



Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1

***Untersuchungen zur Funktion von
HCN1-Kanälen in der Signalverarbeitung
der Retina***

Gabriel Knop

***Untersuchungen zur Funktion von
HCN1-Kanälen in der Signalverarbeitung
der Retina***

Gabriel Knop

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4201

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1 Jül-4201

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

Kurzzusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, Erkenntnisse über die Funktion von HCN1-Kanälen (hyperpolarisation-activated and cyclic nucleotide-gated) in der retinalen Signalverarbeitung zu gewinnen. Dazu stand eine transgene Mauslinie zur Verfügung, deren HCN1-Kanäle genetisch ausgeschaltet worden waren („HCN1-Knock-out“, HCN1 $-/-$).

Mit immunhistochemischen Methoden wurde das Expressionsmuster von HCN-Kanälen in Retinae von Knock-out- und Wildtyp-Tieren untersucht. Die Analyse ergab, dass HCN1 die dominierende Isoform in der Retina ist und besonders in Photorezeptoren exprimiert wird. Die anderen Isoformen HCN2-4 sind schwächer exprimiert. Es wurden keine Unterschiede im Expressionsmuster und Expressionsniveau dieser drei Isoformen zwischen Retinae von HCN1-Knock-out- und Wildtyp-Mäusen gefunden.

Retinale Lichtantworten wurden mit zwei Methoden abgeleitet und zwischen Wildtyp und Knock-out verglichen. In einem systemischen Ansatz wurden Elektroretinogramme (ERGs) abgeleitet. Bei dem Vergleich zwischen Wildtyp und Knock-out wurde besonderes Augenmerk auf die Länge der B-Welle und auf die Frequenzübertragung bei Blitzfolgen gelegt. Sowohl unter skotopischen (Stäbchen-ERG) als auch unter photopischen (Zapfen-ERG) Bedingungen wurden bei Reizen geringer Intensität kaum Veränderungen der B-Welle bzw. der Frequenzübertragung im ERG des Knock-out gefunden. Erst bei hohen Lichtintensitäten war die B-Welle deutlich verlängert und eine dramatische Verschlechterung der Frequenzübertragung wurde beobachtet.

In weiteren Untersuchungen wurden retinale Ganglienzellen *in vitro* abgeleitet. Erste Messungen zeigten, dass die Defizite, die im ERG des HCN1-Knock-outs beobachtet wurden, auch in den Ganglienzellen zum tragen kamen. Sowohl im ON- als auch im OFF-Kanal der retinalen Signalverarbeitung scheint die Frequenzübertragung verschlechtert zu sein.

Vertebratenphotorezeptoren zeigen eine hyperpolarisierende Lichtantwort. Im Wildtyp werden HCN1-Kanäle während der Hyperpolarisation aktiviert und wirken durch eine Depolarisation einer Sättigung der Lichtantwort entgegen. Im HCN1-Knock-out dagegen sättigen vermutlich die Lichtantworten. Diese Sättigung könnte zu einer Blockade der Weiterleitung von Lichtsignalen führen.

Diese Ergebnisse liefern erste Hinweise auf eine bisher nicht beschriebene Funktion des HCN1-Kanals in der retinalen Signalverarbeitung.

Abstract

The aim of the current study was to elucidate the function of HCN1-channels (hyperpolarisation-activated and cyclic nucleotide-gated) in retinal information processing. A transgenic mouse strain was employed, in which the gene encoding HCN1 had been knocked-out by targeted deletion (HCN1-knock-out).

The expression of HCN-channels was studied by immunocytochemistry in retinae of both HCN1-knock-out-mice and wildtype-mice. Analysis revealed that HCN1 is the predominant isoform in wildtype-retinae. Isoforms HCN-2, HCN3 and HCN4 are expressed to a lesser extend. No noticeable differences are observed in the expression patterns and level of expression for these three isoforms between retinae of wildtype-mice and knock-out-mice. Retinal light responses recorded by two different methods were compared between wildtype-mice and HCN1-knock-out-mice. Electroretinograms (ERGs) were recorded from anesthetized mice. The analysis focused on the length of the b-wave and on the frequency response during repetitive stimulation. In both scotopic (rod ERG) and photopic (cone ERG) conditions at low intensities neither the duration of the b-wave nor the frequency response of the HCN1-knock-out were significantly affected. At higher intensities, a lengthening of the b-wave and a pronounced deficit in the frequency response was observed in the HCN1-knock-out.

In a second approach, light responses of retinal ganglion cells were recorded *in vitro* in the whole-cell-mode of the patch clamp-technique. First results show that the deficit observed in the ERG's frequency response is also present on the level of individual ganglion cells. Frequency transmission is reduced in both ON- and OFF-ganglion cells of the HCN1-knock-out-mouse.

Vertebrate photoreceptors show a hyperpolarising light response. In wildtype, HCN-channels become activated during hyperpolarisation. The depolarisation induced by HCN-channel activation counteracts the saturation of the photoreceptor light response in bright light. In contrast, in the knock-out light responses in the rod-system might saturate. This saturation might block signal transmission in both ON- and OFF-pathway. These results point towards a new function for HCN1-channels in retinal signal processing.

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	III
1. EINLEITUNG	1
1.1. Die Retina	1
1.1.1. Grundaufbau und Zellklassen	1
1.1.2. Informationswege in der Retina	2
1.1.2.1. Vertikale Informationswege	2
1.1.2.2. Horizontale Informationswege	5
1.2. HCN-Kanäle	6
1.2.1. Funktionelle Eigenschaften des HCN-Kanals	7
1.2.2. Die physiologische Rolle der HCN-Kanäle	8
1.2.3. HCN-Kanäle in der Retina	9
1.3. Fragestellung der Arbeit	10
 2. MATERIAL UND METHODEN	 11
2.1. Versuchstiere	11
2.2. Messungen von Lichtantworten retinaler Ganglienzellen	12
2.2.1. Präparation	12
2.2.2. Messkammer	13
2.2.3. Perfusion	13
2.2.4. Elektrophysiologische Methode	14
2.2.4.1. Patch-Elektroden	14
2.2.4.2. Ableittechnik und experimentelles Vorgehen	15
2.2.4.3. Das „Space-Clamp“-Problem	16
2.2.4.4. Datenerfassung und Datenverarbeitung	17
2.2.5. Optischer Messaufbau und Stimulationsapparatur	18
2.2.5.1. IR-Kontrastoptik	18
2.2.5.2. Projektion der Lichtreize	19
2.2.5.3. Kalibrierung der Stimulationsapparatur	19
2.2.5.4. Radiometrische und photometrische Größen	21
2.3. Immunhistochemische Methoden	25
2.3.1. Präparation	25
2.3.1.1. Fixierung	25
2.3.1.2. Herstellung der Kryostatschnitte	25
2.3.2. Antikörperfärbungen	25
2.3.3. Vertikalschnitte von charakterisierten Ganglienzellen	27
2.3.4. Konfokales Scannen / Bildbearbeitung	28
2.4. Messungen cornealer Elektroretinogramme (ERG)	29
2.4.1. Adaptation und Narkose	29
2.4.2. Messaufbau	29
2.4.3. Die Stimulationseinheit	30
2.4.4. Datenaufzeichnung	32
2.4.5. Grundlagen des cornealen Elektroretinogramms	32
2.4.5.1. Die A-Welle	32
2.4.5.2. Die B-Welle	33

2.4.5.3.	Oszillatorische Potentiale	33
2.5.	Lösungen	35
2.6.	Software	36
3.	ERGEBNISSE	37
3.1.	Charakterisierung der HCN-Expression in Knock-out und Wildtyp	37
3.1.1.	Immunhistochemie für HCN1	38
3.1.2.	Immunhistochemie für HCN2	40
3.1.3.	Immunhistochemie für HCN3	41
3.1.4.	Immunhistochemie für HCN4	41
3.2.	Messung cornealer ERGs in HCN1-Knock-out und Wildtyp	43
3.2.1.	Das skotopische ERG	44
3.2.1.1.	Die skotopische Intensitätsreihe	44
3.2.1.2.	Die skotopische Frequenzreihe	48
3.2.2.	Das photopische ERG	51
3.2.2.1.	Die photopische Intensitätsreihe	51
3.2.2.2.	Die photopische Frequenzreihe	53
3.2.3.	Messungen im Übergangsbereich	55
3.2.3.1.	Die skotopische Frequenzreihe bei hohen Reizintensitäten	55
3.2.3.2.	Die 6-Hz-Intensitätsreihe	58
3.3.	Untersuchungen an retinalen Ganglienzellen	62
3.3.1.	Experimentelle Voraussetzungen	62
3.3.1.1.	Scan-Mapping	63
3.3.1.2.	Charakterisierung einfacher rezeptiver Felder	66
3.3.1.3.	Charakterisierung komplexer rezeptiver Felder	70
3.3.2.	Untersuchung der Frequenzübertragung in Ganglienzellen	75
3.3.2.1.	Untersuchung der Frequenzübertragung bei skotopischer Intensität	79
3.3.2.2.	Untersuchungen der Frequenzübertragung im mesopischen Bereich	84
4.	DISKUSSION	91
4.1.	Etablierung der Messtechnik	91
4.2.	Lokalisation von HCN1 in der Mausretina	93
4.2.1.	Der HCN1-Knock-out ist ein geeignetes Modellsystem	93
4.2.2.	HCN1 ist die dominierende Isoform in der Retina	93
4.2.3.	Wo haben HCN1-Kanäle die größte Bedeutung?	93
4.3.	Die Wirkung von HCN1 im Photorezeptor	94
4.3.1.	Der HCN1-Knock-out zeigt kaum Defizite im skotopischen Bereich	95
4.3.2.	Untersuchungen im photopischen Bereich	96
4.3.3.	Frequenzuntersuchung in „Übergangssituationen“	96
4.3.4.	Veränderungen des retinalen Netzwerks bei der Helladaptation	97
4.4.	Modell zur Funktion des HCN1-Kanals im Übergangsbereich	98
4.5.	Möglichkeiten zum Überprüfen des Modells – ein Ausblick	99
5.	LITERATUR	103

Abkürzungen

°C	Temperatur in Grad Celsius
+/+	wildtyp
+/-	heterozygot
-/-	knockout
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AC	Amakrin Zellen (<u>A</u> macrine <u>C</u> ell)
bzw.	beziehungsweise
ChAT	<u>C</u> holine <u>a</u> cetyltransferase
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cy3, Cy5	Carbocyanin Derivate
DIC	<u>D</u> ifferential <u>I</u> nterference <u>C</u> ontrast
E _N	Nernst-Potential
EGTA	Ethylen-bis-(Oxyethylen-Nitrilo)-Tetraessigsäure (<u>E</u> thylene glycol-bis(β -aminoethyl ether) N,N,N',N'- <u>t</u> etra <u>a</u> cetic acid)
ERG	<u>E</u> lektro- <u>R</u> etinogramm
et al.	<i>et alii</i> , und Andere
Fa.	Firma
g	Gramm
GABA	γ -Amino-Buttersäure (γ - <u>a</u> mino <u>b</u> utyric <u>a</u> cid)
GCL	Ganglienzellschicht (<u>G</u> anglion <u>C</u> ell <u>L</u> ayer)
GTP	Guanosine 5'-Triphosphat
G Ω	10 ⁹ Ohm
h	Stunde(n)
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
HEPES	4-(2- <u>H</u> ydroxyethyl)-1- <u>P</u> iperazinethansulfonsäure
Hz	Hertz
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> nnere <u>N</u> uclear <u>L</u> ayer)
IPL	innere plexiforme Schicht (<u>I</u> nnere <u>P</u> lexiform <u>L</u> ayer)
IR	infrarot
IS	Innensegmente der Photorezeptoren (<u>I</u> nnere <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
min	Minute

IV

ml	10^{-3} Liter
μ l	10^{-6} Liter
μ m	10^{-6} Meter
nm	10^{-9} Meter
mV	10^{-3} Volt
M Ω	10^6 Ohm
n	Zahl der Experimente
N	Zahl der Versuchstiere
NFL	Nervenfaserschicht (<u>N</u> erve <u>F</u> ibre <u>L</u> ayer)
N-Terminus	Amino-Terminus
OFF-Zelle	Zellen die bei Belichtung hyperpolarisieren
ON-Zelle	Zellen die bei Belichtung depolarisieren
ONL	äußere Körnerzellschicht (<u>O</u> uter <u>N</u> uclear <u>L</u> ayer)
OPL	äußere plexiforme Schicht (<u>O</u> uter <u>P</u> lexiform <u>L</u> ayer)
OS	Außensegmente der Photorezeptoren (<u>O</u> uter <u>S</u> egment)
PA	<u>P</u> araformaldehyd
pA	10^{-12} Ampere
PB	Phosphat-Puffer (<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffer)
PCR	Polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung (in Mol pro Liter)
R_i	Eingangswiderstand
R_s	Serienwiderstand
RT	<u>R</u> aum- <u>T</u> emperatur ($\sim +22^\circ\text{C}$)
s	Sekunde
sog.	so genannte
U	Spannung
V	Volt
V_m	Membranspannung; im voltage-clamp Modus gleich der Kommandospannung

1. Einleitung

1.1. Die Retina

1.1.1. Grundaufbau und Zellklassen

Im Wirbeltierauge bildet sich die visuelle Umgebung über den optischen Apparat auf dem Augenhintergrund ab. Der Augenhintergrund wird durch ein etwa 200 µm dickes Nervengewebe, die Retina ausgekleidet. Die Retina ist ein Teil des Gehirns. Sie entwickelt sich während der Embryonalentwicklung als Ausstülpung des Zwischenhirns. Sie ist sehr klar geschichtet und enthält sechs neuronale Hauptzellklassen (**Abb. 1**). Die Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) liegen auf der lichtabgewandten, äußeren Seite der Retina. Ihre lichtempfindlichen Außensegmente bilden die äußerste Schicht. Nach innen schließt sich die Innensegmentenschicht an. Die äußere nukleäre Schicht (engl.: outer nuclear layer, ONL) wird von den Somata der Photorezeptoren gebildet. Die Zellkörper der Horizontalzellen, Bipolarzellen und Amakrinzellen bilden die innere nukleäre Schicht (innner nuclear layer, INL), die der Ganglienzellen und „versetzten“ Amakrinzellen (engl.: „displaced“ amacrine cells) die Ganglienzellschicht (ganglion cell layer, GCL). In der äußeren plexiformen Schicht (engl.: outer plexiform layer, OPL) bilden die Photorezeptoren synaptische Kontakte mit Horizontalzellen und Bipolarzellen. Synapsen zwischen Bipolarzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen befinden sich in der inneren plexiformen Schicht (engl.: innner plexiform layer, IPL). Neben den Neuronenklassen kommen drei Arten von Gliazellen in der Retina vor. Müllerzellen durchspannen die Retina in vertikaler Richtung und bilden die so genannten Grenzmembranen. Diese grenzen die Retina nach innen gegenüber dem Glaskörper und nach außen zur Innensegmentenschicht hin ab. Müllerzellen gelten als Stützelemente der Retina und sollen am Metabolismus von extrazellulärem Kalium beteiligt sein. Ähnlich wie im restlichen zentralen Nervensystem sind Astroglia mit Blutgefäßen assoziiert und bilden eine Blut-Retina-Schranke aus (Ogden, 1978). Bewegliche Mikrogliazellen haben die Funktion, totes Gewebe zu beseitigen (Boycott & Hopkins, 1981).

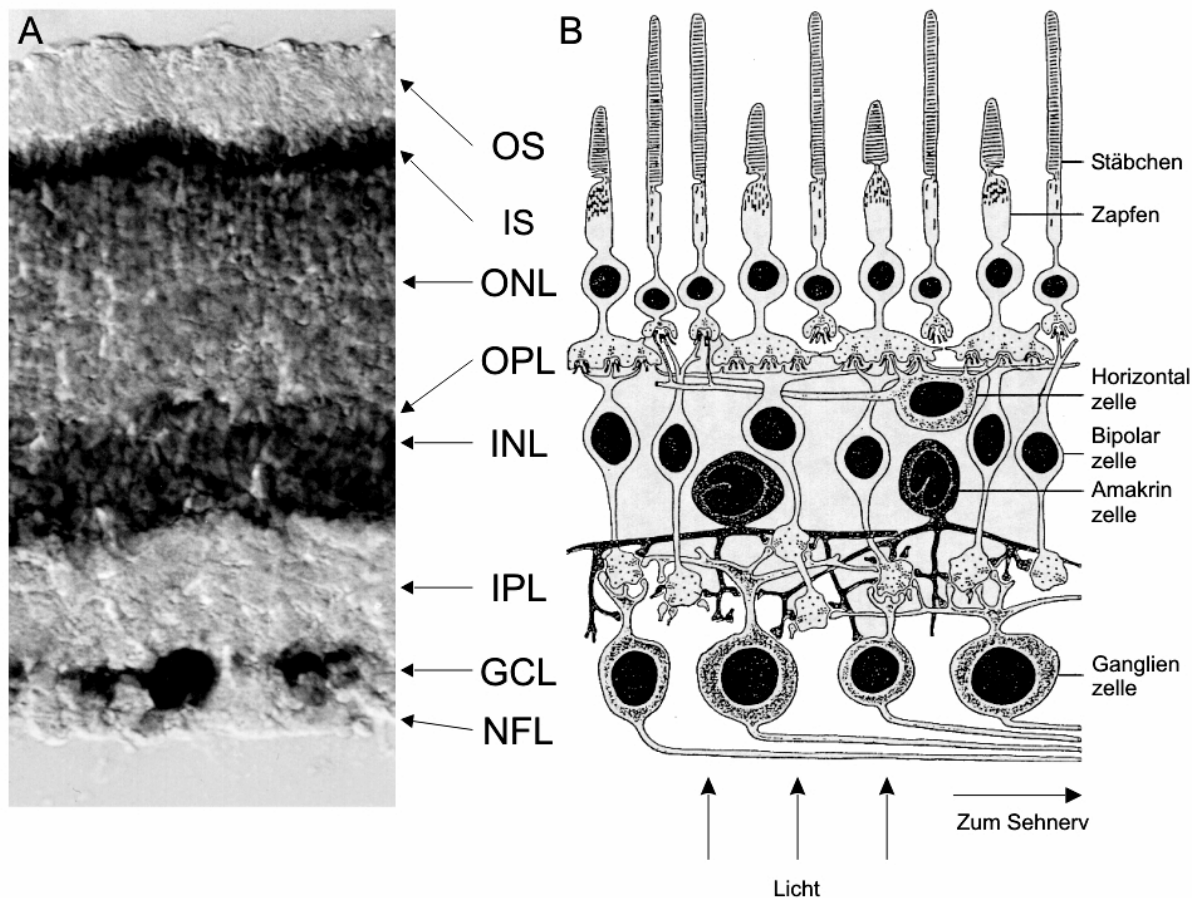


Abb. 1: Vertikalschnitt und schematischer Aufbau der Rattenretina.

A: Vertikalschnitt durch die Retina. Das Licht fällt von der Ganglienzellseite her ein.

B: Schematische Darstellung des Vertikalschnitts. OS: Außensegmente der Photorezeptoren, IS: Innensegmente der Photorezeptoren, ONL: Äußere nukleäre Schicht, OPL: Äußere plexiforme Schicht, INL: Innere nukleäre Schicht, IPL: Innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht, NFL: Nervenfaserschicht. Abb. verändert nach Dowling & Boycott (1969).

1.1.2. Informationswege in der Retina

1.1.2.1. Vertikale Informationswege

Fällt Licht in das Auge, so muss es zunächst die gesamte Retina durchqueren, bevor es auf die lichtempfindlichen Außensegmente der Photorezeptoren fällt. In den Außensegmenten befindet sich das membrangebundene Photopigment, Rhodopsin. Wird Rhodopsin durch die Absorption eines Photons aktiviert, löst es eine Enzymkaskade im Außensegment aus, die zur Lichtantwort führt. Stäbchen sind dabei auf die Funktion bei niedrigen Helligkeiten (Dämmerungs- und Nachtsehen) spezialisiert und in der Lage, einzelne Lichtquanten zu detektieren (Rieke & Baylor, 1998). Zapfen sind deutlich unempfindlicher und auf das Sehen

bei hellem Tageslicht und zum Farbsehen angepasst (zur Übersicht: McNaughton, 1990). Im unbelichteten Zustand strömt ein durch Natrium- und Kalziumionen getragener, depolarisierender Strom in das Außensegment ein („Dunkelstrom“, siehe **Kap. 2.4.5** und **Abb. 9**). Dadurch werden Stäbchen und Zapfen im Dunkeln erregt und setzen am Axonterminalsystem den Neurotransmitter Glutamat frei. Bei Belichtung hyperpolarisieren die Photorezeptoren und die Glutamatfreisetzung wird reduziert (zur Übersicht: Müller & Kaupp, 1998).

Die vertikale Informationsübertragung setzt sich in der OPL an Synapsen zwischen Zapfen und 10-12 Klassen von Bipolarzellen fort. Man unterscheidet grundsätzlich Bipolarzellen, die bei Belichtung depolarisieren (ON-Bipolarzellen) und solche, die bei Belichtung hyperpolarisieren (OFF-Bipolarzellen). OFF-Bipolarzellen tragen auf ihren Dendriten ionotrope Glutamatrezeptoren. Ihre Axone stratifizieren in der äußeren Sublamina der IPL, der OFF-Sublamina. ON-Bipolarzellen verfügen über metabotrope Glutamatrezeptoren und übertragen ihr Signal in die innere Sublamina der IPL, die ON-Sublamina. Somit liegt das Signal der Zapfen auf Ebene der IPL in einer doppelten, spiegelbildlichen Repräsentation vor. ON- und OFF-Bipolarzellen setzen an ihren Axonterminalsystemen Glutamat als Neurotransmitter frei (zur Übersicht: Wäble & Boycott, 1991). In der ON-Sublamina bilden ON-Bipolarzellen Synapsen mit ON-Ganglienzellen, in der OFF-Sublamina bilden OFF-Bipolarzellen Synapsen mit OFF-Ganglienzellen (Nelson et al., 1978). ON- und OFF-Kanal der Signalverarbeitung sind somit morphologisch und physiologisch getrennt.

Die Signale der Stäbchen werden in der OPL durch einen spezialisierten ON-Bipolarzelltyp, die Stäbchenbipolarzelle, weitergeleitet. Im Gegensatz zum Zapfenweg werden keine Ganglienzellen durch Stäbchenbipolarzellen direkt erregt. Stäbchenbipolarzellen erregen durch Glutamatfreisetzung eine spezielle Amakrinzellklasse, die AII-Amakrinzelle (**Abb. 2**). Die AII-Amakrinzellen ihrerseits speisen dieses Signal sowohl in ON- als auch in OFF-Bipolarzellen des Zapfenwegs ein. Dabei erregt die AII bei Belichtung die ON-Bipolarzellen des Zapfenwegs über elektrische Synapsen (gap-junctions) und inhibiert die OFF-Bipolarzellen über die Freisetzung von Glyzin (Famiglietti & Kolb, 1975; Kolb & Famiglietti, 1974; Müller et al., 1988; Wäble et al., 1991).

Neben der Informationsweiterleitung über die AII-Amakrinzelle gibt es zwei weitere, alternative Verarbeitungswege für Stäbchensignale. Ein Weg ist die elektrotonische Weiterleitung des Stäbchensignals über elektrische Synapsen zwischen Stäbchen und Zapfen (Schneeweis und Schnapf, 1999).

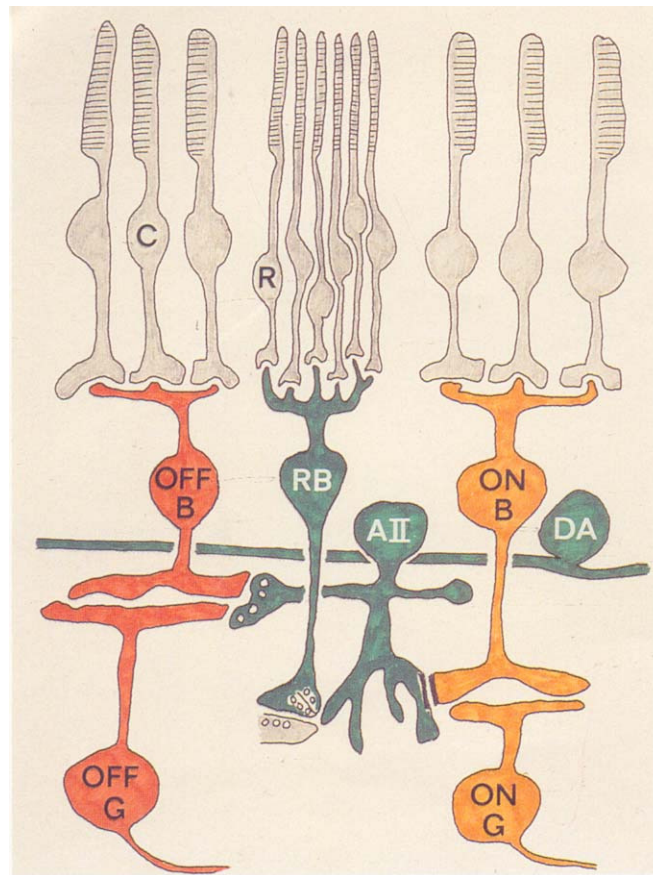


Abb. 2: Schematische Darstellung der Signalverarbeitung von Stäbchen- und Zapfensignalen

C: Zapfen (engl.: cones), R: Stäbchen (engl.: rods), OFF-B: OFF-Bipolarzelle, ON-B: ON-Bipolarzelle, RB: Stäbchenbipolarzelle (engl.: rod bipolar cell), AII: AII-Amakrinzelle, DA: Dopaminerge Amakrinzelle, OFF-G: OFF-Ganglienzelle, ON-G: ON-Ganglienzelle.

Das Schema stellt die Beziehung zwischen Zapfenverarbeitungswegen (OFF-Weg: Rot, ON-Weg: Gelb) und Stäbchenverarbeitungsweg (grün) dar. Zapfen geben ihre Signale an ON- und OFF-Bipolarzellen weiter. OFF-Bipolarzellen verschalten auf OFF-Ganglienzellen. ON-Bipolarzellen verschalten auf ON-Ganglienzellen. Stäbchen geben ihre Signale an (ON-)Stäbchenbipolarzellen weiter. Die Stäbchenbipolarzelle verschaltet nicht direkt auf Ganglienzellen, sondern erregt die AII-Amakrinzelle. Die AII-Amakrinzelle speist das Stäbchensignal über eine hemmende chemische Synapse (Vorzeichen-umkehrend) in den OFF-Kanal und über eine erregende elektrische Synapse (Vorzeichen-erhaltend) in den ON-Weg ein. Möglicherweise wird das ganze Stäbchensystem durch die Helladaptation an seiner zentralen Stelle, der AII-Amakrinzelle, unter der Kontrolle von dopaminergen Amakrinen „abgeschaltet“. Abb. verändert nach Peichl, (1990).

Weiterhin gibt es eine direkte synaptische Verbindung zwischen Stäbchen und einer Klasse von OFF-Bipolarzellen (Hack et al., 1999; Soucy et al., 1998; zur Übersicht: Tsukamoto et al., 2001). Speziell in Mäusen soll dieser Signalweg jedoch eine untergeordnete Bedeutung haben (Protti et al., 2004). Ganglienzellen sind die Ausgangselemente der Retina. Sie stellen damit das letzte Glied in der vertikalen Signalverarbeitung der Retina dar. Entlang der Dendritenbäume, die in der IPL verzweigen, bilden sie synaptische Verbindungen mit Bipolarzellen und Amakrinen aus. Die Ganglienzellen bilden als erste retinale Zellklasse grundsätzlich Aktionspotentiale und übermitteln die Information über lange Axone in die

visuellen Zentren des Gehirns. Die Axone der Ganglienzellen entspringen am Zellkörper und laufen zum blinden Fleck. Um das Auge in Richtung Gehirn zu verlassen, bilden sie hier den optischen Nerv und projizieren zu zentralen Verschaltungsstellen der optischen Bahn, insbesondere dem Corpus geniculatum laterale. Ganglienzellen nehmen somit im Bezug auf die Informationsübertragung eine zentrale Rolle ein. Der optische Nerv bildet einen „Flaschenhals“ für die visuelle Informationsübertragung, der durch die Anzahl der Ganglienzellaxone begrenzt ist. Aufgrund ihrer Morphologie und der physiologischen Antworten lassen sich je nach Spezies zwischen 10 und 15 Typen von Ganglienzellen unterscheiden. Frühe Untersuchungen charakterisierten Ganglienzellen anhand ihrer phasischen oder tonischen Antworten bzw. ihrer linearen oder nicht-linearen Integrationseigenschaften (Cleland et al., 1973; Cleland & Levick, 1974). Später konnten diesen physiologischen Klassen morphologische Typen zugeordnet werden (Boycott & Wäble, 1974; Peichl & Wäble, 1981; zur Übersicht: Masland, 2001a; Wäble & Boycott, 1991). Anatomische Studien zeigen, dass die rezeptiven Felder jedes Ganglienzelltyps die Retina gleichmäßig und vollständig abdecken und somit die parallele Informationsverarbeitung über die gesamte Retina sicherstellen (Wäble et al., 1981). Die rezeptiven Felder einiger Ganglienzellklassen besitzen komplexe Eigenschaften. So gibt es zum Beispiel bewegungs- und richtungsselektive Ganglienzellen (Maus: Pang et al., 2003; Weng et al., 2004, siehe Ergebnisteil, **Abb. 32-34**). Zumeist sind die rezeptiven Felder jedoch konzentrisch organisiert und bestehen aus einem zentralen Teil, dem so genannten Feldzentrum und einem antagonistischen Umfeld. Die horizontale Ausdehnung des Dendritenbaums entspricht in etwa der Größe des rezeptiven Feldzentrums (Peichl & Wäble, 1983). ON-Ganglienzellen werden durch Belichtung des Zentrums erregt und durch Belichtung des Umfelds gehemmt. OFF-Ganglienzellen werden dagegen durch einen hellen Zentrumsreiz gehemmt und durch Belichtung des Umfelds erregt (Kuffler, 1953). Der Zentrum-Umfeld-Antagonismus wird durch hemmende, horizontale Verbindungen erzeugt (siehe unten).

1.1.2.2. Horizontale Informationswege

Horizontalzellen und Amakrinzellen tragen zur horizontalen Informationsverarbeitung bei. In der Retina sind anhand von morphologischen Kriterien je nach Spezies zwischen 20 und 30 Amakrinzelltypen beschrieben worden (zur Übersicht: MacNeil & Masland, 1998; Masland, 2001a). Amakrinzellen werden von Bipolarzellen erregt und verschalten ihrerseits mit

Ganglienzellen, Amakrinzellen und auch reziprok auf Bipolarzellen zurück. Viele Amakrinzellen verwenden dabei die inhibitorischen Neurotransmitter Glyzin oder γ -Aminobuttersäure (GABA). Die spezifische Funktion von Amakrinzellen ist vielfach noch unklar. Grundsätzlich ist zu erwarten, dass Amakrinzellen an Prozessen beteiligt sind, die zu komplexen Eigenschaften von retinalen Ganglienzellen führen. Ein gut untersuchtes Beispiel dafür ist der retinale Schaltkreis, der die Richtungsselektivität von Ganglienzellen hervorruft (Euler et al., 2002; Taylor & Vaney, 2002).

Gemeinsam mit Horizontalzellen vermitteln Amakrinzellen die Umfeldhemmung der rezeptiven Felder von Ganglienzellen. Während Amakrinzellen in der IPL direkt hemmend auf Ganglienzellen verschalten, tragen Horizontalzellen indirekt über Inhibition in der OPL dazu bei (Flores-Herr et al., 2001; Freed & Sterling, 1988; Freed, 1992). Horizontalzellen verzweigen seitlich in der OPL. In Folge der Glutamatfreisetzung der Photorezeptoren setzen Horizontalzellen ihrerseits den hemmenden Transmitter GABA frei, der die umliegenden Photorezeptoren oder Bipolarzellen hemmt. Dadurch kommt es auf dieser Ebene zu einer lateralen Inhibition, die eine Kontrastverstärkung bewirkt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Säugern haben Mäuse nur eine Klasse von Horizontalzellen (Peichl & Gonzalez-Soriano, 1994).

1.2. HCN-Kanäle

Die Ströme der HCN-Kanäle (engl.: hyperpolarisation-activated, cyclic-nucleotide-gated-channels) wurden zuerst in Photorezeptoren (Bader et al., 1979; Fain et al., 1978) und im Sinusknoten des Säugerherzens (Brown et al., 1979; Brown & DiFrancesco, 1980; Yanagihara & Irisawa, 1980) entdeckt. Im Gegensatz zu vielen anderen spannungsgesteuerten Leitfähigkeiten aktivieren HCN-Kanäle bei Hyperpolarisation. Daher wurden die Ströme anfangs als I_h (h für hyperpolarisationsaktiviert), I_f (f für engl.: funny) oder I_q (q für engl.: queer) bezeichnet. Seither wurden HCN-Ströme in zahlreichen Teilen des Nervensystems und in Muskelzellen gefunden (zur Übersicht: Kaupp & Seifert, 2001).

Vor einigen Jahren gelang die Identifikation der Gene, die für HCN-Kanäle kodieren. In Säugetieren wurden 4 Gene identifiziert, die für HCN-Kanäle kodieren. Die Isoformen werden mit HCN1 bis HCN4 bezeichnet und unterscheiden sich in ihren biophysikalischen Eigenschaften, z.B. der Aktivierungskurve und der Kinetik ihrer Ströme (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).

Die Struktur der HCN-Kanäle weist große Ähnlichkeiten mit spannungsabhängigen Kalium-Kanälen des „Shaker“-Typs und mit zyklisch-Nukleotid-gesteuerten Kanälen (CNG-Kanäle) auf. Die Topologie für eine HCN-Untereinheit zeigt sechs transmembranale Segmente, mit einer Porenschleife zwischen Segment S5 und S6 sowie einem Spannungsfühlermotiv in Segment S4. Die Porenregion enthält ein GYG (Glyzin-Thyrosin-Glyzin) Selektivitätsmotiv, wie es auch für Kaliumkanäle beschrieben wurde. N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Der C-Terminus enthält eine Bindestelle für zyklische Nukleotide (**Abb. 3**). Vier solcher Untereinheiten bilden einen funktionellen Kanal (zur Übersicht: Biel et al., 2002; Santoro & Tibbs, 1999).

1.2.1. Funktionelle Eigenschaften des HCN-Kanals

Die spannungsabhängige Aktivierung des HCN-Kanals erfolgt bei Hyperpolarisation der Membran und lässt sich sehr gut mit einer Boltzmannfunktion beschreiben. Die halbmaximale Aktivierung erfolgt je nach Isoform in verschiedenen Expressionssystemen zwischen -60 und -80 mV (zur Übersicht: Kaupp & Seifert, 2001). Der HCN-Strom entwickelt sich bei Hyperpolarisation der Membran mit sigmoidalem Zeitverlauf. Die Aktivierungskinetik ist grundsätzlich langsam und ebenfalls zwischen den Isoformen verschieden. HCN1 aktiviert am schnellsten, HCN4 am langsamsten, HCN2 und HCN3 liegen dazwischen.

Die Bindung zyklischer Nukleotide (z.B. cAMP und cGMP) an die HCN-Kanäle verändert die Spannungsabhängigkeit ihrer Aktivierung. Die Aktivierungskurve wird durch mikromolare Konzentrationen zu positiveren Spannungen hin verschoben. Der Grad der Modulierbarkeit unterscheidet sich zwischen den Isoformen. Die halbmaximale Aktivierungsspannung wird bei HCN1 nur um etwa 2-5 mV verschoben, bei den anderen Isoformen zwischen 10 und 20 mV (Chen et al., 2001; Ludwig et al., 1998 und 1999; Seifert et al., 1999).

HCN-Kanäle leiten hauptsächlich Kalium- und Natriumionen. Das Verhältnis der Leitfähigkeit von Natrium und Kalium bewegt sich zwischen 0,1 und 0,4 (Wollmuth & Hille, 1992). Unter physiologischen Bedingungen haben die Ströme durch HCN-Kanäle daher ein Umkehrpotential von etwa -30 mV. Das führt dazu, dass der HCN-Strom in Neuronen gewöhnlich einen depolarisierenden Effekt hat (Ludwig et al., 1998; Seifert et al., 1999).

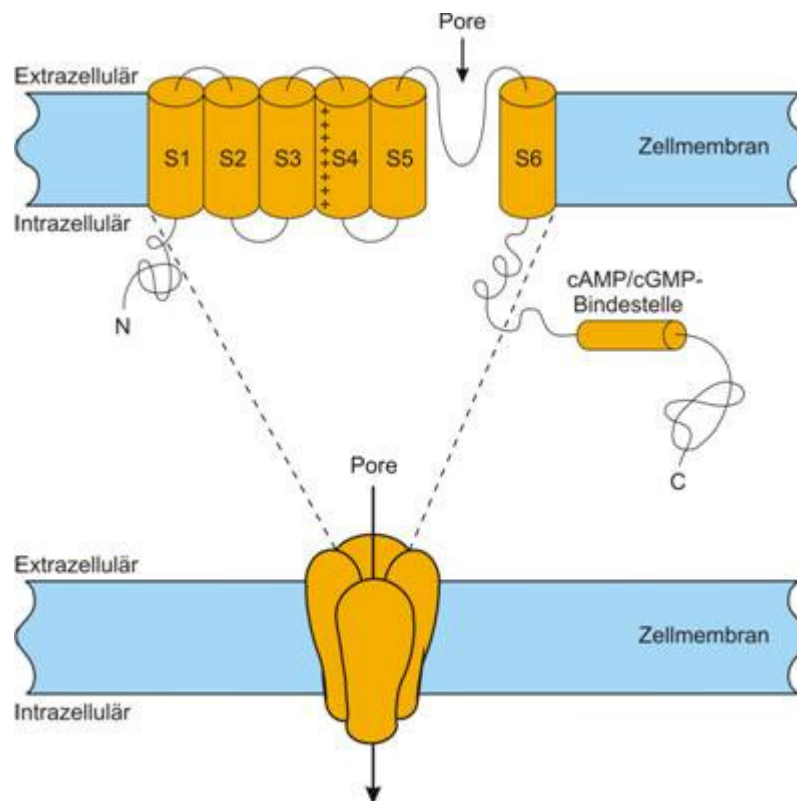


Abb. 3: Schema zur Proteinstruktur und Zusammensetzung eines HCN-Kanals.

S1-S6: transmembranale Segmente, N: N-Terminus der Aminosäurekette, C: C-Terminus der Aminosäurekette. Ein funktioneller Kanal (unten) setzt sich aus 4 Untereinheiten (oben) zusammen.

Wie viele Kaliumkanäle zeigen HCN-Kanäle einen spannungsabhängigen Block durch millimolare Cäsiumkonzentrationen (DiFrancesco, 1982). Neben Cäsium blocken einige organische Komponenten HCN-Kanäle. Zatebradine, Ivabradin und ZD-7288 blocken jedoch zusätzlich bestimmte Kaliumkanäle oder verändern die synaptische Übertragung (Chen, 2004; DiFrancesco, 1994; Gasparini & DiFrancesco, 1997; Satoh & Yamada, 2002). Ein spezifischer, reversibler Blocker für HCN-Kanäle ist bis heute nicht bekannt. Auch dass die vier Isoformen pharmakologisch nicht differenziert werden können, erschwert pharmakologische Untersuchungen.

1.2.2. Die physiologische Rolle der HCN-Kanäle

Durch ihre besonderen Eigenschaften eignen sich HCN-Kanäle in rhythmusgenerierenden Systemen als „Schrittmacher“-Kanäle. Besonders gut verstanden ist ihre Rolle beim Herzrhythmus der Wirbeltiere. Dort kommen HCN-Kanäle in spezialisierten Herzmuskel-

zellen des Sinusknotens vor. Sie tragen nach der Ausbildung eines Herzaktionspotentials zur erneuten Depolarisation der Membranspannung bei. Dabei steuert das vegetative Nervensystem über Adrenalin / Noradrenalin und Acetylcholin die intrazelluläre Produktion von zyklischen Nukleotiden in den Herzmuskelzellen. Durch die Bindung zyklischer Nukleotide werden so die Aktivierbarkeit der HCN-Kanäle und damit die Geschwindigkeit der erneuten Depolarisation beeinflusst. Mittelbar bestimmt das die Frequenz des Herzschlages (zur Übersicht: DiFrancesco, 1993). Ein Beispiel für die Rolle von HCN-Kanälen im zentralen Nervensystem sind Neurone des Thalamus, die zur Regulation des Schlaf- / Wachrhythmus beitragen (Lüthi et al., 1998; Lüthi & McCormick, 1999; zur Übersicht: McCormick & Bal, 1997). Magee zeigte an CA1-Neuronen des Hippocampus, dass HCN-Kanäle auf zellulärer Ebene die Integrationseigenschaften entscheidend beeinflussen können. In den CA1-Neuronen wird aufgrund einer gradierten HCN-Verteilung der Zeitverlauf von synaptischen Eingängen angeglichen (Magee, 1998 und 1999). Eine Rolle für die Modulation von synaptischer Übertragung durch I_h wird von Beaumont und Kollegen im Flusskrebs beschrieben. An der neuromuskulären Synapse wird durch HCN-Kanäle eine serotoninabhängige Potenzierung vermittelt. Der genaue Mechanismus ist bisher jedoch unbekannt (Beaumont & Zucker, 2000). Als weitere, allgemeine Funktionen von HCN-Kanälen werden ein möglicher Schutz gegen übermäßige Hyperpolarisation und ein Beitrag zum Ruhemembranpotential diskutiert (zur Übersicht: Robinson & Siegelbaum, 2003).

1.2.3. HCN-Kanäle in der Retina

Neben anderen Teilen des Gehirns, werden HCN-Kanäle auch in der Retina exprimiert (Moosmang et al., 2001; Müller et al., 2003). HCN-Ströme sind in Stäbchen und Zapfen vieler Vertebraten beschrieben (Salamander: Hestrin, 1987; Meerschweinchen: Demontis et al., 1999; Kaninchen: Demontis et al., 2002; Primaten: Schneeweis & Schnapf, 1995). Es wurde gezeigt, dass während der hyperpolarisierenden Lichtantwort die HCN-Kanäle aktiviert werden und durch Depolarisation die Lichtantwort des Photorezeptors verkürzen (Fain et al., 1978, Satoh & Yamada, 2000; Schneeweis & Schnapf, 1995). In Bipolarzellen von Maus und Ratte wurden ebenfalls HCN-Kanäle gefunden (Kaneko et al., 1989; Karschin & Wäßle, 1990). Elektrophysiologische Nachweise von HCN-Kanälen bzw. des typischen $I(h)$ -Stroms existieren auch aus Ganglienzellen (Goldfisch: Tabata & Ishida, 1996; Katze: O'Brian et al., 2002; Maus: eigene unveröffentlichte Untersuchungen). Die Funktion von HCN-Kanälen in

diesen Zellen und ihre Auswirkung auf die retinalen Netzwerke sind jedoch weitgehend unbekannt. Die Expression der vier HCN-Isoformen ist in der Rattenretina besonders detailliert untersucht worden. Müller und Kollegen weisen durch die Kombination immunocytochemischer und elektrophysiologischer Methoden eine differentielle Expression der HCN-Isoformen in der Retina nach. Dabei wird HCN1 am stärksten exprimiert und besonders in Photorezeptoren und in Typ 5-Bipolarzellen gefunden. Die anderen Subtypen HCN2-HCN4 sind schwächer exprimiert und kommen in bestimmten Bipolarzelltypen, Amakrin- und Ganglienzellen sowie in Fortsätzen in der IPL vor (Müller et al., 2003). Auch in anderen Spezies ist HCN1 stark in Photorezeptoren exprimiert (Kaninchen: Demontis et al., 2002; Rind und Affe: persönliche Mitteilung Dr. F. Müller; Maus: siehe auch Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung). Dieses spezifische Expressionsmuster legt nahe, dass dem HCN1-Kanal eine wichtige Rolle bei der Gestaltung und Weiterleitung von Signalen in der Säugerretina zukommen könnte.

1.3. Fragestellung der Arbeit

Neben den komplexen synaptischen Schaltkreisen beeinflussen auch zelluläre Eigenschaften, wie z.B. spannungsgesteuerte Leitfähigkeiten in Neuronen die Signalverarbeitung in der Retina. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass der HCN1-Kanal die Lichtantwort von Photorezeptoren verkürzt. Um die Bedeutung von HCN1 für die retinale Signalverarbeitung zu untersuchen, stand mir eine transgene Mauslinie zur Verfügung, die keinen funktionellen HCN1-Kanal exprimiert („HCN1-Knock-out“). Sollte der HCN1-Kanal die Lichtantwort von Photorezeptoren tatsächlich verkürzen, so ist damit zu rechnen, dass der HCN1-Knock-out eine verlängerte Lichtantwort in den Photorezeptoren zeigt. Infolgedessen könnte auch die Lichtantwort in Bipolarzellen verändert sein. Mit der Messung von ERGs wurde eine einfache und reproduzierbare Methodik angewandt, um auf Ebene von Photorezeptoren und Bipolarzellen nach Veränderungen in der Signalverarbeitung zu suchen. Besonderes Augenmerk galt dabei der Frequenzübertragung.

Um die Untersuchung auf die Ebene des retinalen Ausgangs auszudehnen, etablierte ich einen Messaufbau, um *in vitro* Patch-Clamp-Ableitungen an Ganglienzellen vorzunehmen. Dies erlaubte den Zugriff auf die Verarbeitungsebene, die für die höheren visuellen Zentren relevant ist.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Alle hier beschriebenen Experimente wurden an Mäusen und an isolierter Mäuseretina durchgeführt. Ich verwendete Mäuse des Inzuchtstamms C57BL/6-N (Fa. Charles River, Sulzfeld) für die grundlegenden und methodischen Experimente. Diese Linie gilt als ein Standardmodell für physiologische Untersuchungen.

Die Funktion von HCN1-Kanälen in der Retina wurde an transgenen Mäusen untersucht. Zuchttiere für diese Mauslinien wurden mir freundlicherweise aus dem Labor von Dr. Eric R. Kandel (Center for Neurobiology and Behavior, Columbia University, USA) zur Verfügung gestellt. Sie tragen eine Deletion im Gen für HCN1, so dass kein funktionelles Kanalprotein entsteht („Knock-out“). Die Deletion wurde in Tieren des Stamms SV129 erzeugt. Durch Kreuzung mit C57BL/6-N-Mäusen konnte der genetische Hintergrund an den des Standardmodells angenähert werden. Es entstand eine zum Teil heterozygote Tochtergeneration (F1-Tiere), welche die Deletion nur auf einem Allel trug (**Abb. 4**). Die heterozygoten F1-Tiere wurden durch eine PCR (engl.: polymerase chain reaction) auf genomischer DNS identifiziert und zur Zucht verwendet. Innerhalb der F2-Generation treten neben heterozygoten Tieren auch solche mit einer doppelten Deletion (HCN1 $-/-$, Knock-out-Tiere) und solche mit zwei intakten Allelen auf (HCN1 $+/+$, Wildtyp-Tiere). Auch die Tiere der F2-Generation wurden genotypisiert. Die identifizierten Knock-out- und Wildtyp-Tiere wurden entweder für Experimente oder für F3-Nachzuchten verwendet.

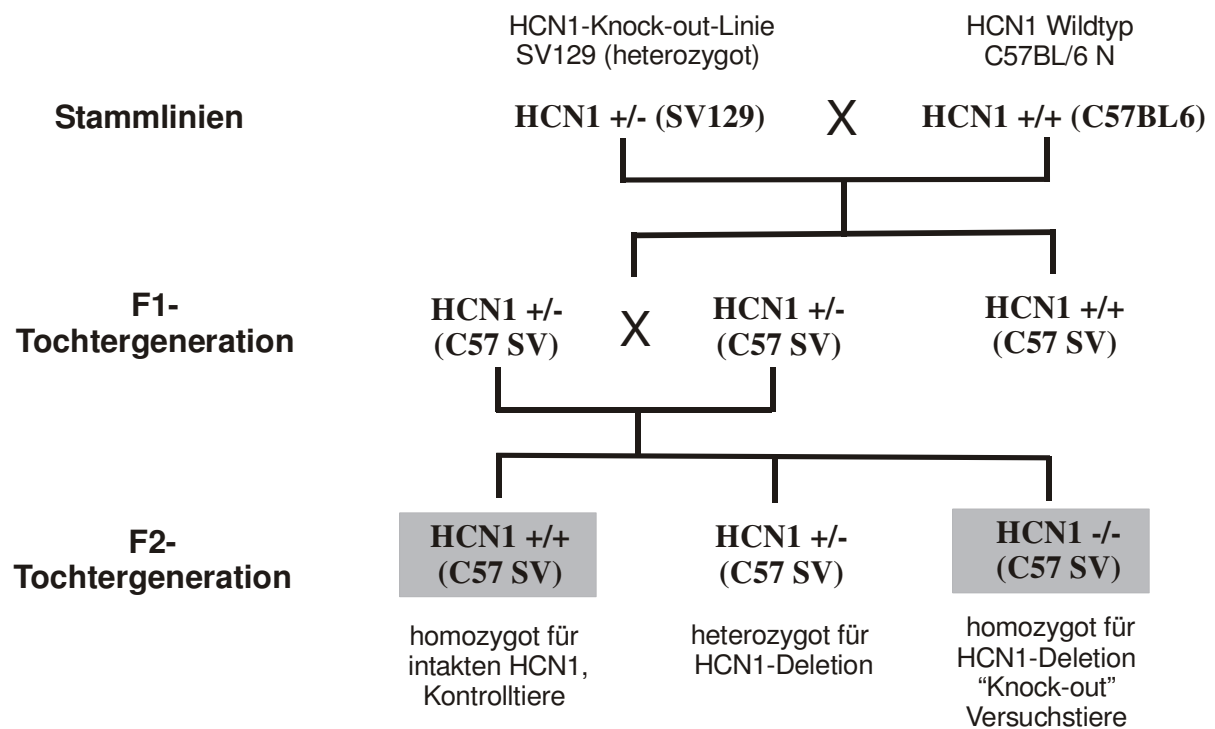


Abb. 4: Zuchtschema für den HCN1-Knock-out.

Tiere, die experimentell oder zur Nachzucht verwendet wurden, sind grau unterlegt. Zur F1- und F2-Tochtertiere wurden durch PCR genotypisiert.

2.2. Messungen von Lichtantworten retinaler Ganglienzellen

2.2.1. Präparation

Vor dem Experiment wurden die Mäuse für mindestens 3 Stunden dunkeladaptiert. Um die Photorezeptoren der Retina während der Präparation nicht zu belichten, wurden alle Präparationsschritte in Dunkelheit durchgeführt. Dazu verwendete ich ein IR (Infrarot) - Nachtsichtgerät („Pathfinder S“, Fa. Bushnell Optics Europe, Köln). Das Nachtsichtgerät verfügt über zwei getrennte Bildverstärker für linkes und rechtes Auge und erlaubt dadurch räumliches Sehen bis in den Nahbereich (20-25 cm). Das Sichtfeld wird dabei durch eine eingebaute IR-Diode beleuchtet, die hauptsächlich Licht des nahen IR (700-800 nm) emittiert. Die dunkeladaptierten Mäuse wurden zunächst mit Isofluran (Fa. Curamed-Pharma, Karlsruhe) betäubt und anschließend dekapitiert.

Beide Augen wurden entnommen und zur weiteren Präparation in mit Karbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) begastes Ames-Medium (Fa. Sigma-Aldrich Chemicals, München) überführt.

Die Präparation der Retina erfolgte unter einem Binokular. Zur Aufhellung der Präparationsfläche mit infrarotem Licht wurden zwei herkömmliche Glühlampen mit 850 nm Langpass-Filtern („Schott RG850“, Fa. ITOS, Mainz) ausgestattet. Mit einer Kanüle wurde zunächst eine seitliche Öffnung in das Auge gestochen. Das Auge wurde mit einer Feinschere entlang der Ora serrata in eine vordere und eine hintere Hemisphäre geteilt. Aus dem hinteren Augenbecher wurden die Linse und der Glaskörper sorgfältig mit Feinpinzetten entfernt. Das vollständige Entfernen des Glaskörpers ist Voraussetzung für die erfolgreiche Ableitung retinaler Ganglienzellen (siehe **Kap. 2.2.4.2.**). Zum Ablösen der Retina wurde eine Pinzettenspitze vorsichtig zwischen Retina und Pigmentepithel hindurchgeführt und der Augenbecher abschließend umgestülpt. Die verbleibende Verbindung der Retina mit dem Augenbecher am Sehnerv wurde mit der Feinschere durchtrennt. Die Retina wurde zurechtgeschnitten und je nach Größe in zwei bis vier Stücke aufgeteilt. Bis zur Verwendung wurden sie in Dunkelheit bei Raumtemperatur (RT) in einer Vorratskammer mit begastem Ames-Medium aufbewahrt. Die Retinastücke waren für zwei bis vier Stunden für Experimente verwendbar.

2.2.2. Messkammer

Für elektrophysiologische Experimente wurde ein Retinastück in eine selbst gefertigte Plexiglaskammer mit Glasboden überführt. Die rechteckige Kammer hat eine Grundfläche von 1,3 mm x 1,8 mm. Während der Messung enthält die Kammer das Präparat und die Badlösung, in die ein Wasserimmersionsobjektiv eintaucht (Flüssigkeitsvolumen: 400-500 μ l). Um die Retina flach am Kammerboden zu fixieren, wurde ein hufeisenförmiger Edelstahldraht mit Zahnseidefäden bespannt und vorsichtig auf die Ganglienzellseite der Retina gelegt. Die Photorezeptorseite wies somit zum Kammerboden hin.

2.2.3. Perfusion

Die Messkammer wurde mit einer Schwerkraft-betriebenen Perfusion mit begastem Ames-Medium durchspült. Durch Zugabe von Natriumbikarbonat wurde der pH auf 7,4 bei 35° C eingestellt. Das Medium wurde 50 cm über dem Kammerboden in einem 250 ml Vorratsgefäß

begast und durch einen gasdichten Schlauch („Tygon“, Fa. Neolab, Heidelberg) bis zur Messkammer geführt. Kurz vor der Messkammer wurde das Medium zwischen zwei geregelten Peltier-Elementen erwärmt („TPC 3B“, Fa. Luigs & Neumann, Ratingen), so dass in der Messkammer eine Lösungstemperatur von 35° C vorlag. Der Fluss durch die Kammer betrug 7 ml/min. Das Medium wurde auf der gegenüberliegenden Seite mit einer Peristaltikpumpe abgesaugt („Merodos GL“, Fa. Medorex, Nörten-Hardenberg) und zurück in das Vorratsgefäß gepumpt. Die Lösung wurde spätestens nach 2 Stunden ersetzt.

2.2.4. Elektrophysiologische Methode

Der elektrophysiologische Messstand wurde auf einem druckluftgedämpften Tisch („Isostation“, Fa. Newport, Irvine, USA) aufgebaut. Der Tisch wurde mit einem geschlossenen Gestell aus Stahlblechen umgeben, das gleichzeitig dem Lichtabschluss und als Faraday-Käfig diente. Der vordere Zugang wurde mit schwarzen Vorhängen ausgestattet. Während der Dunkelexperimente blieben die Vorhänge geschlossen, oder es wurde bei verdunkeltem Labor mit dem Nachtsichtgerät gearbeitet.

Um die elektrischen Antworten von retinalen Ganglienzellen auf Lichtreize zu untersuchen, wurde ein Patch-Clamp-Messstand etabliert. Ich verwendete ein aufrechtes Mikroskop („FS 2 mot“, Fa. Zeiss, Oberkochen) mit selbst gefertigtem Objektisch, einen konventionellen Patch-Clamp-Verstärker („Axopatch 200 A“, Fa. Molecular Devices, Union City, USA) und einen Mikromanipulator („LN SM 1“, Fa. Luigs & Neumann, Ratingen).

Ein digitales Datenerfassungssystem („Digidata 1200“ mit „pClamp 6“ -Software, Fa. Molecular Devices, Union City, USA) und ein Standard-PC (486 DX2, MS-DOS 6.22) dienten zur Steuerung und Dokumentation der Messungen.

2.2.4.1. Patch-Elektroden

Die Mikroelektroden für die Patch-Clamp-Messungen wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren (mit Innenfilament; 1,5 mm Außendurchmesser; 0,314 mm Wandstärke, Fa. Hilgenberg, Malsfeld) mit Hilfe eines Elektrodenziehgeräts (DMZ Universal, Fa. Zeitz Instrumente, Augsburg) hergestellt. Die Spitzengröße und Form wurde mit einem Mikroskop begutachtet. Die Elektroden hatten einen Widerstand von 4-6 M Ω .

Am Elektrodenhalter diente ein elektrolytisch chlorierter Silberdraht zur elektrischen Verbindung von Intrazellulärlösung und Vorverstärker. Als Bezugselektrode tauchte ein Silber/Silberchlorid-Pellet in der Nähe des Lösungszulaufs in die Badlösung. Da keine unterschiedlichen Extrazellulärlösungen verwendet wurden, konnte auf eine Salzbrücke verzichtet werden.

Durch die unterschiedliche Mobilität von Ionen in Lösungen kommt es an Grenzflächen zwischen verschiedenen Lösungen (hier zwischen Pipettenlösung und Badlösung) zu den so genannten LJPs (engl.: Liquid Junction Potentials). LJPs verfälschen die Halte- / Kommandospannungen des Patch-Clamp-Verstärkers. Zur Korrektur wurde das LJP mit Hilfe einer Software („Junction Potential Calculator“, Molecular Devices, Union City, USA, basierend auf Barry, 1991) zu -12 mV berechnet. Durch Austausch der auf Kaliumglukonat basierenden Pipettenlösung gegen Badlösung wurde das LJP in Vorversuchen experimentell zwischen -8 und -12 mV bestimmt. Der Einfachheit halber wurde ein Wert von -10 mV für die Korrektur aller Messwerte benutzt.

2.2.4.2. Ableittechnik und experimentelles Vorgehen

Um Patch-Clamp-Ableitungen von einzelnen Ganglienzellen zu etablieren, ist ein spezielles Vorgehen notwendig, da Glaskörperreste und die so genannte „innere Grenzmembran“, die von den Endfüßen der Müllerzellen gebildet wird, den direkten Zugriff auf die Ganglienzell-somata verhindern.

Mit Hilfe der IR-Kontrastoptik (siehe **Kap. 2.2.5.1.**) wurden geeignete Stellen auf der Retina gesucht. Ganglienzellklassen unterscheiden sich unter anderem durch die Größe ihrer Somata. Um die Anzahl der untersuchten Ganglienzellklassen zu begrenzen, wurden Zellen mit besonders großem Soma ausgewählt. Mit einer Reinigungselektrode wurde die eigentliche Ableitung vorbereitet. Die Reinigungselektrode war mit Extrazellulärlösung gefüllt und wurde benutzt, um in die innere Grenzmembran einen kleinen Loch in der Nähe der abzuleitenden Zelle zu stechen. Durch diese Öffnung wurde ein direkter Zugang zu der Zelle frei geräumt. Dabei konnte durch Anlegen von Unter- oder Überdruck mit Extrazellulärlösung gespült bzw. Matrix oder Glia abgesaugt werden. War ein Zugang vorbereitet, wurde die Reinigungselektrode durch die Patch-Elektrode ersetzt. Durch den vorbereiteten Zugang konnte die Patch-Elektrode direkt an die Zellmembran der Zielzelle herangeführt werden. Die Patch-Elektrode war mit Intrazellulärlösung gefüllt. Durch Anlegen eines Unterdrucks wurde der sog. Gigaseal zwischen Elektrode und Zellmembran hergestellt (in der Regel $> 3 \text{ G}\Omega$).

Durch kurzes starkes Saugen wurde die Zellmembran unter der Glaselektrode durchgerissen und die Ganzzellkonfiguration etabliert. In der Folge konnte die Ganglienzelle mit Lichtreizen stimuliert und ihre elektrische Antwort abgeleitet werden. Die Ableitungen waren häufig sehr stabil und viele Ganglienzellen konnten länger als eine Stunde abgeleitet werden. Die Intrazellulärlösung enthielt Biozytin, das später mit einem fluoreszierenden Streptavidinanalogs nachgewiesen werden konnte. Die Morphologie der abgeleiteten Zelle konnte so rekonstruiert werden. Dazu wurde das Retinastück nach Abschluss des Experiments in Paraformaldehyd fixiert und immunhistochemisch angefärbt.

2.2.4.3. Das „Space-Clamp“-Problem

Ein grundsätzliches Problem der Patch-Clamp-Technik besteht darin, dass der Vorverstärker als Stromfolger konstruiert ist und Ströme gemessen werden, die aufgrund der angelegten Kommandospannung fließen. Diese Messanordnung basiert auf der Annahme, dass die Kommandospannung nicht nur an der Elektrode anliegt, sondern die zu untersuchende Zelle ebenfalls vollständig „kontrolliert“ wird. Jeder Widerstand, der zwischen dem Silberchlorid-draht in der Patch-Elektrode und den weit entfernten Teilen der untersuchten Zelle liegt, wirkt als Serienwiderstand (R_s). An jedem R_s fällt ein Teil der ursprünglichen Kommandospannung ab, die Messung wird mit größerem Abstand zur Elektrode zunehmend verfälscht.

Serienwiderstände dieser Art sind der Pipettenwiderstand, mögliche Zugangswiderstände durch Zellfragmente an der Pipettenöffnung („klassischer“ Serienwiderstand) und der Längswiderstand entlang der untersuchten Zelle.

Eine Patch-Clamp-Messung ergibt nur dann korrekte Messwerte, wenn die Summe der Serienwiderstände gegenüber dem Eingangswiderstand der Zelle (R_i) klein ist:

$$\sum R_s \ll R_i$$

Große und weit verzweigte Zellen führen zu einem starken Anwachsen der „zellulären“ Beiträge zum Serienwiderstand $\sum R_s$ und damit zum so genannten „Space-Clamp“-Problem. Gleichzeitig verringert sich der Eingangswiderstand mit der Größe der Zelle, weil eine größere Membranoberfläche mehr Leitfähigkeit besitzt. Die oben genannte Bedingung wird umso schlechter erfüllt, je größer die Zelle ist.

Eine Strategie zur Verbesserung dieser Situation besteht darin, alle für die Untersuchung irrelevanten Leitfähigkeiten durch Zusatz von Kanalblockern zur Intra- oder Extrazellulär-

lösung zu minimieren. Eine andere ist, gezielt kleinere Zellen zu untersuchen, die größere Eingangswiderstände aufweisen.

In meinen Untersuchungen stand jedoch die Messung der physiologischen Reaktion von großen retinalen Ganglienzellen auf einen Lichtreiz im Vordergrund. Ich verzichtete deshalb auf einen Zusatz von Kanalblockern, um den physiologischen Zustand der Ganglienzellen möglichst wenig zu verändern.

Um die negativen Auswirkungen des Space-Clamp-Problems zu umgehen, führte ich Current-Clamp-Messungen durch, in der das Membranpotential der Zelle gemessen wird, ohne eine Kommandospannung zu bestimmen. In den Messungen, in denen lichtinduzierte Ströme des rezeptiven Feldzentrums in der Spannungsklemme gemessen wurden, wählte ich die Haltespannung zu -60 mV. Diese Haltespannung liegt sehr nahe an dem zu erwartenden Nernst-Potential für Cl^- - Ionen (siehe **Kap. 2.5., Tab.4**). Daher ist davon auszugehen, dass die Aktivierung von inhibitorischen Eingängen zu sehr geringen Strömen führt. Aktivierung oder Inaktivierung von exzitatorischen Eingängen hingegen werden sich stark auswirken, weil das Nernst-Potential für die kationischen Leitfähigkeiten, die mit Glutamatrezeptoren verbunden sind, weit von -60 mV entfernt ist. Bei der Untersuchung des rezeptiven Feldzentrums von Ganglienzellen ist vor allen Dingen mit der Wirkung solcher glutamatergen Eingänge von Bipolarzellen zu rechnen. Es wurde darauf verzichtet, exzitatorische und inhibitorische Ströme durch Variation des Haltepotentials getrennt zu untersuchen, da ich keine Aussagen über die Membranspannungen in weit entfernten Bereichen des Dendritenbaums machen kann.

2.2.4.4. Datenerfassung und Datenverarbeitung

Das Datenerfassungssystem erlaubte, je nach experimentellem Protokoll, eine Abtastrate von 1 bis 5 kHz. Um dem Nyquist-Kriterium möglichst zu entsprechen, wurde der Tiefpassfilter mit der niedrigsten Grenzfrequenz verwendet, der zur Verfügung stand (1 kHz Bessel; 80 dB / Dekade).

Da Ganglienzellen Aktionspotentiale ausbilden, deren Länge nur 1-3 ms beträgt, wurde durch die Filterung mit 1 kHz die korrekte Aufzeichnung von Aktionspotentialen teilweise beeinträchtigt. Der genaue Zeitverlauf und die Amplitude von Aktionspotentialen standen jedoch nicht im Fokus dieser Untersuchung.

Durch das „Space-Clamp-Problem“ (siehe **Kap. 2.2.4.3.**) traten auch in der Spannungsklemme regelmäßig schnelle, transiente Einwärtsströme durch unkontrollierte

Aktionspotentialbildung auf. Damit diese die lichtinduzierten Ströme nicht maskieren, wurden sie nachträglich durch Anwendung eines digitalen 50 Hz Tiefpassfilters entfernt. Um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurde dieses Verfahren unabhängig vom Auftreten der transienten Einwärtsströme auf alle Messungen angewendet.

2.2.5. Optischer Messaufbau und Stimulationsapparatur

2.2.5.1. IR-Kontrastoptik

Die Anforderung an den Messaufbau bestand darin, elektrophysiologische Ableittechnik mit einer Stimulationsvorrichtung zu kombinieren, die eine Charakterisierung der rezeptiven Feldeigenschaften und eine angepasste Stimulation der Ganglienzellen ermöglicht (**Abb. 5**). Es wurde ein aufrechtes Mikroskop mit 40fach-Wasserimmersionsobjektiv (NA 0,8) verwendet, das in die temperierte Badlösung eintauchte. Die Durchlichtbeleuchtung musste mit IR-Licht erfolgen, um die Retina nicht zu bleichen und lichtempfindlich zu erhalten. Dazu wurde ein IR-Longpassfilter („Schott RG850“, Fa. ITOS, Mainz) an der Leuchtfeldblende angebracht.

Die Ganglienzellen wurden durch eine differenzielle Interferenz-Kontrastoptik (engl.: differential interference contrast, DIC) dargestellt. Dazu wurde IR-Licht linear polarisiert und mit einem doppelt brechenden Prisma in zwei parallele Strahlenbündel aufgeteilt (DIC-Prisma I). Die beiden Strahlenbündel durchlaufen das Präparat somit leicht räumlich versetzt. Durchlaufen sich entsprechende Strahlen der beiden Bündel optische Medien unterschiedlicher Dichte (z.B. Zytoplasma und Extrazellulärraum), so kommt es zu einer Phasenverschiebung zwischen diesen Strahlen. Durch ein zweites DIC-Prisma, das die beiden Strahlenbündel wieder vereint, interferieren sich entsprechende Strahlen und die Phasenunterschiede führen zu Intensitätsunterschieden im Durchlichtbild. Diese Art der Kontrastoptik vermittelt einen präzisen räumlichen Eindruck des betrachteten Präparats, der für Patch-Clamp-Ableitungen von großem Vorteil ist.

Um eine solche Optik mit IR-Licht ($\lambda > 850$ nm) zu realisieren, wurden speziell gefertigte Strahlenteilerwürfel verwendet (Fa. B. Halle, Berlin). Sie wirken als IR-Polarisatoren/-Analysatoren. Um das Durchlichtbild sichtbar zu machen, wurde eine IR-empfindliche CCD-Kamera („BC-2 schwarz/weiß“, Fa. AFT-Horn, Aalen) benutzt und das Signal auf einem s/w-Monitor („WV-5410“, Fa. Panasonic Deutschland, Hamburg) dargestellt.

2.2.5.2. Projektion der Lichtreize

Zur Lichtstimulation der Ganglienzellen wurde ein PC-gesteuerter Röhrenmonitor (17 Zoll) verwendet, dessen Bild mit einem 35 mm-Fotoobjektiv von der Seite auf die spiegelnde Grenzfläche des unteren IR-Strahlenteilerwürfels projiziert wurde. Durch den Kondensor wurde das Stimulationsbild scharf in die Ebene der Photorezeptoren abgebildet.

Zur Steuerung des Monitors diente eine nicht-kommerzielle Stimulationssoftware („QDS 2.0“, Dr. T. Euler, MPI für med. Forschung, Heidelberg), die auf einem Standard-PC (Pentium II 800 MHz, MS Windows XP) ausgeführt wurde. Die QDS-Software erlaubt die im ms-Bereich zeitgenaue Projektion von zweidimensionalen geometrischen Formen unterschiedlicher Größe. Die Projektion des Stimulationsmusters kann μm -genau variiert werden. Die nutzbare Projektionsfläche entsprach in der Photorezeptorebene $2 \times 2 \text{ mm}$. Sowohl stationäre, als auch bewegte Muster sind darstellbar. Es wurden ausschließlich schwarz-weiß Muster verwendet. Die einzelnen Stimulationssequenzen sind mit Hilfe einer Skriptsprache programmierbar und wurden selbst erstellt. Eine D/A-Wandler Karte („PCI-DIO24“, Fa. Plug-In Elektronik, Eichenau) synchronisierte Stimulations-PC und Datenerfassungssystem. Mit Hilfe verschiedener Stimulationssequenzen wurden Position und Größe des rezeptiven Feld-Zentrums der Ganglienzelle ermittelt und anschließend ein optimaler Zentrumsreiz appliziert (siehe **Kap. 3.3.1.1.**).

2.2.5.3. Kalibrierung der Stimulationsapparatur

Um vergleichbare Messungen zu erhalten, muss die Lichtintensität der Stimulation während des Experiments unverändert bleiben. Mit einem Leuchtdichtemessgerät („LS-100“, Fa. Konika-Minolta, Langenhagen) wurde die Helligkeit des Stimulationsmonitors zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Anschalten gemessen (**Abb. 6 A**). Nach 40 min stabilisierte sich die Leuchtdichte auf einen Wert von 84 Cd/m^2 . Der Monitor wurde darum mindestens eine Stunde vor der Durchführung von Experimenten eingeschaltet.

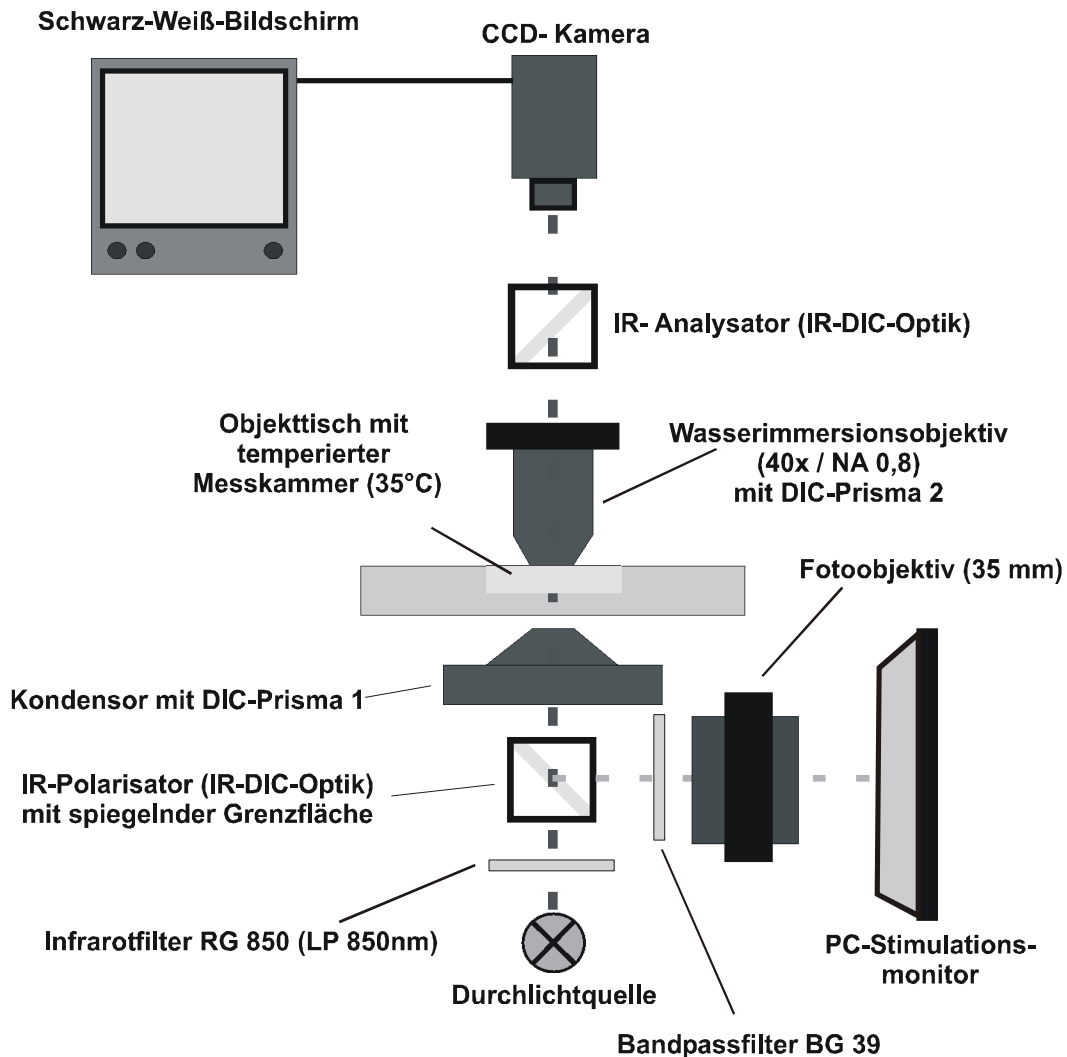


Abb. 5: Optik des Messaufbaus.

Der Messstand verfügt über eine IR-Kontrastoptik. Das Bild wird über eine IR-empfindliche CCD-Kamera sichtbar gemacht. Über eine spiegelnde Grenzfläche wird das Bild des Stimulationsmonitors durch den Kondensor auf das Präparat projiziert. Das Präparat befindet sich am Boden der Messkammer.

Zur Überprüfung der homogenen Ausleuchtung und korrekten Projektion der Leuchtmuster wurde gemessen, ob sich die Strahlungsleistung in der Objektebene linear mit der Fläche des projizierten Musters ändert (**Abb. 6 B**). Dazu wurden helle Leuchtpunkte unterschiedlichen Durchmessers auf schwarzem Hintergrund projiziert und die Strahlungsleistung mit einem Radiometer (Model 70260, Fa. LOT-Oriel, Darmstadt) in der Objektebene gemessen. Im zentralen Projektionsfeld (bis 1000 μm Leuchtpunktdurchmesser) verhält sich die Leistung nahezu linear zur Fläche des Testpunkts (**Abb. 6 B**, 0,8 mm^2). Bei größeren Punkten wurde ein Verlust an Strahlungsleistung pro Fläche beobachtet. Mögliche Erklärung sind Streuverluste oder eine etwas schwächere Monitoremission in der Peripherie. Um die mögliche Restemission des schwarzen Hintergrunds abzuschätzen, wurde die Messung mit einer Blende wiederholt, die die Peripherie des Projektionsmonitors abdeckt. Die

Strahlungsleistung stieg dabei unverändert an, bis die Blende wirksam wurde und blieb dann konstant (**Abb. 6 B**, dreieckige Symbole). Der Anstieg der Strahlungsleistung bei kleinen Punkten verläuft deckungsgleich mit dem Verlauf ohne Blende. Dies zeigte, dass die mögliche Restemission der „schwarzen“ Hintergrundsfläche vernachlässigbar ist.

2.2.5.4. Radiometrische und photometrische Größen

Aus psychophysischen Experimenten am Menschen ist bekannt, dass der Zusammenhang zwischen objektiver Strahlungsleistung (radiometrischer Strahlungsfluss) und subjektivem Helligkeitseindruck (photometrischer Strahlungsfluss) von der Wellenlänge des verwendeten Lichts abhängt. Die so genannte skotopische Lumineszenzfunktion für den dunkeladaptierten Zustand ist in **Abb. 6 D** aufgetragen. Sie ist eine beinahe symmetrische Funktion, die den Bereich von 400 bis 600 nm abdeckt und bei 500 nm ihren Höhepunkt hat. Sie bedeutet, dass bei gleicher Strahlungsenergie grünes Licht vom Menschen als am hellsten empfunden wird, Licht von 350 nm oder 650 nm dagegen kaum noch wahrgenommen werden kann. Es wird angenommen, dass dieser Zusammenhang näherungsweise auch für die visuellen Systeme anderer Säuger gilt. Deshalb werden in neurophysiologischen Untersuchungen Helligkeiten in photometrischen Größen, also unter Berücksichtigung der genannten Lumineszenzfunktion berechnet. Um eine Leistungsmessung der Stimulationsapparatur richtig interpretieren zu können, muss in einem ersten Schritt das Emissionsspektrum des Stimulationsmonitors abgeschätzt werden. Mit einer Reihe von schmalen Bandpassfiltern (Fa. Omega Optical, Brattleboro, USA) wurde das Emissionsspektrum eines weißen Punktes in der Objektebene des Mikroskops bestimmt. Die Messung ergab ein Emissionsmaximum im grünen Bereich (bei ca. 500 nm) und eine weitere starke Emission im langwelligen Spektrum (**Abb. 6 C**, dreieckige Symbole). Um möglichst nur physiologisch wirksames Licht zur Stimulation zu verwenden, wurde ein Bandpassfilter („Schott BG39“, Fa. ITOS, Mainz) in den Strahlengang eingeführt (**Abb. 5**), der den UV- und IR-Bereich ausschließt. Berücksichtigt man dessen Transmissionsfunktion, nähert sich die Monitoremission sehr stark der skotopischen Lumineszenzfunktion an (**Abb. 6 C**, viereckige Symbole, vergleiche mit **Abb. 6 D**).

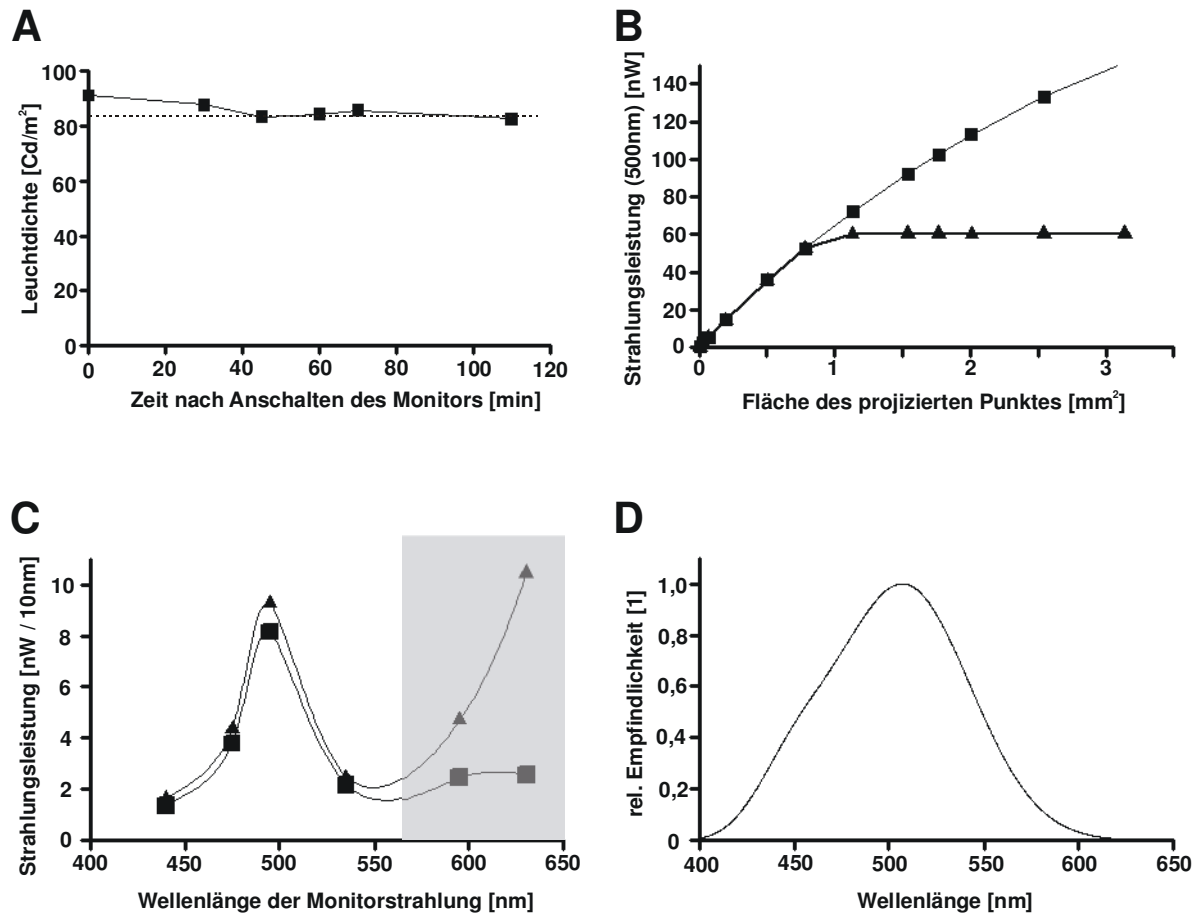


Abb. 6: Vermessung der Stimulationsapparatur.

A: Zeitverlauf der Emission des Stimulationsmonitors nach dem Einschalten.

B: In der Objektebene des Mikroskops gemessene Strahlungsleistung des Stimulationsmonitors. Es wurden weiße Punkte unterschiedlicher Größe auf schwarzem Hintergrund abgebildet (quadratische Symbole). Wird die Peripherie des Stimulationsmonitors abgedeckt, bleibt die Strahlungsleistung bei größeren Punkten unverändert (dreieckige Symbole). Der Zusammenhang Fläche zu Strahlungsleistung ist für Punkte mit $r < 1000 \mu\text{m}$ nahezu linear.

C: Emissionsspektrum des Stimulationsmonitors, vermessen mit schmalen Bandpassfiltern. Neben einem Emissionsmaximum bei 500 nm emittiert der Monitor auch stark im langwelligen Bereich (dreieckige Symbole, grau unterlegter Bereich). Verwendung eines Bandpassfilters (BG 39) nähert das Emissionsspektrum der skotopischen Lumineszenzfunktion an (viereckige Symbole, vergleiche D).

D: Skotopische Lumineszenzfunktion des Menschen. Die Kurve zeigt das relative Helligkeitsempfinden in Abhängigkeit der Wellenlänge im dunkeladaptierten Zustand. Grünes Licht (um 500 nm) wird am hellsten wahrgenommen, Licht $< 400 \text{ nm}$ und $> 600 \text{ nm}$ wird kaum noch wahrgenommen.

Somit konnte die physiologisch wirksame, photometrische Helligkeit des Stimulus bestimmt werden. Die Messung der maximalen Strahlungsleistung eines Lichtpunktes mit Radius $r = 500 \mu\text{m}$ ($A = 7,85 * 10^{-7} \text{ m}^2$) ergab $14,28 \text{ nW}$ ($P_{\text{rad}}(500 \text{ nm})$).

Aus internationalen Konversionsstandards (Wyszecki & Stiles, 2000) ergibt sich für den photometrischen Strahlungsfluss Φ :

$$1/1700 \text{ W} \equiv 1 \text{ skotopisches Lumen [lm]}$$

und damit:

$$\Phi_{\text{MAX}} = 14,28 \text{ nW} \equiv 2,42 * 10^{-5} \text{ lm}$$

Für einen Lichtpunkt mit ($r = 500 \mu\text{m}$) berechnet sich daraus die photometrische Flussdichte E_p in Lux [$\text{lm} / \text{m}^2 = \text{lx}$]:

$$E_p = \frac{\Phi_{\text{MAX}}}{A} = \frac{2,42 * 10^{-5} \text{ lm}}{7,85 * 10^{-7} \text{ m}^2} = 30,8 \text{ lx}$$

Die maximale Helligkeit der Stimulationsapparatur liegt somit im *mesopischen* Bereich. Für das menschliche Empfinden entsprechen $30,8 \text{ Lux}$ etwa einer schwachen Raumbelichtung.

Dabei muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass die Leuchtdichte von $30,8 \text{ Lux}$ im Messstand direkt auf die Photorezeptoren einwirken kann. Deshalb ist die Umrechnung der Stimulationsintensität in eine physiologisch bedeutsame Größe von Vorteil. In der Retinaforschung ist es üblich, die Intensität in die Anzahl der pro Zeit isomerisierten Sehpigmente umzurechnen. Im Falle einer dunkeladaptierten Mausretina also in Isomerisationen von Rhodopsin pro Zeit. Da die Flussdichte flächenbezogen ist, bezieht man die Anzahl der Isomerisationen zusätzlich auf den effektiven Querschnitt eines Photorezeptors.

Aus dem Planckschen Wirkungsquantum berechnet sich der skotopische Photonenfluss zu:

$$1 \text{ skotopisches Lumen (bei } 507 \text{ nm)} \equiv 1,5 * 10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{s}}$$

Daher herrscht bei 30,8 Lux in der Objektebene eine Photonenflussdichte $Q_{\max}$ [Photonen / (s * m²)] von:

$$Q_{\max} = E_P * 1,5 * 10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{s}}$$

$$= 4,62 * 10^{16} \frac{\text{Photonen}}{\text{s} * \text{m}^2}$$

Den effektiven Querschnitt (A_{rod}) eines Stäbchens entnehme ich einer Herleitung von Lyubarski und Kollegen (Lyubarski et al., 2004; deren Formel (8)). Der Wert von 0,67 μm² ist um die Lichtleitereffekte des Photorezeptorinnensegments reduziert, weil in meinem Versuchsaufbau das Licht von der Außenseite der Retina einfällt, also keine Lichtleitereffekte auftreten. So ergibt sich für die maximale Stimulationsintensität eine Isomerisationshäufigkeit I_{rod} [Rh* / s]:

$$I_{\text{rod}} = Q_{\max} * A_{\text{rod}}$$

$$= 4,62 * 10^{16} \frac{\text{Photonen}}{\text{s} * \text{m}^2} * 6,7 * 10^{-13} \frac{\text{m}^2}{\text{Stäbchen}}$$

$$\approx 31000 \frac{\text{Rh}^*}{\text{s} * \text{Stäbchen}}$$

Für die Frequenzuntersuchungen wurde mit 20 ms kurzen Reizen stimuliert. Dadurch reduziert sich die Anzahl der Isomerisationen auf 620 / (Reiz * Stäbchen).

Zur Abschwächung der Stimulationseinheit wurden Neutral-Graufilter-Kombinationen (Fa. ITOS, Mainz) verwendet. Damit wurden zur skotopischen Stimulation eine Intensität von 3,3 Rh* / (Reiz * Stäbchen) eingestellt.

2.3. Immunhistochemische Methoden

2.3.1. Präparation

2.3.1.1. Fixierung

Zur Immunhistochemie wurde in Paraformaldehyd (PA) fixiertes Gewebe verwendet. Die Retina wurde wie beschrieben aus dem Auge isoliert und entweder im Anschluss an elektrophysiologische Untersuchungen oder direkt, für rein histologische Zwecke, in 4 % PA fixiert. Für Ganzretinapräparate und zur Herstellung von Kryostatschnitten betrug die Inkubationszeit 30 min bei RT.

2.3.1.2. Herstellung der Kryostatschnitte

Um Vertikalschnitte der Retina herzustellen, wurde die Retina nach der Fixierung zunächst gefriereschützt. Dazu erfolgte eine einstündige Inkubation in 10 % Saccharose in Phosphatpuffer (PB, siehe **Tab. 1**) bei RT; anschließend eine dreistündige Inkubation in 30 % Saccharose in PB, bei RT. Danach wurde die Retina in Gefriermedium eingebettet („Tissue-Tek“, Fa. Sakura, Zoeterwoude, Niederlande). In einem Kryostaten (2800 Frigocut E, Fa. Reichert-Jung, Nussloch) wurden 20-60 µm dicke Schnitte senkrecht zu den retinalen Schichten hergestellt, auf Objektträgern („Superfrost +“, Fa. Menzel, Braunschweig) aufgenommen und getrocknet.

2.3.2. Antikörperfärbungen

Die immunhistochemischen Färbungen verliefen nach einem Standardprotokoll, das sich je nach Präparat durch verschiedene Inkubationszeiten unterschied (**Tab. 1**). Alle Inkubationen erfolgten bei RT und wurden zum Schutz vor Austrocknung in feuchten Kammern durchgeführt. Zuerst erfolgte der Präinkubationsschritt. Durch Zugabe von 0,5 % Triton-X 100 und 5 % Chemiblocker (Fa. Chemicon International, Hamshire, UK) in PB wurden die Zellmembranen angelöst, um die Penetration in der folgenden Erstantikörper-Inkubation zu verbessern.

Es wurden Erstantikörper zum Nachweis von verschiedenen Retinaproteinen verwendet. Sie wurden der Inkubationslösung in spezifischen Konzentrationen hinzugefügt (**Tab. 2**). Nach einem Waschschrift erfolgte die Zweitantikörperinkubation.

Die Zweitantikörper sind gegen die konstanten Regionen der Erstantikörper gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Somit sind sie geeignet, die Erstantikörper einer bestimmten Spezies sichtbar zu machen (**Tab. 3**). Durch Verwendung von Erstantikörpern aus unterschiedlichen Spezies und Zweitantikörpern mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konnten bis zu drei Antikörperfärbungen parallel durchgeführt werden. Abschließend wurden die Präparate in PB gespült und unter einem Deckglas in Eindeckmedium („Aqua Polymount“, Fa. Polysciences, Warrington, USA) konserviert.

Bei längeren Inkubationszeiten enthielten die Lösungen 0,05 % Natriumazid, um Pilz- und Bakterienwachstum zu verhindern. Zur Analyse und Dokumentation wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) verwendet (**Kap. 2.3.4.**).

Inkubationsschritte	Inkubationslösungen / Inkubationszeiten	
	Kryostatschnitte	Ganzretinapräparat
Waschen 1	PB / 2 x 10 min	PB / 3 x 20 min
Präinkubation	CT / 1 h	CT / 1 h
1.Ak-Inkubation	CTA + 1.Ak / 12 h	CTA + 1.Ak / 3 Tage
Waschen 2	PB / 2 x 10 min	PB / 3 x 20 min
2.Ak-Inkubation	C + 2.Ak / 1 h	CA + 2.Ak / 12 h
Waschen 3	PB / 2 x 10 min	PB / 3 x 20 min

Tab. 1: Inkubationsprotokolle für immunhistochemische Färbungen.

Inkubationslösungen:

PB: Phosphatpuffer mit 19 mM Na_2HPO_4 , 81 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4.

PA: 4 % Paraformaldehyd in PB.

C: 5 % Chemiblocker in PB.

CA: 5 % Chemiblocker, 0,05 % NaN_3 in PB.

CT: 5 % Chemiblocker, 0,5 % Triton-X 100 in PB.

CTA: 5 % Chemiblocker, 0,5 % Triton-X 100, 0,05 % NaN_3 in PB.

Antikörper	Protein/Antigen	Spezies	Verdünnung	Herkunft / Quelle
HCN1	HCN1	Kaninchen	1/400	Alomone, Jerusalem, Israel
N21	HCN2	Meerschwein	1/4000	R. Shigemto, Okazaki, JPN
AK 9496	HCN3	Kaninchen	1/400	M.Biel, München
FPc73K	HCN4	Kaninchen	1/400	A. Scholten, IBI-1, Jülich
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase	Ziege	1/100	Chemicon, Hofheim

Tab. 2: Verwendete Erstantikörper.

Die Erstantikörper wurden in CT bzw. CTA (siehe Tab. 1) verdünnt.

2.3.3. Vertikalschnitte von charakterisierten Ganglienzellen

Retinastücke mit erfolgreich abgeleiteten Ganglienzellen wurden nach Abschluss des Experiments in PA fixiert. Das Biozytin in der abgeleiteten Zelle wird dabei ebenfalls anfixiert. Nach einer Präinkubation wurde das Präparat sofort mit Streptavidin-Alexa 488 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) inkubiert. Biozytin verbindet sich mit Streptavidin zu einem stabilen Komplex, wodurch die abgeleitete Zelle mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 markiert wird. Somit konnte die Lage und Morphologie der Ganglienzelle direkt mit dem konfokalen LSM bestimmt werden. Zur Klassifizierung von Ganglienzellen ist die genaue Kenntnis des Stratifikationsniveaus in der vertikalen Ebene wichtig. Grundsätzlich unterscheidet man ON- und OFF-Ganglienzellen, je nachdem ob sie im inneren (ON-Sublamina) oder äußeren (OFF-Sublamina) Teil der IPL verzweigen. Durch das abschließende Eindecken in Aqua Polymount wird das Ganzretinapräparat in der Vertikalen stark gestaucht (eigene Beobachtung und persönliche Mitteilung von L. Heinze, MPI für Hirnforschung, Frankfurt). Es wurde beobachtet, dass die durchschnittlich mindestens 60 µm dicke IPL nach Konservierung nur noch eine Dicke von ca. 20 µm aufwies. Dies hat zur Folge, dass das Stratifikationsniveau des Dendritenbaums in der IPL trotz Verwendung eines konfokalen LSM nur noch unzureichend analysiert werden kann. Daher wurden Vertikalschnitte der Retinastücke hergestellt. Das vorgefärbte Ganzzellpräparat wurde zurechtgeschnitten, so dass nur der Bereich um die gefärbte Zelle übrig blieb. Das Retinastück wurde nun analog zur Standardprozedur für Kryostatschnitte eingebettet und vertikal geschnitten. Die Schnitte wurden einzeln auf Objektträger aufgenommen. Jeder einzelne Schnitt konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet werden. Schnitte, die

Teile der markierten Zelle enthielten, wurden für die immunhistochemische Färbung verwendet.

2.3.4. Konfokales Scannen / Bildbearbeitung

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Leica DM IRBE, Fa. Leica, Heidelberg) analysiert. Neben einer konventionellen Epifluoreszenzeinrichtung war ein konfokales Laser-Scanning-System angeschlossen (Leica TCS, Fa. Leica, Heidelberg), das über einen Argon- und zwei Helium/Neon-Laser verfügte. Zur Anregung wurden Laserlinien der Wellenlängen 488, 543 und 633 nm verwendet, so dass bis zu drei Färbungen in einem Präparat ausgewertet werden konnten. Bei Mehrfachfärbungen wurden alle Fluoreszenzfarbstoffe einzeln (sequentiell) angeregt und detektiert. Die Fluoreszenz verschiedener Farbstoffe innerhalb eines Präparats konnte in einem RGB-Falschfarbenbild dargestellt werden. Damit kann die räumliche Lage verschiedener Epitope zueinander beurteilt werden (Kokalisation stellt sich dabei als RGB-Mischfarbe dar).

Durch die konfokalen Blenden erreicht das System bei Verwendung eines 63x Ölimmersionsobjektivs auch in der Vertikalen eine räumliche Auflösung von unter einem μm (sog. optischer Schnitt). Strukturen, die sich über mehrere optische Schnitte erstreckten, wurden in Form eines Bildstapels, einer so genannten Maximalprojektion dargestellt. Kontrast und Helligkeit der Bilder wurden zum Teil mit Bildbearbeitungssoftware (Adobe Photoshop, siehe **Kap. 2.6, Tab. 5**) nachbearbeitet.

Zweitantikörper	Verdünnun	Anregung	Emission	Herkunft / Quelle
d α gt Alexa 488	1/500	488 nm	500-550 nm	Molecular Probes, Leiden, NL
d α gp Cy 3	1/800	543 nm	580-640 nm	Dianova, Hamburg
d α gt Alexa 647	1/200	633 nm	670-760 nm	Molecular Probes, Leiden, NL
Streptavidin Alexa 488	1/1000	488 nm	500-550nm	Molecular Probes, Leiden, NL

Tab. 3: Verwendete Zweitantikörper.

Die Zweitantikörper wurden in C bzw. CA (siehe Tab. 1) verdünnt. α : anti; d: donkey; gt: goat; gp: guinea pig.

2.4. Messungen cornealer Elektroretinogramme (ERG)

Das ERG ist eine einfache nicht-invasive Methode zur Messung retinaler Funktion. Sie spielt daher eine große Rolle in der Humandiagnostik. Um grundlegende Auswirkungen des Verlusts von HCN1-Kanälen auf die Signalverarbeitung in der Retina zu untersuchen, wurden ERGs der Netzhaut der HCN1-Knock-out-Tiere mit denen von Kontrolltieren verglichen. Die Messungen wurden an der Universitätsaugenklinik in Tübingen in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Seeliger und Herrn Dr. Tanimoto durchgeführt.

2.4.1. Dunkeladaptation und Narkose

Die Mäuse wurden vor dem Versuch mindestens 12 Stunden dunkeladaptiert. Die Experimente wurden bei schwacher Rotlichtbeleuchtung durchgeführt. Vor dem Experiment wurden die Mäuse gewogen. Durch subcutane Injektion von 20 mg / kg Xylazine und 40 mg / kg Ketamin in physiologischer Kochsalzlösung wurden die Mäuse narkotisiert.

Vor der Messung wurden die Augen durch Augentropfen mit 1 % Atropin und 0,5 % Tropicamid (Fa. Stulln Pharma, Stulln) behandelt, um die Iris vollständig aufzuweiten und das Austrocknen der Cornea zu verhindern. Während des Experiments und danach wurden die Augen mit Methylcellulose-Gel behandelt (Methocel 2 %, Fa. Novartis, Frankfurt/Main), um Verschmutzung und Austrocknen der Cornea zu verhindern.

2.4.2. Messaufbau

Die narkotisierten Tiere wurden auf eine 25 °C Wärmeplatte gelegt, um ein Auskühlen des Tieres zu verhindern. Die Ableitelektroden bestanden aus Goldringen, die an der Spitze von Positionierungsarmen angebracht waren. Die Goldringe wurden in direkten Kontakt zur Cornea gebracht, um das ERG abzuleiten. Als Referenz- und Erdungselektrode dienten zwei Stahlkanülen, die am Kopf und an der Schwanzwurzel der Maus vorsichtig unter die Haut geschoben wurden (**Abb. 7**).

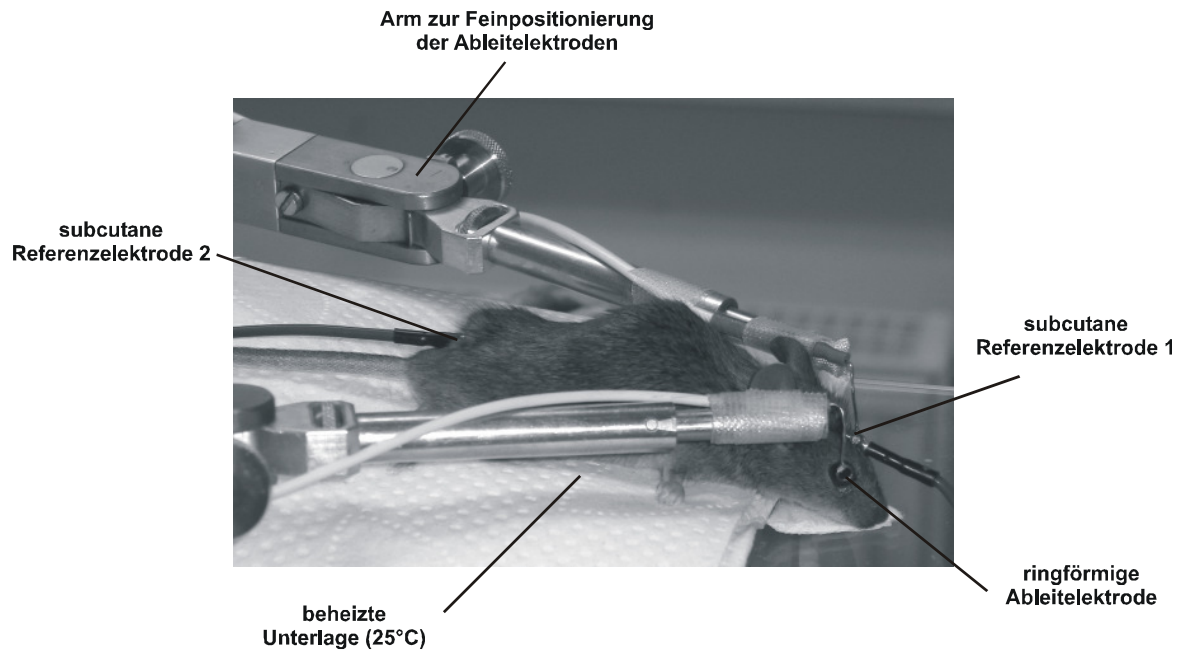


Abb. 7: Narkotisiertes Versuchstier mit positionierten ERG-Elektroden.

So vorbereitet wurde die Maus auf einem beweglichen Schlitten in die Stimulationsvorrichtung in Form einer Hohlkugel geschoben (**Abb. 8**).

Das Gesamtsystem aus Steuerung, Stimulationseinheit und Datenaufzeichnung der ERGs wird kommerziell für die augenärztliche Diagnostik hergestellt („Multilinear Vision“ Fa. Jaeger-Toennis, Höchberg).

2.4.3. Die Stimulationseinheit

Die Stimulationseinheit ist eine weiße Hohlkugel („Ganzfeldkugel“), die von innen durch eine Blitzlampe und ein kontinuierliches Hintergrundlicht beleuchtet werden kann. Durch die Anordnung der Lampen und die reflektierende Innenseite der Kugel wird eine gleichmäßige Helligkeit erzielt („Ganzfeld-Beleuchtung“). Bei Messungen, die im dunkeladaptierten Zustand vorgenommen wurden, wurde kein Hintergrundlicht appliziert. Die Stimulation erfolgte durch ca. 50 μ s kurzes Aufleuchten der Blitzlampe. Die Intensität der Stimulation wird in Form der zeitlich integrierten Leuchtdichte angegeben und variierte zwischen 0,1 mCds/m^2 und 25000 mCds/m^2 .

Vor Messungen an helladaptierten Retinae wurde das Versuchstier zunächst 10 Minuten lang einer konstanten Hintergrundhelligkeit der Leuchtdichte 30 Cd/m^2 ausgesetzt. Die

Blitzstimulation erfolgte danach zusätzlich zum Hintergrundlicht. Die Helligkeitsangaben der zeitlich integrierten Leuchtdichte eines kurzen Lichtblitzes können nicht in die Angaben zu den *in vitro*-Versuchen umgerechnet werden, da diese aus einer kontinuierlichen Messung stammen. Zur Abschätzung der Helligkeit wurden daher die ERG-Potentiale von Kontrollmessungen bei bekannter Stimulationsintensität mit Daten aus der Literatur verglichen. Den Publikationen (Pugh et al., 1998; Lyubarski et al., 2004) liegen aufwendige Kalibrierungen zu Grunde. Das Auftreten der skotopischen A-Welle bzw. von oszillatorischen Potentialen im ERG erfolgte nach eigenen Beobachtungen immer zuverlässig bei einer bestimmten Stimulationsintensität. Der Vergleich der Literaturdaten mit den eigenen Messungen (vergleiche **Abb. 16** mit Pugh et al., 1998 und Robson et al., 2004) ergibt, dass einer Blitzintensität von 10 mCds/m^2 etwa 30 Rhodopsinisomerisationen/Stäbchen entsprechen. Dieser Wert wurde als Umrechnungsfaktor für alle vergleichenden Betrachtungen herangezogen.

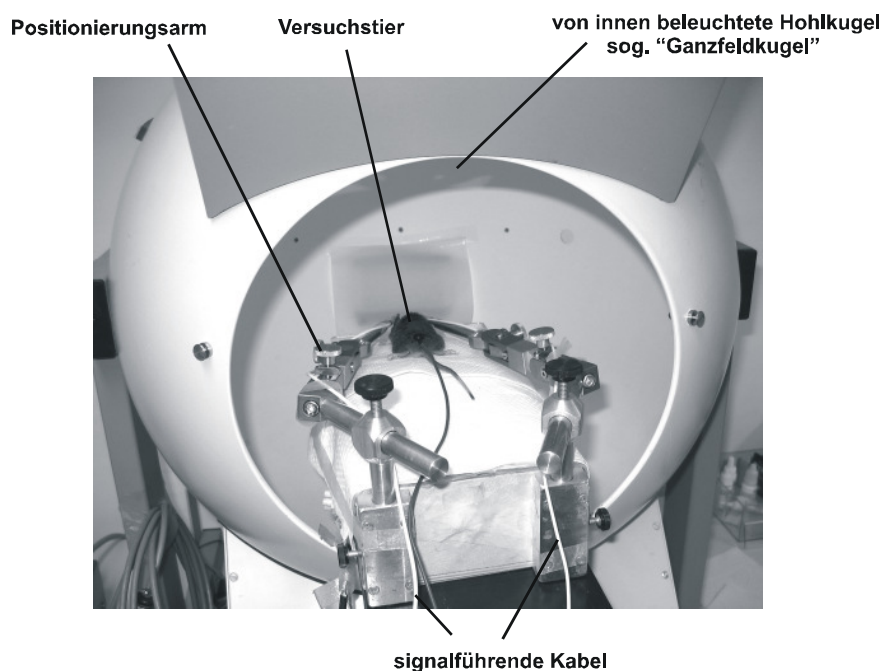


Abb. 8: Versuchstier, in der Stimulationsapparatur positioniert (sog. „Ganzfeldkugel“).

2.4.4. Datenaufzeichnung

Die ERGs wurden 10000-fach verstärkt und bandpassgefiltert (0,3-300 Hz). Die Abtastrate der digitalen Datenaufzeichnung war je nach Stimulationsprogramm 2-5 kHz. Jede Messung bestand aus 10 Reizapplikationen im Abstand von 10s. Es wurde nur die gemittelte Antwort abgespeichert. Bei Frequenzreihen liegen der gemittelten Antwort je nach Frequenz bis zu 100 Einzelreize zugrunde.

2.4.5. Grundlagen des cornealen Elektretinogramms

Das ERG des Säugerauges stellt eine extrazelluläre Summenableitung der gesamten Retina dar. Nach allgemeinem Verständnis liegen den Signalen die Ionenströme zwischen unterschiedlichen Schichten der Retina zu Grunde. Diese summieren sich durch die parallele Anordnung gleichartiger Zelltypen (z.B. Photorezeptoren und Bipolarzellen) auf. Dadurch entstehen elektrostatische Felder zwischen der Cornea und der Augenseite bzw. einem Referenzpotential. Diese Spannungsunterschiede betragen einige hundert μV . Bei Belichtung der Retina ändern sich die Membranströme bestimmter Zellklassen und führen somit zu einer Spannungsänderung, die einen stereotypen Verlauf hat. Die wichtigsten Elemente der ERG-Antwort einer Maus sind die A-Welle und B-Welle (**Abb. 9 A**). Die A-Welle ist eine Spannungsänderung in negativer Richtung. Sie wird der Aktivität von Photorezeptoren zugeschrieben. Die B-Welle ist eine darauf folgende Spannungsänderung in positiver Richtung. Sie reflektiert die Aktivität von Bipolarzellen. Eine umfassende Übersicht bietet Pugh et al. (1998).

2.4.5.1. Die A-Welle

Grundlage für die A-Welle ist der sog. Dunkelstrom in Photorezeptoren. Im Dunkeln sind CNG-Kanäle in den Außensegmenten der Photorezeptoren geöffnet. Durch die CNG-Kanäle strömen Natrium- und Kalziumionen ein. Diesem Einwärtsstrom steht ein Auswärtsstrom am Innensegment und am Axonterminalsystem gegenüber, der durch Kaliumionen getragen wird (**Abb. 9 B**, oben links, roter Pfeil). Der extrazelluläre Fluss der Ionen verläuft von der Quelle (Axonterminalsysteme) zur Mündung (Außensegmente). Quelle und Mündung sind räumlich

voneinander getrennt. Da das Extrazellulärmedium einen elektrischen Widerstand hat, fällt längs der Strecke eine Spannung ab, die zur Innenseite der Retina hin positiv ist.

Wird der Photorezeptor belichtet, schließen die CNG-Kanäle und der zirkuläre Dunkelstrom wird kleiner (**Abb. 9**, oben rechts, blauer Pfeil). Die positive Spannung entlang des Photorezeptors verringert sich. Daher wird auf der Innenseite der Retina, an der cornealen ERG-Elektrode eine Spannungsänderung in negativer Richtung gemessen (A-Welle, **Abb. 9 A**).

2.4.5.2. Die B-Welle

Das Auftreten der B-Welle ergibt sich analog zu den Vorgängen an Photorezeptoren. Auch die Bipolarzellen sind senkrecht zur retinalen Schichtung ausgerichtet. Da für die Ausbildung der extrazellulären Spannung Quelle und Mündung des Stroms voneinander getrennt sein müssen, spielen Bipolarzellen mit langen Axonen, also ON-Bipolarzellen (Stockton & Slaughter, 1989; Tian & Slaughter, 1995) die wesentliche Rolle. Bei den ON-Bipolarzellen besteht die Quelle im Einstrom von Natrium-Ionen im Bereich der Dendriten. Der ausgleichende Kalium-Ausstrom vollzieht sich verstärkt im Bereich des Axonterminalsystems. Der zirkuläre Strom steigt im Gegensatz zu den Photorezeptoren bei Belichtung an (**Abb. 9**, rechts unten). Die positive Spannung auf der Innenseite der Retina nimmt somit zu. Da die Reaktion der Bipolarzellen von der Glutamatausschüttung der Photorezeptoren abhängt, folgt die B-Welle der A-Welle mit kurzer Verzögerung.

2.4.5.3. Oszillatorische Potentiale

Bei der Messung von Maus-ERGs treten zusätzlich so genannte „oszillatorische Potentiale“ auf, die als Abweichung vom Grundverlauf der B-Welle zu erkennen sind (**Abb. 9 A**). Obwohl Spezies-spezifische Unterschiede beschrieben wurden (zur Übersicht: Wachtmeister, 1998), gilt als sicher, dass oszillatorische Potentiale die Folge von Rückkopplungsmechanismen sind, an denen Amakrinzellen und Ganglienzellen beteiligt sind. In meinen Untersuchungen wurden die oszillatorischen Potentiale durch die Anwendung eines digitalen 25 Hz-Gauß-Filters isoliert und getrennt ausgewertet (siehe **Kap. 3.2.**, **Abb. 15**).

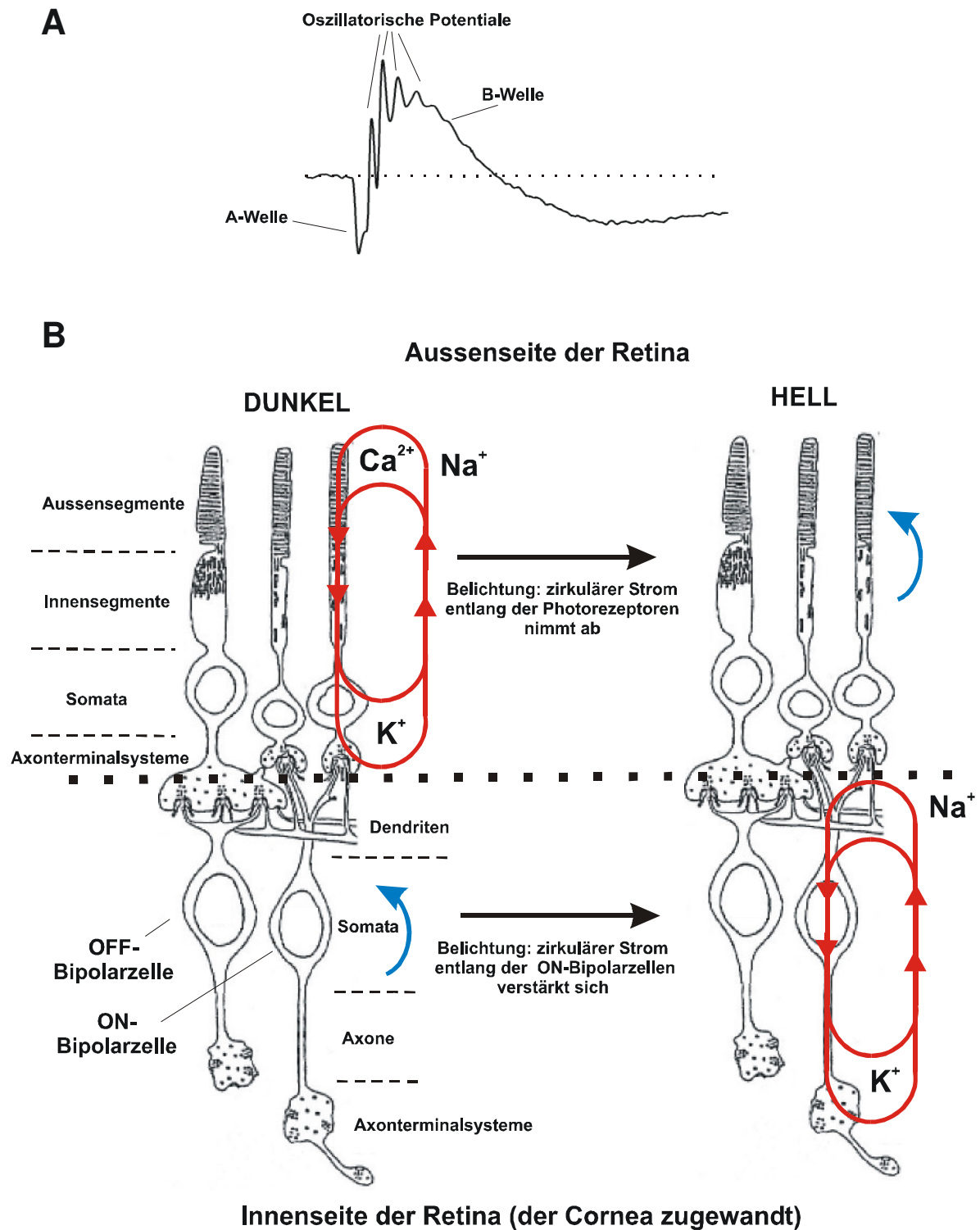


Abb. 9: Komponenten und Ursachen des Maus-ERGs.

A: Typischer Verlauf des Maus-ERGs.

B: Diagramm zeigt Vorgänge in der Photorezeptorschicht (oben) und der Bipolarzellschicht (unten). Die Situation im Dunkeln (links) und bei Belichtung (rechts) wird verglichen. Die starke Ausprägung von zirkulären Strömen ist durch rote Pfeile gekennzeichnet, ihre schwache Ausprägung bzw. Abwesenheit mit blauen Pfeilen. Abbildung verändert nach Pugh et al. (1998).

2.5. Lösungen

Für histologische Zwecke wurde die Retina in HEPES-gepufferter Hanks-Lösung präpariert. Für elektrophysiologische Untersuchungen wurde Ames-Medium als Extrazellulärlösung verwendet. Die Zusammensetzung des Ames-Mediums ist speziell auf die physiologischen Bedürfnisse von retinalem Gewebe abgestimmt und wird durch Zusatz von Natriumhydrogencarbonat und intensivem Begasen mit Carbogen gepuffert. Neben den unten genannten Hauptbestandteilen enthält Ames-Medium eine Vielzahl von Zusätzen (Aminosäuren, Vitamine, Spurenelemente) auf deren vollständige Auflistung hier verzichtet wird. Die Intrazellulärlösung (Lösung in der Patch-Elektrode) basiert auf Kaliumglukonat ($\text{KC}_6\text{H}_{11}\text{O}_7$), um das Umkehrpotential für Cl^- möglichst physiologisch zu belassen. Alle Lösungsbestandteile bzw. das Ames-Medium wurden von der Fa. Sigma-Aldrich bezogen.

Substanzen	Extrazelluläre Lösung Hanks-Lösung [mM]	Extrazelluläres Ames Medium [mM]	Intrazelluläre Lösung [mM]
NaCl	147	120	10
$\text{KC}_6\text{H}_{11}\text{O}_7$	-	-	126
KCl	5,4	3,1	4
KPO_4	-	0,5	-
CaCl_2	0,8	1,7	1
MgCl_2	1,25	1,4	1
HEPES	10		10
D-Glukose	5,6	5,5	-
Phenolrot	0,03	-	-
EGTA	-	-	10
ATP (1mol Mg^{2+} /mol)	-	-	1
GTP (3 mol Na^+ /mol)	-	-	1
Biozytin	-	-	10
NaHCO_3	-	22,1	-
	-	inkl. verschiedener Zusätze, wie Aminosäuren	-
	pH 7,4; mit NaOH eingestellt	pH 7,4; mit NaHCO_3 und Carbogen bei 35°C eingestellt	pH 7,2 ; mit KOH eingestellt

Tab. 4: Auflistung der Hauptbestandteile der verwendeten Lösungen.

Die Nernst-Potentiale für die Hauptionensorten bei Verwendung von Ames als extrazellulärem Medium und einer Temperatur von 35 °C sind: $E_N(\text{Na}^+) = 64 \text{ mV}$, $E_N(\text{K}^+) = -95 \text{ mV}$, $E_N(\text{Cl}^-) = -53 \text{ mV}$.

2.6. Software

Zum Aufzeichnen und Auswerten der Daten, Erstellen der Abbildungen und Anfertigen dieser Dissertation verwendete ich folgende Software:

Software	Zweck / Verwendung	Hersteller
DOS 6.22	Betriebssystem (E- Physiologie)	Microsoft
Windows XP	Betriebssystem	Microsoft
pClamp v.6 und v.8	Datenerfassung / -auswertung	Molecular Devices
IGOR Pro 5	Datenauswertung	Wavemetrics
QDS v. 2.0	Stimulationssoftware	Dr. Thomas Euler
Excel 2002	Datenauswertung	Microsoft
SigmaPlot 8.0	Datenauswertung	SPSS
CorelDraw 10	Bildbearbeitung / Satz	Corel
Photoshop 7.0	Bildbearbeitung	Adobe
Word 2002	Textverarbeitung	Microsoft
Reference Manager 11	Literaturdatenbank	Thompsen ISI Research Soft

Tab. 5: Auflistung der verwendeten Software.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der HCN-Expression in Knock-out und Wildtyp

Um die Bedeutung des HCN1-Kanals für die retinale Signalverarbeitung zu untersuchen, wurde eine transgene Mauslinie verwendet, die keine funktionellen HCN1-Kanäle exprimiert (sog. Knock-out-Mäuse, siehe **Kap. 2.1.**).

Von solchen Mäusen wurde zuvor ein motorisches Defizit berichtet. Elektrophysiologische Untersuchungen konzentrierten sich in diesem Zusammenhang auf die Eigenschaften von Purkinje-Zellen im Cerebellum (Nolan et al., 2003). Visuelle Leistungen wurden bisher nicht untersucht.

Bei den Knock-out-Mäusen handelt es sich um einen konventionellen Knock-out, das heißt die Tiere besitzen zu keinem Zeitpunkt ihrer Entwicklung funktionelle HCN1-Kanäle.

Eignen sich solche Tiere, um sie auf Veränderungen in der Signalverarbeitung der Retina zu untersuchen? Es ist denkbar, dass aufgrund des Fehlens von HCN1 die Entwicklung der Retina beeinträchtigt ist. In einem solchen Fall würden Untersuchungen zur retinalen Funktion keine Effekte beschreiben, die auf das unmittelbare Wirken der HCN1-Kanäle zurückzuführen sind. Da in Vertebraten Gene für vier HCN-Isoformen vorliegen, muss außerdem überprüft werden, ob im HCN1-Knock-out andere Isoformen die Rolle von HCN1 übernehmen. Vielleicht gibt es eine Kompensation, so dass andere Isoformen verstärkt gebildet werden, wenn die Expression von HCN1 ausfällt. Deshalb wurden immunhistochemische Methoden angewendet, um die HCN-Expression in der Retina der Versuchstiere zu untersuchen. Die grundlegende immunhistochemische Charakterisierung der Retina meiner Versuchstiere wurde im Labor von Dr. F. Müller durchgeführt. Sie waren nicht Bestandteil meiner Arbeit und dienten zur allgemeinen Beurteilung des normalen, voll entwickelten Status der Retina. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist, dass die Versuchstiere in Bezug auf die Expression typischer retinaler Proteine keine Besonderheiten aufweisen. Die Ausbildung der retinalen Schichtung und die Ausbildung der Neuronenpopulationen sowie ihrer Verbindungen ist offenbar normal (persönliche Mitteilung F. Thiel, A. Mataruga, Dr. F. Müller).

Zur immunhistochemischen Lokalisation von HCN-Kanälen standen mir mono- und polyklonale Antikörper zur Verfügung. Sie wurden auf 20 µm dicken Vertikalschnitten der Retina von Kontroll- und Knock-out-Tieren verwendet und mit Zweitantikörpern sichtbar

gemacht (siehe **Kap. 2.3.2.**). Dabei werden im Folgenden Wildtyp- und Knock-out-Färbungen gegenübergestellt. Es wurden jeweils drei Retinae aus drei einzelnen Tieren der Wildtyp- bzw. Knock-out-Zucht präpariert und immunocytochemisch gefärbt. Das Expressionsmuster der einzelnen HCN-Isoformen wird durch ein repräsentatives Färbeergebnis dokumentiert.

3.1.1. Immunhistochemie für HCN1

Die Färbung gegen HCN1 zeigt im Wildtyp eine breite HCN1-Expression (**Abb. 10 A**). In der äußeren Retina ist in der Übersicht eine sehr kräftige Färbung im Bereich der Photorezeptoren zu erkennen. Innensegmente, die Somata in der äußeren nukleären Schicht und die Axonterminalsysteme in der äußeren plexiformen Schicht werden angefärbt. Die Außensegmente werden nicht markiert. In der inneren Retina sind ebenfalls nukleäre und plexiforme Schicht HCN1-positiv. Zur genaueren Betrachtung ist eine Detailaufnahme in **Abb. 11** gezeigt.

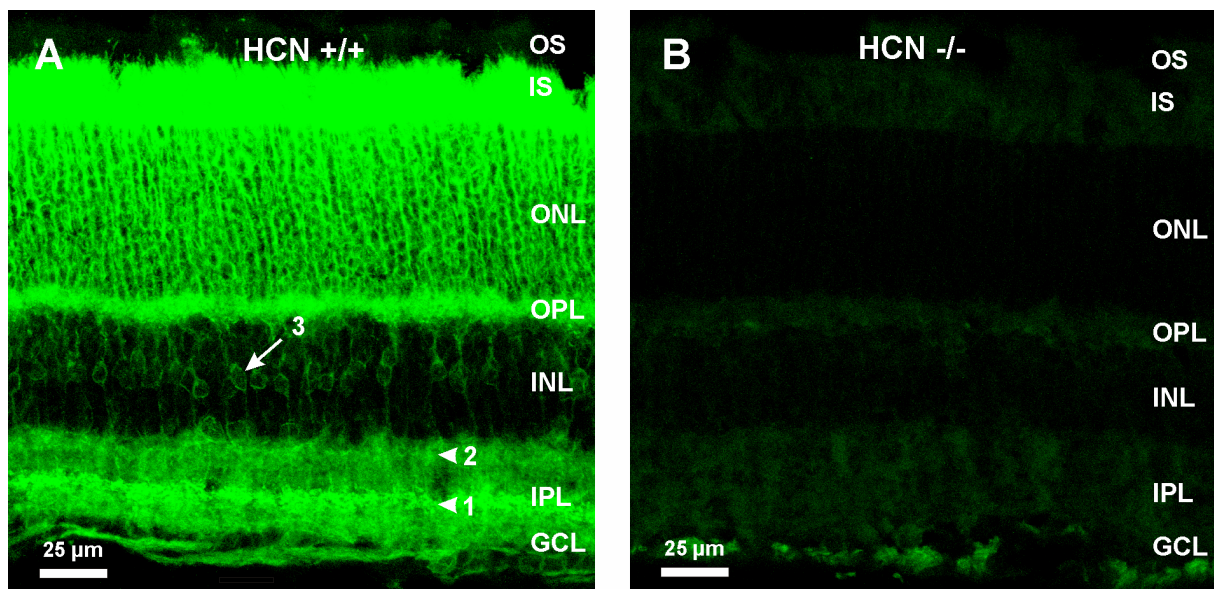


Abb. 10: Übersichtsfärbung gegen HCN1.

A: Im Wildtyp zeigt sich eine breite Expression von HCN1 in der äußeren Retina (OPL, ONL, IS). Nur die Außensegmente der Photorezeptoren sind nicht angefärbt. Innere Retina: Die gesamte IPL ist HCN1-positiv. Es zeichnen sich verstärkt gefärbte Banden ab (Pfeilköpfe 1 und 2). In der INL sieht man gefärbte Zellkörper (Pfeil 3). Am inneren Rand fallen Nervenfaserbündel der Ganglienzellen auf. Details siehe Abb. 11.

B: Erwartungsgemäß findet sich in der Retina des HCN1-Knock-out keine HCN1-Immunreaktion. Die schwache Färbung von OPL und IPL sowie die leicht gefärbten Nervenfaserbündel sind auf unspezifische Bindung von Zweitantikörper bzw. eine Kreuzreaktion des Zweitantikörpers zurückzuführen.

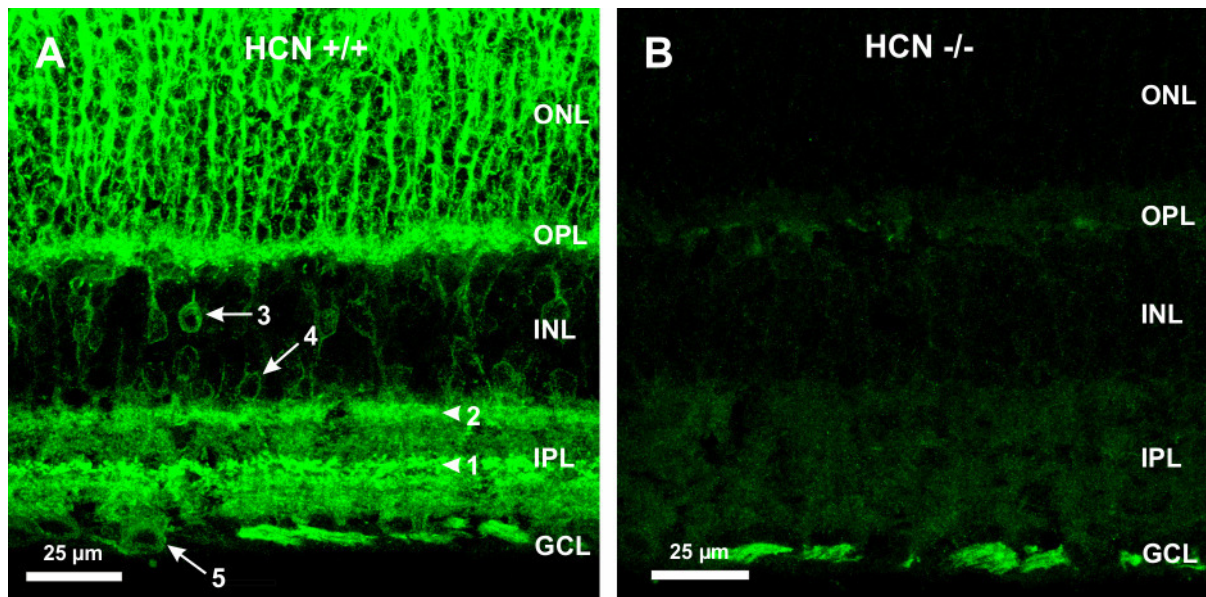


Abb. 11: Immunhistochemische Färbung gegen HCN1.

A: Im Wildtyp kommt HCN1 in der INL in Bipolarzellen (Pfeil 3) und Amakrinzellen (Pfeil 4) vor. In der IPL sind neben einer allgemeinen Färbung Banden zu erkennen. Am stärksten wird eine Bande in der Mitte der IPL markiert (Pfeilkopf 1), eine etwas schwächere am äußeren Rand (Pfeilkopf 2). In der GCL sind Membranfärbungen großer Zellkörper, wahrscheinlich von Ganglienzellen zu finden (Pfeil 5). Nervenfaserbündel sind ebenfalls HCN1-positiv.

B: Im Knock-out findet sich keine spezifische Färbung für HCN1. Die schwache Färbung von OPL und IPL sowie die leicht gefärbten Nervenfaserbündel sind auf unspezifische Bindung von Zweitantikörper bzw. eine Kreuzreaktion des Zweitantikörpers zurückzuführen.

Abb. 11 zeigt die HCN1-Färbung in der inneren Retina. In der Mitte der IPL befindet sich eine sehr starke Bande (Pfeilkopf 1), im äußeren Teil eine schwächere (Pfeilkopf 2). Der Rest der IPL ist diffus gefärbt. In der INL kann man klare Membranfärbungen von Zellkörpern und dendritischen Fortsätzen ausmachen. Die Lage der Zellkörper legt nahe, dass es sich um Bipolarzellen (Pfeil 3) und Amakrinzellen (Pfeil 4) handelt. Auch in der Ganglienzellschicht finden sich gefärbte Zellkörper (Pfeil 5) und Nervenfaserbündel der Ganglienzellen.

Die Retina im Knock-out (**Abb. 11 B**) zeigt erwartungsgemäß keine spezifische Färbung. Die Färbung der Nervenfaserbündel ist auf eine Kreuzreaktion des Zweitantikörpers zurückzuführen.

Aus weiterführenden immunhistochemischen und elektrophysiologischen Untersuchungen ist zwischenzeitlich bekannt, dass es sich bei der Bande 1 um die Axonterminalsysteme der Typ-5-Bipolarzelle handelt. Bande 2 wird vermutlich durch Dendriten von Amakrinzellen gebildet (eigene Untersuchungen und persönliche Mitteilung F. Thiel).

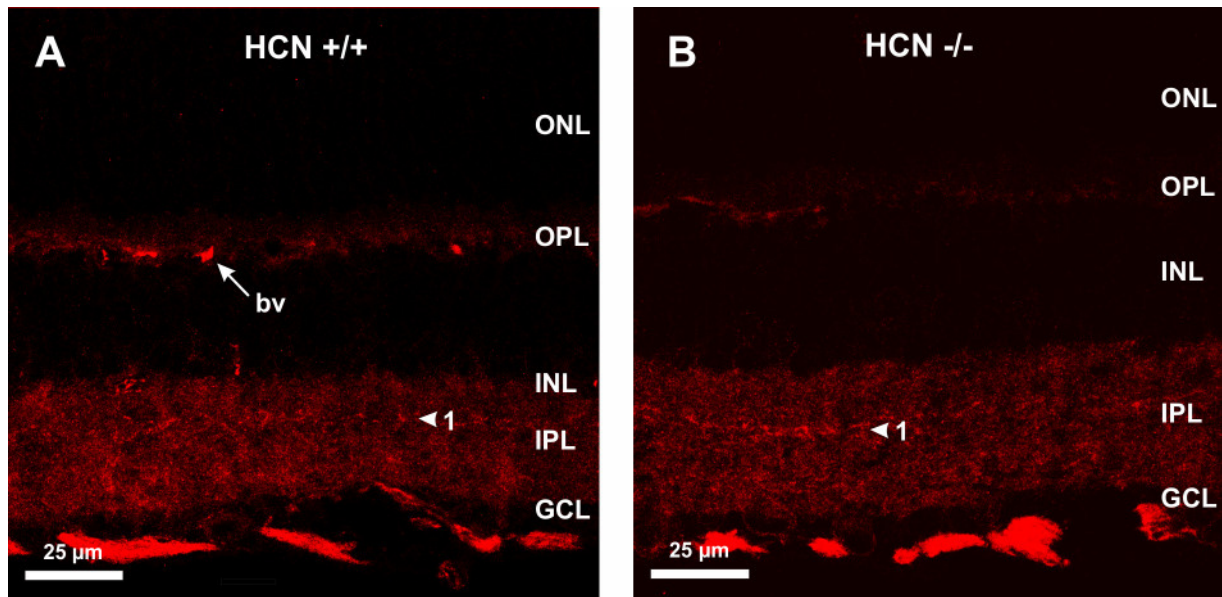


Abb. 12: Immunhistochemische Färbung gegen HCN2.

A: Die IPL der Wildtyp-Retina zeigte schwache punktuelle Färbung durch den Antikörper gegen HCN2. Neben Nervenfaserbündeln (unterhalb der GCL) werden wenige Fortsätze in der IPL spezifisch angefärbt. Sie liegen in einem schmalen Stratum der OFF-Sublamina (Pfeilkopf 1). Selten sind HCN2-positive Somata von Ganglienzellen zu erkennen (hier nicht gezeigt). bv: angefärbte Blutgefäße.

B: Die Färbung des HCN1-Knock-out weist die gleichen Charakteristika wie der Wildtyp auf.

3.1.2. Immunhistochemie für HCN2

Die Expression von HCN2 ist sehr schwach. Neben Nervenfaserbündeln (unterhalb der GCL) ist eine schwache punktuelle Färbung der gesamten IPL, eventuell auch der OPL festzustellen. In der IPL findet man außerdem wenige stärker gefärbte dendritische Fortsätze, die in einem engen Stratum der OFF-Sublamina liegen (**Abb. 12 A**, Pfeilkopf 1). Selten sind Membranfärbungen von Ganglienzellsomata und schwach gefärbte Amakrinzellen zu erkennen (hier nicht gezeigt). Vergleicht man den Knock-out mit dem Wildtyp, finden sich keine Unterschiede im Expressionsmuster von HCN2 (**Abb. 12 B**).

Im Gegensatz zur Rattenretina (Ivanova, 2003; Müller et al., 2003) ist HCN2 in der Mäuseretina nur sehr schwach exprimiert und deshalb vermutlich von untergeordneter Bedeutung.

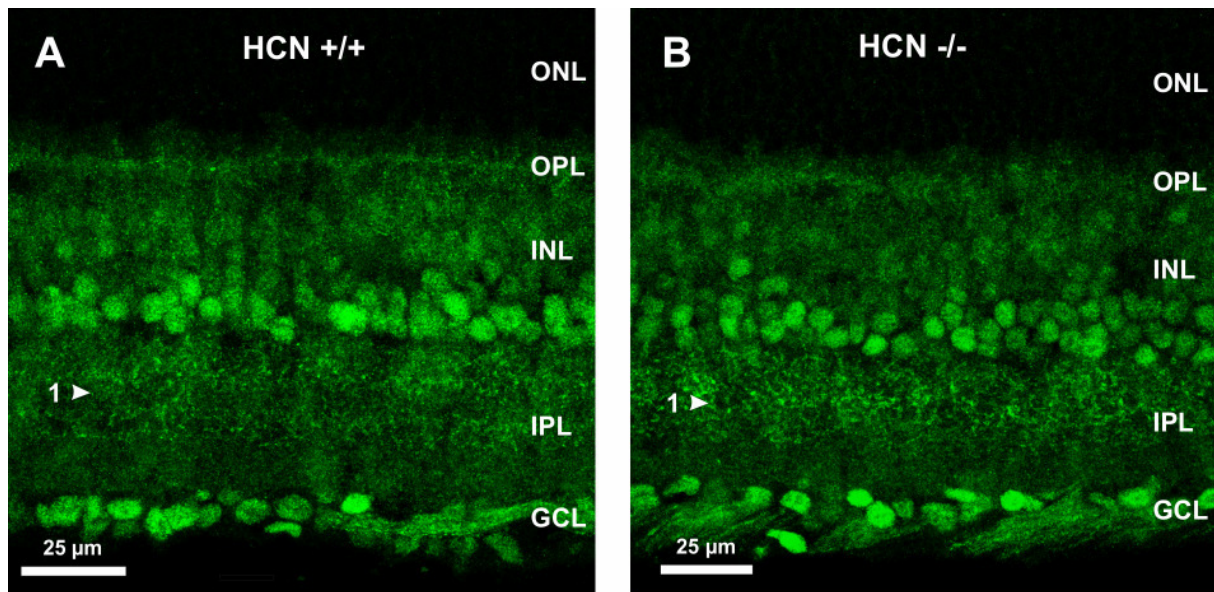


Abb. 13: Immunhistochemische Färbung gegen HCN3.

A: Im Wildtyp gibt es neben Amakrinzellsomata in INL und GCL eine diffuse Markierung der IPL (Pfeilkopf 1). Das Expressionsniveau in der IPL ist insgesamt sehr schwach.

B: Die Knock-out-Retina zeigt das gleiche Expressionsmuster wie die Wildtyp-Retina.

3.1.3. Immunhistochemie für HCN3

Abb. 13 zeigt die Immunhistochemie für HCN3. Sehr viele Somata von Amakrinzellen werden von dem Antikörper diffus angefärbt. Sie liegen sowohl in der Amakrinzellschicht (dem inneren Rand der INL), als auch in der Ganglienzellschicht. Diese Somaanfärbung ist unspezifisch. Sie ist auch in der Retina von HCN3-Knock-out-Mäusen zu finden und stellt eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit einem unbekannten Protein dar (F. Müller, persönliche Mitteilung). Spezifisch ist dagegen die Anfärbung von Fortsätzen in der äußeren IPL (Pfeilkopf 1). Das Expressionsmuster stellt sich im Knock-out genauso dar (**Abb. 13 B**).

3.1.4. Immunhistochemie für HCN4

Antikörper gegen HCN4 färben in der Retina eine deutliche Bande in der IPL (**Abb. 14**). Es lassen sich Axonterminalsysteme von Bipolarzellen erkennen (Pfeilkopf 1). Auch in der OPL gibt es ein definiertes Band, das vermutlich von den Dendritenbäumen der Bipolarzellen gebildet wird (Pfeilkopf 2). Teilweise sind die Somata (Pfeil 4) und Primärdendriten (Pfeil 3)

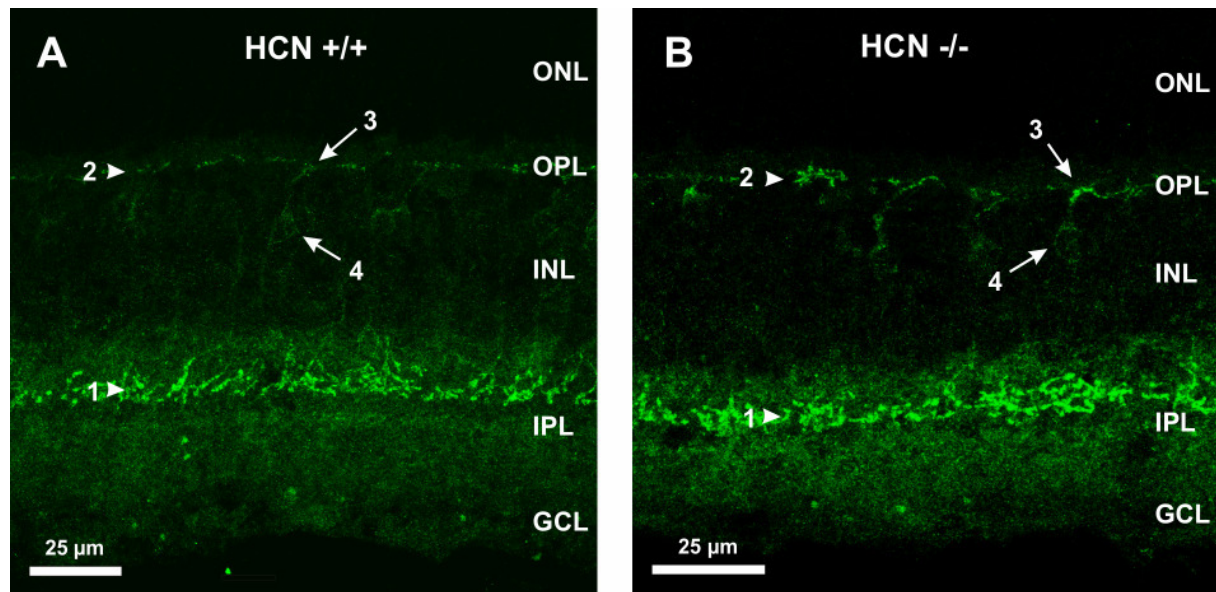


Abb. 14: Immunhistochemische Färbung gegen HCN4.

A: Antikörper gegen HCN4 färben in der Wildtyp-Retina eine deutliche Bande in der IPL (Pfeilkopf 1). In der OPL werden Dendritenbäume von Bipolarzellen markiert (Pfeilkopf 2). Teilweise sind die Primärdendriten (Pfeil 3) und Somata (Pfeil 4) der entsprechenden Bipolarzellen zu erkennen. Die IPL ist als ganzes schwachdiffus gefärbt.

B: Das Expressionsmuster von HCN4 entspricht im Knock-out in allen Aspekten dem des Wildtyp.

dieser Bipolarzellen in der INL mitgefärbt. Zusätzlich besitzt die IPL im Ganzen eine schwache, diffuse Immunreaktivität für HCN4. Für den Knock-out findet sich das gleiche Expressionsmuster (**Abb. 14 B**).

Zusammenfassend wird deutlich, dass HCN1 im Wildtyp die weitaus umfangreichste und stärkste Expression aufweist. Der Knock-out ist für HCN1 erwartungsgemäß negativ.

Die Färbungen für die anderen Isoformen sind deutlich schwächer. Ich konnte in Bezug auf die Expression von HCN2-HCN4 keine wesentlichen Unterschiede zwischen Wildtyp- und HCN1-Knock-out-Tieren erkennen. Insbesondere findet sich in Bereichen, in denen im Wildtyp HCN1 exprimiert wird, keine auffällige Aufregulation anderer Isoformen. Somit ist der HCN1-Knock-out als ein geeignetes System zur Untersuchung des spezifischen Beitrags von HCN1 zu betrachten.

Es ist jedoch zu betonen, dass es sich bei den hier gezeigten Färbungen um keine quantitative Analyse handelt. Zu einer abschließenden Betrachtung aller Isoformen bedarf es weiterer Untersuchungen bzw. größerer Stichproben.

3.2. Messung cornealer ERGs in HCN1-Knock-out und Wildtyp

Um die Bedeutung von HCN1-Kanälen für die Signalverarbeitung in der Retina zu untersuchen, wurde mit der Messung von ERGs ein systemischer Ansatz gewählt, der die Beurteilung der allgemeinen retinalen Funktion im intakten Tier erlaubt. Durch die Untersuchung des HCN1-Knock-outs war es möglich, dies ohne pharmakologische Einflussnahme zu tun. Der HCN1-Knock-out wurde in Mäusen des Stammes SV129 erzeugt (siehe **Kap. 2.1.**). Durch die Kreuzung mit C57BL/6-N-Mäusen gelang es, Versuchstiere zu züchten, die diesem Standardmodell für physiologische Untersuchungen näher sind, als reine SV129-Tiere. In den Messungen werden Wildtyp- und HCN1-Knock-out-Tiere verglichen, die den gleichen genetischen Hintergrund „C57SV“ haben (siehe **Abb. 4.**).

Für die Grundlagen des ERGs wird auch auf **Kap. 2.4.** verwiesen.

Der typische Verlauf und die Hauptkomponenten eines Maus-ERGs werden in **Abb. 15** anhand eines skotopischen ERGs mit einer Blitzintensität von 25000 mCds/m^2 gezeigt. In dieser Situation treten alle typischen Signale des ERGs auf. Der Zeitpunkt des Lichtblitzes ist mit einem Pfeil markiert. Man kann drei Komponenten des ERGs deutlich erkennen: 1. die A-Welle, die auf dem Abschalten des Dunkelstroms in den Photorezeptoren beruht; 2. die B-Welle, die mit der Aktivierung der ON-Bipolarzellen assoziiert ist (zur Übersicht: Pugh et al., 1998); 3. oszillatorische Potentiale, für deren Ursache Rückkopplungsmechanismen in der inneren Retina diskutiert werden (Dong et al., 2004; Heynen et al., 1985; zur Übersicht: Wachtmeister, 1998). Um alle drei Komponenten auswerten zu können, wurden die oszillatorischen Potentiale vom Gesamtsignal getrennt. Dazu wurden die Originaldaten (**Abb. 15 A**) nachträglich mit 25 Hz tiefpassgefiltert. Die Quantifizierung der Signalamplitude von A- und B-Welle erfolgte aus dem gefilterten Signal (**Abb. 15 B**, oben). Aus der Subtraktion des gefilterten Signals vom Original ergeben sich die oszillatorischen Potentiale (**Abb. 15 B**, unten). Da die Anwendung des Filters den Zeitverlauf des ERGs glättet, wurden zeitbezogene Werte, wie die Latenz der B-Welle, aus den ungefilterten Daten ermittelt. So konnten alle Komponenten des ERGs getrennt quantifiziert und ausgewertet werden. Die retinale Signalverarbeitung ist stark vom adaptiven Zustand der Retina abhängig. Daher wurden sowohl Messungen an dunkeladaptierten Mäusen (skotopische Ausgangsbedingung) als auch an helladaptierten Mäusen durchgeführt (photopische Ausgangsbedingung). Die Versuchstiere wurden vor Versuchsbeginn mindestens 12 Stunden in vollständiger Dunkelheit gehalten.

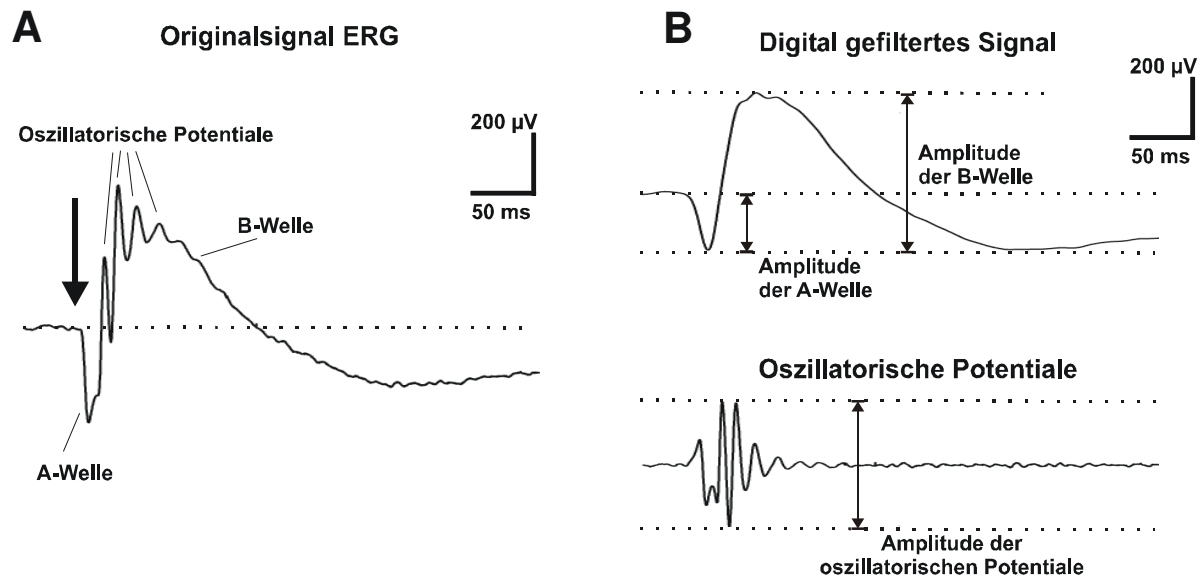


Abb. 15: Quantifizierung der ERG-Komponenten.

A: Beispiel eines skotopischen ERGs einer Wildtyp-Maus bei 25000 mCds/m^2 . Der Pfeil markiert den Reizzeitpunkt.

B: Trennung des Originalsignals in Hauptkomponente (oben, A- und B-Welle) und oszillatorische Potentiale (unten) durch Verwendung eines digitalen 25 Hz-Filters. Oszillatorische Potentiale ergeben sich aus der Subtraktion des gefilterten Signals (B, oben) vom Original (A).

Nach der Messung des skotopischen ERGs wurden die Tiere zur Helladaptation für 10 Minuten einem Hintergrundlicht von 30 Cd/m^2 ausgesetzt. Bei der anschließenden Messung des photopischen ERGs blieb diese Hintergrundbeleuchtung eingeschaltet.

3.2.1. Das skotopische ERG

3.2.1.1. Die skotopische Intensitätsreihe

Im dunkeladaptierten Zustand ist die Retina auf das Sehen bei niedrigsten Lichtintensitäten angepasst. Davon ausgehend wurde zunächst eine Reihe von ERGs gemessen, bei denen die Blitzintensität stufenweise von $0,1 \text{ mCds/m}^2$ auf 25000 mCds/m^2 erhöht wird. Anhand dieser Intensitätsreihe lassen sich das Auftreten und die Entwicklung der typischen ERG-Komponenten beurteilen.

Abb. 16 zeigt diese skotopische Intensitätsreihe. Jede Aufnahme ist die Mittelung aus 10 Einzelmessungen, die im Abstand von 10 s wiederholt wurden. Wiederum deutet ein Pfeil auf den Zeitpunkt des Lichtblitzes hin. In der linken Spalte ist das ERG eines Wildtyp-Tieres zu sehen, in der rechten Spalte das ERG eines HCN1-Knock-out-Tieres. In der mittleren Spalte

sind beide ERGs überlagert. Beide ERGs sind auf ihre jeweilige maximale B-Wellen-Amplitude normiert. Diese Auftragung erlaubt den Vergleich der Entwicklung von Amplituden und Zeitverlauf der ERGs relativ zueinander. In der Überlagerung ist das Knock-out-ERG zur besseren Unterscheidung rot eingetragen. Bis in den Bereich von 10 mCds/m^2 wird ein rein skotopisches ERG gemessen, das ausschließlich auf die Aktivität der Stäbchen und der retinalen Verarbeitungswege für Stäbchensignale zurückgeführt werden kann. Zapfensignale spielen keine oder eine sehr untergeordnete Rolle (Biel et al., 1999; persönliche Mitteilung Dr. M. Seeliger).

Das rein skotopische ERG zeichnet sich durch eine runde, beinahe symmetrische B-Welle aus. Eine A-Welle fehlt und oszillatorische Potentiale sind sehr klein (**Abb. 16 A**, Intensitäten bis 30 mCds/m^2). In der Überlagerung stellt sich in diesem Bereich die B-Welle des Knock-outs als etwas kleiner dar. Betrachtet man jedoch die absoluten Messwerte (**Abb. 16 B**, Intensitäten bis 30 mCds/m^2 , jeweils $N=4$), zeigt sich, dass beide sehr ähnliche Amplituden aufweisen. Die Amplitude der B-Welle erreicht in beiden Fällen um $10\text{-}30 \text{ mCds/m}^2$ ein Plateau. Bei Blitzintensitäten $> 30 \text{ mCds/m}^2$ erfolgt der Übergang des Sehsystems in den photopischen Bereich. Die Lichtantwort der Stäbchen kommt in den Bereich der Sättigung und die Signale von Zapfen gewinnen an Bedeutung.

Ab Intensitäten $> 100 \text{ mCds/m}^2$ hat die B-Welle keinen runden, sondern einen eher dreieckigen Verlauf mit geraden, steileren Flanken. Das ist ein qualitatives Zeichen für die zunehmende Aktivität des Zapfensystems. Auffälligster Unterschied zwischen den Versuchstieren ist nun die stark verlängerte B-Welle im Knock-out (**Abb. 16 A**, Intensitäten $> 30 \text{ mCds/m}^2$). **Abb. 16 B** zeigt zudem, dass das Niveau der B-Wellen-Amplitude im Knock-out durchschnittlich etwa $100 \mu\text{V}$ höher liegt. Die Latenz der B-Welle wird mit zunehmender Reizintensität kleiner. Dabei besteht kein Unterschied zwischen Knock-out- und Wildtyp-Tieren (**Abb. 17 A**). Die Zeit bis zum Erreichen des Maximums der B-Welle verkürzt sich ebenfalls mit der Reizintensität. Nur im Übergangsbereich zwischen 10 und 100 mCds/m^2 ist sie im Knock-out etwas länger als im Wildtyp (**Abb. 17 B**). Sowohl im Knock-out also auch im Wildtyp tritt ab einer Intensität von 100 mCds/m^2 eine A-Welle auf. Sie steigert sich bis auf durchschnittlich 130 bzw. $160 \mu\text{V}$ bei 25000 Cds (**Abb. 16 C**). Die Amplitude der oszillatorischen Potentiale vergrößert sich ebenfalls mit der Reizintensität (**Abb. 18 C**). Es ist bekannt, dass A-Wellen-Amplitude und die Stärke der oszillatorischen Potentiale im ERG korrelieren (Wachtmeister, 1998). Bei hohen Reizintensitäten sind beide Amplituden im Knock-out gegenüber dem Wildtyp reduziert (A-Welle: **Abb. 16 C**; oszillatorische Potentiale: **Abb. 18 A** und **18 C**). Korrigiert man durch Normierung für die geringere Amplitude im Knock-out, kommen die Potentiale jedoch beinahe zur Deckung.

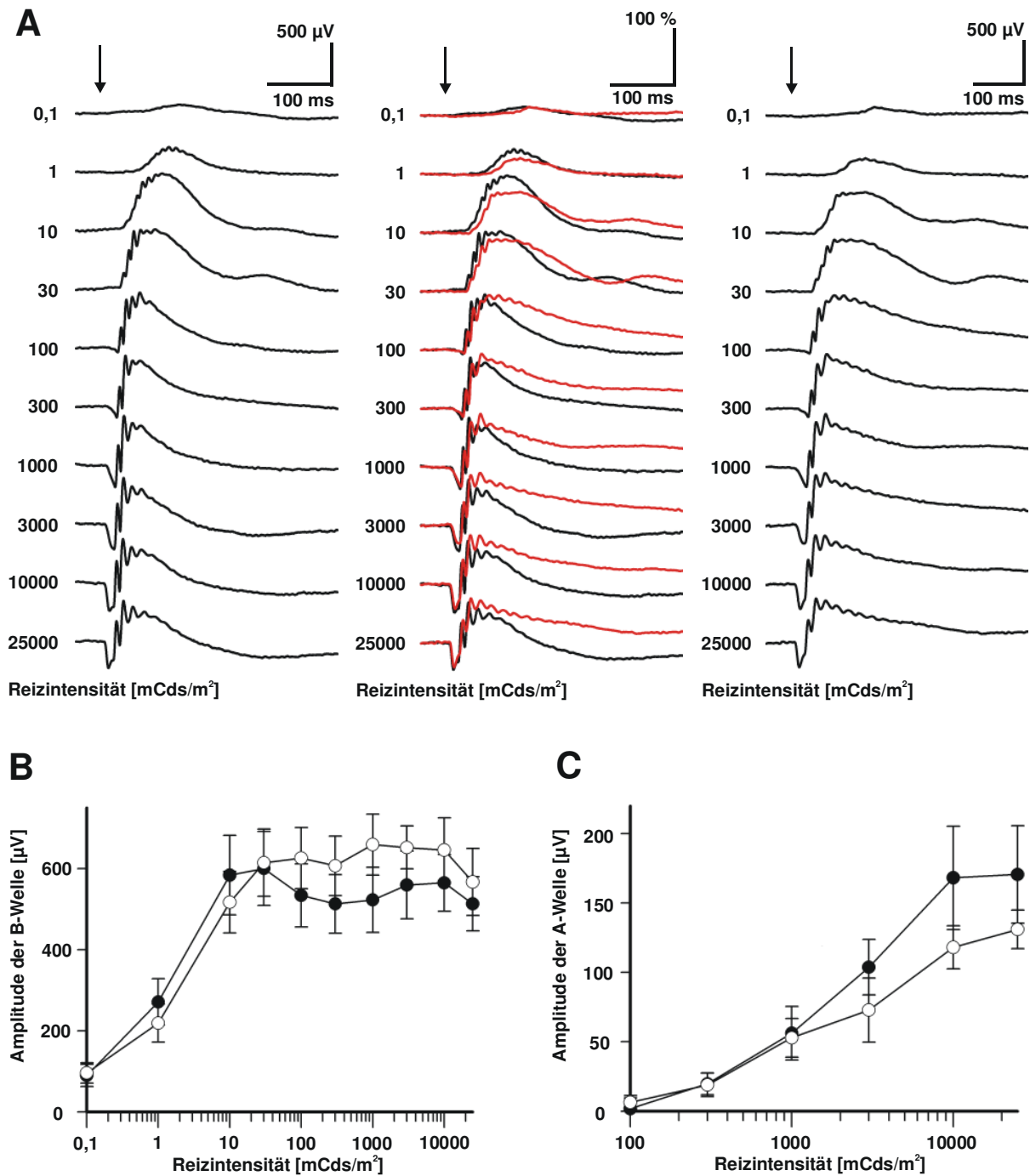


Abb. 16: Intensitätsreihe von 0,1 mCds/m² bis 25000 mCds/m² aus dem skotopischen Ausgangszustand.

A: Original-ERGs von repräsentativen Einzeltieren bei Intensitäten von 0,1-25000 mCds/m². Pfeile deuten auf den Reizzeitpunkt. Links: Wildtyp. Rechts: HCN1-Knock-out. Mitte: Überlagerung der normierten ERGs (schwarz: Wildtyp, rot: Knock-out). Die B-Welle ist im Knock-out bei Intensitäten > 100 mCds/m² stark verlängert. Die oszillatorischen Potentiale sind gegenüber dem Wildtyp reduziert.

B: Auftragung der B-Wellen-Amplitude gegen die Reizintensität. Die Knock-out-Tiere (N=4, weiße Kreise) weisen bei niedrigen Intensitäten eine etwas kleinere Amplitude auf. Bei hellen Blitzen (> 30 mCds/m²) ist die B-Wellen-Amplitude deutlich größer als in den Kontrolltieren (N=4, schwarze Kreise).

C: Amplitude der A-Welle. Bei höheren Intensitäten ist die A-Welle bei Knock-out-Tieren (N=4, weiße Kreise) kleiner als im Wildtyp (N=4, schwarze Kreise).

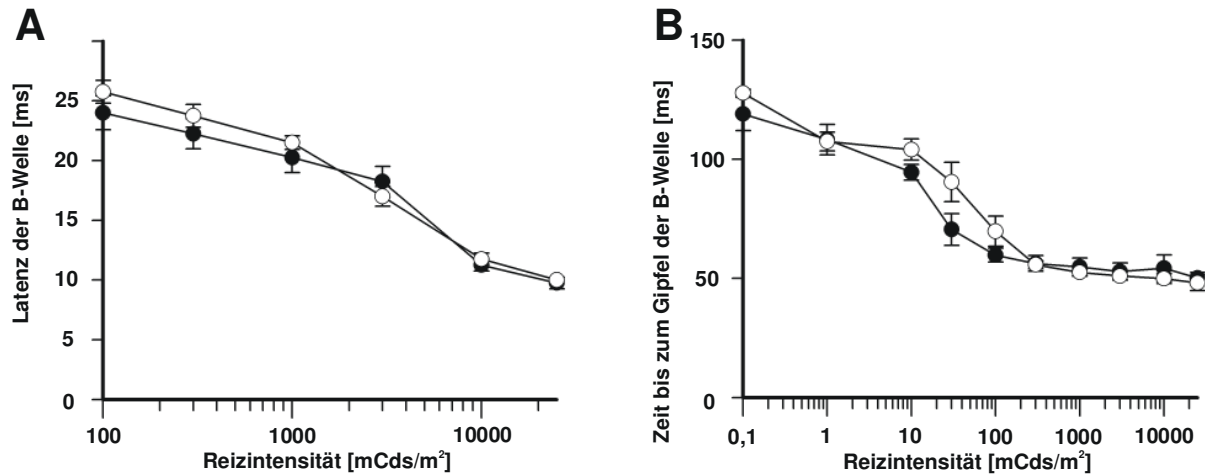


Abb. 17: Zeitaspekte der skotopischen B-Welle bei verschiedenen Reizintensitäten.

A: Verzögerung (Latenz) der B-Welle ab dem Reizzeitpunkt. Die Latenz der B-Welle verringert sich in beiden Tiergruppen gleichermaßen intensitätsabhängig von 25 ms auf 10 ms (Wildtyp: schwarze Kreise, Knock-out: weiße Kreise, beide Gruppen $N=4$).

B: Zeit bis zum Maximum der B-Welle. Intensitätsabhängig verkürzt sich die Zeit von 120 ms (bei $0,1 \text{ mCds/m}^2$ Intensität) auf 50 ms (bei 25000 mCds/m^2). Im mittleren Bereich von $10\text{-}100 \text{ mCds/m}^2$ deutet sich eine Verzögerung bei den Knock-outs (weiße Kreise) an.

Offensichtlich haben die Oszillationen die gleichen Komponenten und eine sehr ähnliche Frequenz (Abb. 18 B). Dies wird auch deutlich, wenn man die Oszillationsamplitude normiert. Die Entwicklung der Amplitude verläuft dann im Knock-out und Wildtyp völlig identisch (Abb. 18 D, Wildtyp: schwarze Kreise, Knockout: weiße Kreise, beide Gruppen $N=4$). Somit ist festzuhalten, dass die Oszillationsamplitude im Knock-out verringert ist. Qualitative Merkmale wie Frequenz und Form der Schwingungen sind jedoch nicht betroffen. Dies deutet darauf hin, dass die ursächlichen Rückkopplungsmechanismen in der inneren Retina nicht beeinträchtigt sind.

Insgesamt ist festzuhalten, dass sich starke Unterschiede zwischen Knock-out-Tieren und Wildtyp-Tieren finden. Diese treten aber erst auf, wenn die Reizintensität in den photopischen Bereich übergeht ($> 30 \text{ mCds/m}^2$). Das rein skotopische ERG zeigt nur geringfügige Veränderungen. Möglicherweise treten Unterschiede zwischen Wildtyp und Knock-out erst dann auf, wenn bei sehr hellen Reizen die Hyperpolarisation der Photorezeptoren einen kritischen Wert erreicht, ab dem HCN1-Kanäle aktiviert werden.

3.2.1.2. Die skotopische Frequenzreihe

Gargini und Kollegen beschreiben beim ERG von Ratte und Katze, dass es bei pharmakologischer Blockade von HCN-Strömen zu Defiziten in der Frequenzübertragung von Lichtreizen kommt (Gargini et al., 1999a, 1999b; Maccarone et al., 2004). Daher wurden HCN1-Knock-out-Tiere mit Blitzserien verschiedener Frequenzen gereizt. Gibt der HCN1-Knock-out im Vergleich mit Kontrolltieren Reizfrequenzen schlechter wieder?

Aus den Ergebnissen der Intensitätsreihe ergab sich für den skotopischen Bereich (bis 10 mCds/m²) nur ein geringfügiger Unterschied im dunkeladaptierten ERG. Zunächst wurde die Frequenzübertragung beim skotopischen Sehen untersucht. Dazu wurde an dunkeladaptierten Mäusen eine Frequenzreihe bei einer Intensität 10 mCds/m² gemessen.

In **Abb. 19 A** werden die Originaldaten zweier repräsentativer Tiere verglichen, wie es schon bei der Intensitätsreihe dargestellt wurde. Beide ERGs weisen bei dieser niedrigen Intensität noch keine A-Welle auf. Oszillatorische Potentiale sind nur sehr klein. Die Lichtreize werden mit Wiederholungsraten zwischen 0,5 und 29 Hz appliziert. Die Amplitude der B-Welle („Modulationsamplitude“) dient als Maß für die Güte der Frequenzübertragung. Die ERGs von Kontrolltier (**Abb. 19 A**, links) und Knock-out (**Abb. 19 A**, rechts) zeigen sehr ähnliches Frequenzverhalten. Die Amplituden der B-Wellen werden mit zunehmender Frequenz kleiner, da zwischen den einzelnen Lichtblitzen immer weniger Zeit zur Verfügung steht, zum Ausgangsniveau zurückzukehren. In der normierten Überlagerung der ERGs zeigt der HCN1-Knock-out eine geringfügige Verzögerung und Verlängerung der B-Welle (**Abb. 19 A**, mitte; siehe auch Detailabbildung **19 C**). Reizfrequenzen bis 12 Hz werden in beiden Tieren durch den Verlauf des ERGs noch deutlich wiedergegeben. Bezieht man die Amplitudenmodulation auf den Maximalwert bei 0,5 Hz, zeigt sich im HCN1-Knock-out eine etwas schlechtere Frequenzwiedergabe (**Abb. 19 B**, schwarze Kreise: Wildtyp; weiße Kreise: HCN1-Knock-out, beide N=4). Dieser kleine Unterschied bleibt über den gesamten Frequenzbereich konstant.

Die Deletion von HCN1 zeigt somit unter rein skotopischen Bedingungen nur eine geringfügige Reduktion in der Modulationsamplitude, die sich frequenzabhängig nicht verändert. In vorherigen Untersuchungen an Ratten und Katzen wurde beschrieben, dass die eingeschränkte Frequenzübertragung besonders bei hellen Stimulationsbedingungen auftritt. Dabei wurden jedoch keine verschiedenen Stimulationsintensitäten und Adaptationszustände verglichen (Gargini et al., 1999a, 1999b; Maccarone et al., 2004).

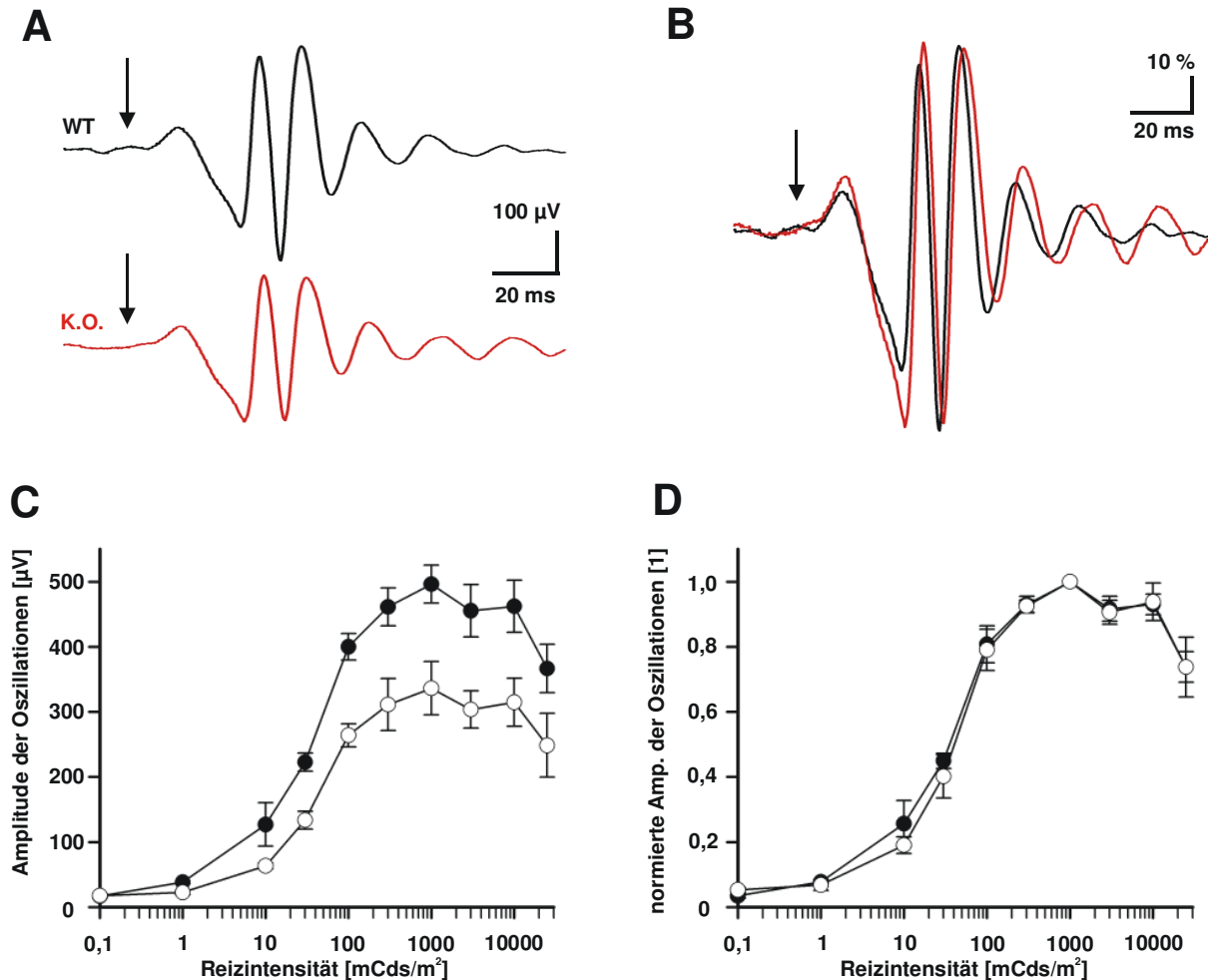


Abb. 18: Oszillatorische Potentiale aus der skotopischen Intensitätsreihe.

A: Repräsentative oszillatorische Potentiale aus der skotopischen Intensitätsreihe (Abb. 16) bei 3000 mCds/m². Pfeile deuten auf den Reizzeitpunkt. Oben: Wildtyp. Unten, rot: HCN1-Knock-out. Im Knock-out ist die Gesamtamplitude reduziert. Form und Frequenz der Oszillationen sind sehr ähnlich.

B: Überlagerung der normierten oszillatorischen Potentiale aus A. Die Potentiale von Knock-out (rot) und Wildtyp (schwarz) verlaufen fast deckungsgleich. Abweichungen in Amplitude und Frequenz sind gering.

C: Intensitätsabhängige Maximalamplitude der oszillatorischen Potentiale. Die Potentiale sind bei Knock-out-Tieren (N=4, weiße Kreise) kleiner als im Wildtyp (N=4, schwarze Kreise).

D: Daten aus C auf maximale Amplitude normiert. Die Amplituden der oszillatorischen Potentiale zeigen eine charakteristische Veränderung bezüglich verschiedener Reizstärken. Dieser Verlauf ist insbesondere bei höheren Intensitäten zwischen Knock-out-Tieren (N=4, weiße Kreise) und Wildtyp-Tieren (N=4, schwarze Kreise) völlig identisch.

Die Messergebnisse aus der Intensitätsreihe (**Abb. 16**) weisen darauf hin, dass der Ausfall von HCN1 zu Veränderungen des ERGs bei hohen Reizintensitäten führt. Daher wurden die Untersuchungen auf den helladaptierten (photopischen) Zustand der Retina ausgedehnt.

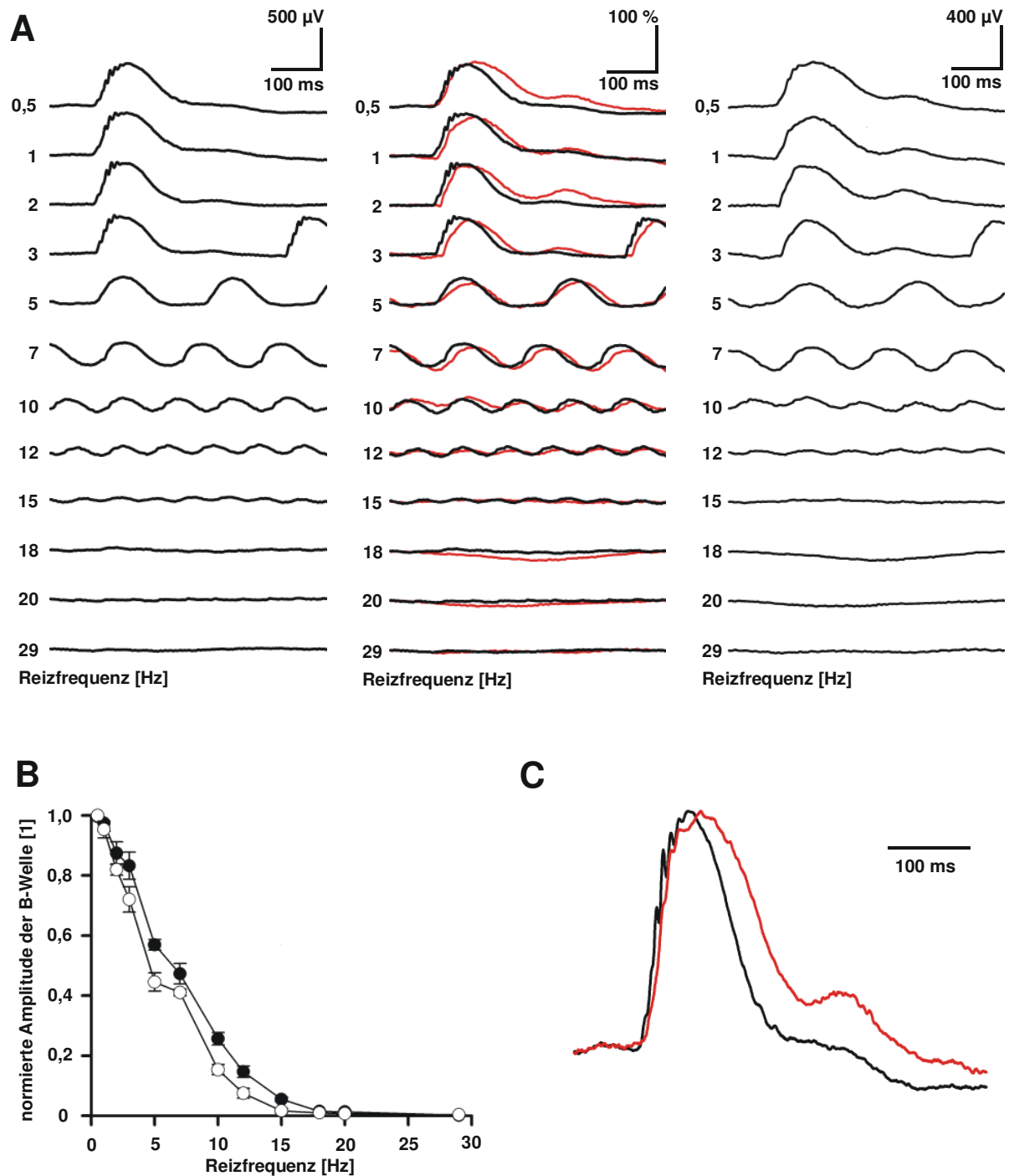


Abb. 19: Frequenzreihe bei einer Blitzintensität von 10 mCds/m² (rein skotopische Reizung).

A: Original-ERGs von repräsentativen Einzeltieren bei Reizfrequenzen von 0,5-29 Hz. Links: Wildtyp. Rechts: HCN1-Knock-out. Mitte: Überlagerung der normierten ERGs. Bei niedrigen Frequenzen ist eine leichte Verzögerung und Verlängerung der B-Welle im Knock-out (rot) gegenüber dem Wildtyp (schwarz) zu erkennen.

B: Quantifizierung der normierten B-Wellen-Amplitude. Die Kontrolltiere (N=4) unterscheidet sich im Frequenzverhalten nur geringfügig von den Knock-out-Tieren (N=4). Die Modulationsamplitude ist bei allen Frequenzen etwas kleiner. Das Defizit verändert sich jedoch nicht frequenzabhängig.

C: Detailabbildung des normierten Verlaufs des ERGs bei 0,5 Hz. Die B-Welle ist im Knock-out (rote Spur) gegenüber dem Wildtyp (schwarz) etwas verlängert. Man beachte, dass auch der Höhepunkt der B-Welle etwas verzögert erreicht wird.

3.2.2. Das photopische ERG

Um die Aktivität der Retina im helladaptierten Zustand vermessen zu können, wurden die Versuchstiere vor und während den Messungen einer Hintergrundhelligkeit von 30 Cd/m^2 ausgesetzt. Dies ist ein allgemein akzeptiertes Verfahren, um verschiedene Vorgänge auszulösen, welche das Sehsystem für das Sehen bei Tageslicht anpassen. Dazu gehören biochemische Veränderungen in der Außensegmenten der Photorezeptoren (zur Übersicht: Müller & Kaupp, 1998). Es ist ebenfalls bekannt, dass die Signalweiterleitung von Bipolarzellen helligkeitsabhängig moduliert wird. Auch Netzwerkeigenschaften der Retina unterliegen adaptiven Veränderungen. Insbesondere die Modulation von elektrischen Synapsen (gap-junctions) ist ein möglicher Mechanismus um die Gewichtung verschiedener Signalverarbeitungswege in der Retina zu verschieben (zur Übersicht: Sohl et al., 2005). Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass sich so die Ausdehnung und die Eigenschaften der rezeptiven Felder der AII-Amakrinzellen helligkeitsbedingt anpassen (Xin & Bloomfield, 1999a, 1999b; zur Übersicht: Bloomfield & Dacheux, 2001).

3.2.2.1. Die photopische Intensitätsreihe

Die helladaptierte Retina ist weniger lichtempfindlich als die dunkeladaptierte Retina. Daher führen nur Stimulationsintensitäten von über 1000 mCds/m^2 zu auswertbaren Antworten im ERG. Jede Aufnahme besteht aus dem Mittelwert von 10 Messungen, die im Abstand von 10 Sekunden aufgezeichnet wurden. Da die Aktivität von Stäbchenphotorezeptoren durch einen konstanten Hintergrund von 30 Cd/m^2 unterdrückt wird, kann das ERG als das Ergebnis der Aktivität des Zapfensehsystems betrachtet werden. **Abb. 20** stellt die Originaldaten von repräsentativen Einzeltieren dar (links: Wildtyp-Maus, rechts: Knock-out-Maus, Mitte: normierte Überlagerung). Wie schon bei den hohen Intensitäten des skotopischen ERGs, zeichnet sich im Wildtyp die B-Welle des photopischen ERGs durch eine schmale, eher dreieckige Form aus. Die B-Welle ist im Wildtyp bis zu 100 ms lang und durch starke oszillatorische Potentiale gekennzeichnet. Die A-Welle des photopischen ERGs ist sehr klein und kann aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses nicht ausgewertet werden.

Das Knock-out-ERG zeigt fast keine oszillatorischen Potentiale. Insgesamt ist die B-Wellen-Amplitude reduziert und erreicht bei hohen Intensitäten nur die halbe Amplitude der Kontrolltiere (**Abb. 20 B**). Vergleicht man die normierten Daten, so zeigt der Knock-out eine Verzögerung der B-Welle.

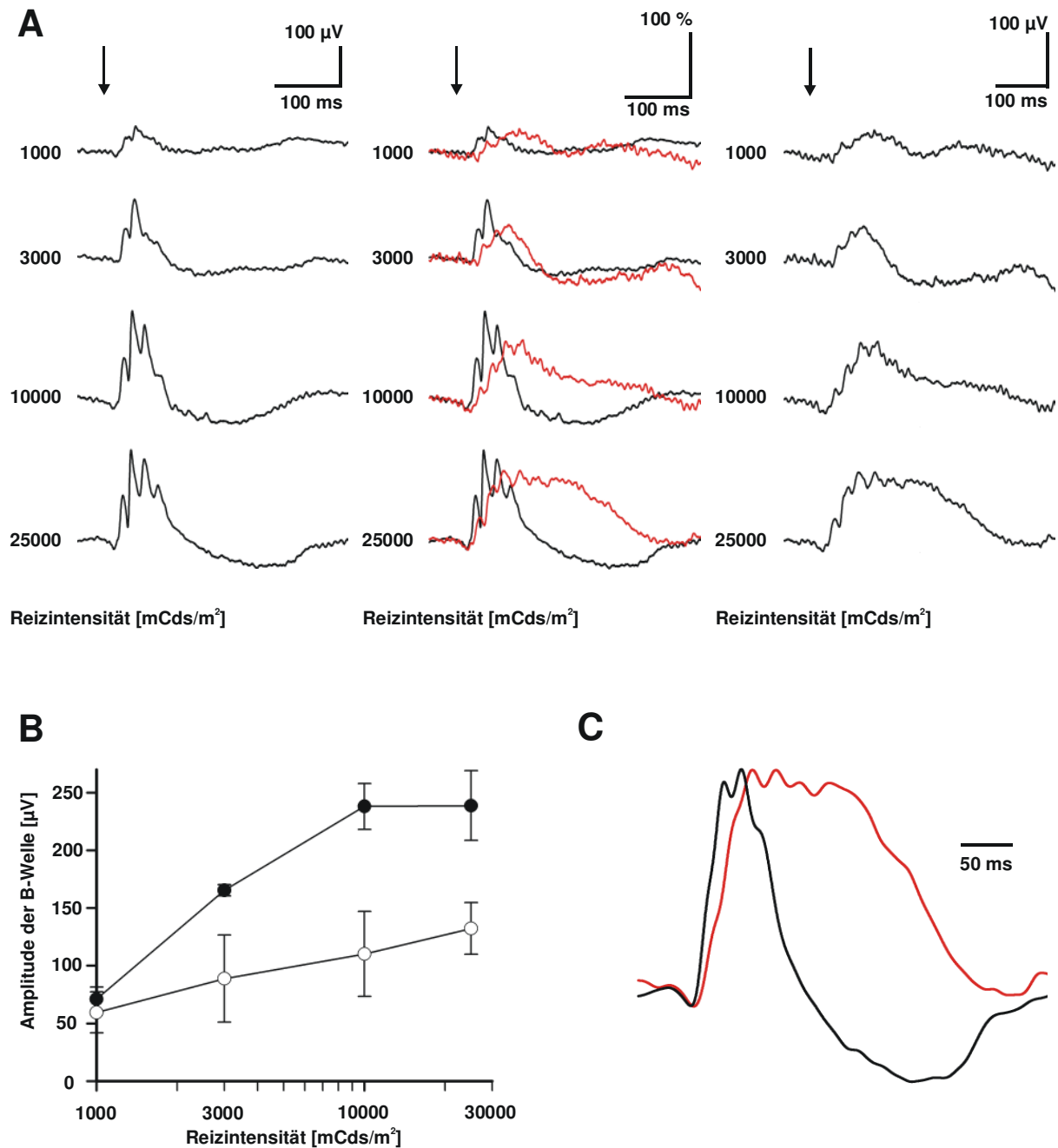


Abb. 20: Intensitätsreihe von 1000 mCds/m^2 bis 25000 mCds/m^2 bei photopischen Bedingungen.

A: Original-ERGs von repräsentativen Einzeltieren bei Intensitäten von 1000-25000 mCds/m^2 . Pfeile deuten auf den Reizzeitpunkt. Links: Wildtyp. Rechts: HCN1-Knock-out. Mitte: Überlagerung der auf B-Wellen-Maximum normierten ERGs (schwarz: Wildtyp, rot: Knock-out). Die B-Welle des Knock-outs erreicht ihr Maximum bei allen Intensitäten später als die des Wildtyps. Bei Intensitäten $> 3000 \text{ mCds/m}^2$ ist die B-Welle zusätzlich stark verlängert. Oszillatorische Potentiale sind im Knock-out stark reduziert.

B: Auftragung der B-Wellen-Amplitude gegen die Reizintensität. Die Knock-out-Tiere (N=4, weiße Kreise) weisen insbesondere bei hohen Reizintensitäten kleinere Amplituden auf. Sie erreichen bei 25000 mCds/m^2 nur etwa die halbe Amplitude des Wildtyps (schwarze Kreise, N=4).

C: Überlagerung der B-Wellen bei 25000 mCds/m^2 . Knock-out (rot) und Wildtyp (schwarz). Um den Zeitverlauf vergleichen zu können, wurden beide ERGs durch Anwendung eines 25 Hz-Filters weitgehend von den oszillatorischen Potentialen getrennt. Sowohl die Verlängerung der B-Welle, als auch das spätere Maximum des Knock-outs sind klar zu erkennen. Der Beginn der B-Welle (Latenz) ist in beiden Tiergruppen gleich. Durchschnittlich erreichte das Wildtyp-ERG das Maximum der B-Welle früher als der Knock-out (Wildtyp: 50 ms; Knock-out: 85 ms).

Auswertung aller Messungen zeigt, dass bei Wildtyp-Mäusen 50 ms vergehen, bis die B-Welle maximal ist, in Knock-out-Mäusen dauert es 85 ms (Daten nicht gezeigt). Diese Werte sind konstant und unabhängig von der Reizintensität. Zusätzlich kommt es bei sehr hohen Intensitäten (10000 und 25000 mCds/m²) im Knock-out zu einer massiven Verlängerung der B-Welle (**Abb. 20 A**, mitte). Um sowohl die Verlängerung als auch die Verzögerung der B-Welle unabhängig von den oszillatorischen Potentialen darzustellen, sind die B-Wellen bei der höchsten Intensität (25000 mCds/m²) nochmals in ihrer gefilterten Form in **Abb. 20 C** dargestellt.

3.2.2.2. Die photopische Frequenzreihe

Auch unter photopischen Bedingungen wurde eine Frequenzmessung durchgeführt. Dabei wurde eine hohe Reizintensität von 2500 mCds/m² verwendet. **Abb. 21** stellt die ERGs von Wildtyp und Knock-out bei Reizfrequenzen zwischen 0,5 und 30 Hz gegenüber (links: Wildtyp; rechts: Knock-out; mitte: normierte Überlagerung der ERGs, Knock-out in rot).

Wie schon in der photopischen Intensitätsreihe fällt eine Verkleinerung und Verzögerung der B-Welle im Knock-out auf. Man beachte dazu die unterschiedliche Skalierung in den Originaldaten. Die Verlängerung der Lichtantwort ist nur geringfügig. Die Verzögerung führt bei hochfrequenter Reizung zu einer Phasenverschiebung der Knock-out-Antworten gegenüber dem Wildtyp. In **Abb. 21 C** sind zum Beispiel die B-Wellen bei einer Reizfrequenz von 7 Hz auf volle Amplitude normiert und übereinander aufgetragen. Man erkennt, dass die B-Welle des Knock-outs (rot) etwa 35 ms später als die des Wildtyps ihr Maximum erreicht. Das entspricht bei 7 Hz einer Phasenverschiebung von $\pi/2$. Vergleicht man die Entwicklung der Modulationsamplitude gegenüber der Reizfrequenz für jeweils 4 Tiere, so sind die Unterschiede nur minimal (**Abb. 21 B**). Ganz ähnlich wie bei der rein skotopischen Reizung, lässt die B-Wellenamplitude im Knock-out nicht frequenzbedingt nach. Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen zur Frequenzübertragung zwischen HCN1-Knock-out-Tieren und Kontrolltieren nur sehr geringe Unterschiede (**Abb. 19** und **21**). Man sieht jedoch, dass die B-Wellen sowohl im skotopischen Bereich als auch im photopischen Bereich verzögert und leicht verlängert sind. Die Betrachtung der Intensitätsmessungen zeigt, dass eine kräftige Verlängerung der B-Welle erst bei hohen Intensitäten auftritt (skotopisch: **Abb. 16 A**, ab 30 mCds/m²; photopisch: **Abb. 20 A**, ab 10000 mCds/m²).

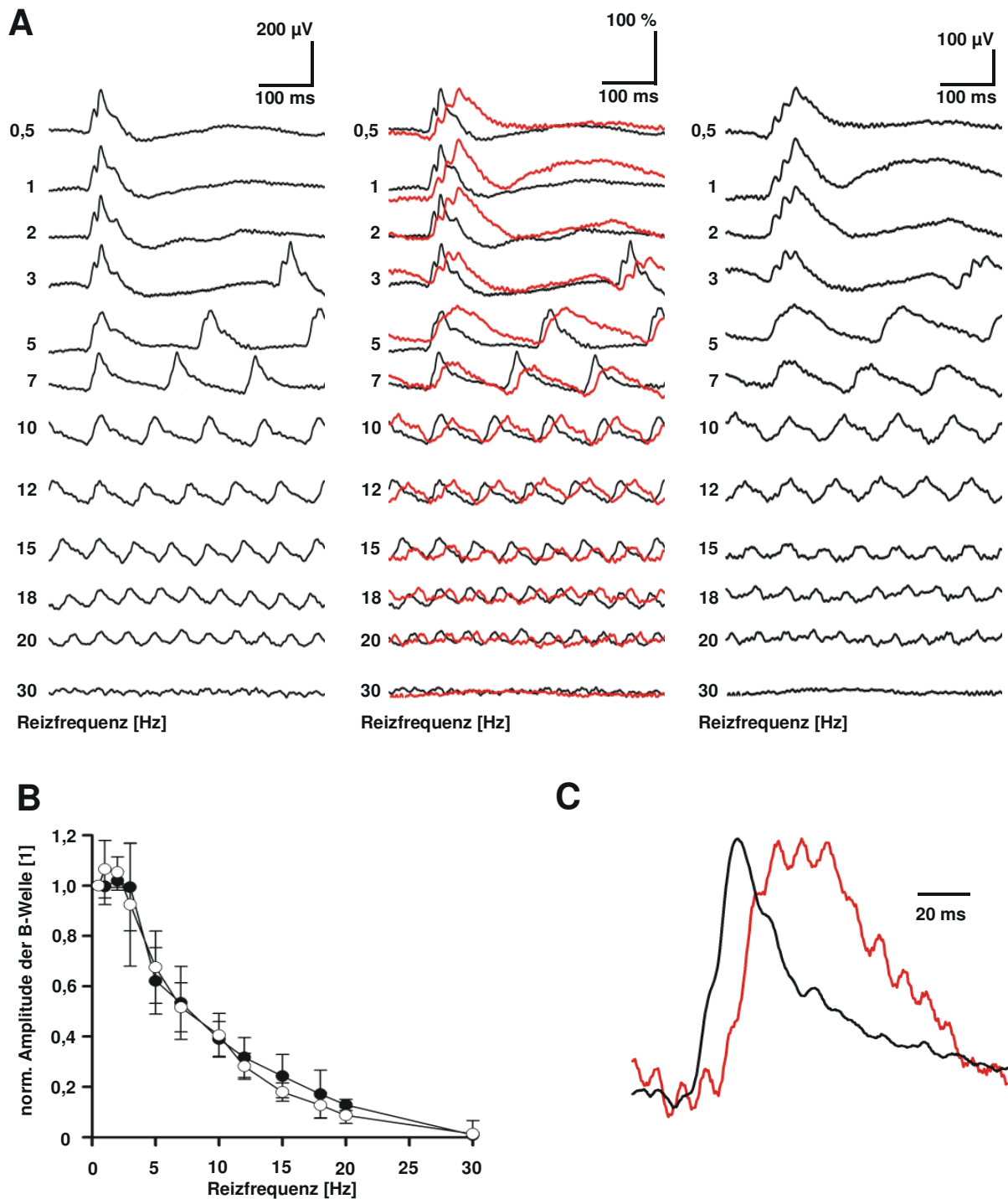


Abb. 21: Photopische Frequenzreihe bei einer Blitzintensität von 2500 mCds/m².

A: Original-ERGs von repräsentativen Einzeltieren bei Reizfrequenzen von 0,5-30 Hz. Links: Wildtyp. Rechts: HCN1-Knock-out. Mitte: Überlagerung der normierten ERGs. Bei höheren Frequenzen führt die etwas verzögerte B-Welle des Knock-out-Tieres zu einer Phasenverschiebung zwischen den Antworten. Beide ERGs geben die Stimulationsfrequenz bis 20 Hz in der B-Welle zuverlässig wieder.

B: Die Modulationsamplitude (normiert auf den Wert bei 0,5 Hz) fällt bei höheren Reizfrequenzen sowohl bei Kontrolltieren (schwarze Kreise) als auch im Knock-out (weiße Kreise) allmählich ab. Dabei ist die absolute Amplitude in den HCN1-Knock-outs geringfügig kleiner (siehe A, man beachte die Skalierung). Die relative Veränderung gegenüber der Frequenz verläuft sehr ähnlich.

C: Die B-Welle des Knock-outs ist bei 0,5 Hz leicht verlängert und verzögert. Bei höheren Frequenzen äußert sich das in einer Phasenverschiebung der Modulation. Hier sind exemplarisch die B-Wellen von HCN1-Knock-out (rot) und Wildtyp (schwarz) bei 7 Hz normiert übereinander aufgetragen. Die Verzögerung im Knock-out beträgt ca. 35 ms und entspricht damit bei 7 Hz einer viertel Phase ($\pi/2$).

Es ist denkbar, dass deutliche Defizite in der Frequenzübertragung erst auftreten, wenn diese Intensitäten überschritten werden. Leider war die Intensität der Lichtblitze für hochfrequente Reize aufgrund der Ladezeit der Stimulationslampe auf 2500 mCds/m^2 begrenzt. Daher bestand keine Möglichkeit, im helladaptierten Zustand größere Reizintensitäten für Frequenzreihen zu benutzen als in **Abb. 21** gezeigt.

Für den dunkeladaptierten Zustand konnten jedoch ebenfalls 2500 mCds/m^2 verwendet werden. Bei diesen Helligkeiten waren in der skotopischen Intensitätsreihe bereits ausgeprägte Unterschiede zwischen HCN1-Knock-out und Kontrolltieren beobachtet worden (**Abb. 16**, z.B. 1000 mCds/m^2 und 3000 mCds/m^2). Eine solche Frequenzreihe findet jedoch nicht mehr unter rein skotopischen Bedingungen statt. Vielmehr ist die Ausgangssituation skotopisch (dunkeladaptiert), die Reizintensität jedoch erhöht. Deswegen stellt dieses Reizparadigma eine Übergangssituation dar, bei der Stäbchen und Zapfen gereizt werden.

3.2.3. Messungen im Übergangsbereich

3.2.3.1. Die skotopische Frequenzreihe bei hohen Reizintensitäten

Abb. 22 zeigt die Frequenzreihe im dunkeladaptierten Zustand bei einer hohen Reizintensität von 2500 mCds/m^2 (links: Wildtyp; rechts: Knock-out; mitte: normierte Überlagerung der ERGs, Knock-out in rot). Die Lichtblitze werden mit Wiederholungsraten zwischen 0,5 und 30 Hz appliziert. Schon bei 0,5 Hz zeigen sich deutliche qualitative Unterschiede zwischen den Versuchstieren, wie sie in ähnlicher Form in der skotopischen Intensitätsreihe aufgetreten sind (vergleiche **Abb. 16**). Im Wildtyp-ERG sind deutliche oszillatorische Potentiale zu erkennen und die B-Welle ist nach weniger als 100 ms auf das Ausgangsniveau zurückgefallen. Das ERG des Knock-outs weist reduzierte oszillatorische Potentiale und eine 4-5fach verlängerte B-Welle auf. Noch auffälliger ist die Entwicklung der B-Wellen-Amplitude bei verschiedenen Reizfrequenzen. Bei 15 Hz ist die Modulationsamplitude des Wildtyps im Durchschnitt auf etwa 20 % der Amplitude bei 0,5 Hz abgesunken. Beim Knock-out vollzieht sich diese Reduktion schon bei 2 Hz (**Abb. 23 A**: Werte normiert auf Amplitude bei 0,5 Hz; Wildtyp: schwarze Kreise, N=4; Knock-out: weiße Kreise, N=4). Ab 10 Hz wird das Reizmuster im Knock-out nicht mehr durch eine erkennbare Modulation des ERGs wiedergegeben. Dagegen ist im Wildtyp auch bei 20 und 30 Hz eine Modulation klar erkennbar (**Abb. 22**). Es ist festzuhalten, dass im HCN1-Knock-out die Frequenzübertragung

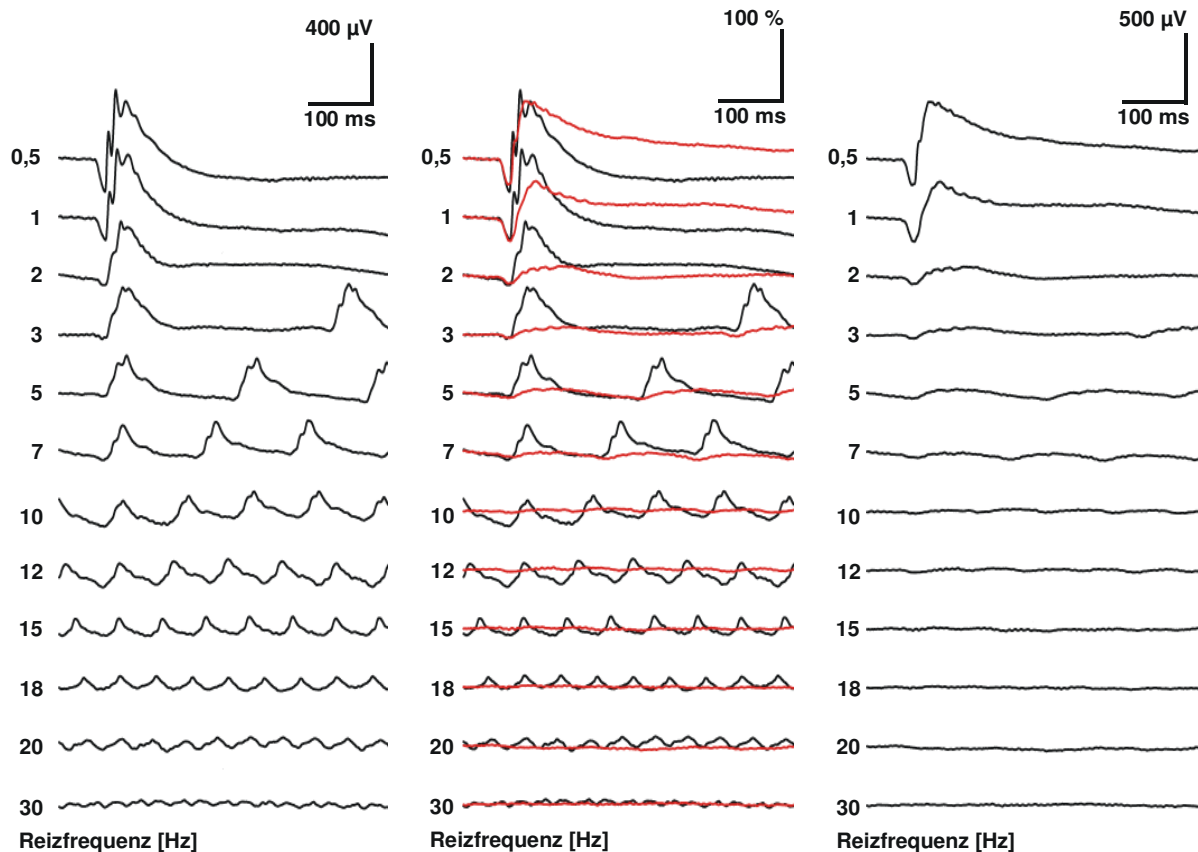


Abb. 22: Skotopische Frequenzreihe bei einer Blitzintensität von 2500 mCds/m².

Original-ERGs von repräsentativen Einzeltieren bei Reizfrequenzen von 0,5-30 Hz. Links: Wildtyp. Rechts: HCN1-Knock-out. Mitte: Überlagerung der normierten ERGs. Schon bei der niedrigsten Frequenz ist eine starke Verlängerung der B-Welle im Knock-out (rot) gegenüber dem Wildtyp (schwarz) zu erkennen. Bei höheren Frequenzen fällt die Modulationsamplitude im Wildtyp ganz allmählich, im Knock-out jedoch dramatisch ab. Frequenzen von mehr als 10 Hz können durch das Knock-out-ERG nicht wiedergegeben werden. Im Wildtyp sind auch bei 20 und 30 Hz deutlich Modulationen zu erkennen.

bei Reizintensitäten von 2500 mCds/m² gegenüber den Kontrolltieren massiv eingeschränkt ist.

Auch bei der Untersuchung der oszillatorischen Potentiale stelle ich deutliche Unterschiede fest. Vergleicht man die oszillatorischen Potentiale bei der niedrigsten Reizfrequenz von 0,5 Hz, so zeigt sich zunächst, dass die Potentiale des Wildtyps eine größere Amplitude haben (**Abb. 24 A**). Die Oszillationen des Wildtyps sind durch zwei gleich große Hauptschwingungen gekennzeichnet, an die sich 2-3 Schwingungen abnehmender Amplitude anschließen (**Abb. 24 A und 24 B**, schwarze Linien). Der Knock-out zeigt nur eine unvollständige Hauptschwingung. Im Anschluss treten diskontinuierliche Nachschwingungen auf, die sich aus einer Kombination verschiedener Frequenzen zusammensetzen (**Abb. 24 A und 24 B**, rote Linien, man beachte das Auftreten von Zwischenmaxima und Abweichungen von der Hauptschwingung).

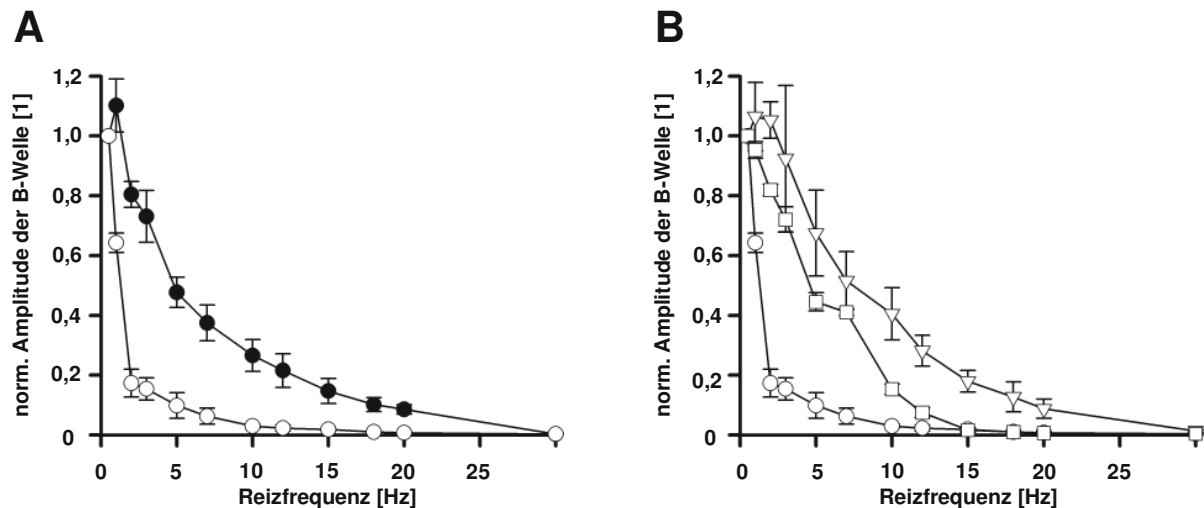


Abb. 23: Frequenzverhalten der B-Welle im dunkeladaptierten Zustand bei 2500 mCds/m² Reizintensität.
A: B-Wellen-Amplitude bei verschiedenen Reizfrequenzen. Die Knock-out-Tiere (weiße Kreise, N=4) haben eine dramatisch verschlechterte Frequenzfolge gegenüber den Wildtyp-Tieren (schwarze Kreise, N=4). Die maximale B-Wellen-Amplitude liegt in beiden Gruppen bei 500 μ V (nicht gezeigt).
B: Vergleich der Frequenzübertragung im Knock-out bei verschiedenen Adaptationszuständen. Weiße Quadrate zeigen das Ergebnis bei rein skotopischen Bedingungen (10 mCds/m² Intensität, aus Abb. 19). Im helladaptierten Zustand ist die Frequenzübertragung besonders im Bereich hoher Frequenzen deutlich verbessert (weiße Dreiecke, 2500 mCds/m², aus Abb. 21). Wird die gleiche Intensität beim dunkeladaptierten Zustand verwendet, ist die Frequenzübertragung dramatisch verschlechtert (weiße Kreise, 2500 mCds/m², siehe A).

Es ist interessant, diese Ergebnisse mit denen zu vergleichen, die in der Intensitätsreihe bei vergleichbarer Helligkeit (3000 mCds/m²) gewonnen wurden (**Abb. 18**). Auch dort gab es Unterschiede in der Amplitude der oszillatorischen Potentiale. Wurden die Unterschiede in der Amplitude durch Normierung ausgeglichen, zeigten sich die qualitativen Merkmale der Oszillationen jedoch sehr ähnlich (**Abb. 18 B** und **18 D**). Die Unterschiede zwischen der Intensitätsreihe und der Frequenzreihe können nur in der unterschiedlichen Blitzfolge liegen. In der Intensitätsreihe werden für jede Intensität die ERGs von 10 Blitzen im Abstand von 10 Sekunden gemittelt. Daher liegt diesen ERGs eine Reizfrequenz von 0,1 Hz zu Grunde. Bei diesen langen Abständen sind die ERGs als Einzelantworten zu betrachten. Das ist für den Wildtyp auch bei einer Blitzfolge von 0,5 Hz so (man vergleiche die Antworten des Wildtyps in **Abb. 18 A** und **Abb. 24 A**), nicht aber in der Knock-out-Retina. Hier scheinen sich bei 0,5 Hz bereits Veränderungen der oszillatorischen Potentiale zu ergeben.

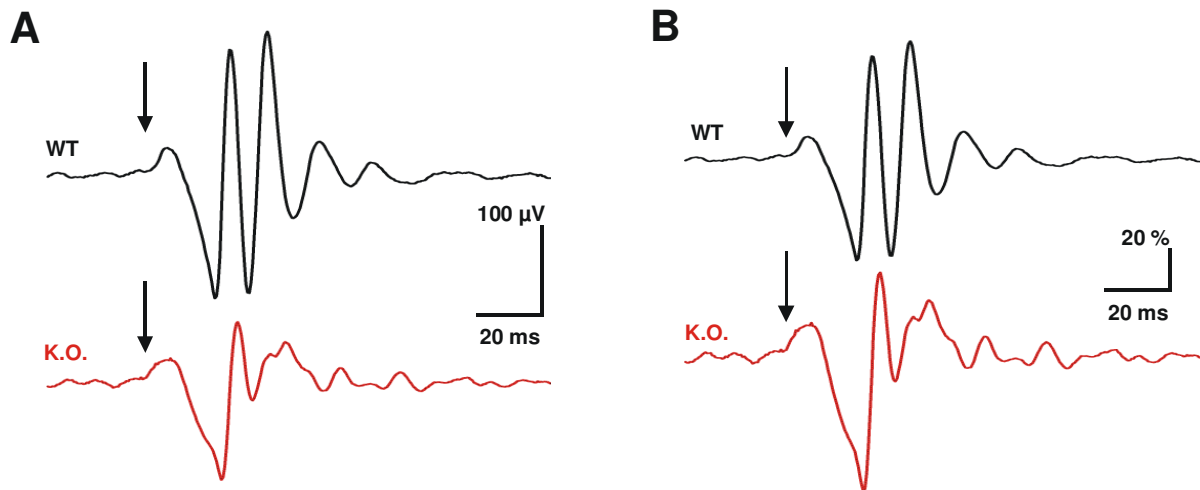


Abb. 24: Oszillatorische Potentiale bei 2500 mCds/m² und 0,5 Hz Reizfrequenz.

A: Repräsentative oszillatorische Potentiale aus der skotopischen Frequenzreihe (Abb. 22) bei 0,5 Hz. Pfeile deuten auf den Reizzeitpunkt. Oben: Wildtyp. Unten: HCN1-Knock-out. Im Knock-out ist eine reduzierte Gesamtamplitude zu erkennen.

B: Gegenüberstellung der normierten oszillatorischen Potentiale aus A. Die Potentiale des Wildtyps bestehen aus 2 Hauptschwingungen, die von kontinuierlichen Nachschwingungen nachlassender Amplitude gefolgt werden (oben). Der Knock-out zeigt nur eine unvollständige Hauptschwingung und eine diskontinuierliche, zusammengesetzte Nachschwingung.

3.2.3.2. Die 6-Hz-Intensitätsreihe

Eine andere Möglichkeit, den Übergang von der skotopischen zu photopischen Signalverarbeitung zu untersuchen, bietet das 6-Hz-Protokoll. Da Stäbchen eine langsame und lang anhaltende Lichtantwort haben, beginnen sich ihre Lichtantworten zeitlich zu summieren, wenn sie schnell genug wiederholt gereizt werden.

Beim 6-Hz-Protokoll wird bei einer konstanten Blitzfrequenz von 6 Hz die Reizintensität langsam gesteigert. Durch die steigende Intensität werden die Stäbchen zunehmend in die Sättigung getrieben und das Stäbchensystem fällt allmählich aus der Lichtantwort heraus. Durch eine feine Abstufung der Intensitätssteigerung kann man den Übergang von der skotopischen zur photopischen Signalverarbeitung sehr gut verfolgen. In Ergänzung zur skotopischen Frequenzreihe mit erhöhter Intensität wurde der 6-Hz-Versuch mit Wildtyp- und Knock-out-Tieren durchgeführt.

Abb. 25 zeigt die Originaldaten einer Wildtyp-Maus (links) gegenüber den Daten einer HCN1-Knock-out-Maus (rechts). Die ERGs sind von der ersten Messung mit niedrigster Intensität (oben) zu späteren Messungen mit höherer Intensität (unten) angeordnet.

Im Wildtyp treten ab 0,075 mCds/m² B-Wellen auf. Bis 7,5 mCds/m² werden die B-Wellen größer und entwickeln die typische runde Form, wie sie aus den ERG-Messungen bei rein skotopischen Reizbedingungen bekannt sind (vergleiche **Abb. 16 A**). Der Beginn der B-Welle

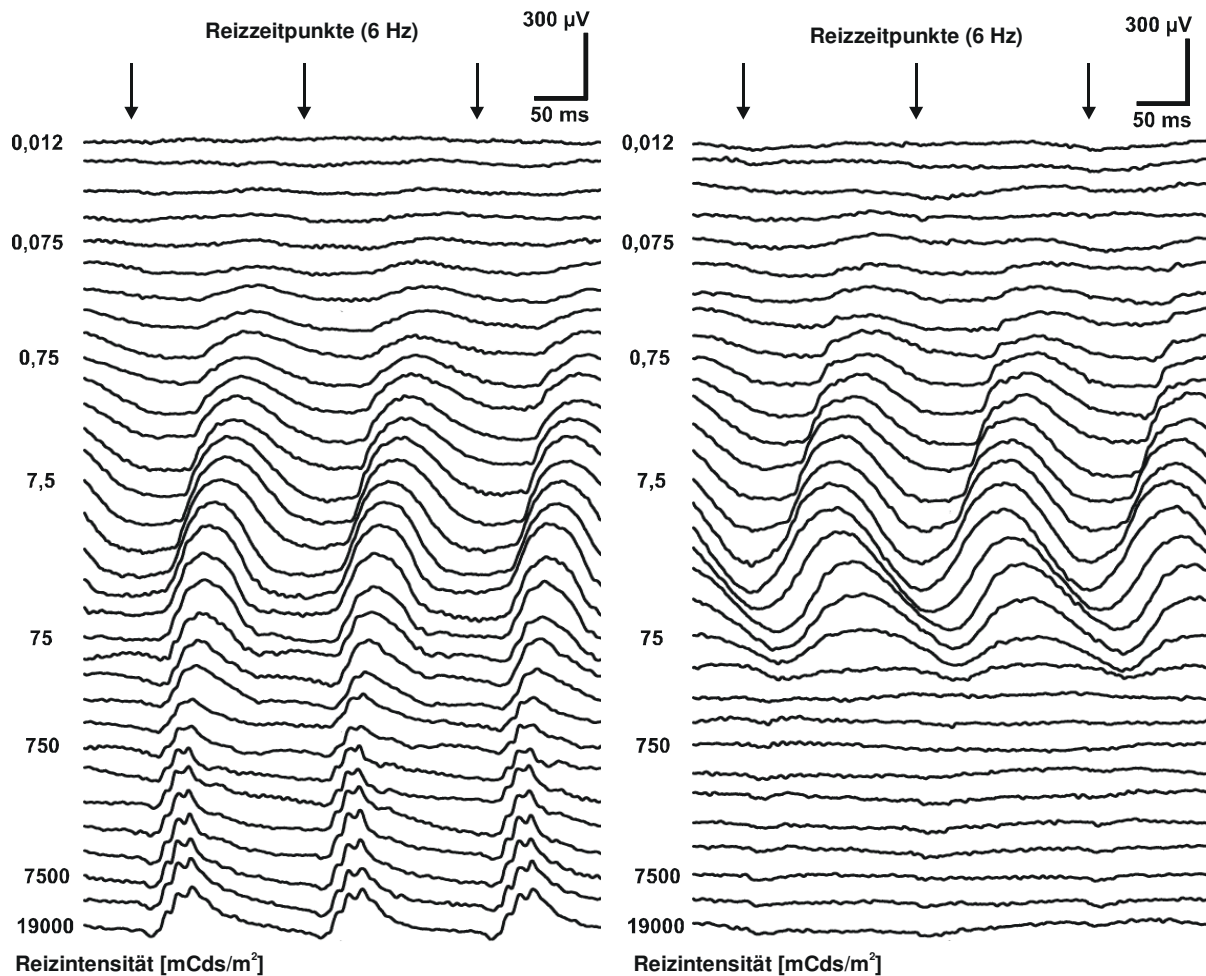


Abb. 25: 6-Hz-Flimmer-ERG bei Intensitäten zwischen 0,012 mCds/m² und 19000 mCds/m².

Gegenüberstellung des ERGs einer Wildtyp-Maus (links) und einer HCN1-Knock-out-Maus (rechts). Die einzelnen ERGs sind von niedrigen zu hohen Reizintensitäten angeordnet. Pfeilspitzen geben den Zeitpunkt der Lichtblitze an. Die Wildtyp-Maus entwickelt im Bereich von 0,012 mCds/m² bis etwa 7,5 mCds/m² eine typische skotopische B-Welle. Im Übergangsbereich bis etwa 75 mCds/m² verringert sich die Amplitude und die runde Form geht in eine dreieckige Form über, was für den photopischen Bereich typisch ist. Im Bereich höchster Intensitäten steigt die Amplitude wieder leicht an. Die Phasenlage der B-Welle verschiebt sich mit der Intensität stetig näher an die Reizzeitpunkte. Der HCN1-Knock-out (rechts) zeigt ein normales skotopisches ERG. Im Übergangsbereich zwischen 7,5 und 75 mCds/m² zeigt die B-Welle eine Phasenverschiebung vom Reizzeitpunkt weg. Die Amplitude wird auch hier geringer, doch wird die kleiner werdende skotopische B-Welle nicht von einer photopischen ersetzt. Bei Helligkeiten ab 750 mCds/m² ist keine B-Welle mehr zu erkennen.

verschiebt sich mit steigender Intensität nach vorne. Bei weiterer Intensitätssteigerung vollzieht sich der Übergang zum photopischen ERG. Die Amplitude der runden B-Welle verringert sich zunächst. Ab etwa 75 mCds/m² verändert sich die Gestalt der B-Welle zur dreieckigen Form, die für große Intensitäten typisch ist (vergleiche **Abb. 16 A**, hohe Intensitäten). Dabei treten im Bereich der Intensitäten >750 mCds/m² zunehmend oszillatorische Potentiale auf. Die Amplitude der B-Welle nimmt dabei wieder zu und die Phasenlage der B-Welle verschiebt sich weiter nach vorne. Insgesamt ist im Bereich zwischen

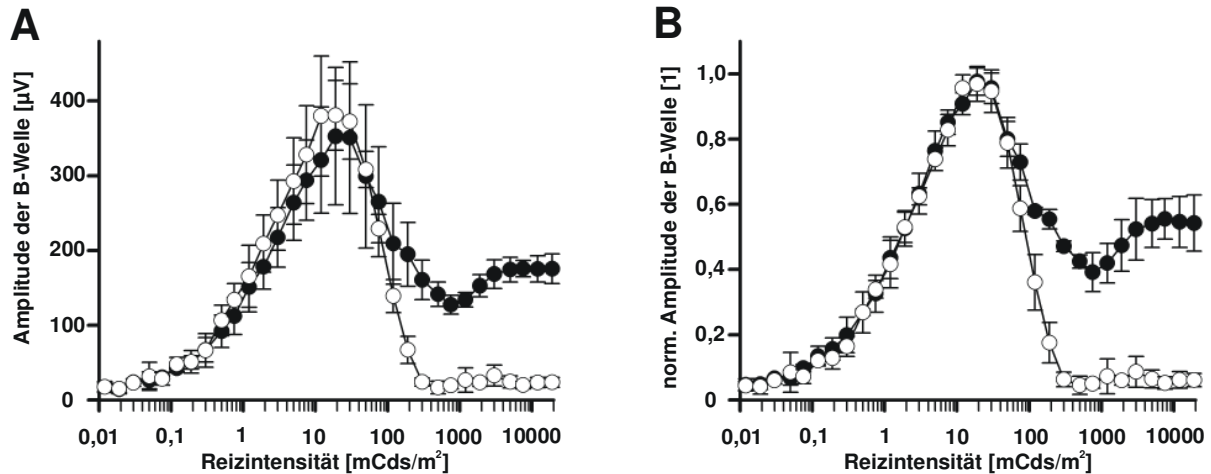


Abb. 26: Entwicklung der B-Wellen-Amplitude im 6-Hz-Versuch (0,012 mCds/m²-19000 mCds/m²).

A: Auftragung der B-Wellen-Amplitude von Knock-out- (weiße Kreise, N=3) und Wildtyp-Mäusen (schwarze Kreise, N=4) gegen die Intensität der 6-Hz-Stimulation. Der Knock-out weist bei 30 mCds/m² eine geringfügig größere Amplitude auf. Im Intensitätsbereich bis 300 mCds/m² fällt die Amplitude vollständig ab. Der Wildtyp behält bei höheren Intensitäten eine Amplitude von etwa 175 µV.

B: normierte Daten aus A. Wildtyp (schwarze Kreise, N=4) und Knock-out (weiße Kreise, N=3) unterscheiden sich nur im photopischen Bereich.

7,5 und 750 mCds/m² ein klarer Übergang zwischen skotopischem und photopischem ERG zu beobachten.

Im HCN1-Knock-out (**Abb. 25**, rechts) verläuft die Entwicklung des skotopischen ERGs bis 7,5 mCds/m² gleich. Beim Übergang zum photopischen Bereich beginnt sich die Amplitude der B-Welle ebenfalls zu verringern. Im Gegensatz zum Wildtyp fällt die B-Welle dabei jedoch im Reizzyklus zurück. Auch bildet sich im Bereich um 75 mCds/m² keine typisch-photopische B-Welle heraus. Bei etwa 120 mCds/m² ist die B-Welle sogar ganz verschwunden.

Auch bei stärkeren Reizen tritt praktisch keine B-Welle mehr auf. Offenbar findet im HCN1-Knock-out der Übergang von der skotopischen zur photopischen Signalverarbeitung nicht statt. Dies ist deshalb sehr überraschend, weil im helladaptierten Zustand bei 2500 mCds/m² eine sehr gute Frequenzfolge auch über 6 Hz und darüber hinaus beobachtet wird. Das Zurückfallen der Phasenlage ist allerdings auch dort zu erkennen (vergleiche **Abb. 21**). Betrachtet man die B-Wellen-Amplitude gegenüber der Reizintensität (**Abb. 26 A und 26 B**), so erkennt man, dass nur die Wildtyp-Mäuse (schwarze Kreise) eine photopische B-Welle im Helligkeitsbereich über 300 mCds/m² zeigen. Dagegen unterscheidet sich die Entwicklung der Amplitude im skotopischen Intensitätsbereich bis ca. 120 mCds/m² überhaupt nicht zwischen Knock-out-Mäusen (weiße Kreise) und Kontrollen. Betrachtet man die ERG-Messungen insgesamt, so wird klar, dass die Versuchstiere, die keinen HCN1-Kanal exprimieren, sich in vielen Aspekten der Lichtantwort von den Wildtyp-Tieren unterscheiden.

Was die Frequenzübertragung angeht, treten klare Unterschiede nur unter bestimmten Stimulationsbedingungen auf. Unter rein skotopischen Bedingungen, wenn die Retina dunkeladaptiert ist und Lichtreize so schwach sind, dass keine dauerhaften Adaptationsprozesse ausgelöst werden, sind nur sehr milde Defizite bei der Frequenzübertragung im Knock-out zu finden (**Abb. 19**). Auch wenn die Retina helladaptiert ist und mit klar photopischen Lichtreizen stimuliert wird, ist kein frequenzabhängiger Unterschied zwischen Wildtyp und Knock-out festzustellen (**Abb. 21**).

Jedoch zeigen die Intensitätsreihen, dass sowohl im dunkel- wie im helladaptierten Zustand die stärksten Veränderungen erst im Bereich großer Reizstärken auftreten (**Abb. 16** und **20**). In beiden Fällen ist die B-Welle im Knock-out dramatisch verlängert, wenn eine kritische Reizstärke (skotopisch: 30 mCds/m², photopisch: 3000 mCds/m²) überschritten wird. Im Falle der dunkeladaptierten Retina war es möglich, mit einer diesbezüglich ausreichenden Intensität von 2500 mCds/m² Frequenzuntersuchungen durchzuführen. Diese Messreihe zeigt, dass beim Knock-out die Frequenzübertragung bei der hohen Intensität dramatisch schlechter ist, als im Wildtyp (**Abb. 22** und **23**). Eine entsprechende Messreihe unter helladaptierten Bedingungen konnte nicht durchgeführt werden, weil die vermutlich notwendigen Helligkeiten (> 3000 mCds/m²) für eine hochfrequente Stimulation technisch nicht machbar waren. Auch bei dem 6-Hz-Versuch zeigt sich ein dramatischer Effekt des HCN1-Knock-out. Beim 6-Hz-Versuch wird, vom dunkeladaptierten Zustand ausgehend, die Intensität über den skotopischen Bereich hinaus erhöht. Der typische Übergang der retinalen Signalverarbeitung vom skotopischen zum photopischen Sehen fand im Knock-out nicht statt (**Abb. 25** und **26**).

3.3. Untersuchungen an retinalen Ganglienzellen

Die Ableitungen der Maus-ERGs, wie sie im vorigen Kapitel beschrieben wurden, zeigen einen eindeutigen Effekt des HCN1-Knock-outs auf die retinale Informationsverarbeitung. Da es sich beim ERG um eine Summenableitung handelt, ist die Aussagekraft dieser Methode beschränkt. Sie erlaubt hauptsächlich die Beobachtung der ersten Stufen der retinalen Informationsverarbeitung. Dies sind die Ebenen der Photorezeptoren und Bipolarzellen. Vorgänge in der inneren Retina können gar nicht oder nur sehr indirekt beobachtet werden.

Mit dem ERG lassen sich nur Effekte im ON-Kanal der Retina direkt untersuchen. Ob auch der OFF-Kanal des HCN1-Knock-outs beeinflusst wird, kann mit dieser Methode nicht geklärt werden. Vor allen Dingen aber ist unsicher, ob die Veränderungen, die ich im ERG der HCN1-Knock-out-Tiere feststellen konnte, sich auf die Informationsweiterleitung in das Gehirn auswirken. Die Ausgangselemente der Retina sind die Ganglienzellen. Nur Informationen, die als Aktionspotentialfrequenz kodiert die Retina über den optischen Nerv verlassen, können die visuellen Zentren des Gehirns erreichen. Deswegen wurde die Untersuchung des HCN1-Knock-out auf Ganglienzellen ausgeweitet. Zusätzlich kann die Untersuchung von Ganglienzellen im Gegensatz zum ERG Erkenntnisse über den OFF-Kanal der Signalübertragung ergeben.

Um zu klären, ob sich die im ERG festgestellten Defizite auch auf der Ebene der Ganglienzellen zeigen lassen, wurden Retinae unter IR-Bedingungen präpariert und Ganglienzellen mit der Patch-Clamp-Technik abgeleitet. Mit Hilfe einer Stimulationsoptik konnten Reizmuster, ähnlich zu denen aus den Untersuchungen des ERGs am lebenden Tier, *in vitro* appliziert werden (siehe Material und Methoden, **Kap. 2.2.5.**). Die Antworten der Ganglienzellen auf die Lichtreize wurden elektrophysiologisch gemessen und aufgezeichnet.

3.3.1. Experimentelle Voraussetzungen

Die Präparation und die technischen Voraussetzungen, um Ganglienzellen abzuleiten sind in **Kap. 2.2.** beschrieben. Die Ableitung der Ganglienzellen erfolgte mit der Patch-Clamp-Methode in der Ganzzellkonfiguration. Um eine vergleichbare Reizung der einzelnen Ganglienzellen zu gewährleisten, führte ich eine einfache Charakterisierung des rezeptiven Feldes jeder Ganglienzelle durch (**Abb. 27**).

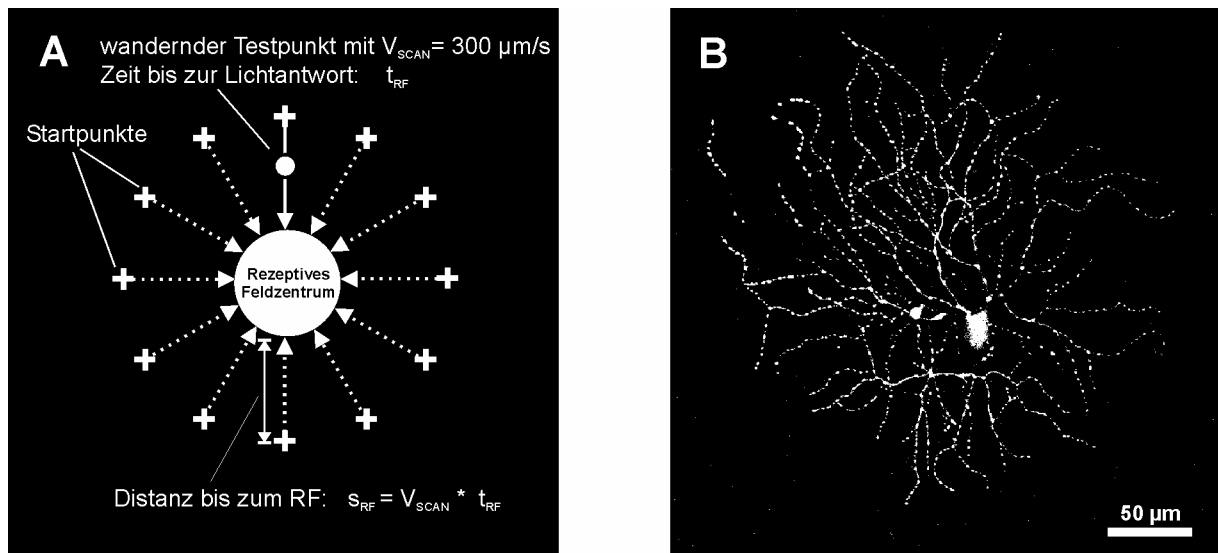


Abb. 27 : Prinzip des Scan-Mapping.

A: In der Projektionsebene wird ein Leuchtpunkt in 12 Richtungen auf das rezeptive Feld zu bewegt (Kreuze markieren die Startpunkte). Bei bekannter Geschwindigkeit V_{SCAN} kann aus der Zeit t_{RF} zwischen Start des Testpunktes und dem Beginn der Zellreaktion die Distanz s_{RF} zwischen Startpunkt und Rand des Feldzentrums berechnet werden.

B: Immunhistochemische Rekonstruktion der abgeleiteten Ganglienzelle aus Abb. 28. Der Durchmesser des Dendritenbaums beträgt ca. 230-280 μm .

3.3.1.1. Scan-Mapping

Dabei wurde zuerst die Position und Größe des rezeptiven Feldzentrums vermessen (sog. „Mapping“) und die Stimulationsoptik so angepasst, dass ein optimaler Zentrumsreiz appliziert werden konnte. Bei einigen Ganglienzellen war es möglich, umfangreiche Messreihen zur Frequenzübertragung durchzuführen. Dazu mussten die Ableitungen 30-60 min stabil bleiben und robuste Lichtantworten zeigen. Während der Ableitung wurden die Zellen mit Biozytin gefüllt. Nach erfolgreicher Ableitung wurde das Retinastück fixiert und immunhistochemisch weiterverarbeitet. Insbesondere konnte durch den Fluoreszenznachweis des Biozytins die Morphologie der Ganglienzelle dargestellt werden.

Mein Mapping-Verfahren beruht auf der Möglichkeit, während der Ableitung einer Ganglienzelle einen bewegten Lichtpunkt auf die Photorezeptoren der isolierten Retina zu projizieren. Dabei wird ein kleiner heller Testpunkt (Durchmesser 50 μm) auf dunklem Hintergrund aus der Peripherie zum Zentrum der Projektionsfläche bewegt (**Abb. 27 A**). Die Zelle wird in der Spannungs-klemme (Haltepotential: -60 mV) abgeleitet. Trifft der Testpunkt auf das rezeptive Feldzentrum der abgeleiteten Ganglienzelle, so reagiert diese mit einem markanten Membranstrom. Bei ON-Ganglienzellen löst der helle Reiz einen Einwärtsstrom aus. Der Einwärtsstrom wird von glutamataktivierten Ionenkanälen geleitet, die auf die

Glutamatfreisetzung der präsynaptischen ON-Bipolarzellen reagieren. Bei OFF-Ganglienzellen wird ein Auswärtsstrom gemessen. Vermutlich liegt diesem das Abschalten eines tonischen Einwärtsstroms zugrunde. Der tonische Einwärtsstrom kommt durch die Glutamatfreisetzung präsynaptischer OFF-Bipolarzellen zustande, die im Dunkeln erregt sind. Die Ganglienzelle in **Abb. 28** zeigt einen Auswärtsstrom, es handelt sich also um eine OFF-Ganglienzelle. Das Durchqueren des rezeptiven Umfelds führt gewöhnlich zu keiner oder nur einer sehr schwachen Antwort. Dieser Vorgang wird von 12 Startpunkten aus wiederholt, die den Ort der Ableitung kreisförmig umgeben. Die Bahnen, auf denen sich der Testpunkt zum Zentrum der Projektionsfläche bewegt, schließen jeweils einen Winkel von 30° zueinander ein. Dadurch wird das Zentrum aus 12 Richtungen zwischen 0° und 330° „angefahren“ (**Abb. 27 A**). Die Geschwindigkeit des Testpunktes beträgt $300 \mu\text{m} / \text{s}$. Aus der Verzögerungszeit t_{RF} zwischen Start der Projektion und der Reaktion der Ganglienzellen lässt sich somit die Strecke berechnen, die der Testpunkt bis zum Rand des rezeptiven Feldzentrums zurückgelegt hat. Unter der Annahme, dass es sich um ein etwa kreisförmiges rezeptives Feldzentrum handelt, lassen sich aus den zwölf „Abstandsvektoren“ seine Position und seine Größe konstruieren. Dazu werden die Endpunkte der Vektoren zu einem Polygon verbunden (**Abb. 28 unten**). Wenn die Stimulationseinrichtung bezüglich des Feldzentrums nicht zentriert ist, kommt es bei entgegengesetzten Richtungen zu sehr verschiedenen Verzögerungszeiten t_{RF} . Eine solche Situation ist in **Abb. 28 A** gezeigt. Die Verzögerungszeiten, hier bei den Richtungen 270° und 90° sind deutlich verschieden (**Abb. 28 A**, oben). Dies wird auch in der graphischen Rekonstruktion deutlich. Die Abstandsvektoren haben sehr verschiedene Längen, die symmetrische Eingrenzung des Feldzentrums gelingt nicht (**Abb. 28 A**, unten). Die Stimationssoftware erlaubt es, die Projektion zur Korrektur nach rechts zu verschieben. Dadurch gleichen sich die Verzögerungszeiten an (**Abb. 28 B**, oben). Das Zentrum des rezeptiven Feldes fällt nun in die Mitte der Projektion (**Abb. 28 B**, unten). In dieser Situation kann die durchschnittliche Verzögerungszeit aller 12 Richtungen zur Bestimmung der Größe des rezeptiven Feldzentrums benutzt werden. In diesem Fall ergab die Auswertung einen Durchmesser von $250 \mu\text{m}$. Auch die Dauer des Auswärtsstroms weist auf die rezeptive Feldgröße hin. Der Auswärtsstrom dauert etwa eine Sekunde an. Bei einer Geschwindigkeit von $300 \mu\text{m/s}$, ist es ziemlich genau die Zeit, die der Stimulus braucht, um das Feldzentrum zu durchqueren. Diese Analyse geht aber von der Annahme aus, dass es sich um einen tonischen Strom handelt. Die vorher beschriebene Analyse ist von dieser Annahme unabhängig und deshalb besser geeignet, das rezeptive Feld zu kartieren.

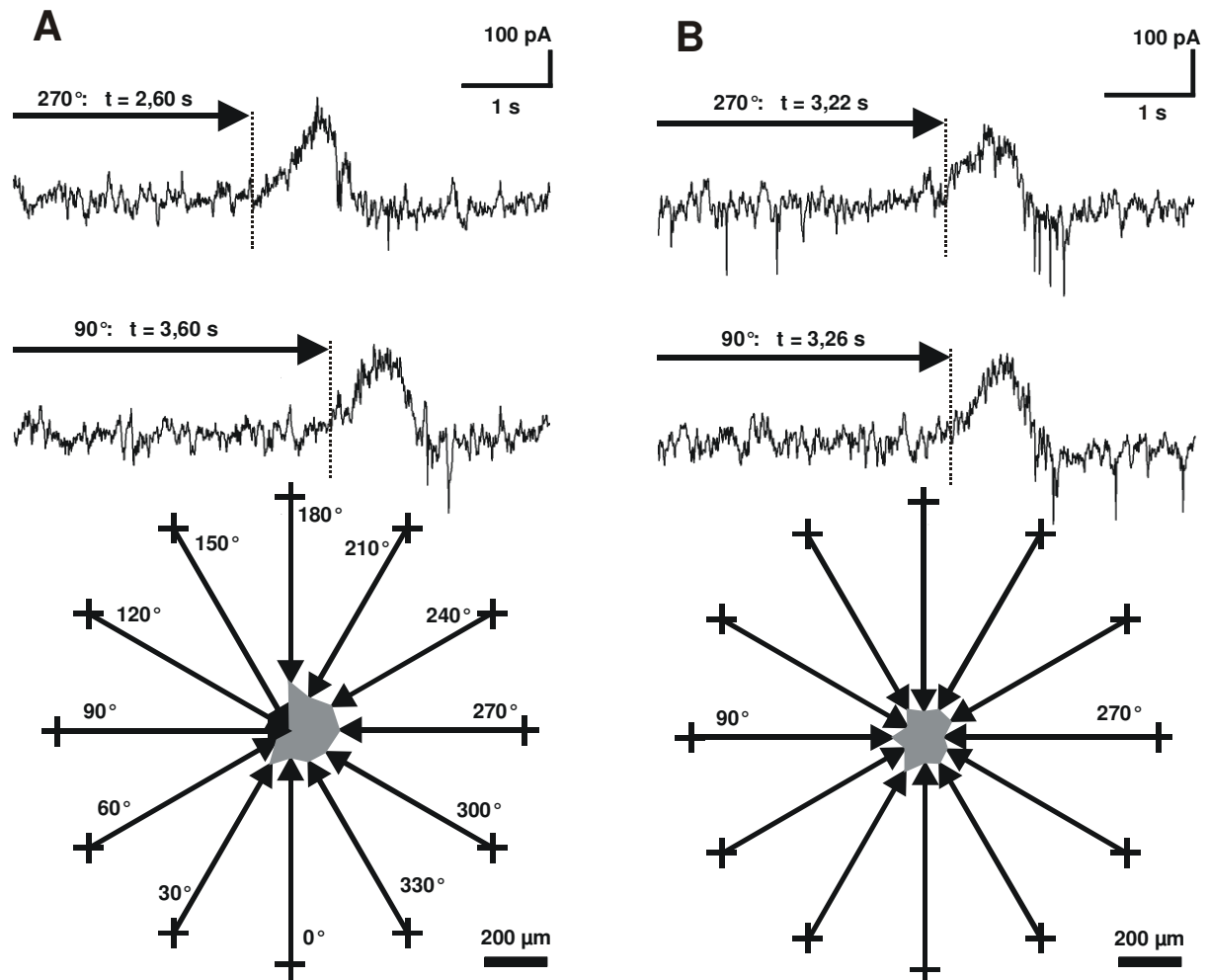


Abb. 28: Durchführung des Scan-Mappings.

A: Scan-Mapping der Ganglienzelle vor der Korrektur. Ableitungen in der Spannungsklemme zeigen die Durchläufe des Testpunktes in entgegengesetzter Richtung (90° und 270°). Die Verzögerung bis zur Lichtantwort ist sehr unterschiedlich. Aus den verschiedenen Abständen vom jeweiligen Startpunkt ergibt sich die Rekonstruktion (unten). Das receptive Feldzentrum ist nicht zentriert.

B: Das Stimulationsmuster wurde nach rechts verschoben. Nun sind die Verzögerungszeiten in den Ableitungen in entgegengesetzter Richtung etwa gleich lang (90° und 270°). Die Rekonstruktion zeigt, dass das receptive Feldzentrum zentriert ist.

Das receptive Feldzentrum entspricht etwa der Ausdehnung des Dendritenbaums von Ganglienzellen (Peichl & Wässle, 1983). **Abb. 27 B** zeigt die durch Fluoreszenznachweis des Markers Biozytin rekonstruierte Zelle aus **Abb. 28**. Durchmesser des rezeptiven Feldzentrums und Durchmesser des Dendritenbaums (230-280 μm, je nach Richtung) stimmen sehr gut überein. Im Allgemeinen konnte die Größe des Dendritenbaums auf diese Weise auf 50 μm genau vorhergesagt werden.

3.3.1.2. Charakterisierung einfacher rezeptiver Felder

Neben einer Abschätzung der Größe der Zelle ermöglicht das "Mappen" die einfache Klassifizierung der Ganglienzellen in ON- und OFF-Ganglienzellen. Die rezeptiven Felder der meisten Ganglienzellen sind konzentrisch aufgebaut und bestehen aus einem Feldzentrum, das antagonistisch zum rezeptiven Umfeld verschaltet ist. ON-Ganglienzellen werden durch Belichtung des Zentrums erregt und durch Belichtung des Umfelds gehemmt. Umgekehrt hemmt die Belichtung des Feldzentrums eine OFF-Ganglienzelle, während die Belichtung des Umfelds die Zelle erregt. Dieser Zusammenhang wird in **Abb. 29** anhand einer OFF-Ganglienzelle dargestellt. Nach dem Mappen wird ein Leuchtpunkt (Durchmesser 50 μm) für 200 ms in das Zentrum des rezeptiven Feldes projiziert (**Abb. 29 A**, links; rezeptives Feldzentrum in blau, Position und Größe des Lichtpunktes in gelb). Die resultierende Lichtantwort wird in der Spannungsklemme bei einem Haltepotential von -60 mV gemessen (**Abb. 29 A**, rechts). Der Lichtpunkt löst einen auswärtsgerichteten Strom von mehr als 500 pA aus. Ein Auswärtsstrom würde die Ganglienzelle inhibieren. Daher handelt es sich hier um ein OFF-Feldzentrum. Zur Demonstration des rezeptiven Umfelds wird der Leuchtpunkt danach um 500 μm in x- bzw. y-Achse der Projektionsfläche verschoben, so dass er im Umfeld der Ganglienzelle aufleuchtet (**Abb. 29 B** und **29 C**, links). In beiden Fällen löst der Lichtpunkt einen ca. 150 pA großen Einwärtsstrom aus (**Abb. 29 B** und **29 C**, rechts, gleiche Skalierung wie **29 A**). Dies zeigt, dass das Umfeld der Ganglienzelle antagonistisch zum Feldzentrum wirkt, da die Zelle durch Belichtung des Umfelds erregt wird. Typisch ist auch, dass die Umfeldantwort deutlich kleiner als die Zentrumsantwort ist. Häufig konnten gar keine Umfeldantworten gemessen werden (nicht gezeigt). ON- und OFF-Zentrum der Ganglienzellen kommen durch die spezifischen synaptischen Kontakte mit Bipolarzellen im Bereich des rezeptiven Feldzentrums zustande (zur Übersicht: Masland, 2001b). Der Dendritenbaum einer Ganglienzelle bildet daher typischerweise feine Verzweigungen dort in der IPL, wo die Axone der entsprechenden Bipolarzellen terminieren. OFF-Bipolarzellen haben kurze Axone und bilden synaptische Kontakte zu OFF-Ganglienzellen in der äußeren Schicht der IPL (OFF-Sublamina). Dagegen haben ON-Bipolarzellen lange Axone und bilden in der inneren IPL (ON-Sublamina) synaptische Kontakte mit den Dendriten von ON-Ganglienzellen. Daher ergibt sich die Möglichkeit, die physiologische Klassifikation der abgeleiteten Ganglienzelle mit anatomischen Methoden zu überprüfen.

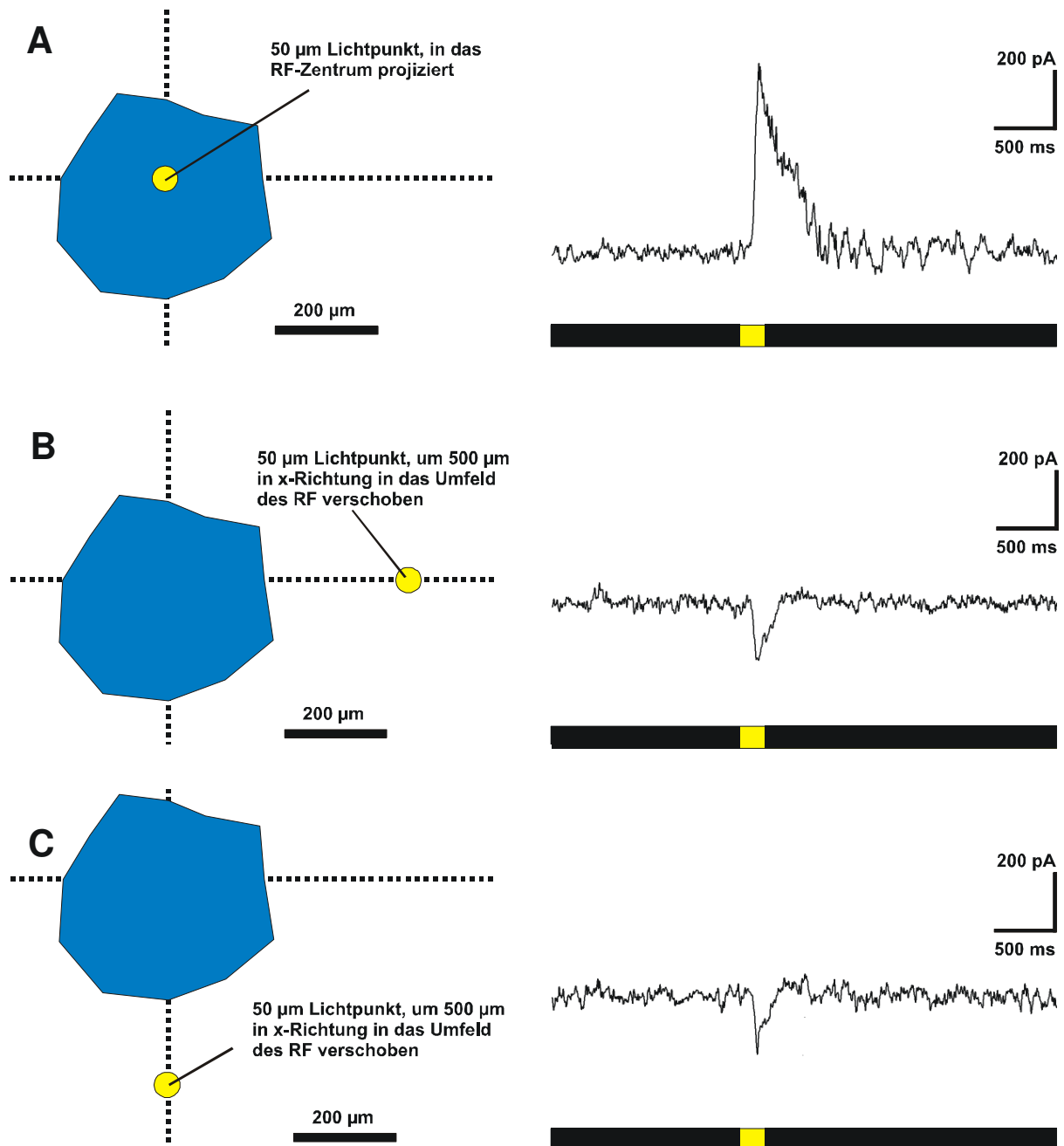


Abb. 29: Demonstration von Zentrums- und Umfeldantwort einer OFF-Ganglienzelle.

A: links: Projektion eines Testpunktes (gelb) in das rezeptive Feldzentrum (blau); rechts: die Lichtantwort der Ganglienzelle bei Projektion des Testpunktes. Im Zentrum des rezeptiven Feldes löst der Lichtpunkt einen Auswärtsstrom von 500 pA aus (Helligkeit: 31000 $\text{Rh}^*/(\text{Stäbchen}^*\text{s})$, Dauer: 200 ms, gelbe Markierung).

B: links: Projektion eines Testpunktes (gelb) 500 μm nach rechts in das Umfeld verschoben; rechts: die Lichtantwort der Ganglienzelle bei Projektion des Testpunktes. Im Umfeld des rezeptiven Feldes führt der Lichtpunkt zu einem Einwärtsstrom von 150 pA. Reizbedingungen siehe A.

C: links: Projektion eines Testpunktes (gelb) 500 μm nach unten in das Umfeld verschoben; Details wie in A.

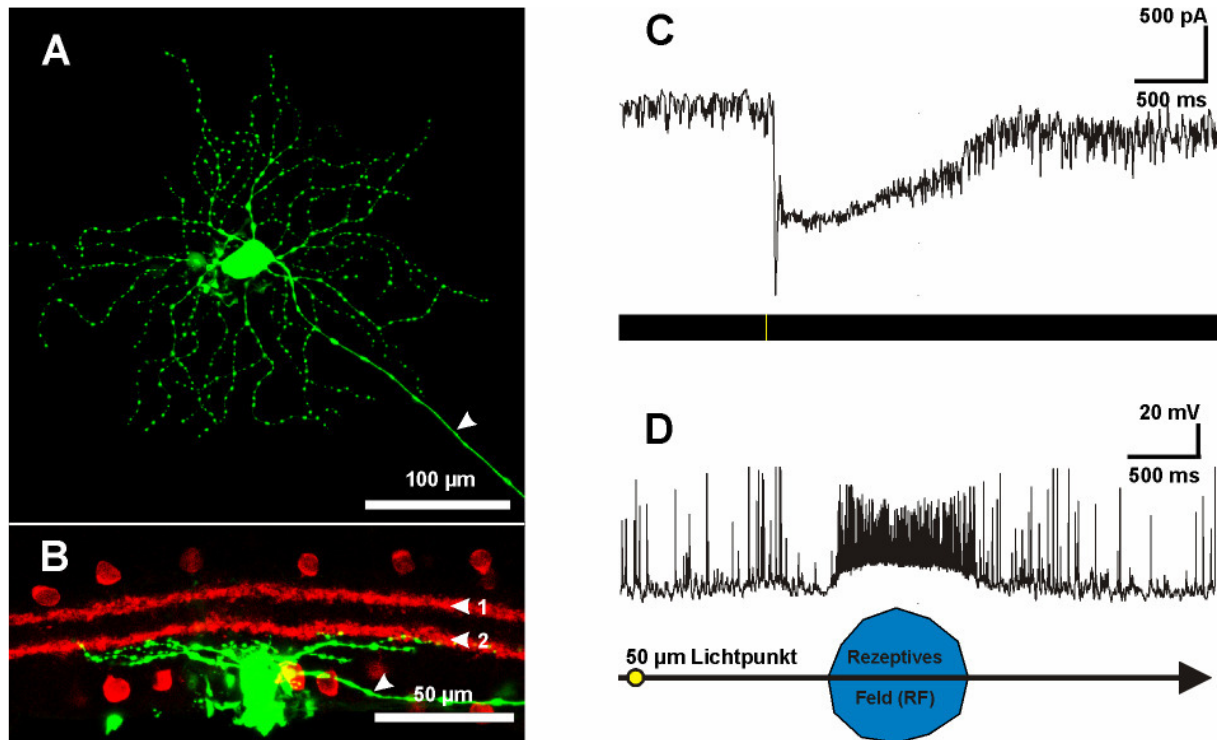


Abb. 30: Anatomische und physiologische Klassifikation einer ON-Ganglienzelle.

A: Anatomische Rekonstruktion einer abgeleiteten Ganglienzelle. Färbung erfolgte durch Fluoreszenznachweis des Markers Biozytin. Das Axon der Ganglienzelle verlässt den Bildausschnitt zum blinden Fleck (Pfeilkopf).

B: Zur Analyse des Stratifikationsniveaus in der IPL wurde ein Vertikalschnitt der Retina mit Antikörpern gegen Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) gefärbt. Die Färbung zeigt die cholinergen Banden (1 und 2) und Somata von Amakrinzellen (rot). Die dendritischen Verzweigungen der Ganglienzelle (grün) liegen unterhalb oder höchstens innerhalb der ON-cholinergen Bande (2).

C: Lichtantwort der gefärbten Ganglienzelle in der Spannungsklemme. Ein optimaler Zentrumsreiz (20 ms (gelbe Markierung), Intensität: $620 \text{ Rh}^* / (\text{Stäbchen} \cdot \text{Reiz})$) ruft einen Einwärtsstrom hervor.

D: Lichtantwort der Ganglienzelle in der Stromklemme. Der wandernde Testpunkt (gelb) führt beim Durchqueren des rezeptiven Feldes (blau) zu einer starken Depolarisation und einer Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz. Man beachte, dass die Höhe der Aktionspotentiale durch die Veränderung des Eingangswiderstandes und die begrenzte Abtastrate der Datenaufzeichnung nicht korrekt wiedergegeben wird.

Dazu wurde das Retinastück mit der abgeleiteten Ganglienzelle fixiert und immunhistochemisch weiterverarbeitet. Der intrazelluläre Marker Biozytin wurde durch einen Fluoreszenznachweis sichtbar gemacht (**Abb. 30 A** und **31 A**).

In der Aufsicht des Ganzpräparats kann das Verzweigungsmuster des Dendritenbaums der Ganglienzellen genau rekonstruiert werden. Im Ganzpräparat kommt es leider zu einer künstlichen Stauchung der Retina. Da die Auflösung des Mikroskops in vertikaler Richtung begrenzt ist, ist es schwierig, das Stratifikationsniveau in der IPL zu bestimmen. Deswegen wurden zur genauen Analyse nachträglich Vertikalschnitte des Präparats erstellt (**Abb. 30 B** und **31 B**, siehe Material und Methoden, **Kap. 2.3.3.**). Durch eine zweite immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) kann in solchen Schnitten die relative Lage des Dendritenbaums der Ganglienzelle in der IPL festgestellt werden. Die Markierung gegen ChAT färbt zwei horizontale Banden in der IPL, die durch die

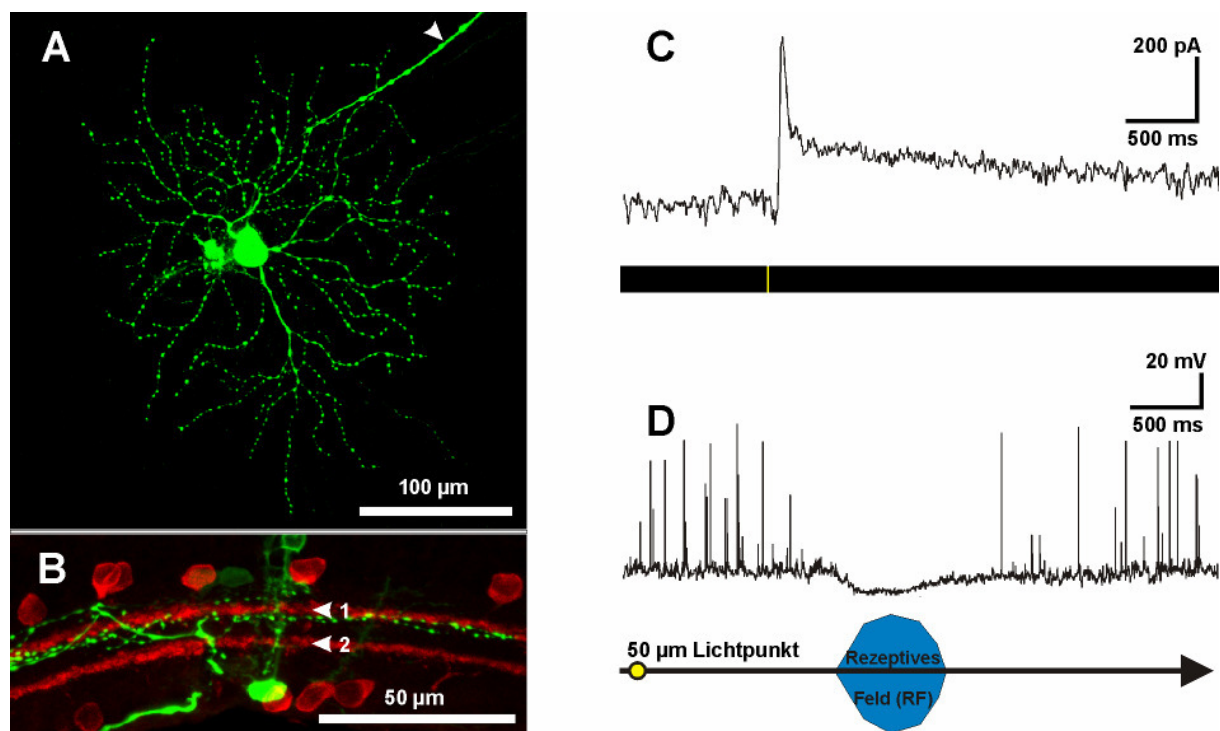


Abb. 31: Anatomische und physiologische Charakterisierung einer OFF-Ganglienzelle.

A: Anatomische Rekonstruktion einer abgeleiteten Ganglienzelle. Färbung erfolgte durch Fluoreszenznachweis des Markers Biozytin. Das Axon der Ganglienzelle verlässt den Bildausschnitt zum blinden Fleck (Pfeilkopf).

B: Zur Analyse des Stratifikationsniveaus in der IPL wurde ein Vertikalschnitt der Retina mit Antikörpern gegen Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) gefärbt. Die Färbung zeigt die cholinergen Banden (1 und 2) und Somata von Amakrinzellen (rot). Die dendritischen Verzweigungen der Ganglienzelle (grün) liegen oberhalb der ON-cholinergen Bande (2), vor allem rund um die OFF-cholinerge Bande (1).

C: Lichtantwort der gefärbten Ganglienzelle in der Spannungsklemme. Ein optimaler Zentrumsreiz (20 ms (gelbe Markierung), Intensität: $620 \text{ Rh}^* / (\text{Stäbchen} \cdot \text{Reiz})$) ruft einen Auswärtsstrom hervor.

D: Lichtantwort der Ganglienzelle in der Stromklemme. Der wandernde Testpunkt (gelb) führt beim Durchqueren des rezeptiven Feldes (blau) zu einer starken Hyperpolarisation und einer Abnahme der Aktionspotentialfrequenz. Durch eine begrenzte Abtastrate der Datenerfassung wird die Größe der Aktionspotentiale nicht korrekt wiedergegeben.

Dendriten von cholinergen Amakrinzellen gebildet werden. Diese Banden können als Orientierungshilfen benutzt werden. Die äußere, so genannte OFF-cholinerge Bande liegt etwa in der Mitte der OFF-Sublamina. Die innere, ON-cholinerge Bande markiert den äußeren Rand der ON-Sublamina. Dendritische Verzweigungen der Ganglienzelle, die innerhalb der ON-cholinergen Bande oder noch weiter innen, Richtung GCL liegen, weisen somit auf ein ON-Feldzentrum hin. Finden sich die Dendriten weiter außen als die ON-cholinerge Bande, handelt es sich um eine Ganglienzelle mit OFF-Zentrum.

Diese anatomischen Untersuchungen sind in **Abb. 30** und **31** den elektrophysiologischen Daten gegenübergestellt. **Abb. 30 A** zeigt eine ON-Ganglienzelle. In der Spannungsklemme (Haltepotential -60 mV) reagierte die Zelle auf einen 20 ms langen, optimalen Zentrumsreiz mit einem ausgeprägten Einwärtsstrom (**Abb. 30 C**). Während des Mappings wanderte ein 50

µm Lichtpunkt quer durch das rezeptive Feld. In **30 D** ist in der Stromklemme zu sehen, dass der Lichtpunkt beim Durchqueren des Feldzentrums zu einer starken Depolarisation führt und die Aktionspotentialfrequenz der Ganglienzelle erhöht. Hier ist zu beachten, dass der Eingangswiderstand und die begrenzte Abtastrate die korrekte Wiedergabe der schnellen Aktionspotentiale beeinträchtigen (siehe Material und Methoden, **Kap. 2.2.4.4.**).

Die physiologische Einordnung als ON-Ganglienzelle wird durch den anatomischen Befund bestätigt. Im Vertikalschnitt finden sich die Dendriten der Ganglienzelle (grün) unterhalb bzw. höchstens innerhalb der ON-cholinergen Bande (**Abb. 30 B**, Bande 2, rot).

Die Charakterisierung einer OFF-Ganglienzelle ist in **Abb. 31** dargestellt. Die Reaktion der Ganglienzelle auf einen optimalen Zentrumsreiz (20 ms Dauer) ist in der Spannungsklemme (Haltepotential -60 mV) ein starker, auswärtsgerichteter Strom. Die Aufnahme in der Stromklemme zeigt daher eine inhibitorische Wirkung des Lichtpunktes. Während der Lichtpunkt das Feldzentrum durchläuft, ist eine Hyperpolarisation des Membranpotentials zu erkennen. Die spontane Bildung von Aktionspotentialen wird unterbrochen und beginnt erst nach der Durchquerung des rezeptiven Feldes wieder (**Abb. 31 D**).

3.3.1.3. Charakterisierung komplexer rezeptiver Felder

Neben Ganglienzellen mit einfachem Zentrum-Umfeld-Antagonismus gibt es Ganglienzellklassen, die über komplexe rezeptive Feldeigenschaften verfügen. Ein bekanntes Beispiel sind die richtungsselektiven Ganglienzellen oder DSGCs (engl.: direction-selective ganglion cells). Die Zellklasse der ON-OFF-DSGCs ist bereits in vielen Spezies beschrieben und wurde vor kurzem auch in der Maus charakterisiert (Barlow & Hill, 1963; Weng et al., 2004). Lokale, synaptische Interaktionen zwischen den Ganglienzelldendriten und den Dendriten der cholinergen Amakrinzellen liegen der Richtungsselektivität zugrunde. Die DSGC wurde auch in meinen Untersuchungen gefunden und soll hier als Beispiel für eine „komplexe“ Ganglienzelle vorgestellt werden. In **Abb. 32 A** ist die Rekonstruktion einer ON-OFF-DSGC abgebildet. Typisch für die Morphologie dieser Zellklasse ist der dichte Dendritenbaum und der geschwungene Verlauf der dendritischen Äste (**Abb. 32 A**, besonders links oben). Die DSGC hat dendritische Verzweigungen in beiden cholinergen Banden, ist also bistratifiziert. **Abb. 32 B** zeigt im Vertikalschnitt, dass die Dendriten der Zelle genau innerhalb der ON- und der OFF- cholinergen Banden verlaufen. In der Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle erscheinen die dendritischen Fortsätze (grün) innerhalb der cholinergen Banden (rot) teilweise gelb.

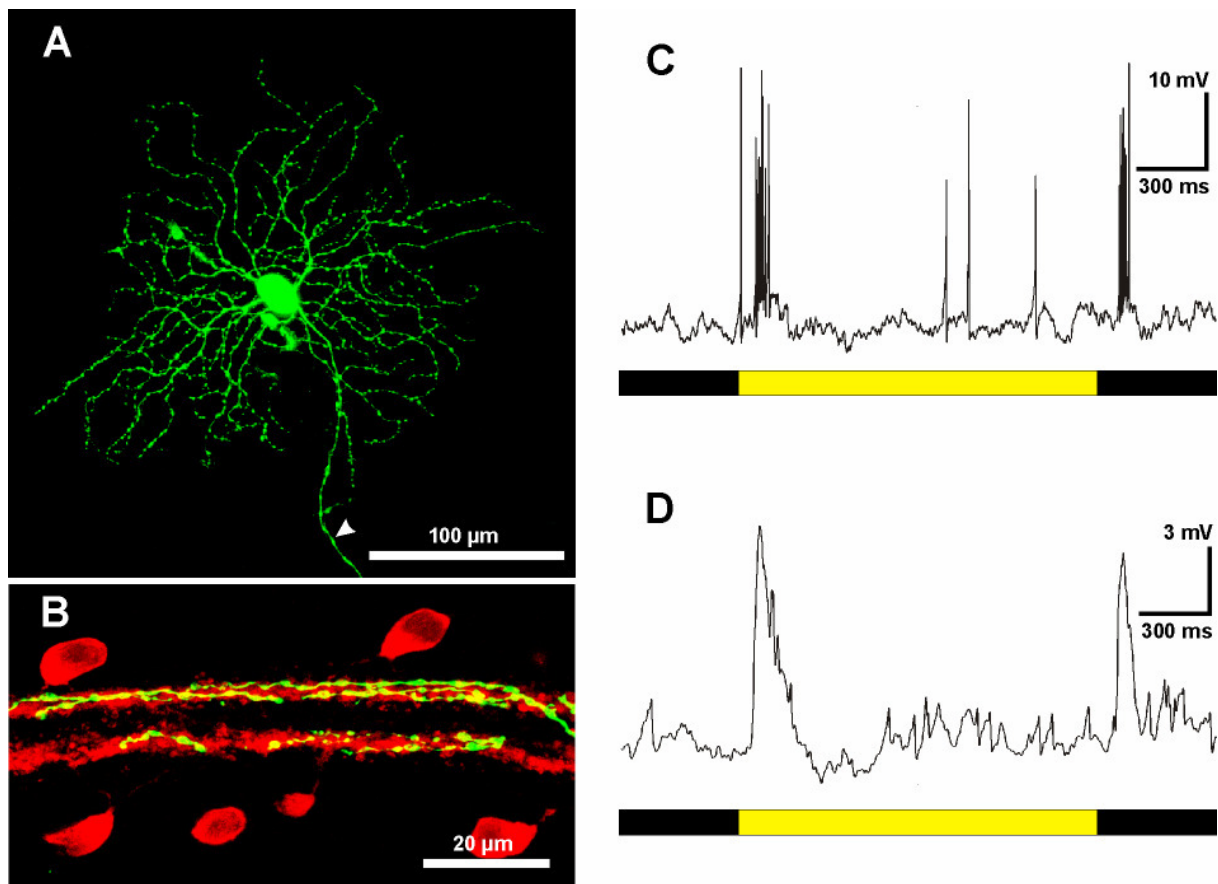


Abb. 32: ON-OFF-DSGC: Morphologie und Lichtantwort auf einen stationären Lichtreiz.

A: Anatomische Rekonstruktion einer ON-OFF-richtungselektiven Ganglienzelle (DSGC). Die Färbung erfolgte durch Fluoreszenznachweis des Markers Biozytin. Das Axon der Ganglienzelle verlässt den Bildausschnitt zum blinden Fleck (Pfeilkopf).

B: Zur Analyse des Stratifikationsniveaus in der IPL wurde ein Vertikalschnitt der Retina mit Antikörpern gegen Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) gefärbt. Die Färbung zeigt die cholinergen Banden und Somata von Amakrinzellen (rot). Die dendritischen Verzweigungen der Ganglienzelle (grün) liegen innerhalb der ON- und der OFF-cholinergen Bande.

C: Lichtantwort einer DSGC auf einen stationären Zentrumsreiz in der Stromklemme (Dauer: 1500 ms (gelbe Markierung), Intensität: $900 \text{ Rh}^* / \text{Stäbchen} \cdot \text{s}$). Beginn und Ende des Lichtreizes führen zur Bildung einer Gruppe von Aktionspotentialen.

D: Fünffach gemittelte Lichtantwort der Ganglienzelle in der Stromklemme. Die Aktionspotentiale wurden durch einen 50 Hz-Filter aus der Aufnahme entfernt. Man erkennt transiente Depolarisationen bei Beginn und Ende der Stimulation. Reizparameter wie in C.

Da die Ganglienzelle Eingänge von ON- und von OFF-Bipolarzellen bekommt, zeigt ihre Lichtantwort auf einen stationären Reiz eine so genannte ON-OFF-Charakteristik: sie wird sowohl durch den Beginn, als auch durch das Ende einer Belichtung erregt. **Abb. 32 C** zeigt eine solche Lichtantwort in der Stromklemme. Am Anfang und am Ende des Lichtreizes (Länge: 1,5 s, Durchmesser: $200 \mu\text{m}$, Intensität: $900 \text{ Rh}^* / \text{Stäbchen} \cdot \text{s}$) bildet die Zelle eine Gruppe von Aktionspotentialen aus. In **Abb. 32 D** sind Daten aus fünf solcher Durchgänge gemittelt, die Aktionspotentiale wurden durch einen 50 Hz Tiefpassfilter entfernt. Man erkennt, dass die Depolarisationen zu Beginn und zu Ende des Reizes sehr transient sind.

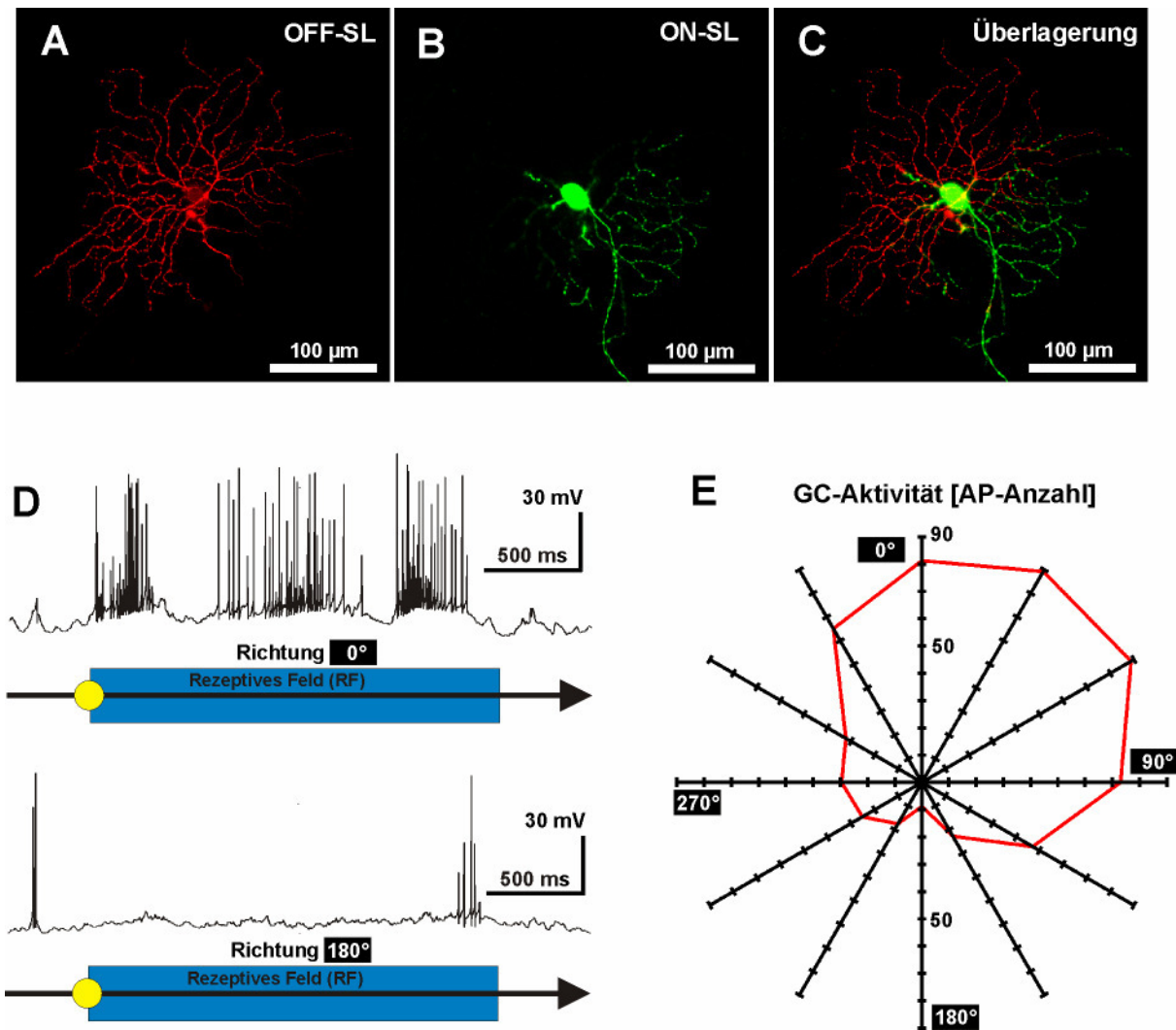


Abb. 33: ON-OFF-DSGC: Morphologie und Lichtantwort auf einen bewegten Reiz in der Stromklemme.

A+B: Anatomische Rekonstruktion einer ON-OFF-richtungselektiven Ganglienzelle (DSGC). Färbung erfolgte durch Fluoreszenznachweis des Markers Biozytin. Der Bildstapel der konfokalen Projektion wurde in OFF-Sublamina (A) und ON-Sublamina (B) aufgeteilt. Man erkennt die Anteile des Dendritenbaums in Falschfarben: OFF-Anteil in rot, ON-Anteil in grün.

C: Überlagerung von A und B.

D: Lichtantwort der abgeleiteten DSGC auf einen bewegten Lichtpunkt in der Stromklemme (50 μm Durchmesser, gelber Punkt; Intensität: 31000 $\text{Rh}^* / \text{Stäbchen} \cdot \text{s}$). Während der Durchquerung des rezeptiven Feldes (blau) kommt es in Richtung 0° (oben) zur Ausbildung von zahlreichen Aktionspotentialen. Die Durchquerung in Richtung 180° führt nur zur Bildung von sehr wenigen Aktionspotentialen.

E: Auswertung der richtungselektiven Reaktion der DSGC. Die durchschnittliche Anzahl der Aktionspotentiale ist kreisförmig gegen die Richtung der Lichtstimulation aufgetragen ($n=4$). Reizparameter siehe D. Verbindet man die einzelnen Messwerte, entsteht eine Fläche, deren geometrischer Schwerpunkt die Vorzugsrichtung der DSGC anzeigt.

Da sich in der vertikalen Projektion deutlich zwei getrennte Stratifikationsebenen trennen ließen, wurde der konfokale Bildstapel, der die Projektion des gesamten Dendritenbaums zeigt (**Abb. 32 A**), in den ON- und OFF-Bereich aufgeteilt (**Abb. 33 A** und **33 B**). Die Überlagerung (**Abb. 33 C**) zeigt, dass sich ON- und OFF-Dendritenbaum in etwa gegenüber stehen. Auffällig ist, dass die Stratifikation in der OFF-Sublamina sehr viel ausgedehnter als in der ON-Sublamina ist.

In **Abb. 33 D** ist die richtungsselektive Reaktion der Ganglienzelle gezeigt. Die Abbildungen zeigen das Verhalten der Membranspannung, wenn sich ein 50 µm großer Lichtpunkt durch das rezeptive Feld bewegt. Es wird die Bewegung in Richtung 0° mit der entgegengesetzten Richtung (180°) verglichen. In Richtung 0° bildet die Ganglienzelle eine Vielzahl von Aktionspotentialen aus (insgesamt 54). Die Aktionspotentiale treten dabei in drei Gruppen auf. In der entgegengesetzten Richtung treten nur sehr wenige Aktionspotentiale auf. Die Auswertung aus vier Durchgängen und zwölf Testrichtungen ergibt **Abb. 33 E**. In diesem Graph ist die durchschnittliche Anzahl der Aktionspotentiale gegen die Bewegungsrichtung des Lichtpunkts kreisförmig aufgetragen. Verbindet man die Messwerte zu einer geschlossenen Linie, ergibt sich eine Fläche, deren geometrischer Schwerpunkt zur bevorzugten Richtung der Ganglienzelle verlagert ist. Man erkennt, dass die Ganglienzelle richtungsselektiv reagiert und die so genannte „Vorzugsrichtung“ zwischen 0° und 90° liegt. Ein sehr ähnliches Ergebnis bringt der gleiche Versuch in der Spannungsklemme (**Abb. 34**). Auch die Ströme bei einem Haltepotential von -60 mV zeigen die richtungsselektive Reaktion der Zelle. In der Richtung 0° werden, während der Lichtpunkt das rezeptive Feld durchquert, Einwärtsströme gemessen, in Richtung 180° Auswärtsströme. Das gepunktete Niveau zeigt jeweils den durchschnittlichen Haltestrom vor der Stimulation (**Abb. 34 A**). Auffällig ist, dass sich bei 0° in der Spannungsklemme drei Stromfluktuationen abzeichnen.

Diese erregenden Ströme führen in der Stromklemme zu den drei getrennten Gruppen von Aktionspotentialen (**Abb. 33 B**). Für **Abb. 34 B** wurde der durchschnittliche Nettostrom über den Zeitraum der Zentrumsdurchquerung (Zeitraum von 2 s, durch den blau unterlegten Bereich symbolisiert) berechnet und in Abhängigkeit der Stimulationsrichtung aufgetragen. Für 0° entnimmt man dem Graphen z.B., dass während der Durchquerung im Durchschnitt ein Einwärtsstrom von -55 pA geflossen ist. Der Kreis gibt den Haltestrom vor der Stimulation und damit die Grenze zwischen Einwärtsstrom und Auswärtsstrom an. Werte außerhalb des Kreises wirken bezogen auf das Haltepotential von -60 mV depolarisierend, innerhalb des Kreises hyperpolarisierend.

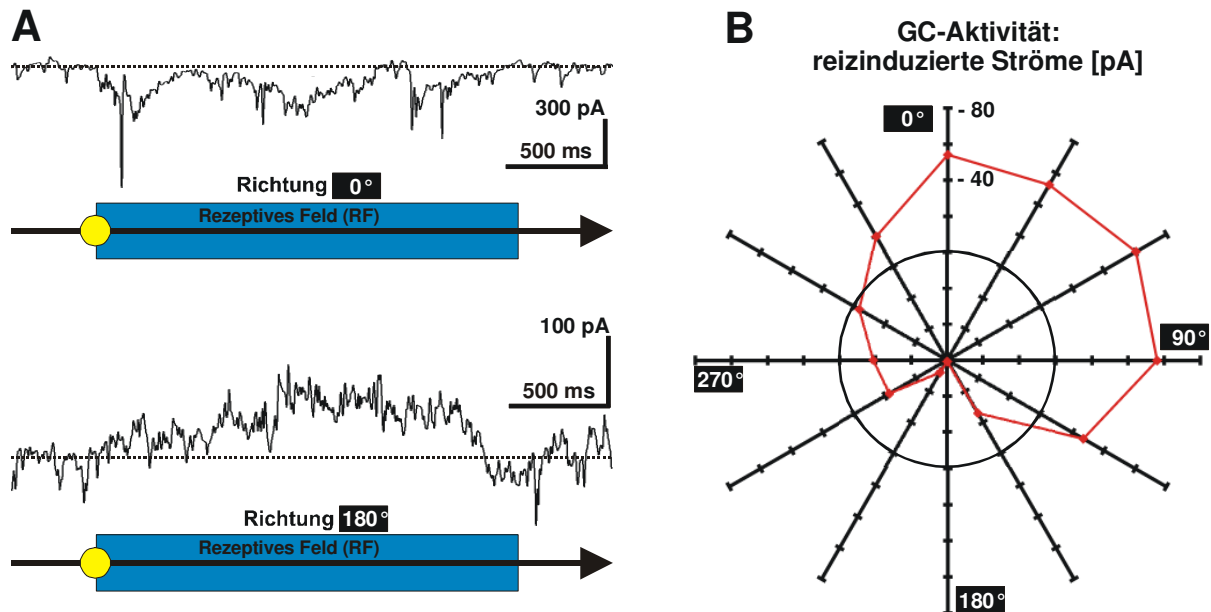


Abb. 34: ON-OFF-DSGC: Lichtantwort auf einen bewegten Reiz in der Spannsklemme

A: Lichtantwort der abgeleiteten DSGC auf einen bewegten Lichtpunkt in der Spannsklemme ($50\ \mu\text{m}$ Durchmesser, gelber Punkt; Intensität: $31000\ \text{Rh}^* / (\text{Stäbchen} \cdot \text{s})$). Während der Durchquerung des rezeptiven Feldes (blau) kommt es in Richtung 0° (oben) zu einem Einwärtsstrom. Die Durchquerung in Richtung 180° führt zu einem Auswärtsstrom. Die gepunkteten Linien geben den Haltestrom vor der Stimulation an.

B: Auswertung der richtungsselektiven Reaktion aus A. Der durchschnittliche Membranstrom während der Durchquerung des rezeptiven Feldes ist kreisförmig gegen die Richtung der Lichtstimulation aufgetragen. Reizparameter siehe A. Verbindet man die einzelnen Messwerte, entsteht eine Fläche, deren geometrischer Schwerpunkt die Vorzugsrichtung der DSGC anzeigt. Man vergleiche mit Abb. 33 D und 33 E.

Anhand der bisher präsentierten Daten wird deutlich, dass ich mit dem beschriebenen experimentellen Ansatz die Möglichkeiten habe, Ganglienzellen *in vitro* abzuleiten und ihre physiologischen Antworten auf Lichtreize zu messen. Durch das Scan-Mapping kann die Position und Größe des rezeptiven Feldzentrums bestimmt werden (Abb. 27 und 28). Der Vergleich elektrophysiologischer Antworten mit morphologischen Ergebnissen und Literaturdaten zeigt, dass sowohl Ganglienzellen mit einfachem Zentrum-Umfeld-Antagonismus als auch mit komplexen rezeptiven Feldeigenschaften identifiziert werden und ihre Lichtantworten charakterisiert werden konnten (Abb. 29-34).

3.3.2. Untersuchung der Frequenzübertragung in Ganglienzellen

Durch Patch-Clamp-Ableitungen von Ganglienzellen sollten die Erkenntnisse zur Frequenzübertragung aus den ERG-Messungen überprüft und auf die innere Retina übertragen werden. In der Mausretina sind morphologisch zu unterscheidende Ganglienzelltypen beschrieben worden, die sich in ihrem Antwortverhalten unterscheiden (Sun et al., 2002; Pang et al., 2003). Um in meinen Ergebnissen die Variabilität durch diese unterschiedlichen Antwortcharakteristiken zu reduzieren, verfolgte ich die Strategie, die Anzahl der untersuchten Ganglienzellklassen von vorne herein zu begrenzen. Ein geeignetes, einfaches Kriterium dazu ist die Selektion der Ganglienzellen nach der Somagröße. Anatomische Arbeiten in verschiedenen Spezies zeigen, dass die Somagröße und -form ein morphologisches Kriterium ist, das Ganglienzellklassen identifiziert (Sun et al., 2002). Daher habe ich bei der Auswahl der Zellen für die elektrophysiologischen Ableitungen große Somata bevorzugt. Dies hat zusätzlich einen praktischen Vorteil, weil erfolgreiche Patch-Clamp-Ableitungen von großen Somata einfacher gelingen und eine geringere Gefahr besteht, irrtümlich Amakrinzellen abzuleiten. Die so genannten „versetzten“ Amakrinzellen, die ihre Somata in der Ganglienzellschicht haben, machen mindestens 50 % der Somata (etwa 60.000) in der GCL aus (Jeon et al., 1998). Tatsächlich wurde keine der abgeleiteten Zellen als Amakrinzelle identifiziert.

Die Untersuchung der Frequenzübertragung auf Ganglienzellen erforderte ein umfangreiches Versuchsprogramm, das die Charakterisierung des rezeptiven Feldes und eine große Anzahl von Frequenzmessungen bei verschiedenen Reizintensitäten einschließt (siehe unten). Daher waren nur Ableitungen zu verwenden, die über einen Zeitraum von 30-60 min stabile und robuste Lichtantworten zeigten. Aufgrund dieser Schwierigkeiten konnten nur relativ wenige Daten zur Frequenzübertragung auf Ganglienzellen erhoben werden.

Um die Frequenzübertragung zu untersuchen, wurden zunächst Größe und Position des rezeptiven Feldzentrums bestimmt (**Abb. 35 A**, vergleiche **Abb. 27**). Die Reizprojektion wurde auf das Feldzentrum zentriert und anhand der Größenabschätzung ein möglichst optimaler kreisförmiger Zentrumsreiz eingestellt. Dabei wurde im Zweifel die Reizgröße bevorzugt, die die größte Lichtantwort hervorrief. Der optimale Zentrumsreiz wurde in einem Zeitraum von je 3,5 s in verschiedenen Frequenzen zwischen 0,5 und 25 Hz appliziert. Jeder Einzelreiz war 20 ms lang. Für jede Frequenz wurde die Messung dreimal wiederholt.

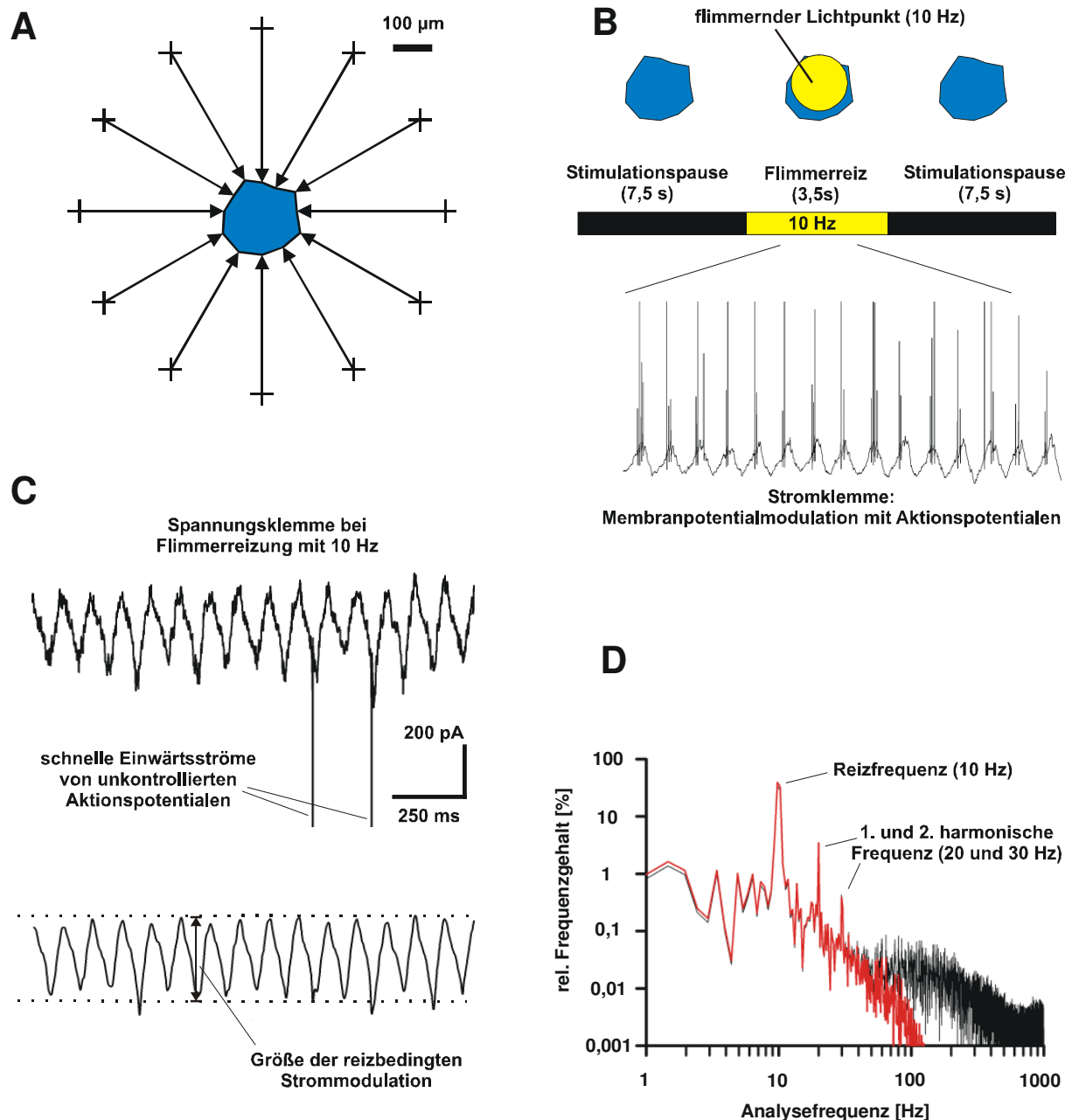


Abb. 35: Experimentelles Vorgehen bei der Messung der Frequenzübertragung an Ganglienzellen.

A: Vermessen und Zentrieren des rezeptiven Feldzentrums (sog. Scan-Mapping, siehe Abb. 27 und 28)

B: oben: Mit einem angepassten Lichtpunkt werden Flimmerreize unterschiedlicher Frequenzen appliziert. (620 Rh*/ (Stäbchen*Reiz), Einzelreizdauer: 20 ms, Frequenzen: 0,5 - 25 Hz; 3 Messungen, je 3,5 s). Aufnahmen in der Stromklemme zeigen, dass die Lichtreize das Membranpotential verändern und die Aktionspotentialbildung bestimmen (unten, 1,5 s Ausschnitt aus einer 10 Hz-Stimulation).

C: Datenanalyse aus Aufnahmen in der Spannungsklemme bei 10 Hz Stimulationsfrequenz (Ausschnitt von 1,5 s). Oben: Originaldaten mit schnellen Natriumströmen. Unten: die mit 50 Hz gefilterte Aufnahme wird zur Datenanalyse verwendet. Zur Quantifizierung wird die reizbedingte Modulationsamplitude vermessen.

D: Powerspektren der 10 Hz-Stimulation in der Spannungsklemme (aus C). Die Powerspektren der gefilterten (rot) und ungefilterten Daten (schwarz) werden verglichen. Sie sind auf den Gesamtfrequenzgehalt normiert. Durch den Lichtreiz konzentriert sich der Frequenzgehalt bei der Stimulationsfrequenz (10 Hz) und harmonischen Frequenzen (20 und 30 Hz). Das Filtern macht sich nur oberhalb von 50 Hz bemerkbar. Die Unterschiede bewegen sich im Bereich von maximal 0,1 %. Man beachte die doppelt-logarithmischen Auftragungen.

Zwischen den einzelnen Durchgängen wurde eine Stimulationspause von 15 s eingehalten, damit sich die Photorezeptoren erholen konnten (Schema **Abb. 35 B**).

Einzelne Messungen in der Stromklemme belegen, dass die Lichtreize zu starken Veränderungen des Membranpotentials und zur Modulation der Aktionspotentialfrequenz führen (**Abb. 35 B**, unten; Reizung bei 10 Hz mit $620 \text{ Rh}^* / (\text{Stäbchen} * \text{Reiz})$).

Standardmäßig fanden die Messungen jedoch in der Spannungsklemme statt, um unabhängig vom Ruhemembranpotential und dem möglichen Beitrag von intrinsischen Leitfähigkeiten zu messen. Das Haltepotential der Spannungsklemme wurde für alle Zellen auf -60 mV eingestellt. Die Ströme der Spannungsklemme stellen die Veränderung dar, die aufgrund aller synaptischen Eingänge der Ganglienzelle im Soma bei -60 mV gemessen werden und zeigen somit den „Nettoeffekt“ auf die Ganglienzelle.

Zur Analyse der Frequenzübertragung wurden für jede Frequenz alle drei Stimulationsdurchgänge verwendet. Die ersten 500 ms jeder Reizapplikation wurden verworfen, weil der Start der Lichtantwort einen transienten Anteil umfasst, der nicht aussagekräftig für die frequenzabhängige Modulation ist. Die verbleibenden 9 s Lichtantwort aus 3 Stimulationsdurchgängen wurden auf zwei Arten analysiert. Zum einen wurde die Modulationsamplitude des Stroms gemessen (**Abb. 35 C**, unten). Zum anderen wurde der Frequenzgehalt der Stromantwort mit einem Power-Spektrum untersucht.

Die Auswertung der Modulationsamplitude betrachtet die Lichtantwort vom Gesichtspunkt der Ganglienzelle aus. Die Schwankung des synaptischen Eingangs bestimmt in Ganglienzellen die Aktionspotentialfrequenz und damit die Veränderung in der physiologischen Antwort der Zelle. Nachteil dieser Auswertung ist, dass nicht sicher ist, ob die gemessene Modulation tatsächlich vom Lichtreiz verursacht wurde. Zufällige Schwankungen und Rauschen können ebenfalls zur Amplitudenmodulation beitragen.

Die Analyse des Powerspektrums erlaubt, in der Stromantwort gezielt nach der Frequenz des Lichtreizes zu suchen. Um alle Powerspektren vergleichbar zu machen, wurde in jeder Messung auf den Gesamtfrequenzgehalt normiert. Das bedeutet, dass der relative Anteil der Reizfrequenz am Spektrum ausgewertet wurde und die „Dominanz“ der Reizfrequenz gemessen wird. Dadurch betrachtet die Analyse des Powerspektrums die Lichtantwort eher vom informationstheoretischen Standpunkt aus. Sie berücksichtigt die Reizfrequenz im Membranstrom auch dann, wenn der Strom sehr klein und damit für die physiologische Antwort der Ganglienzelle von geringer Bedeutung ist. **Abb. 35 C** zeigt Aufnahmen aus der Spannungsklemme unter den gleichen Versuchsbedingungen wie bei der Stromklemme in **35 B**. Oben ist die ungefilterte Aufnahme mit schnellen Natriumströmen, unten die gefilterte Aufnahme zu sehen. Um zu zeigen, dass die Verwendung des 50 Hz-Filters den relevanten

Teil des Powerspektrums nicht beeinträchtigt, wurden beide Aufnahmen ausgewertet und die Spektren gemeinsam in **Abb. 35 D** aufgetragen (schwarz: original, rot: gefilterte Aufnahme; man beachte die doppelt-logarithmischen Auftragungen). Es wird deutlich, dass das Filtern erst Effekte im Bereich der Grenzfrequenz von 50 Hz hat. Sie liegen maximal im Bereich von 0,1 %.

In **Abb. 36 B** vergleiche ich die Powerspektren der 10 Hz-Stimulation aus **Abb. 35** mit einer Aufnahme vor der Stimulation. Es ist klar ersichtlich, dass sich der Frequenzgehalt durch die Stimulation bei 10 Hz konzentriert. Auch Vielfache der Reizfrequenz (sog. harmonische Frequenzen) treten im Powerspektrum auf (hier 20 Hz). Sie werden ebenfalls durch die Lichtreizung hervorgerufen. Deshalb wird ihr Anteil am Gesamtspektrum zur Reizfrequenz addiert und die Summe auf das Gesamtspektrum normiert. Im dargestellten Fall sind 62 % des Gesamtspektrums bei 10 Hz und den harmonischen Frequenzen konzentriert.

Wegen der Stimulation mit Frequenzen bis 25 Hz war die Wahl eines kurzen Stimulus von 20 ms Länge notwendig. Unter diesen Bedingungen ist die maximale Helligkeit, die ich mit meiner Stimulationsapparatur erreichen kann auf $620 \text{ Rh}^* / (\text{Reiz} * \text{Stäbchen})$ begrenzt. Um den hohen Reizintensitäten aus den ERG-Untersuchungen möglichst nahe zu kommen, wurde eine Messreihe mit dieser maximalen Helligkeit durchgeführt. Zusätzlich wurden Vergleichsmessungen unter rein skotopischen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde die Helligkeit mit Hilfe einer Graufilterkombination auf $3,3 \text{ Rh}^* / (\text{Reiz} * \text{Stäbchen})$ reduziert.

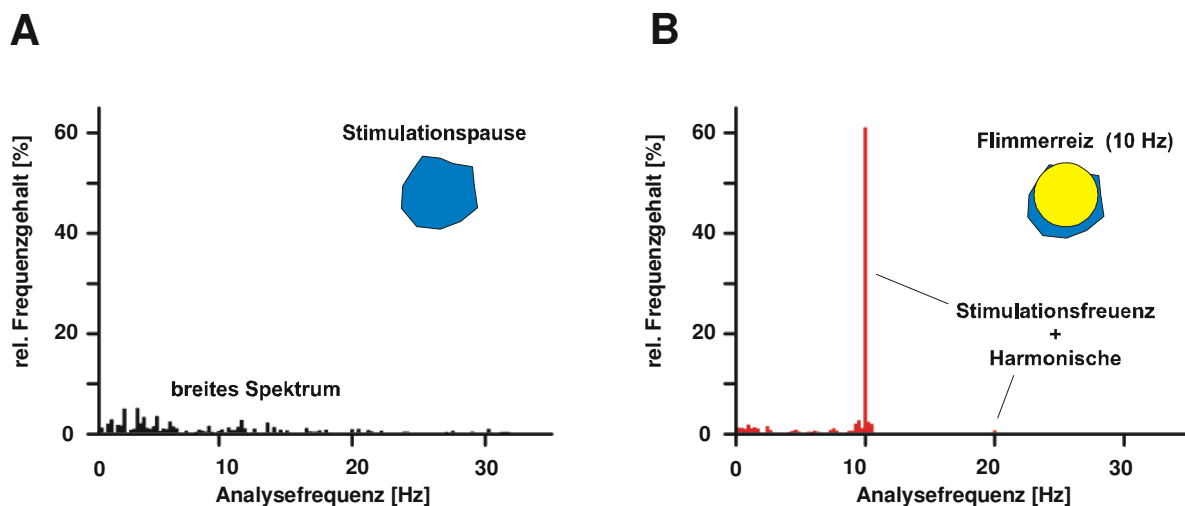


Abb. 36: Veränderung der Spektralanalyse durch die Lichtstimulation.

A: Frequenzanalyse der Stromsignale vor einer Lichtstimulation. Das Powerspektrum zeigt eine breite Verteilung, vor allem im Bereich niedriger Frequenzen.

B: Durch die Lichtstimulation (Stimulationsfrequenz 10 Hz, Beispiel aus Abb. 35) konzentriert sich der Frequenzgehalt bei der Stimulationsfrequenz (10 Hz) und den harmonischen Frequenzen (hier 20 Hz).

3.3.2.1. Untersuchung der Frequenzübertragung bei skotopischer Intensität

Wie schon in den Messungen zur Frequenzübertragung im ERG der Maus, wurden Tiere aus der Knock-out-Zucht verwendet, um die Bedeutung des HCN1-Kanals zu untersuchen. Sowohl Knock-out-Tiere wie Kontrolltiere besitzen den gleichen, gemischten genetischen Hintergrund, „C57SV“ (siehe **Abb. 4**). Im Bereich skotopischer Intensitäten wurden bei der Ableitung der ERGs nur geringfügige Unterschiede zwischen Knock-out-Tieren und Wildtyp-Tieren gemessen (vergleiche **Kap. 3.2.1.**). Dabei weisen die ähnlichen B-Wellen auf eine vergleichbare Aktivität der ON-Bipolarzellen hin. Daher erwartete ich im Falle der ON-Ganglienzellen keinen Unterschied in der Frequenzübertragung. **Abb. 37** zeigt den Vergleich zwischen zwei ON-Ganglienzellen der beiden Mauslinien. Auf der linken Seite (**Abb. 37 A**) sind die Daten einer Wildtyp-Ganglienzelle zu sehen, rechts die einer vergleichbaren Knock-out-Ganglienzelle (**Abb. 37 B**). Jede Spur zeigt eine dreifach gemittelte Stimulationssequenz in der Spannungsklemme. Das Haltepotential beträgt -60 mV. Der Pfeil weist auf den Zeitpunkt des Beginns der Lichtstimulation. Die verschiedenen Stimulationsfrequenzen sind von 0,5 Hz bis 10 Hz von oben nach unten angeordnet. In der obersten Spur sind zum Beispiel zwei reizkorrelierte Deflektionen der Stromspur nach unten zu erkennen. Das zeigt, dass durch die Lichtstimulation ein Einwärtsstrom in der Ganglienzelle ausgelöst wird, der die Zelle depolarisieren würde. Es handelt sich also um eine Ganglienzelle, deren rezeptives Feld ein ON-Zentrum besitzt. Der Abstand der Deflektionen beträgt in den obersten Spuren genau 2 s, was der Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz entspricht. Bei 0,5 Hz kehrt die Stromspur in beiden Zellen wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Bei höheren Frequenzen (unten) folgen die Deflektionen entsprechend schneller aufeinander und die einzelnen Reaktionen sind auf einen residenten Einwärtstrom aufmoduliert. Um die Güte der Frequenzfolge zu quantifizieren, wurden die durchschnittlichen Modulationsamplituden gemessen und die Powerspektren der Stromspuren berechnet (siehe oben, **Abb. 35** und **36**). Grundsätzlich ist zu erkennen, dass sowohl im Wildtyp- als auch im Knock-out-Tier die Stimulationsfrequenzen bis zu 10 Hz durch Modulation des Membranstroms in die Ganglienzelle übertragen werden. In **Abb. 38** ist die quantitative Auswertung aller Stimulationsfrequenzen bis 25 Hz zu sehen. Die Knock-out-Ganglienzelle ist durch weiße Kreise, die Wildtyp-Ganglienzelle mit schwarzen Kreisen eingetragen. In **Abb. 38 A** ist der relative Anteil der Stimulationsfrequenz am Powerspektrum eingetragen. Als Normierung oder Referenz dient der Anteil der Stimulationsfrequenz bei 3 Hz („1“ bzw. 100 %). Man erkennt, dass in beiden Zellen die Stimulationsfrequenz bei höheren Frequenzen immer weniger dominiert.

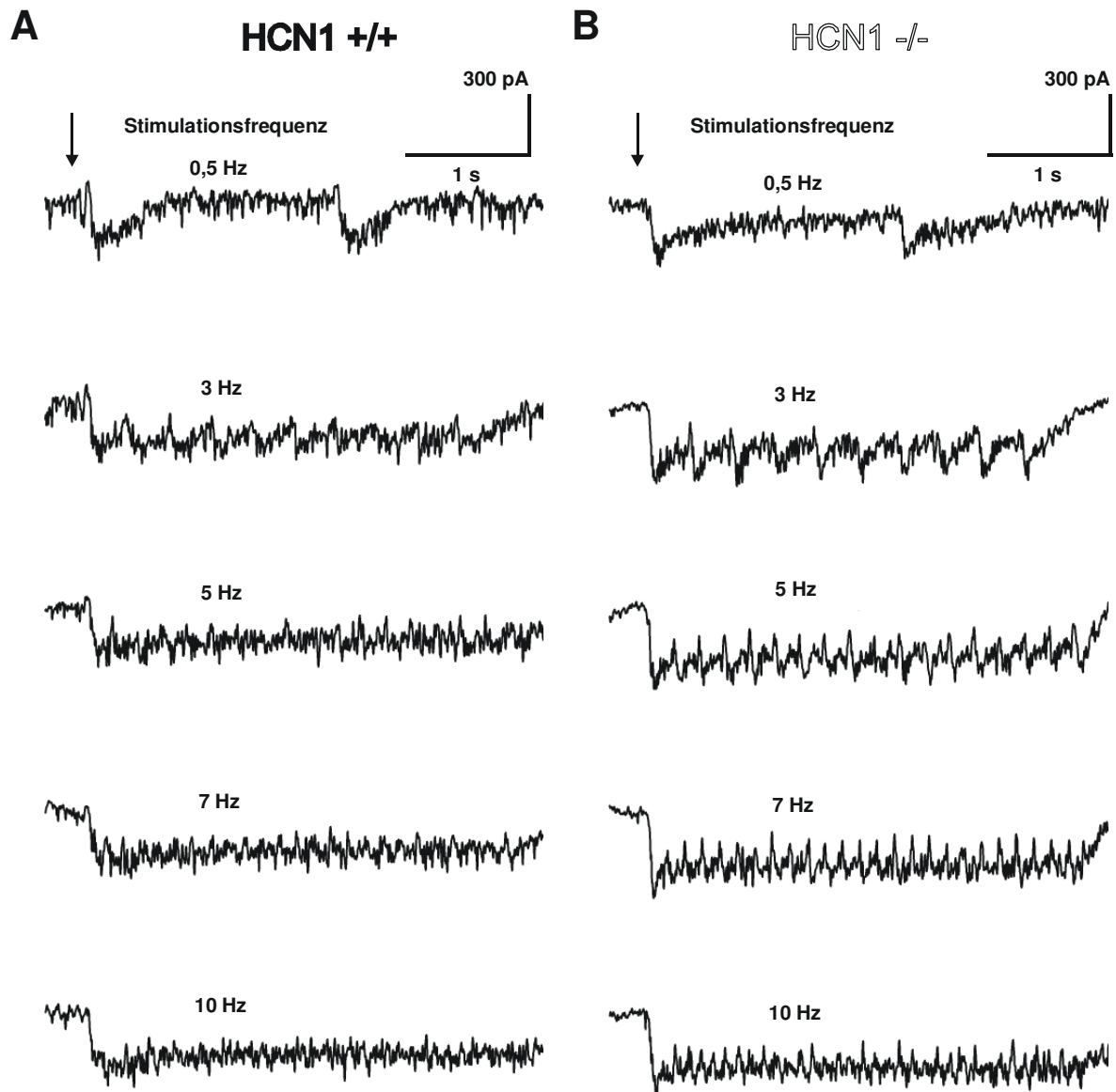


Abb. 37: Membranströme von ON-Ganglienzellen bei skotopischer Stimulation (3,3 Rh*/ (Stäb. *Reiz).

Membranströme einer Wildtyp-Ganglienzelle (A) und einer Ganglienzelle des HCN1-Knock-outs (B) bei Lichtstimulation zwischen 0,5 Hz (oben) und 10 Hz (unten). Haltepotential der Spannungsklemme: -60 mV. Beginn der Stimulation ist mit dem Pfeil markiert. Die Einzelreize haben eine Dauer von 20 ms. Jeder Lichtreiz wird mit einem Einwärtsstrom beantwortet. Die Modulationsamplitude wird bei höheren Frequenzen kleiner. Bei einer Stimulationsfrequenz von 10 Hz tritt sie kaum aus dem Hintergrundrauschen hervor. Bei 0,5 Hz kehrt der Membranstrom noch auf das Ausgangsniveau (Haltestrom vor der Stimulation) zurück.

Bei Frequenzen über 12,5 Hz ist der Anteil in beiden Zellen auf 10 % des Referenzwertes von 3 Hz abgefallen. Die Ganglienzelle des Knock-outs zeigt im niedrigen Frequenzbereich ein etwas besseres Übertragungsverhalten. Dieser Unterschied verringert sich jedoch bei hohen Frequenzen wieder. Ähnliches ist bei Auswertung der durchschnittlichen Modulationsamplitude zu beobachten (Abb. 38 B). Auch hier findet sich im Knock-out eine etwas bessere

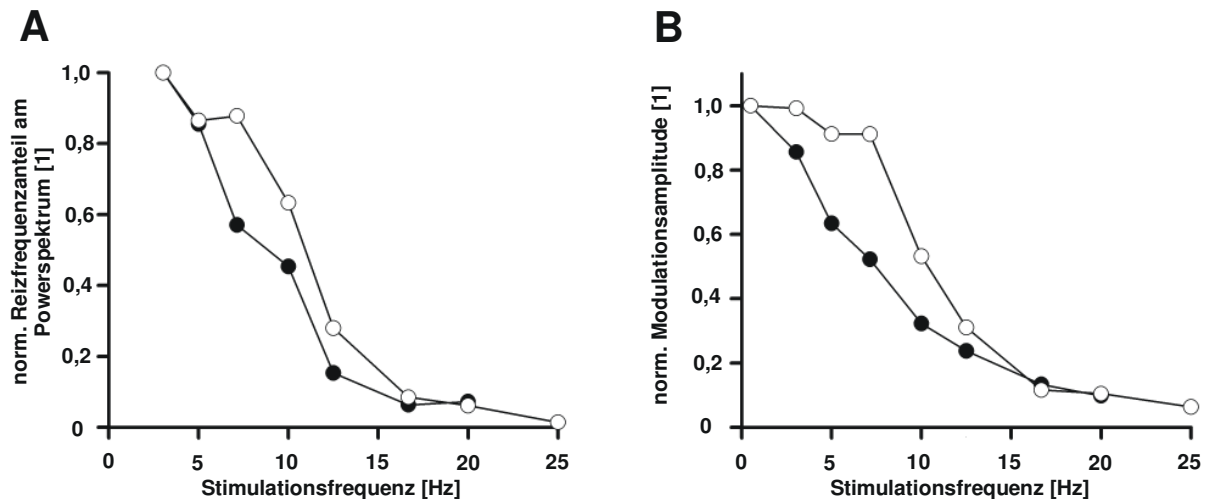


Abb. 38: Analyse der Stromantworten von ON-Ganglienzellen unter skotopischen Bedingungen.

Eine ON-Ganglienzelle des Wildtyps (schwarze Kreise) und eine des HCN1-Knock-outs (weiße Kreise) werden verglichen (Zellen aus Abb. 37).

A: Frequenzanalyse durch Berechnung des Powerspektrums der Stromantworten aus Abb. 37. Gezeigt wird die Entwicklung des Frequenzanteils, den die Stimulationsfrequenz am Gesamtspektrum einnimmt. Der Frequenzanteil bei 3 Hz dient als Referenz (100 %). In beiden Fällen nimmt der Frequenzanteil von niedrigen zu hohen Frequenzen ab. Im mittleren Frequenzbereich dominiert die Reizfrequenz im Knock-out etwas stärker als im Wildtyp. Zu hohen Frequenzen hin gleicht sich der Kurvenverlauf wieder an. Stimulationsfrequenzen von über 12,5 Hz werden durch die Spektralanalyse kaum noch detektiert (Anteil am Gesamtspektrum <10 %).

B: Entwicklung der Modulationsamplitude des Membranstroms gegenüber der Stimulationsfrequenz. Referenzwert ist die Lichtantwort bei 0,5 Hz (100 %). Im Bereich niedriger Frequenzen ist die Modulationsamplitude des Knock-outs etwas größer.

Frequenzfolge bei niedrigen Frequenzen. Dieser Unterschied wird zu hohen Frequenzen hin jedoch kleiner.

Auch für OFF-Ganglienzellen gelang die Aufnahme einer skotopischen Frequenzreihe. Die entsprechenden Originaldaten sind in **Abb. 39** aufgetragen. Auch hier stehen sich Daten aus dem Wildtyp (**Abb. 39 A**, links) und Knock-out (**Abb. 39 B**, rechts) gegenüber. Aufnahmen für Frequenzen zwischen 0,5 Hz und 10 Hz sind im Original gezeigt. Im Gegensatz zu den ON-Ganglienzellen, führt der Lichtreiz bei einem Haltepotential von -60 mV zu einem Auswärtsstrom. Wiederum ist in den Originaldaten bis zu einer Stimulationsfrequenz von 10 Hz eine klare Amplitudenmodulation zu erkennen. Dabei zeichnet sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Ganglienzellen ab. Die Quantifizierungen der Frequenzübertragung zeigt **Abb. 40**. Die Ergebnisse stellen sich ähnlich zu denen bei den ON-Ganglienzellen dar. Im Vergleich zum Referenzwert bei 3 Hz fällt in beiden Zellen der Frequenzanteil bis 12,5 Hz auf etwa 10 % ab (**Abb. 40 A**). Das gleiche gilt für die Modulationsamplitude (**Abb. 40 B**). Bei niedrigen Frequenzen schwanken die Messwerte stark (besonders zwischen 3 und 10 Hz). Es ist jedoch kein Trend zu erkennen, dass eine der Zellen der Lichtstimulation grundsätzlich besser folgen kann.

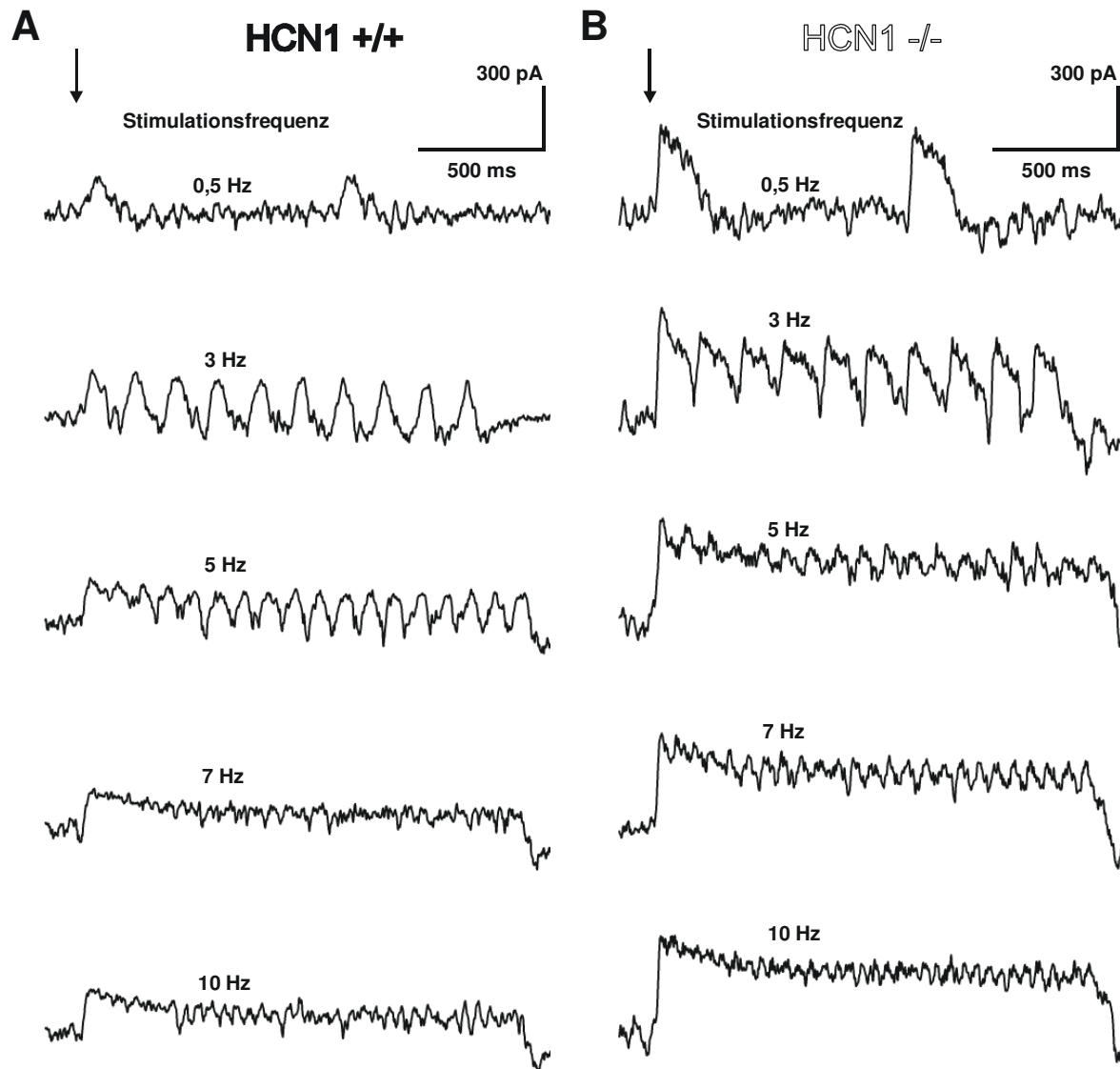


Abb. 39: Membranströme von OFF-Ganglienzellen bei skotopischer Lichtreizung ($3,3 \text{ Rh}^*$ / (Stäb. *Reiz). Membranströme einer Wildtyp-Ganglienzelle (A) und einer Ganglienzelle des HCN1-Knock-outs (B) bei Lichtstimulation zwischen 0,5 Hz (oben) und 10 Hz (unten). Haltepotential der Spannungsklemme: -60 mV. Pfeile: Beginn der Stimulation. Einzelreizdauer: 20 ms. Jeder Lichtreiz wird mit einem Auswärtsstrom beantwortet. Die Modulationsamplitude wird bei höheren Frequenzen kleiner. Bei einer Stimulationsfrequenz von 10 Hz ist sie kaum vom Rauschen zu unterscheiden. Bei 0,5 Hz kehrt der Membranstrom noch auf das Ausgangsniveau (Haltestrom vor der Stimulation) zurück.

Im Bereich der hohen Stimulationsfrequenzen gleichen sich die Messwerte auf niedrigem Niveau an. Die Mittelwerte von 3 Wildtyp-Ganglienzellen und 2 Knock-out-Ganglienzellen sind bezüglich des Frequenzanteils und der Entwicklung der Modulationsamplitude in **Abb. 41** zusammengefasst. Insgesamt bestätigt sich der Eindruck aus der Gegenüberstellung der einzelnen Zellen. Grundsätzlich verringert sich die Zellantwort, die der Stimulation zugeordnet werden kann, bei höheren Frequenzen. Wie in den Untersuchungen im Maus-ERG zeichnet sich bei niedrigen, rein skotopischen Reizintensitäten kein Unterschied zwischen Knock-out- und Wildtyp-Tieren ab. Besonders bei Stimulationsfrequenzen von 10 Hz und

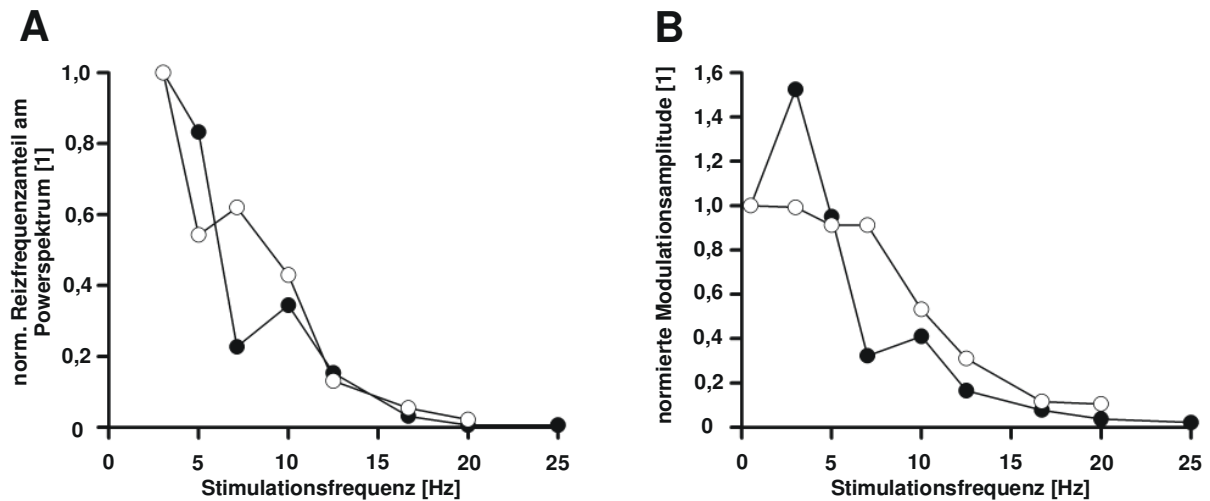


Abb. 40: Analyse der Stromantworten von OFF-Ganglienzellen unter skotopischen Bedingungen.

Eine OFF-Ganglienzelle des Wildtyps (schwarze Kreise) und eine des HCN1-Knock-outs (weiße Kreise) werden verglichen (Zellen aus Abb. 39)

A: Frequenzanalyse durch Berechnung des Powerspektrums der Stromantworten aus Abb. 39. Gezeigt wird die Entwicklung des Frequenzanteils, den die Stimulationsfrequenz am Gesamtspektrum einnimmt. Der Frequenzanteil bei 3 Hz dient als Referenz (100 %). Die Werte unterliegen im Bereich niedriger Frequenzen starken Schwankungen. In beiden Fällen nimmt der Frequenzanteil von niedrigen zu hohen Frequenzen ab. Ab einer Frequenz von 10 Hz verlaufen die beiden Kurven beinahe deckungsgleich. Stimulationsfrequenzen von über 12,5 Hz werden durch die Spektralanalyse kaum noch detektiert (Anteil am Gesamtspektrum <10 %).

B: Modulationsamplitude des Membranstroms der Ganglienzellen. Auch die Modulationsamplitude verringert sich in beiden Fällen von niedrigen zu hohen Frequenzen. Referenzwert ist die Lichtantwort bei 0,5 Hz (100 %).

höher gleichen sich die Entwicklung von Frequenzanteil (**Abb. 41 A**) und Modulationsamplitude (**Abb. 41 B**). Über die Erkenntnisse aus den ERG-Messungen hinaus, weisen die Daten der einzelnen OFF-Ganglienzellen darauf hin, dass kein großer Unterschied zwischen der Frequenzübertragung im ON- und OFF-Kanal besteht. Zur statistischen Absicherung dieser Tendenzen sind jedoch weitere Messungen erforderlich. Bei den Untersuchungen zum Maus-ERG traten die starke Verlängerung der B-Welle und die deutlichen Defizite der Frequenzübertragung des Knock-outs erst bei höheren Reizintensitäten auf. Daher wurden in einer zweiten Versuchsreihe bei Ganglienzellen ebenfalls helle Lichtreize verwendet.

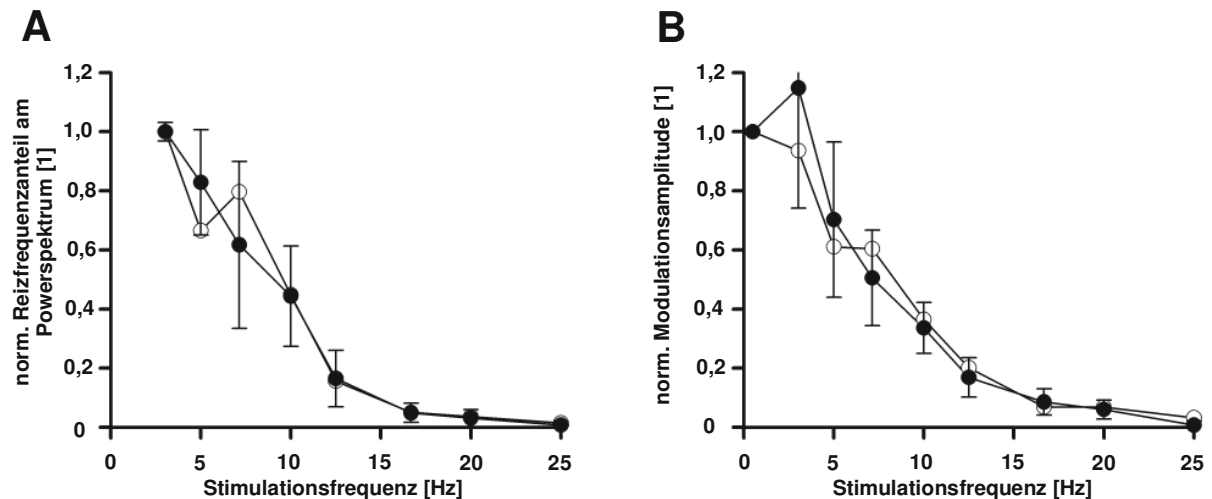


Abb. 41: Zusammenfassung der Frequenzfolgeexperimente unter skotopischen Reizbedingungen.

Den Graphen liegen 3 Wildtyp-Ganglienzellen (schwarze Symbole) und 2 HCN1-Knock-out-Ganglienzellen (weiße Symbole) zugrunde. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Bei den zwei Knock-out-Zellen wurde auf Standardabweichungen verzichtet.

Die Variabilitäten, die sich in den Gegenüberstellungen von Einzelzellen ergaben, gleichen sich bei der Mittelung aus. Sowohl für die Spektralanalyse (A) als auch bei der Entwicklung der Modulationsamplitude (B) verlaufen die Graphen von HCN1-Knock-out und Wildtyp nahezu identisch.

3.3.2.2. Untersuchungen der Frequenzübertragung im mesopischen Bereich

Der optische Messstand, der zur Charakterisierung und Stimulation der Ganglienzellen verwendet wird, erlaubt bei den kurzen Reizen, die zur hochfrequenten Stimulation notwendig sind, Intensitäten von $620 \text{ Rh}^* / (\text{Stäbchen} * \text{Reiz})$. Nach meiner Abschätzung entspricht dies ERG-Blitzen der Intensität von 200 mCds (siehe Material und Methoden, **Kap. 2.4.3.**). Zur Charakterisierung von photopischen ERGs werden gewöhnlich deutlich stärkere Reize verwendet. Die Untersuchung der Maus-ERGs zeigte jedoch gerade im Übergangsbereich zwischen skotopischen und photopischen Reizen klare Effekte des HCN1-Knock-outs bei der Frequenzübertragung (man vergleiche mit **Abb. 22** und **25**). Legt man die Grenze von 10 mCds für eine rein skotopische Reizung zu Grunde, übertrifft die maximale Reizintensität von $620 \text{ Rh}^*/\text{Reiz}$ diese um mindestens eine Größenordnung. Ich gehe daher davon aus, dass zumindest Prozesse, die den Übergangsbereich (sog. mesopischer Bereich) charakterisieren, bei den gegebenen Stimulationsbedingungen untersucht werden können. Trotz des umfangreichen experimentellen Protokolls gelang es in einigen Fällen, von Ganglienzellen sowohl die skotopischen als auch die mesopischen Messungen in Folge durchzuführen. Es handelt sich bei den folgenden Beispielen (je ein Paar ON- und OFF-Ganglienzellen) um die gleichen Zellen, deren skotopische Antwortcharakteristik dargestellt.

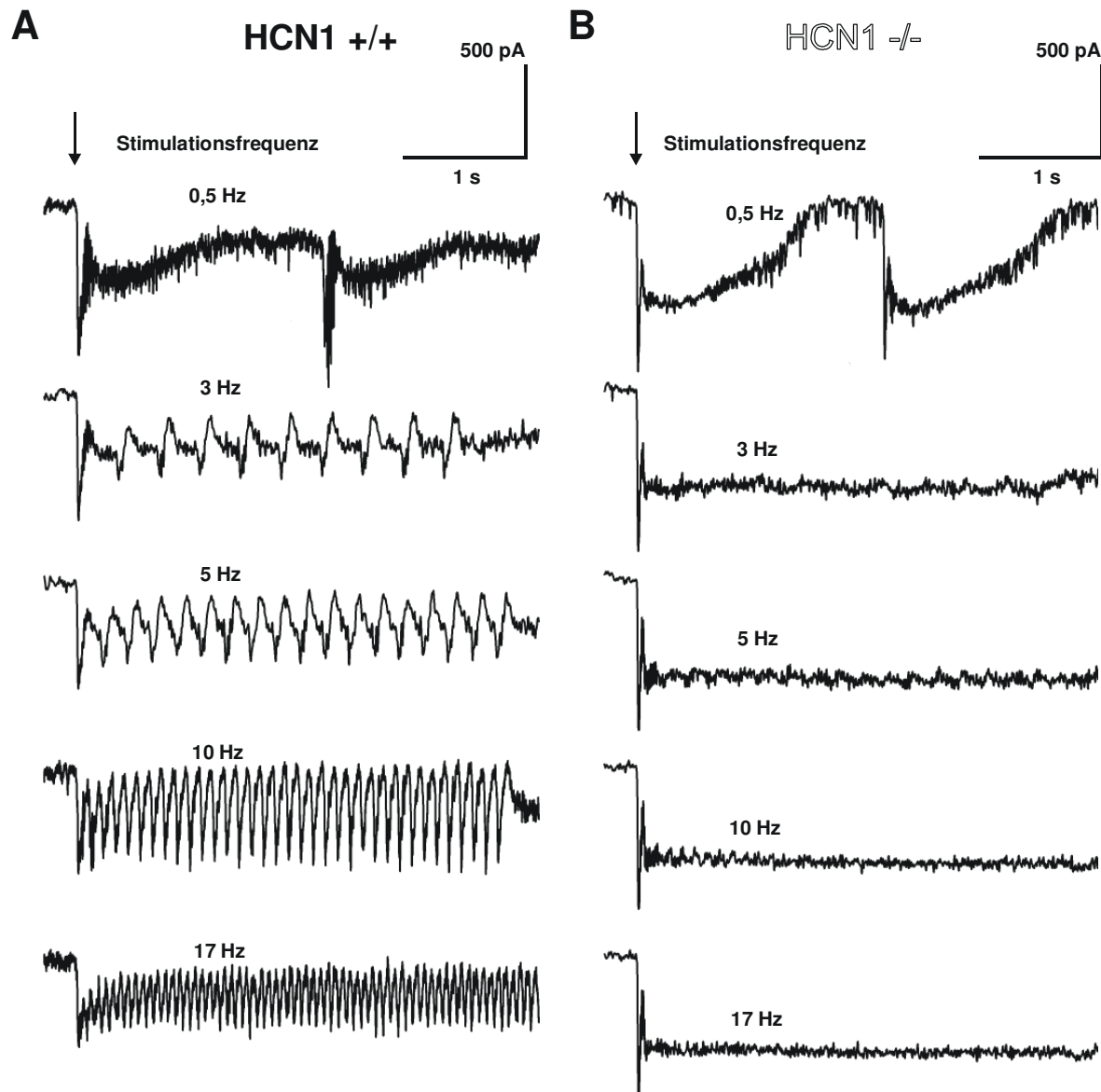


Abb. 42: Membranströme von ON-Ganglienzellen bei einer Lichtintensität von 620 Rh* / (Stäbchen*Reiz). Membranströme einer Wildtyp-Ganglienzelle (A) und einer Ganglienzelle des HCN1-Knock-outs (B) bei Stimulationsfrequenzen zwischen 0,5 Hz (oben) und 17 Hz (unten). Haltepotential der Spannungsklemme: -60 mV. Der Beginn der Stimulation ist mit dem Pfeil markiert. Die Einzelreize haben eine Dauer von 20 ms. Jede Stimulationssequenz wird mit einem Einwärtsstrom beantwortet, der einen sehr großen, transienten Anfangsteil hat. Die Modulationsamplitude steigt im Wildtyp zunächst an (bis 10 Hz) und jeder einzelne Lichtreiz wird auch bei 17 Hz noch deutlich beantwortet. Die Knock-out-Ganglienzelle zeigt bereits bei 3 Hz eine sehr kleine reizbezogene Modulationsamplitude. Bei einer Stimulationsfrequenz von 10 Hz ist sie kaum noch erkennbar.

worden ist. Daher können ggf. Unterschiede im Verhalten unter verschiedenen Reizbedingungen direkt verglichen werden.

Die Lichtantwort bei 620 Rh* / (Stäbchen * Reiz) hat eine deutlich größere Amplitude als bei 3,3 Rh* / (Stäbchen * Reiz). In den in **Abb. 42** gezeigten Ganglienzellen von Knock-out- und Kontrolltieren treten in der Stromklemme (Haltepotential -60 mV) gleichermaßen reizinduzierte Ströme von ca. 800 pA auf. Am Anfang der Stimulation kommt es in allen

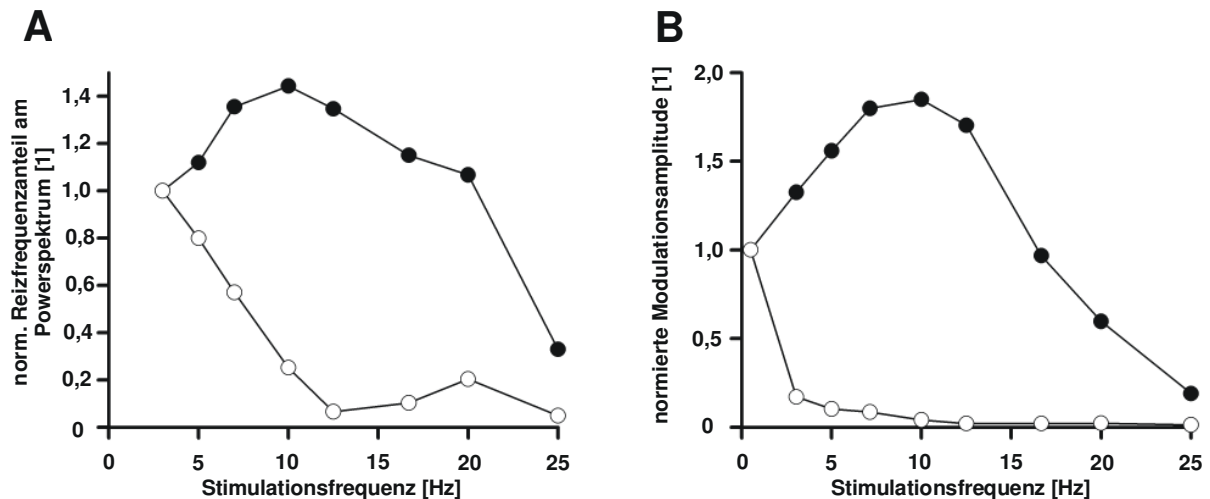


Abb. 43: Auswertung der Stromantworten von zwei ON-Ganglienzellen bei mesopischen Bedingungen. Eine ON-Ganglienzelle des Wildtyps (schwarze Kreise) und eine des HCN1-Knock-outs (weiße Kreise) werden verglichen (Zellen aus Abb. 42).

A: Frequenzanalyse durch Berechnung des Powerspektrums der Stromantworten aus Abb. 42. Gezeigt wird die Entwicklung des Frequenzanteils, den die Stimulationsfrequenz am Gesamtspektrum einnimmt. Der Frequenzanteil bei 3 Hz dient als Referenz (100 %). Unter mesopischen Bedingungen zeichnet sich ein deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp und Knock-out ab. Im Wildtyp steigert die Stimulationsfrequenz ihren Anteil am Gesamtspektrum bei 10 Hz auf über 140 % des Ausgangswertes. Dagegen fällt der Anteil im Knock-out linear ab und liegt bei 12,5 Hz unter 10 Prozent.

B: Bei der Modulationsamplitude stellt sich der Unterschied noch klarer dar. Referenzwert ist die Lichtantwort bei 0,5 Hz (100 %). Die Modulationsamplitude des Wildtyps verdoppelt sich bis 10 Hz beinahe, während sie sich im Knock-out schon zwischen 0,5 und 3 Hz extrem reduziert. Vergleicht man die Werte mit dem Verhalten der gleichen Zelle unter skotopischen Bedingungen (Abb. 37), so verbessert sich die Frequenzübertragung im Wildtyp, während sich der Knock-out in der Frequenzfolge verschlechtert.

Ganglienzellen zu einem transienten Spitzenstrom. Das Frequenzverhalten der Ganglienzellen unterscheidet sich zwischen Wildtyp (**Abb. 42 A**) und Knock-out (**Abb. 42 B**) jedoch sehr stark. Anders als bei skotopischen Reizbedingungen steigt bei der Wildtyp-Ganglienzelle (**Abb. 42 A**) die durchschnittliche Modulationsamplitude zwischen 3 und 10 Hz an. Die einzelnen Lichtreize werden durch sehr schnelle Modulationen des Membranstroms wiedergegeben. Noch bei 10 Hz Stimulationsfrequenz wird zwischen den einzelnen Lichtreizen beinahe das Niveau des Haltestroms vor der Stimulation erreicht. Insgesamt ist die Frequenzwiedergabe gegenüber der skotopischen Situation viel besser (vergleiche mit **Abb. 37 A**).

Im HCN1-Knock-out zeigt die Lichtantwort bei 0,5 Hz einen sehr ähnlichen Zeitverlauf wie im Wildtyp (**Abb. 42 B**). Schon bei einer Stimulation mit 3 Hz ist die Lichtantwort jedoch durch einen residualen Einwärtsstrom dominiert. Der Strom wird nur noch sehr wenig moduliert und ab einer Stimulationsfrequenz von 10 Hz ist keine reizkorrelierte Veränderung der Lichtantwort mehr zu erkennen. Dieser augenfällige Unterschied wird auch in der Quantifizierung deutlich (**Abb. 43**). Im Wildtyp steigt der Anteil der Stimulationsfrequenz am

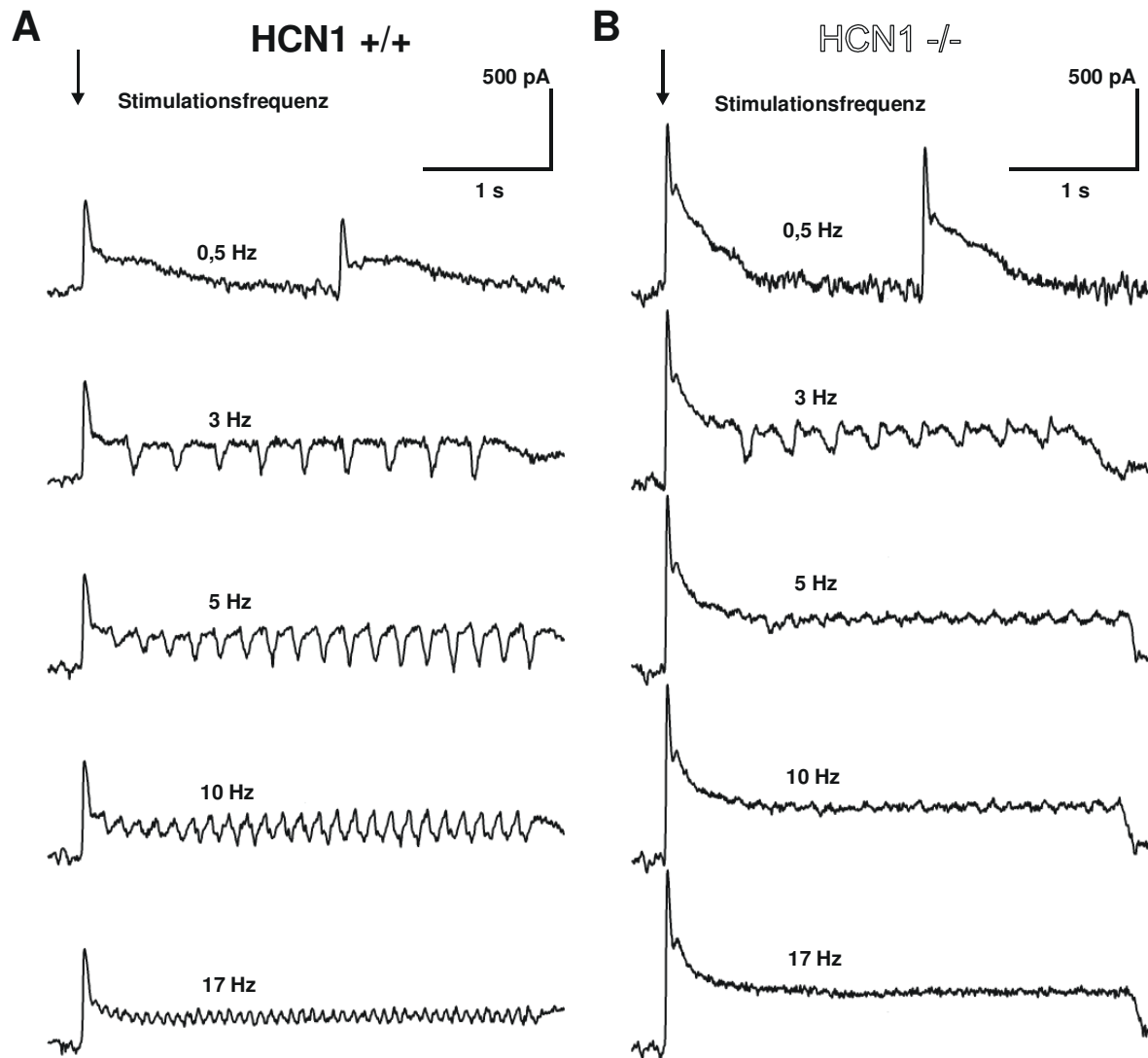


Abb. 44: Membranströme von OFF-Ganglienzellen bei einer Lichtintensität von $620 \text{ Rh}^*/(\text{Stäb} \cdot \text{Reiz})$.

A+B: Membranströme einer Wildtyp-Ganglienzelle (A) und einer Ganglienzelle des HCN1-Knock-outs (B) bei Stimulationsfrequenzen zwischen 0,5 Hz (oben) und 17 Hz (unten). Haltepotential der Spannungsklemme: -60 mV. Pfeile markieren den Stimulationsbeginn. Die Einzelreize haben eine Dauer von 20 ms. In beiden Fällen wird jede Reizsequenz mit einem Auswärtsstrom beantwortet, der einen sehr großen, transienten Anfangsteil hat. Die Modulationsamplitude steigt im Wildtyp zunächst an (bis 5 Hz) und jeder einzelne Lichtreiz wird auch bei 17 Hz noch einzeln beantwortet. Die Knock-out-Ganglienzelle zeigt bereits bei 5 Hz eine sehr kleine reizbezogene Modulationsamplitude. Bei einer Stimulationsfrequenz von 10 Hz ist sie kaum vom Rauschen zu unterscheiden.

Gesamtspektrum zwischen 3 und 10 Hz um 40 % an und bleibt bis zu 20 Hz über dem Ausgangsniveau (**Abb. 43 A**, schwarze Kreise). Erst bei der höchsten Stimulationsfrequenz von 25 Hz fällt der Anteil unter das Ausgangsniveau. Betrachtet man dagegen die Auswertung für die Zelle des HCN1-Knock-outs, erkennt man in 43 A (weiße Kreise), dass der Anteil der Reizfrequenz am Spektrum von Beginn an linear abnimmt und bei 12,5 Hz auf unter 10 % des ursprünglichen Wertes fällt.

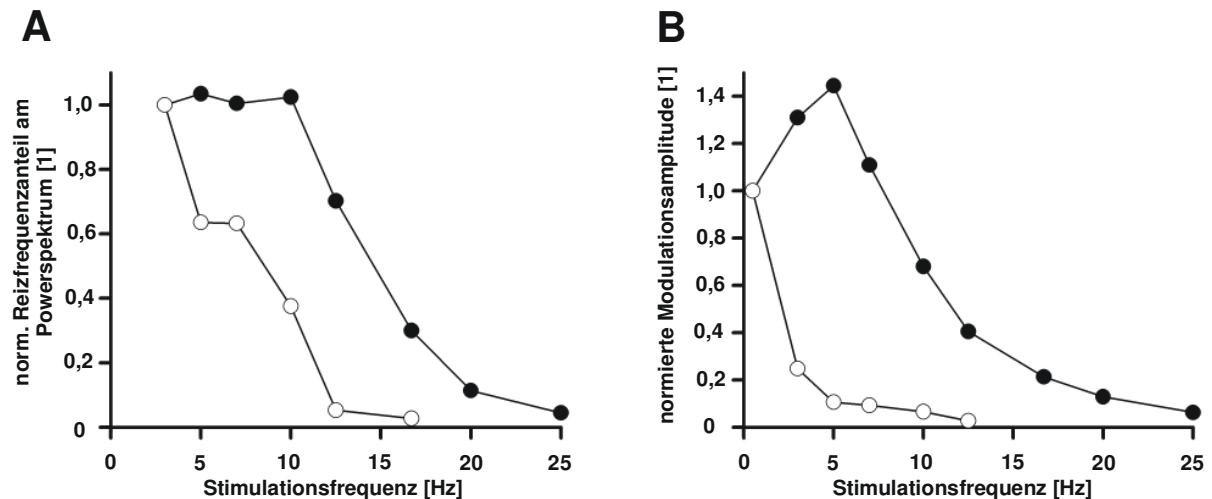


Abb. 45: Auswertung der Stromantworten von OFF-Ganglienzellen bei mesopischen Bedingungen.

Eine OFF-Ganglienzelle des Wildtyps (schwarze Kreise) und eine des HCN1-Knock-outs (weiße Kreise) werden verglichen (Zellen aus Abb. 44).

A: Die Frequenzanalyse durch Berechnung des Powerspektrums der Stromantworten aus Abb. 44 ist dargestellt. Aufgetragen ist der Frequenzanteil, den die Stimulationsfrequenz am Gesamtspektrum einnimmt. Der Frequenzanteil bei 3 Hz dient als Referenz (100 %). In der Ganglienzelle des Wildtyps bleibt der Frequenzanteil der Lichtstimulation bis 10 Hz konstant hoch und fällt erst danach allmählich ab. Auch bei 20 Hz ist der Anteil noch größer als 10 %. Dagegen unterschreitet die Ganglienzelle des Knock-outs diese Grenze schon bei 12,5 Hz Reizfrequenz.

B: Bei der OFF-Ganglienzelle des Wildtyps vergrößert sich die Modulationsamplitude zunächst (um 40 % bis zur 5 Hz-Stimulation) und fällt erst bei höheren Frequenzen ab.

Bei der Knock-out-Ganglienzelle gehen 70 % der Modulationsamplitude schon bei einer Reizfrequenz von 3 Hz verloren. Eine Strommodulation ist bei 12,5 Hz kaum noch messbar.

Noch deutlicher unterscheidet sich die Entwicklung der Modulationsamplitude (**Abb. 43 B**). In der Wildtyp-Ganglienzelle (schwarze Kreise) nimmt sie bei einer Stimulation mit 10 Hz fast auf das doppelte zu. Die Modulationsamplitude der Knock-out-Ganglienzelle (weiße Kreise) verringert sich dagegen bis 3 Hz auf unter 20 % des Ausgangswertes.

Finden sich solche Unterschiede auch in den OFF-Ganglienzellen? **Abb. 44** zeigt, dass dies der Fall ist. In den Originaldaten zeichnet sich spätestens bei einer Stimulationsfrequenz von 5 Hz ab, dass die Wildtypzelle eine deutlich bessere Frequenzfolge aufweist, als die vergleichbare Knock-out-Zelle (**Abb. 44 A** und **44 B**). Auch die Quantifizierung zeigt, dass unter mesopischen Bedingungen die Wildtyp-Ganglienzelle sowohl in der Frequenzanalyse (**Abb. 45 A**) als auch bei der Modulationsamplitude (**Abb. 45 B**) klare Vorteile gegenüber der Knock-out-Zelle hat. Ähnlich wie bei den ON-Ganglienzellen verbessert sich die Frequenzübertragung bei niedrigen Stimulationsfrequenzen sogar. Insgesamt stellt sich der Unterschied jedoch nicht so ausgeprägt dar, wie bei den Einzeldaten der ON-Ganglienzellen. Zur Bestätigung solcher Unterschiede müssen jedoch mehr Messungen für beide Zellklassen durchgeführt werden.

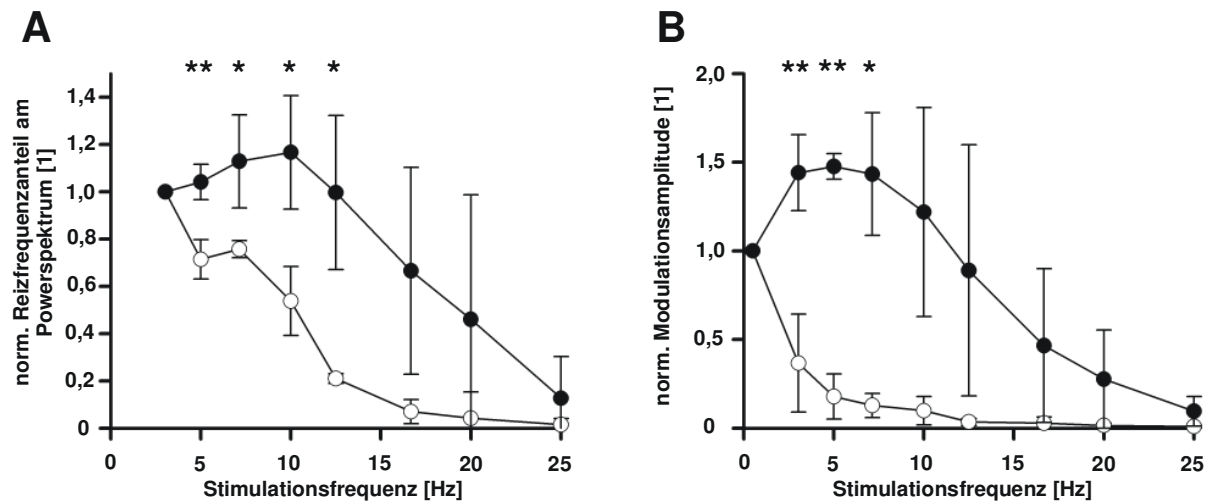


Abb. 46: Zusammenfassung der Frequenzfolgeexperimente unter mesopischen Reizbedingungen.

Den Graphen liegen 3 Wildtyp-Ganglienzellen (schwarze Symbole) und 3 HCN1-Knock-out-Ganglienzellen (weiße Symbole) zugrunde. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Sowohl für die Spektralanalyse (A) als auch bei der Entwicklung der Modulationsamplitude (B) zeigt sich ein sehr unterschiedliches Verhalten in Wildtyp- und Knock-out-Zellen.

Unter mesopischen Bedingungen ($620 \text{ Rh}^*/(\text{Stäbchen} \cdot \text{Reiz})$) zeigen Wildtyp-Ganglienzellen eine klar bessere Frequenzübertragung als Knock-out-Ganglienzellen. Die Unterschiede im Frequenzbereich von 5-12,5 Hz bzw. 3-7 Hz sind statistisch signifikant (*: 5 %-Niveau; **: 1 %-Niveau).

Abb. 46 fasst die Messwerte aller Ganglienzellen bei Stimulation mit 620 Rh^* (Stäbchen * Reiz) zusammen. Es wurden 3 Wildtyp-Ganglienzellen (schwarze Kreise) und 3 Knock-out-Ganglienzellen (weiße Kreise) vermessen. Die Unterschiede im mittleren Frequenzbereich erweisen sich als statistisch signifikant (Student t-Test). Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Messungen unter skotopischen Bedingungen (**Abb. 37**), so ist im Wildtyp die Frequenzübertragung im mesopischen Helligkeitsbereich sowohl bezüglich des Reizfrequenzanteils als auch bezüglich der Modulationsamplitude erheblich besser. Zur Verdeutlichung sind die Messungen in **Abb. 47** nochmals für die beiden Belichtungssituationen für Wildtyp und Knock-out getrennt dargestellt. Bei den Zellen des HCN1-Knock-out muss zwischen der Analyse des Powerspektrums und der Modulation des Membranstroms unterschieden werden. Die Modulationsamplitude geht bei mesopischer Stimulation schon bei niedrigen Frequenzen stärker zurück, als es bei skotopischer Stimulation der Fall ist. Bezüglich der Frequenzdominanz erkennt man unter den beiden Versuchsbedingungen ein etwa gleiches Verhalten. Auf keinen Fall führt die hellere Stimulation im HCN1-Knock-out zu einer Verbesserung der Frequenzfolge.

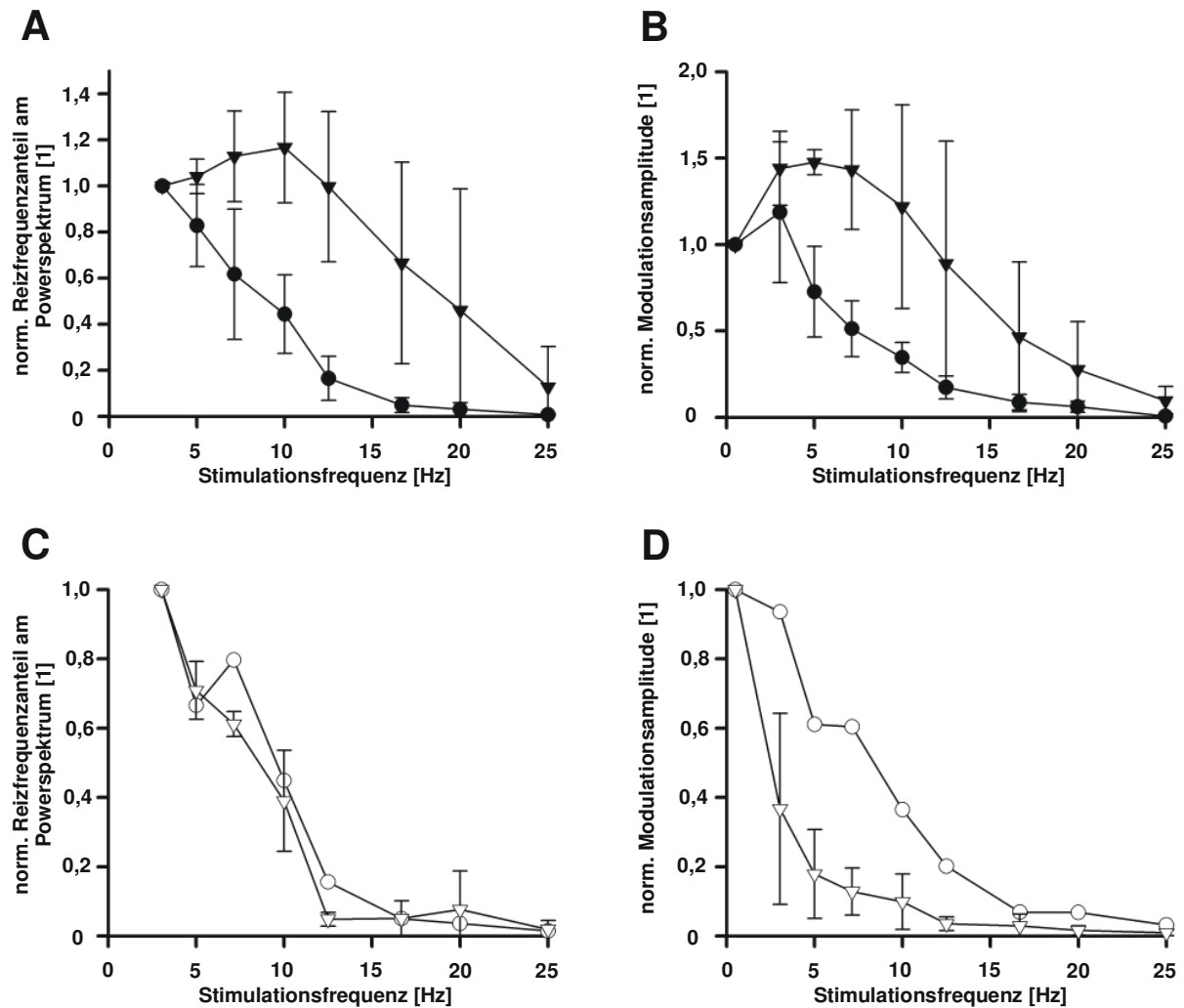


Abb. 47: Frequenzfolgeexperimente der Ganglienzellen bei unterschiedlichen Reizintensitäten.

Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

A+B: Messwerte der Wildtyp-Ganglienzellen. Sowohl für die Spektralanalyse (A) als auch bei der Entwicklung der Modulationsamplitude (B) verbessert sich die Frequenzwiedergabe bei 620 Rh*/(Stäbchen*Reiz) (dreieckige Symbole, n=3) gegenüber der skotopischen Intensität von 3,3 Rh*/(Stäbchen*Reiz) (runde Symbole, n=3).

C+D: Messwerte der HCN1-Knock-out-Ganglienzellen. In der Spektralanalyse (C) zeichnet sich kein Trend zwischen den verschiedenen Reizbedingungen ab. Bei der Amplitudenmodulation (D) zeichnet sich im Knock-out eine starke Verschlechterung der Frequenzübertragung bei höheren Reizintensitäten von 620 Rh*/(Stäbchen*Reiz) ab (dreieckige Symbole, n=3). Runde Symbole bezeichnen Messungen bei 3,3 Rh*/(Stäbchen*Reiz).

4. Diskussion

4.1. Etablierung der Messtechnik

Eines der wesentlichen Ziele dieser Arbeit war es, einen Messstand aufzubauen, der es ermöglicht, retinale Ganglienzellen mit geeigneten Lichtreizen zu stimulieren und ihre Lichtantworten elektrophysiologisch abzuleiten.

Um umfangreiche Messreihen durchführen zu können, ist es notwendig, stabile und lang andauernde Ableitungen zu etablieren. Deswegen wählte ich die Patch-Clamp-Technik, um die Ganglienzellen *in vitro* zu untersuchen. Dazu muss die Retina aus dem Auge isoliert werden. Mit diesem Ansatz ist jedoch das Problem der Regeneration des Sehfärbstoffes verbunden. Die Sehpigmente der Photorezeptoren bestehen aus einem Proteinanteil, dem Opsin und dem Chromophor, dem 11-cis-Retinal. Bei der Absorption eines Photons geht das 11-cis-Retinal in die all-trans-Form über. Es muss anschließend wieder in 11-cis-Retinal umgewandelt werden. Diese Umwandlung findet nicht im Photorezeptor, sondern im angrenzenden Pigmentepithel statt. Dazu wird der isomerisierte Chromophor durch spezielle Transportproteine als all-trans-Retinol aus den Photorezeptoren exportiert und nach erfolgter Umwandlung im Pigmentepithel als 11-cis-Retinal wieder reimportiert (zur Übersicht: Müller & Kaupp, 1998; Rodieck, 1998). Wird die Retina für Patch-Clamp-Ableitungen isoliert, ist keine Regeneration des Sehfärbstoffes möglich. Daher muss bei diesem Ansatz im Vordergrund stehen, den vorhandenen Sehfärbstoff während der Präparation keinem sichtbarem Licht auszusetzen. Das machte es notwendig, alle Präparationsschritte und auch die Etablierung der Patch-Clamp-Ableitung unter Infrarot-Bedingungen durchzuführen (siehe **Kap. 2.2.**). Durch die Verwendung von IR-Nachtsichtgeräten und die Ausrüstung des Messstandes mit einer IR-DIC-Optik wurde dieses Ziel erreicht. Unter optimalen Bedingungen und bei Verwendung von milden Stimulationsintensitäten gelang es, Patch-Clamp-Ableitungen von Ganglienzellen durchzuführen, die auch nach einer Experimentierzeit von über einer Stunde kein merkliches Nachlassen der Lichtantworten zeigten.

Ein zweiter wesentlicher Aspekt bei der Untersuchung von Ganglienzellen ist die Art der Lichtstimulation. Ganglienzellen verfügen über rezeptive Felder, die im einfachsten Fall ein kreisförmiges rezeptives Feldzentrum und ein ringförmiges, antagonistisch verschaltetes Umfeld haben. Um die Lichtstimulation in verschiedenen Experimenten vergleichbar zu halten, ist eine Anpassung der Stimulation an die individuelle Ganglienzelle notwendig. Der

von mir etablierte Messstand verwendet eine Optik, mit der das Bild eines Computer-Monitors in die Photorezeptorebene der flach ausgebreiteten Retina projiziert werden kann. Durch eine Stimulationsoftware konnte ich ein „Mapping“-Verfahren durchführen, um Position und Größe des rezeptiven Feldzentrums der abgeleiteten Ganglienzelle festzustellen („Scan-Mapping“, siehe **Abb. 27**). Ich konnte zeigen, dass mit diesem Verfahren sowohl einfache ON- und OFF-Ganglienzellen, als auch „komplexe“ Ganglienzellen korrekt identifiziert und ihre rezeptiven Felder charakterisiert werden konnten (siehe **Kap. 3.3.1**). Mit diesen Voraussetzungen war es möglich, auf Ganglienzellen individuell angepasste Zentrumsreize zu projizieren, um Experimente zur Frequenzübertragung an Ganglienzellen durchzuführen.

Ein weiterer Aspekt des „Scan-Mapping“, ist die Möglichkeit, es automatisiert oder halbautomatisiert durchzuführen. Das Eintreten des Lichtpunkts in das rezeptive Feldzentrum der Ganglienzelle führt gewöhnlich zu einem markanten Ein- bzw. Ausstrom in der Spannungsklemme (siehe **Abb. 28**). Es ist gut vorstellbar, durch einen Schwellendetektor die Zeit zwischen Beginn des Reizes und Über- bzw. Unterschreiten eines bestimmten Grenzwertes messen zu lassen. Durch Vergleich entgegengesetzter Bewegungsrichtungen könnte eine Software die notwendige Korrektur der Projektionskoordinaten berechnen, um die Größe und Position des Reizes an das rezeptive Feldzentrum der Ganglienzelle anpassen. Da die Stimulation ebenfalls softwaregesteuert ist, wäre eine vollautomatische Lösung möglich, die die Projektionskoordinaten selbst korrigiert. Allerdings würde dies erfordern, dass Detektions-/Berechnungssoftware und Stimulationsoftware direkt zusammenarbeiten.

Die halbautomatische Lösung ist deutlich einfacher zu realisieren, indem man die aufgezeichneten Daten der 12 Durchgänge des Scan-Mappings „offline“ durch eine Auswertroutine analysieren lässt, und die vorgeschlagene Korrektur bezüglich der Projektionskoordinaten von Hand in die Stimulationsoftware eingibt. Diese Lösung wurde im Rahmen dieser Dissertation nicht realisiert, weil die Rechenkapazität bzw. die Aufzeichnungssoftware des Messrechners keine parallele Ausführung eines zweiten Programms erlaubte. Deswegen musste ich die notwendige Zentrumskorrektur direkt („online“) beim Betrachten der Stimationssequenzen abschätzen und manuell eingeben. Ein weiterer Mapping-Durchgang ergab entweder ein zufrieden stellendes Ergebnis oder erforderte eine neuerliche Korrektur. Dies limitiert sicherlich bisher die Genauigkeit des Verfahrens und verlängerte die Mapping-Prozedur wesentlich.

4.2. Lokalisation von HCN1 in der Mausretina

4.2.1. Der HCN1-Knock-out ist ein geeignetes Modellsystem

Die Retina der HCN1-Knock-out-Tiere ist voll entwickelt und zeigt in der grundsätzlichen anatomischen Begutachtung keine Besonderheiten. Die immunhistochemische Untersuchung ergab keine wesentlichen Veränderungen im Expressionsmuster der HCN-Isoformen 2-4. Außer einem motorischen Defizit werden keine Verhaltensauffälligkeiten von dem konventionellen HCN1-Knock-out berichtet (Nolan et al., 2003). Deswegen sind diese Tiere grundsätzlich gut geeignet, um die Auswirkungen des genetischen Ausschaltens von HCN1 auf die retinale Informationsverarbeitung zu untersuchen. Untersuchungen zum visuellen System des HCN1-Knock-outs liegen bisher noch nicht vor.

4.2.2. HCN1 ist die dominierende Isoform in der Retina

Die immunhistochemische Analyse des HCN-Expressionsmusters ergab, dass HCN1 die bei weitem dominierende HCN-Isoform in der Wildtyp-Retina ist. Die stärkste Expression von HCN1 findet sich in den Photorezeptoren, sowohl in Stäbchen wie in Zapfen. Sowohl immunhistochemische als auch elektrophysiologische Untersuchungen zeigen, dass HCN1-Kanäle in der Mausretina auch in einigen ON-Bipolarzellen, speziell in so genannten Typ 5- und Typ 7-Zapfenbipolarzellen sowie in der Stäbchenbipolarzelle vorkommen (eigene Untersuchungen, nicht gezeigt; persönliche Mitteilung F. Thiel). Hingegen findet sich keine Expression von HCN1 in OFF-Bipolarzellen. In der inneren Retina ist HCN1 zwar schwächer exprimiert, kommt aber in einigen Amakrinzellen und Ganglienzellen vor.

4.2.3. Wo haben HCN1-Kanäle die größte Bedeutung?

Im HCN1-Knock-out sind die HCN1-Kanäle in keiner der oben beschriebenen Zellen mehr vorhanden. An welcher Stelle kommen die wesentlichen Veränderungen, die ich in den Lichtantworten des HCN1-Knock-outs festgestellt habe, zustande? Die von mir verwendeten Methoden erlauben nicht, diese Frage abschließend zu klären. Wahrscheinlich ist jedoch, dass

die Expression in den Photorezeptoren die größte Bedeutung für die retinale Signalverarbeitung hat. Die Untersuchung des Maus-ERGs ergab, dass die A- und B-Welle im HCN1-Knock-out starke Veränderungen gegenüber dem Wildtyp zeigen. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Effekte auf der Ebene der ON-Bipolarzellen oder auf der Ebene der Photorezeptoren auftreten. In beiden Zellklassen werden im Wildtyp HCN1-Kanäle exprimiert (siehe oben). Dass dem Ausschalten der HCN1-Kanäle in ON-Bipolarzellen die wesentliche Bedeutung für die Defizite im Knock-out zukommt, erscheint aus zwei Gründen nicht plausibel. Erstens ist die Lichtantwort in ON-Bipolarzellen eine Depolarisation. Eine Aktivierung der HCN1-Kanäle während der Lichtantwort ist somit nicht zu erwarten. Dieses konzeptionelle Problem besteht bei den Lichtantworten der Photorezeptoren nicht. Photorezeptoren hyperpolarisieren bei Belichtung und HCN1 kann dabei aktiviert werden. Zweitens findet man keine Expression von HCN1 in OFF-Bipolarzellen. Messungen auf der Ebene der Ganglienzellen zeigen im Knock-out jedoch auch bei OFF-Ganglienzellen starke Defizite in der Frequenzübertragung. Die starken, sehr ähnlichen Defekte in ON- und OFF-Weg legen den Schluss nahe, dass die Defizite auf das Ausschalten der HCN1-Kanäle in den Photorezeptoren zurückgehen.

4.3. Die Wirkung von HCN1 im Photorezeptor

Von vielen Säugern wird berichtet, dass sowohl Zapfen als auch Stäbchen HCN-Kanäle exprimieren (Meerschweinchen: Demontis et al., 1999; Kaninchen: Demontis et al., 2002; Kim et al., 2003; Ratte: Müller et al., 2003; Primat: Schneeweis & Schnapf, 1995). In allen genauer untersuchten Spezies wurde dabei die HCN1-Isoform identifiziert. Somit scheint die Expression von HCN-Kanälen in Photorezeptoren ein allgemeines Phänomen in der Säugerretina zu sein. Welche Bedeutung hat die HCN1-Leitfähigkeit in Photorezeptoren?

Bei Belichtung führt die Unterdrückung des Dunkelstroms im Photorezeptoraußensegment zur hyperpolarisierenden Lichtantwort des Vertebratenphotorezeptors. Im Stäbchen beträgt die gemessene Veränderung des Dunkelstroms bei der maximalen Lichtantwort je nach Spezies 20-40 pA. Dadurch wird der Photorezeptor vom Dunkelmembranpotential aus um etwa 20-30 mV hyperpolarisiert (von etwa -40 mV bis auf maximal -70 mV; siehe Baylor et al., 1984; Schneeweis & Schnapf, 1995). Die Stärke der Hyperpolarisation hängt dabei von der Stimulationsintensität ab und entwickelt sich über etwa zwei Zehnerpotenzen. Sie folgt einer Michaelis-Menten-Beziehung und ist im Säuger durchschnittlich bei 50 Rh^{*}/Stäbchen

halbmaximal. Bei Reizintensitäten, die größer als halbmaximal sind, werden die HCN1-Kanäle durch die Hyperpolarisation aktiviert und wirken der Lichtantwort entgegen (Attwell et al., 1987; Fain et al., 1978; Schneeweis & Schnapf, 1995). Dadurch depolarisiert das Membranpotential auch bei andauernder Lichtstimulation sehr schnell wieder auf ein Niveau, das nur etwa 10 mV unter dem Dunkelmembranpotential liegt (siehe Schneeweis & Schnapf, 1995, ihre Abbildungen 1 und 3). Wären keine HCN-Kanäle vorhanden, wäre die Hyperpolarisation viel ausgeprägter und länger. Satoh und Kollegen konnten dies im Frosch durch Verwendung des HCN-Kanalblockers ZD7288 demonstrieren (Satoh & Yamada, 2000). Von dem wesentlichen Unterschied abgesehen, dass Zapfen etwa 100x weniger empfindlich als Stäbchen sind, ist die Situation in Zapfen vermutlich sehr ähnlich. Auch in Zapfen wirken HCN-Kanäle erst bei hohen Intensitäten der Lichtantwort entgegen (Schneeweis & Schnapf, 1999; zur Übersicht: McNaughton, 1990).

4.3.1. Der HCN1-Knock-out zeigt kaum Defizite im skotopischen Bereich

Wenn man die Ergebnisse aus den Messungen in anderen Spezies auf die Maus übertragen kann, so ergibt sich daraus, dass bei niedrigen Intensitäten (bis etwa $50 \text{ Rh}^*/(\text{Stäbchen} \cdot \text{Reiz})$) HCN-Kanäle im Photorezeptor nicht aktiviert werden. Deshalb ist im ERG unter skotopischen Reizbedingungen bei ca. $30 \text{ Rh}^*/(\text{Stäbchen} \cdot \text{Reiz})$ kein Unterschied zwischen HCN1-Knock-out- und Wildtyp-Mäusen zu erwarten. Die Ergebnisse der ERG-Messungen bestätigen diese Vorhersage im Wesentlichen. In der Intensitätsreihe ist bis $30 \text{ Rh}^*/(\text{Stäbchen} \cdot \text{Reiz})$ oder 10 mCds/m^2 nur eine kleine Verlängerung der B-Welle zu erkennen (siehe **Abb. 16**). Entsprechend weist auch die Frequenzreihe bei 10 mCds/m^2 auf kein ausgeprägtes Defizit im HCN1-Knock-out hin (siehe **Abb. 19**). Auf Ebene der Ganglienzellen liegen bisher nur sehr wenige Messungen vor. Aber bisher ergibt sich kein Hinweis auf einen Unterschied in der skotopischen Frequenzübertragung zwischen Knock-out und Wildtyp (**Kap. 3.3.2.1**).

Vermutlich werden HCN-Kanäle in Stäbchen erst bei sehr viel höheren Intensitäten aktiviert und verkürzen dann die Lichtantwort. In der Tat ist im Knock-out bei höheren Intensitäten in der ERG-Intensitätsreihe eine Verlängerung der B-Welle zu beobachten. Sie spiegelt vermutlich eine längere Lichtantwort der Photorezeptoren im Knock-out wieder (**Abb. 16**, Intensitäten $> 30 \text{ mCds/m}^2$).

4.3.2. Untersuchungen im photopischen Bereich

Bei den *in vivo*-Untersuchungen konnten die Versuchstiere helladaptiert werden (siehe **Kap. 3.2.2.**). Unter photopischen Bedingungen dominieren die Zapfensignale die Lichtantwort. Das kommt im ERG zum Beispiel durch die veränderte Form der B-Welle zum Ausdruck. Auch im photopischen Bereich tritt eine charakteristische Verlängerung der B-Welle erst bei höheren Intensitäten auf ($> 3000 \text{ mCds/m}^2$, siehe **Abb. 20**). Auch hier könnte der Grund darin liegen, dass erst bei so hohen Lichtstärken die Hyperpolarisation zu einer Aktivierung des HCN-Kanals im Wildtyp-Zapfen und damit zu einem Unterschied zum Knock-out führt.

Frequenzuntersuchungen konnten aus technischen Gründen nur bei niedrigeren Helligkeiten (2500 mCds/m^2) durchgeführt werden. Erwartungsgemäß genügt diese Helligkeit nicht, um im HCN1-Knock-out zu einer Verschlechterung der frequenzbedingten Signalübertragung zu führen (siehe **Abb. 21**). Im Wildtyp und im Knock-out werden die photopischen Signale im ERG bis 20 Hz gut übertragen.

4.3.3. Frequenzuntersuchung in „Übergangssituationen“

Für die skotopische Ausgangssituation bestand die Möglichkeit, Frequenzreihen mit Intensitäten durchzuführen, die ausreichend hell waren, um im Einzelreiz eine Verlängerung der B-Welle hervorzurufen. Aufgrund der stark verlängerten B-Wellen könnte man erwarten, dass Antworten auf wiederholte Reize im Knock-out bei einer niedrigeren Frequenz verschmelzen, als dies im Wildtyp der Fall ist. Führen solche Reize im HCN1-Knock-out zu einer Verschlechterung der Frequenzauflösung? Die skotopische Frequenzreihe bei 2500 mCds/m^2 macht deutlich, dass dies der Fall ist. Gegenüber dem Wildtyp verliert die B-Welle des HCN1-Knock-outs schon bei 2 Hz mehr als 80 % der Modulationsamplitude (**Abb. 22** und **23**). Dies legt nahe, dass die HCN1-Leitfähigkeit entscheidend zur Frequenzauflösung unter diesen Bedingungen beiträgt. Beruht das Defizit allein auf der Verlängerung der B-Welle?

Das Ergebnis lässt sich unter diesem Aspekt alleine nicht erklären. Die photopische Frequenzreihe wurde bei der gleichen Blitzhelligkeit durchgeführt. Auch im Knock-out wurden dabei Frequenzen bis ca. 20 Hz gut übertragen. Im Gegensatz dazu ist in der skotopischen Frequenzreihe bei 2500 mCds/m^2 im Bereich zwischen 10 und 20 Hz im Knock-out überhaupt keine B-Wellen-Modulation mehr zu erkennen. Was geschieht also mit den Zapfensignalen, die im helladaptierten Zustand bei gleicher Blitzintensität noch gut

übertragen wurden? Der Unterschied zwischen den beiden Situationen besteht einzig in der Helladaptation vor und während der photopischen Messreihe. Bei der Helladaptation wird das Stäbchensystem „abgeschaltet“ (siehe unten). Gehen im HCN1-Knock-out also Zapfensignale verloren, wenn das Stäbchensystem nicht vollständig abgeschaltet wird?

Man nennt den Übergangsbereich, in dem beide Photorezeptorsysteme gleichzeitig aktiv sind, den mesopischen Bereich. Mit dem 6-Hz-Versuch sollte dieser Übergangsbereich näher untersucht werden. Es wird dabei, vom dunkeladaptierten Zustand ausgehend bei einer konstanten Reizfrequenz von 6 Hz durch Intensitätssteigerung der Lichtreize ein allmählicher Übergang von den Stäbchen- zu den Zapfensignalen hergestellt. Auch hier findet vor dem Versuch keine Helladaptation statt. Im Wildtyp bringt dieses Reizparadigma einen fließenden Übergang zwischen der skotopischen und der photopischen B-Welle hervor. Im HCN1-Knock-out dagegen verschwindet die skotopische B-Welle, die Amplitudenmodulation des Zapfensystems fällt wiederum komplett aus (**Kap. 3.2.3.2., Abb. 25**). Können diese dramatischen Defizite anhand des Aufbaus des retinalen Netzwerks erklärt werden?

4.3.4. Veränderungen des retinalen Netzwerks bei der Helladaptation

Unter skotopischen Bedingungen ist die retinale Signalverarbeitung vom Stäbchensystem dominiert. Die skotopischen Signale werden in erster Linie über die AII-Amakrinzelle in den ON- und den OFF-Kanal des Zapfensystems eingespeist (siehe **Abb. 2**). Die Lichtantworten der Stäbchen werden über die Stäbchenbipolarzelle glutamaterg auf die AII übertragen. Die AII-Amakrinzellen sind im dunkeladaptierten Zustand untereinander über gap-junctions zu einem funktionellen Netzwerk verbunden. Ihre Ausgangssynapsen sind elektrische Synapsen (gap-junctions) auf ON-Bipolarzellen und glyzinerge Synapsen auf OFF-Bipolarzellen. Da Glyzin ein inhibierender Transmitter ist, ist die Verbindung zum OFF-Kanal vorzeichenumkehrend. Die passive, elektrische Verbindung zum ON-Kanal ist dagegen vorzeichenerhaltend. In dieser Weise werden die Signale der Stäbchen über die Stäbchenbipolarzelle und die AII-Amakrinzelle in den ON-Signalverarbeitungsweg (**Abb. 2**, gelb) und den OFF-Signalverarbeitungsweg (**Abb. 2**, rot) eingespeist. Stäbchen- und Zapfensignale benutzen also eine gemeinsame Endstrecke auf dem Weg zu den retinalen Ganglienzellen. Unter photopischen Bedingungen wird der Verarbeitungsweg für Stäbchensignale (**Abb. 2**, grün) vermutlich von den ON- und OFF-Kanälen abgekoppelt. Die zugrunde liegenden Prozesse sind noch nicht vollständig verstanden, jedoch wird dopaminerg/GABAergen Amakrinzellen

dabei eine Schlüsselrolle zugerechnet. Diese Amakrinzellen sollen im helladaptierten Zustand die Signale der AII-Amakrinzellen durch GABAerge Inhibition unterdrücken (Contini & Raviola, 2003) und durch dopaminerge Modulation der gap-junctions die AII-Amakrinzellen physiologisch voneinander isolieren (Mills & Massey, 1995). Die Umstellung des retinalen Netzwerks setzt möglicherweise ein konstantes Hintergrundlicht für eine bestimmte Zeit voraus. Bei den ERG-Messungen war die Helladaptation nach zehn Minuten abgeschlossen. Nach der Helladaptation ist die retinale Signalverarbeitung von der direkten vertikalen Signalverarbeitung der Zapfensignale dominiert (zur Übersicht: Witkovsky, 2004).

Was aber passiert im mesopischen Übergangsbereich?

4.4. Modell zur Funktion des HCN1-Kanals im Übergangsbereich

Es ist nicht vollständig geklärt, ob im mesopischen Bereich alle Stäbchensignale den Weg über die Stäbchenbipolarzelle und die AII-Amakrinzelle nehmen. Es gibt gap junctions zwischen Stäbchen- und Zapfenendfüßen (Smith et al., 1986), die unter mesopischen Bedingungen scheinbar geöffnet werden. Stäbchensignale können dann in Zapfen nachgewiesen werden (Nelson, 1977) und können von dort in Zapfenbipolarzellen weitergeleitet werden. Für die folgende Diskussion wird angenommen, dass zumindest ein Teil der Stäbchensignale weiterhin über die AII-Amakrinzelle in ON- und OFF-Kanal fließt.

Da Stäbchen und Zapfen gleichzeitig aktiv sind, kann es bei hellen Reizen zu einer Art „Konflikt“ zwischen den hochempfindlichen Stäbchen- und dem weniger empfindlichen Zapfensystem kommen. Starke wiederholte Reizung der Stäbchen könnte zur Sättigung der Stäbchenantworten, und damit des gesamten Stäbchenwegs führen. Die Folge wäre eine tonische Übererregung der Stäbchenbipolarzellen und AII-Amakrinzellen. Die stark depolarisierten AII-Amakrinzellen könnten durch ihre elektrischen Synapsen den ON-Weg übererregen und durch ihre glyzinergen Synapsen den OFF-Weg stark inhibieren. Die Weiterleitung der schwächeren Zapfensignale über die gemeinsame Endstrecke wäre unter diesen Bedingungen sehr erschwert oder gar unmöglich. Im Wildtyp wird diese Situation vermutlich verhindert, indem die HCN1-Kanäle in den Stäbchen während der starken Reize der sättigenden Hyperpolarisation entgegenwirken. Die Stäbchen depolarisieren und das Stäbchensystem (und damit das gesamte retinale Netzwerk) entgeht der Sättigung. Die Zapfensignale können normal weitergeleitet werden.

Im HCN1-Knock-out ist die Situation anders. Da die HCN-Kanäle in den Photorezeptoren fehlen, muss man hier damit rechnen, dass die Lichtantworten der Stäbchen sättigen und so die Zapfensignale blockieren.

Dieses Modell könnte somit erklären, warum in den geschilderten Übergangssituationen auch keine Frequenzmodulation durch Zapfeneingänge mehr zu beobachten ist. Auch die elektrophysiologischen Messungen der Ganglienzellen unterstützen diese Vorstellung. Der Einbruch der Frequenzmodulation im Knock-out ist nämlich dadurch charakterisiert, dass ON-Ganglienzellen schon bei niedrigen Frequenzen einen großen residualen Einwärtsstrom zeigen (siehe **Abb. 42** und **44**). OFF-Ganglienzellen zeigen hingegen einen großen residualen Auswärtsstrom. Das spricht dafür, dass eine starke tonische Erregung bzw. Inhibition in den Teilsystemen vorliegt.

Wenn die Retina helladaptiert ist, kommt dieser Sättigungseffekt auch im Knock-out nicht oder zumindest nicht so stark zum tragen. Durch den Einfluss der dopaminerg/GABAergen Amakrinzellen ist die Lichtantwort der AII-Amakrinzellen unterdrückt und durch Modulation der synaptischen Verbindungen von den ON- und OFF-Bipolarzellen des Zapfenwegs abgekoppelt. Daher könnte dieses Modell auch die moderaten Defizite im helladaptierten Knock-out erklären. Den HCN1-Kanälen würde demnach vor allem bei der parallelen Signalverarbeitung beider Photorezeptorsysteme eine wichtige Rolle zukommen.

Wie kann dieses Modell experimentell überprüft werden?

4.5. Möglichkeiten zum Überprüfen des Modells – ein Ausblick

Das Modell erklärt die Defizite im Knock-out durch Sättigung im Stäbchensystem. Um das Modell zu überprüfen, stehen zwei Wege zur Verfügung. Der erste Weg besteht darin, die Sättigung im Stäbchenweg auch im HCN1-Knock-out zu vermeiden. Es existieren zahlreiche transgene Mauslinien, bei denen Proteine ausgeschaltet wurden, die für die Stäbchenfunktion von Bedeutung sind. Durch das Ausschalten des Rhodopsins (oder anderer Elemente der Phototransduktionskaskade) sind Stäbchen in diesen Tieren „blind“. Zapfen funktionieren normal, da sie andere Opsine benutzen als Stäbchen (Jaissle et al., 2001). Die Retina entwickelt sich zuerst normal. Erst ab der vierten bis fünften Lebenswoche sterben die Stäbchen ab (Toda et al., 1999). Man hat also ein kurzes Zeitfenster, um elektrophysiologische Untersuchungen durchzuführen. Durch Kreuzung eines Rhodopsin-Knock-outs mit dem HCN1-Knock-out kann ein Doppel-Knock-out erzeugt werden, um die Richtigkeit des von

mir vorgeschlagenen Modells zu überprüfen. In diesen Mäusen kann das Stäbchensystem nicht in Sättigung gehen. Sollten die Defizite in der Frequenzübertragung im HCN1-Knock-out auf die Sättigung des Stäbchenwegs zurückgehen, sollten sie im Doppel-Knock-out nicht auftreten. Durch Vergleich des Doppel-Knock-outs mit dem einfachen Rhodopsin-Knock-out wäre es auch möglich, Erkenntnisse über die Funktion von HCN1 im Zapfensystem zu erhalten.

Der zweite Weg besteht darin, die Sättigung nicht in den ON- bzw. den OFF-Kanal gelangen zu lassen. Die Einkopplung des Stäbchensystems in die beiden Kanäle erfolgt durch unterschiedliche Synapsentypen, die sich in ihrem pharmakologischen Profil unterscheiden. Durch die Möglichkeit Lichtantworten auf der Ganglienzellebene *in vitro* zu untersuchen, kann ich die Einkopplung in den ON- bzw. OFF-Signalverarbeitungsweg pharmakologisch blockieren. Durch den Einsatz von Strychnin wäre es beispielsweise möglich, den OFF-Kanal von der glyzineren Inhibition durch die AII-Amakrinzelle abzukoppeln. In einem solchen Experiment sollte man unter mesopischen Bedingungen bei OFF-Ganglienzellen des HCN1-Knock-outs keine oder nur sehr leichte Defizite in der Frequenzübertragung beobachten. ON-Ganglienzellen, deren Aktivität über elektrische Synapsen zwischen AII-Amakrinzellen und ON-Bipolarzellen gesteuert wird, sollten hingegen die bekannten Defizite auch während der Strychninapplikation aufweisen. Im umgekehrten Ansatz wäre die Verwendung von Blockern für gap-junctions, z.B. Carbenoxolon denkbar (zur Übersicht: Sohl et al., 2005). In diesem Fall sollten die Defizite in den OFF-Ganglienzellen erhalten bleiben, in den ON-Ganglienzellen aber nicht oder kaum auftreten. Die gap-junctions der AII-Amakrinzellen mit den ON-Bipolarzellen enthalten das Connexin36 (Feigenspan et al., 2001). Durch Kreuzung des HCN1-Knock-outs mit einem Connexin36-Knock-out würde ebenfalls die Einkopplung des Stäbchensystems in den ON-Weg verhindert. Diese Versuche sollen in der Folge dieser Doktorarbeit durchgeführt werden bzw. sind bereits in Arbeit.

Die hier vorgestellten Ergebnisse geben erste Hinweise darauf, dass HCN1 eine wesentliche, bisher nicht beschriebene Funktion in der retinalen Signalverarbeitung hat. Seine Expression in Stäbchen könnte wichtig dafür sein, dass im mesopischen Arbeitsbereich die Zusammenarbeit zwischen den zwei unterschiedlich spezialisierten Sehsystemen, dem Stäbchensystem und dem Zapfensystem funktionieren kann. Das vorgeschlagene Modell kann nicht alle Effekte erklären, die ich in der retinalen Signalverarbeitung im HCN1-Knock-out feststellen konnte. Zum Beispiel weisen die Phasenverschiebung bei der Frequenzübertragung im ERG (**Abb. 19** und **21**) und die veränderten, desynchronisierten oszillatorischen Potentiale (**Abb. 18** und **24**) darauf hin, dass wichtige Zeitaspekte der Signalverarbeitung verändert sind.

Möglicherweise handelt es sich dabei um Sekundäreffekte, die durch den gestörten Signaleingang in die innere Retina hervorgerufen werden. Es ist aber auch denkbar, dass sich in diesen Veränderungen andere Funktionen der HCN1-Kanäle widerspiegeln, die mit der Expression in der inneren Retina, z.B. in Amakrinzellen zusammenhängen. Antworten auf diese Fragen sind auch für die Beurteilung aller zukünftigen Experimente mit dem HCN1-Knock-out wichtig.

Andere Untersuchungen an der Retina stellen die Wirkung von HCN-Leitfähigkeiten im Photorezeptor in den Zusammenhang mit Kaliumkanälen. Dabei wurde die Frequenzübertragung von Stromsignalen und Lichtreizen in Photorezeptoren des Meerschweinchens und in Elektroretinogrammen von Ratten, Katzen und Menschen gemessen. Die beschriebene Übertragungsfunktion ist ein Bandpassfilter und soll die Weiterleitung von visuellen Reizen im Bereich von 1-10 Hz optimieren (Demontis et al., 1999; Gargini et al., 1999a, 1999b; Maccarone et al., 2004; zur Übersicht: Demontis & Cervetto, 2002).

Es sollte betont werden, dass meine Ergebnisse nicht im Widerspruch zu den genannten Konzepten stehen. Es ist ein überaus häufiges und typisches Phänomen in biologischen Systemen, dass einzelne Elemente, die sich durch experimentelle Techniken isoliert untersuchen lassen, mehr als eine Funktion haben und in komplexer Art und Weise zur Systemleistung beitragen. Die Liste der möglichen Funktionen der HCN1-Kanäle innerhalb der retinalen Signalverarbeitung wird in dieser Arbeit durch eine wichtige Funktion ergänzt.

5. Literatur

Attwell D, Borges S, Wu SM & Wilson M (1987). Signal clipping by the rod output synapse. *Nature* **328**, 522-524.

Bader CR, MacLeish PR & Schwartz EA (1979). A voltage-clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander. *J Physiol* **296**, 1-26.

Barlow HB & Hill RM (1963). Selective sensitivity to direction of movement in ganglion cells of the rabbit retina. *Science* **139**, 412-414.

Barry PH & Lynch JW (1991). Liquid Junction Potentials and Small Cell Effects in Patch-Clamp Analysis. *Journal of Membrane Biology* **121**, 101-117.

Baylor DA, Matthews G & Nunn BJ (1984). Location and function of voltage-sensitive conductances in retinal rods of the salamander, *Ambystoma tigrinum*. *J Physiol* **354**, 203-223.

Beaumont V & Zucker RS (2000). Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic I(h) channels. *Nat Neurosci* **3**, 133-141.

Biel M, Seeliger M, Pfeifer A, Kohler K, Gerstner A, Ludwig A, Jaissle GB, Fauser S, Zrenner E & Hofmann F (1999). Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7553-7557.

Biel M, Schneider A & Wahl C (2002). Cardiac HCN Channels. Structure, Function, and Modulation. *Trends Cardiovasc Med* **12**, 206.

Bloomfield SA & Dacheux RF (2001). Rod vision: pathways and processing in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* **20**, 351-384.

Boycott BB & Wäbke H (1974). The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J Physiol* **240**, 397-419.

Boycott BB & Hopkins JM (1981). Microglia in the retina of monkey and other mammals: its distinction from other types of glia and horizontal cells. *Neuroscience* **6**, 679-688.

Brown HF, DiFrancesco D & Noble SJ (1979). How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* **280**, 235-236.

Brown HF & DiFrancesco D (1980). Voltage-clamp investigations of membrane currents underlying pace-maker activity in rabbit sino-atrial node. *J Physiol* **308**, 331-351.

Chen S, Wang J, & Siegelbaum SA (2001). 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.

Chen C (2004). ZD7288 inhibits postsynaptic glutamate receptor-mediated responses at hippocampal perforant path-granule cell synapses. *Eur J Neurosci* **19**, 643-649.

Cleland BG, Levick WR & Sanderson KJ (1973). Properties of sustained and transient ganglion cells in the cat retina. *J Physiol* **228**, 649-680.

Cleland BG & Levick WR (1974). Brisk and sluggish concentrically organized ganglion cells in the cat's retina. *J Physiol* **240**, 421-456.

Contini M & Raviola E (2003). GABAergic synapses made by a retinal dopaminergic neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1358-1363.

Demontis GC, Longoni B, Barcaro U & Cervetto L (1999). Properties and functional roles of hyperpolarization-gated currents in guinea-pig retinal rods. *J Physiol* **515**, 813-828.

Demontis GC, Moroni A, Gravante B, Altomare C, Longoni B, Cervetto L & DiFrancesco D (2002). Functional characterisation and subcellular localisation of HCN1 channels in rabbit retinal rod photoreceptors. *J Physiol* **542**, 89-97.

Demontis GC & Cervetto L (2002). Vision: how to catch fast signals with slow detectors. *News Physiol Sci* **17**, 110-114.

DiFrancesco D (1982). Block and activation of the pace-maker channel in calf purkinje fibres: effects of potassium, caesium and rubidium. *J Physiol* **329**, 485-507.

DiFrancesco D (1993). Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* **55**, 455-472.

DiFrancesco D (1994). Some properties of the UL-FS 49 block of the hyperpolarization-activated current (I_f) in sino-atrial node myocytes. *Pflügers Arch* **427**, 64-70.

Dong CJ, Agey P & Hare WA (2004). Origins of the electroretinogram oscillatory potentials in the rabbit retina. *Vis Neurosci* **21**, 533-543.

- Dowling JE & Boycott BB (1969). Retinal ganglion cells: a correlation of anatomical and physiological approaches. *UCLA Forum Med Sci* **8**, 145-161.
- Euler T, Detwiler PB & Denk W (2002). Directionally selective calcium signals in dendrites of starburst amacrine cells. *Nature* **418**, 845-852.
- Fain GL, Quandt FN, Bastian BL & Gerschenfeld HM (1978). Contribution of a caesium-sensitive conductance increase to the rod photoresponse. *Nature* **272**, 466-469.
- Famiglietti EVJ & Kolb H (1975). A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Res* **84**, 293-300.
- Feigenspan A, Teubner B, Willecke K & Weiler R (2001). Expression of neuronal connexin36 in AII amacrine cells of the mammalian retina. *J Neurosci* **21**, 230-239.
- Flores-Herr N, Protti DA & Wäble H (2001). Synaptic currents generating the inhibitory surround of ganglion cells in the mammalian retina. *J Neurosci* **21**, 4852-4863.
- Freed MA & Sterling P (1988). The ON-alpha ganglion cell of the cat retina and its presynaptic cell types. *J Neurosci* **8**, 2303-2320.
- Freed MA (1992). GABAergic circuits in the mammalian retina. *Prog Brain Res* **90**, 107-131.
- Gargini C, Demontis GC, Bisti S & Cervetto L (1999a). Effects of blocking the hyperpolarization-activated current (I_h) on the cat electroretinogram. *Vision Res* **39**, 1767-1774.
- Gargini C, Demontis GC, Bisti S & Cervetto L (1999b). Temporal fidelity in the visual system. *Arch Ital Biol* **137**, 299-309.
- Gasparini S & DiFrancesco D (1997). Action of the hyperpolarization-activated current (I_h) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. *Pflügers Arch* **435**, 99-106.
- Gauß R, Seifert R & Kaupp UB (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* **393**, 583-587.
- Hack I, Peichl L & Brandstätter JH (1999). 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.
- Hestrin S (1987). The properties and function of inward rectification in rod photoreceptors of the tiger salamander. *J Physiol* **390**, 319-333.

Heynen H, Wachtmeister L & van Norren D (1985). Origin of the oscillatory potentials in the primate retina. *Vision Res* **25**, 1365-1373.

Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A & Ohmori H (1999). Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem* **274**, 12835-12839.

Ivanova EN. (2003). Systematic analysis of Hyperpolarization-activated and Cyclic Nucleotide-gated (HCN) channels in photoreceptors and bipolar cells of the rat retina. *Diss Univ Köln, Jülbericht* , Jül-4102.

Jaissle GB, May CA, Reinhard J, Kohler K, Fauser S, Lutjen-Drecoll E, Zrenner E & Seeliger MW (2001). Evaluation of the rhodopsin knockout mouse as a model of pure cone function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 506-513.

Jeon CJ, Strettoi E & Masland RH (1998). The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* **18**, 8936-8946.

Kaneko A, Pinto LH & Tachibana M (1989). Transient calcium current of retinal bipolar cells of the mouse. *J Physiol* **410**, 613-629.

Karschin A & Wäble H (1990). Voltage- and transmitter-gated currents in isolated rod bipolar cells of rat retina. *J Neurophysiol* **63**, 860-876.

Kaupp UB & Seifert R (2001). Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol* **63**, 235-257.

Kim IB, Lee EJ, Kang TH, Chung JW, & Chun MH (2003). 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.

Kolb H & Famiglietti EV (1974). Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of cat retina. *Science* **186**, 47-49.

Krieger J, Strobel J, Vogl A, Hanke W & Breer H (1999). Identification of a cyclic nucleotide- and voltage-activated ion channel from insect antennae. *Insect Biochem Mol Biol* **29** , 255-267.

Kuffler SW (1953). Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J Neurophysiol* **16**, 37-68.

Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F & Biel M (1998). A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* **393**, 587-591.

Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F & Biel M (1999). Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J* **18**, 2323-2329.

Lüthi A, Bal T & McCormick DA (1998). Periodicity of thalamic spindle waves is abolished by ZD7288, a blocker of Ih. *J Neurophysiol* **79**, 3284-3289.

Lüthi A & McCormick DA (1999). Modulation of a pacemaker current through Ca(2+)-induced stimulation of cAMP production. *Nat Neurosci* **2**, 634-641.

Lyubarsky AL, Daniele LL & Pugh EN, Jr. (2004). 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.

Maccarone R, Izzizzari G, Gargini C, Cervetto L & Bisti S (2004). The impact of organic inhibitors of the hyperpolarization activated current (Ih) on the electroretinogram (ERG) of rodents. *Arch Ital Biol* **142**, 95-103.

MacNeil MA & Masland RH (1998). Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron* **20**, 971-982.

Magee JC (1998). Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **18**, 7613-7624.

Magee JC (1999). Dendritic Ih normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nat Neurosci* **2**, 848.

Marx T, Gisselmann G, Stortkuhl KF, Hovemann BT & Hatt H (1999). 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.

Masland RH (2001a). Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 431-436.

Masland RH (2001b). The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* **4**, 877-886.

McCormick DA & Bal T (1997). Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu Rev Neurosci* **20**, 185-215.

McNaughton PA (1990). Light response of vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev* **70**, 847-883.

Mills SL & Massey SC (1995). Differential properties of two gap junctional pathways made by AII amacrine cells. *Nature* **377**, 734-737.

Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F & Ludwig A (2001). Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem* **268**, 1646-1652.

Müller F, Wäbke H & Voigt T (1988). Pharmacological modulation of the rod pathway in the cat retina. *J Neurophysiol* **59**, 1657-1672.

Müller F & Kaupp UB (1998). Signaltransduktion in Sehzellen. *Naturwissenschaften* **85**, 49-61.

Müller F, Scholten A, Ivanova E, Haverkamp S, Kremmer E & Kaupp UB (2003). HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals. *Eur J Neurosci* **17**, 2084-2096.

Nelson R (1977). 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.

Nelson R, Famiglietti EVJ & Kolb H (1978). Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina. *J Neurophysiol* **41**, 472-483.

Nolan MF, Malleret G, Lee KH, Gibbs E, Dudman JT, Santoro B, Yin D, Thompson RF, Siegelbaum SA, Kandel ER & Morozov A (2003). The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell* **115**, 551-564.

O'Brien BJ, Isayama T, Richardson R & Berson DM (2002). Intrinsic physiological properties of cat retinal ganglion cells. *J Physiol* **538**, 787-802.

Ogden TE (1978). Nerve fiber layer astrocytes of the primate retina: morphology, distribution, and density. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **17**, 499-510.

Pang JJ, Gao F & Wu SM (2003). Light-evoked excitatory and inhibitory synaptic inputs to ON and OFF alpha ganglion cells in the mouse retina. *J Neurosci* **23**, 6063-6073.

Peichl L & Wäbke H (1981). Morphological identification of on- and off-centre brisk transient (Y) cells in the cat retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **212**, 139-153.

Peichl L & Wäbke H (1983). The structural correlate of the receptive field centre of alpha ganglion cells in the cat retina. *J Physiol* **341**, 309-324.

- Peichl L (1990). Prinzipien der Bildverarbeitung in der Retina. *Optometrie* **3**, 3-12.
- Peichl L & Gonzalez-Soriano J (1994). Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Vis Neurosci* **11**, 501-517.
- Protti DA, Flores-Herr N, Li W, Massey SC, & Wassle H (2005). Light signaling in scotopic conditions in the rabbit, mouse and rat retina: a physiological and anatomical study. *J Neurophysiol* **93**, 3479-3488.
- Pugh EN, Jr., Falsini B & Lyubarsky AL (1998). The origin of the major rod- and cone-driven components of the rodent electroretinogram and the effect of age and light-rearing history and the amplitude of these components. In *Photostasis and related topics*, pp. 93-128. Plenum Press, New York.
- Rieke F & Baylor DA (1998). Single-photon detection by rod cells of the retina. *Reviews of Modern Physics* **70**, 1027-1036.
- Robinson RB & Siegelbaum SA (2003). Hyperpolarization-Activated Cation Currents: From Molecules to Physiological Function. *Annu Rev Physiol* **65**, 453-480.
- Robson JG, Maeda H, Saszik SM & Frishman LJ (2004). In vivo studies of signaling in rod pathways of the mouse using the electroretinogram. *Vision Res* **44**, 3253-3268.
- Rodieck RW (1998). *The first steps in seeing*, 2nd Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Santoro B & Tibbs GR (1999). The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci* **868**, 741-764.
- Satoh TO & Yamada M (2000). A bradycardiac agent ZD7288 blocks the hyperpolarization-activated current (I_h) in retinal rod photoreceptors. *Neuropharmacology* **39**, 1284-1291.
- Satoh TO & Yamada M (2002). Multiple inhibitory effects of zatebradine (UL-FS 49) on the electrophysiological properties of retinal rod photoreceptors. *Pflügers Arch* **443**, 532-540.
- Schneeweis DM & Schnapf JL (1995). Photovoltage of rods and cones in the macaque retina. *Science* **268**, 1053-1056.
- Schneeweis DM & Schnapf JL (1999). The photovoltage of macaque cone photoreceptors: adaptation, noise, and kinetics. *J Neurosci* **19**, 1203-1216.

Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P & Kaupp UB (1999). 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.

Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D & Cohen IS (1999). Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res* **85**, e1-e6.

Smith RG, Freed MA & Sterling P (1986). Microcircuitry of the dark-adapted cat retina: functional architecture of the rod-cone network. *J Neurosci* **6**, 3505-3517.

Sohl G, Maxeiner S & Willecke K (2005). Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci* **6**, 191-200.

Soucy E, Wang Y, Nirenberg S, Nathans J & Meister M (1998). A novel signaling pathway from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian retina. *Neuron* **21**, 481-493.

Stockton RA & Slaughter MM (1989). B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *J Gen Physiol* **93**, 101-122.

Sun W, Li N & He S (2002). Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* **451**, 115-126.

Tabata T & Ishida AT (1996). Transient and sustained depolarization of retinal ganglion cells by Ih. *J Neurophysiol* **75**, 1932-1943.

Taylor WR & Vaney DI (2002). Diverse synaptic mechanisms generate direction selectivity in the rabbit retina. *J Neurosci* **22**, 7712-7720.

Tian N & Slaughter MM (1995). Correlation of dynamic responses in the ON bipolar neuron and the b-wave of the electroretinogram. *Vision Res* **35**, 1359-1364.

Toda K, Bush RA, Humphries P & Sieving PA (1999). The electroretinogram of the rhodopsin knockout mouse. *Vis Neurosci* **16**, 391-398.

Tsukamoto Y, Morigiwa K, Ueda M, & Sterling P (2001). Microcircuits for night vision in mouse retina. *J Neurosci* **21**, 8616-8623.

Vaccari T, Moroni A, Rocchi M, Gorza L, Bianchi ME, Beltrame M & DiFrancesco D (1999). The human gene coding for HCN2, a pacemaker channel of the heart. *Biochim Biophys Acta* **1446**, 419-425.

Wachtmeister L (1998). Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog Retin Eye Res* **17**, 485-521.

Wassle H, Boycott BB, & Illing RB (1981). Morphology and mosaic of on- and off-beta cells in the cat retina and some functional considerations. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **212**, 177-195.

Wäble H & Boycott BB (1991). Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev* **71**, 447-480.

Wäble H, Yamashita M, Greferath U, Grunert U & Müller F (1991). The rod bipolar cell of the mammalian retina. *Vis Neurosci* **7**, 99-112.

Weng S, Sun W & He S (2004). Identification of ON-OFF direction-selective ganglion cells in the mouse retina. *J Physiol.* **562**, 915-923

Witkovsky P (2004). Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol* **108**, 17-40.

Wollmuth LP & Hille B (1992). Ionic selectivity of Ih channels of rod photoreceptors in tiger salamanders. *J Gen Physiol* **100**, 749-765.

Wyszecki G & Stiles WS (2000). *Color Science* , Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Xin D & Bloomfield SA (1999a). Comparison of the responses of AII amacrine cells in the dark- and light-adapted rabbit retina. *Vis Neurosci* **16**, 653-665.

Xin D & Bloomfield SA (1999b). Dark- and light-induced changes in coupling between horizontal cells in mammalian retina. *J Comp Neurol* **405**, 75-87.

Yanagihara K & Irisawa H (1980). Potassium current during the pacemaker depolarization in rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch* **388**, 255-260.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern und Kollegen des Instituts für Biologische Informationsverarbeitung 1 und des Forschungszentrums Jülich bedanken, die mich in vielfältiger Weise bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt folgenden Menschen:

Herrn Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp für die Betreuung dieser Arbeit und die Möglichkeit im IBI 1 arbeiten zu dürfen,

Herrn Dr. Frank Müller für die stete Unterstützung, die wissenschaftliche Anleitung und die Engelsgeduld,

Herrn Prof. Dr. Peter Kloppenburg, für die Begutachtung dieser Arbeit und die anregende Diskussion,

alle ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Müller, die mir es so leicht gemacht haben, mich in dieser Zeit wohl zu fühlen und diese Arbeit zu vollenden. Insbesondere:

- Elena Ivanova, als Mentorin in Sachen Patch-Clamp,
- Anja Mataruga, für die fachliche Beratung und das Händchen am Kryostaten,
- Frank Thiel, für die intensive Zusammenarbeit und den kollegialen Beistand,
- Christoph Aretzweiler, für die intensive Unterstützung, besonders bei der Tierzucht,

allen Kollegen im IBI-1, die mich bei organisatorischen und technischen Problemen immer tatkräftig unterstützt haben und die hervorragenden Arbeitsbedingungen schaffen, vor allem: Mechthilde Bruns, Anita Eckert, Rudolf Esser, Dieter Grammig und Daniel Porz, Ohne Euch geht gar nichts!

allen auswärtigen Wissenschaftlern, die mich durch ihren Rat und die kritische Diskussion unterstützt haben, dabei besonders:

Nico Flores und Heinz Wäble, sowie Thomas Euler für die wichtigen Anregungen und die Motivation,

Herrn Dr. M. Seeliger und seiner Arbeitsgruppe für die fruchtbare Zusammenarbeit,

meiner Familie und meinen Freunden, die mich stützen und mir Kraft geben.

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.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4201
Januar 2006
ISSN 0944-2952