



Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1

***Untersuchung zur Expression und Funktion
von HCN-Kanälen in Photorezeptoren und
Bipolarzellen der Mäuseretina***

Frank Thiel

***Untersuchung zur Expression und Funktion
von HCN-Kanälen in Photorezeptoren und
Bipolarzellen der Mäuseretina***

Frank Thiel

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4202

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1 Jül-4202

D 38 (Diss., Köln, Univ., 2005)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Kurzfassung

Die Arbeit untersucht die Expression und die funktionellen Eigenschaften von HCN-Kanälen (hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated) in Photorezeptoren und Bipolarzellen der Mäuseretina. Die Verteilung der HCN-Isoformen 1-4 wurde immunhistochemisch mit isoformspezifischen Antikörpern an Schnitten der Retina untersucht. Die Färbungen wurden mit dem Konfokalen Laserscanning Mikroskop ausgewertet.

In der Mäuseretina ist HCN1 die am stärksten exprimierte Isoform. HCN1 konnte in Stäbchen und Zapfen sowie in Stäbchenbipolarzellen, Typ5 und Typ7 Bipolarzellen nachgewiesen werden. HCN2, HCN3 und HCN4 werden in der Mäuseretina nicht so häufig exprimiert. HCN4 wird in Typ3 Bipolarzellen exprimiert. HCN2 und HCN3 konnten in Photorezeptoren und Bipolarzellen nicht nachgewiesen werden. Diese Isoformen werden besonders in Amakrin- und Ganglienzellen exprimiert.

In retinalen Gewebsschnitten wurden Photorezeptoren und Bipolarzellen elektrophysiologisch im Ganzzellmodus der Patch-clamp Technik abgeleitet und die Aktivierungskinetik und die Strom-Spannungsbeziehung der HCN-Kanäle untersucht. Während der Ableitung wurden die Zellen mit einem Farbstoff gefüllt und anschließend morphologisch identifiziert. Die Eigenschaften der retinalen HCN1-Kanäle unterscheiden sich z.T. von denen heterolog exprimierter HCN1-Kanäle. Die Eigenschaften der HCN1-Kanäle unterscheiden sich auch zwischen verschiedenen retinalen Zelltypen. Dies könnte bedeuten, dass HCN1-Kanäle in der Retina moduliert werden.

Für die Messung retinaler Lichtantworten stand eine transgene Mauslinie zur Verfügung, in der das Gen für die HCN1-Isoform ausgeschaltet worden war – ein „HCN1-Knockout“. Lichtantworten wurden in Form von Elektroretinogrammen (ERG) in vitro von Retinae von Wildtypmäusen und von HCN1-Knockoutmäusen abgeleitet. In HCN1-Knockoutretinae ist die B-Welle des ERGs leicht verlängert. Dies könnte auf eine Verlängerung der Lichtantwort in Photorezeptoren hinweisen. Im skotopischen Flimmer-ERG ist die Frequenzübertragung in der Knockoutretina leicht verschlechtert. Applikation des HCN-Kanalblockers ZD7288 zur Wildtypretina führt ebenfalls zur leichten Verschlechterung der Frequenzübertragung.

Die Untersuchungen liefern erste Erkenntnisse über die Rolle von HCN1-Kanälen an der Ausbildung retinaler Lichtantworten.

Abstract

The aim of this study was to examine the expression and the functional properties of HCN-channels (hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated) in photoreceptors and bipolar cells of the mouse retina. The expression pattern of the four HCN channel isoforms HCN1 - 4 was studied in retinal sections using immunocytochemistry with isoform-specific antibodies. The stainings were analysed using confocal laser scanning microscopy.

In the mouse retina HCN1 is the predominantly expressed isoform. HCN1 could be detected in rods and cones as well as in type5 and type7 bipolar cells. HCN2, HCN3 and HCN4 are not abundantly expressed in the mouse retina. HCN4 was expressed in type 3 bipolar cells. HCN2 and HCN3 could not be found in photoreceptors and bipolar cells. These isoforms were mainly expressed in amacrine and ganglion cells.

In retinal slices photoreceptors and bipolar cells were recorded electrophysiologically in the whole-cell mode of the patch-clamp technique to study the activation kinetics and the mid-point potential of activation of HCN channels. During the recording the cells were filled with dyes and were subsequently morphologically identified. The properties of the retinal HCN1 channels differ to some extent from those of heterologously expressed HCN1 channels. The properties of the HCN1 channels also vary between different cell types. This could mean, that HCN1 channels are modulated in the retina.

To record retinal light-responses, a genetically modified mouse strain was used in which the gene coding for HCN1 has been deleted - "HCN1 knockout". Electroretinogramms (ERG) were recorded in vitro from wildtype retinae and HCN1 knockout retinae. In HCN1 knockout retinae the B-wave of the ERG was slightly elongated. This could reflect extended light-responses of the photoreceptors. In the scotopic flicker-ERG the frequency transfer is slightly reduced in knockout retinae. Application of the HCN channel blocker ZD7288 also slightly reduced the frequency transfer in wildtype retinae.

The study provides first insights into the role of HCN1 channels in the generation of light-responses.

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	I
-----------------------------------	----------

II Abkürzungen	IV
-----------------------------	-----------

1. Einleitung	1
----------------------------	----------

1.1 Aufbau der Retina	1
1.2 Lichtantwort und Signalübertragung.....	2
1.3 HCN-Kanäle.....	4
1.4 HCN Kanäle verändern die Lichtantwort.....	7
1.5 Bipolarzellen	8
1.6 Ziel der Arbeit	9

2. Material und Methoden	10
---------------------------------------	-----------

2.1 Präparation	10
2.1.1 Präparation von Mäuseretinae	10
2.1.2 Anfertigung von Retina Schnitten.....	12
2.2 Elektrophysiologie	13
2.2.1 Die Messkammer.....	13
2.2.2 Der Messstand	14
2.2.3 Durchführung der Patch-clamp Experimente.....	15
2.2.4 Bewertung der Spannungskontrolle	17
2.2.5 Datenanalyse	18
2.2.6 ERG: Präparation dunkeladaptierter Retinae	19
2.2.7 In vitro ERG	19
2.2.8 Die Lichtstimulation.....	20
2.2.9 Kalibrierung des Lichtstimulus	21
2.3 Immunhistochemie	22
2.3.1 Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen	22
2.3.2 Immunhistochemie an der Retina.....	23
2.3.3 Anfertigung von Kryostatschnitten	23
2.3.4 Immunhistochemische Färbung auf Kryostatschnitten	23

2.3.5 Vormarkierung von Bipolarzellen im Schnitt	26
2.4 Heterologe Expression von HCN-Kanälen in HEK293-Zellen	27
3. Ergebnisse	29
3.1 Immunhistochemie	29
3.1.1 Expression von HCN1-4 in der Mäuseretina	29
3.1.2 Typ5 Bipolarzellen exprimieren HCN1	32
3.1.3 Typ3 Bipolarzellen exprimieren HCN4.....	34
3.1.4 Typ2 und Typ3 Bipolarzellen	35
3.1.5 Die Mauslinie GUS _{8.4} GFP exprimiert GFP in Typ7 Bipolarzellen.....	37
3.1.6 Im Mäusestamm Clomeleon-1 wird GFP in Typ9 Bipolarzellen exprimiert	38
3.1.7 Quantifizierung der Bipolarzellen in Ganzretinapräparaten	39
3.2 Einzelzell-Elektrophysiologie	45
3.2.1 HCN1 in HEK293-Zellen	45
3.2.2 Untersuchung an retinalen Zellen des Mäusestammes C57Bl/6.....	48
3.2.2.1 Photorezeptoren exprimieren HCN1	49
3.2.2.2 Funktion von HCN1 in Photorezeptoren.....	51
3.2.2.3 HCN1 in Stäbchenbipolarzellen.....	52
3.2.2.4 HCN1 in Typ5 Bipolarzellen	54
3.2.2.5 Vormarkierung von Typ2 Bipolarzellen mit Antikörpern gegen CD15	55
3.2.2.6 Typ7 Bipolarzellen exprimieren HCN1	57
3.2.2.7 Typ 9 Bipolarzellen exprimieren keinen HCN-Kanal.....	58
3.2.3 Elektrophysiologische Untersuchungen im HCN1-Knockout.....	59
3.2.3.1 Vergleich der Mauslinien C57Bl/6, SV129 und C57SV.....	60
3.2.3.2 Charakterisierung des HCN1-Knockout	63
3.2.3.4 Retinale Lichtantworten	65
3.3 Elektoretinogramm.....	67
3.3.1 Grundlagen des ERG	67
3.3.2 Optimierung der B-Wellenamplitude	69
3.3.3 Eigenschaften des in vitro ERGs	71
3.3.4 Vergleich der B-Welle in Wildtyp- und Knockoutmäusen und nach Applikation von ZD7288	74
3.3.5 Frequenzreihe.....	77

3.3 Elektoretinogramm	67
3.3.1 Grundlagen des ERG.....	67
3.3.2 Optimierung der B-Wellenamplitude.....	69
3.3.3 Eigenschaften des in vitro ERGs.....	71
3.3.4 Vergleich der B-Welle in Wildtyp- und Knockoutmäusen und nach Applikation von ZD7288.....	74
3.3.5 Frequenzreihen	77
 4. Diskussion	80
4.1 Das Expressionsmuster von HCN-Kanälen in der Retina.....	80
4.2 Eigenschaften der HCN-Kanäle in der Retina	81
4.3 Der HCN1-Knockout	85
4.4 Ausblick	87
 5. Literaturverzeichnis.....	89
 6. Danksagung.....	99

II Abkürzungen

°C	Temperatur in Grad Celsius
+/+	wildtyp
+/-	heterozygot
-/-	knockout
±	Standardabweichung
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AC	Amakrinzellen (<u>a</u> macrine <u>c</u> ell)
APB	L-APB, 2-Amino-4-Phosphonobuttersäure
bzw.	beziehungsweise
cAMP	Adenosine-3',5'-zyklisches Monophosphate (<u>a</u> denosine 3',5'- <u>c</u> yclic <u>m</u> onophosphate)
Chat	<u>C</u> holine <u>a</u> cetyl <u>t</u> ransferase
CD15	Epitop CD15
cDNA	Komplementäre DNA (<u>c</u> omplementary DNA)
cGMP	Guanosine-3',5'-zyklisches Monophosphate (<u>g</u> uanosine 3',5'- <u>c</u> yclic <u>m</u> onophosphate)
CNS	Zentrales Nervensystem (<u>c</u> entral <u>n</u> ervous <u>s</u> ystem)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cy3, Cy5	Carbocyanin Derivate
DIC	<u>D</u> ifferential <u>I</u> nterference <u>C</u> ontrast
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
ECACC	Europäische Zellkultursammlung
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure (<u>e</u> thylenediaminetetra <u>a</u> cetic acid)
EGTA	Ethylen-bis-(Oxyethylen-Nitrilo)-Tetraessigsäure (<u>e</u> thylene glycol-bis(β -aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetra <u>a</u> cetic acid)
ERG	<u>E</u> lektro- <u>R</u> etinogramm
et al.	<i>et alii</i> , und Andere
FCS	Fötales Kälberserum (<u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum)
FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> sothi <u>c</u> yanat
g	Gramm
GABA	γ -Amino-Buttersäure (<u>\gamma</u> -aminob <u>u</u> tyric <u>a</u> cid)
CabP	<u>C</u> alcium <u>b</u> inding <u>P</u> rotein
GC	Ganglienzellen (<u>g</u> anglion <u>c</u> ells)
GCL	Ganglienzellschicht (<u>g</u> anglion <u>c</u> ell <u>l</u> ayer)
GFP	grün fluoreszierendes <u>P</u> rotein
GLT-1	<u>G</u> lutamate <u>T</u> ransporter-1
GTP	Guanosine 5'-Triphosphat
GΩ	10 ⁹ Ohm
h	Stunde(n)
HC	Horizontalzellen (<u>h</u> orizontal <u>c</u> ells)
HCN	Hyperpolarisationsaktivierter und zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal (<u>h</u> yperpolarization-activated and <u>c</u> yclic <u>n</u> ucleotide-gated channels)
HCN1	HCN Kanal Isoform 1
HCN2	HCN Kanal Isoform 2
HCN3	HCN Kanal Isoform 3
HCN4	HCN Kanal Isoform 4

HEK293-Zellen	Zellen der menschlichen embryonalen Nierenzelllinie 293(<u>h</u> uman <u>e</u> mbryonal <u>k</u> idney cells)
HEPES	4-(2- <u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl)-1- <u>P</u> iperazin <u>e</u> thansulfonsäure
Hz	Hertz
I	Stromstärke
IC	Interplexiforme Zellen (<u>i</u> nterplexiform <u>c</u> ells)
I _h , I _f , I _q	Strom durch HCN-Kanäle h für hyperpolarisationsaktiviert f für funny (lustig) q für queer (komisch)
I _{Kx}	Strom durch K _x Kalium-Kanäle
INL	innere Körnerzellschicht (<u>i</u> nn <u>e</u> r <u>n</u> uclear <u>l</u> ayer)
intr.	intrazellulär
IPL	innere plexiforme Schicht (<u>i</u> nn <u>e</u> r <u>p</u> lexiform <u>l</u> ayer)
IR	infrarot
IS	Innensegmente der Photorezeptoren (<u>i</u> nn <u>e</u> r <u>s</u> egment)
kHz	10 ³ Hertz
l	Liter
LY	<u>L</u> ucifer <u>Y</u> ellow, 6-Amino-2,3-Dihydro-1,3-Dioxo-2-Hydrazinocarbonylamino-1H-Benz[d,e]isoquinoline-5,8-Disulfonsäure
M	Molar
m	Meter
M10	modifiziertes MEM
MC	Müllerzellen (<u>M</u> üller <u>c</u> ells)
MEM	<u>M</u> inimal <u>E</u> ssential <u>M</u> edium
mGluR6	metabotroper Glutamatrezeptor 6
min	Minute
ml	10 ⁻³ Liter
μl	10 ⁻⁶ Liter
μm	10 ⁻⁶ Meter
mV	10 ⁻³ Volt
MΩ	10 ⁶ Ohm
n	Zahl der Experimente
NFL	Nervenfaserschicht (<u>n</u> erve <u>f</u> ibre <u>l</u> ayer)
NK3R	Neurokinin-3-Rezeptor
nm	10 ⁻⁹ Meter
NMDA	<u>N</u> - <u>M</u> ethyl- <u>D</u> - <u>A</u> spartat
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (<u>n</u> itric <u>o</u> xid <u>s</u> ynthase)
Nr.	Nummer
N-Terminus	Amino-Terminus
OFF-cell	Zellen die bei Belichtung hyperpolarisieren
ON-cell	Zellen die bei Belichtung depolarisieren
ONL	äußere Körnerzellschicht (<u>o</u> ut <u>e</u> r <u>n</u> uclear <u>l</u> ayer)
OPL	äußere plexiforme Schicht (<u>o</u> ut <u>e</u> r <u>p</u> lexiform <u>l</u> ayer)
OS	Außensegmente der Photorezeptoren (<u>o</u> ut <u>e</u> r <u>s</u> egment)
PA	<u>P</u> araformaldehyd
pA	10 ⁻¹² Ampere
PDE	<u>P</u> hosphodi <u>e</u> st <u>e</u> r <u>a</u> se
PEA	Peanutagglutinin
pF	10 ⁻¹² Farad
PB	Phosphat-Puffer (<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffer)

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung (in Mol pro Liter)
PKC	Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase
RT	Raum-Temperatur ($\sim +22^\circ\text{C}$)
s	Steigung der Boltzmann-Kurve
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
U	Spannung
ü.N.	über Nacht
V	Volt
V_m	Membranspannung; in der Spannungsklemme gleich der Kommandospannung
$V_{1/2}$	Spannung halbmaximaler Kanalaktivierung
z.T.	zum Teil
τ	Zeitkonstante
$\varnothing$	Durchmesser

1. Einleitung

1.1 Aufbau der Retina

Die Netzhaut (Retina) entsteht in der Embryonalentwicklung als Ausstülpung des Zwischenhirns und ist somit ein Teil des Zentralnervensystems. Die Retina ist ein ca. 200 μm dickes Nervengewebe, das den Augenhintergrund auskleidet. Sie ist anatomisch klar in die drei Zellkörperschichten ONL, INL und GCL (Outer und Inner Nuclear Layers und Ganglion Cell Layer) geschichtet (**Abb. 1.1**). Es können fünf Klassen von Nervenzellen unterschieden werden (Photorezeptoren, Bipolarzellen, Horizontalzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen), die eine Vielzahl funktioneller Untertypen aufweisen. Die Interaktion der Zellen findet in zwei synaptischen Schichten statt, der OPL und der IPL (Outer und Inner Plexiform Layers).

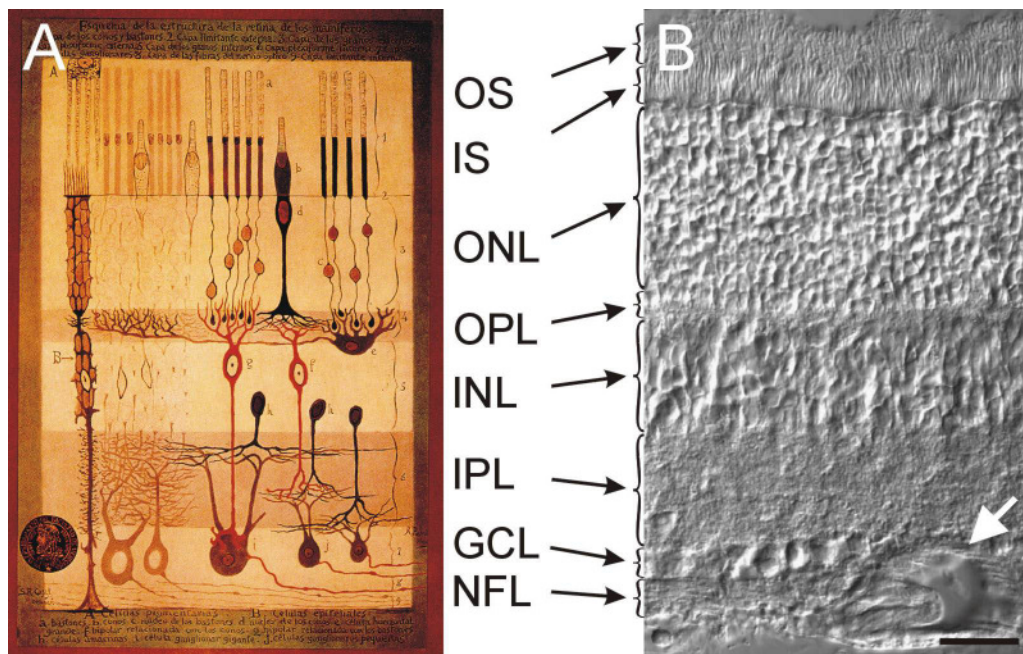


Abb. 1.1: Aufbau der Retina.

A: Schema, die neuronalen Zellen sind in abgegrenzten Schichten angeordnet und in zwei synaptischen Schichten verschaltet. (OS: outer segment layer, IS: inner segment layer, ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, INL: inner nuclear layer, IPL: inner plexiform layer, GCL: ganglion cell layer, NFL: nerve fiber layer; Cajal, um 1890; entnommen aus Hubel, 1988).

B: Vertikalschnitt durch eine Rattenretina, Differential-Interferenz-Kontrast Aufnahme, Pfeil: angeschnittenes Blutgefäß, Balken: 30 μm .

Die lichtempfindlichen Zellen der Retina, die Photorezeptoren (in der ONL), bilden mit den Bipolarzellen (in der INL) und den Ganglienzellen (in der GCL) einen Übertragungsweg für neuronale Signale von der äußeren Schicht der Netzhaut zu höheren Zentren des Gehirns. Horizontalzellen (in der INL) und Amakrinzellen (in der INL und GCL) bilden hauptsächlich laterale Verbindungen.

1.2 Lichtantwort und Signalübertragung

Die Photorezeptoren liegen auf der lichtabgewandten, äußeren Seite der Netzhaut. Das Licht muß aufgrund dieser inversen Anordnung zunächst alle davor liegenden Zellschichten durchdringen, bevor es auf die eigentlichen Photorezeptoren trifft. Im Außensegment der Photorezeptoren entsteht nach Absorption von Licht durch das Photopigment ein elektrisches Signal. Man nennt diesen Prozess Phototransduktion (für Details: Müller und Kaupp, 1998). Es gibt zwei Arten von Photorezeptoren, die Stäbchen und die Zapfen, die unterschiedliche funktionelle Eigenschaften besitzen (zur Übersicht: Dowling, 1987). Stäbchen sind für das Dämmerungssehen zuständig. Sie sind sehr sensitiv und sind in der Lage einzelne Photonen zu detektieren, wie es zum Beispiel bei schwachem Mondlicht der Fall ist. Zapfen sind sehr viel weniger empfindlich und für das Tageslicht- und Farbsehen verantwortlich. Bei Dunkelheit sind beide Photorezeptortypen depolarisiert und schütten den Transmitter Glutamat an ihren Synapsen aus. Bei Belichtung hyperpolarisieren die Photorezeptoren und die Glutamatfreisetzung ist reduziert (zur Übersicht: Müller und Kaupp, 1998).

Zapfen verschalten auf 8-11 morphologisch unterschiedliche Typen von Zapfenbipolarzellen (im Kaninchen, Famiglietti, 1981; in der Katze, Famiglietti, 1981; Kolb et al., 1981; McGuire et al., 1984; Cohen und Sterling, 1990; in Primaten, Boycott und Wässle, 1991; in der Ratte, Euler und Wässle, 1995; Hartveit, 1997; in der Maus, Ghosh et al., 2004). Man unterscheidet zwei Klassen von Zapfenbipolarzellen, so genannte „ON“-Bipolarzellen, die bei Belichtung depolarisieren und so genannte „OFF“-Bipolarzellen, die bei Belichtung hyperpolarisieren. Die Axone von ON-Bipolarzellen stratifizieren in der inneren Hälfte der IPL, der ON-Sublamina nahe der GCL, OFF-Bipolarzellen stratifizieren in der äußeren Hälfte der IPL, der OFF-Sublamina. Zur unterschiedlichen Antwort in ON- und OFF-Bipolarzellen kommt es durch unterschiedliche Glutamatrezeptoren in ihren Dendriten. Eine Glutamatausschüttung im Dunkeln führt in OFF-Bipolarzellen über ionotrope Rezeptoren zu einem Na^+ -Einstrom und zur Erregung. ON-Bipolarzellen besitzen metabotrope Glutamatrezeptoren, deren Aktivierung

zum Schließen von Kationenkanälen führt (Nawy und Jahr, 1991; Yamashita und Wässle, 1991). Diese ON-OFF-Dichotomie wird in den nachfolgenden Verarbeitungswegen beibehalten. ON-Bipolarzellen erregen ON-Ganglienzellen und OFF-Bipolarzellen erregen OFF-Ganglienzellen.

In der Säugerretina verschalten Stäbchen auf Stäbchenbipolarzellen (Boycott und Dowling, 1969; Dacheux und Raviola, 1986; Wässle et al., 1991), die bei Belichtung depolarisieren. Im Säuger sind Stäbchenbipolarzellen nicht direkt mit Ganglienzellen verknüpft. Bei Belichtung erregen die Stäbchenbipolarzellen AII Amakrinzellen. Diese wiederum erregen depolarisierende Zapfenbipolarzellen über elektrische Synapsen und inhibieren hyperpolarisierende Zapfenbipolarzellen über glycinerge Synapsen (Kolb und Famiglietti, 1974; Famiglietti und Kolb, 1975; Kolb und Nelson, 1983; Pourcho und Goebel, 1985; Müller et al., 1988). Bei niedrigen Lichtintensitäten, also unter scotopischen Bedingungen, werden die Signale der Stäbchen über diesen Weg zu den ON- und OFF-Ganglienzellen übertragen.

Bei höheren Lichtintensitäten, im mesopischen Bereich, wird das Stäbchensignal wahrscheinlich zusätzlich noch über zwei weitere Wege übertragen (Volgyi et al., 2004). Zum Einen kann dies über elektrische Verbindungen zwischen Stäbchen und Zapfen geschehen, die sowohl physiologisch (Schneeweis und Schnapf, 1995; Nelson, 1977), als auch anatomisch (Smith et al., 1986) dokumentiert sind. Zum Anderen können Stäbchen wahrscheinlich auch direkt auf einen OFF-Zapfenbipolarzelltyp verschalten (Soucy et al., 1998; Hack et al., 1999; Tsukamoto et al., 2001).

Die Bipolarzellen übertragen die Information vertikal von den Photorezeptoren auf die Ganglienzellen. Ein lateraler Informationsfluss findet über die Horizontalzellen in der OPL und über die Amakrinzellen in der IPL statt.

Sowohl im Stäbchen- als auch im Zapfensystem führt die laterale Inhibition der Horizontalzellen zur Kontrastverstärkung bei angrenzenden hellen und dunklen Bereichen und zur Bildung von rezeptiven Feldern mit exzitatorischem Zentrum und inhibitorischem Umfeld. Während die meisten Säuger zwei Typen von Horizontalzellen besitzen, wurde in Ratte und Maus nur ein Typ beschrieben (Peichl und Gonzalez-Soriano, 1994; Jeon et al., 1998).

Die Lichtantwort wird in der IPL stark durch Amakrinzellen moduliert. Verschiedene Amakrinzelltypen erzeugen dazu laterale Inhibition, negative Rückkopplung und vorwärts gerichtete Inhibition. Die Informationsverarbeitung durch Amakrinzellen ist eine Voraussetzung zur Bildung von komplexen Eigenschaften der rezeptiven Felder einiger Ganglienzelltypen, wie zum Beispiel Bewegungs- und Richtungsselektivität. In Säugern

wurden neunundzwanzig Amakrinzelltypen beschrieben (zur Übersicht: Masland, 1988; Vaney, 1990). Diese übernehmen eng begrenzte Aufgaben wie Umformung und Kontrolle der Ganglienzellantwort. In Säugern wurden zehn bis fünfzehn Ganglienzelltypen gefunden (in der Katze, Boycott und Wässle, 1974; Kolb et al., 1981; im Kaninchen, Amthor et al., 1983, 1984, 1989; Famiglietti, 1987; in der Ratte, Peichl, 1989; in der Maus, Sun et al., 2002). Da die Ganglienzellen die Ausgangsneurone der Retina sind, können die unterschiedlichen Ganglienzellklassen als neuronale Filter betrachtet werden, die unterschiedliche Aspekte der Information eines komplexen Bildes trennen, das auf die Retina projiziert wird. Die Axone der Ganglienzellen bilden die innerste Schicht der Retina, die Nervenfaserschicht (nerve fiber layer, NFL). Alle Ganglienzellaxone laufen zur retinalen Papille (blinder Fleck) und bilden dort den Sehnerv (nervus opticus), der die Signale in die visuellen Zentren des Gehirns weiterleitet (zur Übersicht: Peichl, 1990; Wässle und Boycott, 1991; Masland, 2001).

Um die Funktionsweise der Retina vollständig zu verstehen, müssen zwei Aspekte der Informationsverarbeitung betrachtet werden. Erstens müssen die synaptischen Schaltkreise verstanden werden, um die Netzwerkeigenschaften der Retina zu verstehen. Zweitens muss die Umformung und Modulation der Signale innerhalb der einzelnen Elemente des Netzwerks, der Zelle, verstanden werden. Dazu muss das Repertoire von Ionenkanälen untersucht werden, die die funktionellen Eigenschaften der Zellen bestimmen.

Eine Klasse von spannungsabhängigen Ionenkanälen, die in einer Vielzahl von retinalen Zellen gefunden werden, sind die HCN-Kanäle (hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated).

1.3 HCN-Kanäle

HCN-Kanäle wurden sehr gut in einer Vielzahl von Geweben und heterologen Expressionssystemen untersucht (zur Übersicht: Pape, 1996; Kaupp und Seifert, 2001).

Die HCN-Kanäle wurden in den späten siebziger Jahren im Sinusknoten entdeckt, wo sie an der Generation des Herzrhythmus beteiligt sind. Sie wurden deshalb Schrittmacherkanäle genannt (Brown et al., 1979; Brown und DiFrancesco, 1980; DiFrancesco, 1981a und 1981b; Yanagihara und Irisawa, 1980). Zur Zeit der Entdeckung der Kanäle schienen deren Eigenschaften einzigartig zu sein, dies galt besonders für die Aktivierung durch Hyperpolarisation. Deshalb wurden diese Kanäle I_h (für hyperpolarisationsaktiviert), I_f (funny) oder I_q (queer) genannt. Dieselben Ströme wurden in Pyramidenzellen des

Hippocampus (Halliwell und Adams, 1982; Maccaferri et al., 1993) und in Photorezeptoren (Fain et al., 1978; Baylor et al., 1984; Hestrin, 1987) entdeckt. Mittlerweile wurde die Gensequenz entschlüsselt, die in verschiedenen Vertebraten (Maus, Ratte, Mensch, Kaninchen) und Invertebraten (Seeigel, Fruchtfliege) für HCN-Kanäle codiert (Gauss et al., 1998; Ishii et al., 1999; Krieger et al., 1999; Ludwig et al., 1999; Marx et al., 1999; Seifert et al., 1999; Shi et al., 1999; Vaccari et al., 1999).

In Säugern sind vier HCN-Isoformen (HCN1-4) bekannt. Die vier Gene im Säuger zeigen eine hohe Sequenzhomologie. Hydropathie-Analysen und Sequenzvergleiche zeigen, dass die HCN-Kanäle zur Familie der spannungsabhängigen Kationenkanäle gehören. Die Kanäle werden den *eag* K⁺-Kanälen und den zyklisch-Nukleotid gesteuerten Kanälen zugerechnet (20 – 25 % Sequenzhomologie). Außerdem zeigen HCN-Kanäle einige Ähnlichkeit mit einwärtsgerichtenden K⁺-Kanälen aus *Arabidopsis thaliana* (KAT-Kanäle) (zur Übersicht: Warmke und Ganetzky, 1994; Kaupp und Seifert, 2001; Biel et al., 2002).

HCN-Kanäle setzen sich aus vier Untereinheiten zusammen. Jede Untereinheit besteht aus sechs transmembranalen Helizes (S1 – S6) (**Abb. 1.3**). Das positiv geladene S4-Segment enthält das Spannungsfühler-Motiv, zwischen S5 und S6 bildet sich eine Ionen leitende Pore aus. Am C-Terminus des Kanals befindet sich eine Bindestelle für zyklische Nukleotide. Vier Untereinheiten formen den funktionellen Kanal. In heterologen Expressionssystemen lassen sich funktionelle Kanäle aus vier gleiche Untereinheiten, so genannte homooligomere Kanäle, exprimieren (zur Übersicht: Kaupp und Seifert, 2001).

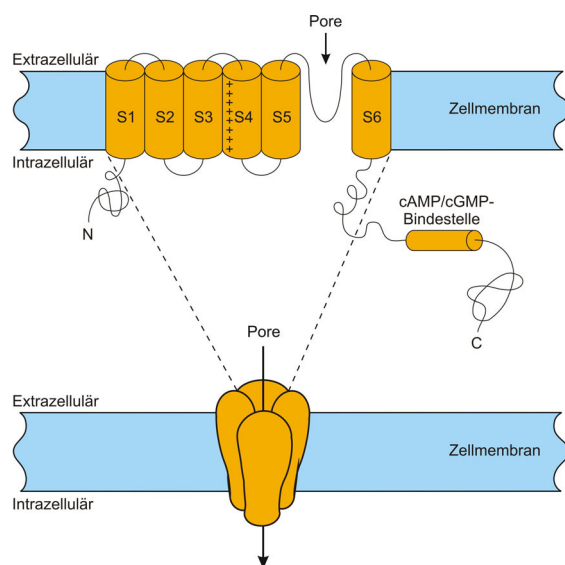


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der HCN-Kanaltopologie.

Der Kanal besteht aus sechs transmembranalen Domänen (S1 – S6). S4 enthält den Spannungssensor, zwischen S5 und S6 bildet sich die Pore aus. Am C-Terminus befindet sich eine Bindestelle für zyklische Nukleotide. Aus vier dieser Untereinheiten wird der funktionelle Kanal gebildet.

Kennzeichen von nativen und exprimierten HCN-Kanälen sind die Aktivierung durch Hyperpolarisation, eine Na^+/K^+ -Leitfähigkeit, Blockierbarkeit durch extrazelluläres Cs^+ und Modulation durch zyklische Nukleotide.

1. Aktivierung der Kanäle: Bei Hyperpolarisation entwickeln sich alle HCN-Ströme mit einem charakteristischen sigmoidalen Zeitverlauf, der auf eine mehrstufige und komplexe Serie von Aktivierungsschritten hindeutet (Kaupp und Seifert, 2001). Die HCN-Isoformen zeigen deutliche Unterschiede in ihrer Aktivierungskinetik. HCN1 besitzt die schnellste, HCN4 die langsamste Aktivierungskinetik.

In der Aktivierungskurve ist der Spannungsbereich abzulesen, in dem der Kanal arbeitet. Die Maßeinheit ist die Spannung bei der der Kanal halbmaximal aktiviert, das so genannte $V_{1/2}$. Das $V_{1/2}$ unterscheidet sich zwischen den HCN-Isoformen.

2. Ionenselektivität: HCN-Kanäle leiten sowohl Na^+ - als auch K^+ -Ionen. Die relative Na^+/K^+ -Leitfähigkeit ist von der extrazellulären K^+ -Konzentration abhängig und variiert zwischen 0,15 und 0,40 (Edman et al., 1987; Hestrin, 1987; Maricq und Korenbrot, 1990; Wollmuth und Hille, 1992; Gauss et al., 1998; Ludwig et al., 1998; Santoro et al., 1998). Unter physiologischen Gradienten monovalenter Ionen liegt das Umkehrpotential zwischen -20 und -30 mV (Seifert et al., 1999; Gauss et al., 1998; Ludwig et al., 1998). Eine Aktivierung der HCN-Kanäle führt unter physiologischen Bedingungen zu einem Einwärtsstrom und damit zur Depolarisation der Zelle.

3. Cäsium-Block: Die HCN-Kanäle werden durch millimolare extrazelluläre Cs^+ -Konzentrationen geblockt ($K_{1/2} = 2.19 \text{ mM}$, in Purkinje-Fasern, DiFrancesco, 1982). Der Block ist spannungsabhängig. HCN-Kanäle werden, im Gegensatz zu einwärtsgerichteten Kanälen wie I_{Kir} , nicht durch millimolare Ba^{2+} -Konzentrationen beeinflusst (Ludwig et al., 1998; Pape, 1996).

4. Modulation durch zyklische Nukleotide: Die Aktivität der Kanäle wird direkt durch die Bindung der zyklischen Nukleotide cAMP ($K_{1/2} = \sim 0.5 \text{ }\mu\text{M}$, gemessen für HCN2; Ludwig et al., 1998) und cGMP ($K_{1/2} = \sim 6 \text{ }\mu\text{M}$, gemessen für HCN2; Ludwig et al., 1998) moduliert. Dabei wird die Aktivierungskurve zu positiveren Spannungen verschoben. Die HCN-Isoformen unterscheiden sich in ihrer Modulierbarkeit. Die Verschiebung des $V_{1/2}$ -Wertes durch cAMP ist am geringsten bei HCN1 ($\sim 2 \text{ mV}$, Santoro et al., 1998; $\sim 4 \text{ mV}$, Chen et al., 2001). HCN2 zeigt eine Verschiebung des $V_{1/2}$ von 12 – 14 mV (Ludwig et al., 1998 und 1999), HCN4 von 11 – 13 mV (Ishii et al., 1999; Ludwig et al., 1999; Seifert et al., 1999).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zeitkonstante der Aktivierung, das $V_{1/2}$ und die Modulation durch zyklische Nukleotide für jede HCN-Isoform spezifisch sind und die Kanäle dadurch unterschieden werden können.

1.4 HCN-Kanäle verändern die Lichtantwort

HCN-Kanäle werden in einer Vielzahl von retinalen Zellen exprimiert und könnten eine wichtige Rolle bei der retinalen Signaltransduktion spielen. In Stäbchen und Zapfen verändern HCN-Kanäle die Lichtantwort. Die Kanäle werden durch Hyperpolarisation bei Belichtung aktiviert und depolarisieren die Zelle in Richtung des ursprünglichen Membranpotentials bei Dunkelheit. Dadurch wird die Lichtantwort transients (Fain et al., 1978; Baylor et al., 1984; Hestrin, 1987). Dies könnte dazu führen, dass das zeitliche Auflösungsvermögen der Retina bei Lichtreizen höherer Frequenz verbessert wird (im Meerschweinchen, Demontis et al., 1999; in der Katze, Gargini et al., 1999; im Bullenfrosch, Satoh und Yamada, 2000; in der Ratte, Maccarone et al., 2004).

HCN-Ströme wurden ebenso in Ganglienzellen gefunden (im Goldfish, Tabata und Ishida, 1996; in der Katze, O'Brien et al., 2002). Dort sollen sie die Erregbarkeit der Zellen nach der Hyperpolarisation verbessern (Tabata und Ishida, 1996).

HCN-Kanäle wurden in Bipolarzellen von Fischen (im Goldfish, Kaneko und Tachibana, 1985; im Barsch, Lasater, 1988; im Zebrafisch, Connaughton und Maguire, 1998), Kaninchen (Kim et al., 2003), differentiell exprimiert in Bipolarzellen von Ratten (Karschin und Wässle, 1990; Ma et al., 2003; Müller et al., 2003) und in einigen unidentifizierten Bipolarzellen der Maus (Kaneko et al., 1989) gefunden. Über die Funktion von HCN-Kanälen in Bipolarzellen ist nichts bekannt.

Das Ziel dieser Studie ist es, HCN-Kanäle in Bipolarzellen der Mäuseretina elektrophysiologisch zu untersuchen. Außerdem sollen Lichtantworten in normalen Retinae und in Retinae transgener Tiere, bei denen der HCN1-Kanal ausgeschaltet wurde, verglichen werden, um Rückschlüsse über die physiologische Funktion der HCN1-Kanäle ziehen zu können.

1.5 Bipolarzellen

In der Mäuseretina wurden zehn morphologisch unterschiedliche Bipolarzelltypen beschrieben (Ghosh et al., 2004). Man unterscheidet neun Zapfenbipolarzellen und eine Stäbchenbipolarzelle. Weiter werden die Zapfenbipolarzellen in „OFF“-Bipolarzellen (Typ 1 – 4), die bei Belichtung hyperpolarisieren, und „ON“-Bipolarzellen (Typ 5 – 9), die bei Belichtung depolarisieren, unterteilt. Die Stäbchenbipolarzelle ist eine „ON“-Bipolarzelle.

Das wichtigste morphologische Unterscheidungskriterium ist das Stratifikationsniveau der Axonterminalsysteme (**Abb. 1.5**). Nach Cajal lässt sich die IPL in fünf Sublaminae (1-5) gleicher Dicke unterteilen. Der Antikörper gegen das Kalzium-bindende Protein Calretinin färbt drei dendritische Strata in der IPL (siehe **Abb. 1.5**, rot markierte Banden). Zwei der Strata werden von den Dendriten cholinergischer Amakrinzellen gebildet. Das äußere Stratum (zwischen Sublamina 1 und 2) stammt von den Dendriten OFF-cholinergischer Amakrinzellen, das innere Stratum (zwischen Sublamina 3 und 4) von den Dendriten ON-cholinergischer Amakrinzellen. Das Stratum in der Mitte der IPL (zwischen Sublamina 2 und 3) wird von den Dendriten einer NOS-immunoreaktiven (nitric oxid synthase) Amakrinzelle (Haverkamp und Wässle, 2000; Ghosh et al., 2004) gebildet. Ein Antikörper gegen Cholinacetyltransferase färbt nur die beiden Banden der cholinergen Amakrinzellen.

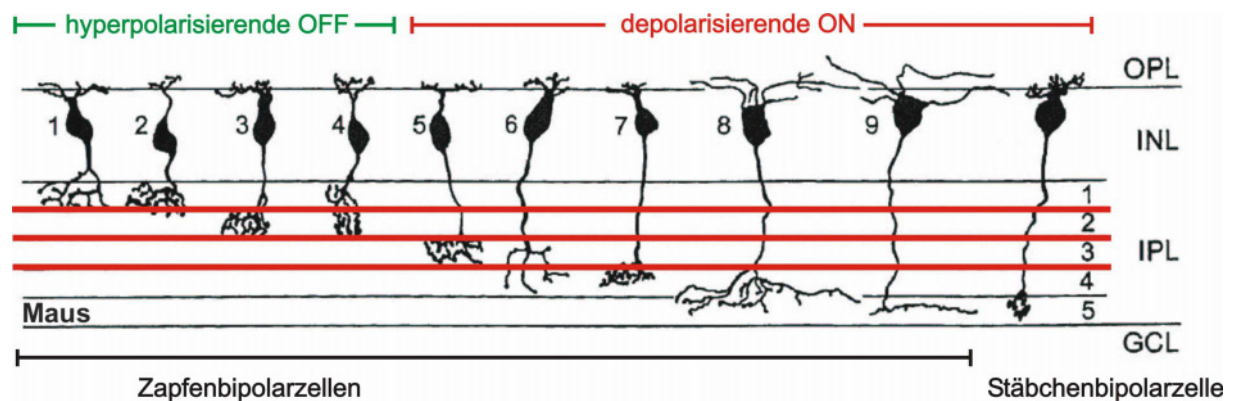


Abb. 1.5 : Morphologische Klassifikation der Bipolarzellen in der Mäuseretina

Klassifikationsschema der Bipolarzellen in der Mäuseretina (nach Ghosh et al., 2004). Man unterscheidet neun Zapfenbipolarzelltypen (nummeriert) und eine Stäbchenbipolarzelle. Typ 1 – 4 sind OFF-Bipolarzellen, die bei Belichtung hyperpolarisieren, Typ 5 – 9 und die Stäbchenbipolarzelle sind ON-Bipolarzellen, die bei Belichtung depolarisieren. Die fünf Sublaminae der IPL sind markiert, außerdem sind die drei Calretinin-positiven Strata rot markiert.

Man benützt diese Färbungen als Orientierungshilfe in der IPL (im Huhn, Baughman und Bader, 1977; im Kaninchen, Masland und Mills, 1979; Hayden et al., 1980; in der Ratte,

Voigt, 1986; in der Maus, Ghosh et al., 2004), um das Stratifikationsniveau der Bipolarzellen besser bestimmen zu können.

1.6 Ziel der Arbeit

In der Mäuse- und Rattenretina wurden zehn Bipolarzelltypen morphologisch klassifiziert, aber es ist wenig über ihre Eigenschaften und Funktion bekannt. Das Repertoire von HCN-Kanälen in Bipolarzellen der Rattenretina ist gut untersucht (Müller et al., 2003). Die HCN-Isoformen sind dort differentiell exprimiert. In Bipolarzellen der Maus ist weder etwas über das Inventar und die Verteilung von HCN-Kanälen, noch etwas über die physiologische Funktion dieser Kanäle bekannt. Sind die HCN-Kanäle in der Mäuseretina auch differentiell exprimiert? Welche Eigenschaften und physiologische Bedeutung haben sie? Warum gibt es zehn Typen von Bipolarzellen? Sind alle Bipolarzelltypen gleich häufig? Unterscheiden sich die Bipolarzelltypen nicht nur morphologisch, sondern auch elektrophysiologisch?

Mit dem Maussystem hat man die Möglichkeit mit transgenen Tieren, wie dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten „HCN1-Knockout“ zu arbeiten. Bei dieser Mauslinie wurde der HCN1-Kanal ausgeschaltet. Vergleicht man Lichtantworten dieser Tiere mit denen genetisch unveränderter Tiere, so lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion der HCN1-Kanäle ziehen. Dazu müssen Wildtyptiere und Knockouttiere zuerst genau untersucht und charakterisiert werden. Eine wichtige Frage ist, welcher Bipolarzelltyp welche HCN-Isoform exprimiert.

Es gibt gegen alle HCN-Isoformen Antikörper, die als molekulares Werkzeug zum Nachweis von HCN-Kanälen dienen können. Außerdem gibt es für viele Bipolarzelltypen spezifische Antikörpermarker, die eine detaillierte immunhistochemische Analyse ermöglichen. So lässt sich immunhistochemisch die Expression von HCN-Kanälen einzelnen Bipolarzelltypen zuordnen (**Kap. 3.1**).

In retinalen Schnitten können Bipolarzellen elektrophysiologisch abgeleitet und dabei mit einem fluoreszierenden Farbstoff gefüllt und morphologisch identifiziert werden. Dadurch lassen sich morphologischen Zelltypen elektrophysiologische Eigenschaften zuordnen (**Kap. 3.2**).

Mit dem in vitro ERG können Lichtantworten von „HCN1-Knockouttieren“ mit denen unveränderter Tiere verglichen werden, um somit Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung des HCN1-Kanals in der Retina zu erhalten (**Kap. 3.3**).

2. Material und Methoden

2.1 Präparation

2.1.1 Präparation von Mäuseretinae

Es wurden Retinae adulter Mäuse der Stämme C57Bl/6 und SV129, sowie Mäuse mit gemischtem genetischen Hintergrund „C57SV“ im Alter von fünf bis vierzehn Wochen untersucht. Die Mäuse wurden von Charles River, Elevage Janvier, oder aus der eigenen Tierzucht bezogen. Außerdem wurden Tiere aus drei transgenen Mauslinien verwendet. In der HCN1-Knockout-Linie (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. E. Kandel, New York) wurde der HCN1-Kanal ausgeschaltet (Nolan et al., 2003). In der Mauslinie GUS_{8.4}GFP (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. R. F. Margolskee, New York) wird das grünfluoreszierende Protein GFP unter der Kontrolle des Gustducinpromotors als Transgen exprimiert (Wong et al., 1999). In der Mauslinie Clomeleon-1 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. T. Kuner, Heidelberg), wird Clomeleon, ein GFP-Dimer unter der Kontrolle des Thy1-Promotors als Transgen exprimiert (Kuner und Augustine, 2000; Kuner et al., 2002). Die Tiere hatten einen zwölfstündigen Tag/Nacht-Rhythmus mit Kunstlicht von 7.00 bis 19.00 Uhr.

Die HCN1-Knockoutmäuse sind vom Stamm SV129 (Nolan et al., 2003). Als Standardtiere für physiologische Untersuchungen werden allerdings Mäuse des Stammes C57Bl/6 verwendet, die sich in ihrem genetischen Hintergrund von den SV129 Mäusen unterscheiden. Um HCN1-Knockoutmäuse mit reinem C57Bl/6 Hintergrund zu erhalten, müssten die SV129 Knockouttiere über 10 – 20 Generationen mit C57Bl/6 Mäusen rückgekreuzt werden. Dies würde viel Zeit in Anspruch nehmen. Eine zeitsparende, allgemein anerkannte Möglichkeit besteht darin, SV129 Knockouttiere mit C57Bl/6 Wildtypen zu kreuzen und somit Knockouttiere mit gemischtem genetischen „C57SV“ Hintergrund zu erhalten.

Die uns gelieferten, für den HCN1-Knockout heterozygoten SV129 Mäuse wurden mit C57Bl/6 Mäusen gekreuzt. Die daraus hervorgehende F1-Generation wurde genotypisiert. Dazu wurde von jedem Tier genomische DNA aus einer Schwanzbiopsie präpariert. Durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit geeigneten Primern konnte der Genotyp bestimmt

werden. Die gemischtrassigen, heterozygoten F1-C57SV Tiere wurden untereinander weiterverpaart. In der F2-Generation erwartet man nach Mendel 25% homozygote normale Kontrolltiere (HCN1 $+/+$ F2C57SV), 50% heterozygote Kontrolltiere (HCN1 $+/-$ F2C57SV) und 25% homozygote HCN1-Knockouttiere (HCN1 $-/-$ F2C57SV). Diese Tiere hatten nun alle den gemischten genetischen Hintergrund C57SV. Auch die F2-Tiere wurden mittels PCR genotypisiert.

Zuchtplan für den HCN1-Knockout

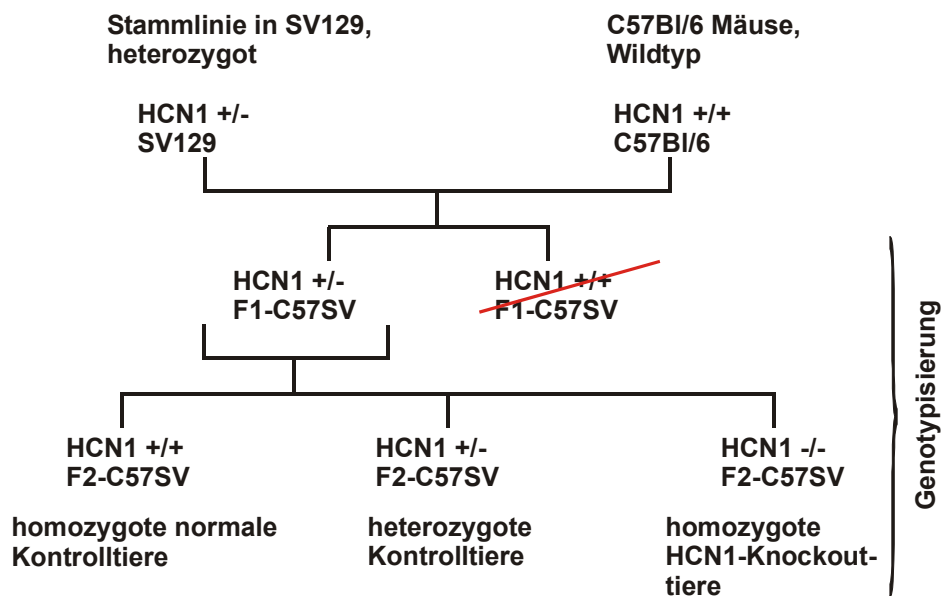


Abb. 2.1.1: Zuchtplan für den HCN1-Knockout.

Mäuse der heterozygoten Stammlinie SV129 wurden mit C57Bl/6 Wildtyp Mäusen gekreuzt. Nach Genotypisierung der F1-Generation wurden die heterozygoten Tiere untereinander weitergekreuzt. Die F2-Generation verteilte sich nach Mendel in homozygote normale Kontrolltiere (HCN1 $+/+$ F2C57SV), heterozygote Kontrolltiere (HCN1 $+/-$ F2C57SV) und homozygote Versuchstiere (HCN1 $-/-$ F2C57SV). Die Knockout-Zuchttiere wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. E. Kandel, New York.

Es wurden Retinae von hell- oder dunkeladaptierten Mäusen präpariert. Soweit nicht anders beschrieben wurden die Mäuse bei Tageslicht (ca. 1000 Lux) präpariert. Die Tiere wurden zuerst mit Isofluran (Curamed Pharma, Karlsruhe) betäubt und dann dekapitiert. Anschließend wurden die Augen entnommen und in eine Schale mit oxygenierter Hanks-Lösung (**Tab. 2.2.3**) überführt. Die Augen wurden unter dem Binokular mit einer Kanüle angestochen und entlang der Ora serrata mit einer kleinen Schere aufgeschnitten. Mit feinen Pinzetten wurden Cornea, Linse und Glaskörper entfernt und die Retina vom Augenbecher vorsichtig gelöst. Die Ränder der Retina wurden glatt geschnitten. Danach wurde der Augenbecher nach hinten umgestülpt und der Sehnerv am blinden Fleck durchtrennt. Mit

einem Löffelspatel wurde die Retina in eine selbst gefertigte, mit oxygenierter Hanks-Lösung gefüllte Kammer überführt, in der die folgende Schneideprozedur durchgeführt wurde (**Abb. 2.1.2**).

2.1.2 Anfertigung von Retina Schnitten

Die Retina wurde mit zwei feinen Pinseln mit den Photorezeptoren nach oben auf einem Millipore Filter (Schleicher und Schuell, NC10, Dassel, Deutschland) ausgebreitet (**Abb.2.1.2**). Unter dem Filter befand sich ein poröser Glasstein, durch den man mit einer 20 ml Plastikspritze Unterdruck an den Filter anlegen konnte. Dadurch wurde die Retina an den Filter gesaugt und haftete daran. Dies ermöglichte es, die Retina mit Hilfe des Filters zu bewegen und in eine Schneide-Vorrichtung einzuspannen, ohne die Retina selbst zu berühren. Vertikalschnitte von Retina und Filter wurden durch folgende Techniken hergestellt und optimiert. Zum Einen wurde eine gekrümmte Skalpell-Klinge über den Filter gerollt (Boos et al., 1993), zum Anderen wurde mit einer geraden Rasier-Klinge „gestempelt“. Um die Schnittdicke einzustellen, wurde die gesamte Kammer mit der Retina durch Drehen an einer Mikrometerschraube nach jedem Schnitt, relativ zur Klinge versetzt. Dadurch wurden Schnitte von 150 μm Dicke hergestellt.

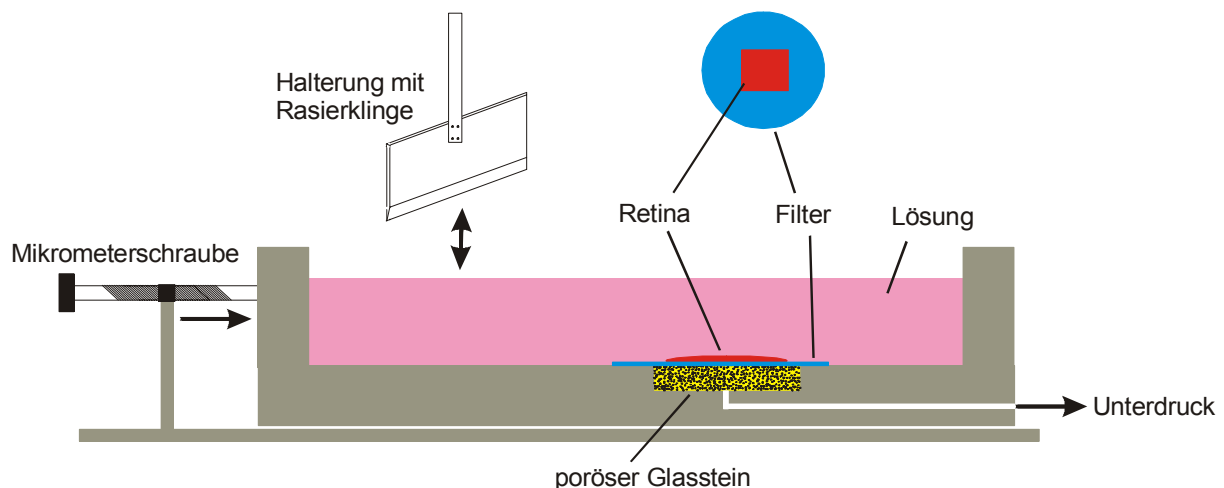


Abb. 2.1.2: Die Schnittstation.

Die Kammer wurde mit begaster Hanks-Lösung gefüllt. Die Retina wurde zu einem Rechteck geschnitten und mit feinen Pinseln auf einem Millipore Filter ausgebreitet. Über einen porösen Glasstein konnte mit einer Spritze Unterdruck an den Filter angelegt werden. Dadurch wurde die Retina an den Filter gesaugt und haftete daran. Mit einer Klinge wurde die Retina in 150 μm dicke Schnitte geschnitten. Dazu wurde die gesamte Kammer mit der Retina vor jedem Schnitt durch eine Mikrometerschraube um 150 μm relativ zur Klinge versetzt.

Die Schnitte wurden, mit oxygenierter Hanks-Lösung bedeckt, in einer geschlossenen Petrischale bei Dunkelheit aufbewahrt. Die Petrischale wurde mit angefeuchtetem Sauerstoff durchströmt. Dadurch waren die Schnitte ausreichend mit Sauerstoff versorgt, so dass das Gewebe für mindestens sechs Stunden am Leben erhalten werden konnte. Zur Durchführung der Patch-clamp Experimente wurde immer nur ein Schnitt entnommen und in die Messkammer gelegt.

2.2 Elektrophysiologie

2.2.1 Die Messkammer

Die elektrophysiologischen Messungen wurden in einer Plexiglaskammer mit einem Glasboden und einem Volumen von ca. 200 μl durchgeführt (**Abb. 2.2.1**). An gegenüberliegenden Seiten waren Einschnitte zur Fixierung des Schnittes angebracht. Die Kammer wurde kontinuierlich mit Sauerstoff-gesättigter Hanks-Lösung durchspült (ca. 2 ml/min). Vier unterschiedliche, oxygenierte Lösungen konnten schwerkraftgetrieben über

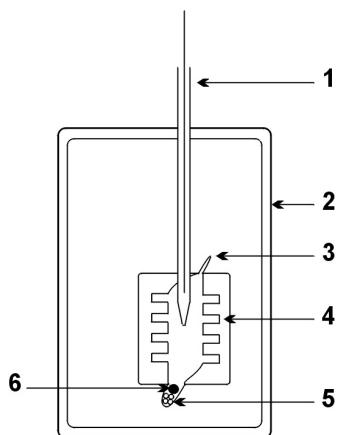


Abb. 2.2.1: Schemazeichnung der Messkammer für Retinaschnitte: 1 - Patch-Pipette mit Elektrode; 2 – Rand der Kammerhalterung; 3 – Ausgang der Kammer, aus dem Lösung über die Pumpe abgesaugt wurde; 4 – Einschnitte zur Fixierung der Schnitte; 5 – Zulauf in die Kammer; 6 – Referenzelektrode.

Plastikschläuche (Tygon), die in vier verbundenen Kanülen endeten, in die Kammer gespült werden. Pharmaka wurden so durch kompletten Badwechsel appliziert. Durch eine Peristaltik-

Pumpe (Varioperpex II, LKB) konnte Lösung vom anderen Ende der Kammer abgesaugt werden. Die Referenzelektrode wurde in der Nähe des Zulaufs in der Kammer positioniert.

2.2.2 Der Messstand

Alle elektrophysiologischen Messungen wurden an folgendem Messstand durchgeführt. Der gesamte Messstand befand sich in einem geerdeten Faraday'schen Käfig. Die Retinaschnitte wurden unter einem aufrechten Mikroskop (Axioskop FS, Zeiss) mit Wasser-Immersions Objektiv (Zeiss, 40/0.75 W) und DIC (Differential Interference Contrast) Optik betrachtet. Als Lichtquelle diente eine konventionelle Mikroskopleuchte. Mit Hilfe einer Quecksilberdampf-Lampe konnte unter Auflicht Fluoreszenz angeregt werden. Um mit Lucifer Yellow (LY) gefüllte Zellen sichtbar zu machen, wurde der Zeiss Filtersatz Nr. 5 verwendet. Um mit Alexa 488 gefüllte Zellen, sowie GFP in HEK293-Zellen und in retinalen Zellen zu sehen, wurde der Zeiss Filtersatz Nr. 9 benützt.

Die elektrischen Messungen wurden mit zwei Ag/AgCl-Elektroden durchgeführt. Als Referenzelektrode wurde ein Ag/AgCl Pellet verwendet, als Ableitelektrode diente ein Ag/AgCl Draht in einer Glaspipette. Die Glaspipette wurde aus filamentiertem Borosilikat-Glas (Hilgenberg, Malsfeld) auf einem horizontalen DMZ-Universal Puller (Zeitz, Augsburg) gezogen. Die Pipetten hatten unter Standardbedingungen einen Widerstand von 7-10 MΩ.

Die Elektroden waren mit dem Vorverstärker (CV 201A) eines Patch-clamp Verstärkers (Axopatch 200A, Axon Instruments) verbunden. Der Vorverstärker war auf einen Mikromanipulator (SM 1; Luigs & Neumann) montiert. Mikroskop und Mikromanipulator waren fest auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Newport, VH 3036-OPT) befestigt.

Clampex 6 Software wurde zur Stimulation und zur gleichzeitigen Datenerfassung eingesetzt. Halte- und Kommandospannung des applizierten Stimulus wurden von einem 12-bit Digital-zu-Analog Wandler umgewandelt. Signale wurden nach Tief-Pass-Filterung von 5 kHz in einem 12-bit 125 kHz Analog-zu-Digital Wandler (TL-1, Axon Instruments) digitalisiert. Die Daten wurden mit einer Abtastrate von 1-10 kHz aufgenommen und auf der Festplatte eines Rechners gespeichert.

2.2.3 Durchführung der Patch-clamp Experimente

Für die Durchführung der Messung wurde ein mit HEK293-Zellen bewachsenes Glasplättchen, bzw. ein Retinaschnitt in die Messkammer gelegt. Die Messungen wurden in Sauerstoff-gesättigter Hanks-Lösung bei RT durchgeführt. Bei Patch-clamp Experimenten wurden Pipetten mit $\sim 8 \text{ M}\Omega$ Widerstand verwendet, die mit intrazellulärer Lösung (Tab. 2.2.3) gefüllt waren. Für die Messung wurde die Pipette gegen eine intakte Zelle gedrückt und ein schwacher Unterdruck angelegt, um einen „Gigaseal“ zu erzielen. Der Seal-Widerstand lag üblicherweise über $3 \text{ G}\Omega$. Nach elektrischer Kompensation der Pipettenkapazität wurde der Membranfleck unter der Pipette durch kurzes Saugen durchgerissen und die Ganzzellkonfiguration etabliert.

Die Zellen wurden meist in der Spannungs-Klemme vermessen. Hierbei wird die Spannung vorgegeben und der resultierende Strom gemessen. Standardmäßig wurden Bipolarzellen und Photorezeptoren bei einem Haltepotential von $V_m = -60 \text{ mV}$ gehalten. Es wurden Familien von Spannungssprüngen von -60 mV bis -135 mV in -15 mV Schritten (500 ms Dauer) appliziert, um HCN-Kanäle zu aktivieren und HCN-Ströme aufzunehmen. Nach jeder Hyperpolarisation wurde die Zelle für 250 ms auf $V_m = -60 \text{ mV}$ geklemmt um „tail-Ströme“ zu messen. Bei -60 mV besitzen die HCN-Kanäle eine gewisse Offenwahrscheinlichkeit, zudem schließen die Kanäle bei -60 mV nur sehr langsam. Um die Kanäle möglichst schnell zu schließen, wurde anschließend für 150 ms auf $V_m = -10 \text{ mV}$ depolarisiert. Nach weiteren 100 ms wurde der nächste Spannungssprung angewandt.

Um die HCN-Kanäle näher zu untersuchen, wurden zwei Parameter im Detail betrachtet: die Aktivierungskinetik und die Strom-Spannungsbeziehung.

Die Aktivierungskinetik kann als Kriterium verwendet werden, um die HCN-Isoformen zu bestimmen. Dazu wurde die Aktivierungskinetik im oben beschriebenen Protokoll im letzten Sprung auf $V_m = -135 \text{ mV}$ bestimmt. Die Dauer von 500 ms war bei -135 mV ausreichend, um HCN1 vollständig zu aktivieren und den stabilen Zustand zu erreichen. Die Aktivierungskinetik wurde nur während der ersten Minute nach Erreichen der Ganzzell-Konfiguration gemessen. Während dieser Zeit konnte kein erkennbarer „rundown“ der HCN-Kanalaktivität festgestellt werden.

Der zweite Parameter, der im Detail untersucht wurde, war die Strom-Spannungsbeziehung. Dazu wurden Familien von Spannungssprüngen von -10 bis -135 mV angelegt. Nach jeder Hyperpolarisation wurde der „tail-Strom“ bei -110 mV gemessen. Dann wurde die Membranspannung auf $V_m = -10 \text{ mV}$ geklemmt, um die Kanäle zu schließen. Die Protokolle

variierten je nach Zelltyp in der Länge, dem Ausgangsniveau und der Schrittweite der Spannungsfamilien.

In einigen Fällen wurden Zellen in der Strom-Klemme vermessen. Die Zelle wurde dabei durch Strom-Injektion auf einem Membranpotential von -60 bis -70 mV gehalten. Dann wurden Familien von Stromsprüngen vorgegeben und die resultierende Membranspannung gemessen. Die Stromsprünge hatten eine Schrittweite von -2.5 pA und wurden im FAST-CLAMP Modus des Verstärkers durchgeführt.

Die Zellen wurden während der Messung mit Biocytin und dem Farbstoff „Lucifer Yellow“, bzw. Alexa 488 gefüllt. Nach der Ableitung wurden die Retinaschnitte in 4% Paraformaldehyd fixiert und immunhistochemisch gefärbt.

Substanzen	Extrazelluläre Lösung (Hanks) [mM]	Extrazelluläres Ames Medium [mM]	Intrazelluläre Lösung [mM]
NaCl	146,89	119,99	10,00
KC ₆ H ₁₁ O ₇	-	-	126,00
KCl	5,36	3,09	4,00
KPO ₄	-	0,50	-
CaCl ₂	0,81	1,68	1,00
MgCl ₂	1,25	1,42	1,00
Hepes	10,00		10,00
D-Glukose	5,55	5,45	-
Phenolrot	0,03	-	-
EGTA	-	-	10,00
ATP	-	-	1,00
1 mol Mg ²⁺ /mol	-	-	
GTP	-	-	1,00
3 mol Na ⁺ /mol	-	-	
Lucifer Yellow (LY) bzw. Alexa 488	-	-	0,15 bzw. 0,1
Biocytin	-	-	10,00
NaHCO ₃	-	22,14	-
	-	inkl. verschiedener Zusätze, wie Aminosäuren	-
	pH 7,4; mit NaOH eingestellt	pH 7,4; mit NaHCO ₃ und begast mit Carbogen bei 35°C eingestellt	pH 7,3; mit KOH eingestellt

Tab. 2.2.3: Extrazelluläre Hanks- und Ames-Lösungen und intrazelluläre Lösung.

Bei Zugabe von z.B. 3 mM CsCl zur extrazellulären Lösung, wurde die entsprechende Menge an NaCl durch CsCl ersetzt. Nernstpotentiale für die Kombination Hanks-Lösung / intrazelluläre Lösung: Na⁺ = +69 mV; K⁺ = -82 mV; Cl⁻ = -55 mV.

Die extra- und intrazellulären Lösungen beinhalteten Ionen unterschiedlicher Konzentration. In der Badlösung herrscht eine hohe Cl⁻-Konzentration, in der Pipettenlösung eine hohe Glukonat-Konzentration. Die Mobilität von Cl⁻ ist deutlich höher als die von Glukonat. Dies führt dazu, dass Cl⁻ entlang seines Konzentrationsgradienten vom Bad in die Pipette

diffundiert. Dieser negative Strom erzeugt ein negatives Potential (Übergangspotential oder „liquid junction Potential“), das bei der Offset-Korrektur nach Eintauchen der Pipette ins Bad manuell mit abgeglichen wird. Im Ganzzellmodus existiert dieses Übergangspotential nicht mehr, die Offset-Korrektur ist jetzt um den Betrag dieses Potentials „überkorrigiert“.

Das Potential wurde mit -10 mV gemessen (nach Neher, 1992). Der Wert, der mit dem „Junction Potential Calculator“ (Clampex 8, Axon Instruments) berechnet wurde, liegt bei -12 mV. Die Membranspannung wurde nachträglich um das gemessene Potential von -10 mV korrigiert.

2.2.4 Bewertung der Spannungskontrolle

Bipolarzellen in der Mäuseretina besitzen abhängig vom Zelltyp Axone von 15 bis 60 µm Länge und ungefähr 1 µm Durchmesser. Stäbchenbipolarzellen besitzen das längste Axon mit ~ 60 µm. Dies wirft die Frage auf, ob das Axonterminalsystem dieser Zellen richtig geklemmt werden kann. Ausgehend von einer Zelloberfläche von 400 µm², einem Membranwiderstand von 10 GΩ, einem cytoplasmatischen Widerstand von 2 Ω*m und einem Axondurchmesser von 1 µm (Daten aus De la Villa et al., 1998) kann mit folgender Formel eine Längskonstante von 700 µm berechnet werden:

$$\lambda = \sqrt{\frac{R_m * A * d}{4 * R_i}}$$

R _m	-	Membranwiderstand
R _i	-	cytoplasmatischer Widerstand
A	-	Oberfläche der Zelle
d	-	Axondurchmesser
λ	-	Längskonstante

Bei einer Axonlänge von maximal 60 µm und einer Längskonstante von 700 µm erhält man einen Spannungsabfall von maximal 5 % in den distalen Bereichen der Zelle. Deshalb war es nicht notwendig, den Spannungsabfall in der Zelle zu kompensieren.

2.2.5 Datenanalyse

Die Daten wurden mit Clampfit 6 und Clampfit 8 Software (Axon Instruments) ausgewertet. Die fertigen Abbildungen wurden mit Excel und Sigma Plot hergestellt.

Es wurden nur Zellen mit vernachlässigbarem Leckstrom und guten Eingangswiderständen ausgewertet. Diese lagen bei Stäbchen und Stäbchenbipolarzellen über 1 GΩ, bei Typ 5 Bipolarzellen um 700 MΩ und bei HEK293-Zellen bei 300-800 MΩ. Die Leckströme wurden nicht abgezogen. Alle Daten wurde nachträglich um das „liquid junction Potential“ von -10 mV korrigiert (siehe **Kap. 2.2.3**).

Die Aktivierungskinetik der HCN-Ströme wurde mathematisch beschrieben, indem eine einfach exponentielle Funktion an die späte ansteigende Phase der HCN-Ströme bei $V_m = -135$ mV angepasst wurde („exponentieller Fit“). Die anfängliche Verzögerung bis zum Start dieser Phase wurde nicht mitgefittet. Zur Berechnung der Größe der HCN-Ströme wurde die Amplitude der instantanen Ströme (zu Beginn des Sprungs) von der Amplitude des stabilen Zustands am Ende des Sprungs abgezogen.

Zur Auswertung der Strom-Spannungsbeziehung wurden die „tail-Ströme“ als Funktion der Spannung aufgetragen und mit der Boltzmann Funktion wie folgt gefittet:

$$I = A + \frac{I_{\max}}{1 + \exp\left(\frac{-(V_m - V_{1/2})}{s}\right)},$$

I	-	tail-Strom,
A	-	Offset,
$I_{\max}$	-	maximaler Strom,
V_m	-	angelegte Testspannung,
$V_{1/2}$	-	Spannung halbmaximaler Aktivierung,
s	-	Steigung der Boltzmann Funktion.

Die $V_{1/2}$ -Werte aus verschiedenen Experimenten wurden gemittelt und ab $n > 2$ (n = Zahl der Experimente) mit der Standardabweichung (+/-) angegeben. Zur graphischen Darstellung wurden die tail-Ströme aus jeder Messung auf den Maximalwert der Boltzmann Funktion normiert. Die normierten tail-Ströme wurden gemittelt und als Mittelwert mit Standardabweichungen dargestellt. Der Fit der gemittelten Werte mit der Boltzmann Funktion ergab sehr ähnliche Werte, wie die gemittelten Werte der individuellen Boltzmann Fits.

2.2.6 ERG: Präparation dunkeladaptierter Retinae

Zur Durchführung von ERG-Experimenten (Elektro-Retinogramm) wurden Mäuse zur Dunkeladaptation über Nacht, beziehungsweise für mindestens 2h in völlige Dunkelheit verbracht. Die Präparation der Retinae erfolgte wie unter **2.1.1** beschrieben, allerdings wurde die Retina für die ERG-Experimente, nachdem sie am Filter festgesaugt wurde, in vier gleich große Teile geschnitten.

Die gesamte Präparation erfolgte in einem völlig abgedunkelten Raum mit Lichtschleuse. Zur Präparation wurde ein Nachtsichtgerät (Bushnell Pathfinder) mit Infrarot (IR)-Diode und Infrarotkonverter verwendet. Die Präparation wurde in Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begastem Ames-Medium (Sigma, A1420-1L) (**Tab. 2.2.3**) durchgeführt. Die Schnitte wurden in einer lichtdichten Kammer in zirkulierendem, Carbogen-begastem Ames-Medium bei RT aufbewahrt. Auch der weitere Umgang mit den Schnitten erfolgte ausschließlich unter Infrarot-Bedingungen.

2.2.7 In vitro ERG

Die ERGs in vitro wurden einer ähnlichen Kammer wie in **2.1.2** beschrieben, abgeleitet. Auf dem Boden der Kammer war ein ringförmig gebogener Ag/AgCl-Draht als Referenzelektrode angebracht. Die Lichtstimulation erfolgte wie in **2.2.8** beschrieben, von unten durch die Öse der Referenzelektrode. Für die Experimente wurden die Filterstücke mit dem Retinastück, mit den Photorezeptoren nach oben auf die Referenzelektrode gelegt. Als Ableitelektrode wurde eine Glaspipette (~ 6 MΩ) mit Ag/AgCl-Draht wie in **2.2.3** verwendet. Die Pipette wurde auf Höhe der Photorezeptoraußensegmente eingestellt.

Die Messungen fanden in Carbogen-gesättigtem Ames-Medium statt. Als Pipettenlösung wurde Hanks-Lösung verwendet. Die Messungen wurden in der Strom-Klemme mit den unter **2.2.2** beschriebenen Geräten durchgeführt. Die Daten wurden nach Tief-Pass-Filterung von 1 kHz mit einer Abtastrate von 2 kHz auf dem Rechner gespeichert. Zur Auswertung wurden die Daten mit einem 50 Hz Gauss-Filter in Clampfit 8 digital nachgefiltert.

2.2.8 Die Lichtstimulation

In vitro ERG-Experimente wurden im selben Messstand wie unter 2.2.2 beschrieben durchgeführt. Der Faraday'sche Käfig, in dem sich das Präparat befand, konnte während der Dunkelexperimente durch schwarze Vorhänge abgedunkelt werden, um Streulicht von außen abzuschirmen. Die Präparate wurden mit einer konventionellen Mikroskopleuchte durch einen Langpaß IR-Filter (RG 850, Schott) beleuchtet und in IR-DIC Optik mit einer CCD-Kamera (COHU 4910, S/W) auf einem Bildschirm dargestellt. Das hier verwendete IR-Licht hat Wellenlängen über 850 nm und wird von den Polarisatoren, die in konventioneller DIC-Optik verwendet werden, nicht mehr polarisiert. Deshalb wurden IR-Polarisatoren in Form von Polarisations-Strahlenteiler-Würfeln (B. Halle Nachfl. GmbH, Berlin) verwendet. Die gesamte IR-DIC Optik setzte sich zusammen aus einem Polarisations-Strahlenteiler-Würfel unter dem Kondensor, einem ersten Prisma im Kondensor, einem zweiten Prisma hinter dem Objektiv und einem zweiten Polarisations-Strahlenteiler-Würfel im Tubus des Mikroskops. Die Experimente wurden in Carbogen-gesättigtem Ames-Medium bei 35°C durchgeführt. Der Zulaufschlauch der Badperfusion in die Kammer führte durch ein Peltier-Element, mit dem die Lösung erwärmt werden konnte. Das Peltier-Element wurde über ein Steuergerät (LN Temperature Controller) mit je einem Temperaturfühler im Bad und am Peltier-Element reguliert.

Die Lichtstimulation erfolgte mit einer Glühlampe (Osram 6V) durch einen Bandpassfilter von ca. 300 – 700 nm (BG 39, Schott). Durch einen Glasfaserlichtleiter wurde der Stimulus über den Polarisations-Strahlenteiler-Würfel von unten durch den Kondensor auf das Präparat gespiegelt. Als Stimuli wurden Einzelblitze oder Blitzfolgen verwendet. Die Länge des Lichtblitzes und die Frequenz der Blitzfolgen wurden mit einem Steuergerät (Uniblitzz VMM-T1, Shutter Driver/Timer) und einem Verschluss im Strahlengang (Uniblitzz) vorgegeben. Als kürzeste Reizdauer konnten 3 ms eingestellt werden. Das Steuergerät wurde vom Messrechner zeitgleich mit dem Beginn der Aufnahme gestartet. Die Helligkeit wurde durch Einschieben von unterschiedlichen Graufiltern auf Werte zwischen 0,4 und 1735 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz eingestellt (siehe **Kap. 2.2.9**).

2.2.9 Kalibrierung des Lichtstimulus

Bei der gewählten Meßanordnung musste der Lichtreiz von unten durch den Kondensor des Mikroskops, den Kammerboden, den Millipore-Filter und durch die gesamte Retina hindurch, bis die Photorezeptoren erreicht wurden. Der Lichtstimulus wurde mit dem Kondensor auf die Ebene der Photorezeptoren scharf gestellt und hatte einen Durchmesser von ca. 350 µm. Um die Leuchtdichte des Lichtreizes zu messen, wurde die experimentelle Anordnung wie folgt imitiert.

Um eine ausgeleuchtete Fläche definierter Größe zu erhalten, wurde auf Glas derselben Dicke wie der Kammerboden eine dünne Loch-Blende aus Aluminiumfolie gelegt. Die Brennebene wurde mit dem Kondensor so justiert, dass die Blende optimal ausgeleuchtet wurde. Über die Blende wurde ein angefeuchteter Millipore-Filter gelegt, um die Situation in der mit Lösung gefüllten Kammer zu simulieren. Ein feuchter Filter zeigt eine 3- bis 4fach bessere Lichtdurchlässigkeit als ein trockener Filter.

Die Energie des Lichtstimulus wurde mit einem Leistungsmessgerät (Oriel 70260 mit Messkopf 70282, LOT-Oriel, Darmstadt), eingestellt auf den Messbereich für monochromatisches Licht bei 500 nm Wellenlänge vermessen. Dabei wurde angenommen, dass das Spektrum des Lichtes im Bereich des Bandpassfilters symmetrisch um 500 nm liegt. Die maximale, durch eine Lochblende von 0,3 mm Durchmesser, gemessene Leistung betrug 28,35 nW.

Die gemessene Leistung in Watt kann für die dunkeladaptierte Retina nach Wyszecki und Stiles (1982) und Pugh et al. (1998) in Photonen pro Stäbchen umgerechnet werden:

$$1 \text{ scotopisches Lumen} = 1/1700 \text{ Watt (bei 507 nm)}$$

Desweiteren gilt: $1/1700 \text{ Watt} = 1,5 \times 10^{15} \text{ Photonen/s}$

Die gemessene Leistung entspricht also $7,2 \times 10^{10} \text{ Photonen/s}$ (bei 507 nm).

Bei einer Lochblende von 0,3 mm Durchmesser und damit einer Fläche von $0,07 \text{ mm}^2$ folgt daraus eine Leuchtdichte von:

$$7,2 \times 10^{10} \text{ Photonen/s} : 0,07 \text{ mm}^2 = 1,03 \times 10^{18} \text{ Photonen/sm}^2$$

Diese Leuchtdichte herrscht vor der Retina. Das Licht wird während des Durchgangs durch die Retina abgeschwächt. Der Intensitätsverlust wurde an zwei frisch isolierten Retinae gemessen. Die Retinae wurden flach auf Objekträger ausgebreitet und wie Filter vor den Messkopf des Leistungsmessgerätes gehalten. Die Retinae absorbierten zwischen 15 und 35% des auffallenden Lichts. Geht man zur Sicherheit von einem Lichtverlust von 35% aus,

herrscht an den Außensegmenten der Photorezeptoren eine Leuchtdichte von ca. $6,64 \times 10^{17}$ Photonen/ sm^2 .

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Mäuseretina ergaben einen Durchmesser der Stäbchenaußensegmente von $1,4 \mu\text{m}$ (Carter-Dawson und LaVail, 1979). Unter Berücksichtigung mehrerer Faktoren, wie der Dichte der Rhodopsinmoleküle im Außensegment und der Quanteneffizienz der Photoisomerisation, berechneten Lyubarsky et al. (2004) einen effektiven Absorptionsquerschnitt eines Stäbchenaußensegmentes von $0,87 \mu\text{m}^2$. Bei einer Leuchtdichte von $6,64 \times 10^{17}$ Photonen/ sm^2 und einem Lichtblitz von 3 ms Dauer entspricht dies 1735 Isomerisationen/Stäbchen/Blitz. Um Lichtreize geringerer Intensität zu applizieren, wurde die Intensität mit entsprechenden Neutralfiltern (Neutralfiltersatz NG 4, 9 und 11 mit unterschiedlichen Glasstärken, Schott) abgeschwächt. Die niedrigste eingestellte Intensität lag bei 0,4 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen

Der Nachweis von Retinaproteinen erfolgte mit immunhistochemischen Methoden. Es wurden sowohl monoklonale, als auch polyklonale Antikörper gegen die entsprechenden Proteine verwendet. Die Erstantikörper (1.AK) wurden durch fluoreszenzgekoppelte Zweitantikörper 2.AK detektiert. 2.AK sind spezifisch gegen die konstante Region des 1.AK gerichtet, die für jede Spezies charakteristisch ist.

Es wurden drei Arten von Fluoreszenzfarbstoffen verwendet, die sich durch ihre charakteristischen Anregungs- und Emissionsspektren unterscheiden. Alexa 488 und Cy2 werden mit blauem Licht angeregt und emittieren im grünen Bereich des Spektrums, Cy3 wird grün angeregt und emittiert rot, Cy5 wird rot angeregt und emittiert im roten-infraroten Bereich des Spektrums. Durch entsprechende Kombination der 1.AK und 2.AK ist es möglich, Zwei- und Dreifach-Färbungen anzufertigen.

2.3.2 Immunhistochemie an der Retina

Mäuse wurden wie unter **2.1.1** beschrieben getötet und die Retina präpariert. Anschließend wurde die Retina in 4 % Paraformaldehyd in Phosphatpuffer (PA) für 15 bis 30 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Danach wurde die Retina in 0,1 M Phosphatpuffer (PB; 19 mM Na_2HPO_4 ; 81 mM NaH_2PO_4 ; pH= 7,4) zweimal 20 min gewaschen. Anschließend wurde die Retina zur Kryoprotektion zuerst in 10% Saccharoselösung (in PB) für mind. 1 h und dann in 30% Saccharoselösung (in PB) über Nacht überführt. Die Retina wurde danach in 30% Saccharoselösung dem Augenbecher entnommen und zu einem Rechteck zurechtgeschnitten. Anschließend wurde das Stück flach in Gefriermedium (Tissue Tek, Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL) eingebettet, eingefroren und bei -80° Grad gelagert.

2.3.3 Anfertigung von Kryostatschnitten

Zur immunhistochemischen Färbung wurden die angefertigten Retinapräparate im Kryostaten (2800 Frigocut-E, Reichert-Jung) in 20 μm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden senkrecht zur retinalen Schichtung angefertigt, auf gelatinisierten Objektträgern (Objektträger wurden in 0,5 %ige Gelatinelösung getaucht und getrocknet) aufgenommen und 20-30 min bei RT getrocknet. Die Schnitte wurden anschließend bei -20° Grad gelagert. Zur Überprüfung der Gewebserhaltung wurden stichprobenartig Schnitte mit Richardson Blau (0,5% Azur 2; 0,05% Methylblau in 0,05 % $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) gefärbt und unter dem Mikroskop betrachtet.

2.3.4 Immunhistochemische Färbung auf Kryostatschnitten

Zur Färbung wurden die tiefgefrorenen Schnitte aufgetaut und 20-30 min bei RT getrocknet. Die Schnitte wurden auf dem Objektträger mit einem Fettstift umrandet und in der Lösung „CT“ (siehe **Tab. 2.3.4.3**) 1h bei RT vorinkubiert. Alle Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer, um Austrocknung der Schnitte zu vermeiden. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Schnitte wurden mit dem entsprechenden 1.AK (siehe **Tab. 2.3.4.1**) über Nacht inkubiert. Die 1.AK wurden in der Inkubationslösung „CTA“ (siehe **Tab.**

2.3.4.3), in den in **Tab. 2.3.4.1** angegebenen Verdünnungen auf das Gewebe pipettiert. Sowohl CT, als auch CTA enthielten Triton-X-100. Dieses Detergens dient dazu, die Zellmembran anzulösen und dadurch für die AK permeabel zu machen.

Die Schnitte wurden anschließend 2 x 20 min mit PB gewaschen und für 1 h bei RT im Dunkeln mit dem entsprechenden 2.AK inkubiert. Die 2. AK wurden in „CA“ (siehe **Tab. 2.3.4.3**) verdünnt und auf die Schnitte pipettiert (**Tab. 2.3.4.2**). Die gefärbten Schnitte wurden danach 2 x 20 min im Dunkeln mit PB gewaschen. Anschließend wurden sie mit einem Deckglas und Eindeckmedium (Aqua Poly/Mount, Polysciences Inc., Warrington) versiegelt und unter dem Konfokalen Laserscanning Mikroskop ausgewertet. Bei Doppel- bzw. Dreifachfärbungen wurden die 1.AK bzw. die 2.AK gemischt auf die Schnitte aufgebracht.

1.AK-Bezeichnung	Antigen	Herkunft	Verdünnung	Bezugsquelle
anti HCN1	HCN1	Kaninchen	1/400	Alomone, Jerusalem, Israel
RTQ-7C3	HCN1	Ratte	1/10	E. Kremmer, GSF, München, D
QQA-4A6	HCN2	Ratte	1/10	E. Kremmer, GSF, München, D
HCN3	HCN3	Kaninchen	1/4000	R. Shigemoto, Okazaki, J
FPc73K	HCN4	Kaninchen	1/400	A. Scholten, IBI-1, Jülich, D
PKC α	Proteinkinase C	Kaninchen	1/2000	Santa Cruz, Heidelberg, D
PKC α	Proteinkinase C	Maus	1/4000	BD Biosciences, San Jose, USA
CabP5	Ca ²⁺ -bindendes Protein 5	Kaninchen	1/1600	K. Palczewski, Washington, USA
CD15	Epitop CD15	Maus	1/50	Becton Dickinson, Heidelberg, D
NK3R	Neurokinin-3 Rezeptor	Kaninchen	1/8000	Acris, Hiddenheim, D
Chat	Cholinacetyltransferase	Maus	1/400	Chemicon, Hofheim, D
Cal	Calretinin	Ziege	1/3000	Chemicon, Hofheim, D
GFP	GFP	Huhn	1/1000	Chemicon, Hofheim, D
Anti-LY biotinyliert	Lucifer Yellow	Kaninchen	1/200	Molecular Probes, Leiden, NL
PEA		Erdnuß	1/200	Sigma, München, D

Tab. 2.3.4.1: 1.AK. Die 1.AK wurden in CTA verdünnt. Bei „PEA“ handelt es sich nicht um einen Antikörper, sondern um ein biotinyliertes Lectin aus der Erdnuß, das an Zapfenendfüße bindet.

Die Detektion der 2.AK erfolgte mit einem Konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica TCS). Dazu wurde das jeweilige Fluorochrom der 2.AK mit einer spezifischen Wellenlänge angeregt. Bei Doppel- und Dreifachfärbungen wurden Kontrollen durchgeführt, um Kreuzreaktionen der 2.AK mit dem falschen 1.AK auszuschließen. Dazu wurden

Kontrollfärbungen mit jeweils einem 1.AK, aber zwei, bzw. drei 2.AK durchgeführt. Um das sog. „Durchbluten“ zwischen den Detektionskanälen bei Mehrfachfärbungen zu vermeiden, wurde sequentiell gescannt, d.h. jeder Farbstoff wurde einzeln angeregt und detektiert. Außerdem wurden nur schmalbandige Ausschnitte in den nicht überlappenden Bereichen der Emmissionsspektren detektiert (siehe **Tab. 2.3.4.2**).

Durch das konfokale Prinzip erhält man im Bild nur Informationen aus einer sehr dünnen Schnittebene des Präparats. Diese „optischen Schnitte“ waren unter den gewählten experimentellen Bedingungen dünner als 1 µm. Die meisten der gezeigten Abbildungen sind solche optischen Schnitte. Bei einigen Präparaten wurden Stapel solcher Schnitte in Z-Richtung angelegt, die dann auf eine Ebene „projiziert“ wurden. Die Bilder wurden anschließend in Corel Draw und Adobe Photoshop weiterverarbeitet.

2. AK	Verdünnung	Anregung [nm]	Detektion d. Emission [nm]	Bezugsquelle
d α rb Alexa 488	1/500	488	~ 500-550	Molecular Probes, Leiden, NL
gt α rb Alexa 488	1/500	488	~ 500-550	Molecular Probes, Leiden, NL
gt α rt Alexa 488	1/500	488	~ 500-550	Molecular Probes, Leiden, NL
gt α ms Alexa 488	1/500	488	~ 500-550	Molecular Probes, Leiden, NL
d α ch Cy2 IgG/IgM	1/200	488	~ 500-550	Molecular Probes, Leiden, NL
d α gt Cy2	1/500	488	~ 500-550	Dianova, Hamburg, D
gt α ms Cy2	1/500	488	~ 500-550	Dianova, Hamburg, D
d α rb Cy3	1/500	543	~ 580-620	Dianova, Hamburg, D
d α ms Cy3	1/100	543	~ 580-620	Dianova, Hamburg, D
d α rb Cy5	1/100	633	~ 660-760	Dianova, Hamburg, D
d α ms Cy5	1/100	633	~ 660-760	Dianova, Hamburg, D
Streptavidin Alexa 488	1/1000	488	~ 500-550	Molecular Probes, Leiden, NL
Streptavidin Alexa 647	1/100	633	~ 660-760	Molecular Probes, Leiden, NL

Tab. 2.3.4.2: 2.AK. Die 2.AK wurden in CA verdünnt. Angeregt wurde durch Laserlicht der angegebenen Wellenlänge, der detektierte Bereich der Emission wurde durch Filter festgelegt. α: anti; d: donkey; gt: goat; ms: mouse; rb: rabbit. Streptavidin ist kein Zweitantikörper. Es wird zum Nachweis biotinylierter Antikörper (oder Lectine) verwendet.

Zur Färbung von Ganzretinapräparaten, Retinaschnitten und HEK293-Zellen wurde das Färbeprotokoll entsprechend **Tab. 2.3.4.3** variiert. Ganzretinapräparate wurden vor der Antikörperinkubation wiederholt ein- und aufgetaut („gecrackt“). Dadurch bilden sich

Eiskristalle, die die Zellmembranen durchlöchern, was zu einer verbesserten Antikörperpenetration führt.

Inkubations- schritte	Inkubationsbedingungen: Lösungen, Inkubationszeit				
	Retina				HEK293- Zellen
	Kryostatschnitte	Ganzretina	Retinaschnitte		
				CD15 Markierung	
Fixierung	PA / 15 - 30 min	PA / 30 min	PA / 15 min	-	PA / 7 min
Waschen	PB / 2 x 20 min	PB / 2 x 20 min	PB / 2 x 20 min	-	PB / 2 x 20 min
Kryoprotektion	10% Sacch./1h	10% Sacch. / 1h	-	-	-
	30% Sacch./ü.N.	30% Sacch. / ü.N.	-	-	-
“Cracken”	-	10x	-	-	-
Präinkubation	CT / 1 h	CT / 4 h	CT / 2 h	-	CT / 20 min
Inkubation mit 1. AK	CTA / ü.N.	CTA / 4-5 Tage	CTA / ü.N.	oxy. Hanks / 1h	CTA / 1 h
Waschen	PB / 2 x 20 min	PB / 2 x 2 h	PB / 2 x 20 min	oxy. Hanks/2 x 10 min	PB / 2 x 10 min
Inkubation mit 2. AK	CA / 1 h	CA / ü.N.	CA / 12 h	oxy. Hanks / 30 min	CA / 30 min
Waschen	PB / 2 x 20 min	PB / 2 x 2 h	PB / 2 x 20 min	oxy. Hanks/2 x 10 min	PB / 2 x 10 min

Tab.2.3.4.3: Färbeprotokolle. ü.N.: über Nacht; Sacch.: Saccharose; oxy. Hanks: oxygenierte Hanks-Lösung; CT: 5% Chemiblocker (Chemicon); 0,5% Triton-X-100, in PB; CTA: 5% Chemiblocker; 0,5% Triton-X-100; 0,05% Natriumazid in PB; CA: 5% Chemiblocker; 0,05% Natriumazid in PB; PB: Phosphatpuffer; PA: 4% Paraformaldehyd in PB.

2.3.5 Vormarkierung von Bipolarzellen im Schnitt

Um gezielt Bipolarzellen eines bestimmten Typs zu patchen, wurden diese Bipolarzelltypen durch folgende Techniken vormarkiert.

Nach dem Protokoll in **Tab. 2.3.4.3** konnten lebende Typ2 Bipolarzellen auf Schnitten mit einem Antikörper gegen CD15 gefärbt werden. Diese konnten dann durch Anregung mit blauem Licht visualisiert und gezielt gepatcht werden. Außerdem standen die transgenen Mäusestämme GUS_{8.4}GFP und Clomeleon-1 (siehe **Kap. 2.1.1**) zur Verfügung, in denen Varianten des GFP in einigen retinalen Zelltypen exprimiert werden. Das GFP wurde in Schnitten der transgenen Tiere mit Auflicht angeregt. GFP-positive Zelltypen konnten so gezielt gepatcht werden.

2.4 Heterologe Expression von HCN-Kanälen in HEK293-Zellen

Die heterologe Expression von Maus HCN1 wurde in HEK293-Zellen (Human Embryonic Kidney cells, ECACC Nr. 85120602) durchgeführt. Die Zellen wurden in Petrischalen in MEM Medium (Minimal Essential Medium, Invitrogen) mit dem Zusatz von 10 % FCS (fetal calf serum), 2 mM L-Glutamin, 1 % Antibiotika/Antimykotika (Invitrogen) kultiviert.

Für die transiente Expression wurden die cDNAs in den Expressions-Vektor pcDNA1 Amp (Invitrogen) kloniert. Das HCN1-Kanal Konstrukt wurde mit einem Plasmid kotransfiziert, das cDNA enthielt, die für GFP (pBOB1.5, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Thomas Hughes, Yale University, USA) kodierte. Das Maximum der Exzitation des GFP ist durch die Mutation S65T zu 488 nm verschoben. Die Zellen, die GFP und HCN1 koexprimierten, konnten mit konventioneller Fluoreszenz-Optik betrachtet werden. Die Zellen wurden transient, mit einer Mischung der beiden Vektoren, nach dem Kalziumphosphat-Transfektions Protokoll (Chen und Okayama, 1987) transfiziert.

Stamm Lösung	Transfektionsmischung für Ø 5 cm Schalen ~4x10 ⁵ Zellen
HCN1-Kanal Konstrukt 0,6 - 1 µg DNA/µl	6-10 µg DNA HCN1-Kanal Konstrukt + 1 µg DNA GFP Konstrukt
GFP Konstrukt 0,5 µg DNA/µl	
H ₂ O	auf 124 µl aufgefüllt
CaCl ₂ 1 M	41 µl
2 x BBS (pH 6,95)*	165 µl

Tab. 2.4: Lösung zur Transfektion: *2 x BBS (pH 6,95) - 50 mM N,N-bis-(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure (BES); 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄

Die Transfektionsmischung wurde für 20 min (RT) inkubiert und dann in Ø 5 cm Petrischalen mit logarithmisch wachsenden HEK293-Zellen (~ 4x10⁵ Zellen mit 3 ml M10) pipettiert. Während einer 20-22 stündigen Inkubation bei 35°C, 3 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit bildet sich ein Kalziumphosphat-DNA Präzipitat aus. Nach dem Waschen mit 3 ml PBS (RT) wurden die Zellen mit 2 ml PBS/EDTA (0,5 % EDTA in PBS, pH 7,4) bei RT behandelt, um das Präzipitat zu entfernen. Die Zellen wurden von der Schale mit 0,3 ml Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA, Invitrogen) bei 37°C gelöst und in 4,7 ml M10 resuspendiert. Ungefähr 300 µl der Zellsuspension wurden auf beschichtete Glasplättchen in eine Multiwell-Schale überführt. Die Glasplättchen wurden vorher über Nacht mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml H₂O, Sigma) beschichtet und waren von 200 µl M10 Medium bedeckt. Die Zellen wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für vier Stunden inkubiert. Dann wurde Natriumbutyrat (0,5 M in PBS, Sigma) in der Endkonzentration von 3 mM zugegeben, um die

Expression zu verstärken. Die Zellen wurden an den folgenden beiden Tagen für Patch-clamp Experimente verwendet.

3. Ergebnisse

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Untersuchung zur Expression und Funktion von HCN-Kanälen in der Mäuseretina gezeigt. In **Kapitel 3.1** werden Bipolarzelltypen immunhistochemisch mit Antikörpermarkern identifiziert und quantifiziert, sowie auf ihre Expression von HCN-Kanälen hin untersucht. Bipolarzellen werden in **Kapitel 3.2** sowohl morphologisch, als auch elektrophysiologisch charakterisiert. Außerdem werden ausgesuchte Zelltypen aus HCN1-Knockouttieren untersucht. In **Kapitel 3.3** werden Elektroretinogramme von HCN1-Knockoutmäusen und von Kontrolltieren miteinander verglichen.

3.1 Immunhistochemie

3.1.1 Expression von HCN1-4 in der Mäuseretina

Die Verteilung der HCN-Kanäle wurde immunhistochemisch in Kryostatschnitten der Mäuseretina mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern untersucht. In **Abb. 3.1.1.1 A** ist eine Übersichtsaufnahme der Retina mit Differential-Interferenz-Kontrast Optik dargestellt. **B-E** zeigen in einem vergleichbaren Ausschnitt die Verteilung der vier HCN-Isoformen. Mit Antikörpern gegen HCN1 erkennt man eine sehr kräftige Färbung in der äußeren Retina (**B**). Gefärbt sind Innensegmente (IS), Somata (in der ONL) und Axonterminalien (in der OPL) der Photorezeptoren. In der inneren Retina sind einige Bipolarzellsomata mit Dendriten und Axonen HCN1-positiv (langer Pfeil). Bereits bei dieser Vergrößerung wird deutlich, dass die Plasmamembran der Zelle, aber kaum das Zytoplasma durch den Antikörper gefärbt wird. In der IPL sieht man eine deutliches Bandenmuster. Die Bande 1 in der äußeren IPL wird wahrscheinlich von Dendriten von Amakrinzellen gebildet, da diese Bande nicht von einem Antikörper gegen den vesikulären Glutamat-Transporter 1 gefärbt wurde, der ein guter Marker für Axonterminalien von Bipolarzellen ist (Daten nicht gezeigt). In der Mitte der IPL ist eine kräftige Bande (Pfeil 2) zu sehen. Bei hoher Auflösung

sieht man, dass diese Bande von den Axonterminalien der HCN1-positiven Bipolarzellen gebildet wird. Am unteren Rand der IPL ist nur eine relativ schwache und diffuse HCN1-Färbung zu erkennen (Pfeil 3). An der Grenze der INL zur IPL sind Amakrinzellsomata HCN1-positiv (kurzer Pfeil). In der Ganglienzellschicht sind einige Ganglienzellsomata HCN1-positiv (Pfeilspitze) und man kann teilweise gefärbte Axonbündel in der Nervenfaserschicht erkennen.

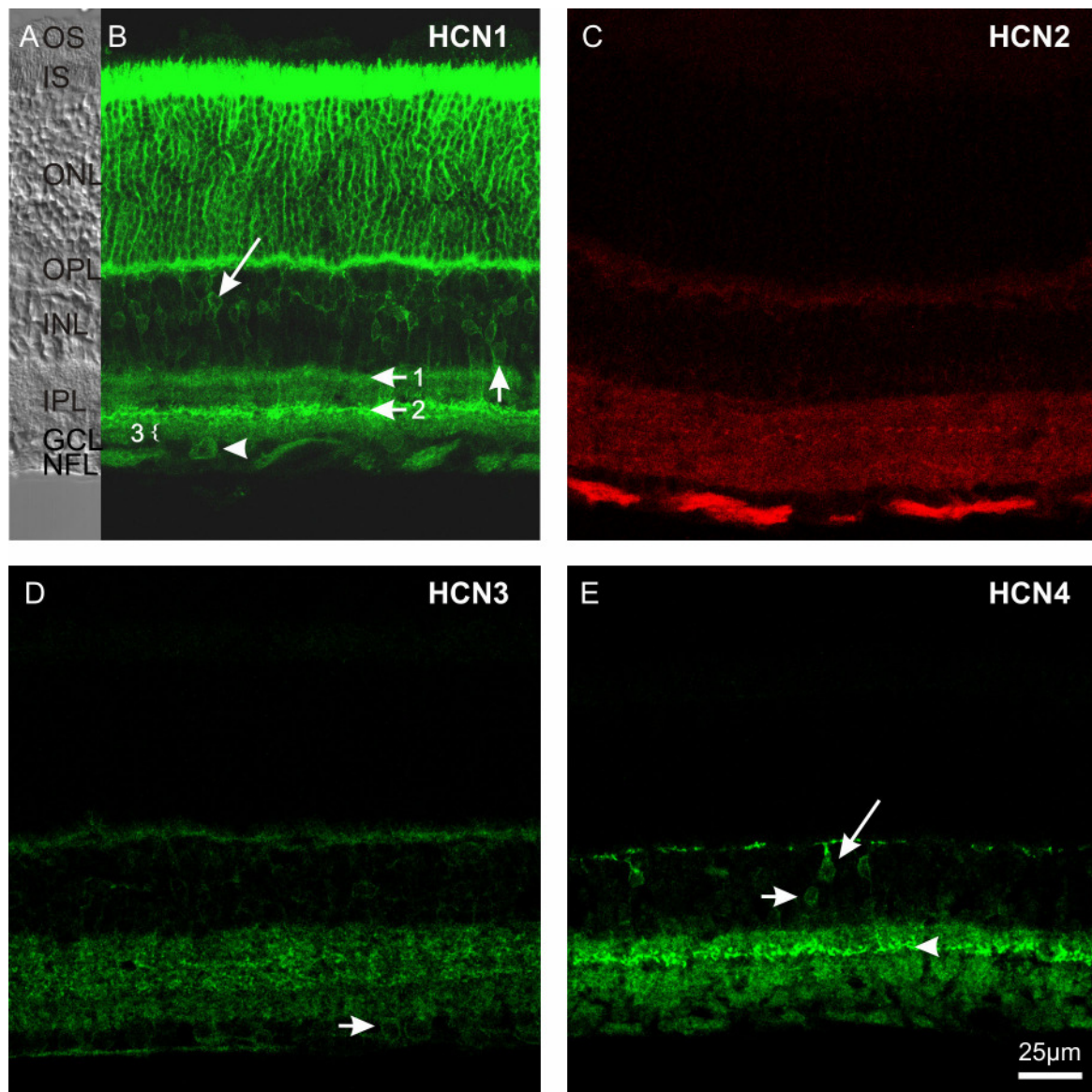


Abb. 3.1.1.1: Immunhistochemische Lokalisation von HCN1-4.

A, DIC Übersichtsaufnahme eines vertikalen Retinaschnittes.

B, Antikörper gegen HCN1 färben Photorezeptoren, einige Bipolarzellsomata (langer Pfeil) und mehrere Banden in der IPL (durch Nummern bezeichnet), außerdem werden Amakrinzellen (kurzer Pfeil) und Ganglienzellen (Pfeilspitze) markiert.

C, HCN2 ist in der Retina nur sehr schwach exprimiert, meist werden nur einige Ganglienzellen (schwache Färbung, hier nicht zu sehen), sowie Axonbündel gefärbt.

D, Punktuelle Färbung gegen HCN3 in der IPL, ein Ganglienzellsoma ist mit einem kurzen Pfeil markiert.

E, Mit dem Antikörper gegen HCN4 werden Somata (langer Pfeil), Dendriten und Axonterminalien (Pfeilspitze) von wenigen Bipolarzellen angefärbt, außerdem sind HCN4-positive Amakrinzellen zu erkennen (kurzer Pfeil).

OS: outer segments; IS: inner segments; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer; NFL: nerve fibre layer.

Die Färbung mit dem Antikörper gegen HCN2 (**C**) zeigt, dass HCN2 in der Mäuseretina sehr schwach exprimiert wird. Nur Axonbündel in der NFL werden kräftig gefärbt, außerdem können teilweise Ganglienzellen markiert werden (schwache Färbung, in dieser Auflösung nicht zu sehen). Dies ist ein deutlicher Unterschied zur Rattenretina, in der HCN2 massiv in der IPL exprimiert wird (Müller et al., 2003).

In Abb. **D** ist die Färbung mit dem Antikörper gegen HCN3 gezeigt. Auch HCN3 wird in der Retina wenig exprimiert. Man kann punktuelle Färbungen in der IPL beobachten, die vermutlich von Fortsätzen von Amakrinzellen und Ganglienzellen stammen. Ein HCN3-positives Ganglienzellsoma ist mit einem Pfeil markiert.

In der Antikörperfärbung gegen HCN4 (**E**) sind wenige Bipolarzellsomata (langer Pfeil) mit Dendriten und eine deutliche Bande in der IPL (Pfeilspitze) zu erkennen. Diese Bande wird von den Axonterminalien der HCN4-positiven Bipolarzellen gebildet. Außerdem sind teilweise Amakrinzellen (kurzer Pfeil) und Ganglienzellen HCN4-positiv.

Somit konnte gezeigt werden, dass von allen HCN-Isoformen in der Mäuseretina überwiegend HCN1 exprimiert wird. HCN1 wurde ebenso wie HCN4 in einigen Bipolarzellen nachgewiesen. HCN2 und HCN3 konnten in Bipolarzellen nicht nachgewiesen werden.

Um nun im Detail zu klären, in welchen Bipolarzelltypen HCN1, bzw. HCN4 exprimiert werden, wurden die HCN-Antikörper in Kombination mit Antikörpern eingesetzt, die spezifisch einen oder mehrere Bipolarzelltypen markieren. Diese Bipolarzellen konnten dann mit dem morphologischen Klassifikationsschema der 10 Bipolarzelltypen in der Mäuseretina (Ghosh et al., 2004) (Abb. 3.1.1.2) verglichen werden. In Doppelfärbungen können außerdem Antikörpermarker verwendet werden, die definierte Banden (rot markiert) in der IPL färbten. Mit Hilfe dieser Banden lässt sich die Stratifikationsebene vieler Bipolarzellen leichter bestimmen.

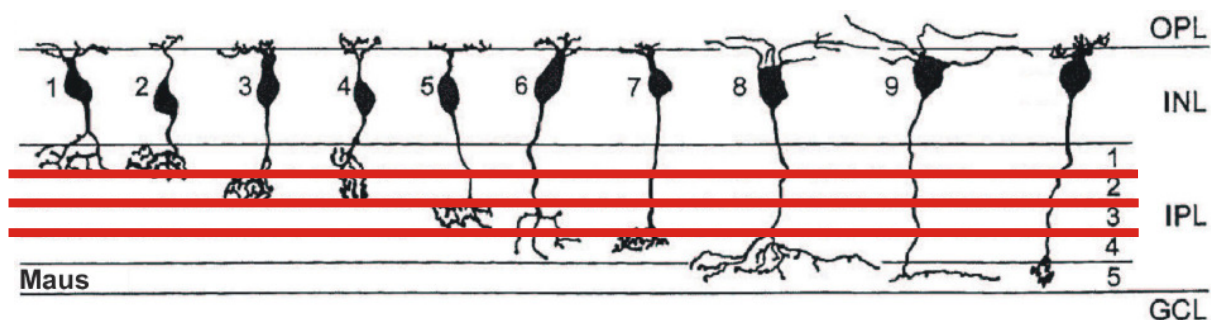


Abb. 3.1.1.2: Morphologische Klassifikation von Bipolarzellen in der Mäuseretina.

Die Zapfenbipolarzellen sind mit den Nummern 1-9 bezeichnet, die Stäbchenbipolarzelle befindet sich ganz rechts (aus Ghosh et al., 2004). Die IPL lässt sich in fünf Strata einteilen. Banden, die von Antikörpern markiert und zur besseren Orientierung benutzt werden, sind rot markiert.

3.1.2 Typ5 Bipolarzellen exprimieren HCN1

In **Abb. 3.1.2.1 A** ist eine Aufnahme eines Vertikalschnitts der Retina, gefärbt mit dem Antikörper gegen Calretinin, einem Kalzium bindenden Protein zu sehen. Calretinin wird in der IPL in drei dendritischen Strata gefunden. Stratum 1 wird von Dendriten OFF-cholinergischer Amakrinzellen gebildet und wird im folgenden „OFF-cholinerge Bande“ genannt. Stratum 3 stammt von den Dendriten der ON-cholinergen Amakrinzellen („ON-cholinerge Bande“). Stratum 2 wird von den Dendriten NOS-immunoreaktiver (nitric oxid synthase) Amakrinzellen („NOS-Bande“) gebildet (Haverkamp und Wässle, 2000; Ghosh et al., 2004). Außerdem werden Somata von Amakrin- und Ganglienzellen mitgefärbt (Pfeilspitzen). Die Färbung gegen Calretinin wird als Orientierungshilfe benutzt, um das Stratifikationsniveau der Bipolarzellen in der IPL besser bestimmen zu können. Der Antikörper gegen das Kalzium bindende Protein 5 (CabP5, **B**) ist ein bekannter Marker, mit dem drei Bipolarzelltypen gefärbt werden können (Haeseleer et al., 2000; Ghosh et al., 2004) die in unterschiedlichen Ebenen der IPL stratifizieren (Pfeile). Dabei handelt es sich um die Typ3 und die Typ5 Bipolarzellen, sowie die Stäbchenbipolarzelle. Die Typ3 Bipolarzelle stratifiziert zwischen der OFF-cholinergen Bande (1) und der NOS-Bande (2), die Typ5 Bipolarzelle terminiert ober- bis innerhalb der ON-cholinergen Bande (3) und die Stäbchenbipolarzelle stratifiziert mit ihren blasenartig verdickten Axonterminalien an der inneren Grenze der IPL.

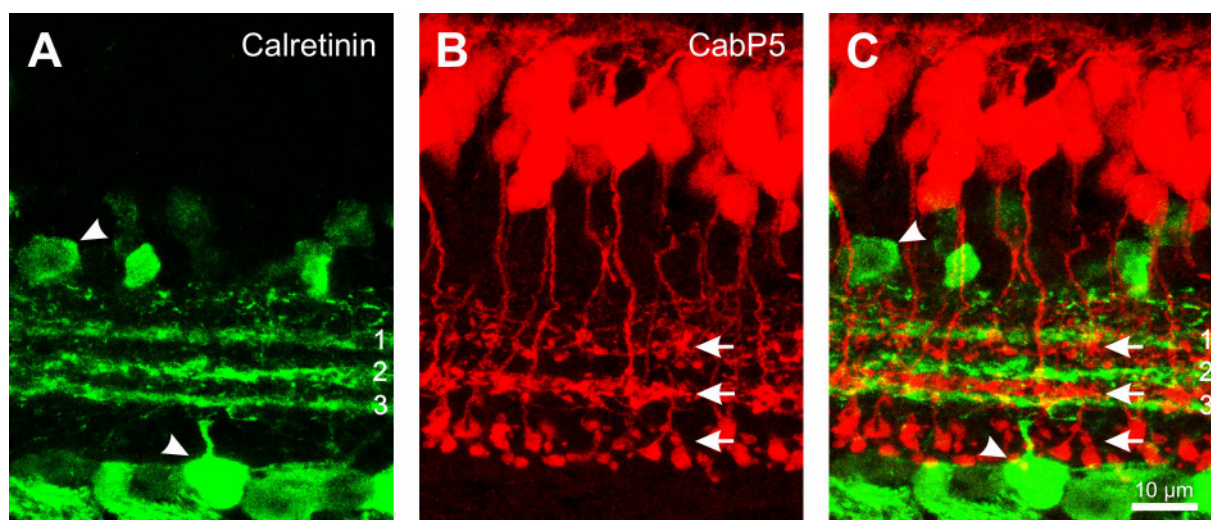


Abb. 3.1.2.1: Doppelfärbung gegen Calretinin und CabP5 in der vertikal geschnittenen Retina (Projektion).

A, Der Antikörper gegen Calretinin markiert drei Banden in der IPL: die OFF-cholinerge Bande (1), die ON-cholinerge Bande (3) und die NOS-Bande (2). Außerdem werden Amakrin- und Ganglienzellsomata gefärbt (Pfeilspitzen).

B, Der CabP5-Antikörper färbt drei Bipolarzelltypen: die Stäbchenbipolarzelle, die Typ5 und die Typ3 Bipolarzelle.

C, Überlagerung der Kanäle.

Abb. 3.1.2.2 zeigt eine Dreifachfärbung im Vertikalschnitt der Retina, mit Antikörpern gegen HCN1 (**A**, grün), CabP5 (**B**, rot) und die α Isoform der Proteinkinase C (PKC) (**C**, blau), sowie eine Überlagerung der drei Kanäle. Mit dem Antikörper gegen CabP5 können, wie in **Abb. 3.1.2.1** gezeigt, Typ3 (Pfeile 3), Typ5 (Pfeile 2) und Stäbchenbipolarzellen (Pfeile 1) gefärbt werden. In **B** ist eine in Soma, Axon und Axonterminalsystern CabP5-positive Typ5 Bipolarzelle markiert (Pfeile 2). Dieselbe Zelle ist in **A** auch durchgehend mit dem Antikörper gegen HCN1 gefärbt (Pfeile 2). Das Axon der Zelle endet in einer stark HCN1-positiven Bande, die von den Axonterminalsystern der Typ5 Bipolarzellen gebildet wird. Die Kolokalisation der grünen Färbung (HCN1) und der roten Färbung (CabP5) führt in der Überlagerung zu einem gelben Signal. Typ5 Bipolarzellen exprimieren also eindeutig HCN1. Stäbchenbipolarzellen werden mit dem Antikörper gegen PKC markiert (Greferath et al., 1990; Haverkamp und Wässle, 2000). In der Überlagerung in **D** erscheinen die CabP5-positiven und PKC-positiven Stäbchenbipolarzellen rot mit blauer Umrandung. Die Somata der Stäbchenbipolarzellen (**C**), sitzen an der Grenze zur OPL (Pfeil 1), die Axone terminieren an der inneren Grenze der IPL (Pfeil 1). Die Axonterminalien dieser Zellen sind blasenartig verdickt. Bei hoher Auflösung sieht man gelegentlich eine schwache HCN1-Färbung, besonders am Axonterminalsystern der Stäbchenbipolarzelle (nicht gezeigt). Stäbchenbipolarzellen könnten also schwach HCN1 exprimieren. Dies wird in **Kapitel 3.2.2.3** elektrophysiologisch verifiziert.

Die Typ3 Zellen (**B**, Pfeile 3) stratifizieren in der äußeren IPL und sind HCN1-negativ. Zusätzlich sind in **A** HCN1-positive Somata von Amakrinzellen (Pfeilspitze) und Ganglienzellen zu erkennen (langer Pfeil). Die HCN1-positive Bande im äußeren Bereich der IPL (**A**, kurzer Pfeil), sowie die HCN1-positive Bande unterhalb der Typ5 Bande stammen nicht von Bipolarzellen. In Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen HCN1 und gegen den vesikulären Glutamat-Transporter 1, einem guten Marker für Bipolarzellterminalien, ergibt sich keine Kolokalisation (nicht gezeigt). Vermutlich stammen die Fortsätze von den HCN1-positiven Amakrinzellen.

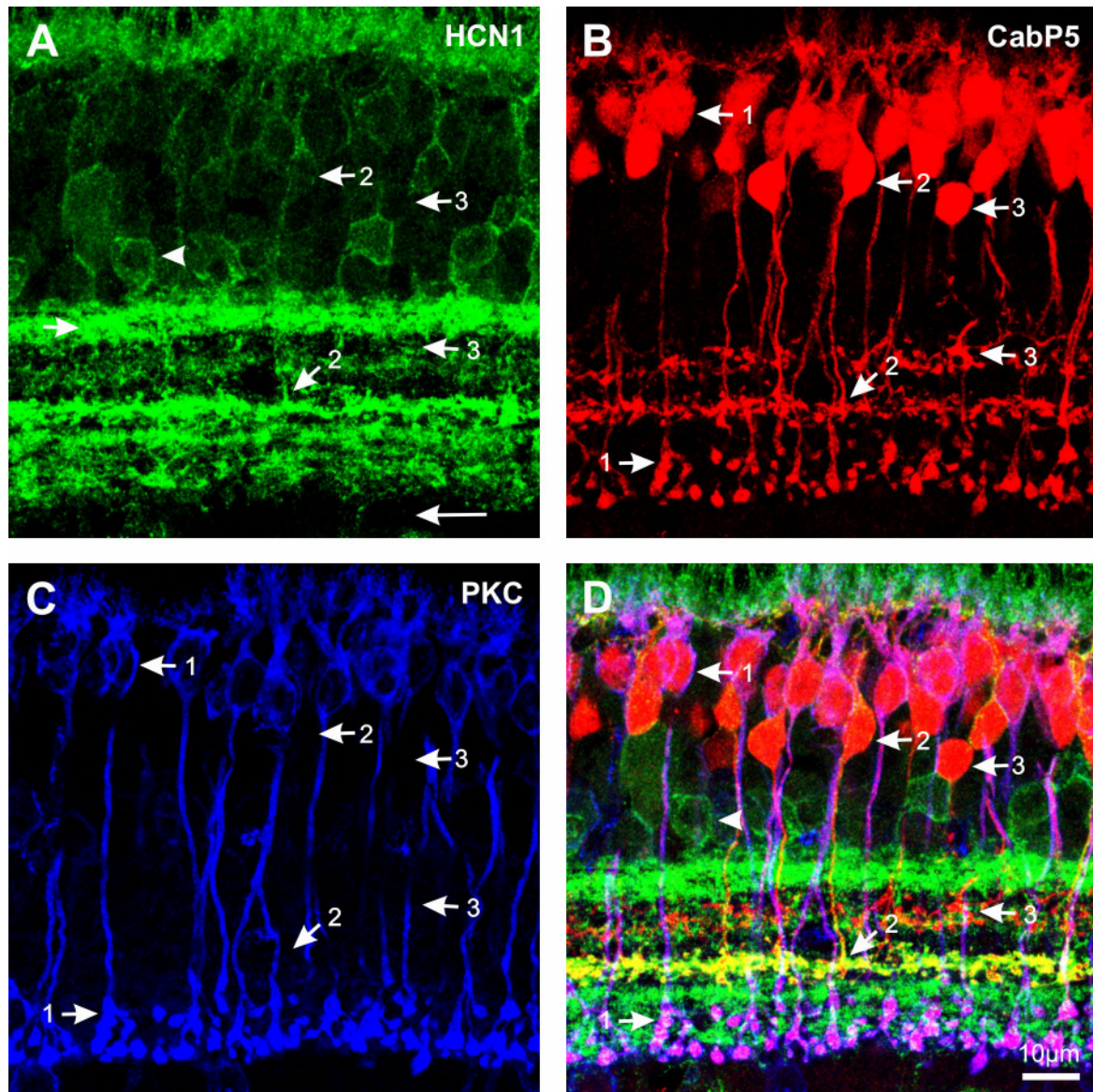


Abb. 3.1.2.2: Dreifachfärbung mit Antikörpern gegen HCN1, CabP5 und PKC in der vertikal geschnittenen Retina (Projektion).

A, HCN1-Färbung. Mehrere Bipolar-, Amakrin- und Ganglienzellsomata sind gefärbt. In der IPL sind mehrere HCN1-positive Banden zu erkennen.

B, Der CabP5-Antikörper färbt drei Bipolarzelltypen. Typ5 Bipolarzellen (Pfeile 3) sind HCN1-positiv, Typ3 Bipolarzellen (Pfeile 2) sind HCN1 negativ.

C, Der PKC-Antikörper markiert Stäbchenbipolarzellen (Pfeile 1). Diese stratifizieren an der Grenze zur Ganglienzellschicht und besitzen charakteristische blasenartige Verdickungen am Axonterminalsystem.

D, Überlagerung der Kanäle.

3.1.3 Typ3 Bipolarzellen exprimieren HCN4

Eine Doppelfärbung mit Antikörpern gegen HCN4 und Cholinacetyltransferase (Chat) ist in **Abb. 3.1.3** dargestellt. Der Antikörper gegen Chat (**B**) färbt die Somata und die Dendriten der cholinergen Amakrinzellen, und damit die OFF- und die ON-cholinerge Bande an (diese

Banden entsprechen der ersten und dritten Calretinin-positiven Bande, Vergleich **Abb. 3.1.2.1**). Der Pfeil in **B** markiert Blutgefäße, die vom Zweitantikörper (anti-Maus) gefärbt werden. Die Färbung gegen HCN4 zeigt eine Bipolarzelle, die direkt unterhalb der OFF-cholinergen Bande stratifiziert (kurzer Pfeil). Der Vergleich mit dem Schema von Ghosh et al. (2004) zeigt, dass es sich dabei um die Typ3 Bipolarzelle handelt. Zusätzlich sind HCN4-gefärbte Amakrinzellsomata zu sehen (Pfeilspitze). Man beachte die starke Färbung der Plasmamembran durch die HCN4-Antikörper. Aus den **Abb. 3.1.2.2** und **3.1.3** ergibt sich zusammengefasst, dass die Typ3 Bipolarzelle HCN1-negativ und HCN4-positiv ist.

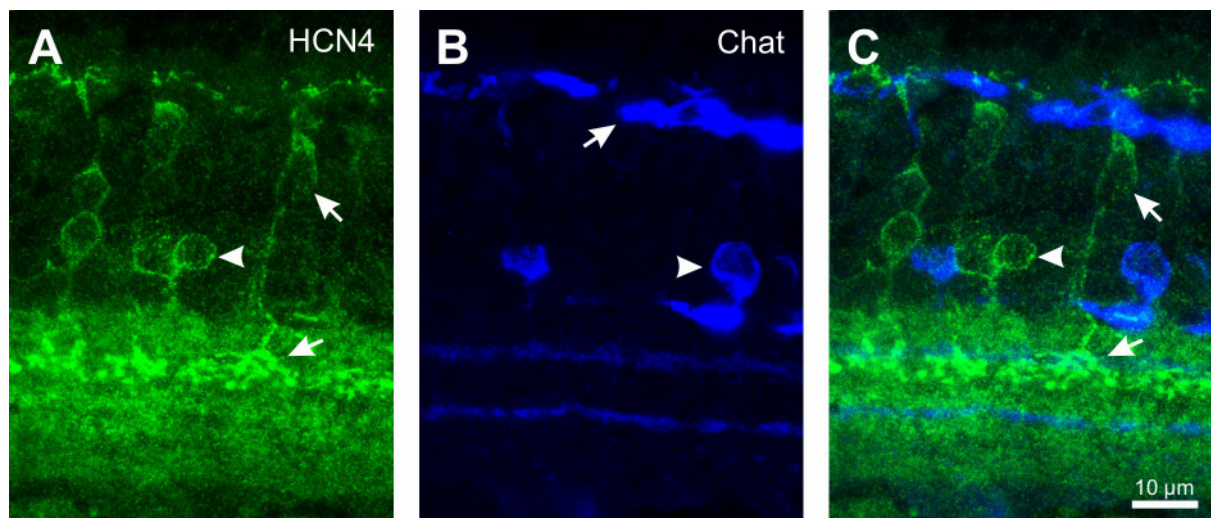


Abb. 3.1.3: Doppelfärbung mit Antikörpern gegen HCN4 und Cholinacetyltransferase (Chat) in der vertikal geschnittenen Retina (Projektion).

A, Der HCN4-Antikörper färbt Typ3 Bipolarzellen (Pfeil) und Amakrinzellen (Pfeilspitzen).

B, Der Chat-Antikörper markiert Somata (Pfeilspitze), sowie zwei Banden in der IPL: Die OFF-cholinerge und die ON-cholinerge Bande. Blutgefäße werden vom Zweitantikörper gefärbt.

C, Überlagerung der Kanäle.

3.1.4 Typ2 und Typ3 Bipolarzellen

In **Abb. 3.1.4** sind die Ergebnisse der Antikörperfärbungen gegen den Neurokinin-3 Rezeptor (NK3R), das Epitop CD15 und Calretinin, bzw. Chat dargestellt.

A-C zeigt die Doppelfärbung gegen NK3R und Chat, sowie die Überlagerung der beiden Kanäle. Die Färbung gegen NK3R (**A**) zeigt Bipolarzellen, die oberhalb der OFF-cholinergen Bande (obere Bande in **B**) stratifizieren. Haverkamp et al. (2003) beschreiben zwei unterschiedliche Klassen von NK3R-positiven OFF-Bipolarzellen. Nach dem Schema von Ghosh et al. (2004), könnte es sich dabei um die Typ1 und die Typ2 Bipolarzelle handeln.

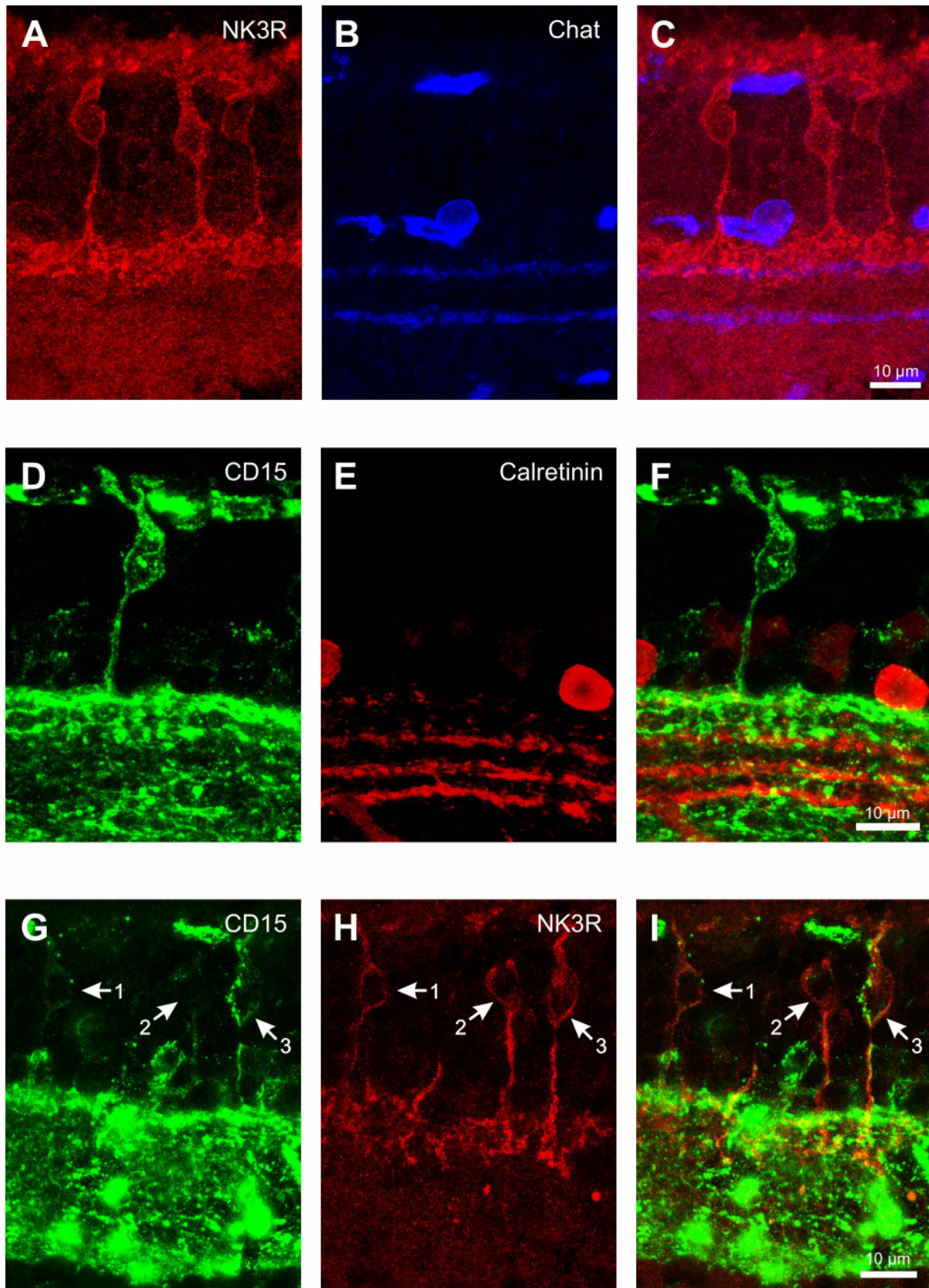


Abb. 3.1.4: Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen NK3R, CD15, Chat und Calretinin in der vertikal geschnittenen Retina (Projektion).

A-C, NK3R-positive Bipolarzellen stratifizieren oberhalb der ON-cholinergen Bande.

D-F, CD15-positive Bipolarzellen stratifizieren ebenso oberhalb der ON-cholinergen Bande.

G-I, Der NK3R-Antikörper färbt die Bipolarzelltypen 1 (Pfeil 1 und 2) und 2 (Pfeil 3). Der CD15-Antikörper markiert Typ2 Bipolarzellen (Pfeil 3).

In **D-F** ist die Doppelfärbung gegen CD15 und Calretinin gezeigt. Die Färbung gegen CD15 (**D**) (Andressen und Mai, 1997) zeigt Bipolarzellen, die oberhalb der OFF-cholinergen Bande stratifizieren. Dabei kann es sich nach dem Bipolarzell-Schema nur entweder um Typ1 oder Typ2 handeln.

Um zu überprüfen, ob mit dem Antikörper gegen NK3R und CD15 die gleichen Bipolarzelltypen gefärbt werden, wurden beide Antikörper in einer Doppelfärbung eingesetzt (**G-I**). In **H** sind drei NK3R-positive Bipolarzellen (Pfeile 1-3) zu sehen. Die mit 3 bezeichnete Zelle ist in **G** ebenfalls deutlich CD15-positiv. Die Zelle 2 ist mit dem Antikörper gegen CD15 nicht, die Zelle 1 nur sehr schwach gefärbt. Dies bestätigt die Vermutung, dass der Antikörper gegen NK3R tatsächlich zwei Typen von Bipolarzellen färbt: Ein Zelltyp ist CD15-positiv, der andere ist CD15-negativ. Bei den CD15- und NK3R-positiven Bipolarzellen handelt es sich wahrscheinlich um den Typ2, da sie etwas tiefer stratifizieren als die NK3R-positiven und CD15-negativen Zellen (Typ1).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Antikörper gegen NK3R Typ1 und Typ2 Bipolarzellen färbt, während der Antikörper gegen CD15 nur Typ2 Bipolarzellen markiert.

In Doppelfärbungen mit den Antikörpern gegen HCN1 und CD15 bzw. NK3R konnte keine Expression des HCN1-Kanals in Typ1 und Typ2 Bipolarzellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.5 Die Mauslinie GUS_{8.4}GFP exprimiert GFP in Typ7 Bipolarzellen

Bei der Mauslinie GUS_{8.4}GFP wurde die cDNA für das grünfluoreszierende Protein (GFP) an den Promotor für das G-Protein Gustducin gekoppelt (Wong et al., 1999). Gustducin wird in der Retina nicht exprimiert (F. Müller, persönliche Mitteilung). Das Transgen geriet bei der Integration in das Genom vermutlich unter die Kontrolle eines starken Promoters, der in der Retina in einem Bipolarzelltyp abgelesen wird.

In **Abb. 3.1.5** ist die Doppelfärbung mit einem Antikörper gegen GFP und gegen Calretinin in Vertikalschnitten der Retina eines Tieres aus diesem transgenen Mäusestamm zu sehen. In **A** sind zwei Populationen von Bipolarzellen zu sehen. Ein Typ wird in Dendriten, Soma und Axon bis in die Axonterminalien kräftig gefärbt (Pfeile) und stratifiziert direkt unterhalb der ON-cholinergen Bande (kurze Pfeile). Das Axonterminalsystem ist relativ breit und schmalbandig. Über den Vergleich mit dem Bipolarzell-Schema wurde dieser Bipolarzelltyp als Typ7 identifiziert. Ein zweiter Typ ist schwach gefärbt (Pfeilspitze). Wie später gezeigt

wird, handelt es sich dabei um die Stäbchenbipolarzelle (siehe 3.1.7.2). In **Kap. 3.2.2.6** wird elektrophysiologisch gezeigt, dass Typ7 Bipolarzellen HCN1-Kanäle exprimieren.

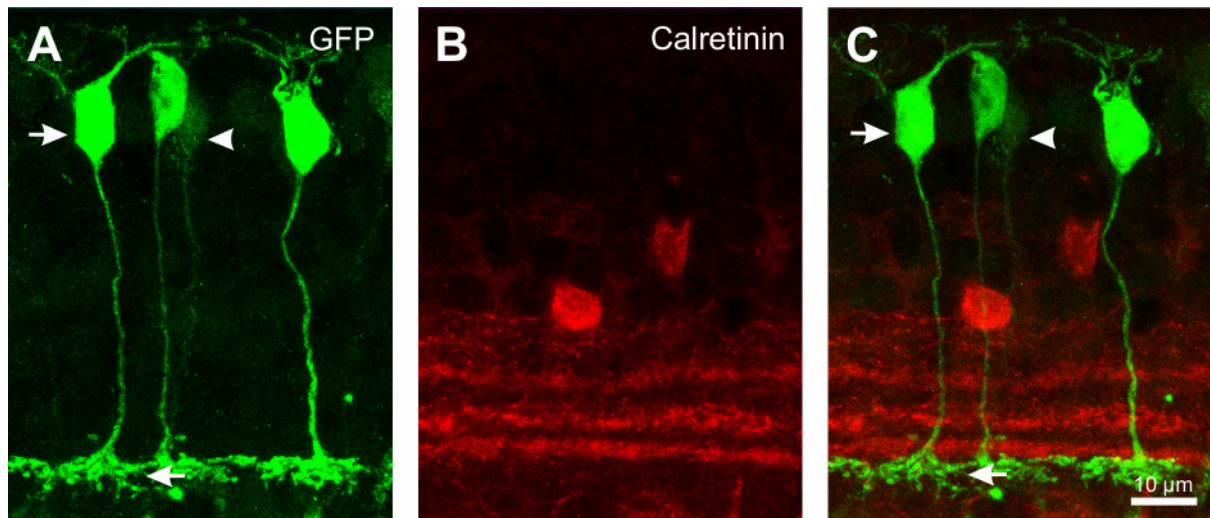


Abb. 3.1.5: Doppelfärbung mit Antikörpern gegen GFP und Calretinin in der vertikal geschnittenen Retina des transgenen Mäusestamms GUS_{8.4}GFP (Projektion).

A, Der GFP-Antikörper färbt Typ7 Bipolarzellen (Pfeile) und Stäbchenbipolarzellen (Pfeilspitze).

B, Der Calretinin-Antikörper markiert drei Banden in der IPL, die unterste ist die ON-cholinerge Bande.

C, Überlagerung der Kanäle.

3.1.6 Im Mäusestamm Clomeleon-1 wird GFP in Typ9 Bipolarzellen exprimiert

In **Abb. 3.1.6** ist die Doppelfärbung mit Antikörpern gegen GFP und Calretinin in Clomeleon-1 Mäusen gezeigt. Dieser transgene Mäusestamm exprimiert unter Kontrolle des Thy1 Promotors Clomeleon-1, ein Dimer aus GFP Molekülen, die über eine Chlorid-sensitive Polypeptidkette verbunden sind (Kuner und Augustine, 2000; Kuner et al., 2002) auch in der Retina. Die Färbung mit dem Antikörper gegen GFP (**A**) zeigt eine Bipolarzelle, die nahe der GCL stratifiziert (Pfeilspitzen). Das Axonterminalsystem ist sehr breit verzweigt, ebenso sind Dendriten gefärbt. Man kann im Schnitt nicht erkennen, ob es sich dabei um Typ8 oder Typ9 handelt, da Fortsätze von Amakrin- und Ganglienzellen in der IPL sehr kräftig gefärbt sind und dadurch das Axonterminalsystem schlecht zu verfolgen ist. Haverkamp et al. (2005) beschreiben diese Zelle als Typ9 Bipolarzelle. Wie später gezeigt wird (**Abb. 3.1.7.4**), wird Clomeleon-1 noch in einem zusätzlichen Bipolarzelltyp exprimiert.

Wie in **Abb. 3.1.1** zu sehen ist, wird in der inneren IPL, in der diese Zelle stratifiziert, sehr wenig HCN1 exprimiert. Auch elektrophysiologisch können keine HCN-Kanäle in dieser Zelle nachgewiesen werden (3.2.2.7).

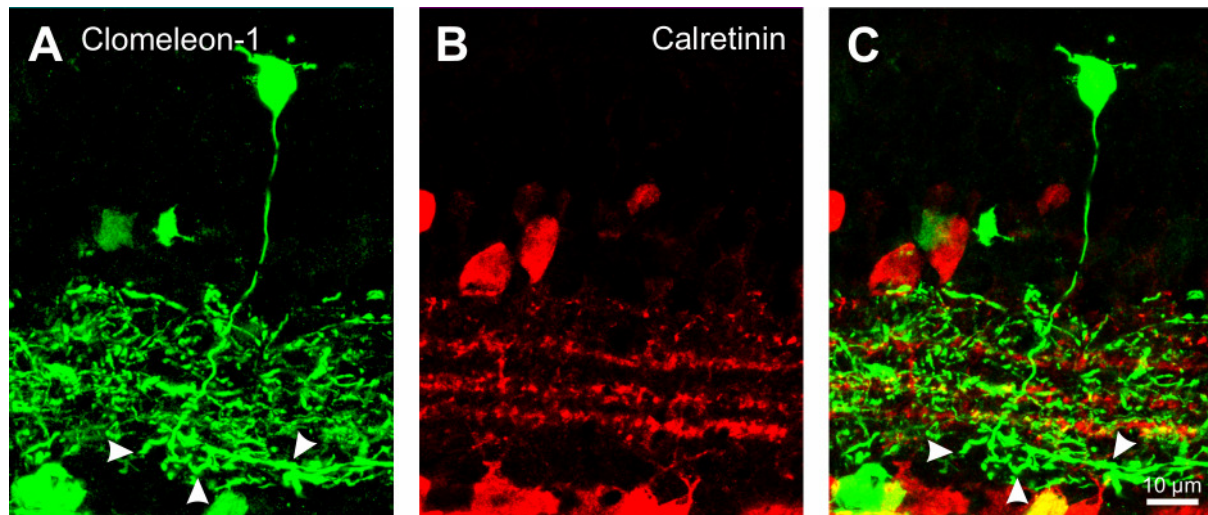


Abb. 3.1.6: Doppelfärbung mit Antikörpern gegen GFP und Calretinin in der vertikal geschnittenen Retina des transgenen Mäusestamms Clomeleon-1 (Projektion).

A, Der GFP-Antikörper färbt Typ9 Bipolarzellen, die sehr breit am unteren Ende der IPL stratifizieren (Pfeilspitzen).

B, Der Calretinin-Antikörper markiert drei Banden in der IPL.

C, Überlagerung der Kanäle.

Durch die immunhistochemischen Färbungen auf Kryostatschnitten konnten mit spezifischen Antikörpermarkern einige Bipolarzelltypen identifiziert werden. Durch Kombination mit Antikörpern gegen die HCN-Isoformen konnte die Expression von HCN1 in Typ5 und Stäbchenbipolarzellen, sowie von HCN4 in Typ3 Bipolarzellen nachgewiesen werden. Die verschiedenen Antikörper werden im Folgenden nun benutzt, um Bipolarzellen in Ganzretinapräparaten zu quantifizieren.

3.1.7 Quantifizierung der Bipolarzellen in Ganzretinapräparaten

In **Abb. 3.1.7.1** ist eine Dreifachfärbung im Ganzretinapräparat mit Antikörpern gegen HCN1 (**A**, grün), CabP5 (**B**, rot) und PKC (**C**, blau) gezeigt. Die Abbildung zeigt eine Projektion konfokaler Schnitte durch die INL.

Mit dem Antikörper gegen CabP5 werden Somata von Stäbchenbipolarzellen, Typ3 und Typ5 Bipolarzellen markiert (**B**). PKC ist besonders in der Zellmembran von Stäbchenbipolarzellen zu finden (**C**). In der Überlagerung (**D**) sind Stäbchenbipolarzellsomata also rot und von einem blauen Ring umgeben. Typ5 Bipolarzellen sind CabP5- und HCN1-positiv, aber PKC-negativ (kurze Pfeile). In der Überlagerung sieht man ein rotes Soma, das von einem grünen Ring umgeben ist. Typ3 Bipolarzellen sind weder HCN1- noch PKC-positiv und erscheinen in der Überlagerung ausschließlich rot (lange Pfeile). Die so identifizierten Zelltypen wurden

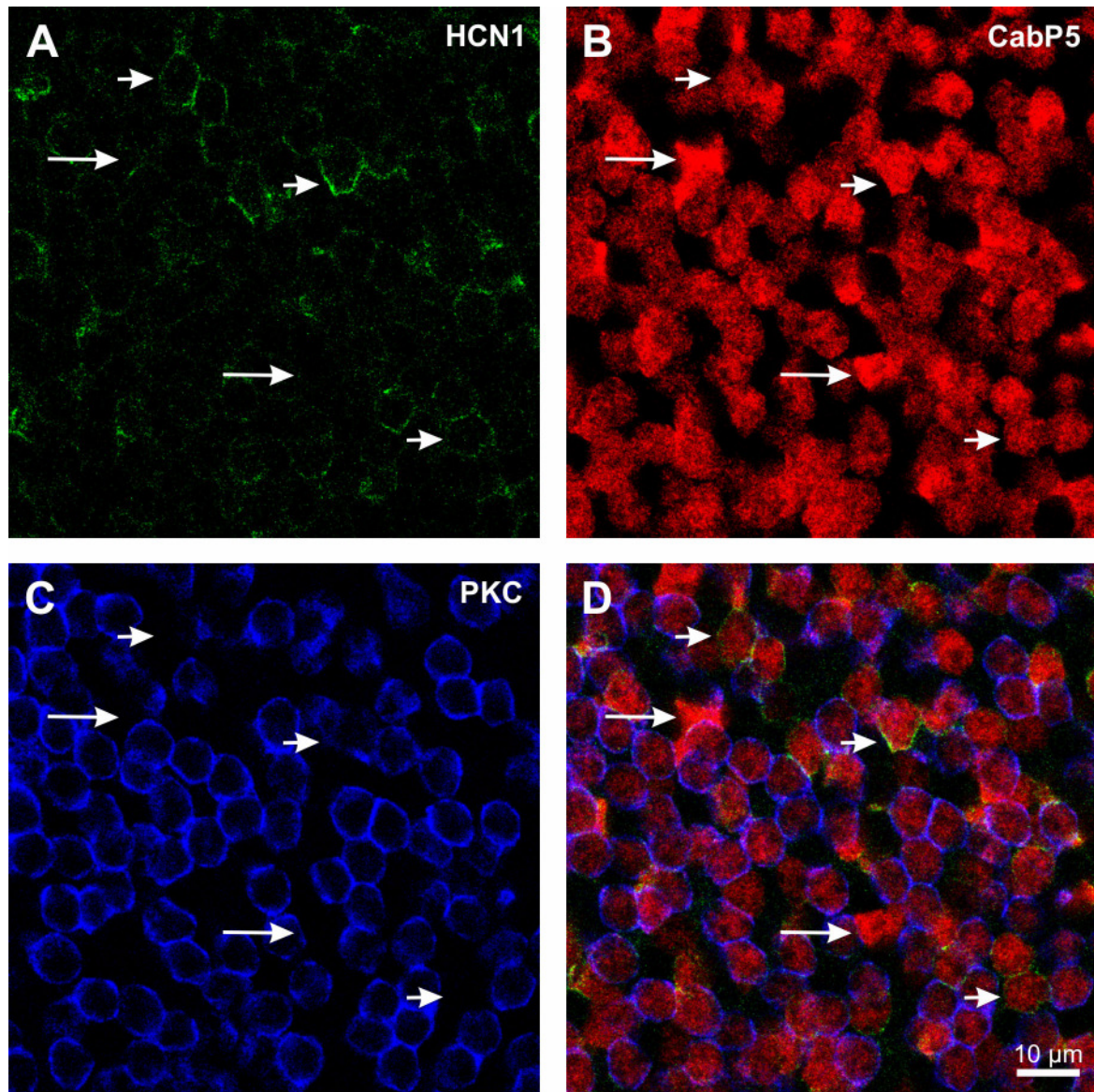


Abb. 3.1.7.1: Dreifachfärbung gegen HCN1, CabP5 und PKC im Ganzretinapräparat (Projektion).

A, Der HCN1-Antikörper färbt Typ5 Bipolarzellsomata kräftig.

B, Der Antikörper gegen CabP5 färbt Stäbchenbipolarzellen, Typ3 und Typ5 Bipolarzellen.

C, Der PKC-Antikörper färbt Stäbchenbipolarzellen.

D, Überlagerung der Kanäle; Stäbchenbipolarzelle: CabP5- und PKC-positiv; Typ5: CabP5- und HCN1-positiv, PKC-negativ (kurze Pfeile); Typ3: CabP5-positiv, HCN1- und PKC-negativ (lange Pfeile).

in mehreren Feldern ausgezählt und die Zelldichte in Zellen/mm² umgerechnet. Die Stäbchenbipolarzelle hat mit 12227/mm² die höchste Dichte, die Typ5 Bipolarzellen wurden mit 5004/mm², die Typ3 Zellen mit 1787/mm² bestimmt (siehe **Tab. 3.1.7**). Zusätzlich wurde die Dichte der Typ3 und Typ5 Zellen auf die Dichte der Stäbchenbipolarzellen bezogen, um die Dichte in unterschiedlichen Retinae besser miteinander vergleichen zu können. Auf 100 Stäbchenbipolarzellen kommen 13,6 Typ3 Zellen und 37,8 Typ5 Zellen. Auch bei allen weiteren Quantifizierungen wurde stets eine Doppelfärbung gegen PKC gemacht und die Dichte der ausgezählten Zellen in Relation zu den Stäbchenbipolarzellen angegeben.

Die Typ3 Bipolarzellen wurde auch in einer Färbung gegen HCN4 ausgezählt (Färbung nicht gezeigt). Damit stand für die Quantifizierung dieses Zelltyps ein zweiter Antikörper zur Verfügung. Das Ergebnis liegt mit $1350/\text{mm}^2$ nahe am Ergebnis aus der CabP5-Färbung.

In Ganzretinapräparaten der transgenen Maus-Linie GUS_{8.4}GFP (**Abb. 3.1.7.2**) konnten Typ 7 Bipolarzellen durch Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen GFP und PKC quantifiziert werden. In **A** ist die Färbung mit dem Antikörper gegen GFP gezeigt. Man erkennt kräftig gefärbte (Pfeil) und schwach gefärbte (Pfeilspitze) Somata. Die schwach gefärbten Somata sind PKC-positiv (**C**), es handelt es sich also um Stäbchenbipolarzellen (Vergleich **Abb. 3.1.5**). Die kräftig GFP-positiven und PKC-negativen Somata sind Typ7 Bipolarzellen. Es gibt Bereiche, in denen keine Typ7 Bipolarzellen gefärbt wurden (**A**, rechtes Rechteck) und Bereiche, in denen viele Typ7 Bipolarzellen gefärbt wurden (**A**, linkes Rechteck). Im linken Rechteck sind Typ7 Zellen gleichmäßig verteilt, das heißt die Abstände zwischen zwei Zellen sind jeweils ähnlich groß. Das ist charakteristisch für alle retinalen Zellpopulationen (Wässle und Riemann, 1978; Wässle und Boycott, 1991). Man kann deshalb davon ausgehen, dass auch in dem rechten Rechteck Typ7 Zellen vorhanden sind, die aber aus ungeklärten Gründen kein GFP exprimieren. Bestimmt man die Dichte der Typ7 Zellen also in Feldern mit „Löchern“, wie in **Abb. 3.1.7.2** gezeigt, wird sie niedriger ausfallen ($675/\text{mm}^2$), als sie in Wirklichkeit ist. Werden dagegen nur solche Felder ausgezählt, in der die Typ7 Zellen homogen verteilt sind (wie im linken Rechteck), ergibt sich eine mittlere Dichte von $2024/\text{mm}^2$.

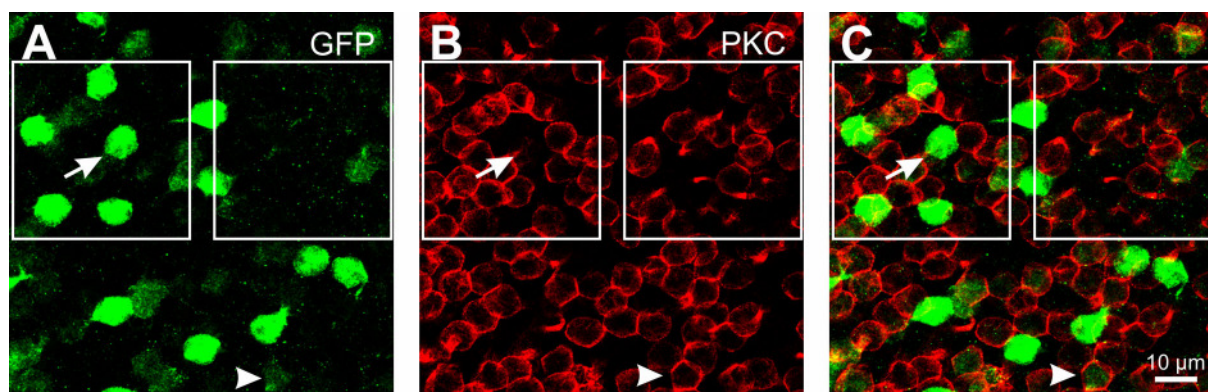


Abb. 3.1.7.2: Doppelfärbung mit Antikörpern gegen GFP (Projektion) und PKC im Ganzretinapräparat der GUS_{8.4}GFP-Linie.

A, Der GFP-Antikörper färbt Typ7 Bipolarzellen (Pfeil) und Stäbchenbipolarzellen (Pfeilspitze). Es gibt Bereiche, in denen viele Typ7 Zellen (linkes Rechteck) bzw. wenige Typ7 Zellen (rechtes Rechteck) gefärbt wurden.

B, Der Antikörper gegen PKC färbt Stäbchenbipolarzellen.

C, Überlagerung der Kanäle.

Die GFP-Färbung wurde als Projektion dargestellt, die PKC-Färbung, aus Gründen der Übersicht, nur als einzelner optischer Schnitt. Deshalb wirken die PKC-positiven Stäbchenbipolarzellen teilweise inhomogen verteilt. Dies war aber nicht der Fall.

In **Abb. 3.1.7.3** ist die Doppelfärbung mit Antikörpern gegen GFP und PKC in einem Ganzretinapräparaten einer Clomeleon-1 Maus gezeigt. Die GFP-positiven Zellen wurden nach Haverkamp et al. (2005) als Typ9 Zellen klassifiziert (**Abb. 3.1.6**). Man sieht in **A**, dass der Dendritenbaum der Typ9 Bipolarzellen sehr groß ist. Typ9 Zellen verschalten wahrscheinlich ausschließlich mit Blauzapfen (Haverkamp et al., 2005). Da dieser Zapfentyp sehr selten ist (5 % aller Zapfen) müssen diese Blauzapfen-Bipolarzellen einen sehr großen Dendritenbaum besitzen, um mehrere Zapfen gleichzeitig zu erreichen. Dies ist bei der Typ9 Zelle der Fall. Die Quantifizierung für Typ9 ergab 516 Zellen/mm². Die Dichte der Typ9 Zellen ist sehr gering, wie es zu erwarten wäre, wenn dieser Zelltyp nur mit den seltenen Blauzapfen verschaltet. Die kurz vor Abschluß der Arbeit erschienene Veröffentlichung von Haverkamp et al. (2005) gibt die Dichte der Typ9 Bipolarzellen mit 300 bis 600/mm² an. Dieser Wert deckt sich gut mit meinen Daten.

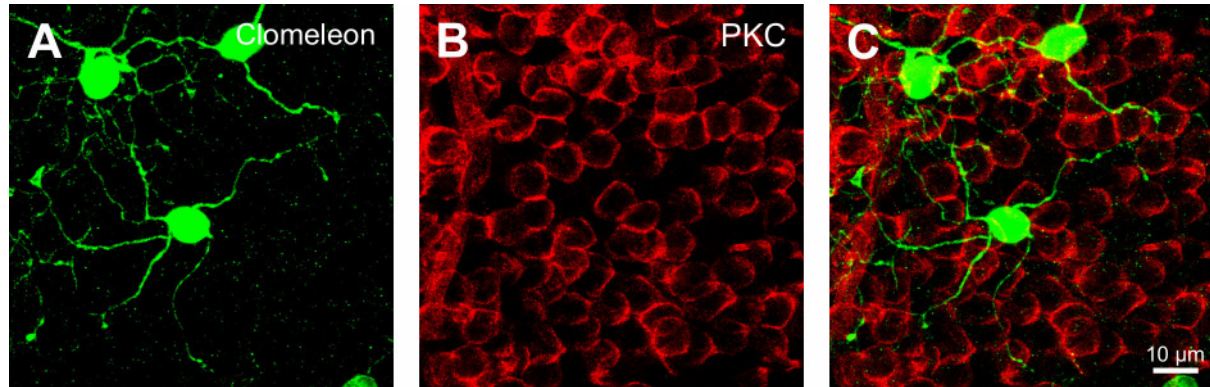


Abb. 3.1.7.3: Doppelfärbung mit Antikörpern gegen GFP (Projektion) und PKC im Ganzretinapräparat der Clomeleon-1 Linie.

A, Der GFP-Antikörper färbt Typ9 Bipolarzellen mit sehr langen Dendriten.

B, Der Antikörper gegen PKC färbt Stäbchenbipolarzellen.

C, Überlagerung der Kanäle.

Abb. 3.1.7.4 zeigt eine Übersichtsaufnahme im Ganzretinapräparat eines Clomeleon-1 Tieres. Man sieht neben der Färbung mit dem Antikörper gegen GFP (grün) eine Färbung durch Erdnußagglutinin (PEA, rot), das an die Zapfenendfüße bindet. In der Mitte sieht man eine GFP-positive Bipolarzelle mit einem sehr großen Dendritenbaum. Diese Bipolarzelle scheint sehr gezielt nur einige wenige Zapfenendfüße zu kontaktieren (Pfeilspitzen). Dabei wird es sich wahrscheinlich um die seltenen Blauzapfen handeln. Einige Fortsätze der Bipolarzelle

scheinen „blind“ zu enden und keine Kontakte zu machen (kurze Pfeile). Dies wurde schon von Blauzapfen-Bipolarzellen in der Maus (Haverkamp et al., 2005) und im Affen (Kouyama und Marshak, 1992; Wässle et al., 1994; Herr et al., 2003) beschrieben und ist eventuell darauf zurückzuführen, dass diese Fortsätze keine Blauzapfen erreichen konnten. Eine andere GFP-positive Bipolarzelle, mit einem Kreis markiert, besitzt sehr viel kürzere Dendriten und scheint alle Zapfenendfüße in ihrer unmittelbaren Nähe zu kontaktieren. Bei dieser Zelle muss es sich um einen anderen Bipolarzelltyp handeln. Damit scheinen in dieser Mauslinie mindestens zwei Bipolarzelltypen Clomeleon-1 zu exprimieren. Die Identität des zweiten Bipolarzelltyps ist unklar. Durch die starke Clomeleon-1 Expression in der IPL konnte das Stratifikationsniveau dieses zweiten Bipolarzelltyps nicht bestimmt werden (siehe 3.1.6). Im Ganzretinapräparat konnte der zweite Bipolarzelltyp nicht getrennt quantifiziert werden, da die Dendriten nicht immer deutlich gefärbt waren. Es ist außerdem unklar, ob von diesem zweiten Typ alle Zellen Clomeleon-1 exprimieren oder nur einige.

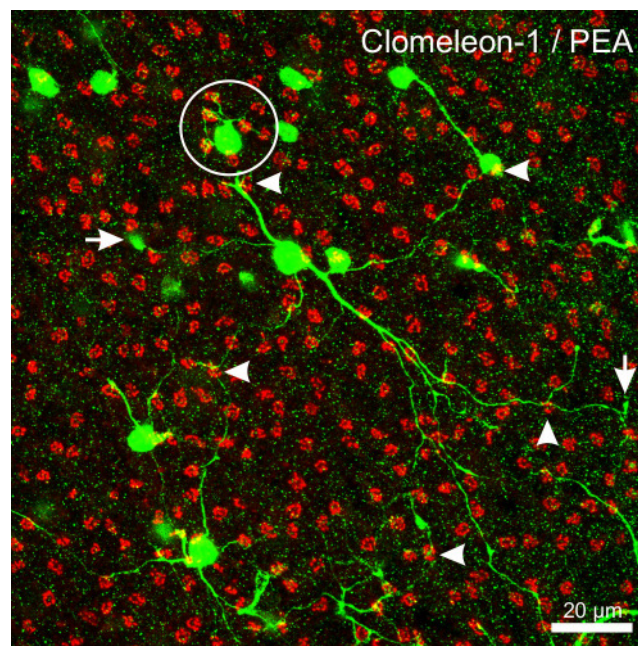


Abb. 3.1.7.4: Doppelfärbung GFP/PEA im Ganzretinapräparat der Clomeleon-1 Linie (Projektion).

PEA (Peanutagglutinin) färbt Zapfenendfüße (rot). Mit dem GFP-Antikörper (grün) können zwei Bipolarzelltypen markiert werden. Ein Typ in der Mitte besitzt einen sehr großen Dendritenbaum und kontaktiert gezielt nur wenige Zapfenendfüße (Pfeilspitzen), bei denen es sich wahrscheinlich um Blauzapfen handelt. Einige Fortsätze enden „blind“ (kurze Pfeile). Bei diesem Bipolarzelltypen handelt es sich um die Typ9 Bipolarzelle. Ein anderer, nicht identifizierbarer Bipolarzelltyp kontaktiert alle Zapfenendfüße in seiner unmittelbaren Umgebung (Kreis).

Zelltyp	Marker	Tiere	Felder*	Zellen/mm ²	Typ X / SB [%]	HCN-Kanal
Stäbchenbipolarzelle (SB)	PKC +	5	19	12227±1460	-	HCN1
Typ 1 + 2	NK3R +	2	6	2382±501	18,6	-
Typ 3	HCN4 +	1	3	1350±390	11,1	HCN4
	HCN1 - CabP5 +	2	4	1787±225	13,6	HCN4
Typ 5	HCN1 + CabP5 +	2	4	5004±1010	37,8	HCN1
Typ 7	GFP +	1	47**	2024±376	17,7	HCN1
Typ 9***	GFP +	2	6	516±154	4,1	-

Tab. 3.1.7: Quantifizierung einzelner Bipolarzelltypen im Ganzretinapräparat.

Einzelne Bipolarzelltypen wurden durch Kombination von Antikörpermarkern im Ganzretinapräparat identifiziert und ausgezählt. Die Zellzahl der markierten Typen wurde auf die Zahl der Stäbchenbipolarzellen im jeweiligen Retinaausschnitt normiert. Insgesamt wurden 7146 Zellen ausgezählt.

* Jedes ausgezählte Feld hatte eine Fläche von 0,025 mm².

** Die Feldgröße betrug 0,0018 mm².

*** Wahrscheinlich wurde die Typ9 Zelle zusammen mit einem anderen Bipolarzelltyp ausgezählt.

Die Dichten der verschiedenen Bipolarzelltypen sind in **Tab. 3.1.7** zusammengefasst. Die Quantifizierung der Bipolarzellen zeigte, dass die Stäbchenbipolarzelle am häufigsten und die Typ5 Bipolarzelle am zweithäufigsten ist, gefolgt von der Typ7 und Typ3 Bipolarzelle. Typ1 und Typ2 Bipolarzellen konnten nur mit dem Antikörper gegen NK3R gefärbt und zusammen quantifiziert werden, da der Antikörper gegen CD15 im Ganzretinapräparat zu schwach färbt, um Typ2 Bipolarzellen getrennt auszuzählen. Am seltensten sind Typ9 Bipolarzellen.

Die folgenden elektrophysiologischen Messungen werden in erster Linie an Stäbchenbipolarzellen und Typ5 Bipolarzellen durchgeführt.

3.2 Einzelzell-Elektrophysiologie

In den folgenden Kapiteln werden die Eigenschaften von HCN1-Kanälen elektrophysiologisch in einem heterologen Expressionssystem untersucht und mit HCN1-Kanälen von Zellen in Retinaschnitten verglichen. Die Messungen wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurden zwei Parameter im Detail betrachtet: die Aktivierungskinetik und die Strom-Spannungsbeziehung. Unter denselben Bedingungen wurden retinale Zellen aus HCN1-Knockouttieren untersucht. Außerdem wurden retinale Zellen aus den Mäusestämmen C57Bl/6 und SV129 sowie aus Mäusen, die aus einer Kreuzung beider Stämme resultieren und den gemischten genetischen Hintergrund „C57SV“ haben, elektrophysiologisch miteinander verglichen. Alle Untersuchungen in diesem Kapitel wurden bei RT durchgeführt.

3.2.1 HCN1 in HEK293-Zellen

In **Abb. 3.2.1** sind Patch-clamp Messungen von HEK293-Zellen im Ganzzell-Modus dargestellt. Der HCN1-Kanal aus der Maus (msHCN1) wurde in diesen Zellen heterolog exprimiert. **A** zeigt oben das applizierte Spannungsprotokoll. Die Membranspannung der Zelle (V_m) wurde auf $V_m = -10$ mV geklemmt. Ausgehend von $V_m = -30$ mV wurde eine Familie von acht hyperpolarisierenden Spannungssprüngen von -15 mV Schrittweite und 1000 ms Dauer angelegt, um HCN-Kanäle zu aktivieren. Anschließend wurden die Zelle auf $V_m = +20$ mV depolarisiert, um die HCN1-Kanäle zu schließen, und danach wieder bei $V_m = -10$ mV gehalten. Bei den ersten beiden Spannungssprüngen auf $V_m = -30$, bzw. -45 mV zeigt sich keine Änderung in der Stromamplitude (**A**). Die Stromspuren liegen übereinander. Ab dem dritten Spannungssprung auf $V_m = -60$ mV kann ein langsam aktivierender Strom beobachtet werden, der durch zunehmende Hyperpolarisation größer und schneller wird - der HCN1-Strom.

Hyperpolarisierende Sprünge erzeugen kleine instantane Einwärts-Ströme, denen Ströme mit sigmoidalem Verlauf folgen. Der sigmoidale Verlauf spricht für eine komplexe Aktivierungskinetik in mehreren Schritten und ist charakteristisch für HCN-Ströme (Kaupp und Seifert, 2001). In HEK293-Zellen ist der sigmoidale Verlauf der HCN-Ströme nicht sehr gut zu beobachten. Wie später gezeigt wird, ist dieser Verlauf in einigen retinalen Zellen

ausgeprägter und besser zu sehen (**Abb. 3.2.2.3** und **3.2.2.4**).

Nachdem die Zelle auf $V_m = +20$ mV geklemmt wurde, sieht man Auswärtsströme, so genannte „tail-Ströme“ der sich langsam schließenden HCN-Kanäle. Die Amplitude ist abhängig vom Grad der vorhergehenden Hyperpolarisation. Während der Hyperpolarisation wird der Einwärtstrom in erster Linie von Na^+ getragen. Der tail-Strom ist auswärts gerichtet, da die angelegte Spannung positiver als das Umkehrpotential der HCN-Kanäle ist. Der HCN1-Strom wird durch 3 mM extrazelluläres Cs^+ geblockt (**B**, $V_m = -120$ mV). Dieser Block ist reversibel und gilt als ein Erkennungsmerkmal für HCN-Ströme.

Die Aktivierungskinetik, sowie die Kinetik der tail-Ströme sind stark spannungsabhängig. Vernachlässigt man die Verzögerung und betrachtet nur die langsam ansteigende Phase des Stromes, so kann man diese mathematisch mit einer einfachen oder einer zweifachen Exponentialfunktion beschreiben („exponentieller Fit“). Eine multiphasische Kinetik kann auf mehrere „gating“-Prozessen innerhalb des Kanals zurückzuführen sein (zur Übersicht: Kaupp und Seifert, 2001). In einigen Veröffentlichungen wird ein einfach exponentieller Fit verwendet, um die Aktivierungskinetik der HCN-Kanäle zu beschreiben (Santoro et al., 1998; Seifert et al., 1999; Ishii et al., 2001; Moosmang et al., 2001; Ludwig et al., 1998). In anderen Veröffentlichungen wird ein exponentieller Fit mit zwei Komponenten benützt (Santoro et al., 2000; Moroni et al., 2000; Ulens und Tytgat, 2001a; Chen et al., 2001).

In **C** ist der letzte Sprung des Protokolls aus **A** ($V_m = -135$ mV) in einer anderen Skalierung zu sehen. Diese Stromspur wurde zum einen zweifach (oben) und zum anderen einfach (unten) exponentiell gefittet. Der zweifach exponentielle Fit beschreibt die Kurve sehr gut. Aus insgesamt acht Zellen wurde eine erste Zeitkonstante von $\tau_1 = 26 \pm 6$ ms ermittelt. Die erste Komponente des zweifach exponentiellen Fits trägt zu $57 \pm 8\%$ zum gesamten HCN-Strom bei. Die zweite Zeitkonstante τ_2 liegt bei 123 ± 34 ms. Die zweite Komponente trägt zu $43 \pm 8\%$ zum Gesamtstrom bei. Die Zeitkonstante gibt an, zu welchem Zeitpunkt der Strom $\sim 63\%$ seiner maximalen Amplitude erreicht. Bei der einfach exponentiellen Funktion wird die Kurve systematisch schwach über- bzw. unterfittet (Pfeilspitzen). Die resultierende Zeitkonstante liegt bei $\tau = 60 \pm 11$ ($n = 8$) und damit ungefähr im Bereich der Zeitkonstanten von 100 bis 300 ms, die von anderen Autoren bei $V_m = -130$ bis -100 mV für HCN1 angegeben werden. Für HCN2 werden Zeitkonstanten von 200 bis 500 ms ($V_m = -140$ bis -100 mV); für HCN4 von mehreren hundert Millisekunden ($V_m = -150$ mV) bis zu 30 Sekunden ($V_m = -70$ mV) genannt (Kaupp und Seifert, 2001; Ivanova, 2003).

Außer der Aktivierungskinetik wurde noch ein zweiter Parameter analysiert: die Strom-Spannungsbeziehung. Eine Kennzahl dafür ist der $V_{1/2}$ -Wert. Dieser Wert gibt die

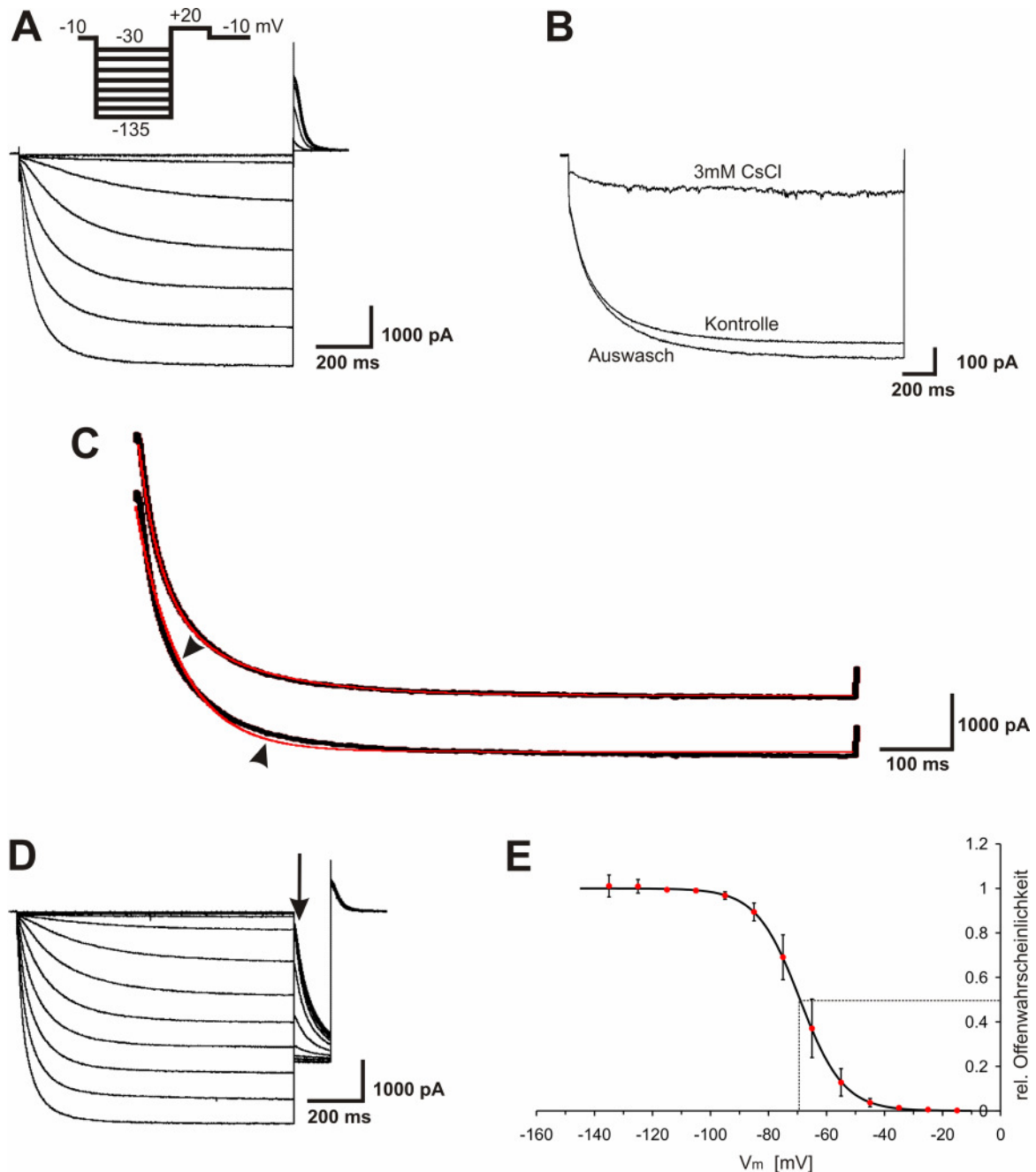


Abb. 3.2.1: Heterolog exprimierter msHCN1 in HEK293-Zellen.

A, Spannungsprotokoll; Haltespannung = -10mV; ausgehend von $V_m = -30$ mV wurden hyperpolarisierende Spannungssprünge von -15 mV Schrittweite bis maximal $V_m = -135$ mV von 1000 ms Dauer appliziert; nach jeder Hyperpolarisation folgte ein 700 ms langer Sprung auf +20 mV, um die Kanäle vollständig zu schließen.

B, HCN1 wird reversibel durch 3 mM Cs^+ blockiert ($V_m = -120$ mV).

C, Die letzte Stromspur aus **A** ($V_m = -135$ mV) wurde sowohl zweifach (oben) und als auch einfach (unten) exponentiell gefittet. Der zweifach exponentielle Fit beschreibt die Kurve sehr gut ($\tau_1 = 29$ ms (61 %), $\tau_2 = 118$ ms (39 %). Bei der einfach exponentiellen Funktion ($\tau = 61$ ms) wird die Kurve systematisch leicht über- bzw. unterfittet (Pfeilspitzen).

D, Messung der Strom-Spannungsbeziehung, die Zellen wurden auf $V_m = -15$ mV geklemmt und in Spannungsfamilien von -10 mV Schrittweite bis auf $V_m = -135$ mV (1500 ms) hyperpolarisiert. Stromamplituden wurden bei $V_m = -110$ mV (Pfeil) gemessen. Am Ende des Sprunges wurde die Zelle für 800 ms auf -10 mV depolarisiert, um alle HCN1-Kanäle zu schließen.

E, Die Strom-Spannungsbeziehung in HEK293-Zellen: $V_{1/2} = -69,1 \pm 3,7$ mV, $s = 8,3 \pm 1,8$ mV, $n = 4$.

Membranspannung an, bei der die relative Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle 0,5 beträgt. Es ist kompliziert, die Strom-Spannungsbeziehung während der Hyperpolarisation zu bestimmen, da dabei sowohl die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle als auch die elektromotorische Kraft verändert werden. Man nutzt für die Messung der Strom-Spannungsbeziehung die Tatsache, dass die Kinetik der HCN-Kanäle langsam ist. Die Zellen werden in einer Familie von Spannungssprüngen hyperpolarisiert und dann jeweils auf $V_m = -110$ mV geklemmt. Bei dieser Spannung werden alle Messungen durchgeführt, damit die elektromotorische Kraft stets gleich groß ist. Die Stromamplitude wird in den ersten Millisekunden dieses Sprungs gemessen (Pfeil), denn die Kanäle besitzen dann noch die Offenwahrscheinlichkeit, die sie bei der vorausgehenden Hyperpolarisation hatten.

Die Amplituden der tail-Ströme werden gegen die Membranspannung der vorausgehenden Hyperpolarisationen aufgetragen. Die Strom-Spannungsbeziehung wurde mit der Boltzmann-Funktion gefittet (siehe **Kap. 2.2.5**) und in **E** abgebildet. Das $V_{1/2}$ von HCN1 in HEK293-Zellen liegt bei $-69,1 \pm 3,7$ mV bei einer Steigung von $8,3 \pm 1,8$ mV. Von anderen Arbeitsgruppen wird ein $V_{1/2}$ -Wert für HCN1 von -72 bis -60 mV für HCN1 angegeben (Santoro et al., 2000; Ishii et al., 2001; Ulens und Tytgat, 2001b; Chen et al., 2001).

3.2.2 Untersuchung an retinalen Zellen des Mäusestammes C57Bl/6

Die folgenden elektrophysiologischen Untersuchungen wurden an Stäbchen und Bipolarzellen im Schnittpräparat von Mäuseretinae des Stammes C57Bl/6 durchgeführt. Mäuse des Stammes C57Bl/6 werden als Standard für elektrophysiologische Untersuchungen verwendet. Die Zellen wurden während der Messungen im Ganzzell-Modus mit den Farbstoffen Lucifer Yellow (LY), bzw. Alexa 488 und Biocytin gefüllt. Nach Ende der Ableitung wurden die Schnitte mit Paraformaldehyd fixiert und immunhistochemisch weiterverarbeitet. LY wurde durch eine Färbung mit Antikörpern gegen LY, Biocytin durch Streptavidin-Alexa 488 nachgewiesen. Die Zellen wurden nach dem Klassifikationsschema nach Ghosh et al. (2004) morphologisch klassifiziert.

3.2.2.1 Photorezeptoren exprimieren HCN1

Wie schon in **Abb 3.1.1.1 B** gezeigt wurde, exprimieren Photorezeptoren sehr kräftig HCN1 in Innensegmenten, Somata und Axonterminalsyste men. Die ersten HCN-Ströme wurden 1978 von Fain et al. in der Retina in Stäbchen beschrieben. Die Retina von Mäusen ist dominiert von Stäbchen. Nur $\sim 3\%$ aller Photorezeptoren sind Zapfen (Jeon et al., 1998). Zapfen wurden in dieser Arbeit nicht abgeleitet.

In **Abb. 3.2.2.1 A** ist das Spannungsprotokoll zu sehen. Die Zelle wurde auf eine Membranspannung von $V_m = -60$ mV geklemmt. Davon ausgehend wurde eine Familie von sechs hyperpolarisierenden Sprüngen von -15 mV Schrittweite und 500 ms Dauer angelegt. Anschließend erfolgte ein Sprung zurück auf $V_m = -60$ mV (250 ms), gefolgt von einem Sprung auf $V_m = -10$ mV (150 ms) um die Kanäle zu schließen. Nach weiteren 100 ms bei $V_m = -60$ mV erfolgte der nächste Spannungssprung. Dieses Protokoll wurde bei allen retinalen Zellen verwendet und wird im Folgenden als „Standardprotokoll“ bezeichnet.

In der Spannungsklemme reagieren die Stäbchen auf hyperpolarisierende Sprünge mit instantanen Strömen (Pfeilspitze), gefolgt von langsam aktivierenden HCN-Strömen (Pfeil).

Bei allen untersuchten retinalen Zellen wurden bei Hyperpolarisation instantane Ströme beobachtet, deren Amplituden sich von Zelltyp zu Zelltyp unterscheiden. Die instantanen Ströme wurden nicht genauer analysiert, aber einiges spricht dafür, dass sie von einwärtsgerichtenden K^+ -Kanälen herrühren und nicht von HCN-Kanälen. In Typ5 Bipolarzellen der Maus (eigene Beobachtung, nicht gezeigt) und in Stäbchen der Ratte (Ivanova, 2003) konnten die instantanen Ströme durch Ba^{2+} blockiert werden. In Zellen aus HCN1-Knockoutmäusen fehlen die HCN1-Ströme, die instantanen Ströme sind aber weitgehend unverändert (siehe **Kap. 3.2.3.2**).

Zur Messung der HCN-Stromamplitude wurde die Amplitude des instantanen Stroms von der Amplitude des Stroms am Ende der Hyperpolarisation auf $V_m = -135$ mV abgezogen.

Die HCN-Ströme in Stäbchen konnten bei $V_m = -135$ mV gut mit einer einfach exponentiellen Funktion mit der Zeitkonstanten $\tau = 29 \pm 6$ ms gefittet werden (Amplitude: -39 ± 11 pA, $n = 12$). Diese Zeitkonstante ist deutlich schneller, als für HCN1 in HEK293-Zellen ($\tau = 60 \pm 11$ ms). Die HCN-Ströme konnten in allen untersuchten retinalen Zelltypen zufriedenstellend einfach exponentiell beschrieben werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden die Verläufe der HCN-Ströme retinaler Zellen nur einfach exponentiell gefittet und mit der Zeitkonstante des einfach exponentiellen Fits aus den HEK293-Zellen verglichen. Die schnelle HCN1-ähnliche Kinetik der HCN-Ströme in Stäbchen stimmt gut mit der starken HCN1-Immunfluoreszenz

überein. Nach dem Sprung auf $V_m = -60$ mV konnten kleine transiente tail-Ströme gemessen werden. Diese sind auf das langsame Schließen der HCN-Kanäle zurückzuführen.

Während des Sprungs auf $V_m = +10$ mV werden kleine Auswärtsströme gemessen. Diese sind wahrscheinlich auf K^+ -Kanäle zurückzuführen die schon früher in Photorezeptoren beschrieben wurden (Wollmuth, 1994).

Sowohl die instantanen Ströme als auch die HCN1-Ströme in Stäbchen werden reversibel durch 3 mM extrazelluläres Cs^+ geblockt (**B**). Cs^+ blockt auch einwärtsrektifizierende K^+ -Kanäle und somit den instantanen Strom. Durch Cs^+ können HCN-Kanäle deshalb nicht von einwärtsrektifizierenden K^+ -Kanälen unterschieden werden.

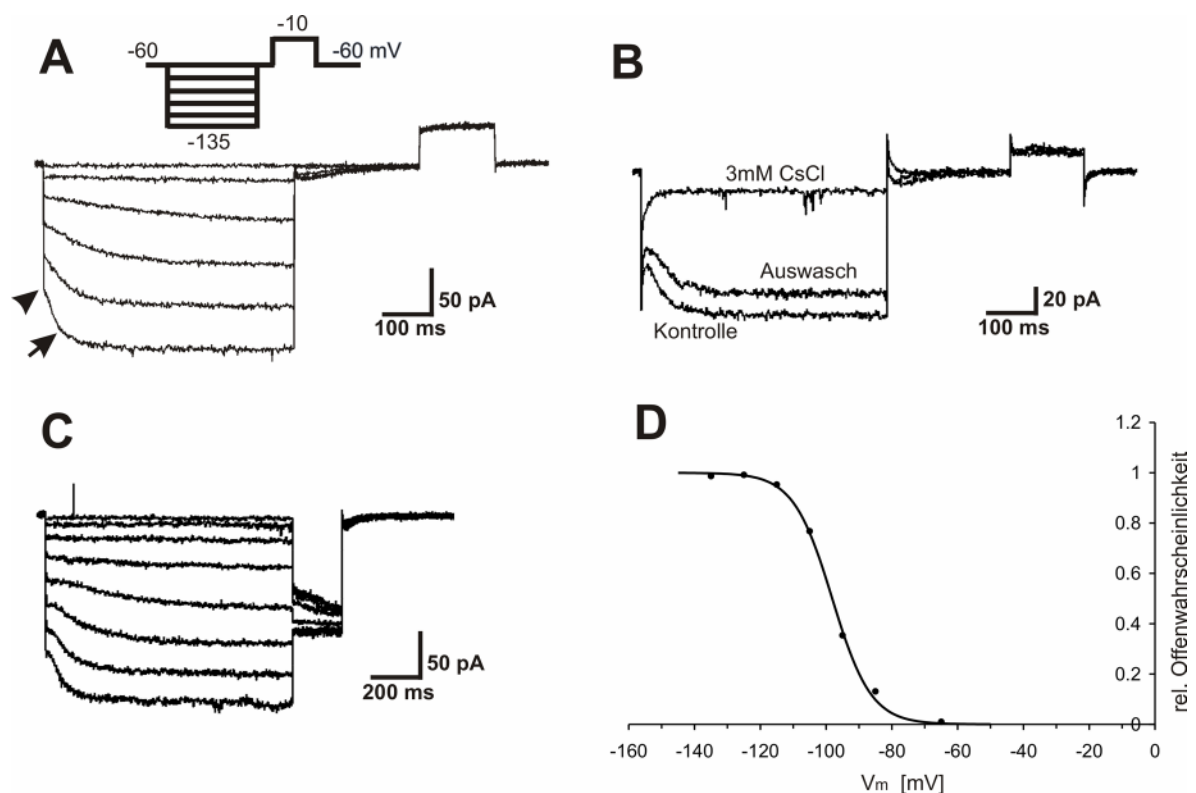


Abb. 3.2.2.1: Hyperpolarisationsaktivierte Ströme in Stäbchen.

A, Messung der Aktivierungskinetik: Haltespannung $V_m = -60$ mV; hyperpolarisierende Spannungssprünge von -60 bis -135 mV von 500 ms Dauer wurden appliziert. Dies führte zu instantanen Strömen (Pfeilspitze) und HCN-Strömen (Pfeil). Nach jeder Hyperpolarisation folgte ein 250 ms langer Sprung auf -60 mV um tail-Ströme zu messen, danach wurde die Zelle für 150 ms auf $V_m = -10$ mV geklemmt, um die Kanäle vollständig zu schließen. Einfach exponentielle Fits bei $V_m = -135$ mV aus 12 Zellen ergaben eine Zeitkonstante von $\tau = 29 \pm 6$ ms; Amplitude: -39 ± 11 pA, instantaner Strom: -92 ± 22 pA.

B, Instantane Ströme und HCN-Ströme werden reversibel durch 3 mM Cs^+ blockiert ($V_m = -135$ mV).

C, Messung der Strom-Spannungsbeziehung; Haltespannung $V_m = -60$ mV. Ausgehend von $V_m = -65$ mV wurde die Zelle in Spannungsfamilien von -10 mV Schrittweite bis auf $V_m = -135$ mV (1000 ms) hyperpolarisiert, Messungen der Stromamplitude wurden bei $V_m = -110$ mV durchgeführt.

D, Die Strom-Spannungsbeziehung in Stäbchen, $V_{1/2} = -98,0$ mV, $s = 5,9$ mV, $n = 1$.

Die Strom-Spannungsbeziehung des HCN1-Kanals konnte in nur einem Stäbchen gemessen werden. Bei allen anderen Zellen brach die Ableitung während der langen

hyperpolarisierenden Sprünge zusammen. Die Zelle wurde bei $V_m = -60$ mV gehalten und es wurden hyperpolarisierende Sprünge von 1000 ms Länge von $V_m = -65$ bis -135 mV durchgeführt. Die Stromamplitude wurde in den ersten Millisekunden beim Sprung auf $V_m = -110$ mV gemessen (**C**). Der $V_{1/2}$ -Wert (**D**) war mit $-98,0$ mV ($s = 5,9$ mV) deutlich negativer als der $V_{1/2}$ -Wert in HEK293-Zellen ($-69,1 \pm 1,8$ mV, $s = 8,3 \pm 1,0$ mV).

3.2.2.2 Funktion von HCN1 in Photorezeptoren

Photorezeptoren sind bei Dunkelheit depolarisiert und werden durch einen Lichtreiz hyperpolarisiert. Die Funktion von HCN in Photorezeptoren ist es, Lichtantworten zu verkürzen (Fain et al., 1978; Baylor et al., 1984; Hestrin, 1987). Satoh und Yamada (2000) zeigten dies in isolierten Photorezeptoren des Bullenfrosches (**Abb. 3.2.2.2 A**). Wird der Photorezeptor durch einen Lichtblitz gereizt, führt dies zu einer Hyperpolarisation, die sehr kurz ist (wenige ms lang), da schnell HCN-Kanäle aktivieren und die Zelle auf ein Zwischenniveau depolarisieren (Pfeilspitze). Davon ausgehend erfolgt dann eine zweite langsame, zwei bis drei Sekunden dauernde Depolarisation auf das Ausgangspotential. Nach dem Einwaschen von $100 \mu\text{M}$ des HCN-Kanalblockers ZD7288 (BoSmith et al., 1993) fehlt diese erste, sehr schnelle Depolarisation und es dauert deutlich länger bis der Wert des Zwischenniveaus erreicht wird. Der HCN-Kanal verkürzt also die Lichtantwort.

Ich habe diese Situation in Stäbchen der Maus in der Stromklemme nachgestellt (**B**). Die Zelle wurde durch Strominjektion auf ein $V_m \sim -70$ mV eingestellt. Dann wurde eine Familie hyperpolarisierender Ströme von $-2,5$ pA schrittweise injiziert, die eine lichtinduzierte Hyperpolarisation simulieren sollten. Die resultierenden Änderungen in der Membranspannung wurden aufgezeichnet. Nach der Strominjektion hyperpolarisiert das Stäbchen bis zu einer Membranspannung, die eine Aktivierung der HCN-Kanäle bewirkt. Die Kanäle öffnen und depolarisieren die Zelle. Das Ergebnis ist ein charakteristischer „voltage sag“ (Pfeilspitze). Nach Ende der Strominjektion kommt es zu einem Überschießen der Membranspannung (kurzer Pfeil), da die Kanäle nicht sofort schließen.

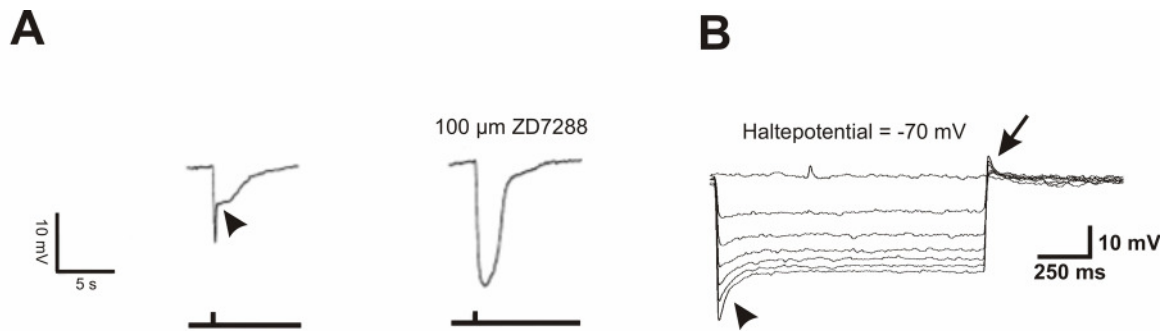


Abb. 3.2.2.2: Die Funktion von HCN in Photorezeptoren.

A, Lichtantwort im isolierten Photorezeptor des Bullenfrosches. Ein kurzer Lichtreiz (markiert in der unteren Spur) bewirkt eine Hyperpolarisation des Photorezeptors. Die Zelle depolarisiert sehr schnell auf ein Zwischenniveau (Pfeilspitze), von dem aus eine langsame zweite Depolarisation auf die Ausgangsspannung erfolgt. Nach Applikation von 100 μ M des HCN-Kanalblockers ZD7288 bleibt die schnelle erste Depolarisation aus. Die Zelle benötigt deutlich länger um das Zwischenniveau zu erreichen (aus Satoh und Yamada, 2000).

B, Stromklemme im Stäbchen der Maus. Die Membranspannung der Zelle wurde durch Strominjektion auf ungefähr -70 mV eingestellt. Eine Reihe von hyperpolarisierenden Strömen mit -2,5 pA Schrittweite wurde injiziert, um eine lichtinduzierte Hyperpolarisation zu simulieren. Die Zelle hyperpolarisiert, bis sie eine Spannung erreicht, bei der die HCN-Kanäle öffnen und diese die Zelle depolarisieren („voltage sag“, Pfeilspitze). Nach Ende der Strominjektion kommt es zu einem Überschießen der Membranspannung (kurzer Pfeil).

3.2.2.3 HCN1 in Stäbchenbipolarzellen

Immunhistochemische Untersuchung von Stäbchenbipolarzellen zeigten eine sehr schwache Färbung mit Antikörpern gegen HCN1 (Daten nicht gezeigt). Die Expression von HCN1 in diesem Zelltyp wurde nun elektrophysiologisch untersucht.

Während der elektrophysiologischen Messung wurden die Zellen mit den Farbstoffen Lucifer Yellow und Biocytin gefüllt. Nach der Ableitung wurde die Patch-Pipette entfernt, die Schnitte wurden in PA fixiert und gegen Biocytin (grün) und Calretinin (rot) gefärbt. Solch eine gefärbte Stäbchenbipolarzelle ist in **Abb. 3.2.2.3 A** zu sehen. Die Zelle stratifiziert an der Grenze der IPL, in unmittelbarer Nähe zur GCL. Das Axonterminalsystem ist blasenartig verdickt, wie es charakteristisch für Stäbchenbipolarzellen ist. In der Färbung gegen Calretinin sind nur die ON- und OFF-cholinergen Banden zu sehen. Die NOS-Bande ist oft schwächer gefärbt und in diesem Schnitt nicht zu erkennen.

Die Stäbchenbipolarzellen zeigen bei Hyperpolarisation im Standardprotokoll instantane Ströme (-55 ± 16 pA) und kleine sich entwickelnde HCN-Ströme (Amplitude: -24 ± 9 pA, $n = 27$) (**B**). Bei Stäbchenbipolarzellen beginnt die Entwicklung des HCN-Stromes mit einer deutlichen Verzögerung (Kreis in **B**) und man kann den typischen sigmoidalen Verlauf der HCN-Aktivierung gut erkennen. In HEK293-Zellen und in Stäbchen ist diese Verzögerung deutlich geringer. Innerhalb dieser Verzögerung fällt der Strom bis zu einer gewissen Spitze

ab und steigt dann wieder an, bis er schließlich ein Plateau erreicht. Die Verzögerung wird in den exponentiellen Fit nicht mit einbezogen.

Der Strom in Stäbchenbipolarzellen kann mit einer einfach exponentiellen Funktion mit einer Zeitkonstante von $\tau = 42 \pm 14$ ms ($n = 27$) gefittet werden. Diese ist etwas schneller als die Zeitkonstante von HCN1 in HEK293-Zellen ($\tau = 60 \pm 11$) und etwas langsamer als in Stäbchen ($\tau = 29 \pm 6$). Die Auswärtströme beim Sprung auf $V_m = -10$ mV sind etwa 200 pA groß. Sie sind wahrscheinlich von K^+ -Ionen getragen und haben einen sich langsam entwickelnden Verlauf. Sie erinnern an verzögerte Gleichrichterkanäle aus dem Axon. Der HCN1-Strom und ein Teil des instantanen Stromes in Stäbchenbipolarzellen konnten durch 3 mM Cs^+ reversibel geblockt werden (C).

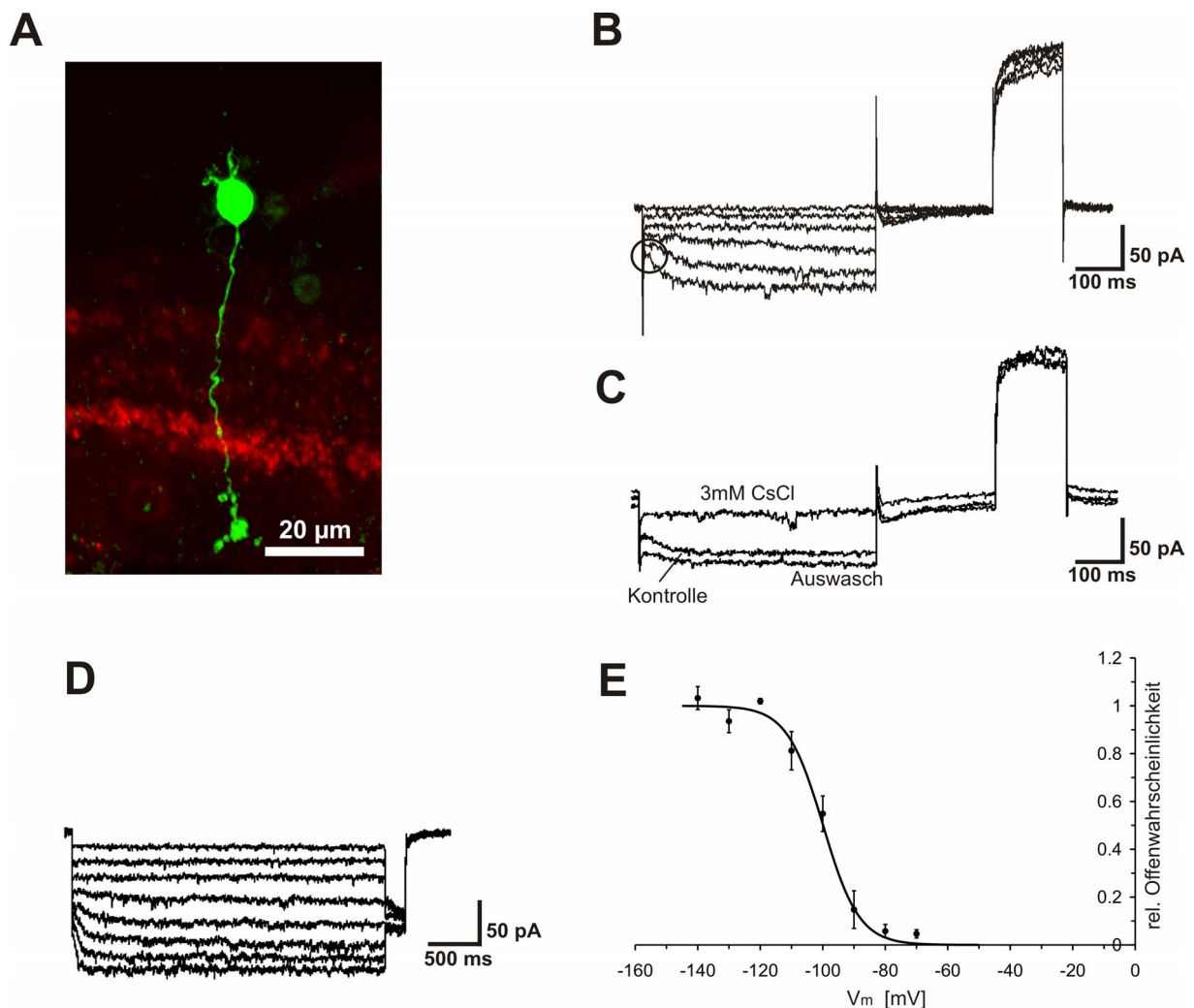


Abb. 3.2.2.3: HCN1 in Stäbchenbipolarzellen.

A, Gefüllte Stäbchenbipolarzelle und Färbung gegen Calretinin.

B, Standardprotokoll; einfach exponentielle Fits bei $V_m = -135$ mV aus 27 Zellen ergaben für HCN-Ströme eine Zeitkonstante von $\tau = 42 \pm 14$ ms, Amplitude: -24 ± 9 pA, instantaner Strom: -55 ± 16 pA; Kreis: Verzögerung der Aktivierung.

C, Instantaner Strom und HCN-Strom werden reversibel durch 3 mM Cs^+ blockiert ($V_m = -135$ mV).

D, Messung der Strom-Spannungsbeziehung.

E, Die Strom-Spannungsbeziehung in Stäbchenbipolarzellen, $V_{1/2} = -101 \pm 1,4$ mV, $s = 5,7 \pm 1,5$ mV, $n = 4$.

Der $V_{1/2}$ -Wert (**E**) von HCN1 liegt in Stäbchenbipolarzellen bei $-101 \pm 1,4$ mV ($s = 5,7$ mV; $n = 4$) und ist damit deutlich negativer als das $V_{1/2}$ von HCN1 in HEK293-Zellen ($-69,1 \pm 1,8$ mV, $s = 8,3 \pm 1,0$ mV).

3.2.2.4 HCN1 in Typ5 Bipolarzellen

Die immunhistochemischen Untersuchungen haben gezeigt, dass Typ5 Bipolarzellen HCN1 exprimieren (siehe **Abb. 3.1.2.2**). HCN1 konnte in Somata, Axonen und Axonterminalien von Typ5 Zellen nachgewiesen werden. In **Abb. 3.2.2.4 A** ist eine gefüllte Typ5 Bipolarzelle in der Doppelfärbung mit Calretinin zu sehen. Die Zelle stratifiziert oberhalb der ON-cholinergen Bande, einige Fortsätze des Axonterminalsystems reichen bis in die ON-cholinerge Bande hinein. Im Standardprotokoll sind große HCN-Ströme mit einer Amplitude von -77 ± 23 pA ($V_m = -135$ mV, $n = 13$) zu sehen. Die HCN1-Ströme lassen sich mit einer Zeitkonstante von $\tau = 48 \pm 13$ ms beschreiben. Diese ist etwas schneller als die Zeitkonstante von HCN1 in HEK293-Zellen ($\tau = 60 \pm 11$). Bei den Typ5 Zellen ist die Verzögerung, die zum HCN-typischen sigmoidalen Verlauf führt, am besten zu sehen (**B**, Kreis). Diese Zellen besitzen außerdem den größten HCN1-Strom und den größten instantanen Strom (-144 ± 40 pA, $V_m = -135$ mV) der von mir abgeleiteten retinalen Zellen.

Im Sprung auf $V_m = -60$ mV sind ausgeprägte tail-Ströme zu sehen, die auf das langsame Schließen der HCN-Kanäle zurückzuführen sind. Zum Einen ist der größte Teil der tail-Ströme durch Cs^+ blockierbar, zum Anderen sind die tail-Ströme in Typ5 Bipolarzellen im HCN1-Knockout nicht mehr zu sehen. Beide Ergebnisse sprechen dafür, dass die tail-Ströme von HCN-Kanälen stammen.

In **D** ist die Messung der Strom-Spannungsbeziehung gezeigt, in **E** ist sie graphisch dargestellt. In Typ5 Bipolarzellen liegt das $V_{1/2}$ von HCN1 bei $-98,5$ mV, mit einer Steigung von $s = 8,6$ mV ($n = 2$).

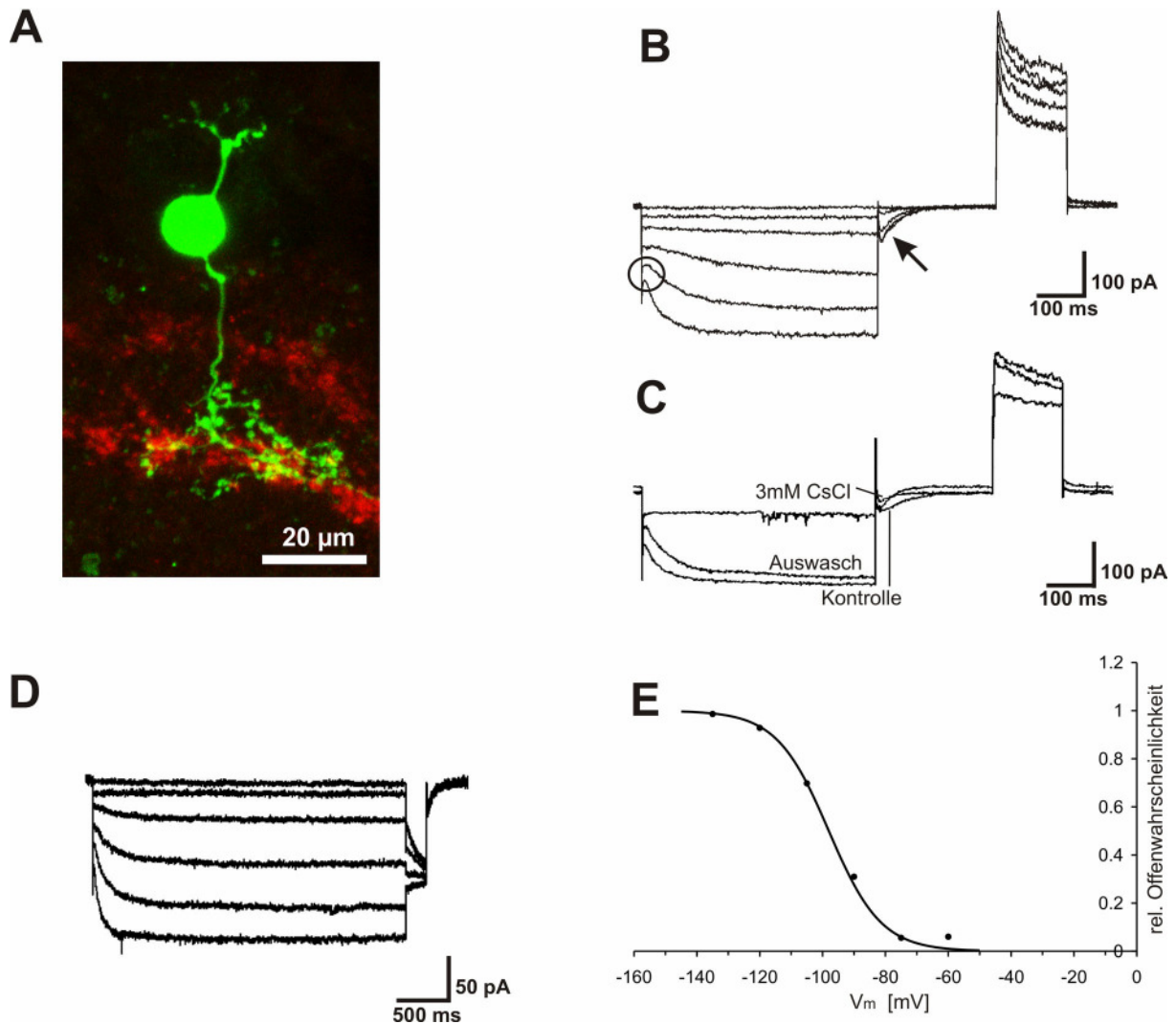


Abb. 3.2.2.4: HCN1 in Typ5 Bipolarzellen.

A, Gefüllte Typ5 Bipolarzelle und Färbung gegen Calretinin.

B, Standardprotokoll, einfach exponentielle Fits bei $V_m = -135\text{ mV}$ aus 13 Zellen ergaben eine Zeitkonstante von $\tau = 48 \pm 13\text{ ms}$, Amplitude: $-77 \pm 23\text{ pA}$, instantaner Strom: $-144 \pm 40\text{ pA}$; Kreis: Verzögerung.

C, Instantaner Strom und HCN-Strom werden reversibel durch 3 mM Cs^+ blockiert ($V_m = -135\text{ mV}$).

D, Messung der Strom-Spannungsbeziehung.

E, Die Strom-Spannungsbeziehung in Typ5 Bipolarzellen, $V_{1/2} = -98,5\text{ mV}$, $s = 8,6\text{ mV}$, $n = 2$.

3.2.2.5 Vormarkierung von Typ2 Bipolarzellen mit Antikörpern gegen CD15

Die Stäbchenbipolarzelle und die Typ5 Bipolarzelle sind die mit Abstand häufigsten Bipolarzellen in der Mäuseretina (siehe **Tab. 3.1.7**), deshalb konnten sie auch am häufigsten abgeleitet werden. Um auch andere, weniger häufige Bipolarzelltypen in ausreichendem Umfang und gezielt zu vermessen, wurde versucht Bipolarzellen vorzumarkieren. Dies gelang

mit einem Antikörper, der gegen das extrazelluläre Epitop CD15 gerichtet ist und Typ2 Bipolarzellen färbt (siehe **Abb. 3.1.4**).

Retinaschnitte, in denen Typ2 Bipolarzellen gepatcht werden sollten, wurden zuerst mit dem CD15-Antikörper inkubiert, der anschließend mit einem fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht wurde. Die Zellen wurden während der Antikörperinkubation nicht geschädigt. Die gefärbten Schnitte wurden unter Auflicht betrachtet. Leuchtende Zellen konnten somit gezielt gepatcht werden. Das Ergebnis einer so vormarkierten und abgeleiteten Typ2 Zelle ist in **Abb. 3.2.2.5 A** zu sehen. Der Schnitt mit der gefüllten Zelle wurde nach der Ableitung immunhistochemisch gegen Calretinin gefärbt. Die CD15-positive gefüllte Zelle stratifiziert oberhalb der OFF-cholinergen Bande.

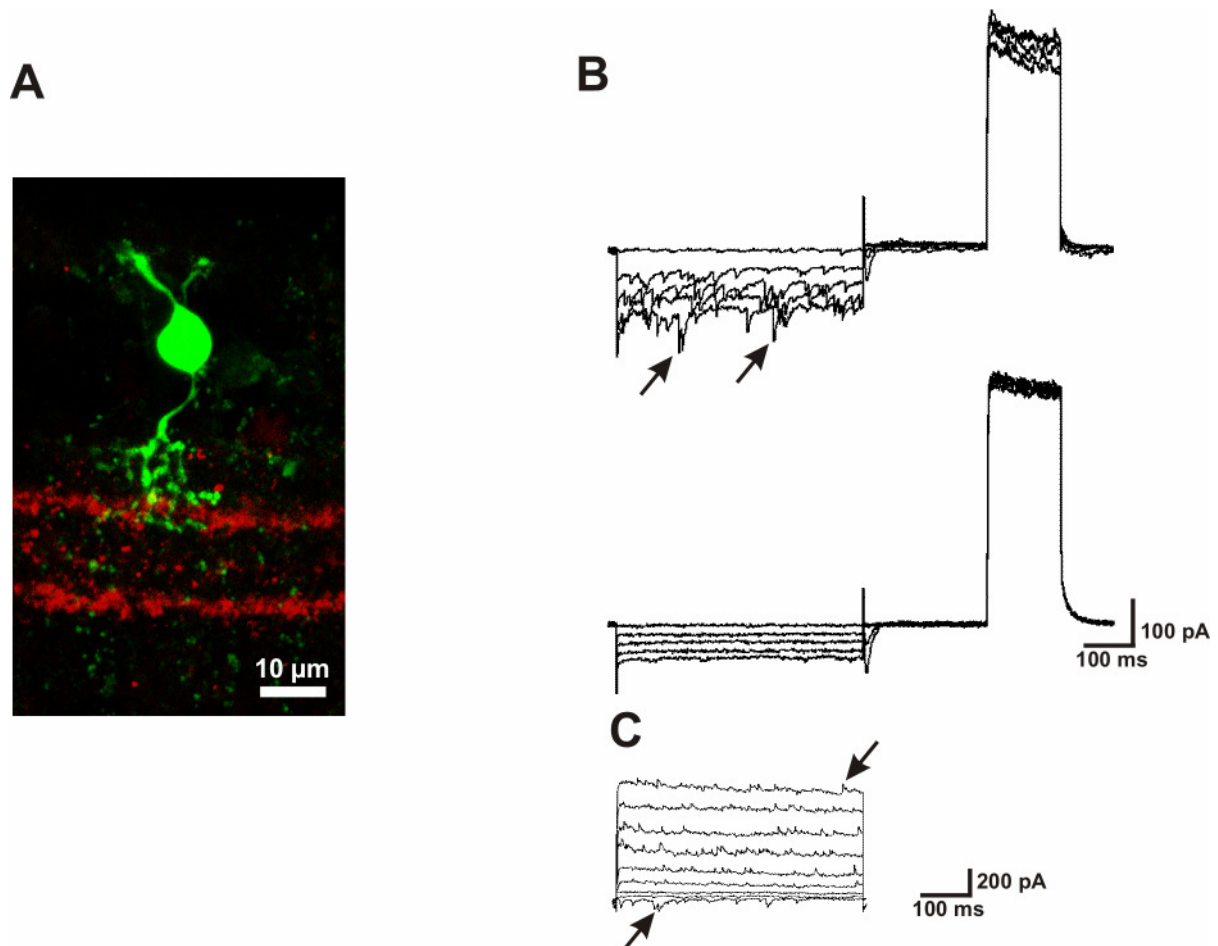


Abb. 3.2.2.5: Typ2 Bipolarzellen haben keine HCN-Ströme.

A, Gefüllte Typ2 Bipolarzelle in der Doppelfärbung gegen Calretinin.

B, Im Standardprotokoll zeigen sich IPSCs (inhibitoric postsynaptic currents), die durch 1 μ M Strychnin (unten) blockiert werden können. Die Typ2 Zelle exprimiert keinen HCN-Kanal.

C, Die Zelle wurde bei $V_m = -70$ mV gehalten und in Schritten von +10 mV depolarisiert. Die IPSCs sind bei $V_m = -50$ mV nicht messbar. Bei Spannungen negativer als $V_m = -50$ mV sind die IPSCs einwärtsgerichtet, bei Spannungen positiver $V_m = -50$ mV auswärtsgerichtet (Pfeile; $E_{Cl} = -55$ mV).

Die elektrophysiologische Analyse der Typ2 Bipolarzellen gestaltete sich schwierig, da sie ausgeprägte spontane IPSCs (inhibitoric postsynaptic currents) hatten (**B**, obere Ableitung, Pfeile). In Gegenwart von 1 μM Strychnin waren keine IPSCs mehr zu sehen (**B**, untere Ableitung, gleiche Zelle). Es handelt sich bei den IPSCs also um Glycin-induzierte Cl^- -Ströme. Nach Blockierung der IPSCs ist zu erkennen, dass die Typ2 Zellen keine HCN-Ströme zeigen. Typ2 Zellen zeigen große Auswärtsströme bei $V_m = -10 \text{ mV}$ von $\sim 300 - 400 \text{ pA}$. Bei den tail-Strömen könnte es sich um T-Typ Ca^{2+} Ströme handeln.

In **C** sind Ströme während einer Spannungsfamilie zu sehen, bei der die Zelle von -70 mV ausgehend in 10 mV Schritten depolarisiert wurde. Bei Spannungen negativer als -50 mV sind die IPSCs einwärts gerichtet, bei Spannungen positiver als -50 mV auswärts gerichtet (Pfeile), bei $V_m = -50 \text{ mV}$ sind keine Ströme messbar. Dies entspricht ziemlich genau dem errechneten Nernstpotential von Cl^- unter meinen experimentellen Bedingungen ($E_{\text{Cl}} = -55 \text{ mV}$).

3.2.2.6 Typ7 Bipolarzellen exprimieren HCN1

Mit dem Mäusestamm GUS_{8.4}GFP standen transgene Tiere zur Verfügung, die GFP unter Kontrolle des Gustducinpromotors in Typ7 Bipolarzellen exprimieren (siehe **Abb. 3.1.5**). Das GFP kann durch Anregung mit blauem Auflicht sichtbar gemacht werden. Die Zellen können so gezielt gepatcht, gefüllt und anschließend immunhistochemisch gefärbt werden.

In **Abb. 3.2.2.6** ist solch eine gefüllte GFP-positive Bipolarzelle in der Doppelfärbung mit Calretinin gezeigt. Die Typ7 Zelle stratifiziert direkt unterhalb der ON-cholinergen Bande. Die Ströme im Standardprotokoll sind in **B** dargestellt. Bei Typ7 Bipolarzellen sind während der Hyperpolarisation zwei Ströme zu messen, die sich teilweise überlagern: ein instantaner Strom, der während des Sprungs kleiner wird (besonders gut zu sehen in der zweiten und dritten Spur) und ein sich langsam entwickelnder Strom, bei dem es sich um einen HCN-Strom handeln könnte (fünfte und sechste Spur). In der vierten Spur scheinen sich die Abnahme des instantanen Stroms und die Zunahme des sich entwickelnden Stroms zu kompensieren. In Gegenwart des Ca^{2+} -Kanalblockers Co^{2+} ist der instantane abfallende Strom nicht zu sehen (Daten nicht gezeigt). Es handelt sich bei diesem Strom wahrscheinlich um einen Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanal, wie er schon in Axonterminalien von Bipolarzellen der Goldfischretina (Okada et al., 1995) und Typ6a Bipolarzellen der Ratte (Ivanova, 2003) beschrieben wurde. Der depolarisierende Sprung im Standardprotokoll auf $V_m = -10 \text{ mV}$ aktiviert spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle im Axonterminalsystem und führt zu einem Ca^{2+} -

Einstrom. Dies führt wiederum zur Aktivierung der Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanäle. Um den reinen HCN-Strom getrennt messen zu können, wurde die Zelle mit einem veränderten Protokoll abgeleitet. Die Zelle wurde einige Sekunden bei $V_m = -60$ mV gehalten, damit die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration absinken kann und dann auf $V_m = -135$ mV hyperpolarisiert (C). So wurden keine Cl^- -Ströme aktiviert und es konnte der reine HCN-Strom vermessen werden ($\tau = 63$ ms, Amplitude = -32 pA, $n = 1$). Diese Zeitkonstante ist sehr ähnlich zu der Zeitkonstante von HCN1 in HEK293-Zellen ($\tau = 60 \pm 11$).

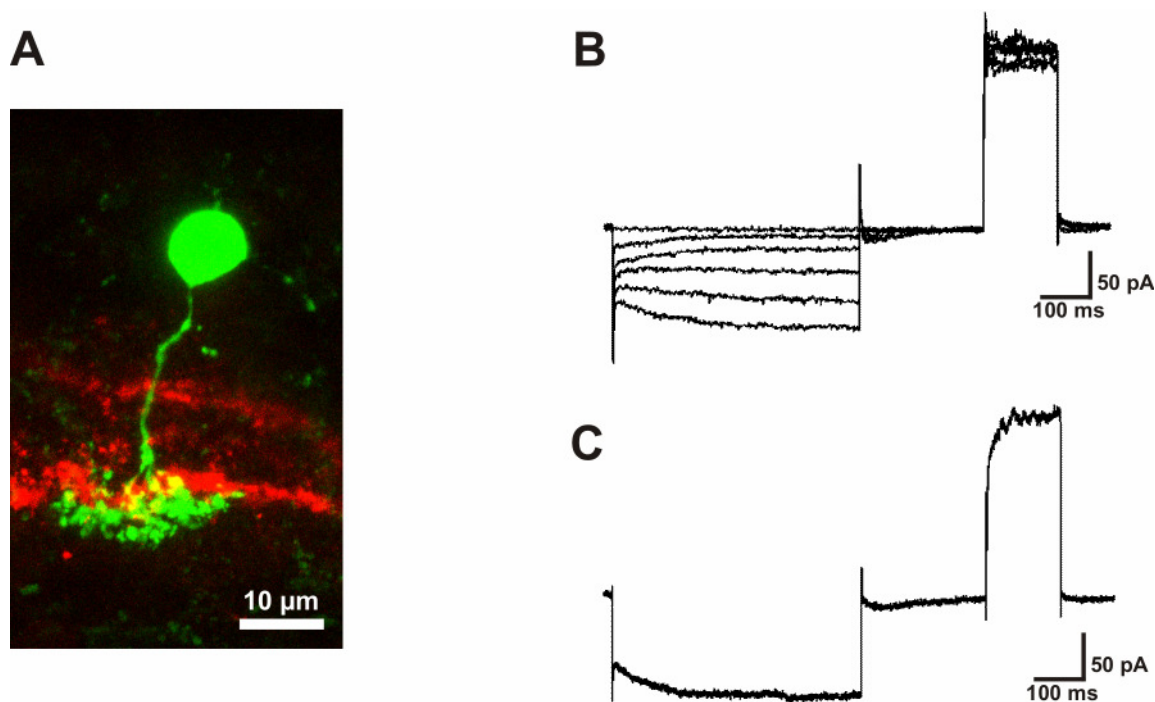


Abb. 3.2.2.6: GUS_{8.4}GFP-Mäuse: HCN1 in GFP-positiven Typ7 Bipolarzellen.

A, Gefüllte Typ7 Bipolarzelle in der Doppelfärbung gegen Calretinin.

B, Im Standardprotokoll sieht man während der Spannungsfamilie zwei Ströme, die sich überlagern. In den ersten Spuren überwiegt ein instantaner Strom, in den letzten Spuren ein sich langsam entwickelnder HCN-Strom.

C, Ein Spannungssprung von $V_m = -60$ mV auf -135 mV (500 ms) führt zu einem HCN1-Strom ($\tau = 63$ ms, Amplitude = -32 pA, $n = 1$).

3.2.2.7 Typ 9 Bipolarzellen exprimieren keinen HCN-Kanal

Mit der Linie Clomeleon-1 standen transgene Mäuse zur Verfügung, die ein GFP-Dimer in Typ9 Bipolarzellen exprimieren (siehe 3.1.6), so dass diese Zellen gezielt gepatcht werden konnten. Von diesem Bipolarzelltyp konnten sieben Zellen abgeleitet werden, die alle identische Stromantworten im Standardprotokoll zeigten (Abb. 3.2.2.7 A). Leider gelang es

nicht, diese Zellen zu füllen und zu färben. Im Standardprotokoll sieht man, dass diese Zellen keinen HCN-Strom besitzen. Der K^+ -Auswärtsstrom ist relativ groß (~ 300 pA, $V_m = -10$ mV) und hat eine ausgeprägte transiente Komponente. In einem zusätzlichen Protokoll, bei dem die Zelle von $V_m = -90$ mV aus in $+10$ mV Schritten depolarisiert wurde (**B**, links), kann man ungefähr ab $V_m = -50$ mV einen schnellen Einwärtsstrom sehen (Kreis). Aus diesem markierten Bereich sind in **B** rechts ausgewählte Stromspuren bei -40 , -20 und 0 mV in einer anderen Skalierung gezeigt. Die Kinetik des Einwärtsstromes wird immer schneller, je positiver die angelegte Spannung ist, wie es für spannungsaktivierte Na^+ -Kanäle beschrieben ist.

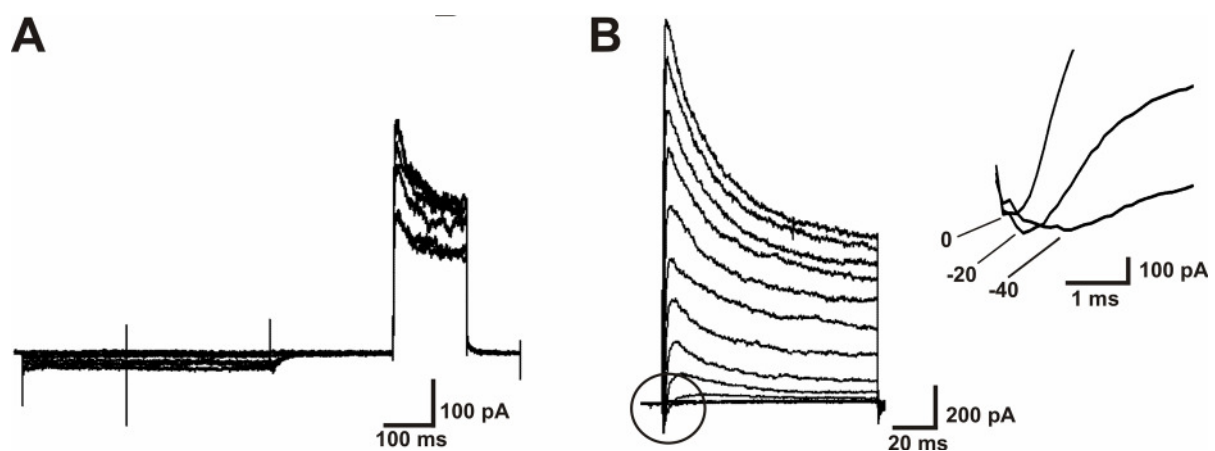


Abb. 3.2.2.7: Typ9 Bipolarzellen exprimieren keine HCN-Kanäle.

A, Standardprotokoll, kein HCN-Strom in Typ9 Zellen.

B, Zelle wird für 100 ms auf $V_m = -110$ mV gehalten und dann ausgehend von $V_m = -90$ mV in Schritten von $+10$ mV (100 ms) depolarisiert. Links: Dies führt ab ungefähr $V_m = -50$ mV zur Aktivierung von Einwärtsströmen (Kreis) und ausgeprägten Auswärtsströmen. Rechts: Aus dem markierten Bereich sind Stromspuren mit einer anderen Skalierung bei -40 , -20 und 0 mV zu sehen. Die Kinetik des Einwärtsstromes wird bei positiveren Spannungen immer schneller. Es könnte sich dabei um einen Na^+ -Strom handeln.

3.2.3 Elektrophysiologische Untersuchungen im HCN1-Knockout

In immunhistochemischen und elektrophysiologischen Untersuchungen der vorhergehenden Kapitel konnte die Expression von HCN1 in mehreren retinalen Zelltypen nachgewiesen werden. In Stäbchen, Stäbchenbipolarzellen und Typ5 Bipolarzellen wurde der HCN1-Kanal detailliert elektrophysiologisch untersucht. Damit wurde nun die Basis geschaffen, um elektrophysiologisch Wildtyptiere mit HCN1-Knockouttieren zu vergleichen.

Um den HCN1-Kanal funktionell auszuschalten, wurden die Teile des Gens, die für die Porenregion und die transmembranale Domäne S6 kodieren, deletiert. Dieser „Knockout“ wurde in Mäusen des Stammes SV129 durchgeführt (Nolan et al., 2003). Die Zuchttiere

wurden freundlicherweise von Prof. E. Kandel, New York, zur Verfügung gestellt. Die bisher präsentierten Ergebnisse wurden in Mäusen des Stammes C57Bl/6 gewonnen, die als Standard in physiologischen Studien verwendet werden. Sie unterscheiden sich in ihrem genetischen Hintergrund von den SV129 Tieren. Es wäre wünschenswert, durch Rückkreuzungen der Knockouttiere mit C57Bl/6 Tieren einen HCN1-Knockout in einem reinen C57Bl/6 Hintergrund zu erhalten. Um den SV129 Hintergrund vollständig gegen den C57Bl/6 Hintergrund auszutauschen, muss man die Knockouttiere über 10 - 20 Generationen mit C57Bl/6 Tieren rückkreuzen. Das Verfahren ist also sehr zeitaufwendig. Eine schnellere und allgemein anerkannte Alternative dazu besteht darin, SV129 Knockouttiere mit C57Bl/6 Wildtyptieren zu kreuzen und die Auswirkungen des Knockouts in diesem gemischten Hintergrund zu untersuchen. Das Zuchtschema ist in **Kap. 2.1.1** beschrieben. Die Nachkommen haben den gemischten genetischen Hintergrund „C57SV“.

3.2.3.1 Vergleich der Mauslinien C57Bl/6, SV129 und C57SV

In diesem Kapitel werden die Eigenschaften der HCN1-Ströme in Stäbchen, Stäbchenbipolarzellen und Typ5 Bipolarzellen in Retinae von C57Bl/6 Tieren, SV129 Tieren und Tieren mit dem gemischtem genetischen Hintergrund C57SV verglichen. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.2.3.1** und in **Tab. 3.2.3.1** zusammengefasst.

Ich möchte hier nur auf einige Tendenzen eingehen.

- Die HCN1-Ströme und die instantanen Ströme sind in der Regel am größten in Zellen aus C57Bl/6 Tieren.
- Die Zeitkonstanten der HCN1-Aktivierung sind am kürzesten in Zellen aus C57Bl/6 Tieren.
- Die Verzögerung (Kreis in **Abb. 3.2.3.1**) bis zur Aktivierung des HCN1 ist am geringsten in Zellen aus C57Bl/6 Tieren, am längsten in Zellen aus SV129 Tieren, und intermediär in Zellen aus C57SV Tieren.

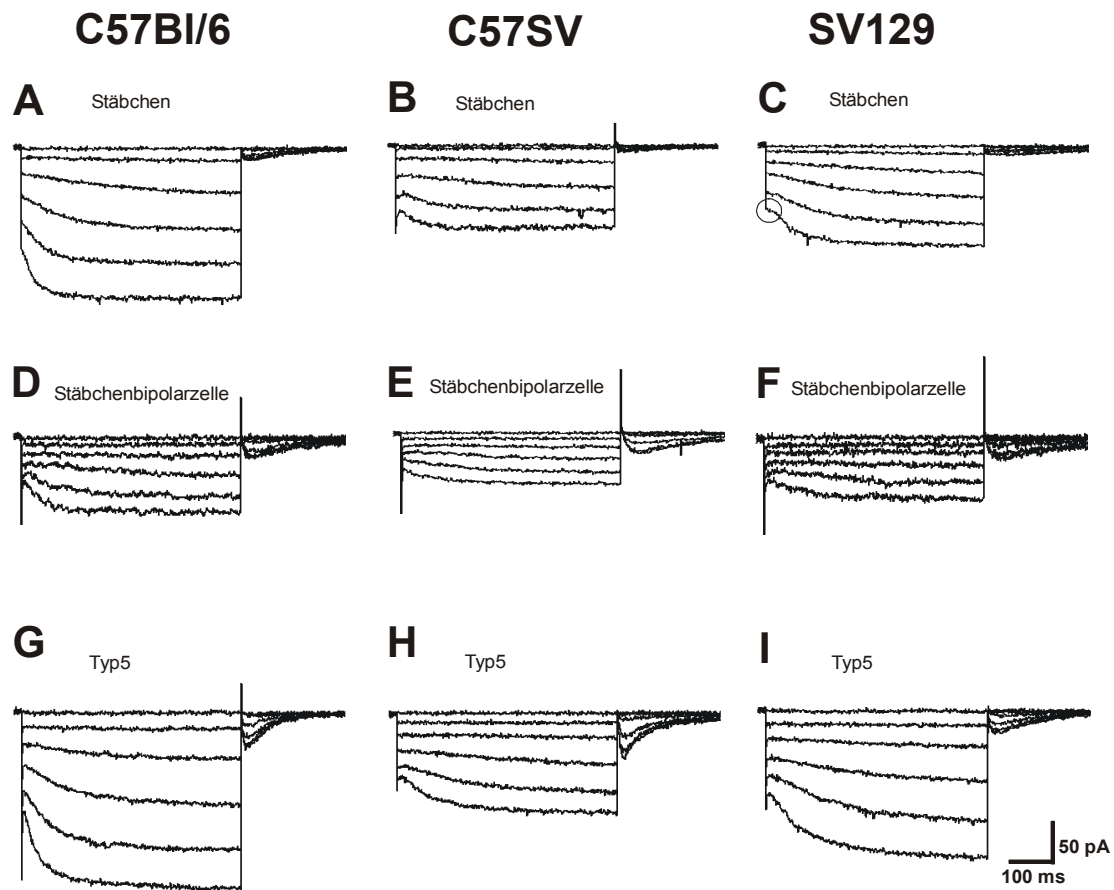


Abb. 3.2.3.1: Elektrophysiologischer Vergleich von Stäbchen, Stäbchenbipolarzellen und Typ5 Bipolarzellen in C57Bl/6, SV129 und C57SV Mäusen.

Stäbchen, Stäbchenbipolarzellen und Typ5 Bipolarzellen wurden mit dem Standard-Protokoll untersucht (nur teilweise gezeigt) und die resultierenden Ströme miteinander verglichen.

A, D, G: Zellen aus C57Bl/6 Tieren,

B, E, H: Zellen aus C57SV Tieren,

C, F, I: Zellen aus SV129 Tieren.

Für Details siehe **Tab. 3.2.3.1**.

Stäbchen

Tierstamm	Zellzahl	HCN-Strom [pA]	Zeitkonstante [ms]	Verzögerung [ms]	Instantaner Strom [pA]
C57Bl/6	12	-39 ± 11	29 ± 6	12 ± 4	-92 ± 22
C57SV	7	-27 ± 9	31 ± 8	14 ± 4	-80 ± 19
SV129	8	-33 ± 15	45 ± 11	20 ± 10	-71 ± 33
T-Test					
C57 / C57SV		P < 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
C57 / SV129		P > 0.05	P < 0.01	P < 0.05	P > 0.05
C57SV / SV129		P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
C57SV k.o.	6				-75 ± 32
C57SV heterozygot	3	-15 ± 3	37 ± 5	18 ± 7	-67 ± 10

Stäbchenbipolarzelle

Tierstamm	Zellzahl	HCN-Strom [pA]	Zeitkonstante [ms]	Verzögerung [ms]	Instantaner Strom [pA]
C57Bl/6	27	-24 ± 9	42 ± 14	15 ± 6	-55 ± 16
C57SV	6	-14 ± 3	63 ± 24	22 ± 8	-50 ± 7
SV129	6	-17 ± 6	82 ± 8	37 ± 12	-56 ± 13
T-Test					
C57 / C57SV		P < 0.05	P < 0.01	P < 0.01	P > 0.05
C57 / SV129		P > 0.05	P < 0.01	P < 0.01	P > 0.05
C57SV / SV129		P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
C57SV k.o.	4				-78 ± 25
C57SV heterozygot	12	-	-	-	-49 ± 17

Typ5 Bipolarzelle

Tierstamm	Zellzahl	HCN-Strom [pA]	Zeitkonstante [ms]	Verzögerung [ms]	Instantaner Strom [pA]
C57Bl/6	13	-77 ± 23	48 ± 13	12 ± 5	-144 ± 40
C57SV	3	-39 ± 7	112 ± 33	24 ± 7	-78 ± 23
SV129	1	-72	93	11	-103
T-Test					
C57 / C57SV		P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01
C57SV k.o.	3				-98 ± 16
C57SV heterozygot	1	-		-	-64

Tab. 3.2.3.1: Vergleich von Stäbchen, Stäbchenbipolarzellen und Typ5 Bipolarzellen in C57Bl/6, SV129 und C57SV Mäusen.

Zusammenstellung der Daten aus **Abb. 3.2.3.1**. Alle Angaben bei $V_m = -135$ mV.

k.o. = Knockouttiere; heterozygot = heterozygote Tiere.

3.2.3.2 Charakterisierung des HCN1-Knockout

Die HCN1-Knockouttiere zeigen ein Defizit im motorischen Lernen (Nolan et al., 2003), sind aber ansonsten nicht weiter verhaltensauffällig. Visuelle Leistungen wurden bisher nicht untersucht. Die Retina sieht normal aus. Immunhistochemische Färbungen der Retina mit Antikörpern, die verschiedene Zelltypen markieren, zeigten keine wesentlichen Unterschiede zu Kontrolltieren (Daten nicht gezeigt).

Die Antikörperfärbungen gegen HCN1 in Knockouttieren und Kontrolltieren sind in **Abb. 3.2.3.2.1** gezeigt. Kontrolltiere (HCN1 +/+) und Knockouttiere (HCN1 -/-) waren F2-Tiere aus der gleichen Zucht mit dem genetischen Hintergrund C57SV.

In Kontrolltieren ist eine kräftige Expression von HCN1 in Photorezeptoren, einigen Somata in der INL und in Banden in der IPL zu sehen (**A**). Die HCN1-Knockoutretina (**C**) zeigt keine spezifische Färbung. Für diese Aufnahme wurde das Mikroskop empfindlicher eingestellt, als für die **Abb. A**, um auch eine schwache HCN1-Expression detektieren zu können. Der Hintergrund ist deshalb höher, HCN1 kann jedoch nicht detektiert werden.

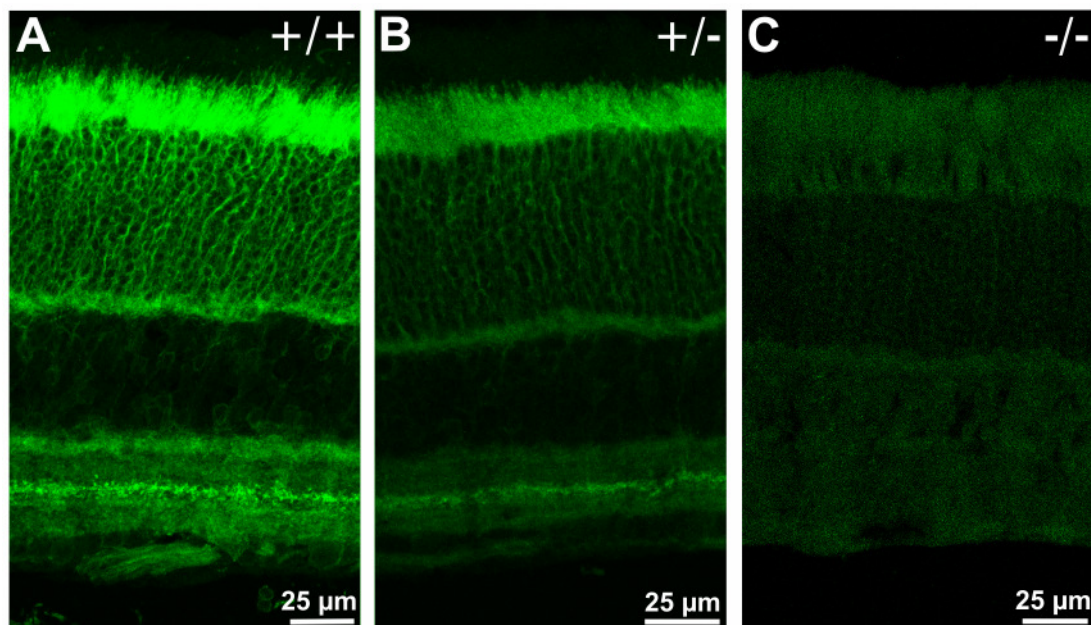


Abb. 3.2.3.2.1: Färbung gegen HCN1 in Kontrolltieren, heterozygoten Tieren und Knockouttieren

A, HCN1-Färbung in Kontrolltieren zeigt eine breite Expression in der Retina.

B, Färbung in heterozygoten Tieren unter identischen Färbebedingung und Einstellungen des Konfokalen Laserscanning Mikroskops. Es werden die gleichen Strukturen gefärbt wie im Kontrolltier, allerdings deutlich schwächer.

C, Färbung gegen HCN1 im Knockout. Trotz der höher eingestellten Empfindlichkeit des Mikroskops ist keine spezifische HCN1-Färbung zu sehen.

Außerdem wurden Schnitte aus heterozygoten Tieren desselben Wurfes gefärbt (**B**). Kontrolltiere und heterozygote Tiere wurden am selben Tag präpariert, geschnitten und mit derselben Antikörperlösung inkubiert. Die fertigen Färbungen wurden dann nacheinander unter identischen Einstellungen des Konfokalen Laserscanning Mikroskops ausgewertet. Im heterozygoten Tier werden die gleichen Strukturen gefärbt wie im Kontrolltier, allerdings deutlich schwächer.

In **Abb. 3.2.3.2.2** sind die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen in Knockouttieren und Kontrolltieren gezeigt. Stäbchen, Stäbchenbipolarzellen und Typ5 Bipolarzellen wurden mit dem Standardprotokoll untersucht.

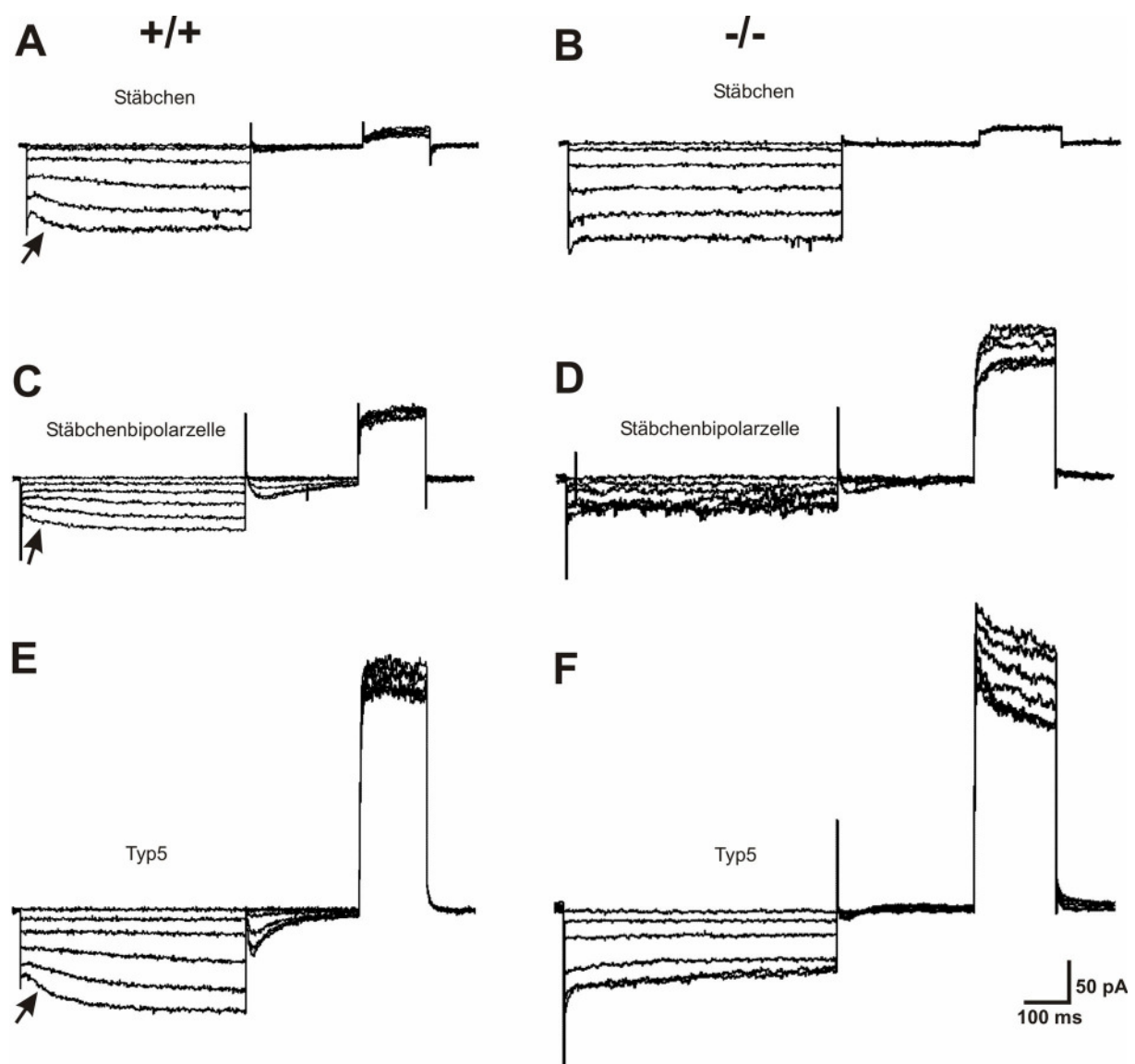


Abb. 3.2.3.2.2: Elektrophysiologischer Vergleich von Stäbchen, Typ5 Bipolarzellen und Stäbchenbipolarzellen in Kontrolltieren und Knockouttieren.

A, C, E: Im Standardprotokoll ist in Zellen von Kontrolltieren deutlich ein HCN1-Strom zu erkennen (Pfeil).

B, D, F: In Zellen von HCN1-Knockouttieren kann kein HCN-Strom gemessen werden. Die Amplitude der instantanen Ströme ist weitgehend unverändert.

In den Kontrollen sind in allen Zelltypen bei Hyperpolarisation die bereits beschriebenen zwei Stromkomponenten zu erkennen: instantaner Strom und der sich langsam entwickelnde HCN1-Strom (Pfeil). In den Knockouttieren sind in keinem der drei Zelltypen HCN1-Ströme mehr nachzuweisen. Die Amplitude der instantanen Ströme bleibt weitgehend unverändert. Auch die Auswärtströme während der Depolarisation sind sehr ähnlich zu den Kontrollen. In den Knockouttieren bleiben die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen, vom Verlust des HCN1-Stroms abgesehen, also im Wesentlichen unverändert.

Die HCN1-Ströme in Stäbchen aus heterozygoten Tieren zeigen eine ähnliche Aktivierungskinetik und eine ähnliche Verzögerung bei der Aktivierung wie die HCN1-Ströme in Stäbchen von Kontrolltieren. Die Amplitude des HCN1-Stromes hingegen ist halbiert (siehe **Tab. 3.2.3.1**). Der HCN1-Strom in Stäbchenbipolarzellen und Typ5 Bipolarzellen von heterozygoten Tieren ist zu klein, um die Aktivierungskinetik zu vermessen. Gelegentlich wurden Ströme mit einem HCN-ähnlichen Zeitverlauf und einer Amplitude von -2 bis -4 pA beobachtet. Der instantane Strom zeigte sich weitgehend unverändert (Stäbchenbipolarzelle: -49 ± 17 pA, $n = 12$; Typ5 Bipolarzelle: -64 pA, $n = 1$; zur Übersicht: **Tab. 3.2.3.1**).

3.2.3.4 Retinale Lichtantworten

Durch die bisher beschriebenen Untersuchungen wurden HCN1-positive Zelltypen in der Retina identifiziert und die Eigenschaften der HCN1-Ströme in diesen Zellen charakterisiert. Die Analyse der HCN1-Knockoutretinae zeigt den vollständigen Verlust von HCN1. Abgesehen von diesem Verlust sind die Eigenschaften der untersuchten Zellen im Wesentlichen unverändert. Insbesondere wird der Verlust von HCN1 nicht durch Expression anderer HCN-Isoformen kompensiert. Durch diese Ergebnisse war die Basis geschaffen, um in Wildtyp- und in Knockoutretinae Lichtantworten in Photorezeptoren und Bipolarzellen abzuleiten und zu vergleichen. Leider gelang es nicht, Lichtantworten auf Einzelzellniveau in den Retinaschnitten routinemäßig abzuleiten.

Für diese Versuche wurden Retinae unter Infrarotbedingungen präpariert und die Ableitungen bei 35°C durchgeführt. Eine große Schwierigkeit bei Patch-clamp Ableitungen in Retinaschnitten besteht darin, dass nur Zellen abgeleitet werden können, die sich an der Oberfläche des Schnittes befinden. Gerade diese Zellen werden beim Schneidevorgang

natürlich am leichtesten gestresst oder verletzt. Bei den Photorezeptoren besteht die Gefahr, dass das empfindliche Außensegment am dünnen Cilium abgerissen wird. Die komplizierten Synapsen von Photorezeptoren auf Bipolarzellen in der OPL können beim Schneiden leicht zerstört werden. Die Bipolarzellen sehen dann zwar noch intakt aus, erhalten aber keinen synaptischen Eingang mehr.

Ich versuchte durch mehrere methodische Ansätze, die Qualität der Retinaschnitte und der Ableitung zu verbessern. 1.) Ich versuchte durch Variation der Präparationsbedingungen Stress und Schäden zu minimieren. Ich benutzte bei der Präparation eiskalte Lösungen, um einer eventuellen Sauerstoffunterversorgung entgegenzuwirken. Während des Schneidevorgangs könnten gestresste Zellen Glutamat freisetzen, das über die Aktivierung von Glutamatrezeptoren zu einem Einstrom von Ca^{2+} und damit evtl. zur Schädigung von Zellen führen kann. Ich präparierte deshalb Retinae in Co^{2+} -haltiger und Ca^{2+} -armer Lösung, um solche Schäden zu minimieren. 2.) Ich probierte verschiedene Schneidemethoden aus. Ich verwendete gerade Klingen, um mit leichtem Druck von oben zu schneiden. Ich verwendete halbrunde Skalpellklingen, um eine geführte, rollende Schneidebewegung auszuführen. In einigen Experimenten wurde die Retina in Agar eingebettet und mit dem Vibratom geschnitten. 3.) Ich versuchte vor der Ableitung mit großen Saugpipetten Somata an der Schnittoberfläche zu entfernen, um ungeschädigte tiefer liegende Zellen für die Patch-Pipette zugänglich zu machen. Trotz all dieser Bemühungen gelang es nicht, routinemäßig Lichtantworten in Photorezeptoren und Bipolarzellen abzuleiten. Aus Zeitgründen verfolgte ich diesen Ansatz nicht weiter, sondern wählte eine andere Methode, um Lichtantworten zu erhalten. Ich führte Ableitungen des Elektro-Retinogramms (ERG) in vitro an Wildtypretinae und an Knockoutretinae durch. Diese Experimente sind im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

3.3 Elektretinogramm

In diesem Kapitel werden Messungen des Elektro-Retinogramms (ERG) in vitro an Retinae aus Kontrolltieren und HCN1-Knockoutmäusen präsentiert. Als Kontrolltiere wurden Mäuse mit dem gemischten genetischen Hintergrund C57SV aus der Knockout-Zucht (siehe **Kap. 2.1.1**) verwendet.

3.3.1 Grundlagen des ERG

Damit die folgenden Untersuchungen besser verstanden werden können, möchte ich hier kurz auf die Grundlagen des ERGs eingehen (**Abb. 3.3.1.A**).

Photorezeptoren sind im Dunkeln depolarisiert. Dabei fließen im Außensegment Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen durch die geöffneten CNG-Kanal (cyclic nucleotide-gated) nach innen, im Innensegment fließen K^+ -Ionen durch K^+ -Kanäle nach außen (zur Übersicht: Müller und Kaupp, 1998). Einstrom und Ausstrom sind gleich groß und bilden einen zirkulierenden stabilen Strom, den „Dunkelstrom“. Da dieser Strom über den Widerstand des Extrazellulärmediums fließt, bildet sich ein Potential entlang der Photorezeptorachse aus. Durch die große Zahl von Photorezeptoren kann dieses Potential im Bereich von einigen 100 μV liegen. Bei Belichtung schließen CNG-Kanäle, der Dunkelstrom wird kleiner und das Potential ändert sich. Mit zwei Elektroden, die vor und hinter der Retina platziert sind, kann man diese Potentialänderung als so genannte A-Welle des ERGs messen. Kurz darauf kommt es zur Depolarisation der ON-Bipolarzellen, das heißt zum Einstrom von Na^+ -Ionen in die Dendriten und zum Ausstrom von K^+ -Ionen aus den Axonen. Es bildet sich ein zweites Potential aus, das als B-Welle des ERGs gemessen werden kann.

In vivo misst man ein corneales ERG, indem man dunkeladaptierten, betäubten Tieren eine ringförmige Messelektrode auf der Cornea und eine Referenzelektrode zum Beispiel hinter dem Ohr oder unter der Kopfhaut befestigt. Ein solches ERG ist in **Abb. 3.3.1.B** gezeigt.

Ich habe ERG-Messungen in vitro an Retinastücken von dunkeladaptierten Tieren durchgeführt. Die Retinastücke wurden mit den Photorezeptoren nach oben in der Messkammer auf eine ringförmige Referenzelektrode gelegt. Als Messelektrode wurde eine Glaspipette verwendet, die an einem Mikromanipulator montiert war. Dadurch befindet sich die Retina auch in dieser Messanordnung zwischen zwei Elektroden. Alle Messungen wurden

unter Infrarot-Bedingungen und bei 35°C durchgeführt. Das ERG weist eine A- und eine B-Welle auf (Abb. C).

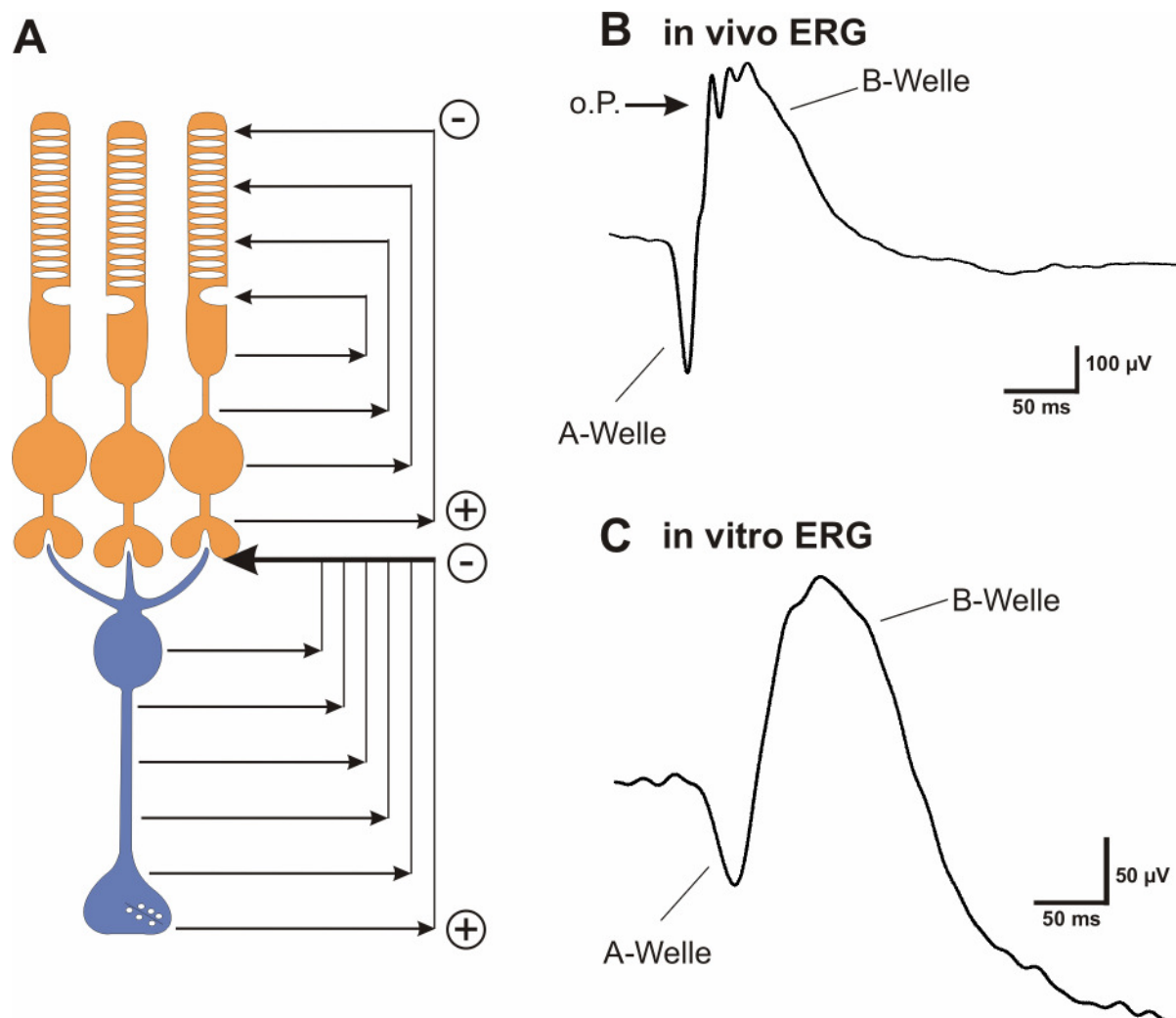


Abb. 3.3.1: In vivo und in vitro ERG.

A, Schematische Darstellung der Photorezeptor- und Bipolarzell-Dipole. Mess- und Referenzelektrode befinden sich oberhalb, bzw. unterhalb der Retina.

B, ERG-Ableitung in vivo: Die A-Welle entspricht einer Summenpotentialänderung der Photorezeptoren, die B-Welle einer Summenpotentialänderung der ON-Bipolarzellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von G. Knop, Jülich).

C, ERG-Ableitung in vitro.

o.P.: oszillatorische Potentiale.

Das in vitro ERG in **C** und das in vivo ERG in **B** wurden unter nicht identischen Bedingungen aufgenommen. Man darf deshalb nur die grundlegende Form vergleichen. Die ERGs zeigen ähnliche A- und B-Wellen. Beide Ableitungen wurden nachträglich mit 50 Hz gefiltert. Beim in vivo ERG sind oszillatorische Potentiale (Pfeil) zu beobachten, die man in vitro nicht sieht. Die oszillatorischen Potentiale sind wahrscheinlich auf Netzwerkeigenschaften der Retina, zum Beispiel laterale Kopplung durch Amakrinzellen mit großen Dendritenbäumen, zurückzuführen, die nur beim in vivo ERG gemessen werden können. Beim in vivo ERG

stimuliert man die gesamte Retina und leitet auch über die gesamte Retina ab. Beim in vitro ERG wird nur ein kleiner Bereich der Retina stimuliert (ca. 300 μm Durchmesser) und man misst mit der Pipette nur die Summenpotentiale eines begrenzten Bereiches der Retina von ca. 200 μm Durchmesser (Green et al., 1999).

Das in vitro ERG hat gegenüber dem in vivo ERG einige Vorteile. ERG-Messungen in vivo sind Tierversuche, die eine spezielle Ausstattung, wie zum Beispiel Ganzfeldkugel, Corneaelektrode und so weiter verlangen. In vitro lässt sich das ERG nach geringfügigen Modifikationen an fast jedem elektrophysiologischen Messstand durchführen. Eine Untersuchung mit Pharmaka beim in vivo ERG erfordert entweder eine systemische Verabreichung oder das Pharmakon muss ins Auge injiziert werden. Beim in vitro ERG können Pharmaka einfach mit der extrazellulären Lösung ein- und ausgewaschen werden.

3.3.2 Optimierung der B-Wellenamplitude

In **Abb. 3.3.2** ist die Ableitung eines in vitro ERGs in einer anderen zeitlichen Auflösung als in **Abb. 3.3.1** dargestellt. Der Zeitpunkt des Lichtblitzes ist durch eine Erhebung in der Spur darunter angegeben. Man erkennt die A- und B-Welle. Die B-Welle geht in eine andere Komponente, die so genannte „langsame PIII-Welle“ über. Diese ist wahrscheinlich auf Potentialänderungen in Müllerzellen (Steinberg et al., 1991) zurückzuführen. Die langsame PIII-Komponente wird in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

In **B** befindet sich die Referenzelektrode vor und die Messelektrode hinter der Retina. Alle Komponenten des ERGs können abgeleitet werden. In **C** wird die Messelektrode bis in die ONL versenkt. Nun ist zu erwarten, dass man Potentialänderungen der Photorezeptoren nicht mehr messen kann und damit keine A-Welle mehr ableiten kann. Wie die Ableitung zeigt trifft dies zu. Außerdem wird die Amplitude der B-Welle größer, da sich die Messelektrode nun näher an den Bipolarzellen befindet und sich deren Potentialänderungen besser ableiten lassen. Man beachte, dass die ERGs in **C**, **D** und **E** eine andere Skalierung haben als in **B**. Versenkt man die Messelektrode noch tiefer bis zur OPL und nähert sich den Bipolarzellen weiter an, so wird die Amplitude der B-Welle maximal (**D**) und das Signal-Rausch Verhältnis wird deutlich verbessert. Wird die Elektrode noch tiefer, bis unterhalb der OPL versenkt, so können auch keine Potentialänderungen der Bipolarzellen mehr abgeleitet werden und die B-Welle verschwindet (**E**).

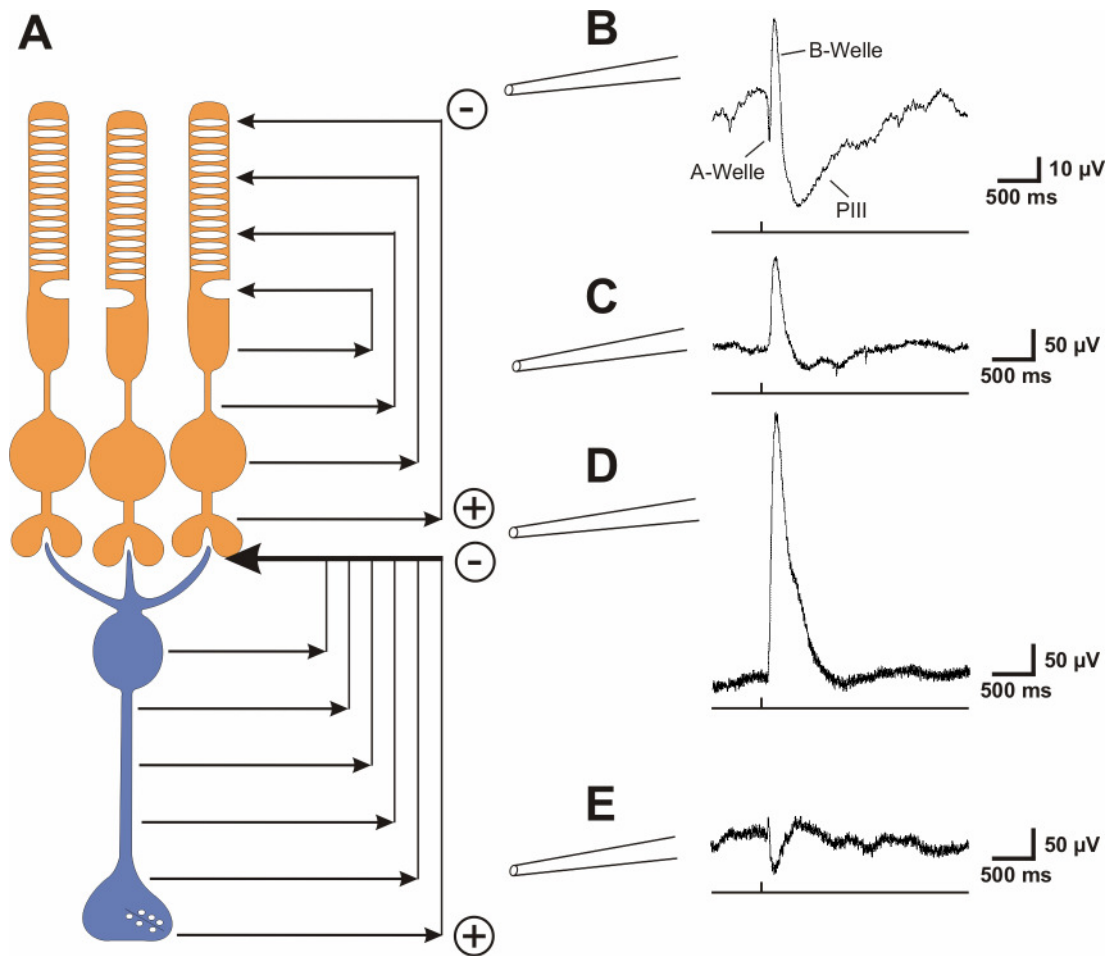


Abb. 3.3.2: Positionseffekt der Pipette beim in vitro ERG (Einzelblitz mit 30 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz).

A, Schematische Darstellung des Photorezeptor- und Bipolarzell-Dipols.

B, A- und B-Welle, sowie die langsame PIII-Komponente.

C, Durch Absenken der Pipette in die Retina verschwindet die A-Welle, die Amplitude der B-Welle wird größer, (man beachte die andere Skalierung).

D, Wird die Pipette noch weiter, bis zur OPL abgesenkt, wird die Amplitude der B-Welle maximal.

E, Versenkt man die Pipette noch tiefer, verschwindet auch die B-Welle. Der Zeitpunkt der Lichtreize ist durch eine Erhebung in der Spur unter den ERGs angegeben.

Vor jeder Messreihe an einem Retinastück wurde die Pipettenposition gesucht, bei der die Amplitude der B-Welle maximal war. Dazu wurde die Pipette zuerst auf die Enden der Photorezeptoraußensegmente eingestellt. Ausgehend davon konnte die Pipette um 0 bis -120 μm in die Retina abgesenkt werden. Bei einer Tiefe von -60 bis -80 μm wurde die Amplitude der B-Welle maximal. Bei den Untersuchungen wurde aber nicht nur die Amplitude, sondern auch die Länge der B-Welle ausgewertet. Dabei wurde die Zeit vermessen, bis die B-Welle zur Hälfte ihrer maximalen Amplitude (T_{50}) zurückkehrte. Die Amplitude und der T_{50} -Wert verändern sich abhängig von der Position der Pipette. Bei Pipettenpositionen zwischen -60 und -80 μm waren sie jedoch konstant (**Tab. 3.3.2**). Auf dieses Niveau wurde die Pipette in allen folgenden Experimenten eingestellt. Dies entspricht in etwa einer Pipettenposition auf Höhe der OPL.

Die B-Welle kann also relativ einfach untersucht werden. Bei der A-Welle ist das nicht so, da sie von der sich entwickelnden B-Welle überlagert wird. Deshalb und aufgrund der größeren Amplitude ist die B-Welle der am einfachsten zu messende Parameter der Lichtantwort. Aus der B-Welle lassen sich Schlussfolgerungen auf Lichtantworten in ON-Bipolarzellen ziehen. Da ON-Bipolarzellen postsynaptisch zu den Photorezeptoren sind, kann man indirekt auch auf Lichtantworten in Photorezeptoren schließen.

Position der Pipette	0 μm	-20 μm	-40 μm	-60 μm	-80 μm	-100 μm	-120 μm
Amplitude der B-Welle [μV]	30	150	290	420	430	340	5
T_{50} [ms]	-	150	190	220	210	420	-

Tab. 3.3.2: Amplitude und T_{50} -Wert der B-Welle bei verschiedenen Pipettenpositionen.

Die Position der Pipette wurde relativ zu den Spitzen der Photorezeptoraußensegmente in μm angegeben. Die Amplitude der B-Welle war bei einer Tiefe zwischen -60 und -80 μm maximal. Dies entspricht in etwa einer Pipettenposition auf Höhe der OPL. Auf diesem Niveau war der T_{50} -Wert relativ konstant. Die gezeigten Daten sind Einzelwerte aus einer Retina bei einer Helligkeit von 30 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz. Ähnliche Messungen wurden auch bei anderen Helligkeiten und in anderen Retinae durchgeführt. Unabhängig von der Helligkeit war die Pipettenposition immer zwischen -60 und -80 μm optimal und der T_{50} -Wert konstant.

3.3.3 Eigenschaften des in vitro ERGs

In diesem Kapitel werden Kontrollmessungen vorgestellt, die zeigen, dass mit der in vitro Präparation physiologisch relevante Parameter untersucht werden können.

Die B-Welle im ERG lässt sich mit L-APB (2-Amino-4-Phosphonobuttersäure), einem Agonisten an den Glutamatrezeptoren der ON-Bipolarzellen, blocken (Slaughter und Miller, 1981; Knapp und Schiller, 1984) und dadurch identifizieren. In **Abb. 3.3.3.1** ist dieser Block durch 100 μM L-APB gezeigt. Bei diversen Messungen wurde die Pipette abwechselnd oberhalb der Photorezeptoren positioniert, bzw. in die Retina versenkt.

In **A – C** ist eine Ableitung zu sehen, bei der die Pipette über die Photorezeptoraußensegmente eingestellt wurde. Man erkennt A-, B- und langsame PIII-Welle (**A**). Nach dem Einwaschen von 100 μM APB für 7 – 8 Minuten ist keine B-Welle mehr zu erkennen (**B**). Die A-Welle beginnt zum selben Zeitpunkt wie in **A**. Die A- und die langsame PIII-Welle gehen ineinander über. Nach dem Auswaschen kehrt die B-Welle zurück, erreicht allerdings nicht mehr die ursprüngliche Amplitude.

D – F zeigt eine Ableitung im selben Retinastück, bei der die Pipette um -60 μm in die Retina versenkt wurde. Die Amplitude der B-Welle in **D** ist deutlich größer als in **A – C**. Nach

Applikation von 100 μM L-APB wurde die B-Welle zwar deutlich kleiner, konnte aber nicht vollständig geblockt werden (auch nicht wenn 200 μM L-APB appliziert wurden oder die Applikationszeit auf 30 min verlängert wurde). Nach dem Auswaschen wurde die ursprüngliche Amplitude der B-Welle fast vollständig wieder erreicht.

Für dieses Experiment wurde während der APB-Applikation mehrfach die Position der Pipette gewechselt. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass die Pipettenposition im ERG in **A** und **C** nicht identisch ist und die B-Welle in **C** deshalb kleiner erscheint.

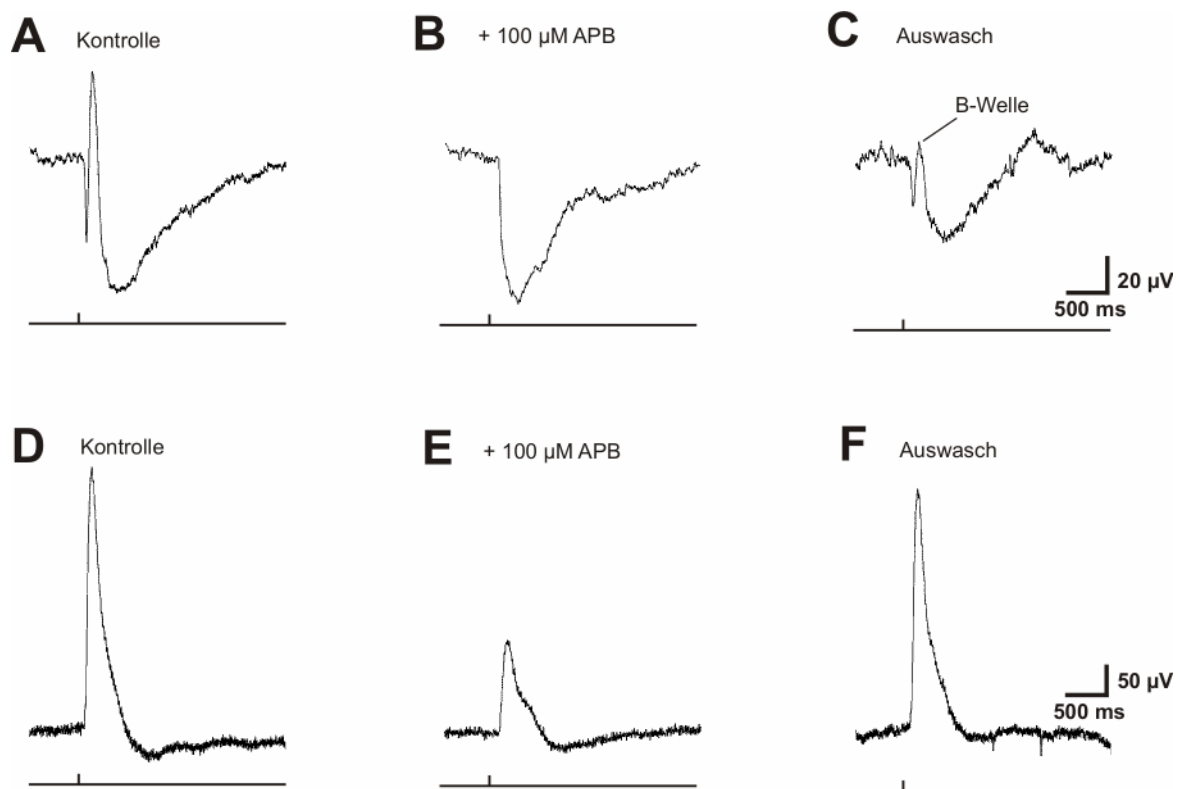


Abb. 3.3.3.1: Block der B-Welle mit L-APB (Einzelblitze mit 30 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz).

Ableitungen aus einem Retinastück. Die Pipette wurde abwechselnd auf Höhe der Photorezeptoraußensegmente (**A – C**) positioniert und $-60\ \mu\text{m}$ in die Retina versenkt (**D – F**).

A, A- und B-Welle, sowie die langsame PIII-Komponente sind zu sehen.

B, Block der B-Welle durch 100 μM L-APB. Die A-Welle geht in die langsame PIII-Welle über.

C, Auswasch, die B-Welle kehrt teilweise wieder zurück.

D, Bei versenkter Pipette ist nur noch die B-Welle zu sehen.

E, Die B-Welle wird deutlich, aber nicht ganz vollständig reduziert.

F, Nach dem Auswasch kehrt die B-Welle fast vollständig wieder zurück.

In einer Versuchsreihe wurde die Lichtempfindlichkeit der *in vitro* Präparation untersucht. Dazu werden Blitze mit Intensitäten zwischen 0,4 und 1735 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz verwendet.

In **Abb. 3.3.3.2 A** sind B-Wellen aus einer Retina bei verschiedenen Blitz-Intensitäten zu sehen. Die Amplitude der B-Welle nimmt mit steigender Intensität zu, außerdem wird die B-Welle breiter. Für jede Retina wurden die Amplituden der B-Wellen bei den verschiedenen

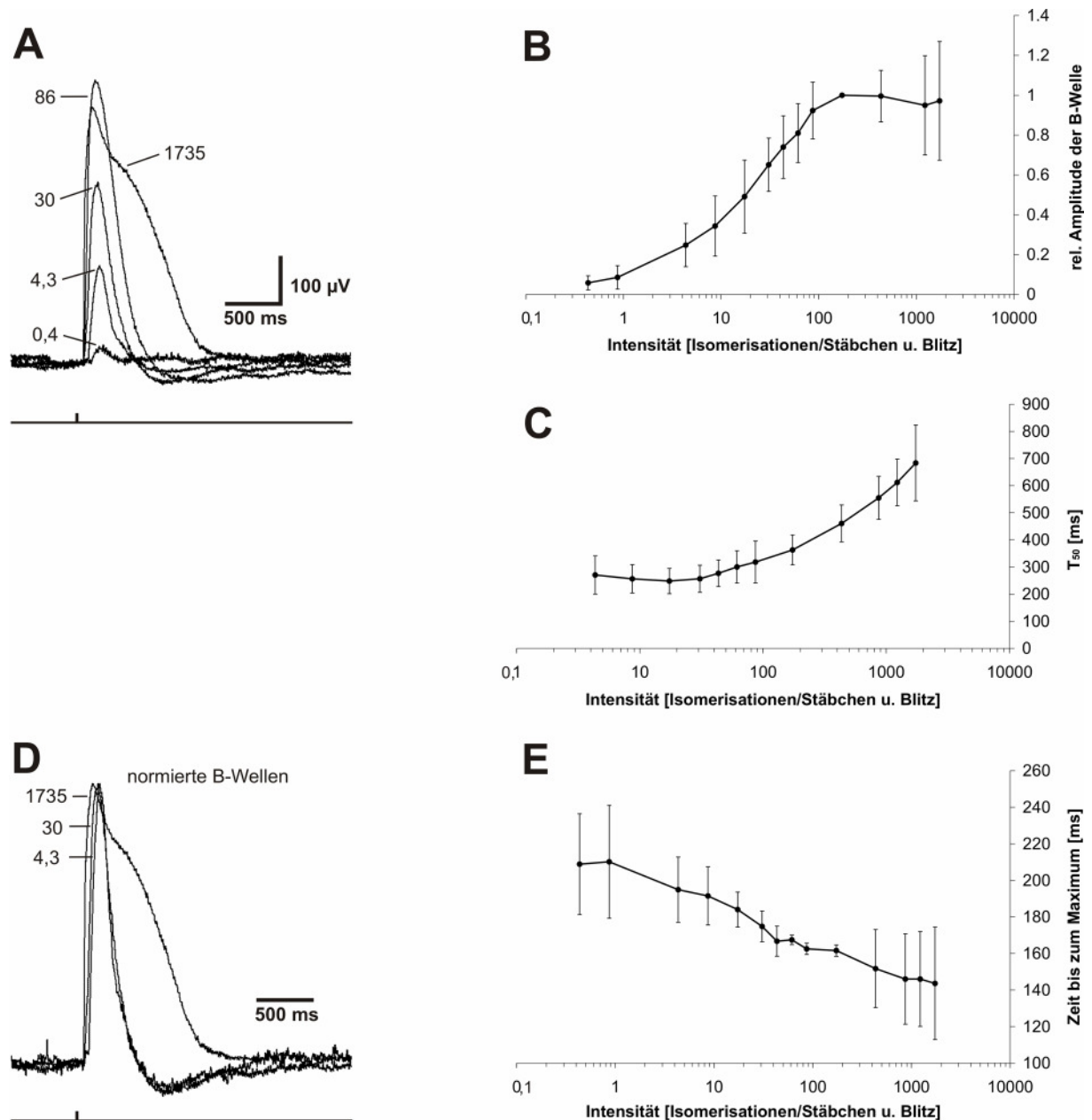


Abb. 3.3.3.2: Intensitätsreihe.

A, Die B-Welle wird mit zunehmender Intensität größer und länger (Angaben in Isomerisationen/Stäbchen und Blitz).

B, Die Amplitude der B-Welle ist bei ca. 17 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz halbmaximal ($n=5$).

C, Der T_{50} -Wert steigt bei zunehmender Intensität an ($n=5$).

D, Normierte B-Wellen bei verschiedenen Intensitäten: die Zeit bis zum Maximum wird kürzer.

E, Die Zeit bis zum Maximum verkürzt sich von 210 ms bei geringen Intensitäten auf 140 ms bei hohen Intensitäten ($n=5$).

Intensitäten auf die Amplitude der B-Welle bei 173 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz normiert. Die normierten Werte aus fünf Retinae verschiedener Tiere wurden dann gemittelt und gegen die Intensität im Diagramm in **B** aufgetragen. Die Kurve zeigt einen sigmoidalen

Verlauf. Die relative Amplitude ist halbmaximal bei 17 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz und geht bei ungefähr 170 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz in die Sättigung. Green et al. (1999) geben als Intensität 5 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz an, bei der die B-Wellenamplitude im in vitro ERG der Ratte halbmaximal ist. Der von mir ermittelte Wert ist also vergleichbar mit Werten aus anderen Präparationen.

In **C** ist die Auswertung der Länge der B-Welle bei unterschiedlichen Intensitäten zu sehen. Zur Bestimmung der Länge der B-Wellen wurde der T_{50} -Wert verwendet. Dieser Wert gibt die Zeit an, nach der die B-Welle auf 50% ihrer Amplitude abgefallen ist. Der T_{50} -Wert bleibt bei geringeren Intensitäten relativ konstant und steigt dann ab ungefähr 20 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz an. Bei höheren Intensitäten ist im Verlauf der B-Welle oft eine zweite Komponente zu sehen, die die B-Welle verlängert (**A** bei 1735 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz).

In **D** wurde die Amplitude der B-Welle bei unterschiedlichen Intensitäten normiert aufgetragen. Man sieht, dass die Zeit bis zum Maximum bei höheren Intensitäten kürzer wird. Die gemittelten Messungen aus fünf Tieren wurden in einem Diagramm in **D** aufgetragen. Bei geringen Intensitäten beträgt die Zeit bis zum Maximum bis zu 210 ms und verkürzt sich mit zunehmender Intensität auf ungefähr 140 ms.

3.3.4 Vergleich der B-Welle in Wildtyp- und Knockoutmäusen und nach Applikation von ZD7288

HCN1-Kanäle verkürzen die Lichtantwort in Photorezeptoren (siehe **Kap. 3.2.2.2**). Man würde deshalb erwarten, dass die B-Wellen in HCN1-Knockouttieren verlängert sind. In Wildtypretinae sollte die B-Welle nach Applikation des HCN-Kanalblockers ZD7288 verlängert sein. Im folgenden Kapitel werden Retinae von Wildtyp- und HCN1-Knockoutmäusen mit Einzelblitzen gereizt und die Länge der B-Wellen verglichen. Die Blitze haben ungefähr halbmaximale (30 Isomerisationen/Stäbchen) bzw. sättigende Intensität (867 Isomerisationen/Stäbchen). Außerdem wird die Wirkung von ZD7288 in Wildtyp- und HCN1-Knockoutretinae untersucht.

In **Abb. 3.3.4 A-D** sind B-Wellen nach Einzelblitzen mit einer Reizintensität von 30 Isomerisationen/Stäbchen zu sehen. In der Spur unter dem ERG ist der Zeitpunkt des Reizes durch eine Erhebung gekennzeichnet. In **A** ist eine B-Welle aus einer Wildtypretina dargestellt. Der T_{50} -Wert beträgt 209 ms. Messungen aus 11 Retinae ergaben einen mittleren

T_{50} -Wert von 232 ± 34 ms. Um die Wirkung von ZD7288 zu untersuchen, wurde der T_{50} -Wert in jeder Retina vor und nach dem Einwaschen gemessen und die Veränderung in Prozent angegeben. Nach 10 minütigem Einwaschen von $100 \mu\text{M}$ ZD7288 ist der T_{50} -Wert der B-Welle in dieser Retina um 48% verlängert (**B**). Messungen aus 7 Retinae ergaben eine mittlere Verlängerung von $59 \pm 11\%$.

Abb. C zeigt die Ableitung einer B-Welle aus einer HCN1-Knockoutretina ($T_{50} = 271$ ms; mittlerer Wert 255 ± 48 ms, $n = 9$). Im Vergleich mit den Wildtypetieren bedeutet das eine Verlängerung des T_{50} -Wertes um 10%. Nach Einwaschen von ZD7288 ist die B-Welle in dieser Retina um 41% verlängert (**D**; mittlere Verlängerung $35 \pm 12\%$, $n = 3$).

In **Abb. E-H** wurden Einzelblitze mit einer Reizintensität von 867 Isomerisationen/Stäbchen appliziert. In **E** ist eine B-Welle aus einer Wildtypretina dargestellt. Der T_{50} -Wert beträgt 503 ms, (mittlerer Wert 559 ± 56 ms, $n = 9$). Einwaschen von ZD7288 führte zu einer Verlängerung des T_{50} -Wertes um 7% (**F**; mittlere Verlängerung $11 \pm 5\%$, $n = 3$). Der T_{50} -Wert für die B-Welle aus der Knockoutretina in **G** beträgt 513 ms. Messungen aus 6 Tieren ergaben einen T_{50} -Wert von 609 ± 94 ms (verglichen mit den Wildtypretinae eine Verlängerung um 9%). Applikation von ZD7288 bewirkt keine eindeutige Verlängerung der B-Welle. Der T_{50} -Wert der B-Welle in **H** ist sogar um 2% verkürzt (mittlere Verlängerung 3%, $n = 2$).

Der HCN-Kanalblocker ZD7288 wirkt intrazellulär (Harris et al., 1994; Harris und Constanti, 1995; Satoh und Yamada, 2000). Der Blocker muss deshalb eine gewisse Zeit eingewaschen werden, bis er in die Zelle gelangt (mindestens 10 Minuten). ZD7288 blockt außerdem irreversibel und kann deshalb nicht wieder ausgewaschen werden. Es ist deshalb wichtig zu untersuchen, ob die Verlängerung der A-Welle spezifisch durch Applikation von ZD7288 erzielt wurde oder durch eine langsame Veränderung der Retina während der langen Ableitung. Wildtypretinae wurden unter Kontrollbedingungen über 20 Minuten abgeleitet und die Veränderung des T_{50} -Wertes bestimmt (Helligkeit: 30 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz). Bei einer von drei Retinae verlängerte sich der T_{50} -Wert während der 20 Minuten um 10%, bei den zwei anderen kam es zu einer moderaten Schwankung. Im Mittel nahm der T_{50} -Wert um 3% zu. Bei Helligkeiten von 30 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz verlängerten sich bei Applikation von ZD7288 die T_{50} -Werte in Wildtypretinae um 59%, in Knockoutretinae um 35%. Diese starken Änderungen weisen auf einen eindeutigen Effekt von ZD7288 hin. Bei hohen Intensitäten verlängert sich der T_{50} -Wert in Wildtypretinae nur um 11%, in Knockoutretinae um 3%. Diese Änderungen sind zu klein um von einem eindeutigen ZD7288 Effekt zu sprechen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die B-Wellen von Knockoutretinae im Vergleich zu Wildtypretinae leicht verlängert sind. Eine deutliche Verlängerung der B-Welle unter ZD7288 ist bei niedrigen Intensitäten sowohl bei Wildtyp-, als auch bei Knockoutretinae zu beobachten. Bei hohen Intensitäten ist kein eindeutiger ZD7288-Effekt in Wildtyp- und Knockoutretinae zu beobachten. Dies widerspricht den Erwartungen. Hohe Lichtintensitäten führen zu starker Hyperpolarisation der Photorezeptoren. Der Einfluss der HCN1-Kanäle sollte also bei hoher Lichtintensität stärker sein, als bei schwachen Intensitäten. Man würde deshalb auch erwarten, dass die Blockade der HCN-Kanäle durch ZD7288 bei hohen Intensitäten einen größeren Effekt hätte, als bei niedrigeren Intensitäten. Das scheint nicht der Fall zu sein.

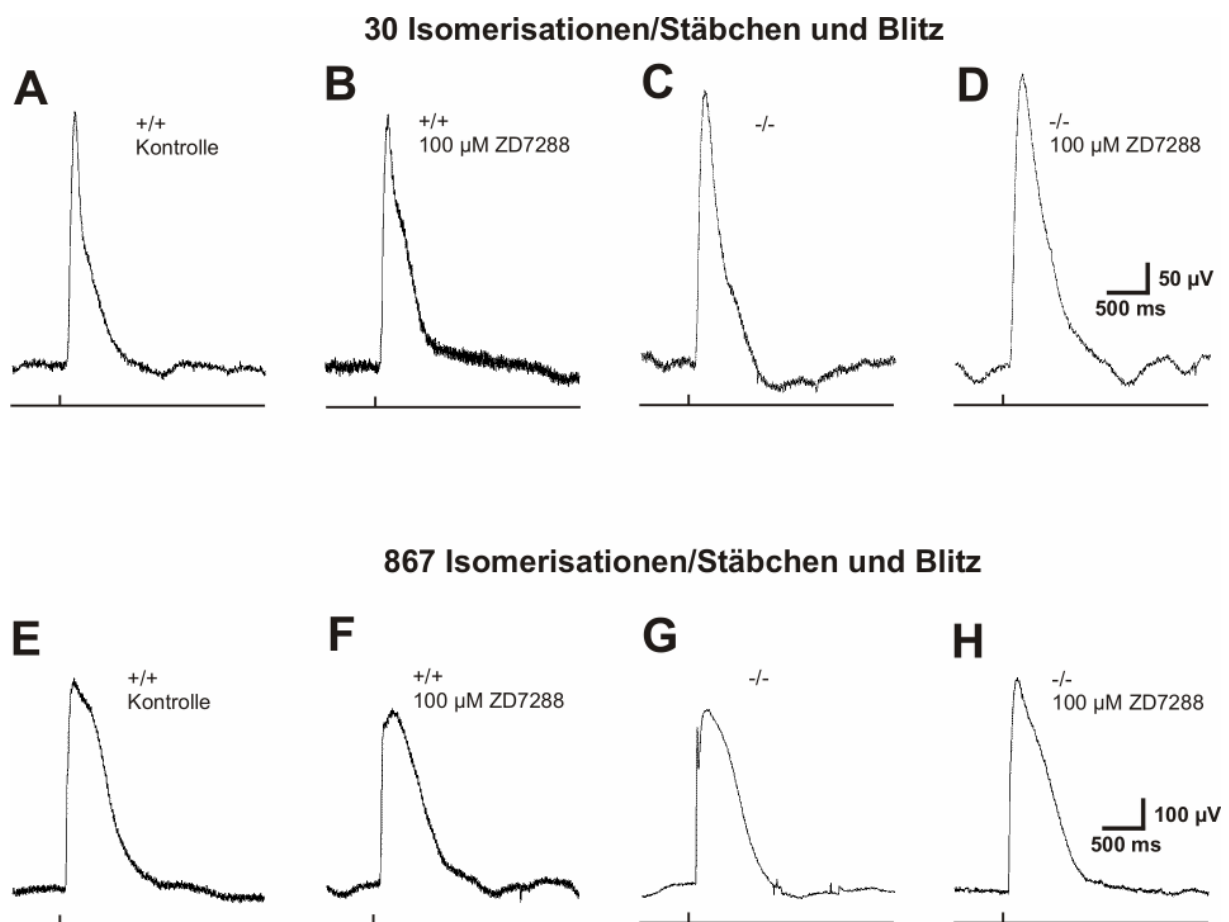


Abb. 3.3.4: Einzelblitz-ERGs in Wildtyp- und Knockoutmäusen.

A-D, Einzelblitze mit 30 Isomerisationen/Stäbchen, **E-H**, Einzelblitze mit 867 Isomerisationen/Stäbchen.

A, B, Wildtyp: Die B-Welle wird nach Einwaschen von ZD7288 länger.

C, D, Knockout: Die B-Welle wird nach Einwaschen von ZD7288 ebenfalls länger, der Knockout (**C**) zeigt gegenüber dem Wildtyp (**A**) eine verlängerte B-Welle.

E-H, ZD7288 zeigt keinen Effekt bei hohen Intensitäten. Die B-Welle der Knockoutretina (**G**) ist im Vergleich zur Wildtypretina (**E**) leicht verlängert.

3.3.5 Frequenzreihen

Es wurde vorgeschlagen, dass der HCN1-Kanal die Lichtantwort in Photorezeptoren verkürzt und damit hilft, den Photorezeptor auf einen nachfolgenden Lichtreiz vorzubereiten. Man könnte deshalb erwarten, dass der Knockout von HCN1 zu einer schlechteren Frequenzauflösung im ERG führt. In diesem Kapitel wird die Frequenzübertragung von Wildtyp- und Knockoutretinae im Flimmer-ERG (30 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz) untersucht. Außerdem wird der Effekt von ZD7288 auf die Frequenzübertragung untersucht.

In **Abb. 3.3.5.1 A** sind B-Wellen aus einer Wildtypretina in einem Flimmer-ERG von 2 Hz gezeigt. Die B-Welle hat beim ersten Blitz die größte Amplitude, wird beim zweiten Blitz kleiner und erreicht ab dem dritten Blitz eine konstante Amplitude. Zur Auswertung wurden die Amplituden der B-Wellen in der „eingeschwungenen“ Phase auf die Amplitude der B-Welle bei einem unmittelbar vorhergehenden Einzelreiz derselben Helligkeit normiert und als relative Amplitude in Prozent angegeben. In **B** sind für eine Wildtyp- und eine Knockoutretina normierte B-Wellen in der eingeschwungenen Phase bei den Reizfrequenzen 2, 6 und 12 Hz dargestellt. Bei einem Flimmerreiz von 2 Hz erreichten die Amplituden der normierten B-Wellen in der eingeschwungenen Phase in der Wildtypretina noch 69%. Für 9 Tiere ergab sich ein Mittelwert von $68 \pm 4\%$. In der Knockoutretina ergab sich ein Wert von 62% (mittlerer Wert $60 \pm 10\%$, $n = 9$). Dieser Wert ist um 11% kleiner als die relative B-Wellenamplitude der Kontrolltiere. Dieser Trend setzt sich auch bei höheren Frequenzen fort. Flimmerreize von 6 Hz ergaben eine relative Amplitude von 23% beim Kontrolltier (mittlerer Wert $23 \pm 3\%$, $n = 9$) und 18% beim Knockouttier (mittlerer Wert $19 \pm 4\%$, $n = 8$). Die relative B-Wellenamplitude der Knockouttiere ist bei 6 Hz um 20% kleiner als die der Kontrolltiere. Flimmerreize von 12 Hz ergaben eine relative Amplitude von 5% in der gezeigten Wildtypretina. Insgesamt wurden sechs Wildtypretinae untersucht. Nur bei einer konnte bei 12 Hz keine B-Welle mehr detektiert werden, die relative B-Wellenamplitude wurde gleich null gesetzt. Bei den sechs Tieren betrug die mittlere relative B-Wellenamplitude $4 \pm 2\%$. Im Gegensatz dazu war in sieben von acht untersuchten Knockoutretinae keine B-Welle mehr zu erkennen. Nur bei einer Retina konnte noch eine relative Amplitude von 3% gemessen werden. Die Frequenz von 12 Hz wurde in Knockoutretinae als nicht mehr aufgelöst gewertet und die relative B-Wellenamplitude gleich null gesetzt.

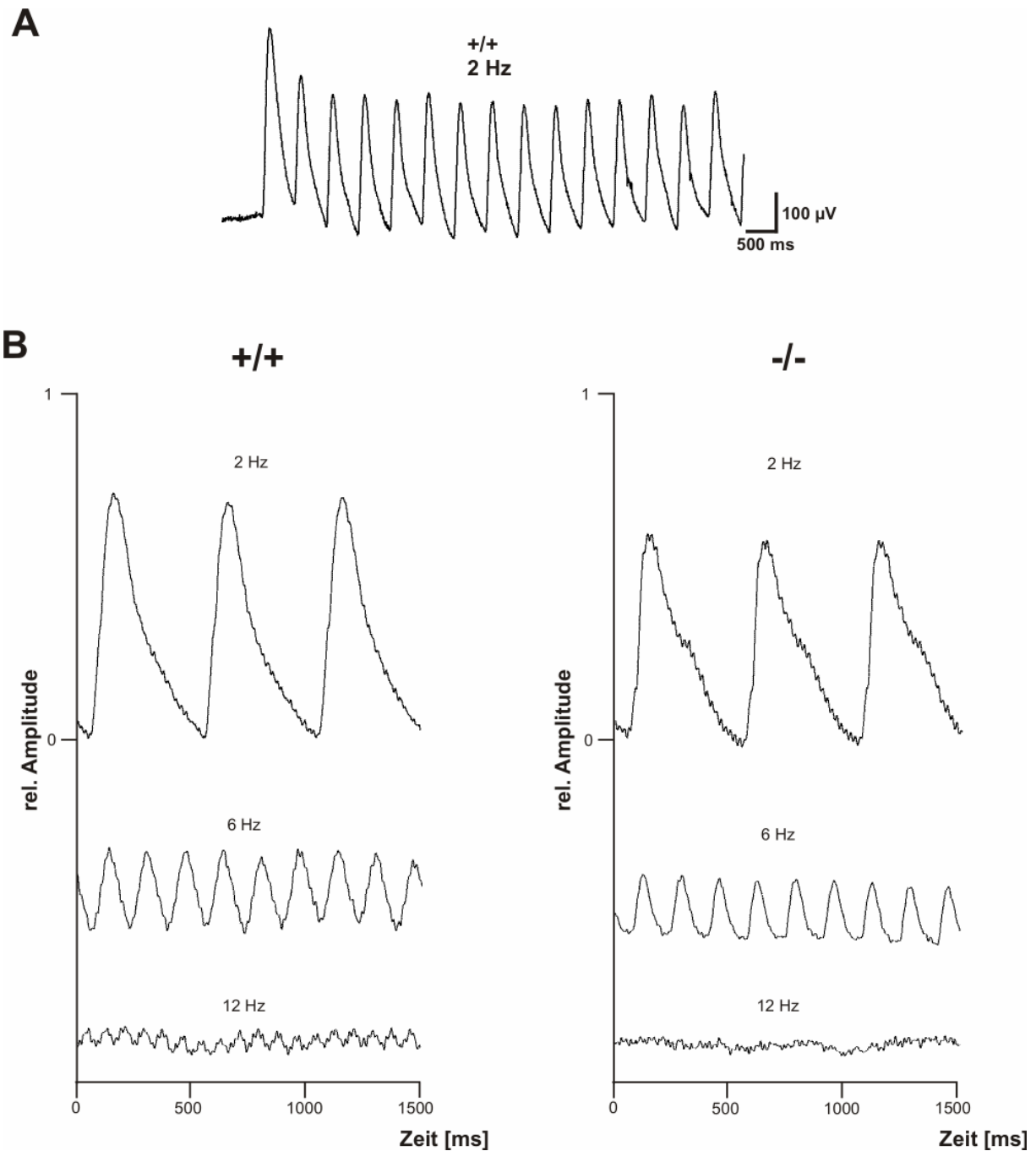


Abb. 3.3.5.1: Flimmer-ERG in repräsentativen Retinae von Wildtyp- und Knockoutmäusen (30 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz).

A, Flimmer-ERG in einer Wildtypretina, die Amplitude der B-Welle schwingt sich nach kurzer Zeit auf ein konstantes Niveau ein.

B, mit zunehmender Frequenz nimmt die relative Amplitude der B-Wellen (normiert auf die Amplitude der B-Welle bei einem Einzelblitz) in der eingeschwungenen Phase ab. Im Wildtyp (links) ist das ERG bei 12 Hz noch Frequenzmoduliert, im Knockouttier (rechts) nicht.

Die Ergebnisse dieser Messungen und Messungen in Gegenwart von ZD7288 sind in einem Diagramm in **Abb. 3.3.5.2** dargestellt. Bei allen Frequenzen ist die relative Amplitude in Knockoutretinae kleiner als in Kontrollretinae. Dies bedeutet ein leichtes Defizit im zeitlichen

Auflösungsvermögen bei HCN1-Knockouttieren. Diese Unterschiede sind aber sehr klein und statistisch nicht signifikant. ZD7288 verringert die relative Amplitude der B-Welle sowohl in Kontroll-, als auch in Knockoutretinae. Die Übertragung der Frequenz nach Applikation von ZD7288 in Wildtypretinae ist schlechter als die Übertragung der Frequenz in Knockoutretinae unter Kontrollbedingungen.

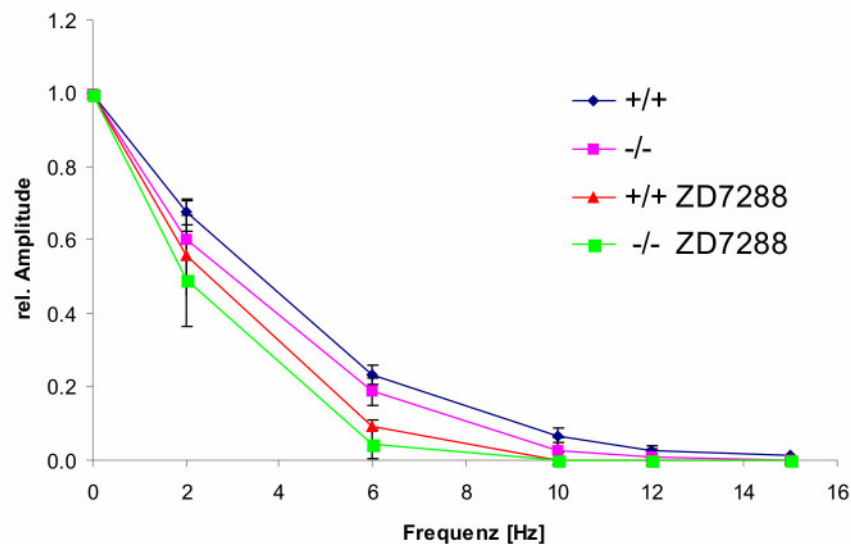


Abb. 3.3.5.2: Frequenzauflösung der B-Welle bei 30 Isomerisationen/Stäbchen und Blitz in Wildtyp- und Knockoutretinae und nach Applikation des HCN-Kanalblockers ZD7288.

Die Untersuchungen mit dem in vitro ERG zeigen:

- Die B-Welle ist in Knockoutretinae leicht verlängert.
- ZD7288 verlängert die B-Welle bei niedrigen Lichtintensitäten sowohl in Wildtypretinae, als auch in Knockoutretinae.
- ZD7288 verlängert die B-Welle kaum bei hohen Lichtintensitäten.
- Die Frequenzübertragung ist in Knockoutretinae leicht reduziert.
- Die Frequenzübertragung wird durch ZD7288 in Wildtyp- und in Knockoutretinae leicht verschlechtert.

4. Diskussion

4.1 Das Expressionsmuster von HCN-Kanälen in der Retina

Die Verteilung der vier HCN-Isoformen in der Mäuseretina ist sehr unterschiedlich. HCN1 wird in Stäbchen und Zapfen, sowie in Stäbchenbipolarzellen, Typ5 und Typ7 Bipolarzellen exprimiert. Außerdem konnte HCN1 in einigen Amakrin- und Ganglienzellen nachgewiesen werden. HCN1 ist in der Mäuseretina also weit verbreitet, HCN2, HCN3 und HCN4 dagegen weit weniger. HCN4 wird in Typ3 Bipolarzellen und in einigen Amakrin- und Ganglienzellen exprimiert. HCN2 konnte nur in Amakrin- und Ganglienzellen nachgewiesen werden. Mit einem Antikörper gegen HCN3 wurden hauptsächlich Fortsätze von Zellen gefärbt, die schwierig zu identifizieren waren. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Fortsätze von Amakrin- und Ganglienzellen.

Vergleicht man die Verteilung der HCN-Kanäle in den zwei nahe verwandten Spezies Ratte (Ivanova, 2003; Müller et al., 2003) und Maus (eigene Arbeit), so lassen sich zum Teil Ähnlichkeiten, aber auch erstaunlicherweise große Unterschiede feststellen. HCN1 ist in beiden Spezies relativ ähnlich verteilt. Sowohl in der Ratten-, als auch in der Mäuseretina wird HCN1 in Photorezeptoren exprimiert. Auch im Kaninchen (Demontis et al., 2002; Kim et al., 2003), sowie im Affen und im Rind (F. Müller, persönliche Mitteilung) besitzen Photorezeptoren HCN1. Es scheint also ein generelles Prinzip zu sein, dass Photorezeptoren HCN1 exprimieren. Die Typ5 Bipolarzelle der Maus ist sehr ähnlich zur Typ5 Bipolarzelle der Ratte. Beide stratifizieren oberhalb der ON-cholinergen Bande und sind durch Antikörper gegen CabP5 anfärbbar. Auch elektrophysiologisch sind die Zellen sehr ähnlich. In beiden Spezies exprimieren Typ5 Bipolarzellen HCN1. Die Typ6a Bipolarzelle in der Ratte (Ivanova, 2003) entspricht vermutlich der Typ7 Bipolarzelle der Maus (Gosh et al., 2004). Beide stratifizieren unterhalb der ON-cholinergen Bande, beide besitzen eine Ca^{2+} -aktivierte Leitfähigkeit, beide exprimieren HCN1. Auch bei dem Expressionsmuster der HCN4-Isoform gibt es Ähnlichkeiten zwischen Maus und Ratte. In beiden Spezies findet man HCN4 in Typ3 Bipolarzellen und in einigen Amakrinzellen.

Allerdings gibt es auch Unterschiede in der Expression der HCN-Isoformen in Bipolarzellen. Stäbchenbipolarzellen in der Ratte exprimieren HCN2, in der Maus HCN1. Die einzige

HCN1-positive Bipolarzelle in der Kaninchenretina ist eine OFF-Bipolarzelle (Kim et al., 2003), HCN1-positive Bipolarzellen in Ratte und Maus sind ON-Bipolarzellen. In der Rattenretina wird HCN2 in allen ON-Bipolarzellen exprimiert (Ivanova, 2003). Immunhistochemische Färbungen mit dem Antikörper gegen HCN2 ergeben in der Ratte ein klares Bandenmuster in der IPL mit einer starken Färbung der Axonterminalsyste der ON-Bipolarzellen. In der Maus ist die HCN2-Expression schwach und es gibt kein klares Bandenmuster. Die häufigste ON-Bipolarzelle, die Stäbchenbipolarzelle, exprimiert in der Maus nicht HCN2, sondern HCN1. Ein zweiter ON-Bipolarzelltyp, der abgeleitet wurde, die Typ9 Bipolarzelle hat in der Mäuseretina gar keinen HCN-Kanal.

Es gibt außerdem Unterschiede zwischen den Spezies in der Koexpression von HCN-Kanälen. In der Rattenretina gibt es Zelltypen, die neben HCN1 auch andere HCN-Isoformen exprimieren (Müller et al., 2003). Dies scheint in der Maus nicht der Fall zu sein. Zapfen haben in der Rattenretina HCN1 und HCN2, in der Maus haben sie nur HCN1. Die Typ5 und die Typ6a Bipolarzellen exprimieren in der Ratte neben HCN1 auch HCN4. In der Maus exprimieren die Typ5, bzw. die Typ7 Bipolarzellen nur HCN1. In keinem der beiden Zelltypen weist die Aktivierungskinetik eine langsame Komponente auf, die auf die HCN4-Isoform hinweisen würde. Typ5 Bipolarzellen in HCN1-Knockouttieren haben keine HCN-Ströme mehr. Das Expressionsmuster einer HCN-Isoform in einer Spezies lässt sich also nicht automatisch auf eine andere Spezies übertragen. Da allerdings in allen bisher untersuchten Spezies Photorezeptoren HCN1 exprimieren, sollten sich die Effekte, die in der HCN1-Knockoutmaus gefunden werden, zumindest in dieser Hinsicht auch auf andere Spezies übertragen lassen.

4.2 Eigenschaften der HCN-Kanäle in der Retina

In Photorezeptoren aller oben genannten Spezies wurde HCN1 gefunden. Es wurde schon früh postuliert, dass HCN-Kanäle in Photorezeptoren die Lichtantwort verkürzen (Fain et al., 1978). Bei Hyperpolarisation der Photorezeptoren durch Belichtung aktivieren die HCN-Kanäle und depolarisieren die Zelle wieder (Satoh et al., 2000). Der schnell aktivierende HCN1-Kanal ist dabei von Vorteil. In der Maus habe ich in Photorezeptoren eine Zeitkonstante von $\tau = 29 \pm 6$ ms für HCN1 gemessen. Diese Zeitkonstante ist doppelt so schnell wie die Zeitkonstante des heterolog exprimierten HCN1 ($\tau = 60 \pm 11$ ms). Auch in

Typ5 Bipolarzellen ($\tau = 48 \pm 13$ ms) und in Stäbchenbipolarzellen ($\tau = 42 \pm 14$ ms) aktivieren die HCN1-Ströme schneller, als in HEK293-Zellen. Sind die HCN1-Kanäle in der Retina verändert?

Es gibt mehrere Faktoren, durch die Eigenschaften der HCN-Kanäle verändert, d.h. moduliert, werden können. Im Folgenden seien nur einige Beispiele genannt. Die Bindung zyklischer Nukleotide verschiebt die Aktivierungskurve der HCN-Kanäle zu positiveren Spannungen und beeinflusst die Aktivierungskinetik. Allerdings ist dieser Effekt bei HCN1 geringer, als bei den anderen HCN-Isoformen. Bindung von cAMP verschiebt die Aktivierungskurve von HCN1 um nur ca. 2 – 4 mV, die von HCN4 um bis zu 15 mV (zur Übersicht: Kaupp und Seifert, 2001). HCN-Kanäle werden auch durch Phosphorylierung moduliert. Phosphorylierung von HCN-Kanälen durch PKC führte z.B. zur Verringerung der Leitfähigkeit, die Aktivierungskurve wurde aber nicht verschoben (Cathala und Paupardin-Tritsch, 1997). Yu et al. (1995) zeigten in ventrikulären Myozyten, dass die Aktivierungskurve nach Inhibition von Phosphatasen zu positiveren Spannungen verschoben wird. Barbuti et al. (2004) diskutieren einen anderen Mechanismus, der Aktivierungseigenschaften der HCN-Kanäle verändern soll. HCN4-Kanäle, die in sogenannte „lipid rafts“ integriert sind, sollen schneller aktivieren als Kanäle außerhalb der „rafts“. Der Aktivierungsbereich der Kanäle soll zu negativeren Spannungen verschoben sein.

Schließlich könnten strukturelle Veränderungen an den HCN1-Kanälen deren Eigenschaften modulieren. Zum einen könnten zusätzliche Untereinheiten in die HCN-Kanäle eingebaut werden. Yu et al. (2001) beschrieben, dass die Koexpression von MIRP1 (Mink-Related-Protein1) in *Xenopus* Oocyten die Aktivierung von HCN1-Kanälen beschleunigt und die Aktivierungskurve verschiebt. Die Proteine MIRP1-3 und MINK (minimal potassium channel) wurden als Untereinheiten von K^+ -Kanälen beschrieben. Ob sie in situ mit HCN-Kanälen assoziiert sind, ist unklar. Zum anderen könnten veränderte Eigenschaften der HCN1-Kanäle auf alternatives Spleissen zurückzuführen sein. Gisselmann et al. (2005) beschreiben eine Verschiebung des $V_{1/2}$ -Wertes in Spleissvarianten von HCN-Kanälen aus der Fruchtfliege. Zur Zeit ist unklar, ob eine oder mehrere der genannten Modulationsmöglichkeiten für die veränderten Aktivierungseigenschaften der HCN1-Kanäle in der Retina verantwortlich sind.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch der Vergleich der HCN1-Ströme in verschiedenen Mäusestämmen. HCN1-Ströme in Stäbchen, Stäbchenbipolarzellen und Typ5 Bipolarzellen aus Tieren des Stammes C57Bl/6 haben immer eine größere Amplitude als die Ströme in diesen Zelltypen aus Tieren des Stammes SV129. Ihre Aktivierung ist außerdem

weniger verzögert und erfolgt mit schnellerer Kinetik. Zum Beispiel haben HCN1-Ströme in Stäbchenbipolarzellen des Mäusestammes C57Bl/6 eine doppelt so schnelle Zeitkonstante ($\tau = 42 \pm 14$ ms) wie in SV129 Tieren ($\tau = 82 \pm 8$ ms). Zwischen den Aminosäuresequenzen der HCN1-Proteine aus C57Bl/6 und SV129 Mäusen gibt es nur einen Unterschied: an Position 42 befindet sich im Stamm C57Bl/6 ein Arginin, im Stamm SV129 ein Glyzin (persönliche Mitteilung, W. Bönigk). Obwohl nicht a-priori ausgeschlossen werden kann, dass dieser moderate Unterschied zu einer Veränderung der Aktivierungseigenschaften führt, ist es wahrscheinlicher, dass die unterschiedlichen Eigenschaften der HCN1-Ströme auf die verschiedenen genetischen Hintergründe der Inzuchtstämme zurück zu führen sind. Die Unterschiede in der Stromamplitude könnten in einem unterschiedlichen Expressionsniveau des HCN1-Proteins begründet liegen. Alternativ könnte das „Targeting“ des Proteins, d.h. der Einbau in die Zellmembran in C57Bl/6 Tieren effizienter sein. Vielleicht sind in diesem Stamm die notwendigen Chaperone oder andere Hilfsproteine stärker exprimiert. In *Xenopus* Oocyten, HEK293-Zellen und Pyramidenzellen wurde z.B. gezeigt, dass das Protein TRIP8b den Transport von HCN-Kanälen in die Membran reguliert (Santoro et al., 2004). Auch Unterschiede in der Expression von Kinasen oder Phosphatasen zwischen den Inzuchtstämmen könnten, wie oben diskutiert, zu verschiedenen Eigenschaften der HCN1-Ströme führen. Eine interessante Frage ist, inwieweit sich die beschriebenen Unterschiede zwischen den Stämmen physiologisch auswirken. Dazu müssten Lichtantworten in den verschiedenen Inzuchtstämmen in Zukunft detailliert untersucht und miteinander verglichen werden. Da die HCN1-Ströme in C57Bl/6 Tieren größer sind, als in Tieren mit dem gemischten genetischen Hintergrund C57SV, könnte es außerdem sein, dass das Ausschalten des HCN1-Kanals in Tieren mit reinem C57Bl/6 Hintergrund ausgeprägtere Effekte hat als in C57SV Tieren. Bisher hat die zeitaufwendige Rückkreuzung verhindert, diesen Aspekt zu untersuchen.

Die $V_{1/2}$ -Werte für HCN1, die ich in Stäbchen und Bipolarzellen gemessen habe, waren sehr negativ ($V_{1/2} \sim -100$ mV). Der Einfluss der HCN-Kanäle auf die physiologischen Eigenschaften der Zelle hängt davon ab, wie stark sich der Aktivierungsbereich der Kanäle mit dem physiologischen Spannungsbereich der Zelle überlappt. Photorezeptoren einiger Spezies hyperpolarisieren bei Belichtung bis auf -70 mV (Schildkröte: -70 mV, Baylor und Hodgkin, 1973; Salamander: -65 mV, Schnapf und Baylor, 1978; Makake: -60 mV, Schneeweis und Schnapf, 1995). Wie stark Photorezeptoren in Maus und Ratte hyperpolarisieren ist nicht bekannt, aber es sind ähnliche Werte zu erwarten. Der

physiologische Spannungsbereich des Photorezeptors würde sich dann nur geringfügig mit dem von mir gemessenen Aktivierungsbereich der HCN1-Kanäle überlappen. Selbst bei maximaler Hyperpolarisation würden nur ein paar Prozent der HCN-Kanäle aktiviert. In **Abb. 3.2.2.2** ist zu erkennen, dass HCN-Kanäle in Stäbchen erst bei sehr negativen Spannungen eine Depolarisation des Photorezeptors auslösen. Das ist mit der bisher postulierten Funktion von HCN-Kanälen in Photorezeptoren nicht vereinbar. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivierungskurve der HCN1-Kanäle durch die Ableittechnik verfälscht wurde. In dem von mir verwendeten Ganzzell-Modus könnte z.B. das intrazelluläre Milieu der Zellen nachteilig verändert werden. Vielleicht wurden endogene Faktoren ausgewaschen wurden, die den Aktivierungsbereich der Kanäle beeinflussen. Meine Messungen wurden unmittelbar nach Etablierung der Ganzzell-Konfiguration durchgeführt, um Störungen durch diese Auswascheffekte zu vermeiden. Außerdem dürfte es bei so lang gestreckten Zellen wie Photorezeptoren und Bipolarzellen relativ lange dauern, um das intrazelluläre Milieu in den Zellkompartimenten zu stören, die weit von der Patch-Pipette entfernt sind. Trotzdem können artifizielle Veränderungen des Aktivierungsbereichs nicht ausgeschlossen werden. Demontis et al. (1999) benutzten in Ableitungen von Stäbchen der Meerschweinchenretina die „Perforated-patch“ Technik. Ihre $V_{1/2}$ -Werte für HCN1 sind mit $V_{1/2} = -72$ mV deutlich positiver als meine Werte ($V_{1/2} \sim -100$ mV). Es erscheint mir deshalb notwendig, die Strom-Spannungsbeziehung der retinalen HCN1-Kanäle der Maus auch mit dieser Technik zu untersuchen.

Welche Funktion könnten HCN-Kanäle in Photorezeptoren und Bipolarzellen haben? In Photorezeptoren (HCN1) und Typ3 Bipolarzellen (HCN4) könnten die HCN-Kanäle die hyperpolarisierenden Lichtantworten verkürzen. Typ5 und Typ7 Bipolarzellen, sowie Stäbchenbipolarzellen sind ON-Bipolarzellen. In diesen Zellen werden HCN-Kanäle während der depolarisierenden Lichtantwort nicht aktiviert. ON-Bipolarzellen hyperpolarisieren erst bei Dunkelheit. Die HCN-Kanäle könnten eine zu starke Hyperpolarisation im Dunkeln verhindern und somit dafür sorgen, dass die Membranspannung der ON-Bipolarzellen im physiologischen Arbeitsbereich bleibt. Auch in Photorezeptoren wirken HCN-Kanäle einer zu starken Hyperpolarisation entgegen, wie sie bei sehr hellen Lichtreizen auftritt. Indem sie „Extremwerte“ verhindern, könnten HCN-Kanäle dazu beitragen, dass retinale Schaltkreise nicht dauerhaft gehemmt oder erregt werden.

4.3 Der HCN1-Knockout

Nicht immer lässt sich durch den Vergleich von Knockouttieren und Wildtyptieren etwas über die Funktion des ausgeschalteten Proteins lernen. In manchen Fällen ist das Ausschalten eines Gens letal. Man lernt dann zwar, dass das Protein lebenswichtig ist, erfährt aber wenig über funktionelle Eigenschaften. Das gilt z.B. für den konventionellen Knockout der HCN4-Isoform (Stieber et al., 2003). In anderen Fällen findet man gar keinen Phänotyp, möglicherweise, weil der Verlust eines Proteins durch Überexpression anderer Proteine oder andere Regulationsmechanismen kompensiert wird. Der HCN1-Knockout scheint nicht in diese Kategorie zu gehören. Die Retina der Knockouttiere sieht normal aus. Immunhistochemische und elektrophysiologische Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigen außer dem Verlust von HCN1 keine wesentlichen Unterschiede zu Kontrolltieren. In meinen elektrophysiologischen Ableitungen fand ich keine Hinweise darauf, dass der Verlust von HCN1-Kanälen durch Expression anderer HCN-Isoformen kompensiert wurde. Der HCN1-Knockout scheint also ein gutes „Werkzeug“ zu sein, um mehr über die Funktion von HCN1 in der Retina zu erfahren.

Verlängerung der B-Welle. Wie bereits mehrfach diskutiert, sollen HCN1-Kanäle die Lichtantwort in Photorezeptoren verkürzen (Fain et al., 1978; Satoh et al., 2000). Durch eine starke und lang anhaltende Hyperpolarisation des Photorezeptors würde seine Transmitterfreisetzung lange unterdrückt. Die Aktivierung der HCN-Kanäle und die darauf folgende Depolarisation des Photorezeptors würde die Transmitterfreisetzung wieder erhöhen. Für die nachgeschalteten Bipolarzellen entspräche dies einer Annäherung zum Dunkelzustand. Dadurch würde die Lichtantwort der ON-Bipolarzellen verkürzt. Der B-Welle im ERG liegt die Lichtantwort der ON-Bipolarzellen zugrunde. Das Ausschalten der HCN-Kanäle in der Knockoutretina sollte deshalb zur Verlängerung der B-Welle führen. Das wurde in der Tat beobachtet.

Die pharmakologische Blockade der HCN-Kanäle in Wildtypretinae durch ZD7288 sollte ebenfalls zur Verlängerung der B-Welle führen. Das war aber nur bei niedrigen Helligkeiten der Fall. Bei hohen Intensitäten hatte ZD7288 keinen signifikanten Effekt. Dies ist erstaunlich, denn gerade bei hohen Intensitäten, und damit starker Hyperpolarisation der Photorezeptoren, sollte eine Blockade der HCN-Kanäle starke Effekte hervorrufen. Unerwartet ist außerdem, dass ZD7288 bei niedrigen Intensitäten auch die B-Welle in Knockoutmäusen verlängert. Sowohl in Photorezeptoren als auch in ON-Bipolarzellen wird

nur die HCN1-Isoform exprimiert. In der HCN1-Knockoutretina kommen also in den Zellen, die die B-Welle maßgeblich bestimmen, keine HCN-Kanäle mehr vor, deren Blockade zur Verlängerung der B-Welle führen könnte. Allerdings könnte ZD7288 in Amakrinzellen HCN-Kanäle blockieren, die durch andere HCN-Isoformen gebildet werden. Diese Amakrinzellen könnten durch synaptische Verschaltung im neuronalen Netzwerk die Lichtantworten der ON-Bipolarzellen beeinflussen, und so die Länge der B-Welle mitbestimmen. Schließlich wurde berichtet, dass ZD7288 auch T-Typ Ca^{2+} -Kanäle blockiert (Felix et al., 2003). So könnte die Verlängerung der B-Welle auch auf HCN-unabhängigen „unspezifischen“ Effekten des ZD7288 beruhen. Dies könnte auch erklären, weshalb die Verlängerung der B-Welle durch Blockade mit ZD7288 in Kontrolltieren ausgeprägter war, als durch das Ausschalten des HCN1-Kanals in Knockouttieren.

Frequenzübertragung. Wirbeltierphotorezeptoren reagieren relativ langsam (zur Übersicht: Müller und Kaupp, 1998). Werden Photorezeptoren durch eine schnelle Blitzfolge gereizt, kommt es zur Verschmelzung der Lichtantworten. Ab einer bestimmten Frequenz können die Einzelreize nicht mehr aufgelöst werden (Flimmerfusionsfrequenz). Man könnte argumentieren, dass die Verkürzung der Lichtantwort durch HCN1 diese Frequenz erhöht. In den HCN1-Knockoutretinae sollten dann entsprechende Defizite in der Frequenzauflösung auftreten. Die HCN-Kanäle verändern allerdings nur die Membranspannung des Photorezeptors. Sie haben auf die Signaltransduktion im Außensegment keinen Einfluss. Gerade bei hohen Frequenzen dürfte diese relativ langsame Signaltransduktion der limitierende Faktor sein. In dieser Arbeit wurden nur geringe Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockoutretinae im Flimmer-ERG gefunden. Zumindest unter den experimentellen Bedingungen spielen HCN1-Kanäle für die Frequenzübertragung vermutlich eine untergeordnete Rolle. Bei allen Frequenzen ist die Amplitude der B-Welle in der Knockoutretina etwas niedriger als im Wildtyp. Auch unter ZD7288 werden im Flimmer-ERG die B-Wellenamplituden insgesamt kleiner. Insbesondere ist weder im Knockout, noch unter ZD7288 ein „Einbruch“ in der Frequenzübertragung bei hohen Frequenzen zu verzeichnen. Die Frequenzuntersuchungen wurden allerdings aus Zeitgründen nur bei einer Helligkeit durchgeführt. Es war die gleiche Helligkeit, bei der eine deutliche Verlängerung der B-Welle in der Knockoutretina zu erkennen war. Allerdings dürften die HCN-Kanäle in Photorezeptoren bei dieser Helligkeit nur teilweise aktiviert werden (30 Isomerisationen/Stäbchen). Die Experimente sollten bei höheren Intensitäten weitergeführt werden.

In ERG-Ableitungen an der Katze (Gargini et al., 1999) und der Ratte (Maccarone et al., 2004) führte die Applikation von Cs^+ und Zatebradine (einem HCN-Kanalblocker) zu einem Einbruch in der Frequenzübertragung bei hohen Frequenzen. Warum fanden diese Arbeitsgruppen Einbrüche bei hohen Frequenzen, die ich unter meinen Bedingungen nicht gefunden habe? Der wesentliche Unterschied zu meinen Experimenten besteht in der Helligkeit der Lichtreize. Bei der von mir verwendeten niedrigen Helligkeit wurden hauptsächlich Stäbchen gereizt (skotopische Helligkeiten). Die weit weniger empfindlichen Zapfen spielen unter diesen Bedingungen kaum eine Rolle. In den oben genannten Untersuchungen wurden Helligkeiten benutzt, bei denen die Stäbchenantworten bereits sättigen und zusätzlich stark Zapfen aktiviert werden (mesopische Helligkeiten). Das retinale Netzwerk befindet sich also in einem gänzlich anderen Erregungs- und Adaptationszustand, als in meinen Untersuchungen. Insbesondere muss mit komplexen Interaktionen der Stäbchen- und Zapfensignale im retinalen Netzwerk gerechnet werden. Möglicherweise spielen HCN-Kanäle unter diesen Bedingungen eine entscheidende Rolle. Natürlich müssen auch in diesen Experimenten pharmakologische Effekte, die nicht auf der Blockade von HCN-Kanälen beruhen, in Erwägung gezogen werden.

4.4 Ausblick

Die HCN1-Isoform wird in allen bisher untersuchten Spezies in Photorezeptoren exprimiert. Das weist auf eine wichtige Funktion von HCN1 in Photorezeptoren hin. HCN1-Kanäle in Photorezeptoren und Bipolarzellen aktivieren schneller als heterolog exprimierte HCN1-Kanäle. Möglicherweise sind die Kanäle in der Retina durch noch unbekannte Faktoren moduliert. Hier sind weitergehende Untersuchungen notwendig, um diese Faktoren zu identifizieren. Auch die Funktion von HCN-Kanälen in Bipolarzellen muss noch erforscht werden. Die HCN1-Knockoutmaus scheint gut geeignet zu sein, um die Funktion von HCN1 in der Retina zu untersuchen. Im ERG der HCN1-Knockoutmaus sind die B-Wellen leicht verlängert. Vermutlich ist durch den Verlust der HCN1-Kanäle die Lichtantwort der Photorezeptoren leicht verlängert. In ersten Experimenten zur Frequenzübertragung im skotopischen Helligkeitsbereich zeigten sich zwischen den ERGs von Wildtyp- und Knockoutmäusen nur geringe Unterschiede. Die B-Wellen im ERG der Knockouttiere waren bei allen Frequenzen etwas kleiner als im Wildtyp. Der ERG Experimente müssen bei anderen Helligkeiten weitergeführt werden. Daneben sollte versucht werden, die Ergebnisse

aus den ERG Messungen durch Ableitungen von Lichtantworten auf der Einzelzellebene zu bestätigen.

5. Literaturverzeichnis

- Amthor, F. R., Oyster, C. W. & Takahashi, E. S. Morphology of on-off direction-selective ganglion cells in the rabbit retina. *Brain Res.* **298**, 187-190 (1984).
- Amthor, F. R., Oyster, C. W. & Takahashi, E. S. Quantitative morphology of rabbit retinal ganglion cells. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **217**, 341-355 (1983).
- Amthor, F. R., Takahashi, E. S. & Oyster, C. W. Morphologies of rabbit retinal ganglion cells with complex receptive fields. *J. Comp Neurol.* **280**, 97-121 (1989).
- Andressen, C. & Mai, J. K. Localization of the CD15 carbohydrate epitope in the vertebrate retina. *Vis. Neurosci.* **14**, 253-262 (1997).
- Barbuti, A. *et al.* Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics. *Circ. Res.* **94**, 1325-1331 (2004).
- Baughman, R. W. & Bader, C. R. Biochemical characterization and cellular localization of the cholinergic system in the chicken retina. *Brain Res.* **138**, 469-485 (1977).
- Baylor, D. A., Matthews, G. & Nunn, B. J. Location and function of voltage-sensitive conductances in retinal rods of the salamander, *Ambystoma tigrinum*. *J. Physiol* **354**, 203-223 (1984).
- Biel, M., Schneider, A. & Wahl, C. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**, 206-212 (2002).
- BoSmith, R. E., Briggs, I. & Sturgess, N. C. Inhibitory actions of ZENECA ZD7288 on whole-cell hyperpolarization activated inward current (I_h) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. *Br. J. Pharmacol.* **110**, 343-349 (1993).
- Boycott B. B. & Dowling J. E. Organization of the primate retina: light microscopy. *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* 109-194 (1969).
- Boycott, B. B. & Wässle, H. Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina. *Eur. J. Neurosci.* **3**, 1069-1088 (1991).
- Boycott, B. B. & Wässle, H. The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J. Physiol* **240**, 397-419 (1974).
- Brown, H. & DiFrancesco, D. Voltage-clamp investigations of membrane currents underlying pace-maker activity in rabbit sino-atrial node. *J. Physiol* **308**, 331-351 (1980).
- Brown, H. F., DiFrancesco, D. & Noble, S. J. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* **280**, 235-236 (1979).
- Carter-Dawson, L. D. & LaVail, M. M. Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *J. Comp Neurol.* **188**, 245-262 (1979).

- Cathala, L. & Paupardin-Tritsch, D. Neurotensin inhibition of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) in the rat substantia nigra pars compacta implicates the protein kinase C pathway. *J. Physiol* **503**, 87-97 (1997).
- Chen, C. & Okayama, H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell Biol.* **7**, 2745-2752 (1987).
- Chen, S., Wang, J. & Siegelbaum, S. A. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J. Gen. Physiol.* **117**, 491-504 (2001).
- Cohen, E. & Sterling, P. Demonstration of cell types among cone bipolar neurons of cat retina. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **330**, 305-321 (1990).
- Connaughton, V. P. & Maguire, G. Differential expression of voltage-gated K(+) and Ca(2+) currents in bipolar cells in the zebrafish retinal slice. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 1350-1362 (1998).
- Dacheux, R. F. & Raviola, E. The rod pathway in the rabbit retina: a depolarizing bipolar and amacrine cell. *J. Neurosci.* **6**, 331-345 (1986).
- De la Villa, P. Vaquero, C. F. & Kaneko, A. Two types of calcium currents of the mouse bipolar cells recorded in the retinal slice preparation. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 317-323 (1998).
- Demontis, G. C., Longoni, B., Barcaro, U. & Cervetto, L. Properties and functional roles of hyperpolarization-gated currents in guinea-pig retinal rods. *J. Physiol.* **515**, 813-828 (1999).
- Demontis, G. C., Moroni, A., Gravante, B., Altomare, C., Longoni, B., Cervetto, L., DiFrancesco, D. Functional characterisation and subcellular localisation of HCN1 channels in rabbit retinal rod photoreceptors. *J. Physiol.* **542**, 89-97 (2002).
- DiFrancesco, D. A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J. Physiol* **314**, 359-376 (1981).
- DiFrancesco, D. A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J. Physiol* **314**, 377-393 (1981).
- DiFrancesco, D. Block and activation of the pace-maker channel in calf purkinje fibres: effects of potassium, caesium and rubidium. *J. Physiol* **329**, 485-507 (1982).
- Dowling J. E. The retina: An approachable part of the brain. *The Belknap Press of Harvard University, Cambridge* 282 pp (1987).
- Edman, A., Gestrelus, S. & Grampp, W. Current activation by membrane hyperpolarization in the slowly adapting lobster stretch receptor neurone. *J. Physiol* **384**, 671-690 (1987).
- Euler, T. & Wässle, H. Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J. Comp Neurol.* **361**, 461-478 (1995).
- Fain, G. L., Quandt, F. N., Bastian, B. L. & Gerschenfeld, H. M. Contribution of a caesium-sensitive conductance increase to the rod photoresponse. *Nature* **272**, 467-469 (1978).

- Famiglietti, E. V., Jr. Functional architecture of cone bipolar cells in mammalian retina. *Vision Res.* **21**, 1559-1563 (1981).
- Famiglietti E. V. The ganglion cells of the rabbit retina: shape, stratification of dendritic trees, and relationship to cholinergic amacrine cells (Abstract). *Invest. Ophthalmol. Visual Sci. Suppl.* **28**, 279 (1987).
- Famiglietti, E. V., Jr. & Kolb, H. A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Res.* **84**, 293-300 (1975).
- Felix, R., Sandoval ,A., Sanchez ,D., Gomora,J.C., De la Vega-Beltran J. L., Trevino,C. L., Darszon, A. ZD7288 inhibits low-threshold Ca(2+) channel activity and regulates sperm function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 187-192 (2003).
- Gargini, C., Demontis, G. C., Bisti, S. & Cervetto, L. Effects of blocking the hyperpolarization-activated current (I_h) on the cat electroretinogram. *Vision Res.* **39**, 1767-1774 (1999).
- Gargini, C., Demontis, G. C., Bisti, S. & Cervetto, L. Temporal fidelity in the visual system. *Arch. Ital. Biol.* **137**, 299-309 (1999).
- Gauss, R., Seifert, R. & Kaupp, U. B. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* **393**, 583-587 (1998).
- Ghosh, K. K., Bujan, S., Haverkamp, S., Feigenspan, A. & Wässle, H. Types of bipolar cells in the mouse retina. *J. Comp Neurol.* **469**, 70-82 (2004).
- Gisselmann, G., Gamerschlag, B., Sonnenfeld, R., Marx, T., Neuhaus, E. M., Wetzels, C. H., Hatt, H. Variants of the *Drosophila melanogaster* I_h-channel are generated by different splicing. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 505-514 (2005).
- Gravante, B. *et al.* Interaction of the pacemaker channel HCN1 with filamin A. *J. Biol. Chem.*, (2004).
- Green, D. G. & Kapousta-Bruneau, N. V. A dissection of the electroretinogram from the isolated rat retina with microelectrodes and drugs. *Vis. Neurosci.* **16**, 727-741 (1999).
- Green, D. G. & Kapousta-Bruneau, N. V. Electrophysiological properties of a new isolated rat retina preparation. *Vision Res.* **39**, 2165-2177 (1999).
- Greferath, U., Grünert, U. & Wässle, H. Rod bipolar cells in the mammalian retina show protein kinase C-like immunoreactivity. *J. Comp Neurol.* **301**, 433-442 (1990).
- Hack, I., Peichl, L. & Brandstätter, J. H. An alternative pathway for rod signals in the rodent retina: rod photoreceptors, cone bipolar cells, and the localization of glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 14130-14135 (1999).
- Haeseleer, F., Sokal, I., Verlinde, C. L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Pronin, A. N., Benovic, J. L., Fariss, R. N., Palczewski, K. Five members of a novel Ca(2+)-binding protein (CABP) subfamily with similarity to calmodulin. *J. Biol. Chem.* **275**, 1247-1260 (2000).

- Halliwel, J. V. & Adams, P. R. Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.* **250**, 71-92 (1982).
- Harris, N. C. & Constanti, A. Mechanism of block by ZD 7288 of the hyperpolarization-activated inward rectifying current in guinea pig substantia nigra neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* **74**, 2366-2378 (1995).
- Harris, N. C., Libri, V. & Constanti, A. Selective blockade of the hyperpolarization-activated cationic current (I_h) in guinea pig substantia nigra pars compacta neurones by a novel bradycardic agent, Zeneca ZM 227189. *Neurosci. Lett.* **176**, 221-225 (1994).
- Hartveit, E. Functional organization of cone bipolar cells in the rat retina. *J. Neurophysiol.* **77**, 1716-1730 (1997).
- Haverkamp, S., Ghosh, K. K., Hirano, A. A. & Wässle, H. Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina. *J. Comp Neurol.* **455**, 463-476 (2003).
- Haverkamp, S. & Wässle, H. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J. Comp Neurol.* **424**, 1-23 (2000).
- Haverkamp, S., Wässle, H., Duebel, J., Kuner, T., Augustine, G. J., Feng, G., Euler, T. The primordial, blue-cone color system of the mouse retina. *J. Neurosci.* **25**, 5438-5445 (2005).
- Hayden, S. A., Mills, J. W. & Masland, R. M. Acetylcholine synthesis by displaced amacrine cells. *Science* **210**, 435-437 (1980).
- Herr, S., Klug, K., Sterling, P. & Schein, S. Inner S-cone bipolar cells provide all of the central elements for S cones in macaque retina. *J. Comp Neurol.* **457**, 185-201 (2003).
- Hestrin, S. The properties and function of inward rectification in rod photoreceptors of the tiger salamander. *J. Physiol* **390**, 319-333 (1987).
- Ishii, T. M., Takano, M. & Ohmori, H. Determinants of activation kinetics in mammalian hyperpolarization-activated cation channels. *J Physiol* 2001. Nov. 15. ;537. (Pt. 1.):93. -100. **537**, 93-100.
- Ishii, T. M., Takano, M., Xie, L. H., Noma, A. & Ohmori, H. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J. Biol. Chem.* **274**, 12835-12839 (1999).
- Ivanova, E. N., Systematic analysis of Hyperpolarization-activated and Cyclic Nucleotide-gated (HCN) channels in photoreceptors and bipolar cells of the rat retina. *Diss., Köln, Univ., Jülbericht Jül-4102* (2003).
- Jeon, C. J., Strettoi, E. & Masland, R. H. The major cell populations of the mouse retina. *J. Neurosci.* **18**, 8936-8946 (1998).
- Kaneko, A., Pinto, L. H. & Tachibana, M. Transient calcium current of retinal bipolar cells of the mouse. *J. Physiol* **410**, 613-629 (1989).
- Kaneko, A. & Tachibana, M. A voltage-clamp analysis of membrane currents in solitary bipolar cells dissociated from *Carassius auratus*. *J. Physiol* **358**, 131-152 (1985).

- Kaupp, U. B. & Seifert, R. Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu. Rev. Physiol* **63**, 235-257 (2001).
- Kim, I. B., Lee, E. J., Kang, T. H., Chung, J. W. & Chun, M. H. Morphological analysis of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel 1 (HCN1) immunoreactive bipolar cells in the rabbit retina. *J. Comp Neurol*. **467**, 389-402 (2003).
- Knapp, A. G. & Schiller, P. H. The contribution of on-bipolar cells to the electroretinogram of rabbits and monkeys. A study using 2-amino-4-phosphonobutyrate (APB). *Vision Res.* **24**, 1841-1846 (1984).
- Kolb, H. & Famiglietti, E. V. Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of cat retina. *Science* **186**, 47-49 (1974).
- Kolb, H. & Nelson, R. Rod pathways in the retina of the cat. *Vision Res.* **23**, 301-312 (1983).
- Kolb, H., Nelson, R. & Mariani, A. Amacrine cells, bipolar cells and ganglion cells of the cat retina: a Golgi study. *Vision Res.* **21**, 1081-1114 (1981).
- Kouyama, N. & Marshak, D. W. Bipolar cells specific for blue cones in the macaque retina. *J. Neurosci.* **12**, 1233-1252 (1992).
- Krieger, J., Strobel, J., Vogl, A., Hanke, W. & Breer, H. Identification of a cyclic nucleotide- and voltage-activated ion channel from insect antennae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**, 255-267 (1999).
- Kuner, T. & Augustine, G. J. A genetically encoded ratiometric indicator for chloride: capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **27**, 447-459 (2000).
- Kuner T., Loo L. S., Schäfer T., Schleich W., Augustine G. J., Feng G. Developmental profile of intracellular chloride in cortical neurons determined in Clomeleon indicator mouse lines. *Soc Neurosci Abstr* 28: 08.9 (2002).
- Lasater, E. M. Membrane currents of retinal bipolar cells in culture. *J. Neurophysiol.* **60**, 1460-1480 (1988).
- Ludwig, A., Budde, T., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C., Holthoff, K., Langebartels, A., Wotjak, C., Munsch, T., Zong, X., Feil, S., Feil, R., Lancel, M., Chien, K. R., Konnerth, A., Pape, H. C., Biel, M., Hofmann, F. Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J.* **22**, 216-224 (2003).
- Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F. & Biel, M. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* **393**, 587-591 (1998).
- Ludwig, A.; Zong, X.; Stieber, J.; Hullin, R.; Hofmann, F.; Biel, M. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J.* **18**, 2323-2329 (1999).
- Lyubarsky, A. L., Daniele, L. L. & Pugh, E. N., Jr. From candelas to photoisomerizations in the mouse eye by rhodopsin bleaching in situ and the light-rearing dependence of the major components of the mouse ERG. *Vision Res.* **44**, 3235-3251 (2004).

- Ma, Y. P., Cui, J., Hu, H. J. & Pan, Z. H. Mammalian Retinal Bipolar Cells Express Inwardly Rectifying K(+) Currents (IKir) With a Different Distribution Than That of Ih. *J. Neurophysiol.* **90**, 3479-3489 (2003).
- Maccaferri, G., Mangoni, M., Lazzari, A. & DiFrancesco, D. Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* **69**, 2129-2136 (1993).
- Maccarone, R., Izzizzari, G., Gargini, C., Cervetto, L. & Bisti, S. The impact of organic inhibitors of the hyperpolarization activated current (Ih) on the electroretinogram (ERG) of rodents. *Arch. Ital. Biol.* **142**, 95-103 (2004).
- Macri, V., Proenza, C., Agranovich, E., Angoli, D. & Accili, E. A. Separable gating mechanisms in a Mammalian pacemaker channel. *J. Biol. Chem.* **277**, 35939-35946 (2002).
- Maricq, A. V. & Korenbrot, J. I. Inward rectification in the inner segment of single retinal cone photoreceptors. *J. Neurophysiol.* **64**, 1917-1928 (1990).
- Marx, T., Gisselmann, G., Stortkuhl, K. F., Hovemann, B. T. & Hatt, H. Molecular cloning of a putative voltage- and cyclic nucleotide-gated ion channel present in the antennae and eyes of *Drosophila melanogaster*. *Invert. Neurosci.* **4**, 55-63 (1999).
- Masland, R. H. Amacrine cells. *Trends Neurosci.* **11**, 405-410 (1988).
- Masland, R. H. The fundamental plan of the retina. *Nat. Neurosci.* **4**, 877-886 (2001).
- Masland, R. H. & Mills, J. W. Autoradiographic identification of acetylcholine in the rabbit retina. *J. Cell Biol.* **83**, 159-178 (1979).
- McGuire, B. A., Stevens, J. K. & Sterling, P. Microcircuitry of bipolar cells in cat retina. *J. Neurosci.* **4**, 2920-2938 (1984).
- Moosmang, S., Stieber, J., Zong, X., Biel, M., Hofmann, F., Ludwig, A. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1646-1652 (2001).
- Moroni, A.; Barbuti, A.; Altomare, C.; Viscomi, C.; Morgan, J.; Baruscotti, M.; DiFrancesco, D. Kinetic and ionic properties of the human HCN2 pacemaker channel. *Pflügers Arch.* **439**, 618-626 (2000).
- Müller, F. & Kaupp, U. B. Signaltransduktion in Sehzellen. *Naturwissenschaften* **85**, 49-61 (1998).
- Müller, F.; Scholten, A.; Ivanova, E.; Haverkamp, S.; Kremmer, E.; Kaupp, U. B. HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals. *Eur. J. Neurosci.* **17**, 2084-2096 (2003).
- Müller, F., Wässle, H. & Voigt, T. Pharmacological modulation of the rod pathway in the cat retina. *J. Neurophysiol.* **59**, 1657-1672 (1988).
- Nawy, S. & Jahr, C. E. cGMP-gated conductance in retinal bipolar cells is suppressed by the photoreceptor transmitter. *Neuron* **7**, 677-683 (1991).

- Neher, E. Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol.* **207**, 123-131 (1992).
- Nelson, R. Cat cones have rod input: a comparison of the response properties of cones and horizontal cell bodies in the retina of the cat. *J. Comp Neurol.* **172**, 109-135 (1977).
- Nolan, M. F., Malleret, G., Lee, K. H., Gibbs, E., Dudman, J. T., Santoro, B., Yin, D., Thompson, R. F., Siegelbaum, S. A., Kandel, E. R., Morozov, A. The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell* **115**, 551-564 (2003).
- O'Brien, B. J., Isayama, T., Richardson, R. & Berson, D. M. Intrinsic physiological properties of cat retinal ganglion cells. *J. Physiol* **538**, 787-802 (2002).
- Okada, T., Horiguchi, H. & Tachibana, M. Ca(2+)-dependent Cl⁻ current at the presynaptic terminals of goldfish retinal bipolar cells. *Neurosci. Res.* **23**, 297-303 (1995).
- Pape, H. C. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu. Rev. Physiol* **58**, 299-327 (1996).
- Peichl, L. Alpha and delta ganglion cells in the rat retina. *J. Comp Neurol.* **286**, 120-139 (1989).
- Peichl L. Prinzipien der Bildverarbeitung in der Retina. *Optometrie* 3/90, 3-12 (1990).
- Peichl, L. & Gonzalez-Soriano, J. Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Vis. Neurosci.* **11**, 501-517 (1994).
- Pourcho, R. G. & Goebel, D. J. A combined Golgi and autoradiographic study of (3H)glycine-accumulating amacrine cells in the cat retina. *J. Comp Neurol.* **233**, 473-480 (1985).
- Proenza, C., Angoli, D., Agranovich, E., Macri, V. & Accili, E. A. Pacemaker channels produce an instantaneous current. *J. Biol. Chem.* **277**, 5101-5109 (2002).
- Pugh, Jr., E. N., Falsini, B. and Lyubarsky, A. L. The origin of the major rod- and cone-driven components of the rodent electroretinogram, and the effect of age and light-rearing history on the magnitudes of these components. In T.P. Williams and A.B. Thistle (Eds.), *Photostasis and Related Topics*, 93-128. New York: Plenum (1998).
- Santoro, B., Chen, S., Luthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G. P., Tibbs, G. R., Siegelbaum, S. A. Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J. Neurosci.* **20**, 5264-5275.
- Santoro, B., Grant, S. G., Bartsch, D. & Kandel, E. R. Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 14815-14820 (1997).
- Santoro, B.; Liu, D.T.; Yao, H.; Bartsch, D.; Kandel, E.R.; Siegelbaum, S.A.; Tibbs, G.R. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* **93**, 717-729 (1998).

- Satoh, T. O. & Yamada, M. A bradycardiac agent ZD7288 blocks the hyperpolarization-activated current (I_h) in retinal rod photoreceptors. *Neuropharmacology* **39**, 1284-1291 (2000).
- Schnapf J. L. & Baylor D. A. How photoreceptor cells respond to light. *Sci. Am.* **256**, 32-39 (1978).
- Schneeweis, D. M. & Schnapf, J. L. Photovoltage of rods and cones in the macaque retina. *Science* **268**, 1053-1056 (1995).
- Seifert, R., Scholten, A., Gauss, R., Mincheva, A., Lichter, P., Kaupp, U. B. Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 9391-9396 (1999).
- Shi, W., Wymore, R., Yu, H., Wu, J., Wymore, R. T., Pan, Z., Robinson, R. B., Dixon, J. E., McKinnon, D., Cohen, I. S. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ. Res.* **85**, e1-e6 (1999).
- Slaughter, M. M. & Miller, R. F. 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. *Science* **211**, 182-185 (1981).
- Smith, R. G., Freed, M. A. & Sterling, P. Microcircuitry of the dark-adapted cat retina: functional architecture of the rod-cone network. *J. Neurosci.* **6**, 3505-3517 (1986).
- Soucy, E., Wang, Y., Nirenberg, S., Nathans, J. & Meister, M. A novel signaling pathway from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian retina. *Neuron* **21**, 481-493 (1998).
- Steinberg R. H., Frishman L. J., Sieving P. A. Negative components of the electroretinogram from proximal retina and photoreceptor. *Progress in Retinal Research* **10**, 121-160 (1991).
- Stieber, J., Herrmann, S., Feil, S., Loster, J., Feil, R., Biel, M., Hofmann, F., Ludwig, A. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15235-15240 (2003).
- Sun W., Li N., He S. Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* **451**, 115-126 (2002).
- Tabata, T. & Ishida, A. T. Transient and sustained depolarization of retinal ganglion cells by I_h. *J. Neurophysiol.* **75**, 1932-1943 (1996).
- Tsukamoto, Y., Morigiwa, K., Ueda, M. & Sterling, P. Microcircuits for night vision in mouse retina. *J. Neurosci.* **21**, 8616-8623 (2001).
- Ulenz, C. & Tytgat, J. Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J. Biol. Chem.* **276**, 6069-6072 (2001).
- Ulenz, C. & Tytgat, J. Gi- and Gs-coupled receptors up-regulate the cAMP cascade to modulate HCN2, but not HCN1 pacemaker channels. *Pflügers Arch.* **442**, 928-942 (2001).
- Vaccari, T., Moroni, A., Rocchi, M., Gorza, L., Bianchi, M. E., Beltrame, M., DiFrancesco, D. The human gene coding for HCN2, a pacemaker channel of the heart. *Biochim. Biophys. Acta* **1446**, 419-425 (1999).

- Vaney D. I. The mosaic of amacrine cells in mammalian retina. *Progress in Retinal Research* **9**, 49-100 (1990).
- Voigt, T. Cholinergic amacrine cells in the rat retina. *J. Comp Neurol.* **248**, 19-35 (1986).
- Volgyi, B., Deans, M. R., Paul, D. L. & Bloomfield, S. A. Convergence and segregation of the multiple rod pathways in mammalian retina. *J. Neurosci.* **24**, 11182-11192 (2004).
- Warmke, J. W. & Ganetzky, B. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 3438-3442 (1994).
- Wässle, H. & Boycott, B. B. Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev.* **71**, 447-480 (1991).
- Wässle, H., Grunert, U., Martin, P. R. & Boycott, B. B. Immunocytochemical characterization and spatial distribution of midget bipolar cells in the macaque monkey retina. *Vision Res.* **34**, 561-579 (1994).
- Wässle, H. & Riemann, H. J. The mosaic of nerve cells in the mammalian retina. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **200**, 441-461 (1978).
- Wässle, H., Yamashita, M., Greferath, U., Grunert, U. & Müller, F. The rod bipolar cell of the mammalian retina. *Vis. Neurosci.* **7**, 99-112 (1991).
- Wollmuth, L. P. Mechanism of Ba(2+) block of M-like K channels of rod photoreceptors of tiger salamanders. *J. Gen. Physiol.* **103**, 45-66 (1994).
- Wollmuth, L. P. & Hille, B. Ionic selectivity of Ih channels of rod photoreceptors in tiger salamanders. *J. Gen. Physiol.* **100**, 749-765 (1992).
- Wong, G. T., Ruiz-Avila, L. & Margolskee, R. F. Directing gene expression to gustducin-positive taste receptor cells. *J. Neurosci.* **19**, 5802-5809 (1999).
- Wyszecki, G. and Stiles, W. S. Color Science: Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae (2nd Edition.), *Wiley* (1982).
- Yamashita, M. & Wässle, H. Responses of rod bipolar cells isolated from the rat retina to the glutamate agonist 2-amino-4-phosphonobutyric acid (APB). *J. Neurosci.* **11**, 2372-2382 (1991).
- Yanagihara, K. & Irisawa, H. Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch.* **385**, 11-19 (1980).
- Yu, H., Chang, F. & Cohen, I. S. Pacemaker current i(f) in adult canine cardiac ventricular myocytes. *J. Physiol* **485**, 469-483 (1995).
- Yu, H., Wu, J., Potapova, I., Wymore, R. T., Holmes, B., Zuckerman, J., Pan, Z., Wang, H., Shi, W., Robinson, R. B., El-Maghrabi, M. R., Benjamin, W., Dixon, J., McKinnon, D., Cohen, I. S., Wymore, R. MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ. Res.* **88**, E84-E87 (2001).

Zhang Z., Tang Y., Zhu M. X. Increased inwardly rectifying potassium currents in HEK-293 cells expressing murine transient receptor potential 4. *Biochem.J.* **354**, 717-25 (2001).

Zhu G., Zhang Y., Xu H., Jiang C. Identification of endogenous outward currents in the human embryonic kidney (HEK 293) cell line. *J.Neurosci.Methods* **81**, 73-83 (1998).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1 (Forschungszentrum Jülich) angefertigt. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere gilt mein Dank:

- Herrn Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit an seinem Institut diese Arbeit anfertigen zu dürfen.
- Herrn Dr. Frank Müller für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Sein Diskussionsbereitschaft und sein persönliches Engagement haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Weiterhin danke ich ihm für die geduldige Unterstützung bei der Niederschrift dieser Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. Ansgar Büschges für die freundliche Unterstützung und die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.
- Frau Anja Mataruga und Herrn Gabriel Knopp für die anregenden Diskussionen und die große Hilfsbereitschaft auf vielen Gebieten.
- Herrn Christoph Aretzweiler für die Unterstützung bei den immunhistochemischen Arbeiten.
- Frau Mechthilde Bruns für die Unterstützung bei den zellbiologischen Arbeiten.
- Frau Anita Eckert, sowie Herrn Rudi Esser und Herrn Daniel Portz dafür, dass sie immer schnell und unkompliziert halfen.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich, Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – auch nicht in Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. U.B. Kaupp betreut worden.

Köln, den 25.8.2005.....

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4202
Januar 2006
ISSN 0944-2952