

Inhibierende Netzwerke in der äußeren Retina

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

Herrn Mario Pieper
geboren am 20.10.1978
in Oldenburg

Gutachter: Prof. Dr. Reto Weiler
Zweitgutachter: Prof Dr. Henrik Mouritsen

Tag der Disputation: 21.12.2009

Zusammenfassung	3
Summary	4
1. Einleitung	5
1.1. <i>Netzwerk der Retina</i>	5
1.2. <i>Gap Junctions in der Retina</i>	9
1.3. <i>Funktion des Horizontalzellnetzwerks</i>	13
1.4. <i>Zielsetzung der Arbeit</i>	15
2. Material und Methoden	17
2.1. <i>Puffer, Lösungen und Medien</i>	17
2.2. <i>Versuchstiere</i>	18
2.3. <i>Patch-Clamp Messungen an isolierten Horizontalzellen</i>	18
2.3.1. <i>Dissoziation der Horizontalzellen</i>	19
2.3.2. <i>Versuchsaufbau</i>	19
2.3.3. <i>Patch-Clamp-Messungen</i>	22
2.4. <i>Lichtantworten von Bipolarzellen</i>	24
2.4.1. <i>Vibratomschnitte</i>	25
2.4.2. <i>Lichtstimulation</i>	25
2.4.3. <i>Bestimmung des Zelltyps</i>	27
2.5. <i>Auswertung der Patch-Clamp Daten</i>	28
2.6. <i>Immunhistologie</i>	28
2.6.1. <i>Herstellung der Präparate</i>	29
2.6.2. <i>Versuchsdurchführung</i>	30
3. Ergebnisse	32
3.1. <i>Horizontalzeleigenschaften</i>	32
3.1.1. <i>Immunhistologische Analyse</i>	32
3.1.2. <i>Horizontalzellströme</i>	41
3.1.3. <i>Glutamat-Antworten</i>	45

3.2.	<i>Bipolarzeleigenschaften</i>	46
3.2.1.	<i>Lichtantworten der Zapfen-Bipolarzellen vom Typ 5</i>	47
3.2.2.	<i>Lichtantworten der Zapfen-Bipolarzellen vom Typ 7</i>	50
3.2.3.	<i>Lichtantworten der Stäbchen-Bipolarzellen</i>	53
4.	Diskussion	56
4.1.	<i>Einfluss des Cx57-Knockouts auf die Horizontalzellen</i>	56
4.2.	<i>Rezeptive Felder von Bipolarzellen</i>	57
4.3.	<i>Funktion der Horizontalzellkopplung</i>	60
5.	Literatur	62
	Abkürzungsverzeichnis	69
	Abbildungsverzeichnis	70
	Lebenslauf	71
	Danksagung	72

Zusammenfassung

Horizontalzellen der Retina bilden ein über *Gap Junctions* gekoppeltes Netzwerk, das für die rezeptiven Felder nachgeschalteter Neurone essentiell ist. Die Horizontalzellen in einer *Connexin57-Knockout*-Maus, in der die interzellulären Kanäle dieser Zellen fehlen, zeigen verkleinerte rezeptive Felder, ein depolarisiertes Dunkelpotential und einen erniedrigten Eingangswiderstand. In dieser Arbeit sind jedoch in immunhistologischen und elektrophysiologischen Analysen weder Ionenkanäle oder -transporter noch Rezeptoren gefunden worden, die für die Depolarisation oder die Erhöhung des Eingangswiderstands der Horizontalzellen verantwortlich sein könnten. Zu dem wurde der Einfluss des Verlustes der Kopplung auf die lichtinduzierten Ströme der nachgeschalteten Bipolarzellen untersucht. Dabei zeigten sich für zwei Typen von Zapfen-Bipolarzellen und die Stäbchen-Bipolarzellen keine veränderten Lichtantworten. Die genaue Funktion der Horizontalzellkopplung für die retinale Verarbeitung ist demnach noch immer unklar.

Summary

Horizontal cells are coupled via gap junctions. They form a network which is essential for forming receptive fields of downstream retinal neurons. In a Connexin57-knockout-mouse the intercellular channels of horizontal cells are lost, the receptive fields are reduced and these cells are more depolarized in the dark and have a lower input resistance. In this thesis histological and electrophysiological analyses were done. But they revealed no alterations in ion-channels, -transporters or receptors that could be responsible for variation of dark resting potential or input resistance of horizontal cells. Additionally, the influence of disrupted coupling of horizontal cells on the light induced currents of bipolar cells was studied. It could be shown that there were no changes in light responses of two types of cone bipolar cells and one type of rod bipolar cell. The exact function of horizontal cell coupling remains still unclear.

1. Einleitung

Grundlage der Neurowissenschaften ist es zu verstehen, wie die einzelnen Nervenzellen miteinander kommunizieren. Dabei spielen die Synapsen eine entscheidende Rolle. Man unterscheidet chemische von elektrischen Synapsen. Chemische Synapsen haben einen komplexen Apparat auf der präsynaptischen Seite zur Transmitter-Freisetzung und postsynaptisch entsprechend Rezeptoren, um eine zellspezifische Antwort auszulösen. Die zellbiologische Grundlage für die elektrische Signalübertragung bilden die aus Connexinen (Cx) aufgebauten *Gap Junctions*. In der Retina konnten bisher zahlreiche unterschiedliche *Gap Junctions* entdeckt und beschrieben werden. Daher eignet sich die Retina besonders um diesen Weg der Zellkommunikation zu studieren.

Im Folgenden wird nun die Retina als neuronales Netzwerk mit den unterschiedlichen Zelltypen vorgestellt und die Bedeutung der verschiedenen elektrischen Synapsen für die Retina erläutert. Es werden die bisherigen Erkenntnisse über die durch *Gap Junctions* verbundenen Horizontalzellen dargestellt und im Anschluss wird die Zielsetzung dieser Studie herausgearbeitet.

1.1. Netzwerk der Retina

Im Auge wird mit Hilfe des optischen Apparates nach dem Prinzip der *camera obscura* ein scharfes Bild auf die Retina projiziert (Kepler, 1604). Diese hat einerseits die Funktion eines Lichtdetektors, andererseits leistet sie wesentliche Teile der Verarbeitung visueller Reize. Die Retina ist ontogenetisch eine Ausstülpung des Zwischenhirns und funktionell ein Teil des Zentralen Nervensystems. Sie besteht hauptsächlich aus Neuronen. Diese lassen sich in fünf Zellklassen einteilen, die laminar in der Retina angeordnet sind.

In der äußeren Retina auf der lichtabgewandten Seite befinden sich die lichtsensitiven Photorezeptoren (Abb. 1). Stäbchen zeigen eine hohe Lichtempfindlichkeit und spielen daher bei der Wahrnehmung schwacher Lichtreize eine große Rolle (Rieke and Baylor, 1998). Bei steigender Lichtintensität werden die Zapfen aktiv. Durch Zapfen-Photopigmente mit unterschiedlicher Präferenz für bestimmte Wellenlängen des sichtbaren Lichts ist eine Farbdiskrimination möglich (McNaughton, 1990). Durch Licht wird in den Photorezeptoren eine *second messenger* Kaskade ausgelöst, die schließlich zu einer Hyperpolarisation der Membran führt, wodurch die Glutamatausschüttung herabgesetzt wird. Dieser Effekt wirkt sich dann auf die weiteren Zellen aus, die ihre

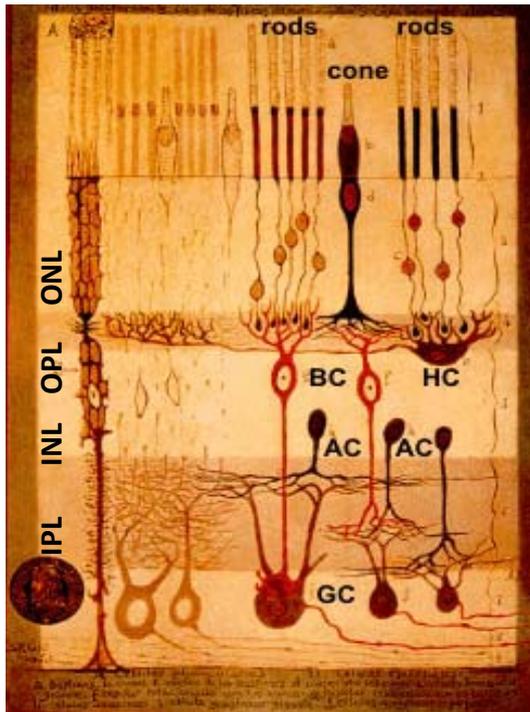


Abbildung 1: Zeichnung der Retina von Santiago Ramón y Cajal um 1880.

Einige dargestellte Zellverbindungen sind zwar falsch, aber die verschiedenen Zellklassen lassen sich sehr gut erkennen. Zapfen (*cones*) und Stäbchen (*rods*) in der äußeren plexiformen Schicht (*ONL*) wandeln die Lichtsignale in elektrische Signale um und leiten sie über ihre Synapsen in der äußeren plexiformen Schicht (*OPL*) weiter an die sekundären Neurone. Bipolarzellen (*BC*) in der inneren nukleären Schicht (*INL*) leiten die Signale weiter an die Ganglienzellen (*GC*). Moduliert wird die vertikale Signalweitergabe in der OPL durch Horizontalzellen (*HC*) und in der inneren plexiformen Schicht (*IPL*) von den Amakrinzellen (*AC*).

Dendriten in unmittelbarer Nähe zu den Photorezeptoren in der äußeren plexiformen Schicht (*outer plexiform layer: OPL*) haben und mit deren Terminalien Synapsen ausbilden. Dazu zählen die Horizontalzellen und Bipolarzellen. Diese haben ihre Zellkörper in der inneren nukleären Schicht (*inner nuclear layer: INL*, siehe Abb. 1). Netzwerkbedingte Wechselwirkungen zwischen diesen drei Zellklassen finden in der äußeren plexiformen Schicht (*outer plexiform layer: OPL*) statt. Die durch *Gap Junctions* gekoppelten Horizontalzellen haben nicht nur ihre Dendriten in der OPL, sondern auch ihre Axonterminalien (näheres zur Funktion und Anatomie der Horizontalzellen in Kap. 1.3.).

Die Axonterminalien der Bipolarzellen enden dagegen in der inneren plexiformen Schicht (*inner plexiform layer: IPL*) und sind direkt an der vertikalen Signalweiterleitung beteiligt. Das heißt, dass sie das Signal von den Photorezeptoren zu den Ganglienzellen übertragen. Nach neuesten Untersuchungen von Wässle *et al.*, (2009) soll es elf Typen von Zapfen Bipolarzellen und einen Stäbchen-Bipolarzell-Typ geben (vergleiche Abb. 2). Dabei sind aus den ursprünglich von Ghosh *et al.*, (2004) vorgestellten neun Zapfen-Bipolarzell-Typen zwei mehr geworden, indem vom Typ 3 die Subtypen a und b gefunden wurden (Mataruga *et al.*, 2007a) und zwei Subtypen der Typ 5 Bipolarzellen postuliert werden (Wässle *et al.*, 2009). Die Bipolarzell-Typen lassen sich zunächst grob in ON- und OFF-Bipolarzellen einteilen. OFF-Bipolarzellen haben ionotrope Glutamatrezeptoren und zeigen eine Hyperpolarisation auf einen Lichtreiz. ON-Bipolarzellen hingegen besitzen

metabotrope Glutamatrezeptoren und reagieren auf einen Lichtreiz mit einer Depolarisation (Wässle and Boycott, 1991). Während dabei die zehn Zapfen-Bipolarzell-Typen Eingang von den Zapfen bekommen, erhalten die zum ON-Typ gehörenden Stäbchen-Bipolarzellen Eingang von den Stäbchen. Einige OFF-Zapfen-Bipolarzellen besitzen Kontakte zu den Stäbchen (Haverkamp *et al.*, 2008; Mataruga *et al.*, 2007b; Tsukamoto *et al.*, 2001). Neben der physiologischen Dichotomie und der mehr oder weniger getrennten Verschaltung in der OPL unterscheiden sich die Bipolarzellen maßgeblich in der Ebene, in der ihre Axonterminalien stratifizieren. Dabei bilden die ON-Bipolarzellen Synapsen mit den ON-Ganglienzellen in der distal gelegenen ON-Sublamina der IPL aus, während die OFF-Bipolarzellen mit den OFF-Ganglienzellen in der OFF-Sublamina im proximalen Teil der IPL Synapsen formen. Im Gegensatz zu den Zapfen-Bipolarzellen bilden die Stäbchen-Bipolarzellen keine direkten Kontakte mit den Ganglienzellen aus. Stäbchen-Bipolarzellen erregen durch Glutamatfreisetzung eine spezielle Amakrinzellklasse, die All-Amakrinzelle. Diese speisen ihrerseits das Signal sowohl in ON- als auch in OFF-Bipolarzellen des Zapfenwegs ein. Die All-Zelle erregt bei Belichtung die ON-Bipolarzellen des Zapfenwegs über *Gap Junctions* und inhibiert die OFF-Bipolarzellen über die Freisetzung von Glyzin (Famiglietti and Kolb, 1975; Kolb and Famiglietti, 1974; Wässle *et al.*, 1991). Bipolarzellen sind die ersten Neurone entlang der Sehbahn, die zumindest in den poikilothermen Organismen einen Zentrums-Umfeld-Antagonismus zeigen (Ammermüller and Kolb, 1995; Nelson and Kolb, 1983), wie er vor allem in Ganglienzellen zu beobachten ist.

Amakrinzellen haben ihre Zellkörper in der INL und tragen zur horizontalen Informationsverarbeitung in der IPL bei. In der Retina sind anhand von morphologischen Kriterien je nach Spezies zwischen 20 und 30 Amakrinzelltypen beschrieben worden (MacNeil and Masland, 1998; Masland, 2001a). Amakrinzellen werden von Bipolarzellen

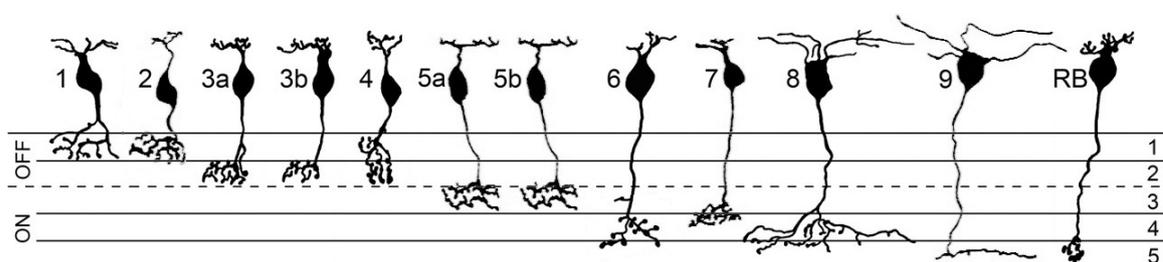


Abbildung 2: Bipolarzellen der Mausretina. In dieser nach (Wässle *et al.*, 2009) veränderten Abbildung sind fünf Typen von Zapfen OFF-Bipolarzelltyp, 6 Zapfen ON-Bipolarzelltypen und ein Stäbchen Bipolarzelltyp skizziert.

erregt und verschalten ihrerseits mit Ganglienzellen, Amakrinzellen und auch reziprok auf Bipolarzellen. 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).

Ganglienzellen sind die Ausgangselemente der Retina. Sie stellen damit das letzte Glied in der Signalverarbeitung der Retina dar. Entlang der Dendritenbäume, die in der IPL verzweigen, bilden sie synaptische Verbindungen mit Bipolarzellen und Amakrinzellen aus. Die Ganglienzellen bilden als erste retinale Zellklasse Aktionspotentiale und übermitteln die Information über lange Axone zum größten Teil in den *Corpus geniculatum laterale* (Vaney *et al.*, 1981) und schließlich in die visuellen Zentren des Gehirns. Ganglienzellen nehmen somit eine zentrale Rolle in der Informationsübertragung ein. Aufgrund ihrer Morphologie und Physiologie lassen sich abhängig von der Spezies zwischen 10 und 15 Typen (Masland, 2001a; b), je nach angewendeten Kriterien auch bis zu 22 Typen (Völgyi *et al.*, 2009) von Ganglienzellen unterscheiden. Sowohl anatomische als auch physiologische Studien zeigen, dass die rezeptiven Felder jedes Ganglienzelltyps die Retina gleichmäßig und vollständig abdecken und somit die parallele Informationsverarbeitung über die gesamte Retina sicherstellen (Gauthier *et al.*, 2009; Wässle *et al.*, 1981). Dabei zeigen sie eine große Diversität, was die Ebene der Stratifizierung als auch die horizontale Ausbreitung angeht. Physiologisch gibt es verschiedene Einteilungen, wie zum Beispiel ON-, OFF- und ON-OFF Ganglienzellen. Daneben wird zwischen tonischen und phasischen Typen unterschieden. Die rezeptiven Felder der Ganglienzellen sind meist konzentrisch organisiert und bestehen aus einem zentralen Teil, dem so genannten Feldzentrum und einem antagonistischen Umfeld. Die horizontale Ausdehnung des Dendritenbaums entspricht häufig in etwa der Größe des rezeptiven Feldzentrums (Peichl and Wässle, 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). Die von (Barlow and Hill, 1963) beschriebenen richtungsselektiven Ganglienzellen zum Beispiel kommen als ON- und ON-OFF Typen vor und reagieren auf Bewegungsreize in einer bevorzugten Richtung.

1.2. *Gap Junctions* in der Retina

Während bei der vertikalen Signalweiterleitung in der Retina vor allem chemische Synapsen benutzt werden, ist die von den *Gap Junctions* vermittelte elektrische Kopplung retinaler Neurone maßgeblich in horizontalen Netzwerken zu finden (Cook and Becker, 1995; Vaney, 1994). Die elektrische Kopplung über *Gap Junctions* wird über Connexine vermittelt. Sechs Connexin-Untereinheiten lagern sich in der Plasmamembran an und bilden einen sogenannten Hemikanal über den benachbarte Zellen einen gemeinsamen Kontakt bilden können, um so einen vollständigen Kanal zu formen. Die so in Verbindung getretenen Zellen koppeln dadurch ihre Zytoplasmen. Der relativ große Innendurchmesser der *Gap Junction* Kanäle von circa 1,2 nm erlaubt nicht nur das Fließen von elektrischem Strom, der maßgeblich von einem K^+ -Ionen-Fluss getragen wird, sondern auch den Austausch von Metaboliten und *Second Messenger* Molekülen. *Gap Junctions* vermitteln also nicht nur die Synchronisation von elektrischer Aktivität, sondern erlauben auch eine metabolische Kopplung sowie eine chemische Kommunikation zwischen Zellen. Sie greifen in die frühe Ontogenese ein (Paul, 1995) und man weist ihnen speziell bei der Entwicklung des Gehirns eine entscheidende Rolle zu (Bennett *et al.*, 1991; Goodenough *et al.*, 1996). Connexine werden von einer Gen-Familie codiert, von denen bis jetzt 20 Connexin-Gene im Genom der Nagetiere und 21 im humanen Genom identifiziert wurden (Sohl and Willecke, 2003; Willecke *et al.*, 2002). Durch unterschiedliche Kombinationen von Connexinen ergeben sich *Gap Junctions*, die verschiedenen Möglichkeiten der Regulierbarkeit, Durchlässigkeit oder Öffnungswahrscheinlichkeit bieten. Mittlerweile gibt es eine Reihe von Mausmodellen, bei denen die entsprechenden Connexin-Gene ausgeschaltet wurden und anhand derer man die Funktion des jeweiligen Connexins untersuchen kann. Dazu gehört Cx36 (Güldenagel *et al.*, 2001), Cx45 (Maxeiner *et al.*, 2005), Cx30.2 (Kreuzberg *et al.*, 2006) und Cx57 (Hombach *et al.*, 2004). In der Retina sind in allen fünf Zellklassen die Zellen durch *Gap Junctions* gekoppelt und exprimieren dabei unterschiedliche Connexine (Söhl *et al.*, 2005). In Abbildung 3 sind die im Folgenden vorgestellten Connexine, die in der Retina Verbindungen zwischen den Zellen herstellen, zur Übersicht kurz skizziert.

Dabei sind bereits auf der Ebene der Photorezeptoren *Gap Junctions* vorhanden (Raviola and Gilula, 1973). Auf der Basis elektronenmikroskopischer Studien sind *Gap Junctions* zwischen Stäbchen und Stäbchen, Zapfen und Zapfen sowie Stäbchen und Zapfen beschrieben (Tsukamoto *et al.*, 2001). Studien in Cx36-defizienten Mäusen zeigen einen Verlust der Kopplung von Stäbchen und Zapfen (Deans *et al.*, 2002; Güldenagel *et al.*, 2001; Weiler *et al.*, 2001). Schließlich wird Cx36 in Zapfen-Endfüßchen nachgewiesen (Feigenspan *et al.*, 2004). Das *Gap Junction* bildende Connexin in den Zapfen ist also Cx36,

welches sowohl für die homologe Kopplung sorgt als auch für die heterologe Kopplung der Zapfen mit den Stäbchen. Welches Connexin allerdings die ebenfalls homolog gekoppelten Stäbchen exprimieren ist noch unbekannt (Hornstein *et al.*, 2005; Tsukamoto *et al.*, 2001). Untersuchungen in dieser Richtung konnten weder einen Kandidaten aus dem Fundus der Connexine ermitteln noch aus der Gruppe der ebenfalls kanalbildenden Pannexine (Bolte *et al.*, 2008). Dabei scheint die Kopplung der Zapfen vor allem der Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses zu dienen, wobei das Bild der Retina dadurch nur in einem sehr geringen Umfang unscharf wird, obwohl sich durch die Kopplung die räumliche Auflösung verschlechtert (DeVries *et al.*, 2002). Die Kopplung von Zapfen und Stäbchen ermöglicht einen weiteren Zapfen-Signalweg (Bloomfield and Dacheux, 2001), der eine Alternative zu dem oben beschriebenen Weg über die All-Amakrinzelle darstellt. Dagegen bewirkt die Kopplung der Stäbchen untereinander bei schwachen Lichtverhältnissen eine Vereinigung der Signale und ermöglicht damit die Wahrnehmung schwach beleuchteter Objekte (Tsukamoto *et al.*, 2001).

Während die gerade beschriebenen Photorezeptoren relativ kleine Netzwerke bilden, formen die Horizontalzellen als Sekundärneurone ein extensives und großes Netzwerk. Dieses wird ausführlich im nächsten Kapitel 1.3. beschrieben.

Die ebenfalls zu den Photorezeptoren sekundären Bipolarzellen exprimieren je nach Typ unterschiedliche Connexine. OFF-Bipolarzellen sind über Cx36 miteinander gekoppelt (Feigenspan *et al.*, 2004). Dabei ließ sich auch nachweisen, dass die elektrischen Synapsen in unmittelbarer Nähe zu den glutamatergen Synapsen liegen und sich damit gegenseitig beeinflussen könnten. Die Wechselwirkung der Kopplungsdynamik mit der Transmitterfreisetzung kann somit zu Verbesserung der Signalweiterleitung führen. Daneben exprimieren OFF-Bipolarzellen auch Cx45 (Maxeiner *et al.*, 2005). Hier zeigt sich eine Lokalisation von Cx45 sowohl in der OPL als auch in der IPL (Hilgen *et al.*, 2009). Mit welchen Zelltypen die OFF-Bipolarzellen über Cx45 koppeln ist noch unklar.

Die ON-Bipolarzellen exprimieren ebenfalls Cx36 und Cx45 (Dedek *et al.*, 2006; Maxeiner *et al.*, 2005). Dabei sind diese beiden Connexine maßgeblich in der IPL zu finden und sind auf Seiten der ON-Bipolarzellen an der Kopplung zu den All-Amakrinzellen beteiligt. Welche Typen von ON-Bipolarzellen Cx36, Cx45 oder beide besitzen ist noch in der Diskussion (Han and Massey, 2005; Li *et al.*, 2008b). Die Kopplung der ON-Bipolarzellen untereinander oder mit anderen Amakrin- oder Ganglienzellen ist auch denkbar. Die maßgebliche Funktion der Connexine in den ON-Bipolarzellen scheint die Kopplung

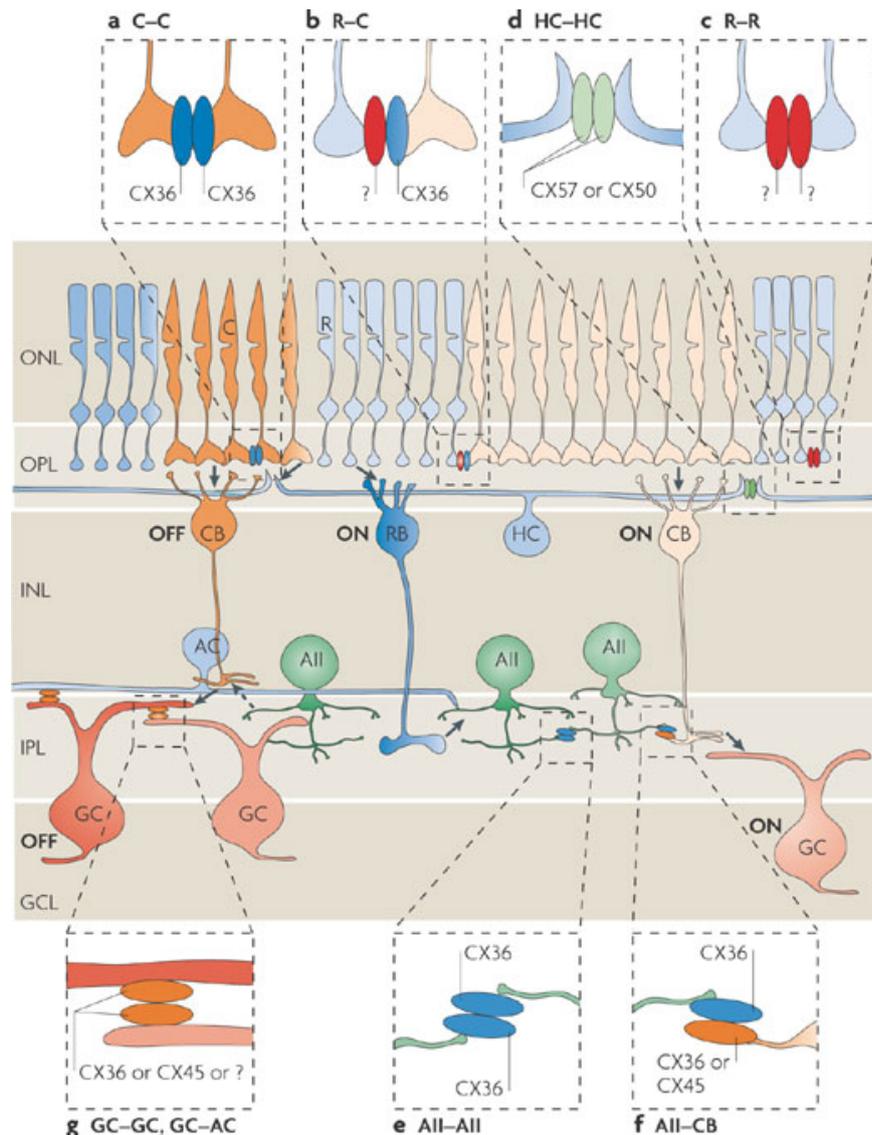


Abbildung 3: Gap Junctions in der Retina. In diesem Schema aus (Bloomfield and Volgyi, 2009) sind sieben wesentliche Beispiele für die Kopplung retinaler Neurone aufgeführt. (a) Ausschnitt in dem gezeigt wird, dass die homologe Kopplung der Zapfen über Cx36 vermittelt wird (Deans *et al.*, 2002; Feigenspan *et al.*, 2004). (b) Zapfen zeigen Cx36-Hemikanäle, die mit bisher unbekanntem Connexonen der Stäbchen verbunden sind (Feigenspan *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003; Volgyi *et al.*, 2004). (c) Die Connexine dieser Gap Junction zwischen den Stäbchen sind bisher unbekannt. (d) A-Typ Horizontalzellen koppeln in Mammalia durch Cx50 (O'Brien *et al.*, 2006). B-Typ Horizontalzellen sind durch Cx57 gekoppelt (Hombach *et al.*, 2004; Shelley *et al.*, 2006). (e) Zwei AII-Amakrinzellen sind durch Cx36 verbunden (Feigenspan *et al.*, 2001). (f) AII-Amakrinzellen sind über Cx36 mit Zapfen Bipolarzellen verbunden, die wiederum abhängig vom Typ Hemikanäle aus Cx36, Cx45 oder beiden besitzen. (Dedek *et al.*, 2006; Feigenspan *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2008b; Lin *et al.*, 2005; Maxeiner *et al.*, 2005). (g) Bisher gibt es Ergebnisse, die zeigen, dass alpha Ganglienzellen über Cx36 (Schubert *et al.*, 2005a) und bestimmte bistratifizierende Ganglienzellen über Cx45 gekoppelt sind (Schubert *et al.*, 2005b). ONL: äußere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere nukleäre Schicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht.

mit den All-Amakrinzellen zu sein. Dadurch lässt sich das Signal der Zapfen-Bipolarzellen über die All-Amakrinzelle in den Zapfen ON-*Pathway* schleusen.

Die Amakrinzellen als heterogenste Gruppe retinaler Neurone bilden eine Reihe von unterschiedlichen Netzwerken. Am prominentesten ist die glycinerge *smallfield* All Amakrinzelle (Pourcho and Goebel, 1985), die an den schon zuvor beschriebenen Stäbchensignalweg beteiligt ist und über *Gap Junctions* mit den ON-Bipolarzellen gekoppelt ist. Allerdings ist diese Verbindung bidirektional, das heißt, dass es nicht nur eine Signalübertragung zu den Bipolarzellen beim Nachtsehen gibt. Bei Tageslicht wird die Erregung von den Bipolarzellen auf die All Amakrinzellen übertragen, die ihrerseits inhibitorische Effekte auf Ganglienzellen haben (Münch *et al.*, 2009; Van Wyk *et al.*, 2009). Über Cx36 ist diese Amakrinzelle zudem homolog gekoppelt und bildet ein großes Netzwerk aus. Dieses Netzwerk verändert sich dynamisch mit der allgemeinen Hintergrundbeleuchtung und wird über verschiedene intrazelluläre Signalwege reguliert (Bloomfield and Volgyi, 2009). Andere Amakrinzellen exprimieren Cx45 und koppeln untereinander. Dazu zählen Amakrinzellen, die den serotoninergen Amakrinzellen S1 und S2 der Kaninchenretina ähneln (Li *et al.*, 2002; Pérez de Sevilla Müller, 2008) und eine Klasse interplexiformer Amakrinzellen (Dedek *et al.*, 2009). Zudem zeigen Amakrinzellen in der INL eine Expression von Cx30.2, einem in der Retina relativ neu entdeckten Connexin (Pérez de Sevilla Müller *et al.*, 2008).

Die bei den Amakrinzellen identifizierten Connexine Cx30.2, Cx36 und Cx45 kommen auch in den Ganglienzellen vor. Alpha Ganglienzellen sind über Cx36 miteinander gekoppelt (Schubert *et al.*, 2005a), während bistratifizierende Ganglienzellen Cx45 exprimieren und darüber ein Netzwerk bilden (Schubert *et al.*, 2005b). Es wird diskutiert, dass die Kopplung über Cx45 an dieser Stelle funktionell eine besondere Bedeutung hat. Da dieses Connexin schon bei geringen Spannungsunterschieden der gekoppelten Zellen schließt, sind genau nur die Zellen synchron, die auf gleiche, in diesem Fall richtungsselektive, Stimuli spezialisiert sind.

Bestimmte Cx30.2 exprimierende Ganglienzellen koppeln mit Amakrinzellen. Dabei sind diese Amakrinzellen möglicherweise nicht positiv für Cx30.2. Zu dem konnte gezeigt werden, dass sie weder Cx36, Cx40 noch Cx45 exprimieren, in dem man bei Tracer Experimenten mit den entsprechenden KO Mäusen keinen Verlust der Kopplung dieser Zelltypen beobachten konnte. Welches Connexin diese Amakrinzellen demnach benutzen, um mit diesen Ganglienzellen zu koppeln und welche Funktion diese Kopplung hat, ist bisher ungeklärt (Pérez de Sevilla Müller *et al.*, 2007).

1.3. Funktion des Horizontalzellnetzwerks

Die Horizontalzellen in der Retina bilden ein eigenes Netzwerk. Sie sammeln Informationen über eine große Fläche der Retina und können so die Lichtantworten der Photorezeptoren und Bipolarzellen über einen weiten Bereich der Retina beeinflussen. Horizontalzellen sind postsynaptisch zu den Photorezeptoren und modulieren die Signalweiterleitung von Photorezeptoren zu Bipolarzellen. Sie sind über *Gap Junctions* miteinander gekoppelt (Vaney, 1994). Das kanalbildende Connexin, das die Horizontalzellen verbindet, ist Cx57 (Hombach *et al.*, 2004). Dies konnte in einer Mauslinie gezeigt werden, in der die kodierende Region des Cx57 durch ein lacZ Reporter gen ersetzt wurde. Durch die Expression des Reporter gens an Stelle des Cx57 konnte gezeigt werden, dass dieses Connexin in der Retina ausschließlich in Horizontalzellen vorkommt. Darüber hinaus belegen Tracer-Experimente, dass in Cx57-defizienten Mäusen (Cx57^{lacZ/lacZ}) die Kopplung signifikant reduziert ist (Hombach *et al.*, 2004). In der Mausretina gibt es nur einen Typ von Horizontalzellen, der als B-Typ bezeichnet wird und ein langes Axon (bis zu 230 µm) mit einer großen Axonendigung hat (Suzuki and Pinto, 1986). Die Dendriten, die um das Soma verteilt sind, kontaktieren die Zapfen und das Axonterminal-Geflecht die Stäbchen (Pan and Massey, 2007). Da die beiden Systeme größtenteils unabhängig voneinander sind, agieren die Terminalien funktionell als Stäbchen-Horizontalzellen und die Somata mit den Dendriten als Zapfen-Horizontalzellen. Beide Kompartimente bilden unabhängige Netzwerke aus (Vaney, 1993), welche zur Kopplung jeweils Cx57 verwenden (Janssen-Bienhold *et al.*, 2009b). Andere Säugetiere haben meist zwei Typen von Horizontalzellen. In der Kanincheretina kommt neben dem B-Typ, der wie in der Maus Cx57 hat, auch der A-Typ vor, der kein Axon besitzt und Kanäle aus Cx50 formt (O'Brien *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2007).

Die Kopplung der Horizontalzellen wird vom Umgebungslicht moduliert: Bei sehr schwachem und starkem Licht ist die Kopplung reduziert, während bei mittleren Helligkeiten die Kopplung maximal ist (Xin and Bloomfield, 1999b; vergleiche Abb. 4). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass durch endogene Freisetzung bzw. durch eine Applikation von Dopamin die Horizontalzell-Kopplung reduziert wird. Die Aktivierung der D1-Rezeptoren führt zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Das führt zu einer Phosphorylierung der Connexine durch Proteinkinase A und einem Schließen der Kanäle (He *et al.*, 2000; Piccolino *et al.*, 1984). Ein weiterer Weg zur Modulation von *Gap Junctions* führt über Stickstoffmonoxid, welches die lösliche Guanylatcyclase aktiviert und damit zu einer Erhöhung der cGMP Konzentration beiträgt, die schließlich zu einer verringerten Leitfähigkeit der Kanäle führt (Lu and McMahon, 1997; Pottek *et al.*, 1997; Xin and Bloomfield, 1999a). Ein anderer Neuromodulator in dieser Hinsicht ist die



Abbildung 4: Die Kopplung der Horizontalzellen ist Abhängig von der Intensität des Hintergrundlichts. Bei nahezu absoluter Dunkelheit, symbolisiert durch die Küstenlandschaft bei Nacht, zeigen die Horizontalzellen eine geringe Kopplung. Dies wird in dem Bild links unten symbolisiert. Eine unter diesen Lichtverhältnissen mit einem *Tracer*-Farbstoff gefüllte Horizontalzelle, angezeigt durch den Pfeilkopf, weist eine Durchlässigkeit ihrer *Gap Junctions* für diesen Farbstoff auf. Durch diese Zell-Zell-Verbindung dringt der Farbstoff in die unmittelbar benachbarten Horizontalzellen ein. Unter mesopischen Lichtverhältnissen, veranschaulicht durch das mittlere Bild bei Dämmerung, erhöht sich die Durchlässigkeit der *Gap Junctions* zwischen den Horizontalzellen. Ein injizierter *Tracer*-Farbstoff breitet sich so weit im Horizontalzellennetzwerk aus (siehe mittleres Bild unten). Bei steigender Lichtintensität sinkt die Durchlässigkeit der *Gap Junctions* wieder und das *Tracer Coupling* nimmt ab. (Illustration nach der Idee von (Bloomfield and Volgyi, 2004), untere Reihe: veränderte Aufnahmen aus (Xin and Bloomfield, 1999b).

Retinsäure, die als Nebenprodukt der Lichtreaktion in den Photorezeptoren anfällt. Das all-trans Isomer der Retinsäure vermag die *Gap Junctions* der Horizontalzellen ebenfalls zu schließen (Potték and Weiler, 2000; Weiler *et al.*, 1998).

Photorezeptoren haben eine sehr kleine räumliche Ausdehnung und reagieren dementsprechend auf lokale Kontraste unabhängig von der globalen Umgebungshelligkeit. Im Gegensatz dazu können Horizontalzellen durch ihre großen rezeptiven Felder, die zusätzlich durch die Kopplung über *Gap Junctions* an Ausmaß gewinnen, so etwas wie eine mittlere Helligkeit ermitteln. Die Bipolarzellen übertragen dann ein Signal, dass eine Differenz aus der lokalen Photorezeptorantwort und der Antwort der großflächigen Horizontalzellen widerspiegelt. Es gibt Modelle, in denen diese Verschaltung und Verrechnung in der äußeren Retina erfolgreich moduliert werden kann (Zaghloul and Boahen, 2004). Hierfür bedarf es eines negativen Signals der

Horizontalzellen. Dieses könnte über einen negativen Feedback zu den Zapfen und Stäbchen geschehen (Thoreson *et al.*, 2008; Vessey *et al.*, 2005). Es gibt auch Anzeichen dafür, dass die Horizontalzellen GABA vesikulär (Hirano *et al.*, 2005) oder über einen Transporter freisetzen (Schwartz, 2002) und so einen inhibitorischen *Feedback* oder eventuell auch eine *Feedforward* Inhibition auf die Bipolarzellen machen (Zhang and Wu, 2009).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

In der Doktorarbeit von Jennifer Trümpler wurden die rezeptiven Felder von Horizontalzellen in Cx57-defizienten Mäusen untersucht (Shelley *et al.*, 2006; Trümpler, 2007). Dazu wurden mit Hilfe intrazellulärer Ableitungen Lichtantworten von Horizontalzellen gemessen. Die rezeptiven Felder der Horizontalzellen wurden ermittelt, um den Zusammenhang zwischen Cx57 *Gap Junctions* und den großen rezeptiven Feldern der Horizontalzellen zu untersuchen. Daneben wurde zum Vergleich der Einfluss von Dopamin auf die Horizontalzellkopplung gemessen. Ein wesentliches Ergebnis dieser Studie war, dass die rezeptiven Felder der Cx57-defizienten Horizontalzellen stark reduziert waren, die Horizontalzellen von Cx57 heterozygoten Mäusen zeigten dagegen kleinere rezeptive Felder als im Wildtyp, aber größere als in den *Knockout*-Tieren. Dopamin reduziert die rezeptiven Felder in Wildtyp-Mäusen und hat keinen Einfluss auf die Lichtantworten im Cx57-*Knockout*. Zusätzlich zeigen die Horizontalzellen einen geringeren Eingangswiderstand und ihr Ruhemembranpotential im Dunkeln ist stärker depolarisiert. *Patch-Clamp* Ableitungen von isolierten Horizontalzellen bestätigten einen um 27% geringeren Eingangswiderstand gegenüber Horizontalzellen von Wildtyp-Mäusen (Shelley *et al.*, 2006).

Diese Maus eignet sich besonders, um den Einfluss der Kopplung der Horizontalzellen auf die nachgeschalteten Neurone zu untersuchen. Im Fokus stehen hier die Bipolarzellen, die zumindest in poikilothermen Organismen schon einen deutlichen Zentrums-Umfeld-Antagonismus zeigen (Ammermüller and Kolb, 1995; Nelson and Kolb, 1983). Dies bedeutet, dass die Bipolarzellen ein Zentrum besitzen, in dem sie direkte Eingänge von Photorezeptoren erhalten. Die Photorezeptoren in der unmittelbaren Nachbarschaft dazu kontaktieren Horizontalzellen, die einen wesentlich größeren Bereich von Photorezeptoren aus dem Umfeld dieser Bipolarzelle abdecken und so ein inhibierendes Umfeld bilden können. Die zentrale Frage in dieser Studie ist, welchen Einfluss die Kopplung der Horizontalzellen auf dieses inhibierende Umfeld und dadurch die rezeptiven Felder der nachgeschalteten Bipolarzellen hat und ob diese beschriebene Inhibition durch

das Umfeld tatsächlich von den Horizontalzellen und nicht ausschließlich von den Amakrinzellen generiert wird. Durch die zusätzlich erhöhte Depolarisation der Horizontalzellen in den Cx57-defizienten Mäusen ist die Neurotransmitterfreisetzung möglicherweise zusätzlich erhöht. Es ist also denkbar, dass der inhibitorische Einfluss der Horizontalzellen auf die Bipolarzellen in diesen Tieren auch unabhängig von der fehlenden Kopplung verändert ist.

Um die zentrale Frage zu beantworten, wurden Lichtantworten von Bipolarzellen in akuten Retinaquerschnitten gemessen und durch Separation der inhibitorischen und exzitatorischen Komponente die verschiedenen Eingänge untersucht.

Zunächst war aber zu klären, was die Ursache für die veränderten Eigenschaften der isolierten Horizontalzellen aus Cx57-defizienten Mäusen ist. Da diese unabhängig vom Netzwerk in der intakten Retina gemessen wurden, wäre es möglich, dass der veränderte Eingangswiderstand durch eine veränderte Ionenkanal-Zusammensetzung hervorgerufen wird. Um dies zu untersuchen wurden zunächst die *Patch-Clamp* Ableitungen aus der vorhergehenden Studie reproduziert und anschließend nach Veränderungen der Membran-Eigenschaften durch eine systematische Analyse der Horizontalzellströme untersucht. Neben verschiedenen elektrischen Stimulationen wurden auch Reaktionen auf eine Applikation von Glutamat untersucht. Diese imitieren in gewisser Weise die Lichtreaktionen, in diesem Fall eher ein Signal „Licht aus“, welches mit einer Glutamatfreisetzung auf die Horizontalzellen einhergeht. Zusätzlich wurden immunhistologische Studien durchgeführt, um zu vergleichen, ob durch den im Cx57-*Knockout* verschiedene Membranproteine in den Horizontalzellen herauf oder herunter reguliert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Puffer, Lösungen und Medien

Die verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in destilliertem Wasser angesetzt.

DMEM [Dulbecco's MEM (siehe (Dulbecco and Freeman, 1959)): 10 ml 10x DMEM (Biochrom); 2,7 ml Natriumbicarbonat (7,5 %ig); 1 ml Antibiotika (Penicillin/Streptomycin; Biochrom AG, Berlin); 2 ml Glutamin (200 mM); 1 ml HEPES (100 mM) auf 83,3 ml Zellkulturwasser.

Ames: Ames Medium [Sigma, (siehe (Ames and Nesbett, 1981)); 22,6 mM NaHCO₃; begast mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂).

DMEM/FCS/DNase I: 25,6 ml 1x DMEM; 2,8 ml FCS (Sigma); 100 U/ml DNase I (Sigma, Typ IV).

Lösung A: Hanks' gepufferte Salzlösung (HBSS; Sigma) ohne Calcium und Magnesium, versetzt mit 0,1 mM EDTA; 1 mM HEPES und 1 ml Antibiotika (Penicillin/Streptomycin; Biochrom AG, Berlin) pro 100 ml Lösung.

Papainlösung: 20 U/ml Papain (Worthington Biochemical, Freehold, NJ); 1 mM Cystein (Sigma) in Lösung A.

Can A Lösung: 1 mg/ml Concanavalin A Typ V (Sigma) in PBS (1 M).

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 7,4 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,4.

Extrazellulärlösung: 137 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 5 mM HEPES; 10 mM Glucose; pH 7,4.

Intrazellulärlösung 1 (Bipolarzellen): 118 mM CH₃CsO₃S; 12 mM CsCl; 5 mM EGTA; 0,5 mM CaCl₂; 2,4 mM ATP; 0,3 mM GTP; 10 mM Tris; 0,8 mM Lucifer Yellow; pH 7,2 (CsCl).

Intrazellulärlösung 2 (Horizontalzellen): 140 mM KCl; 1 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; 11 mM EGTA; 10 mM HEPES; pH 7,2.

Intrazellulärlösung 3 (Horizontalzellen): 125 mM K-gluconat; 10 mM KCl; 0,5 EGTA; 10 mM Hepes (pH 7.2).

Glutamat Lösung: 1 mM Glutamat (Sigma) in Extrazellulärlösung

Paraformaldehyd-Lösung: 2 % Paraformaldehyd, 3 % Saccharose in PBS

2.2. Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden verschiedene Mauslinien von *Mus Musculus* verwendet. Bei den verwendeten Wildtyp-Mäusen handelte es sich um den Stamm C57BL/6 (The Jackson Laboratory, Maine, USA). Die verwendeten Cx57-*Knockout*-Mäuse stammten aus dem Genetischen Institut der Universität Bonn. Durch homologe Rekombination wurde die kodierende Region des Cx57 durch das lacZ-Reportergen ausgetauscht und in embryonalen Stammzellen der Maus eingebracht. Diese Zellen wurden dann in C57BL/6-Blastozysten injiziert. Nach Austragen des Nachwuchses wurden die Cx57-defizienten Tiere für die Zucht weiterverwendet (Hombach *et al.*, 2004). Aufgrund der noch vorhandenen Fertilität konnte die Zucht der Tiere in unserem Labor aufrechterhalten werden. Durch Entnahme von Schwanz-Biopsien wurde regelmäßig der Genotyp kontrolliert. Die Mäuse wurden nach den Rechtsvorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) gehalten und vor den Versuchen ordnungsgemäß getötet. Die Mäuse wurden unter Einhaltung eines 12 Stunden Tag-Nacht Rhythmus gehalten.

2.3. Patch-Clamp Messungen an isolierten Horizontalzellen

Für die Analyse der Horizontalzellen wurden diese zunächst isoliert. Mit Hilfe von *Patch-Clamp* Ableitungen wurden dann die Zellen bei verschiedenen Haltepotentialen geklemmt und die resultierenden Ströme gemessen. Über eine spezielle Apparatur zu Applikation von Lösungen konnte zudem der Einfluss von Glutamat ermittelt werden.

2.3.1. Dissoziation der Horizontalzellen

Die Zellen der Mausretina wurden, wie im Folgenden beschrieben, dissoziiert. Die Auswahl der Horizontalzellen erfolgte dann unmittelbar vor den Messungen visuell unter dem Mikroskop.

Zunächst wurden unter einem Binokular zwei Retinae aus den Augenbechern entnommen, die zuvor von einer getöteten sechs bis acht Wochen alten Maus mit einer Schere abgetrennt wurden. Die vom Glaskörper mit einer Pinzette befreite Retina wurde dann für zehn Minuten bei 37°C in Lösung A präinkubiert. Im gleichen Zeitraum wurde die Papainlösung bei 37°C aktiviert. Im Anschluss daran wurde die Retina in der Papainlösung für 45 Minuten unter regelmäßigen Schwenken inkubiert. Die Enzymreaktion wurde dann durch Austausch der Papainlösung gegen DMEM/FCS/DNase I Lösung gestoppt. Nach fünf Minuten bei 37°C wurde die Retina bei 8.000 Upm abzentrifugiert und die DMEM/FCS/DNase I Lösung abgenommen und durch eine 37°C warme Bikarbonat gepufferte und mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) begaste DMEM-Lösung ersetzt und darin gewaschen. Nach Entfernen des DMEM zum Waschen wurde die Retina in 1 ml DMEM aufgenommen. Mit Hilfe einer feuerpolierten Pasteurpipette wurde dann die Retina zunächst leicht trituriert, um kleine Retinastücke zu erhalten. Die zu großen Teilen aus Photorezeptoren bestehende Zellsuspension im Überstand wurde verworfen. Die Retinastücke wurden anschließend erneut in 1 ml DMEM aufgenommen und nun mit einer englumigen Pasteurpipette trituriert. Dieser Schritt wurde drei Mal wiederholt, wobei jedes Mal der Überstand abgenommen und schließlich vereinigt wurde. Jeweils 450 µl Zellsuspension wurde dann auf ein mit Concanavalin A beschichtetes Deckglaschen in einer 24-Well-Platte ausgesät. Zum Absetzen der Zellen wurden diese in einem Inkubator mit Gaskonzentrationen von 5 % CO₂ und 55 % O₂ bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Deckglaschen kamen dann in eine Messkammer und wurden mit Standard-Ringer beschichtet.

2.3.2. Versuchsaufbau

Die Badkammer, in der sich auf einem Deckglaschen die isolierten Zellen der Retina befanden, wurde auf dem Objektivtisch befestigt (siehe Abb. 5). Der Objektivtisch (Luigs und Neumann, Ratingen) ist zwar in X-Y-Z Richtung verstellbar, dieser wurde aber, nachdem man eine Zelle ausgesucht hat, festgestellt. Das Objektiv wurde dann zur Fokussierung in der Höhe verstellt. Das verwendete Leica DM LFS Mikroskop (Wetzlar) besaß zudem noch einen Aufsatz für eine CCD Kamera. Die hier verwendete Hamamatsu

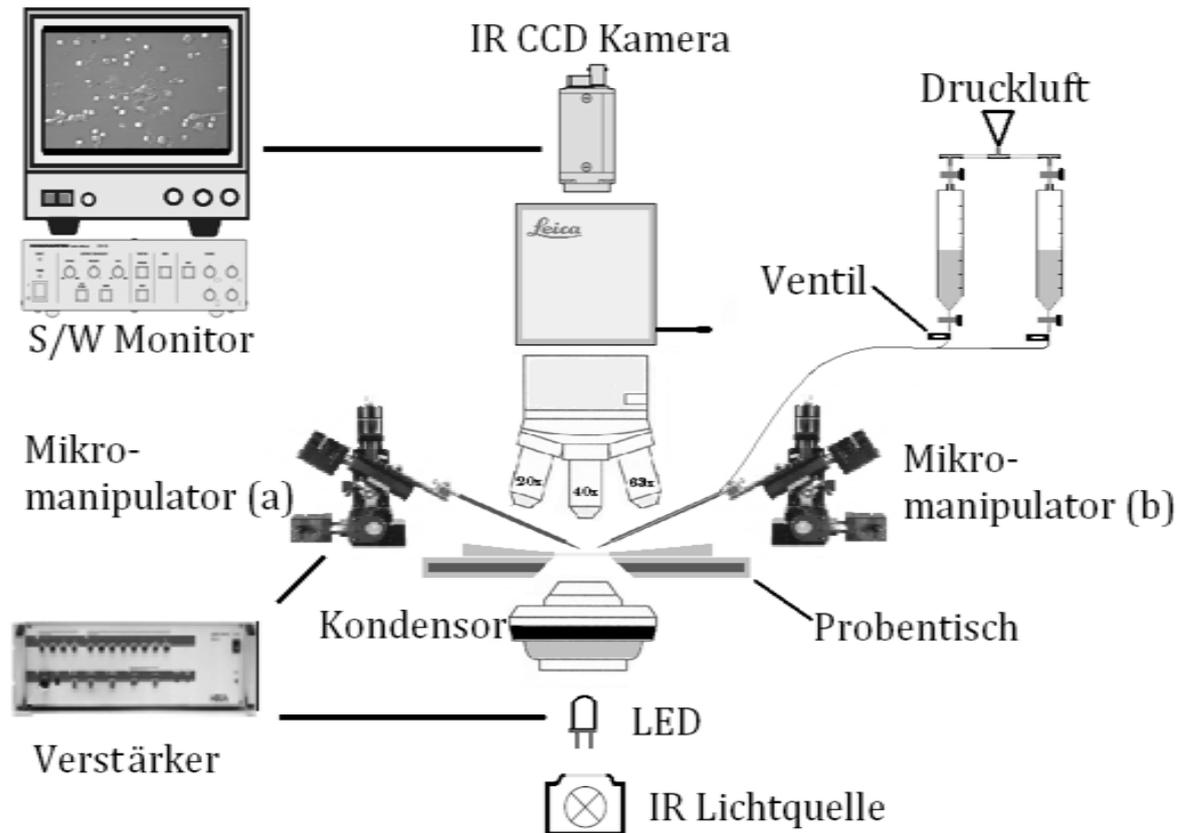


Abbildung 5: Versuchsaufbau. In der Badkammer auf dem Probentisch befindet sich das Präparat. Der Verstärker regelt im Allgemeinen die Spannung der Patch-Elektrode am Mikromanipulator (a) und misst den über die Zellmembran der gepatchten Zelle fließenden Strom. Visuell wird das Ganze über einen Schwarz/Weiß Monitor verfolgt, auf dem das Signal der Infrarot-Kamera erscheint. Diese nimmt das Durchlichtbild auf, welches im Fokus des Wasser-Immersion-Objektivs (hier 40x) liegt. Über den Kondensator wird das Licht der IR gefilterten Quecksilberdampfampe auf das Präparat zur besseren Ausleuchtung zentriert. Die schwenkbare LED wurde für die Lichtstimulation der Retinaquerschnitte mit Hilfe des Verstärkers geregelt. Durch einen Mikroschlauch, der über den Mikromanipulator (b) in die Nähe der zu messenden Zelle gebracht wird, können dann die gewünschten Lösungen appliziert werden. Dazu werden die Ventile, über den Verstärker gesteuert, kurz geöffnet und die Lösung aus den unter Druck stehenden Spritzen schießt kurzzeitig über die Zelle.

C4505 Infrarot CCD Kamera übertrug dann das Signal mit Hilfe eines Hamamatsu Video Controllers C2741 auf einen Schwarz/Weiß-Video-Monitor. Über diesen konnten dann Horizontalzellen identifiziert und gepatcht werden. Dabei wurden die mit Intrazellulärlösung gefüllten Patch-Pipetten auf eine Halterung am Mikromanipulator (Luigs und Neumann, Ratingen) geschoben, so dass ein chlorierte Silberdraht (Ag/AgCl), der mit dem Vorverstärker am Mikromanipulator verbunden war, mit der Lösung innerhalb der Pipette in Kontakt kam. Nach Eintauchen der Elektrode in die Ringerlösung wurde über einen weiteren chlorierten Silberdraht als Referenz, die in die Ringerlösung getaucht wurde, der Stromkreis geschlossen. Die Patch-Elektroden wurden stets frisch

mit Hilfe eines Elektrodenziehgerätes hergestellt (P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter Instrument Company, Novato, CA). Dazu wurden Glaskapillaren mit einem Innendurchmesser von 1,05 mm und einer Wandstärke von 0,225 mm (Hilgenberg, Malsfeld) verwendet. Die fertigen Mikropipetten, die als Elektroden verwendet wurden, hatten bei Verwendung der beschriebenen Lösungen einen Widerstand von fünf bis sieben M Ω . Damit die Zellen in der Ableitkammer ständig mit frischem Carbogen begastem Standard-Ringer umspült wurden, befand sich noch eine Peristaltikpumpe Minipuls 2 (Gilson, Paris) zwecks kontinuierlicher Perfusion am Setup.

Für die Versuche zur Glutamat-Antwort der Zellen wurde ein Applikationssystem aufgebaut. Mit einem Druckminderer (Adolf Würth GmbH & Co. KG, Künzelsau-Gaisbach) wurde die Labor-Druckluft gefiltert und auf 2 bar heruntergeregelt. Über ein *Pneumatic Drug Ejection System* PEDES 02T (npi electronic GmbH, Tamm) konnte der Druck eingestellt werden und die Druckluft zeitgenau (im Millisekundenbereich) über den Patch-Clamp Verstärker EPC 9 (HEKA Elektronik, Lambrecht) angesteuert werden. Das Drucksystem übertrug dann die Druckluft auf zwei 5 ml Spritzen, die die gewünschten Lösungen enthielten. Durch zusätzliche Mikrosol-Ventile (Fluid Automation Systems GmbH, Fellbach), die vom Patch-Clamp Verstärker gesteuert wurden, konnte dann der Lösungsstrom exakt geregelt werden. Über einen kurzen Schlauch, der mit dem in Abb. 5 gezeigten Mikromanipulator (b) über die zu messende Zelle positioniert wurde, konnte dann die Lösung appliziert werden. Der verwendete Druck betrug 1 bar und die Öffnung des Schlauches maß 0,5 mm. Das ganze System befand sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Newport Corporation, Irvine, CA) innerhalb eines Faradayschen Käfigs. Über einen Computer wurde mit dem Programm Pulse (HEKA Elektronik, Lambrecht) der Verstärker angesteuert und die Daten aufgezeichnet. Die Mikromanipulatoren wurden über ein Steuergerät LN SM1 (Luigs und Neumann, Ratingen) geregelt.

2.3.3. Patch-Clamp-Messungen

An dem oben beschriebenen Setup wurden die Messungen der Horizontalzellen durchgeführt, die nach morphologischen Kriterien leicht identifizierbar waren. Es ließen sich, nach der enzymatischen und mechanischen Dissoziation, alle Zellklassen gut unter dem Mikroskop unterscheiden (siehe Abb. 6). Aufgrund des sehr dünnen Axons der Horizontalzellen waren die Axonendigungen in allen beobachteten Proben vom Soma abgetrennt. Beide Kompartimente lagen also getrennt vor. Da in dieser Arbeit lediglich von den Somata abgeleitet wurde, werden diese im Folgenden der Einfachheit halber nur noch als Horizontalzellen bezeichnet. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde die feine Spitze der Glaselektrode an die Zelle gefahren. Dann wurde ein leichter Überdruck erzeugt, der dazu führt, dass Intrazellulärflüssigkeit aus der Elektrode fließt. Das Erreichen der Zelle konnte dann visuell als eine kleine Einbuchtung in der Zelle durch den Lösungsstrom verfolgt werden. Parallel wurde der Widerstand an der Elektrode akustisch von der *Patch-Clamp* Software über Lautsprecher wiedergegeben. Mit Berühren der Zelle und steigendem Widerstand stieg die Tonhöhe. Durch Erzeugen eines Unterdrucks konnte man dann die Zellmembran ansaugen und so einen sogenannten *Gigaseal* erzeugen. Wenn nun ein kurzer starker Unterdruck aufgebaut wurde, riss die Zellmembran auf, so dass man einen direkten Zugang zum Zytoplasma der Zelle hatte. Softwareseitig wurden die kapazitiven Ströme und das *Liquid Junction* Potential kompensiert. Sofern die Ableitung gut war, konnte man davon ausgehen, dass die Ströme, die gemessen wurden diejenigen sind, die über die Membran fließen. Man konnte also direkt auf den Membranwiderstand schließen. Aufgezeichnet wurden die Daten mit einer Rate von 50 kHz. Wegen der längeren Aufzeichnung der Ableitungen wurde zwecks Datenreduktion bei den Messungen der Glutamat-induzierten Ströme mit einer Rate von 2 kHz aufgezeichnet. Um die Eigenschaften der Membran zu untersuchen wurden folgende Spannungs- und Strom-Protokolle ausgeführt. Dabei lag das Haltepotential stets bei -60 mV:

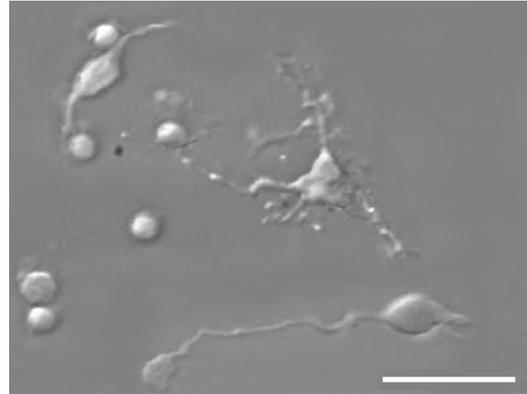
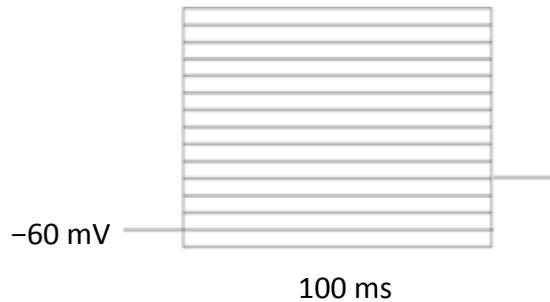
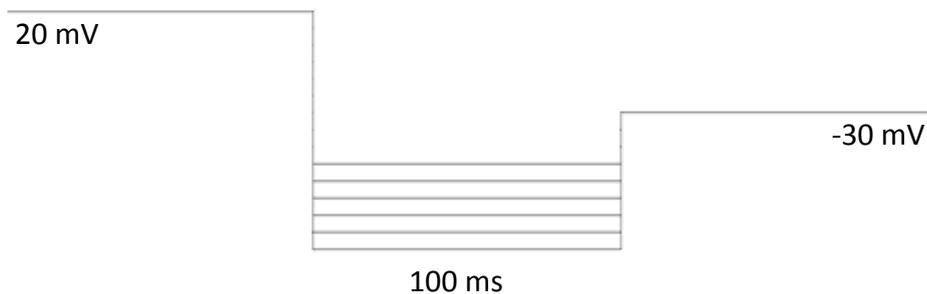


Abbildung 6: Dissoziierte Zellen unter dem Mikroskop. Rechts oben ist eine Horizontalzelle und unten eine Bipolarzelle. Maßstab: 20 μ m.

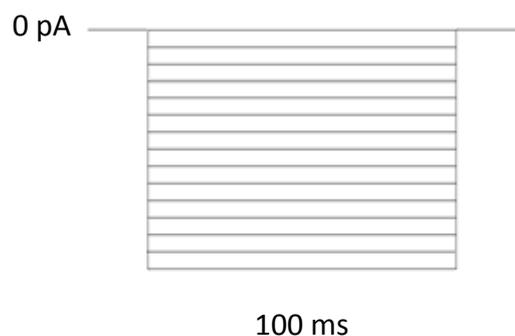
„IV“ Protokoll: Um die Ströme zu messen, die durch eine Depolarisation ausgelöst werden, wurde vom Haltepotential (-60 mV) für je 100 ms auf die Messspannung von -70 mV gesprungen. Diese wurde dann in jedem weiteren Durchgang um je 10 mV erhöht, so dass am Ende bei $+70\text{ mV}$ Messspannung der Strom gemessen wurde. Zwischen jedem Durchgang wurde zwei Sekunden nicht gereizt:



„Hyper“ Protokoll: Das Haltepotential wurde für 100 ms auf 20 mV erhöht und anschließend für je 100 ms auf die Messspannung von -60 mV herabgesetzt. Die Messspannung wurde dann pro Durchgang um 10 mV verringert, bis schließlich der letzte Wert -110 mV betrug. Danach wurde das Haltepotential für 100 ms auf -30 mV gehalten. Zwischen jedem Durchgang wurde zwei Sekunden gewartet:



„Input“ Protokoll: Hierfür wurde im *Current-Clamp* Modus gemessen. Das heißt, dass der Verstärker den Strom vorgab und die resultierende Spannung an der Membran maß. Bei diesem Protokoll war der vorgegebene Strom bei 0 pA . Für 100 ms wurde dieser dann um jeweils 10 pA abgesenkt, bis er schließlich nach dem 13. Durchgang bei -120 pA lag.



Die Protokolle für die Glutamat-induzierten Ströme waren lediglich längere Aufzeichnungen der Ströme von bis zu acht Sekunden. Dabei betrug das Haltepotential wie bei den anderen Protokollen -60 mV. Die Trigger für die Wirkstoff-Applikation mit dem in Kapitel Versuchsaufbau beschriebenen System wurden bei 800 ms nach Beginn der jeweiligen Aufzeichnung gesetzt. Der Impuls für die Steuerung des Drucks und der Ventile dauerte 50 ms.

2.4. Lichtantworten von Bipolarzellen

Zur Messung der Lichtantworten der Bipolarzellen wurden zunächst Vibratomschnitte angefertigt. Diese wurden dann unter dem Mikroskop mit Lichtblitzen gereizt und die in den Bipolarzellen ausgelösten Ströme mit Hilfe von Patch-Clamp-Ableitungen gemessen. Dabei wurde während des ganzen Versuchs unter schwachem Rotlicht einer LED mit einer maximalen Lichtemission bei einer Wellenlänge von 660 nm gearbeitet, um selbst etwas sehen zu können, jedoch so wenig wie möglich die Photorezeptoren der Maus auszubleichen (Kingbright, L-53SR; Abb. 7). Dabei liegt das Emissionsspektrum der LED nicht im Bereich der spektralen Empfindlichkeit der Mäuse.

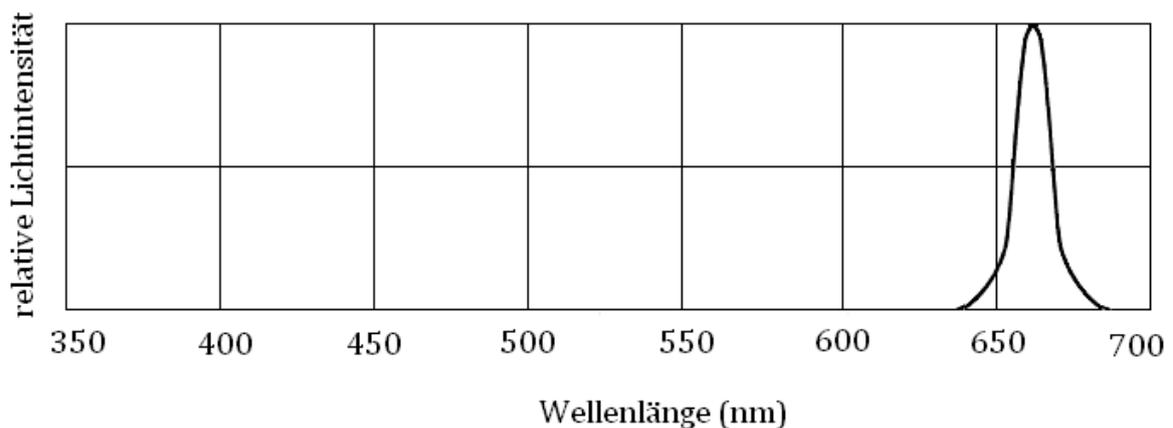


Abbildung 7: Emissionsspektrum der roten LED. Während der Dunkelversuche wurde diese LED zur Beleuchtung eingesetzt. Aus dem Datenblatt zur LED L-53SR von Kingbright. Emissionsmaximum λ_{\max} von 660 nm.

2.4.1. Vibratomschnitte

Zur Herstellung der Retinaquerschnitte wurden Cx57-*Knockout*-Mäuse und C57BL/6-Wildtyp-Mäuse verwendet. Die Tiere wurden mind. 2 Stunden (max. 4 Stunden) dunkeladaptiert, anschließend wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Die Augen wurden entnommen und die Retinae freipräpariert. Eine Hälfte der Retina wurde dann in 5 % Agarose, Type VII (Sigma, BestNr: A9045-10G) in AMES bei einer Temperatur von ca. 30°C eingebettet. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Agarose-Block auf den Probenteller des Vibratoms (Leica VT 1200) geklebt und anschließend mit einer frischen Rasierklinge unter Carbogen begastem AMES Medium in 200 µm dicke Schnitte geschnitten. Dabei wurde von der Ganglienzellseite her geschnitten. Die Vortriebsgeschwindigkeit betrug 0,2 mm/s und die Auslenkung der Klinge 2,5 mm. Die fertigen Schnitte wurden anschließend in AMES Medium (Sigma) bei stetiger Begasung für eine Stunde aufbewahrt.

2.4.2. Lichtstimulation

Für die Lichtstimulation wurde eine LED (Kingbright, L-7524VGC-H) mit einem Emissionsmaximum λ_{\max} von 520 nm verwendet. Die LED wurde unter dem Kondensator platziert, der das Licht auf die im Mikroskop betrachtete Ebene fokussierte (vergleiche Abb. 5). Direkt über der Lichtquelle war ein Filter angebracht, der eine für die verwendete

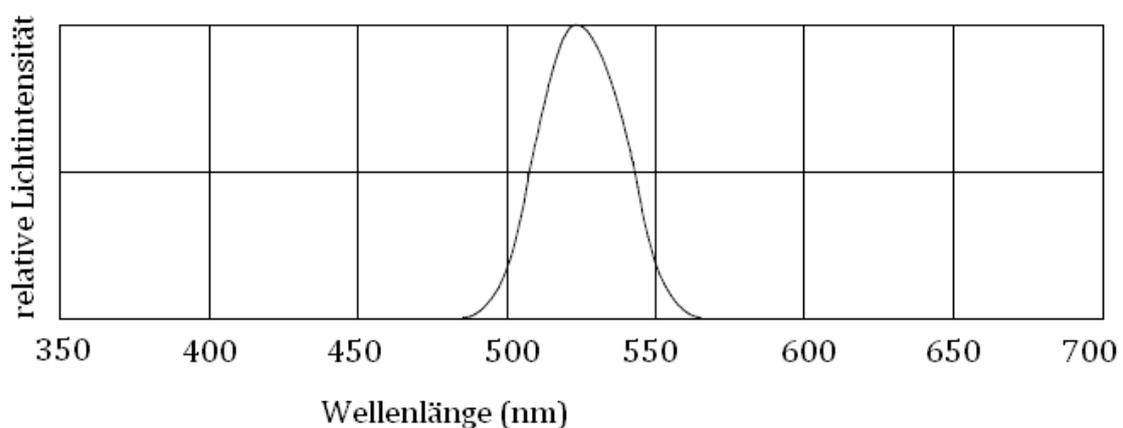


Abbildung 8 Emissionsspektrum der grünen LED. Aus dem Datenblatt zur LED L-7524VGC-H von Kingbright. Emissionsmaximum λ_{\max} von 520 nm

Wellenlänge effektive Transmission von $8,8 \cdot 10^{-4}$ besaß. Angesteuert wurde die LED über eine Steuerspannung, die vom Patch-Clamp-Verstärker geregelt wurde. Über einen U-I-Wandler wurde diese Ausgangsspannung in einen proportionalen Ausgangsstrom umgewandelt. Dabei wurden die Spannungswerte des Verstärkers so gewählt, dass Photonenflussdichten von $10^{-0,5}$, 10^0 , $10^{0,5}$, 10^1 usw. bis $10^{5,5}$ Photonen $\cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ im Fokusbereich des Kondensors gemessen werden konnten. Zur Ermittlung der Quantenflussdichte wurde eine geeichte Photodiode verwendet. Die so ermittelten Werte für die Spannungen, die der Verstärker generieren musste, um die entsprechenden Lichtintensitäten zu realisieren, sind in Abbildung 9 dargestellt. Für die Messung der Lichtantworten wurden die Retinaquerschnitte unter Infrarot-Licht mit dem Fixed Stage Mikroskop mit Hilfe einer CCD Kamera betrachtet (Abb. 5). Zur besseren Erkennung wurde die differentielle Interferenz-Kontrastoptik des Mikroskops verwendet, die Phasenunterschiede im Objekt reliefartig zeigt und so die Zellkörper optimal darstellt.

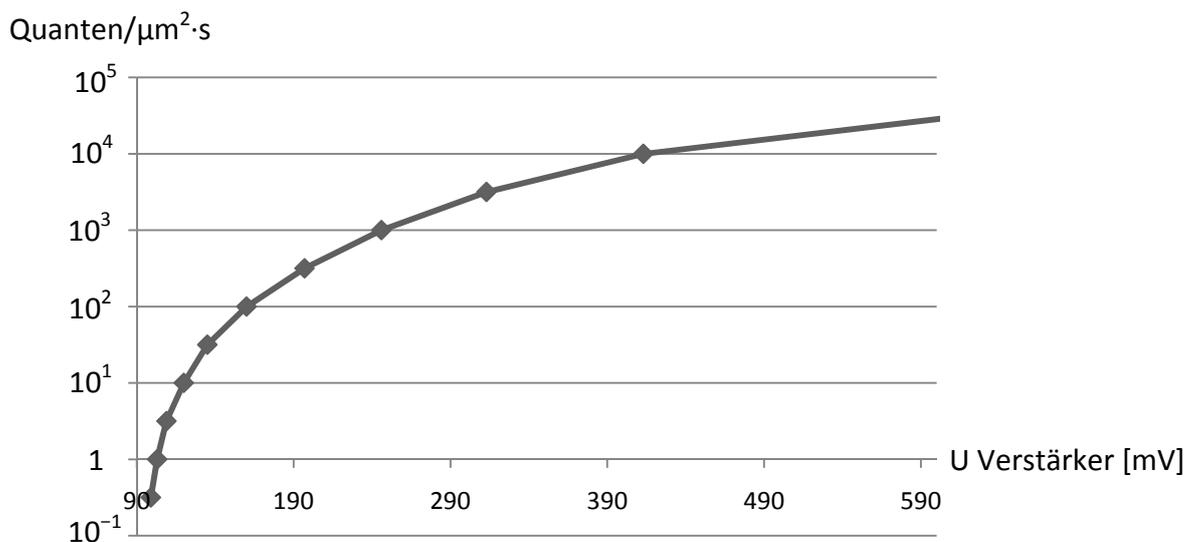
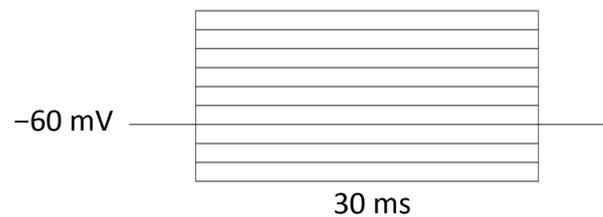


Abbildung 9: Steuerspannung für die Stimulations-LED. Über verschiedene Steuerspannungen des Verstärkers lassen sich Quantenflussdichten über einen Bereich von 5 logarithmischen Einheiten steuern.

Der Kammer, in der die Schnitte lagen, wurde ständig frisch begastes AMES Medium zugeführt. Die Temperatur des Mediums wurde dabei durch ein Heizelement (Multi Channel Systems TC02) aufgeheizt, so dass in der Kammer 33°C bis 35°C herrschten. Es wurde eine Zelle in der inneren nukleären Schicht nahe der äußeren plexiformen Schicht als potentielle Bipolarzelle bestimmt und anschließend gepatcht. Die verwendeten Glaskapillaren wurden mit Intrazellulärlösung 1 gefüllt und zeigten einen Widerstand von 5 bis 7 mΩ. Die Zellen wurden dann bei -60 mV in der Spannungsklemme gehalten. Anschließend wurden die verschiedenen Stimulations-Protokolle durchgeführt. „IV“ Protokoll: Vom Haltepotential von -60 mV springt die Spannung für 30 ms auf ein Kommandopotential, das sich bei jedem Durchlauf um 20 mV erhöht, von zunächst -120 mV auf schließlich + 60 mV.



„Input“ Protokoll: Um die Eingangswiderstände der Zellen zu bestimmen, wurden im Current Clamp Modus ausgehend von einem Strom von 0 pA Sprünge auf -30 pA, -26 pA, -22 pA usw. bis schließlich 30 pA ausgeführt.

Bei den Protokollen für die Messungen der Lichtantworten wurde für einen Zeitraum von 3 Sekunden der Stromverlauf bei Haltepotentialen von -60 mV bzw. 0 mV aufgezeichnet. Eine Sekunde nach dem Start wurde dann ein Lichtblitz von 500 ms Länge mit unterschiedlichen Intensitäten auf den Retinaquerschnitt projiziert. Für einige Intensitäten wurden dann zusätzlich die Lichtantworten bei Haltepotentialen von -80 mV, -60 mV, -40 mV, -20 mV, 0 mV, 20 mV, 40 mV gemessen.

2.4.3. Bestimmung des Zelltyps

Um den Typ der gemessenen Bipolarzelle zu bestimmen, wurde nach der Messung der Schnitt für 15 min in 2% Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Anschließend wurde der Schnitt mit 10% NDS (*normal donkey serum*) blockiert und über Nacht mit einem Calretinin-Antikörper (*goat*; 1:1000) inkubiert. Die Inkubation mit dem sekundäre Antikörper (*donkey anti goat Cy5*; 1:1000) wurde für zwei Stunden durchgeführt. Die *Lucifer Yellow* gefärbte Zelle konnte anschließend unter dem konfokalen Mikroskop (Leica TCS SL)

sichtbar gemacht werden. Der Zelltyp wurde anhand des Stratifizierungslevels der Zelle in Bezug auf die Bänderung des Calretinin-Signals bestimmt (Ghosh *et al.*, 2004). Dabei färbte der Calretinin-Antikörper drei charakteristische Banden zwischen Strata eins und zwei, zwei und drei sowie drei und vier der IPL.

2.5. Auswertung der *Patch-Clamp* Daten

Zur Auswertung der *Patch-Clamp* Daten aus den Versuchen zu den Horizontalzelleigenschaften sowie der Lichtantworten der Bipolarzellen wurden diese zunächst im ASCII Format exportiert, dann in Axon Binary Files konvertiert und anschließend mit Clampfit 10.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) analysiert. Dabei wurden zur Untersuchung der Zellen verschiedene Parameter erfasst, die im Ergebnisteil vorgestellt werden. Aus den Daten zu dem Protokoll „Input“, bei dem im *Current-Clamp* Modus gemessen wurde, konnte der Eingangswiderstand aus dem Quotienten der Stromdifferenzen und der Spannungsdifferenzen für beide Versuchsteile ermittelt werden. Bei der Auswertung des „IV“ und „Hyper“ Protokolls wurden die Mittelwerte der Stromspuren verwandt und gegen das Haltepotential aufgetragen. Zur Ermittlung der Dauer des Abklingens des Glutamatstroms wurde der Zeitpunkt betrachtet, bei dem die Kurve zu 90 % den ursprünglichen Wert wieder angenommen hatte.

Zur Ermittlung der maximalen Lichtantwort wurde zunächst der Mittelwert des Stroms vor der Lichtstimulation bestimmt. Dann wurde die maximale Amplitude während der Lichtstimulation ermittelt und nach Abzug der Standardabweichung des Dunkelstroms (vor dem Reiz) schließlich der Mittelwert des Dunkelstroms vom Maximalwert der Amplitude abgezogen.

2.6. Immunhistologie

Bei der Immunhistologie wird die spezifische Bindung von Antikörpern ausgenutzt. Es lassen sich Immunglobuline bzw. Antikörper herstellen, die spezifisch an ein bestimmtes Protein oder Molekül binden. Diese können dann genutzt werden, um in Geweben dieses Protein oder Molekül nachzuweisen und dann bestimmten Zellen oder sogar einzelnen Zellbereichen zuzuordnen. Bei der hier durchgeführten indirekten Immunfluoreszenz wurde zur optischen Detektion ein zweiter Antikörper genutzt, der an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist und wiederum an den ersten Antikörper bindet.

2.6.1. Herstellung der Präparate

Um histologische Untersuchungen durchzuführen wurden 15-18 µm dicke Retinaquerschnitte von fixierten Augenbechern hergestellt und auf Objektträgern fixiert. Dies ermöglichte eine optimale Immunhistochemie, so dass die Präparate sowohl unter dem Durchlicht- als auch unter dem Fluoreszenz-Mikroskop gut zu betrachten waren. Nach der Narkotisierung der Mäuse wurden sie durch zervikale Dislokation getötet. Durch auseinanderziehen der Augenlider traten die Augen hervor, so dass es gelang mit einer gebogenen Schere unter das Auge zu kommen und vorsichtig den Sehnerv zu durchtrennen. Das Auge wurde dann für die weitere Präparation in eine Petrischale mit PBS (pH 7,4) oder Standard Ringer (pH 7,4) überführt. Unter dem Binokular wurde die Kornea mit einer Blutlanzette punktiert und ausgehend von dieser Punktion die Hornhaut mit einer Schere kreisförmig abgetrennt. Nach der vorsichtigen Entfernung der Kornea und der Linse wurde der Augenbecher zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Augenbecher mit 2% Paraformaldehyd zwei mal zehn Minuten fixiert und anschließend drei mal zehn Minuten mit PBS gewaschen. Das Paraformaldehyd denaturiert Proteine und Nukleinsäuren und vernetzt Aminogruppen benachbarter Moleküle. Gleichzeitig werden die Moleküle unlöslich, was dem Augenbecher eine zusätzliche Stabilität verleiht.

Nachdem die Augenbecher bei 4°C über Nacht in PBS mit 30% Saccharose gefriereschützt wurden, wurden sie in Kryomatrix (Tissue Tek OCT, Compound 4583, Sakura Finetechnical Co. Ltd) unter der Kälte flüssigen Stickstoffs eingebettet. Die eingebetteten Augenbecher wurden in einem Gefriermikrotom (Firma Bright, Instrument Company Ltd, Huntingdon, England) eingespannt und bei -20°C in 15-18 µm dicke Querschnitte geschnitten. Diese Schnitte wurden auf mit Gelatine beschichteten Objektträgern aufgenommen und bei 37°C getrocknet. Wenn die Objektträger nicht gleich gebraucht wurden, lagerten sie bis zur Verwendung bei -20°C.

Es wurden für die immunhistologischen Untersuchungen auch dissoziierte Zellen verwendet. Deren Herstellung wurde bereits in Kapitel 2.3.1. erläutert. Zudem wurden *Whole-mount* Präparate verwendet. Das heißt, dass die gesamte isolierte Retina für die Antikörperinkubation verwendet wurde und anschließend plan auf einem Objektträger eingedeckelt wurde.

2.6.2. Versuchsdurchführung

Für die Immunhistologie wurden zunächst die auf den Objektträgern fixierten Retinaquerschnitte mit einem Fettstift umrandet und dann nach dem folgenden allgemeinen Protokoll für diese Methode weiterbehandelt:

- Blockieren: 1 h mit 10% NGS in 0,1 M PBS (pH 7,4) + 0,3% TritonX 100 in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur (RT) inkubieren
- Waschen: 3 mal 10 Min. mit 0,1 M PBS (pH 7,4) bei RT
- 1. Antikörper: über Nacht mit Antikörper verdünnt in 0,1 M PBS (pH 7,4) + 0,3% TritonX 100 in einer Feuchtkammer bei 4°C inkubieren
- Waschen: 3 mal 10 Min. mit 0,1 M PBS (pH 7,4) bei RT
- 2. Antikörper: 2 h mit Fluorochrom konjugiertem sek. Antikörper, verdünnt in 0,1 M PBS (pH 7,4) + 0,3% TritonX 100 und 2% NGS in einer Feuchtkammer bei RT inkubieren
- Waschen: 3 mal 10 Min. mit 0,1 M PBS (pH 7,4) bei RT

Im Anschluss daran wurden die Präparate in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Die Auswertungen fanden am konfokalen Mikroskop (Leica TCS SL) statt. Zum Scannen der Proben wurde das 40x/1.25 Plan-Apochromat und das 63x/1.32 Plan-Apochromat Objektiv benutzt. Die Auflösung der Bilder betrug 1024 x 1024 Pixel. Bei der Detektion zweier Chromophore unterschiedlicher Emissionsspektren wurde ein sequenzieller Scan durchgeführt, um eine Überlappung der Fluoreszenz zu minimieren. Das Übereinanderlegen der Bilder und die Einstellungen von Kontrast und Helligkeit wurden mit Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Incorporated) durchgeführt.

Tabelle der verwendeten Antikörper:

Antikörper (Spezies)	Hersteller	Verdünnung
Primäre Antikörper		
Calbindin (Maus)	Sigma	1:5000
Calretinin (Ziege)	Chemicon	1:1000
Erg1 (Kaninchen)	Chemicon	1:100
GluR2/3 (Kaninchen)	Millipore	1:1000
KCC2 (Kaninchen)	(Blaesse <i>et al.</i> , 2006)	1:1000
NKCC1 (Kaninchen)	Chemicon	1:1000
Sekundäre Antikörper		
Anti Kaninchen 568 (Esel)	Invitrogen / Molecular probes	1:1000
Anti Kaninchen Cy5 (Ziege)	Jackson Laboratories	1:1000
Anti Maus 488 (Ziege)	Invitrogen / Molecular probes	1:1000
Anti Ziege Cy5 (Esel)	Jackson Laboratories	1:1000

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welchen Einfluss die Kopplung der Horizontalzellen auf die Bipolarzellen hat. In einem ersten Versuchsteil wurden zunächst die Auswirkungen des Verlustes von Cx57 auf die Membraneigenschaften der isolierten Horizontalzellen untersucht. Im zweiten Teil wurde nach möglichen Veränderungen der lichtinduzierten Ströme von Bipolarzellen gesucht. Dabei galt es zu ermitteln, ob im lebenden Retinaquerschnitt die Kopplung der Horizontalzellen einen Einfluss auf die Lichtantworten der Bipolarzellen hat.

3.1. Horizontalzeleigenschaften

Die Horizontalzellen sind eine Zellklasse der Retina, die bisher schon vielfältig in verschiedenen Spezies untersucht wurde. Dabei gibt es neben histologischen Studien, die vor allem Funktionen aufgrund der Anatomie der Zellen postulieren auch physiologische Untersuchungen, die direkte Rückschlüsse auf deren Aufgaben im retinalen Netzwerk ziehen lassen. Die hier vorgestellten Ergebnisse gehen zunächst der Frage nach, welche Auswirkungen der *Knockout* von Cx57, welches exklusiv in den Horizontalzellen exprimiert wird, auf die Physiologie der Horizontalzellen hat. Dazu wurden die Horizontalzellen isoliert, um sie erstens besser patchen zu können und andererseits den Einfluss der anderen Zellen auszuschließen. Die immunhistologische Analyse betrachtet einige Membranproteine, die für den Ionenaustausch und damit den Membranwiderstand von Bedeutung sind.

3.1.1. Immunhistologische Analyse

Zur Untersuchung der Membraneigenschaften der Horizontalzellen wurden verschiedene Membranproteine über Antikörper fluoreszenzmarkiert. Dadurch ließ sich der Level an Proteinen vergleichen und schauen, ob die entsprechenden Moleküle in der Cx57-*Knockout* Retina herauf- oder herunterreguliert wurden, um den Verlust der *Gap Junctions* eventuell zu kompensieren. Hintergrund ist die Tatsache, dass die Horizontalzellen im Cx57-*Knockout* ein depolarisiertes Membranpotential und einen geringeren Eingangswiderstand aufweisen.

Eines dieser untersuchten Proteine war der spannungsgesteuerte K^+ -Kanal *erg1* (*ether à gogo* Isoform 1). Dieser Kanal wurde schon in Horizontalzellen nachgewiesen und scheint hier für ein Verkürzen der Spannungsänderung auf einen Glutamat-Reiz zu sorgen (Feigenspan *et al.*, 2009). Das heißt, dass der *erg*-Kanal hyperpolarisierend wirkt und dementsprechend herunterreguliert sein müsste, um diese Depolarisation, wie sie in den Horizontalzellen der Cx57-Knockout Mäusen festgestellt wurde, zu erklären. In Abbildung 10 sind immunhistologische Färbungen mit einem *erg1*-Antikörper zu sehen (grün). In den Querschnitten (Abb. 10 A, B) sieht man die Verteilung des Proteins innerhalb der Retina. Neben einer prominenten Expression in der IPL kommt der *erg1*- K^+ -Kanal vor allem in der OPL vor. Hier lässt sich der Kanal auf den Calbindin-gefärbten Horizontalzellen, hier rot, gut erkennen. Vergleicht man die Färbungen der Wildtyp-Retina (Abb. 10 A) mit der Cx57-Knockout-Retina (Abb. 10 B), so lässt sich kein Unterschied feststellen. Die Verteilung des *erg1*- K^+ -Kanal wird also durch den *Knockout* von Cx57 vermutlich nicht beeinflusst. Dies wird auch in den Abbildungen 10 C und D deutlich. Hier wurde eine Färbung von Calbindin und des *erg1*- K^+ -Kanals in einer *Whole-mount* Retina durchgeführt. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der Grenzschicht zwischen OPL und INL. Auf dieser Ebene lassen sich die Somata und Dendriten der Horizontalzellen erkennen (rot). Das Vorhandensein des hier grün gefärbten *erg1*-Kanals in den Horizontalzellen wird dabei deutlich. Wie in den Querschnitten schon festgestellt wurde, zeigt sich auch hier kein Unterschied von Wildtyp und Cx57-Knockout.

Um neben einem spannungsgesteuerten Kanal einen Neurotransmitter-gesteuerten Kanal zu betrachten, wurden Antikörper gegen die Glutamat-Rezeptor-Untereinheiten GluR2/3 eingesetzt. Diese zu den AMPA-Rezeptoren gehörenden Kanäle wurden bereits auf Horizontalzellen nachgewiesen (Hack *et al.*, 2001). Sie sind ionotrop und bewirken im Dunkeln, also wenn die Photorezeptoren Glutamat ausschütten, eine Depolarisation. Das würde bedeuten, dass diese Kanäle vermehrt vorkommen müssten, um die stärkere Depolarisation der Horizontalzellen zu erklären. Im Querschnitt zeigt sich GluR2/3 sowohl in der äußeren, als auch in der inneren plexiformen Schicht (Abb. 11). Es ist eine klare Überlagerung des Signals der Calbindin positiven Horizontalzellen mit dem GluR2/3 Signal zu erkennen, welches durch den Cx57-Knockout unbeeinflusst ist. Die AMPA-Rezeptoren als Bestandteile der Glutamat-Rezeptoren sind in der Retina sehr verbreitet, da Glutamat an den meisten Synapsen als Neurotransmitter beteiligt ist. In Abbildung 12 sind daher isolierte Horizontalzellen dargestellt, die mit einem Calbindin-Antikörper angefärbt wurden. Sie zeigen eine deutliche Expression von GluR2/3 (grün) und bestätigen so die Befunde aus den Querschnitten.

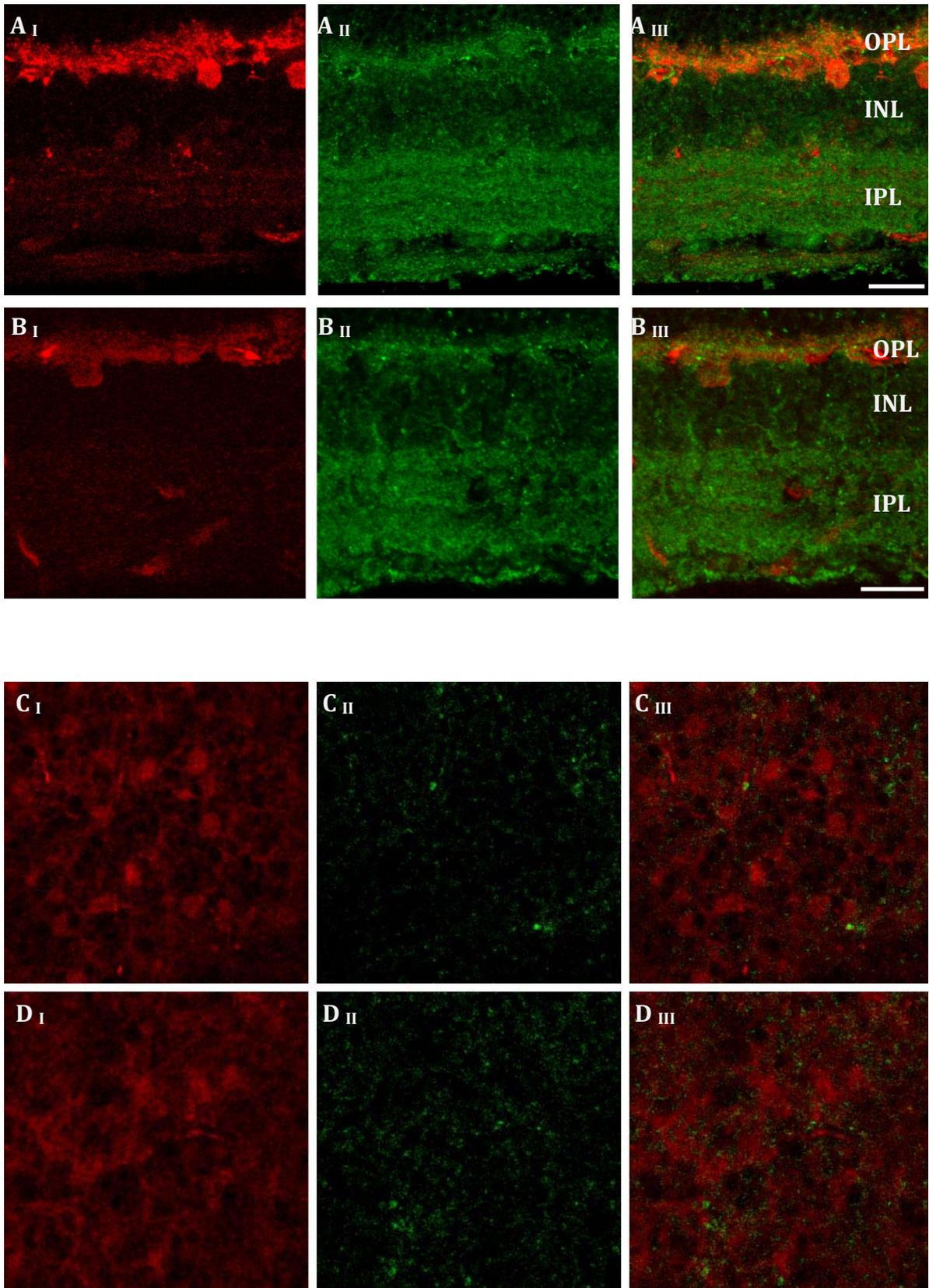


Abbildung 10: Verteilung des erg1-Kanals in der Retina. Retinaquerschnitte (**A, B**) und *Whole-mount* Präparate (**C, D**) wurden mit Antikörpern gegen den erg1-Kanal (grün) und Calbindin (rot) behandelt. Die Bilder spiegeln jeweils einen Overlay aus 4 optischen Schnitten wieder, die jeweils einen Abstand von 0,3 μm hatten. Die Aufnahme **C** und **D** kommt aus der Grenzschicht von OPL und INL. In den Abbildungen **I** ist das Calbindin-Signal dargestellt, welches Horizontalzellen markiert. Die Färbung des erg1-Kanals ist in den Bildern **II** zu sehen und der Overlay der beiden ist in Darstellung **III** gezeigt. OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere nukleäre Schicht, IPL = innere plexiforme Schicht. Maßstab 20 μm .

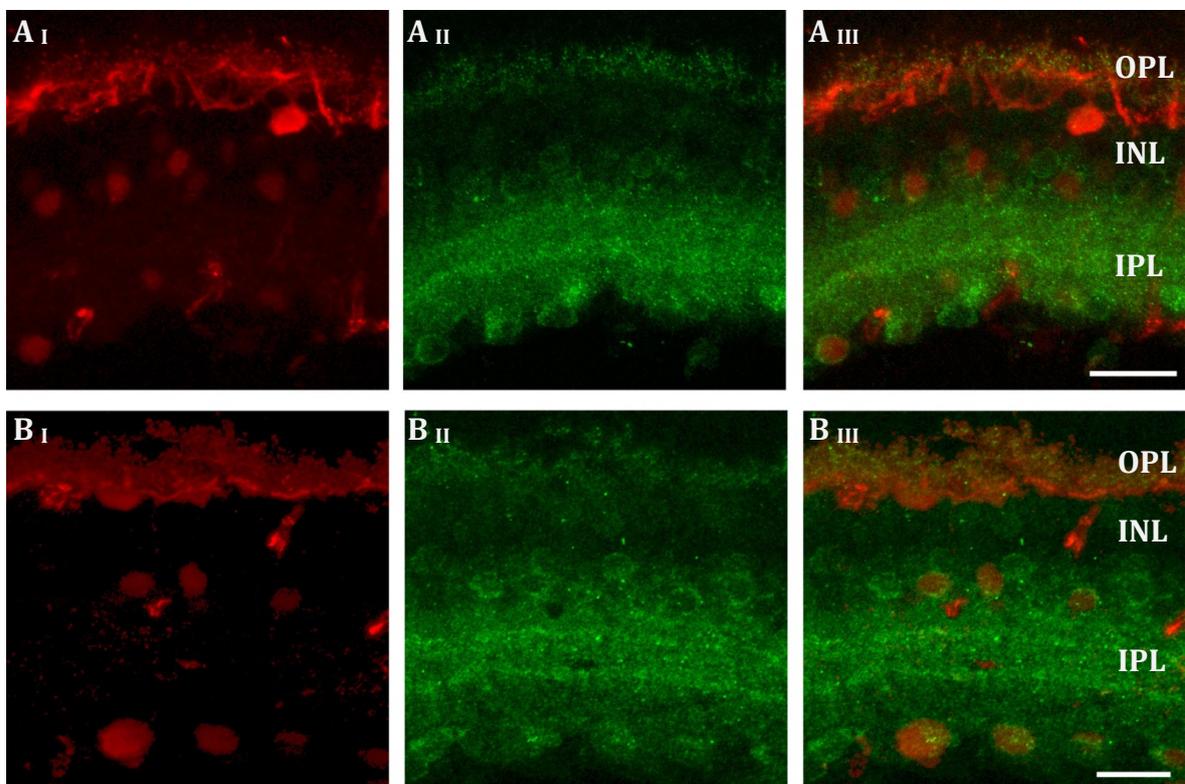


Abbildung 11: GluR2/3 Färbung im Retinaquerschnitt. Querschnitte von Wildtyp (**A**) und Cx57-Knockout-Retinen (**B**) wurden mit einem GluR2/3 Antikörper inkubiert. In Spalte **I** ist das Calbindin-Signal dargestellt, das Horizontalzellen in der OPL und INL markiert. Die zweite Spalte (**II**) zeigt die GluR2/3-Markierung und in **III** ist die Überlagerung abgebildet. OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere nukleäre Schicht, IPL = innere plexiforme Schicht. Maßstab 20 μm

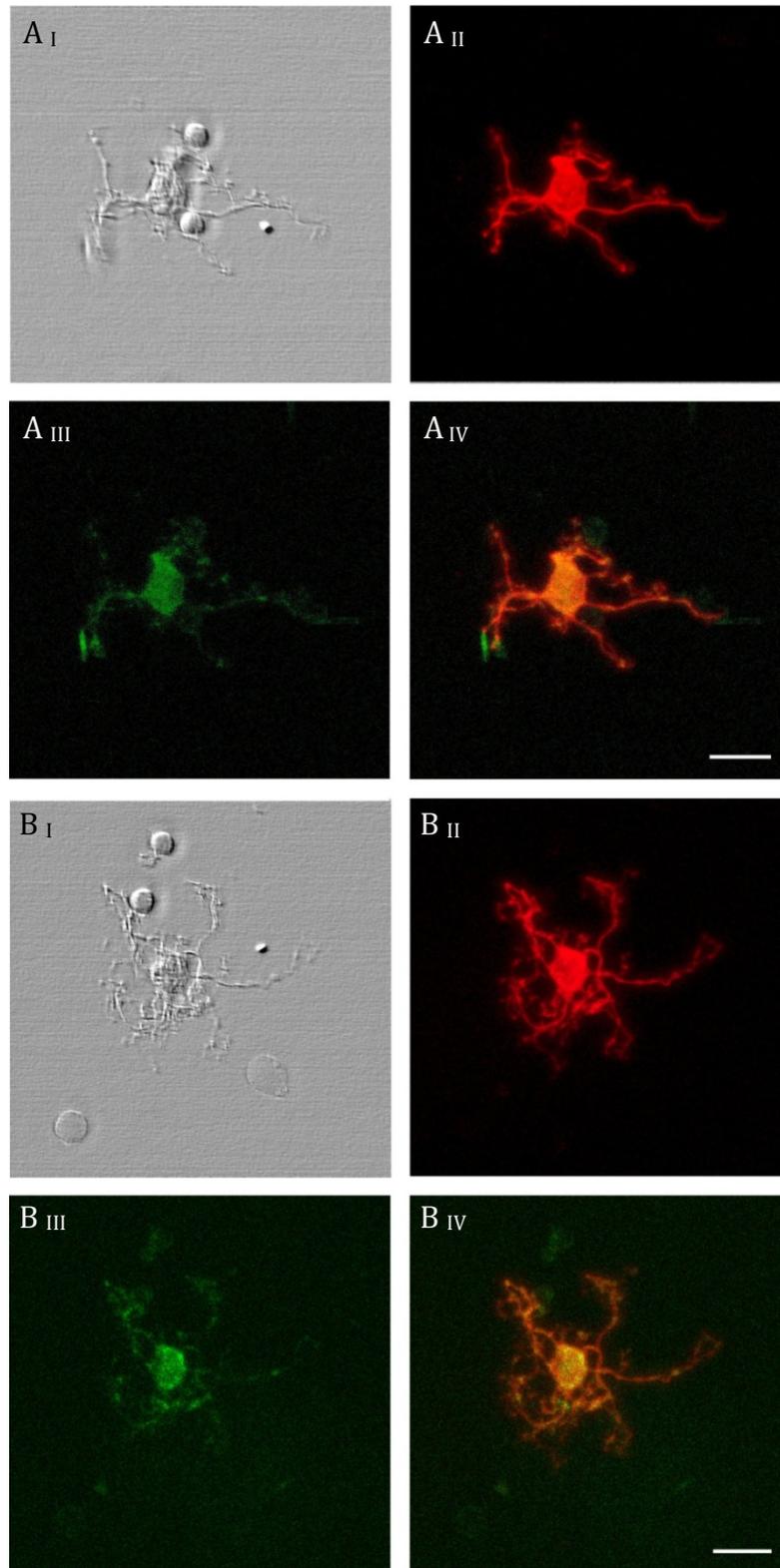


Abbildung 12: GluR2/3 Färbung an dissoziierten Horizontalzellen. Isolierte Horizontalzellen wurden mit Antikörpern gegen Calbindin (rot) und GluR2/3 (grün) inkubiert. Die Abbildungen **A** zeigen Zellen aus Wildtyp-Retinen. Zellen aus *Cx57-Knockout*-Retinen sind in der Bilderfolge **B** dargestellt. **I** zeigt das Durchlichtbild, **II** zeigt die Calbindinfärbung, **III** das GluR2/3-Signal und die Überlagerung ist jeweils in **IV** dargestellt. Maßstab 16 µm.

Betrachtet man hier wieder vergleichend den Wildtyp mit der Retina eines Cx57-defizienten Tiers, so lassen sich keine Unterschiede erkennen. Der hier vorgestellte AMPA-Rezeptor ist eine Untereinheit ionotroper Glutamat-Rezeptoren und kommt in der äußeren Retina vor allem noch in den OFF-Bipolarzellen vor (Hack *et al.*, 2001).

Im Weiteren wurden Kationen-Cl⁻-Cotransporter untersucht, die maßgeblich für das Chlorid-Gleichgewicht verantwortlich sind. Dabei transportieren die beiden betrachteten Cotransporter Cl⁻-Ionen in entgegengesetzter Richtung. Der Na-K-2Cl Cotransporter NKCC1 reichert Chlorid in der Zelle an. Dies führt zu einem Chloridgleichgewichtspotential (E_{Cl}), das höher ist, als das normale Ruhemembranpotential einer Zelle. Dagegen transportiert der hier ebenfalls betrachtete K-Cl Cotransporter KCC2 Cl⁻-Ionen aus der Zelle und bewirkt ein Herabsetzen des Chloridgleichgewichtspotentials bis unter das Ruhemembranpotential der Zelle. Beide Transporter kommen in der Retina vor (Li *et al.*, 2008a). Der Effekt des veränderbaren Chloridpotentials macht sich besonders in Neuronen bemerkbar, die GABA- oder Glycin-vermittelte Ströme zeigen. Durch Veränderung des Chloridgleichgewichts können diese klassischerweise inhibitorischen Neurotransmitter im Falle einer Erhöhung der intrazellulären Chloridkonzentration auch exzitatorisch wirken. Dies kommt üblicherweise bei unreifen Neuronen vor (Cherubini *et al.*, 1991; Russell, 2000). Aber auch in der Retina gibt es Anzeichen dafür, dass beispielsweise in ON-Bipolarzellen Chlorid akkumuliert wird und GABA so exzitatorisch wirken könnte (Duebel *et al.*, 2006). Da aber GABA-Rezeptoren auch auf Horizontalzellen nachgewiesen wurden (Feigenspan and Weiler, 2004), ist denkbar, dass dieser Neurotransmitter durch eine Raufregulierung von NKCC1 bzw. Runterregulierung von KCC2 depolarisierend wirkt und so zu dem erhöhten Membranpotential der Horizontalzellen im Cx57-Knockout führen könnte. Die Quelle für GABA in der äußeren Retina könnten dann die Horizontalzellen selber sein (Guo *et al.*, 2009; Hirano *et al.*, 2005).

Beide Transporter kommen in der äußeren Retina vor und spielen dort eine Rolle bei der Regulation des Chloridhaushalts der Zellen. Zunächst wurde die Verteilung von KCC2 untersucht. Dieses kommt nicht in Horizontalzellen, sondern eher in OFF-Typ Bipolarzellen vor (Li *et al.*, 2008a; Vardi *et al.*, 2000). Um hier mögliche kompensatorische Effekte generell in der OPL zu untersuchen, wurde der Level an KCC2 in Wildtyp- und Cx57-Knockout Retinen verglichen. In Abbildung 13 ist die KCC2-Färbung abgebildet. Auf den Bildern A und B sind die Färbungen der Wildtyp-Retina dargestellt. In rot sind die Horizontalzellen mit dem Calbindin-Antikörper gefärbt. Das KCC2 Signal ist grün dargestellt. KCC2 kommt sowohl in der gesamten inneren plexiformen Schicht, als auch in der äußeren plexiformen Schicht vor. In der Vergrößerung aus einem einzelnen optischen Schnitt (Abb. 13 B) lässt sich sehr gut erkennen, dass die Horizontalzellensignale

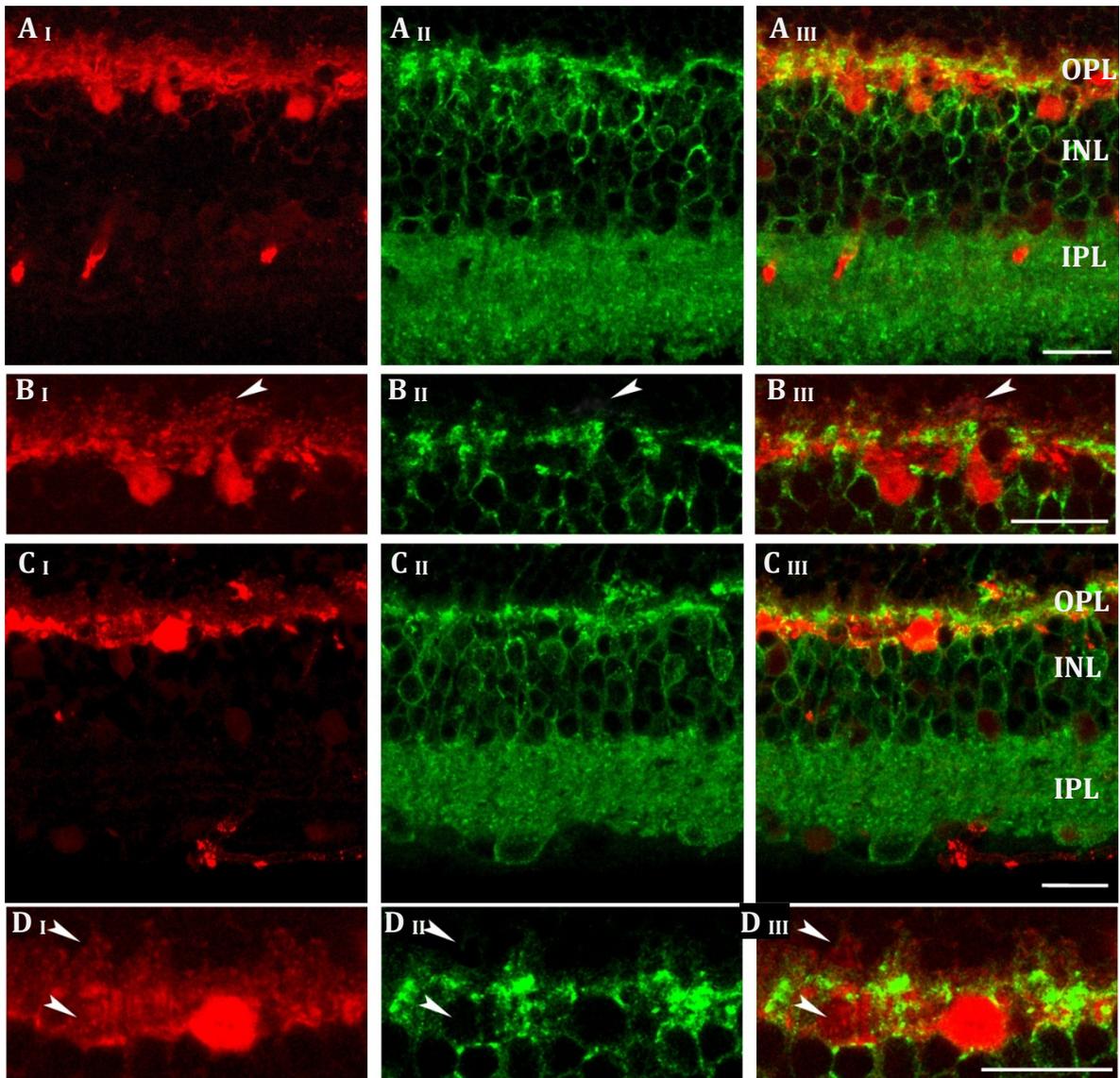


Abbildung 13: Verteilung von KCC2 in der Retina. Querschnitte einer Wildtyp-Retina (**A** und **B**) sowie einer Cx57-defizienten Retina (**C** und **D**). Horizontalzellen sind durch Färbung des Markerproteins Calbindin sichtbar (Spalte **I**). In Spalte **II** ist das KCC2 Signal dargestellt und in der Spalte **III** ist die Überlagerung beider zu sehen. Die Reihe **B** zeigen eine Vergrößerung eines Abschnittes der OPL aus **A** und die Reihe **D** ist eine Großansicht der OPL aus **C**. Die Pfeile markieren Horizontalzellausläufer, die nicht durch den KCC2-Antikörper markiert wurden. OPL = Äußere plexiforme Schicht, INL= Innere nukleäre Schicht, IPL= Innere plexiforme Schicht. Maßstab: 20 µm

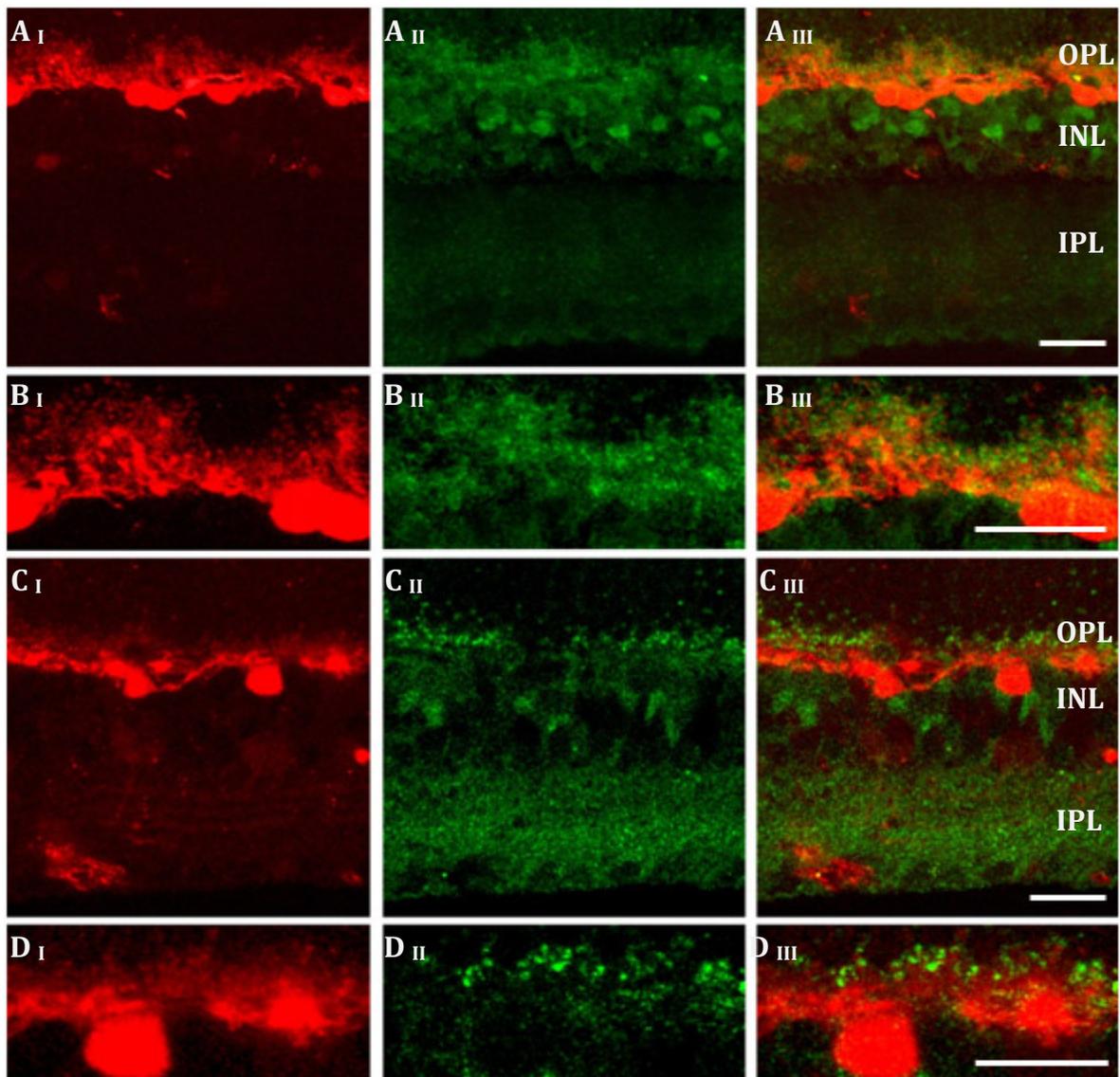


Abbildung 14: Verteilung von NKCC1 in der Retina. Querschnitte einer Wildtyp-Retina (**A** und **B**) sowie einer Cx57-defizienten-Retina (**C** und **D**) wurden mit Antikörpern gegen Calbindin (rot) und NKCC1 inkubiert. Horizontalzellen sind durch Färbung des Markerproteins Calbindin sichtbar (Spalte **I**). In Spalte **II** ist das NKCC1 Signal dargestellt und in der Spalte **III** ist die Überlagerung beider zu sehen. Ein vergrößerter Ausschnitt der OPL aus den Abbildungen **A** ist in Reihe **B** gezeigt und Reihe **D** ist eine Großansicht der OPL aus **C**. OPL = Äußere plexiforme Schicht, INL= Innere nukleäre Schicht, IPL= Innere plexiforme Schicht. Maßstab: 20 μm

nicht mit den KCC2 Signalen überlappen. Die Pfeile zeigen deutliche Horizontalzellausläufer, die frei von KCC2 sind. Vermutlich kommt das KCC2 in der OPL in den Dendriten der OFF-Bipolarzellen vor.

Der andere Kandidat der Kationen Cl^- Cotransporter ist NKCC1. Dieser kommt in Horizontal- und ON-Bipolarzellen vor (Li *et al.*, 2008a; Vardi *et al.*, 2000). Auch hier wurde geschaut, inwieweit die Expression dieses Membranproteins durch den *Knockout* von Cx57 beeinflusst wird. Dazu wurden wieder Querschnitte von Retinen mit dem Calbindin- und NKCC1-Antikörpern fluoreszenzmarkiert. In Abbildung 14 ist zu erkennen, dass NKCC1 in der IPL zu finden ist. Einige Zellkörper in der INL sind gefärbt, die unter anderem ON-Bipolarzellen sein könnten. In der äußeren plexiformen Schicht kommt NKCC1 in Assoziation mit den Ausläufern der Horizontalzellen vor. Die Vergrößerungen (Abb. 14 B und D) zeigen deutlich eine Colokalisation von NKCC1 und Horizontalzellen.

Vergleicht man allerdings wieder den Wildtyp mit dem Cx57 *Knockout*, dann findet man keinen bemerkenswerten Unterschied in der Stärke des NKCC1-Signals auf den Horizontalzellen.

Die in dieser histologischen Analyse vorgestellten Membranproteine hätten bei einer vom Wildtyp abweichenden Expression, deutliche Veränderungen des Membranwiderstands oder des Ruhemembranpotentials bedeutet. Es konnte gezeigt werden, dass diese für das Ionengleichgewicht der Horizontalzellen wichtigen Kandidaten aber nicht in ihrer Häufigkeit verändert waren.

3.1.2. Horizontalzellströme

Für die physiologischen Experimente an Horizontalzellen wurden diese zunächst isoliert. Anhand ihrer Morphologie ließen sie sich sehr gut unter dem Mikroskop ausmachen. Sie besitzen ein polygonales Perikaryon mit einer durchschnittlichen Größe von 14 μm im Durchmesser und besitzen fünf bis acht primäre Dendriten (vergleiche Abb. 15, sowie (Feigenspan and Weiler, 2004).

Nachdem eine Horizontalzelle erfolgreich gepatch wurde und schließlich der Zugang zum Zytoplasma bestand, wurde die Zelle in der Spannungsklemme bei -60 mV gehalten. Nach einer kurzen Stabilisierungsphase von ca. einer Minute wurden die im Methodenteil (2.3.3.) vorgestellten Stimulationsprogramme ausgeführt. Um die Ströme zu betrachten, die auf eine Depolarisation folgen, wurde durch das „IV“-Protokoll das Haltepotential sukzessive erhöht. Dabei verhält sich die Membran bei kleinen Spannungssprüngen noch näherungsweise wie ein Ohmscher Widerstand (Abb. 16). Mit steigender Spannung öffnen sich vermehrt spannungsabhängige Kanäle und die Linearität geht verloren. Die Leitfähigkeit der Membran steigt an. Da die verwendete Intrazellulärlösung eine physiologische Kaliumkonzentration von 140 mM hatte, konnten hier starke Kaliumauswärtsströme mit einer Leitfähigkeit von bis zu 100 nS gemessen werden. Das ist etwa das 20 Fache im Vergleich zu den gemessenen Leitfähigkeiten der Membran bei Haltepotentialen nahe dem Ruhemembranpotential. Dieser große Strom, der maximale

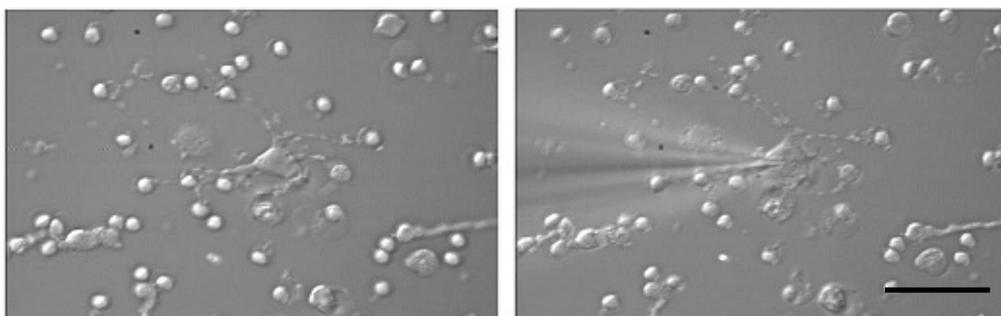


Abbildung 15: Patch-Clamp Messungen isolierter Horizontalzellen. Links im Zentrum sieht man eine Horizontalzelle. Rechts: Dieselbe Zelle, nun von einer Elektrode angesaugt. Balken: 20 μm .

Werte von 4 nA bei einem Potential von 40 mV zeigt, bricht dann bei weiterer noch stärkerer Depolarisation abrupt ein. Dieser Verlauf, dass bei steigender Depolarisation die Kaliumleitfähigkeit stark ansteigt und bei Spannungen ab etwa 40 mV wieder einbricht, ist typisch für erg-Ströme. Die hier gemessenen großen Ströme bei depolarisierenden Potentialen resultieren hauptsächlich aus der Leitfähigkeit des erg1-Kanals (Feigenspan *et al.*, 2009). Wie schon mit den histologischen Befunden gezeigt werden konnte, gibt es keine Veränderung im Verteilungsmuster von erg1 in der äußeren Retina durch den Cx57-

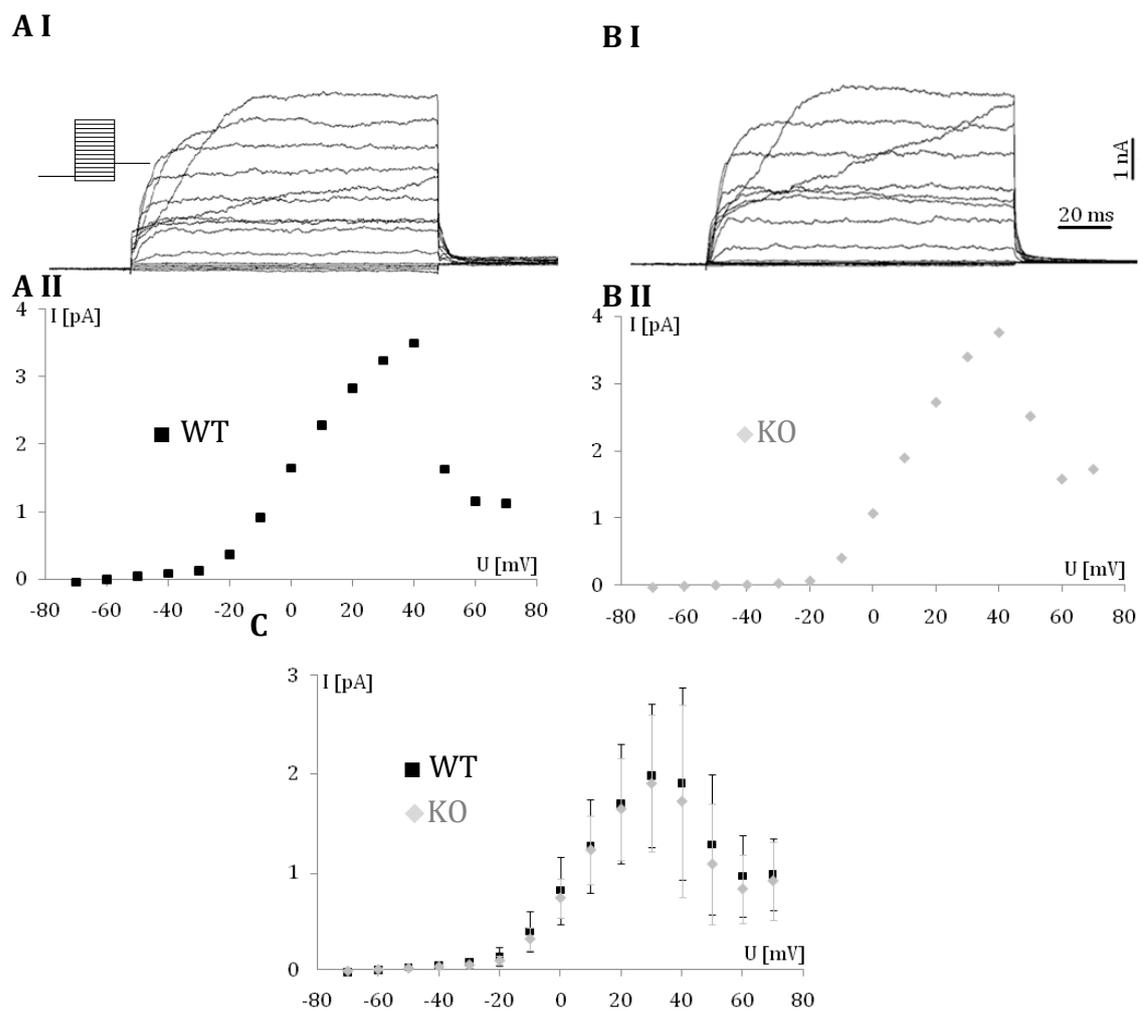


Abbildung 16: Depolarisierende Spannungssprünge lösen starke K^+ -Ströme aus. In dieser Darstellung sind die Ströme zusammengefasst, die durch die Spannungsänderungen des „IV“-Protokolls (siehe Einschub in **A I**) in den Horizontalzellen ausgelöst wurden. Abbildungen **A** beziehen sich auf den Wildtyp und **B** zeigt die Ströme der Horizontalzellen aus einem Cx57-defizienten Tier. In **I** sind die gemessenen Stromspuren übereinander gelegt, die in **II** gegen die vorgegebene Spannung aufgetragen sind. Bild **C** zeigt die Mittelwerte aller gemessenen Zellen mit Standardabweichung. Die schwarzen Quadrate markieren die Werte für die Wildtyp-Zellen (N = 14). Die grauen Rauten kennzeichnen die Werte für die Cx57-Knockout-Zellen (N = 11).

Knockout. Auch die elektrophysiologischen Daten zeigen keinen Unterschied in den erg_1 Strömen, die bei Depolarisation ausgelöst werden (Abb. 16 C). In den Einzelbeispielen aus Abbildung 16 A und B lässt sich dieser beschriebene Strom-Spannungsverlauf sehr gut in Wildtyp und Cx57-Konochout-Horizontalzellen nachvollziehen. Zur Untersuchung der Eingangswiderstände wurde das Protokoll „Input“ verwendet. Dabei wurde der Strom konstant gehalten und die resultierende Spannung gemessen. Es wurde der Strom jedoch nur sehr gering verändert, um keine Spannungen an der Membran auszulösen, die spannungsgesteuerte Kanäle öffnet. Der Widerstand berechnet sich dann aus dem Quotienten von Spannung und Strom, der in der Steigung der Geraden in Abbildung 17 C wiedergespiegelt wird. Hier wurden zur Interpolation der Geradengleichung dann auch lediglich die ersten fünf Datenpunkte herangezogen, da hier mit höherer Wahrscheinlichkeit keine spannungsgesteuerten Kanäle geöffnet waren. Bei diesen Messungen der Eingangswiderstände ergab sich ein Wert von $265 \text{ M}\Omega$ im Wildtyp und $195 \text{ M}\Omega$ im Cx57-Konockout. Das ergibt einen Unterschied von 26 %.

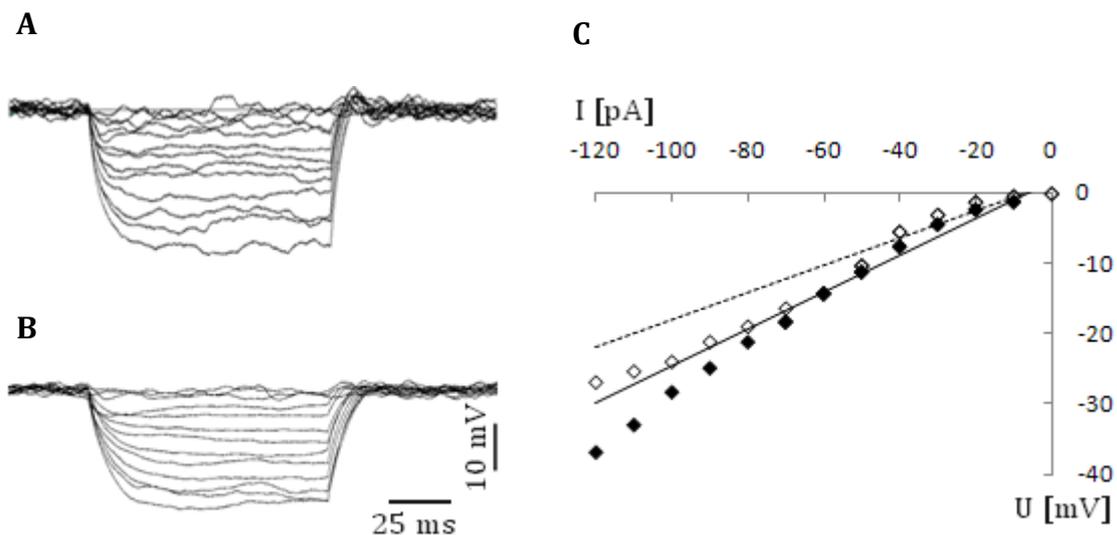


Abbildung 17. Eingangswiderstände der Horizontalzellen. Die Eingangswiderstände der Horizontalzellen wurden mit dem Protokoll „Input“ gemessen. Die Ergebnisse aus den Messungen sind in **A** von den Wildtyp-Zellen und in **B** von den Cx57-Knockout-Zellen gezeigt. Die gemessenen Spannungen wurden in **C** gegen die injizierten Ströme aufgetragen. Die daraus ermittelten Widerstände betragen für den Wildtyp $265 \text{ M}\Omega$ ($N = 12$) und für den *Knockout* $195 \text{ M}\Omega$ ($N = 10$).

Weitere Parameter, die erhoben wurden, waren die Ströme, die bei Hyperpolarisation ausgelöst wurden. Bei hohen negativen Potentialen dominieren Ströme von K^+ -Ionen, die in diesem Fall entgegen des Konzentrationsgefälles Einwärts gerichtet sind. Beim Vergleich der durch Hyperpolarisation ausgelösten Ströme lassen sich keine Unterschiede im Verlauf der Erniedrigung des Potentials auf bis zu 110 mV zwischen Wildtyp und Cx57-*Knockout* feststellen (Abbildung 17). Einwärts rektifizierende K^+ -Kanäle (K_{ir}) sind bereits in Horizontalzellen verschiedener Spezies nachgewiesen worden (Golard *et al.*, 1992; Ueda *et al.*, 1992). Es zeigt sich hier, dass die durch Hyperpolarisation ausgelösten Ströme nicht durch den *Knockout* beeinflusst sind. In Abbildung 17 C sind diese Ströme des Wildtyps ($N = 7$) und des Cx57-*Knockouts* ($N = 5$) nochmal zusammengefasst.

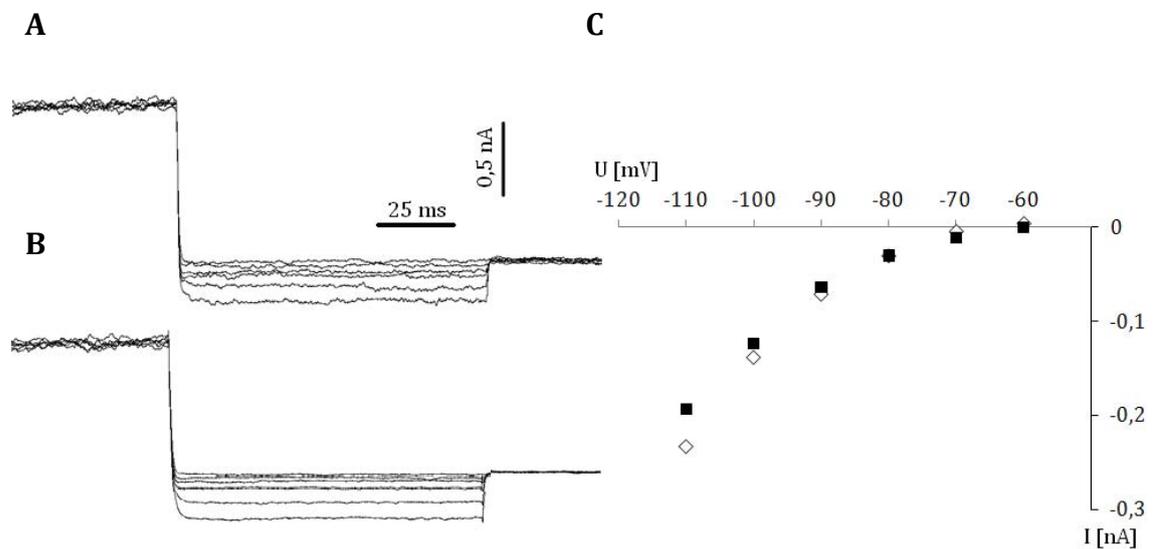


Abbildung 17: Durch Hyperpolarisation ausgelöste Ströme. Mit Hilfe des Protokolls „Hyper“ wurden die Horizontalzellen schrittweise hyperpolarisiert. Links sind die übereinander gelagerten Stromspuren der Horizontalzellen des Wildtyps (A) und des *Knockouts* (B) dargestellt. In C sind die gemessenen Ströme gegen die Spannung aufgetragen.

3.1.3. Glutamat-Antworten

Neben den spannungsabhängigen Strömen sind für die Funktion der Horizontalzellen vor allem die Glutamatrezeptoren entscheidend. Diese werden durch eine Glutamatfreisetzung der Photorezeptoren im Dunkeln aktiviert und depolarisieren so die Horizontalzellen. Bedingt durch die Tatsache, dass die Horizontalzellen in den Cx57-*Knockout*-Tieren depolarisierter sind, wäre eine Veränderung der Expression von Glutamatrezeptoren denkbar. Aus diesem Grund wurden die isolierten Horizontalzellen für kurze Zeit mit Glutamat überspült und die entsprechenden Einwärtsströme gemessen. Die Abbildung 18 zeigt das Ergebnis aus diesem Experiment. Es wurde mit Hilfe des Applikationssystems ein Puls von 1 mM Glutamat für 50 ms auf die Zellen gegeben. Dies löste eine schnelle Reaktion in Form eines transienten Einwärtsstroms mit Amplituden von 178 ± 17 pA ($N = 2$) für den Wildtyp und 184 ± 13 pA ($N = 3$) für die Horizontalzellen der Cx57-*Knockout* Maus aus. Um dann wieder auf 90 % des Ursprungsniveaus zu kommen, dauerte es für den Wildtyp 251 ms und 264 ms für den *Knockout*. Ein

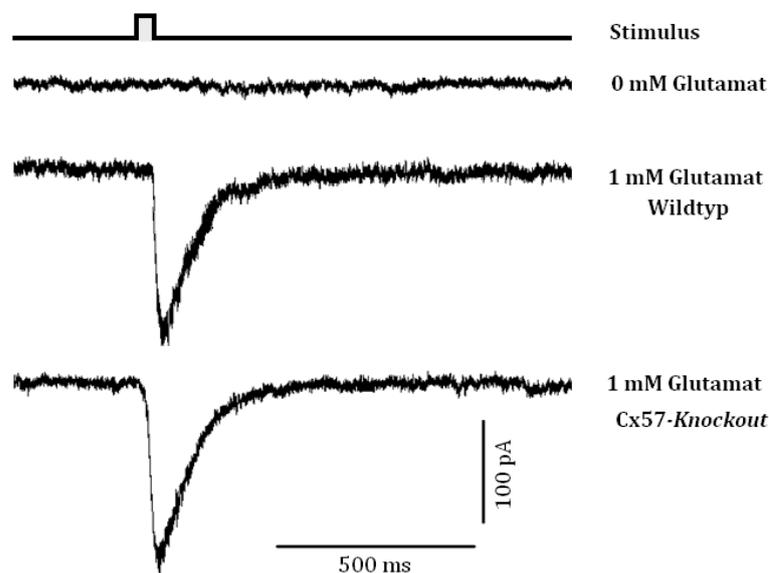


Abbildung 18: Glutamatströme der Horizontalzellen. Auf ein Glutamat-Applikation von 50 ms (oben) folgen die dargestellten Strom-Antworten. Bei 0 mM Glutamat lässt sich keine Reaktion messen (zweite Darstellung von oben). Im Wildtyp lassen sich ebenso wie im Cx57-*Knockout* klassische Einwärtsströme messen, wie es die beiden unteren Bilder zeigen.

Lösungsstrom ohne Glutamat löste allerdings in einigen Fällen eine Reaktion in Folge der Zellbewegung aus. Hier war es dann auch schwierig, gute Glutamat-Antworten zu induzieren. Da insgesamt die Ströme durch das Fehlen der *Gap Junction* zwischen den Horizontalzellen nicht messbar verändert wurden, scheint es, bestätigt durch die histologischen Befunde, keine Änderung der Dichte und Eigenschaften der Glutamatrezeptoren zu geben

3.2. Bipolarzelleigenschaften

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den Versuchen zu den Lichtantworten von Bipolarzellen vorgestellt. Dabei wird auf die Typen einzeln eingegangen und dabei der jeweilige Typ aus den Wildtyp-Mäusen mit denen aus den *Cx57-Knockout*-Mäusen verglichen. Insgesamt fließen pro Zelltyp und Genotyp jeweils zwei Zellen in die Auswertung ein. Dabei werden die Zapfen-Bipolarzell-Typen 5 und 7 verglichen sowie die Stäbchen-Bipolarzellen.

Es wurden Retinaquerschnitte mit Vollfeldblitzen einer grünen LED (siehe Kapitel 2.4.2.) stimuliert. Die Dauer des Reizes wurde auf 500 ms festgesetzt und die Intensität über einen Bereich von fünf logarithmischen Einheiten verändert. Zahlreichen Zellen wurden abgeleitet, und es wurde versucht, diese Zellen im Anschluss an das Experiment histologisch zu analysieren. Sofern die Zellen nicht mit der Messelektrode aus dem Schnitt gezogen wurden (das kam in gut 50 % der Fälle vor) wurde dieser fixiert und dann mit einem Calretinin-Antikörper inkubiert. So ließ sich der potentielle Bipolarzelltyp anhand der Stratifizierung innerhalb der IPL (Ghosh *et al.*, 2004), die durch den Calretinin-Antikörper in spezifischer Weise angefärbt wurde, ermitteln.

Bei den Ergebnissen wird zwischen den exzitatorischen und inhibitorischen Strömen unterschieden, wobei die Kaliumströme wegen der Substitution von Kalium gegen Cäsium in der Intrazellulärlösung keine Rolle spielten. Das heißt, dass es sich bei den exzitatorischen Strömen, die bei einem Haltepotential von -60 mV gemessen wurden, maßgeblich um Einwärtsströme von Natrium und Calcium handelt, da bei dieser Spannung etwa das Chlorid-Gleichgewichtspotential erreicht wird. Die inhibitorischen Ströme werden maßgeblich von Chlorid vermittelt. Um den Chlorid-Einwärtsstrom zu messen, wurde bei einem Kationen-Gleichgewichtspotential von 0 mV gemessen.

3.2.1. Lichtantworten der Zapfen-Bipolarzellen vom Typ 5

Die gemessenen Zellen des Typs 5 der Bipolarzellen zeigten eine Stratifizierung in der dritten Schicht der IPL. Das heißt, dass die Axonterminalien zwischen der zweiten und dritten Calretinin-Bande endeten (siehe Abbildung 19 A). Auf Lichtreize zeigten diese Zellen bei unterschiedlichen Haltepotentialen verschiedene Lichtantworten. In den Wildtyp-Mäusen kehrte sich bei diesem Zelltyp der Lichtstrom bei ca. -50 bis -60 mV um (Abb. 19 B). Auch der gemessene Strom wies ein größeres Rauschen auf, je weiter das Haltepotential stieg. Maß man beim Chlorid-Gleichgewichtspotential von -60 mV die Ströme, die auf den Lichtreiz folgten, dann ließ sich auch bei hoher Lichtintensität keine Lichtantwort erkennen (Abb. 19 C). Die inhibitorischen Chloridströme, die bei einem Haltepotential von 0 mV in Folge eines Lichtreizes gemessen werden konnten, erreichten ihre Maximalantwort bei einer Lichtintensität von 10^3 Photonen $\cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (vergl. Abb. 19 D). In Abbildung 19 E ist die normalisierte inhibitorische Lichtantwort gegen die Lichtintensität aufgetragen. Der dynamische Bereich dieses Zelltyps befand sich zwischen Photonenflussdichten von 10^2 bis 10^3 Photonen $\cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Gleichermaßen verhielten sich die gemessenen Typ 5 Bipolarzellen in den Cx57-KO-Mäusen. Das Umkehrpotential der Lichtantworten lag ebenso zwischen -50 bis -60 mV (Abb. 20 A). Im aufgeführten Beispiel war es zwar möglich exzitatorische Lichtantworten bei einem Haltepotential von -60 mV zu messen (Abb. 20 C), doch insgesamt waren diese Ströme sehr schwer zu erfassen. Der dynamische inhibitorische Bereich der Typ 5 Bipolarzelle befand sich auch in der Cx57-KO-Maus zwischen 10^2 bis 10^3 Photonen $\cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (vergl. Abb. 20 B und D).

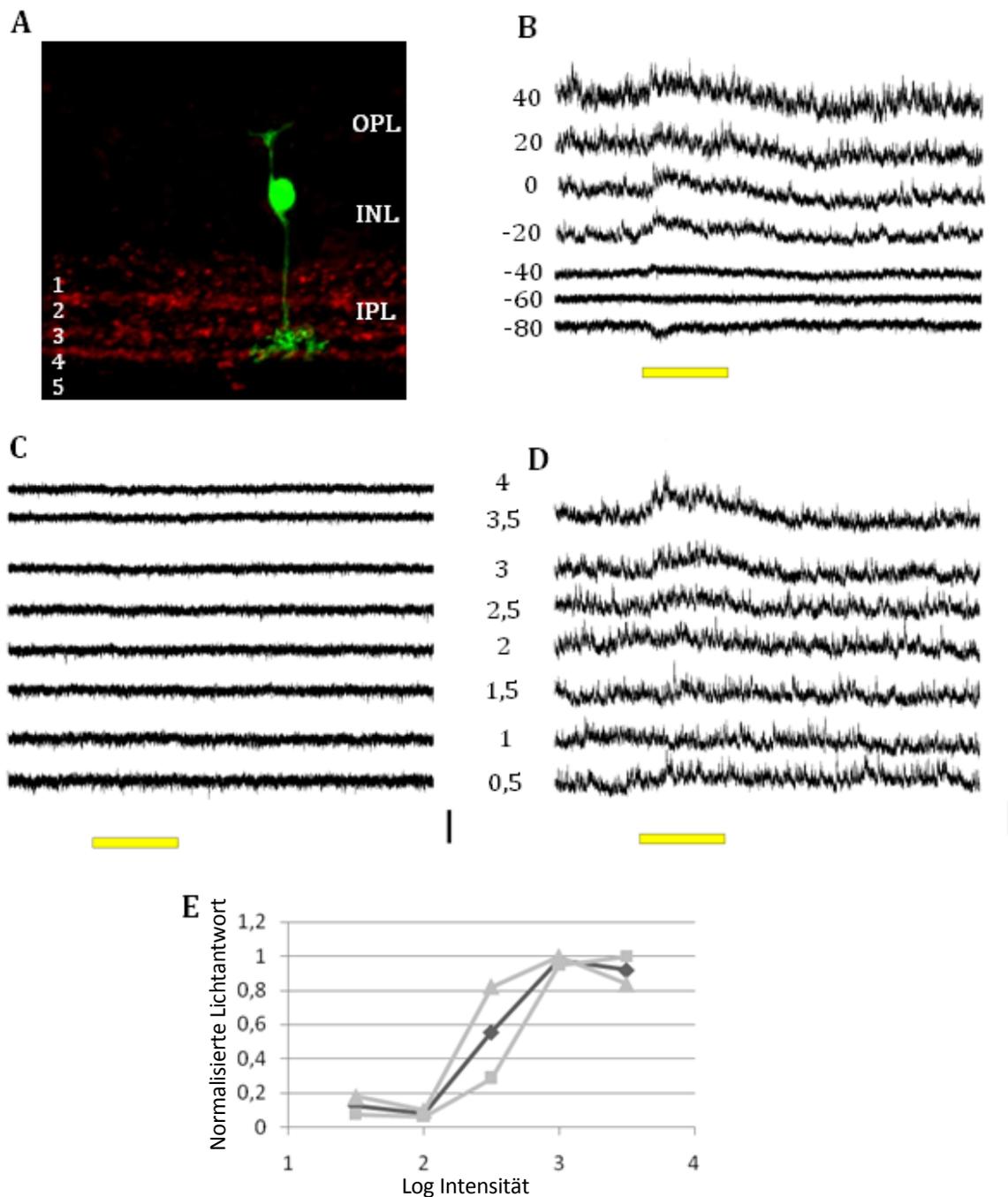


Abbildung 19: Lichtantworten der Typ 5 Bipolarzelle (WT). **A:** Immunhistologische Aufnahme einer gemessenen Typ 5 Bipolarzelle (grün: Lucifer Yellow, rot: Calretinin), die Nummerierung der IPL entspricht den einzelnen Sublamina; **B:** Lichtantworten bei unterschiedlichen Haltepotentialen; **C:** Lichtantworten bei E_{Cl} von -60 mV; **D:** Inhibitorische Lichtantwort bei 0 mV; **E:** Normalisierte Lichtantwort der inhibitorischen Ströme, aufgetragen gegen den dekadischen Logarithmus der Lichtintensität (heller Graph entspricht den Originaldaten, ■ Zelle 1, ▲ Zelle 2; dunkel repräsentiert den Mittelwert). Horizontaler Balken \cong 500 ms; Senkrechter Balken \cong 20 pA.

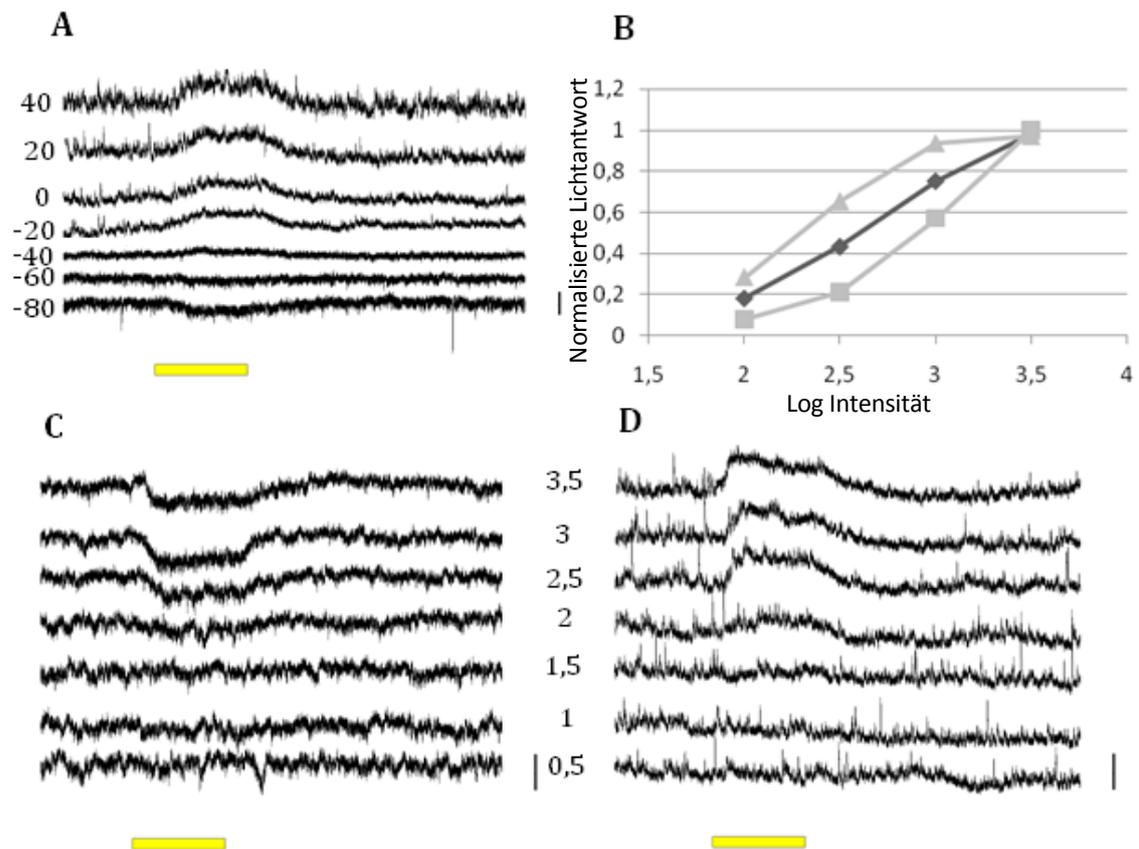


Abbildung 20: Lichtantworten der Typ 5 Bipolarzelle (KO). In **A** sind die Lichtantworten bei unterschiedlichen Haltepotentialen gezeigt; **B**: Normalisierte inhibitorische Lichtantwort aufgetragen gegen den dekadischen Logarithmus der Lichtintensität (heller Graph entspricht den Originaldaten, ▲ Zelle 1, ■ Zelle 2; dunkel repräsentiert den Mittelwert); **C**: Lichtantworten bei E_{Cl} von -60 mV; **D**: Inhibitorische Lichtantwort bei 0 mV. Horizontaler Balken \cong 500 ms; Senkrechter Balken \cong 20 pA.

3.2.2. Lichtantworten der Zapfen-Bipolarzellen vom Typ 7

Die Zapfen-Bipolarzellen des Typs 7 stratifizieren in die Schicht 4 und 5 der IPL. Ein Beispiel einer gemessenen Zelle dieses Typs ist in Abbildung 21 dargestellt. Das Axonterminal befindet sich direkt unter dem dritten Calretinin-Band (Abb. 21 A, vergleiche auch Abb. 2).

Die Typ 7 Bipolarzellen in der Wildtyp-Maus zeigten im Vergleich zur Typ 5 Bipolarzelle einen etwas größeren Dynamikbereich in ihren inhibitorischen lichtinduzierten Strömen. Dieser ließ sich auf einen Bereich von 10^2 bis $10^{3,5}$ Photonen $\cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ festlegen (Abb. 21 B, vergl. auch 21 D). Der Nachweis von lichtinduzierten exzitatorischen Strömen ließ sich bei dieser Untersuchung nicht führen (Abb. 21 C).

Die Typ 7 Bipolarzellen im Cx57-KO wiesen im Vergleich zu den Zellen in der Wildtyp-Maus keinen Unterschied auf. Das Umkehrpotential der Lichtantwort bewegte sich zwischen ca. -50 bis -60 mV. Bei -80 mV ließ sich ein messbarer Einwärtsstrom erkennen (Abb. 22 A). Während die exzitatorischen Ströme bei -60 mV schwer nachweisbar waren, zeigten die inhibitorischen lichtinduzierten Ströme bei einem Haltepotential von 0 mV eine gut messbare Amplitude (Abb. 22 B und D). Der dynamische Bereich dieses Bipolarzelltyps in der Cx57-KO-Maus lag in einem zur Wildtyp-Maus vergleichbaren Bereich von 10^2 bis $10^{3,5}$ Photonen $\cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

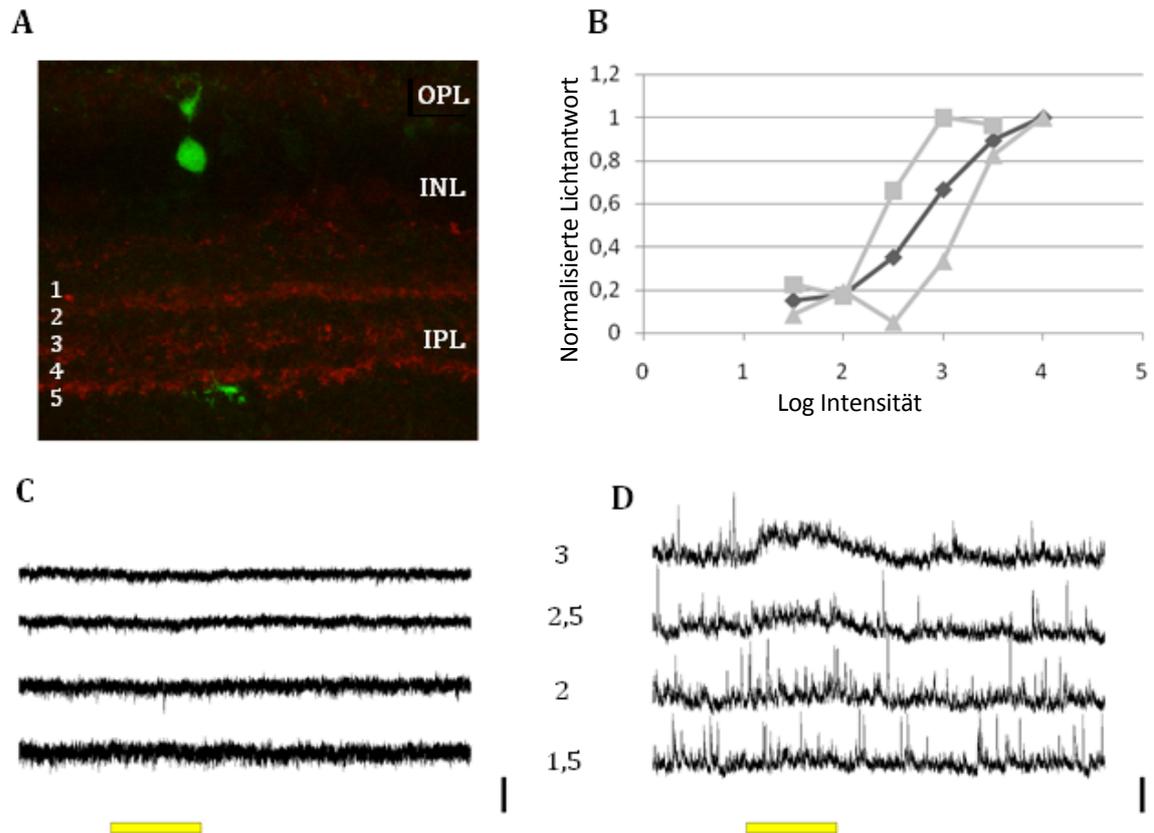


Abbildung 21: Lichtantworten der Typ 7 Bipolarzelle (WT). Die Abbildung **A** zeigt eine Typ 7 Bipolarzelle, deren Axon direkt unter der dritten Calretinen-Bande endet. In **B** sind die inhibitorischen Ströme gegen den Logarithmus der Lichtintensität aufgetragen. (heller Graph entspricht den Originaldaten, ▲ Zelle 1, ■ Zelle 2; dunkel repräsentiert den Mittelwert); **C** zeigt ein Beispiel bei dem keine exzitatorischen Ströme gemessen werden konnten. Abbildung **D** zeigt die inhibitorischen lichtinduzierten Ströme. Horizontaler Balken \cong 500 ms; Senkrechter Balken \cong 20 pA.

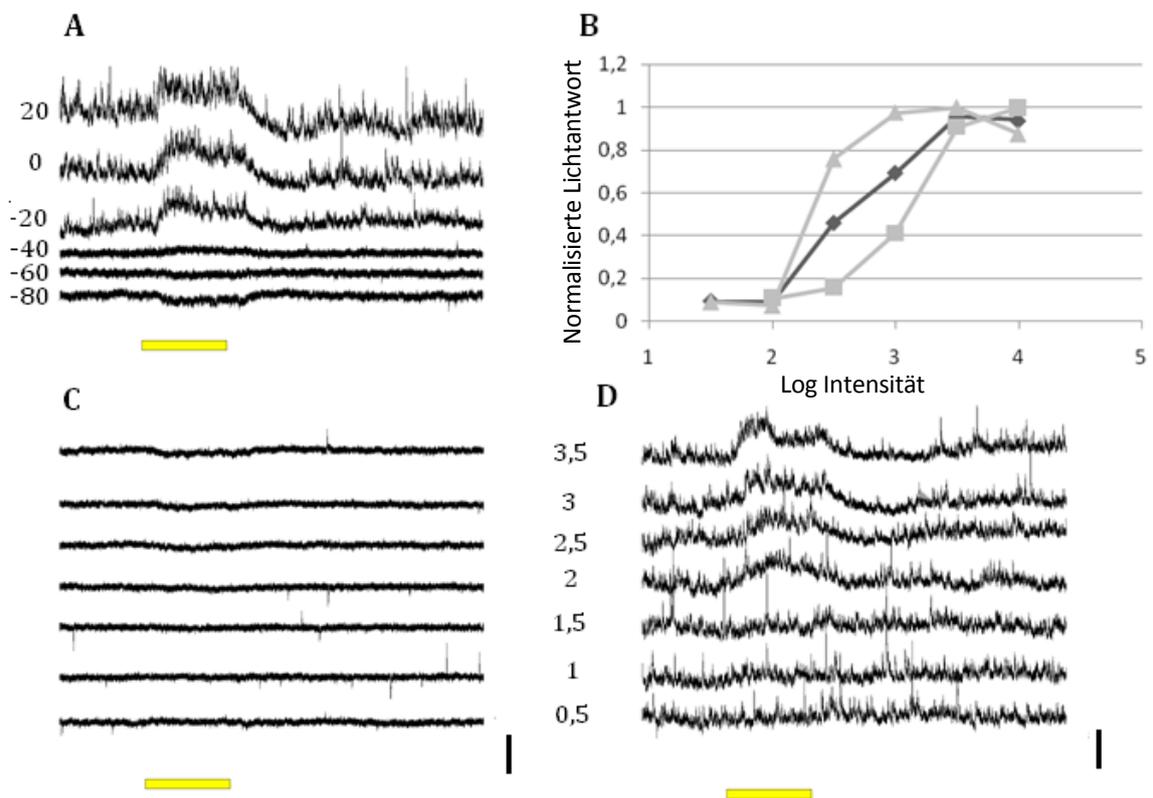


Abbildung 22: Lichtantworten der Typ 7 Bipolarzelle (KO). In Abbildung A sind die bei verschiedenen Haltpotentialen gemessenen lichtinduzierten Ströme gezeigt; B zeigt die inhibitorischen Ströme gegen den Logarithmus der Lichtintensität aufgetragen. (heller Graph entspricht den Originaldaten, ▲ Zelle 1, ■ Zelle 2; dunkel repräsentiert den Mittelwert). Horizontaler Balken \cong 500 ms; Senkrechter Balken \cong 20 pA.

3.2.3. Lichtantworten der Stäbchen-Bipolarzellen

Die Mausretina ist stäbchendominiert. Daher sind die Stäbchen-Bipolarzellen auch die am häufigsten vertretenen Bipolarzellen in der Mausretina (Rodieck, R. W. 1973). Dieser Bipolarzelltyp erhält Eingänge von den Zapfen und stratifiziert in das unterste Ende der IPL an der Grenze zur Ganglienzellschicht (Abb. 23 A). Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Stäbchen zeigten die Stäbchen-Bipolarzellen im Vergleich zu den bereits vorgestellten Typen von Zapfen-Bipolarzellen bei wesentlich geringeren Lichtintensitäten schon Lichtantworten. Diese ließen sich durch Erhöhung des Haltepotentials vergrößern (Abb. 23 B). In dieser Untersuchung konnten allerdings auch für die Stäbchen-Bipolarzellen nur äußerst selten exzitatorische Lichtströme beobachtet werden (vergl. Abb. 23 C). Der dynamische Bereich der inhibitorischen Ströme, gemessen beim Kationen-Gleichgewichtspotential, begann ab $10^{1,5}$ Photonen $\cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Die Maximalantwort war bei $10^{2,5}$ Photonen $\cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ erreicht (vergl. Abb. 23 D und E).

Wie bei den vorher erwähnten Zapfen-Bipolarzell-Typen zeigte auch die Stäbchen-Bipolarzelle keinen messbaren Unterschied in ihren lichtinduzierten Strömen beim Vergleich von Wildtyp- und Cx57-KO-Mäusen. In dem in Abbildung 24 dargestellten Beispiel aus einer KO-Maus liegt das Umkehrpotential der Lichtantworten zwischen -50 bis -60 mV (A). Die gemessene Stäbchen-Bipolarzelle zeigt neben den inhibitorischen Lichtantworten (Abb. 24 D) auch schwache, erst bei starker Lichtintensität zu beobachtende exzitatorische Lichtantworten (Abb. 24 C). Der dynamische Bereich der inhibitorischen Ströme, gemessen beim Kationen-Gleichgewichtspotential, bewegte sich zwischen $10^{1,5}$ Photonen $\cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ und $10^{2,5}$ Photonen $\cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

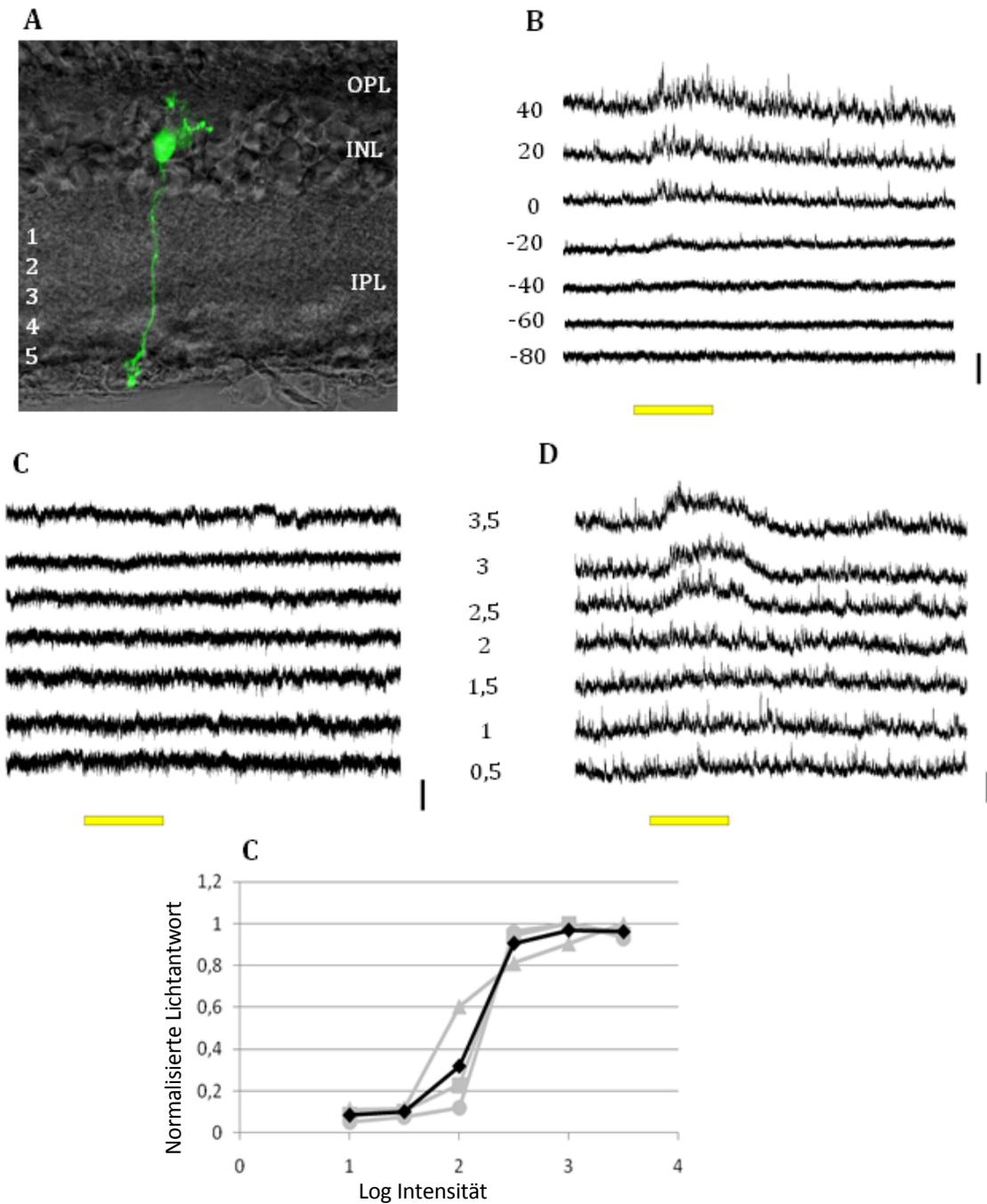


Abbildung 23: Lichtantworten der Stäbchen-Bipolarzelle (WT). **A:** Immunhistologische Aufnahme einer gemessenen Stäbchen-Bipolarzelle (grün: Lucifer Yellow, rot: Calretinin), die Nummerierung der IPL entspricht den einzelnen Sublamina; **B:** Lichtantworten bei unterschiedlichen Haltepotentialen; **C:** Lichtantworten bei E_{Cl} von -60 mV; **D:** Inhibitorische Lichtantwort bei 0 mV; **E:** Normalisierte Lichtantwort der inhibitorischen Ströme, aufgetragen gegen den dekadischen Logarithmus der Lichtintensität (heller Graph entspricht den Originaldaten, ■ Zelle 1, ▲ Zelle 2; dunkel repräsentiert den Mittelwert). Horizontaler Balken \cong 500 ms; Senkrechter Balken \cong 20 pA.

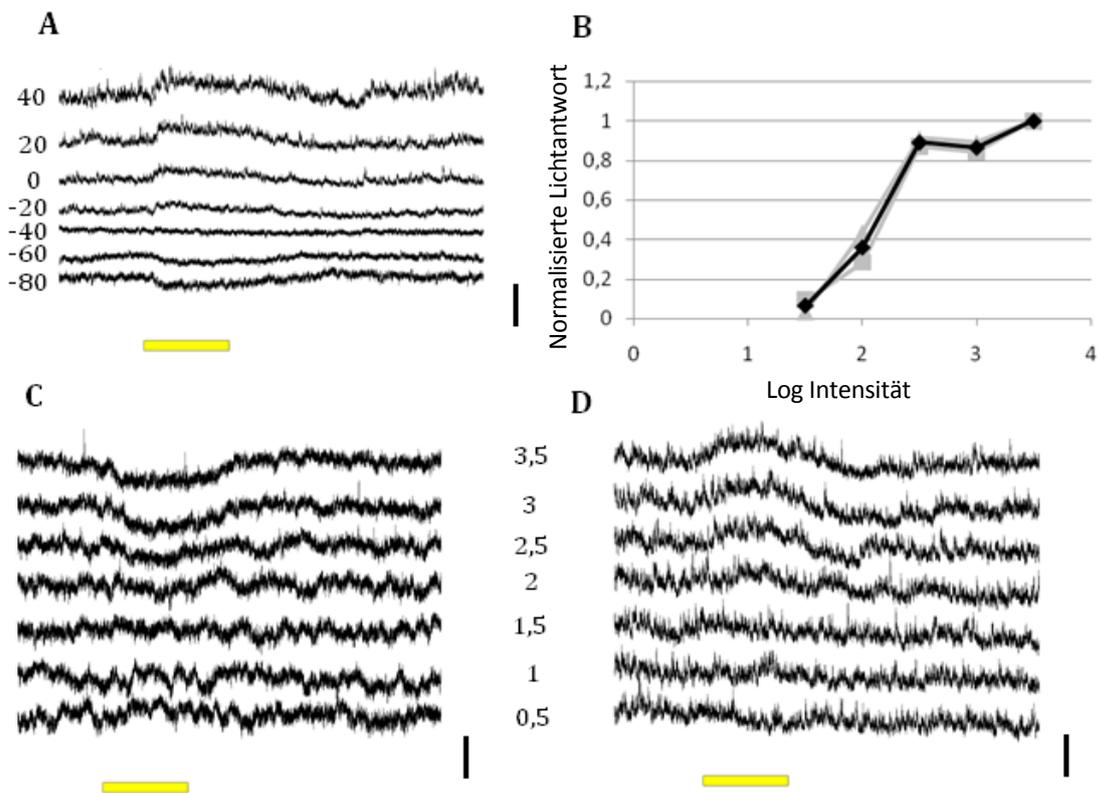


Abbildung 24: Lichtantworten der Stäbchen-Bipolarzelle (KO). **A:** Lichtantworten bei unterschiedlichen Haltepotentialen; **B:** Normalisierte Lichtantwort der inhibitorischen Ströme, aufgetragen gegen den dekadischen Logarithmus der Lichtintensität (heller Graph entspricht den Originaldaten, ■ Zelle 1, ▲ Zelle 2; dunkel repräsentiert den Mittelwert); **C:** Lichtantworten bei E_{Cl} von -60 mV; **D:** Inhibitorische Lichtantwort bei 0 mV. Horizontaler Balken \cong 500 ms; Senkrechter Balken \cong 20 pA.

4. Diskussion

4.1. Einfluss des Cx57-Knockouts auf die Horizontalzellen

Horizontalzellen zeigen eine starke Kopplung durch *Gap Junctions*, die aus Cx57 aufgebaut werden. In der von Hombach *et al.* (2004) beschriebenen Cx57^{lacZ/lacZ} Maus ist diese Kopplung ausgeschaltet. Diese Maus bot sich also an, um den Einfluss der Kopplung auf die Zellen zu untersuchen, die die Signale der Photorezeptoren zu den Ganglienzellen als Ausgangsneurone der Retina übertragen. Da sich allerdings in den Studien zu den rezeptiven Feldern der Horizontalzellen von Shelley *et al.* (2007) herausgestellt hat, dass sich die Horizontalzellen durch den Verlust von Cx57 auch anderweitig verändert haben, musste diesem Umstand zunächst Rechnung getragen werden. Diese Veränderungen waren, dass die Zellen im Dunkeln depolarisierter waren als normal und einen geringeren Eingangswiderstand zeigten. Letzterer Punkt konnte in der hier vorliegenden Arbeit zunächst bestätigt werden. Da diese Eigenschaften an isolierten Zellen gemessen wurden, konnten alle Effekte anderer retinaler Neurone ausgeschlossen werden. In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass Cx57 Hemikanäle bilden kann und diese unter bestimmten Voraussetzungen auch offen sind (Palacios-Prado *et al.*, 2009). Dass allerdings der Verlust solcher potentiell funktionsfähigen Hemikanäle eine Erniedrigung des Membranwiderstands zur Folge hat, ist eher schwer vorstellbar. Vielmehr wäre eine Erhöhung des Widerstands durch den Wegfall dieses für Ionen durchlässigen Kanals denkbar. Es muss also eine andere Ursache für die Veränderung in den Cx57-Knockout-Mäusen geben.

In dieser Studie wurde nach geeigneten Kandidaten gesucht, die für diese Änderung der Membraneigenschaften verantwortlich gemacht werden könnten. Dazu zählen Ionenkanäle, Rezeptoren oder Ionentransporter. Einige Proteine aus diesen Gruppen wurden hier betrachtet. Mit dem Ergebnis, dass zum einen der für das Membranpotential der Horizontalzellen wichtige spannungsgesteuerte K⁺-Kanal *erg1* unverändert war. Dies zeigen die hier präsentierten histologischen Befunde, die durch die elektrophysiologischen Messungen klar bestätigt wurden. Zum Anderen gab es keine Abweichung in der Expression der für die Chlorid-Homöostase entscheidenden Kationen-Chlorid-Cotransporter NKCC1 und KCC2. Schließlich unterlagen auch die untersuchten Glutamaterezeptor-Untereinheiten keiner messbaren Veränderung, weder auf der anatomischen Ebene noch auf der funktionellen Ebene, die über die *Patch-Clamp* Ableitungen untersucht wurde. Des Weiteren gibt es allerdings noch eine Reihe anderer Proteine, die in Frage kommen und durchaus noch getestet werden könnten. Als

mögliche Rezeptoren könnte zum Beispiel der GABA-Rezeptor in Betracht gezogen werden. GABA(A) Rezeptoren wurden schon auf Horizontalzellen der Maus nachgewiesen (Feigenspan and Weiler, 2004). Einfache Versuche, bei denen GABA auf die Zellen appliziert wird, könnten Aufschluss über mögliche Veränderungen geben. Für den erniedrigten Eingangswiderstand sind jedoch vor allem Änderungen in der Ionenkanalzusammensetzung denkbar. Untersuchungen, die man anstellen könnte, um in dieser Richtung weiterzusuchen, wären neben immunhistologischen Vergleichen der elektrophysiologische Ansatz. Mit geeigneten Blockern oder zunächst einfach unter Substitution von Kalium könnten beispielsweise Ca^{2+} -Ströme gemessen werden. Entscheidender für die Frage nach der Funktion der Horizontalzellkopplung ist jedoch, welche Auswirkungen die Entkopplung auf die nachgeschalteten Zellen hat.

4.2. Rezeptive Felder von Bipolarzellen

Die Bipolarzellen formen zusammen mit den Horizontalzellen Synapsen mit den Photorezeptoren. Die Zapfen bilden hierzu eine Struktur, die man *Cone Pedicle* nennt. Hier invaginieren die Dendriten der Bipolarzellen und Horizontalzellen in die Axonendigung der Zapfen und können so parallel aktiviert werden. Dabei geht man klassischerweise davon aus, dass die Horizontalzellen einen *Feedback* auf die Photorezeptoren machen, wenn diese erregt werden (Baylor *et al.*, 1971). Dies hätte daraufhin wieder einen Einfluss auf die Bipolarzellen, die ihrerseits weniger von den Photorezeptoren aktiviert würden. Grundlage für dieses Modell ist eine Inhibition in der äußeren Retina, die auch über einen direkten *Feedforward* die Bipolarzellen inhibieren könnte. Unabhängig vom Mechanismus der Inhibition wird hier die Funktion der Kopplung bei einem solchen Prozess betrachtet. Misst man also einen Effekt in den Bipolarzellen durch die Entkopplung, wäre das ein indirekter Beweis, dass es diese Inhibition der Bipolarzellen direkt oder indirekt durch die Horizontalzellen gibt.

In den meisten von den in dieser Studie vorgestellten Bipolarzellen ließen sich keine oder nur sehr schwache exzitatorische lichtinduzierte Ströme nachweisen, während inhibitorische lichtinduzierte Ströme durchaus beobachtet werden konnten. Da die Bipolarzellen mit wenigen Dendriten die Photorezeptoren kontaktieren, liegt hier ein hohes Fehlerpotential aufgrund der methodischen Schwäche des Schnittpräparats. Einerseits kommt man ohne diese Technik nicht mit einer Patch-Elektrode an die Bipolarzellen heran, andererseits schneidet man ungewollt zu viele Zellverbindungen ab. Dieser Verlust von Zellkontakten führt unter anderem dazu, dass die gemessenen Bipolarzellen zu wenige Kontakte mit den Photorezeptoren haben und keine

exzitatorischen Lichtsignale mehr zeigen. Die inhibierenden Lichtsignale werden von Amakrinzellen und evtl. Horizontalzellen vermittelt. Diese summieren die Lichtantworten von einer Vielzahl von Photorezeptoren bzw. Bipolarzellen und sind somit robuster gegenüber einer Schädigung von Zellkontakten.

Es gibt eine Publikation über Lichtantworten von Bipolarzellen in der Mausretina, die zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Lichtantworten differenziert (Pang *et al.*, 2004). Vergleicht man die dynamischen Bereiche dieser Studie mit den hier vorliegenden Daten, so fällt auf, dass diese voneinander abweichen. Pang *et al.* (2004) bestimmten Empfindlichkeiten der Zapfen- und Stäbchenbipolarzellen, die 1 bis 2 logarithmische Einheiten empfindlicher sind. Dies kann einerseits damit zusammenhängen, dass die Wellenlängen des Lichtes für die Stimulation sich unterscheiden. Die Autoren wählten Licht mit der Wellenlänge von 500 nm, während in der vorliegenden Studie 520 nm verwendet wurde. Von Bedeutung hierbei ist sicher auch die Messung der Lichtintensität, die an der Stelle zu messen ist, an der sich das Präparat befindet. Da hierfür unterschiedliche Stimulationen sowie unterschiedliche Messinstrumente verwendet werden, lässt sich die exakte Vergleichbarkeit anzweifeln. Ein weiterer entscheidender Punkt ist aber der Adaptationszustand der Retina. Bei Pang *et al.* (2004) wurde unter Infrarotlicht gearbeitet, wohingegen hier schwaches sichtbares Rotlicht verwendet wird. Durch eine geringe Belichtung der Retina könnten die Zellen schon an hellere Lichtverhältnisse angepasst sein und wären dementsprechend unempfindlicher. Übereinstimmend ist allerdings die Tatsache, dass die inhibitorischen Lichtantworten robuster und empfindlicher sind als die exzitatorischen.

Betrachtet man nun die Ergebnisse im Hinblick auf die Fragestellung, so muss man feststellen, dass die Kopplung der Horizontalzellen keinen Einfluss auf die inhibitorischen Lichtströme der Bipolarzellen zu haben scheint. Die ursprüngliche These, dass ein inhibierendes Signal aus dem Umfeld der Bipolarzelle über die Kopplung der Horizontalzellen in der äußeren plexiformen Schicht zu den Bipolarzellen gelangt, kann nicht bestätigt werden. Der Grad der Kopplung der Horizontalzellen hängt allerdings vom Adaptationszustand der Retina ab (Xin and Bloomfield, 1999b). Das heißt, dass in den Wildtyp-Mäusen die Gap Junctions zwischen den Horizontalzellen bei den untersuchten Lichtbedingungen durchaus geschlossen gewesen sein könnten und sich aus diesem Grund kein Unterschied zu den Messungen der Cx57-KO-Mäuse feststellen ließ. Da jedoch in dieser Studie die allgemeine Helligkeit nicht variiert wurde, kann diese These auch nicht generell verworfen werden. Vielmehr wäre die Variation der Hintergrundhelligkeit entscheidend für die Klärung dieser Frage.

Allerdings zeigt eine weitere Studie zu den rezeptiven Feldern von Bipolarzellen in der Salamander-Retina (Zhang and Wu, 2009), dass in den ON-Bipolarzellen sowohl über chemische als auch über elektrische Synapsen ein inhibitorisches Umfeld von den Horizontalzellen generiert werden kann. Dabei ist der Ursprung des inhibitorischen Umfelds abhängig vom Bipolarzelltyp. So erfahren die Zapfen dominierten ON-Bipolarzellen sowohl eine Inhibition durch die Horizontalzellen auf chemischem Weg als auch direkt über eine elektrische Kopplung mit den Horizontalzellen, während die anderen ON-Bipolarzellen nur neurotransmittervermittelt durch die Horizontalzellen inhibiert werden. Sollte dies für die Mausretina ebenso zutreffen, dann habe ich in meiner Studie entweder noch nicht die Bipolarzellen gemessen, die eine Umfeldinhibition durch die Horizontalzellen erhalten oder der Einfluss der Horizontalzellkopplung bzw. Entkopplung hat keinen Effekt auf diesen Mechanismus. Fraglich ist auch, ob sich die Bipolarzell-Typen von Salamandern und Mäusen überhaupt vergleichen lassen. Die Bipolarzellen der Salamander-Retinen scheinen einen mehr gemischten Input der Zapfen und Stäbchen zu bekommen, während die Bipolarzellen der Mausretina sich besser in Zapfen- und Stäbchenbipolarzellen einteilen lassen. Jedoch lässt letztere Vorstellung auch langsam nach. Zum Beispiel ließen sich schon Kontakte der OFF-Zapfen-Bipolarzellen zu Stäbchen nachweisen (Haverkamp *et al.*, 2008). Zu dem hat man in der Mausretina noch keine elektrische Kopplung von Bipolar- und Horizontalzellen beobachten können, wie sie in der Salamander-Retina nachgewiesen ist (Zhang *et al.*, 2006). Es konnten generell in der Mausretina für Bipolarzellen noch keine antagonistisch organisierten rezeptiven Felder nachgewiesen werden (Berntson and Taylor, 2000), wie sie in der Salamander-Retina zu finden sind.

Geht man jedoch davon aus, dass es eine *Feedforward*-Inhibition von den Horizontalzellen auf die Bipolarzellen gibt, die durch die Kopplung nicht beeinflusst ist, so sollte man dennoch einen Unterschied in den Lichtantworten der Bipolarzellen in Retinen der Wildtyp-Mäuse und der der Cx57-KO- Mäuse sehen, da die wichtigen Eigenschaften wie Eingangswiderstand und Ruhemembranpotential in den Horizontalzellen durch die Deletion von Cx57 verändert sind. Da dieser Unterschied hier jedoch nicht gefunden wird, ist es wahrscheinlicher, dass der maßgebliche inhibierende Einfluss auf die Bipolarzellen von den Amakrinzellen in der inneren plexiformen Schicht der Retina generiert wird. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass Lagali *et al.*, (2008) in Retinen mit degenerierter äußerer Retina noch Ganglienzellantworten mit intaktem Zentrums-Umfeld Antagonismus messen konnten. In diesen rd1 Tieren, die eine Degeneration zunächst der äußeren Retina zeigen, waren die ON-Bipolarzellen durch eine weitere genetische Manipulation erfolgreich zu lichtsensitiven Zellen umfunktioniert worden. Dies führte zu Retinen, in denen Lichtreaktionen wieder hergestellt werden konnten (Berntson and

Taylor, 2000; Lagali *et al.*, 2008). Die Generierung des inhibierenden Umfeldes scheint in der Mausretina daher also eher in der inneren Retina durch die Amakrinzellen zu erfolgen.

4.3. Funktion der Horizontalzellkopplung

Die hier bearbeitete Fragestellung lautete: Welche Funktion hat die Kopplung der Horizontalzellen für die nachgeschalteten Neurone, wie die Bipolarzellen? Mit den vorgestellten Ergebnissen könnte man die Frage dahingehend beantworten, dass die Kopplung keine Funktion für die Bipolarzellen hat. Jedoch ist zu bedenken, dass in dieser Studie, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, nur eine geringe Zahl von Bipolarzellen gemessen wurde und die anderen nicht gemessenen Bipolarzellen durchaus einem Einfluss der Kopplung unterliegen könnten. Zum anderen ist möglicherweise die Art der Stimulation nicht geeignet um diese Umfeldeffekte zu zeigen. Bei den verwendeten Vollfeldblitzen könnte der Einfluss des Zentrums so dominierend sein, dass die Umfeldinhibition sowieso nicht ins Gewicht fiele. Es bietet sich also noch reichlich Potential für weitergehende Studien in dieser Richtung. Möglicherweise sind aber auch die rezeptiven Felder der Bipolarzellen zu klein und der Effekt macht sich erst bemerkbar bei Zellen, die eine wesentlich größere Fläche abdecken, wie die Ganglienzellen. Hier besteht zusätzlich noch der Ansatz, dass adaptive Prozesse der Ganglienzellen mit dem Grad der Kopplung der Horizontalzellen einhergehen. Grundsätzlich verändert sich das Antwortverhalten der Ganglienzellen auf räumliche Frequenzen mit dem Adaptationszustand. Mit Erhöhung der Intensität des Umgebungslichtes von scotopischen zu photopischen Helligkeiten reagieren die Ganglienzellen zunehmend auf räumlich niederfrequenteren Lichtreize (Barlow *et al.*, 1957; Smirnakis *et al.*, 1997). Dieser *Shift* der räumlichen Empfindlichkeit der Ganglienzellen ist vermutlich auf die Veränderung des Umfeldes im rezeptiven Feld zurückzuführen, welches vermutlich durch die Horizontalzellen beeinflusst wird. Deren Grad der Kopplung hängt ebenfalls von der gegebenen Umgebungslichtintensität ab. (Mangel and Dowling, 1985). Um den Einfluss der Kopplung von Horizontalzellen auf die rezeptive Felder von Ganglienzellen in Retinen von Cx57-defizienten Mäusen zu untersuchen, wurden bereits Multielektrodenableitungen von Ganglienzellen durchgeführt (Dedek *et al.*, 2008). Man fand jedoch keinen Unterschied im räumlichen *Tuning* der Ganglienzellen sowie bei dessen Veränderung von geringen zu hohen räumlichen Frequenzen mit sich ändernder Lichtintensität. Dies deutet darauf hin, dass die Kopplung der Horizontalzellen auch keine entscheidende Rolle im Zentrums-Umfeld-Antagonismus der rezeptiven Felder der

Ganglienzellen spielt. Wenn nun tatsächlich die Kopplung keinen Einfluss auf die rezeptiven Felder von Bipolar- und Ganglienzellen hat, stellt sich wieder die Frage wofür das Ganze dann gut ist und was die Horizontalzellen überhaupt machen.

In einer Studie, in der die Folgen eines Verlustes der Horizontalzellen untersucht wurden zeigt sich dramatisches. Die Autoren berichten von einer neuen Maus, in der eine induzierbare Ablation von Horizontalzellen möglich ist. Durch die Expression des humanen Diphtherie Toxin Rezeptors unter der Kontrolle des Cx57-Promotors lassen sich im adulten Tier durch Gabe des Diphtherie Toxins die Horizontalzellen selektiv abtöten (Janssen-Bienhold *et al.*, 2009a). Dies hat zur Folge, dass die Photorezeptorsynapse ihre komplexe Struktur einbüßt. In der Fortsetzung degenerieren Photorezeptoren und schließlich Bipolarzellen. Das Elektroretinogram zeigt schließlich auch einen Verlust der B-Welle, die normalerweise die Ströme der Bipolarzellen repräsentiert. Diese Arbeiten zeigen sehr schön, dass den Horizontalzellen eine sehr wichtige Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung der komplexen Strukturen in der äußeren Retina zukommt. Man könnte also provokativ spekulieren, dass die Horizontalzellen weniger einen Betrag bei der Verarbeitung der visuellen Signale leisten, als vielmehr Glia-ähnliche Funktionen zeigen. Die Befunde aus zahlreichen Studien über diesen Zelltyp, in denen spezifische neuronale Reaktionen gemessen wurden, sprechen allerdings gegen diese Hypothese. Zum Beispiel gibt es komplexe spektrale Abhängigkeiten (Twig *et al.*, 2003), zahlreiche Möglichkeiten der Modulation der Kopplung (Weiler *et al.*, 2000) aber vor allem eine eindeutige Reaktion auf einen Lichtreiz, die schon in den frühen elektrophysiologischen Arbeiten über die Retina gemessen werden konnten (Kaneko, 1970). Horizontalzellen sind also Neurone der Retina, über die schon viele interessante Details herausgefunden werden konnten. Ganz verstanden hat man die Funktion dieser Zellen aber bis heute nicht.

5. Literatur

- Ames A, Nesbett FB. 1981. INVITRO RETINA AS AN EXPERIMENTAL-MODEL OF THE CENTRAL NERVOUS-SYSTEM. *Journal of Neurochemistry* 37(4):867-877.
- Ammermüller J, Kolb H. 1995. THE ORGANIZATION OF THE TURTLE INNER RETINA .1. ON-CENTER AND OFF-CENTER PATHWAYS. *Journal of Comparative Neurology* 358(1):1-34.
- Barlow HB, Fitzhugh R, Kuffler SW. 1957. Change of organization in the receptive fields of the cat's retina during dark adaptation. *Journal of Physiology* 137(3):338-354.
- Barlow HB, Hill RM. 1963. SELECTIVE SENSITIVITY TO DIRECTION OF MOVEMENT IN GANGLION CELLS OF RABBIT RETINA. *Science* 139(355):412-&.
- Baylor DA, Fuortes MGF, Obryan PM. 1971. RECEPTIVE FIELDS OF CONES IN RETINA OF TURTLE. *Journal of Physiology-London* 214(2):265-&.
- Bennett MVL, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Saez JC. 1991. GAP-JUNCTIONS - NEW TOOLS, NEW ANSWERS, NEW QUESTIONS. *Neuron* 6(3):305-320.
- Berntson A, Taylor WR. 2000. Response characteristics and receptive field widths of on-bipolar cells in the mouse retina. *Journal of Physiology-London* 524(3):879-889.
- Blaesse P, Guillemain I, Schindler J, Schweizer M, Delpire E, Khiroug L, Friauf E, Nothwang HG. 2006. Oligomerization of KCC2 correlates with development of inhibitory neurotransmission. *Journal of Neuroscience* 26(41):10407-10419.
- Bloomfield SA, Dacheux RF. 2001. Rod vision: Pathways and processing in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 20(3):351-384.
- Bloomfield SA, Volgyi B. 2004. Function and plasticity of homologous coupling between All amacrine cells. *Vision Research* 44(28):3297-3306.
- Bloomfield SA, Volgyi B. 2009. The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. *Nature Reviews Neuroscience* 10(7):495-506.
- Bolte P, Janssen-Bienhold U, Feigenspan A, Weiler R. 2008. Analysis of the molekular basis of gap junctional communication between rod and cone photoreceptors in the mouse retina. *FASEB Summer Research Conference: Retinal Neurobiology and Visual Processing; Snowmass, Colorado.*
- Cherubini E, Gaiarsa JL, Benari Y. 1991. GABA - AN EXCITATORY TRANSMITTER IN EARLY POSTNATAL LIFE. *Trends in Neurosciences* 14(12):515-519.
- Cook JE, Becker DL. 1995. GAP-JUNCTIONS IN THE VERTEBRATE RETINA. *Microscopy Research and Technique* 31(5):408-419.
- Deans MR, Volgyi B, Goodenough DA, Bloomfield SA, Paul DL. 2002. Connexin36 is essential for transmission of rod-mediated visual signals in the mammalian retina. *Neuron* 36(4):703-712.
- Dedek K, Pandarinath C, Alam NM, Wellershaus K, Schubert T, Willecke K, Prusky GT, Weiler R, Nirenberg S. 2008. Ganglion cell adaptability: does the coupling of horizontal cells play a role? *PLoS ONE* 3(3):e1714.
- Dedek K, Schultz K, Pieper M, Dirks P, Maxeiner S, Willecke K, Weiler R, Janssen-Bienhold U. 2006. Localization of heterotypic gap junctions composed of connexin45 and

- connexin36 in the rod pathway of the mouse retina. *European Journal of Neuroscience* 24(6):1675-1686.
- DeVries SH, Qi XF, Smith R, Makous W, Sterling P. 2002. Electrical coupling between mammalian cones. *Current Biology* 12(22):1900-1907.
- Duebel J, Haverkamp S, Schleich W, Feng GP, Augustine GJ, Kuner T, Euler T. 2006. Two-photon imaging reveals somatodendritic chloride gradient in retinal ON-type bipolar cells expressing the biosensor clomeleon. *Neuron* 49(1):81-94.
- Dulbecco R, Freeman G. 1959. PLAQUE PRODUCTION BY THE POLYOMA VIRUS. *Virology* 8(3):396-397.
- Famiglietti EV, Kolb H. 1975. BISTRATIFIED AMACRINE CELL AND SYNAPTIC CIRCUITRY IN INNER PLEXIFORM LAYER OF RETINA. *Brain Research* 84(2):293-300.
- Feigenspan A, Janssen-Bienhold U, Hormuzdi S, Monyer H, Degen J, Sohl G, Willecke K, Ammermüller J, Weiler R. 2004. Expression of connexin36 in cone pedicles and OFF-cone bipolar cells of the mouse retina. *Journal of Neuroscience* 24(13):3325-3334.
- Feigenspan A, Teubner B, Willecke K, Weiler R. 2001. Expression of neuronal connexin36 in All amacrine cells of the mammalian retina. *Journal of Neuroscience* 21(1):230-239.
- Feigenspan A, Trumpler J, Dirks P, Weiler R. 2009. Ether-A -gogo-related gene (*erg1*) potassium channels shape the dark response of horizontal cells in the mammalian retina. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 458(2):359-377.
- Feigenspan A, Weiler R. 2004. Electrophysiological properties of mouse horizontal cell GABA(A) receptors. *Journal of Neurophysiology* 92(5):2789-2801.
- Gauthier JL, Field GD, Sher A, Greschner M, Shlens J, Litke AM, Chichilnisky EJ. 2009. Receptive Fields in Primate Retina Are Coordinated to Sample Visual Space More Uniformly. *Plos Biology* 7(4):747-755.
- Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, Feigenspan A, Wässle H. 2004. Types of bipolar cells in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 469(1):70-82.
- Golard A, Witkovsky P, Tranchina D. 1992. MEMBRANE CURRENTS OF HORIZONTAL CELLS ISOLATED FROM TURTLE RETINA. *Journal of Neurophysiology* 68(2):351-361.
- Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. 1996. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual Review of Biochemistry* 65:475-502.
- Guo C, Stella SL, Hirano AA, Brecha NC. 2009. Plasmalemmal and Vesicular gamma-Aminobutyric Acid Transporter Expression in the Developing Mouse Retina. *Journal of Comparative Neurology* 512(1):6-26.
- Güldenagel M, Ammermüller J, Feigenspan A, Teubner B, Degen J, Söhl G, Willecke K, Weiler R. 2001. Visual transmission deficits in mice with targeted disruption of the gap junction gene connexin36. *Journal of Neuroscience* 21(16):6036-6044.
- Hack I, Frech M, Dick O, Peichl L, Brandstätter JH. 2001. Heterogeneous distribution of AMPA glutamate receptor subunits at the photoreceptor synapses of rodent retina. *European Journal of Neuroscience* 13(1):15-24.
- Han Y, Massey SC. 2005. Electrical synapses in retinal ON cone bipolar cells: Subtype-specific expression of connexins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(37):13313-13318.

- Haverkamp S, Specht D, Majumdar S, Zaidi N, Brandstatter J, Wasco W, Wässle H, Tom Dieck S. 2008. Type 4 OFF cone bipolar cells of the mouse retina express calsenilin and contact cones as well as rods. *Journal of Comparative Neurology* 507(1):1087-1101.
- He SG, Weiler R, Vaney DI. 2000. Endogenous dopaminergic regulation of horizontal cell coupling in the mammalian retina. *Journal of Comparative Neurology* 418(1):33-40.
- Hilgen G, Dedek K, von Maltzahn J, Willecke K, Weiler R. 2009. Subcompartmental distribution of Cx45 on bipolar cells in the mouse retina. Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society 2009.
- Hirano AA, Brandstatter JH, Brecha NC. 2005. Cellular distribution and subcellular localization of molecular components of vesicular transmitter release in horizontal cells of rabbit retina. *Journal of Comparative Neurology* 488(1):70-81.
- Hombach S, Janssen-Bienhold U, Sohl G, Schubert T, Bussow H, Ott T, Weiler R, Willecke K. 2004. Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. *European Journal of Neuroscience* 19(10):2633-2640.
- Hornstein EP, Verweij J, Li PH, Schnapf JL. 2005. Gap-junctional coupling and absolute sensitivity of photoreceptors in macaque retina. *Journal of Neuroscience* 25(48):11201-11209.
- Janssen-Bienhold U, Sonntag S, Schultz K, Wellershaus K, Willecke K, Weiler R. 2009a. Morphological and functional consequences of inducible ablation of retinal horizontal cells in living mice. Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society 2009.
- Janssen-Bienhold U, Trumpler J, Hilgen G, Schultz K, Muller LPD, Sonntag S, Dedek K, Dirks P, Willecke K, Weiler R. 2009b. Connexin57 Is Expressed in Dendro-dendritic and Axo-axonal Gap Junctions of Mouse Horizontal Cells and Its Distribution Is Modulated by Light. *Journal of Comparative Neurology* 513(4):363-374.
- Kaneko A. 1970. Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina. *Journal of Physiology* 207(3):623-633.
- Kepler J. 1604. *Ad Vitellionem Paralipomena, Quibus Astronomiae Pars Optica Traditur.*
- Kolb H, Famiglietti E. 1974. ROD AND CONE PATHWAYS IN INNER PLEXIFORM LAYER OF CAT RETINA. *Science* 186(4158):47-49.
- Kreuzberg MM, Willecke K, Bukauskas FF. 2006. Connexin-mediated cardiac impulse propagation: Connexin 30.2 slows atrioventricular conduction in mouse heart. *Trends in Cardiovascular Medicine* 16(8):266-272.
- Kuffler SW. 1953. DISCHARGE PATTERNS AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF MAMMALIAN RETINA. *Journal of Neurophysiology* 16(1):37-68.
- Lagali PS, Balya D, Awatramani GB, Munch TA, Kim DS, Busskamp V, Cepko CL, Roska B. 2008. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nature Neuroscience* 11(6):667-675.
- Lee EJ, Han JW, Kim HJ, Kim IB, Lee MY, Oh SJ, Chung JW, Chun MH. 2003. The immunocytochemical localization of connexin 36 at rod and cone gap junctions in the guinea pig retina. *European Journal of Neuroscience* 18(11):2925-2934.

- Li B, McKernan K, Shen W. 2008a. Spatial and temporal distribution patterns of Na-K-2Cl cotransporter in adult and developing mouse retinas. *Visual Neuroscience* 25(2):109-123.
- Li W, Zhang J, Massey SC. 2002. Coupling pattern of S1 and S2 amacrine cells in the rabbit retina. *Visual Neuroscience* 19(2):119-131.
- Li X, Kamasawa N, Ciolofan C, Olson CO, Lu S, Davidson KGV, Yasumura T, Shigemoto R, Rash JE, Nagy JI. 2008b. Connexin45-containing neuronal gap junctions in rodent retina also contain connexin36 in both apposing hemiplaques, forming bihomotypic gap junctions, with scaffolding contributed by zonula occludens-1. *Journal of Neuroscience* 28(39):9769-9789.
- Lin B, Jakobs TC, Masland RH. 2005. Different functional types of bipolar cells use different gap-junctional proteins. *Journal of Neuroscience* 25(28):6696-6701.
- Lu CB, McMahon DG. 1997. Modulation of hybrid bass retinal gap junctional channel gating by nitric oxide. *Journal of Physiology-London* 499(3):689-699.
- MacNeil MA, Masland RH. 1998. Extreme diversity among amacrine cells: Implications for function. *Neuron* 20(5):971-982.
- Mangel SC, Dowling JE. 1985. RESPONSIVENESS AND RECEPTIVE-FIELD SIZE OF CARP HORIZONTAL CELLS ARE REDUCED BY PROLONGED DARKNESS AND DOPAMINE. *Science* 229(4718):1107-1109.
- Masland RH. 2001a. Neuronal diversity in the retina. *Current Opinion in Neurobiology* 11(4):431-436.
- Masland RH. 2001b. The fundamental plan of the retina. *Nature Neuroscience* 4(9):877-886.
- Mataruga A, Kremmer E, Müller F. 2007a. Type 3a and type 3b OFF cone bipolar cells provide for the alternative rod pathway in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 502(6):1123-1137.
- Mataruga A, Kremmer E, Müller F. 2007b. Type 3a and type 3b OFF cone bipolar cells provide for the alternative rod pathway in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 502(6):1123-1137.
- Maxeiner S, Dedek K, Janssen-Bienhold U, Ammermüller J, Brune H, Kirsch T, Pieper M, Degen J, Krüger O, Willecke K, Weiler R. 2005. Deletion of connexin45 in mouse retinal neurons disrupts the rod/cone signaling pathway between All amacrine and ON cone bipolar cells and leads to impaired visual transmission. *Journal of Neuroscience* 25(3):566-576.
- McNaughton PA. 1990. LIGHT RESPONSE OF VERTEBRATE PHOTORECEPTORS. *Physiological Reviews* 70(3):847-883.
- Münch TA, da Silveira RA, Siebert S, Viney TJ, Awatramani GB, Roska B. 2009. Approach sensitivity in the retina processed by a multifunctional neural circuit. *Nat Neurosci.*
- Nelson R, Kolb H. 1983. SYNAPTIC PATTERNS AND RESPONSE PROPERTIES OF BIPOLAR AND GANGLION-CELLS IN THE CAT RETINA. *Vision Research* 23(10):1183-1195.
- O'Brien JJ, Li W, Pan F, Keung J, O'Brien J, Massey SC. 2006. Coupling between A-type horizontal cells is mediated by connexin 50 gap junctions in the rabbit retina. *Journal of Neuroscience* 26(45):11624-11636.
- Palacios-Prado N, Sonntag S, Skeberdis VA, Willecke K, Bukauskas FF. 2009. Gating, permselectivity and pH-dependent modulation of channels formed by connexin57,

- a major connexin of horizontal cells in the mouse retina. *Journal of Physiology-London* 587(13):3251-3269.
- Pan F, Keung J, Snuggs M, Kim I, O'Brien J, Massey S. 2007. Expression of connexin 57 by horizontal cell axon terminals in the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:E-Abstract 2848.
- Pan F, Massey SC. 2007. Rod and cone input to horizontal cells in the rabbit retina. *Journal of Comparative Neurology* 500(5):815-831.
- Pang JJ, Gao F, Wu SA. 2004. Light-evoked current responses in rod bipolar cells, cone depolarizing bipolar cells and All amacrine cells in dark-adapted mouse retina. *Journal of Physiology-London* 558(3):897-912.
- Paul DL. 1995. NEW FUNCTIONS FOR GAP-JUNCTIONS. *Current Opinion in Cell Biology* 7(5):665-672.
- Peichl L, Wässle H. 1983. THE STRUCTURAL CORRELATE OF THE RECEPTIVE-FIELD CENTER OF ALPHA-GANGLION CELLS IN THE CAT RETINA. *Journal of Physiology-London* 341(AUG):309-&.
- Piccolino M, Neyton J, Gerschenfeld HM. 1984. DECREASE OF GAP JUNCTION PERMEABILITY INDUCED BY DOPAMINE AND CYCLIC ADENOSINE 3'-5'-MONOPHOSPHATE IN HORIZONTAL CELLS OF TURTLE RETINA. *Journal of Neuroscience* 4(10):2477-2488.
- Pottek M, Schultz K, Weiler R. 1997. Effects of nitric oxide on the horizontal cell network and dopamine release in the carp retina. *Vision Research* 37(9):1091-1102.
- Pottek M, Weiler R. 2000. Light-adaptive effects of retinoic acid on receptive field properties of retinal horizontal cells. *European Journal of Neuroscience* 12(2):437-445.
- Pourcho RG, Goebel DJ. 1985. A COMBINED GOLGI AND AUTORADIOGRAPHIC STUDY OF (H-3) GLYCINE-ACCUMULATING AMACRINE CELLS IN THE CAT RETINA. *Journal of Comparative Neurology* 233(4):473-480.
- Pérez de Sevilla Müller L. 2008. Electrical synapses: Cellular morphology and identification of connexins in the mouse retina. Dissertation: C.v.O. Universität Oldenburg.
- Pérez de Sevilla Müller L, Dedek K, Janssen-Bienhold U, Kreuzberg M, Lorenz S, Willecke K, Weiler R. 2008. Expression and modulation of Connexin30.2, a novel gap junction protein in the mammalian retina. (Submitted 2008).
- Pérez de Sevilla Müller L, Kreuzberg MM, Maxeiner S, Lorenz S, Willecke K, Weiler R, Janssen-Bienhold U. 2007. Connexin30.2 is expressed by ganglion cells of the mouse retina. 31st Göttingen Neurobiology Conference.
- Raviola E, Gilula NB. 1973. GAP JUNCTIONS BETWEEN PHOTORECEPTOR CELLS IN VERTEBRATE RETINA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(6):1677-1681.
- Rieke F, Baylor DA. 1998. Single-photon detection by rod cells of the retina. *Reviews of Modern Physics* 70(3):1027-1036.
- Russell JM. 2000. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiological Reviews* 80(1):211-276.
- Schubert T, Degen J, Willecke K, Hormuzdi SG, Monyer H, Weiler R. 2005a. Connexin36 mediates gap junctional coupling of alpha-ganglion cells in mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 485(3):191-201.

- Schubert T, Maxeiner S, Kruger O, Willecke K, Weiler R. 2005b. Connexin45 mediates gap junctional coupling of bistratified ganglion cells in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 490(1):29-39.
- Schwartz EA. 2002. Transport-mediated synapses in the retina. *Physiological Reviews* 82(4):875-891.
- Shelley J, Dedek K, Schubert T, Feigenspan A, Schultz K, Hombach S, Willecke K, Weiler R. 2006. Horizontal cell receptive fields are reduced in connexin57-deficient mice. *European Journal of Neuroscience* 23(12):3176-3186.
- Smirnakis SM, Berry MJ, Warland DK, Bialek W, Meister M. 1997. Adaptation of retinal processing to image contrast and spatial scale. *Nature* 386(6620):69-73.
- Sohl G, Willecke K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man; 2003. p 173-180.
- Suzuki H, Pinto LH. 1986. RESPONSE PROPERTIES OF HORIZONTAL CELLS IN THE ISOLATED RETINA OF WILD-TYPE AND PEARL MUTANT MICE. *Journal of Neuroscience* 6(4):1122-1128.
- Söhl G, Maxeiner S, Willecke K. 2005. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nature Reviews Neuroscience* 6(3):191-200.
- Thoreson WB, Babai N, Bartoletti TM. 2008. Feedback from horizontal cells to rod Photoreceptors in vertebrate retina. *Journal of Neuroscience* 28(22):5691-5695.
- Trümpler J. 2007. PHYSIOLOGY AND MORPHOLOGY OF LATERAL NEURONAL NETWORKS IN THE MOUSE RETINA. Dissertation: C.v.O. Universität Oldenburg.
- Tsukamoto Y, Morigiwa K, Ueda M, Sterling P. 2001. Microcircuits for night vision in mouse retina. *Journal of Neuroscience* 21(21):8616-8623.
- Twig G, Levy H, Weiner E, Perlman I. 2003. Light adaptation and color opponency of horizontal cells in the turtle retina. *Visual Neuroscience* 20(4):437-452.
- Ueda Y, Kaneko A, Kaneda M. 1992. VOLTAGE-DEPENDENT IONIC CURRENTS IN SOLITARY HORIZONTAL CELLS ISOLATED FROM CAT RETINA. *Journal of Neurophysiology* 68(4):1143-1150.
- Van Wyk M, Wassle H, Taylor WR. 2009. Receptive field properties of ON- and OFF-ganglion cells in the mouse retina. *Visual Neuroscience* 26(3):297-308.
- Vaney DI. 1993. THE COUPLING PATTERN OF AXON-BEARING HORIZONTAL CELLS IN THE MAMMALIAN RETINA. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 252(1334):93-101.
- Vaney DI. 1994. PATTERNS OF NEURONAL COUPLING IN THE RETINA. *Progress in Retinal and Eye Research* 13(1):301-355.
- Vaney DI, Peichl L, Wassle H, Illing RB. 1981. ALMOST ALL GANGLION-CELLS IN THE RABBIT RETINA PROJECT TO THE SUPERIOR COLLICULUS. *Brain Research* 212(2):447-453.
- Vardi N, Zhang LL, Payne JA, Sterling P. 2000. Evidence that different cation chloride cotransporters in retinal neurons allow opposite responses to GABA. *Journal of Neuroscience* 20(20):7657-7663.
- Vessey JP, Stratis AK, Daniels BA, Da Silva N, Jonz MG, Lalonde MR, Baldrige WH, Barnes S. 2005. Proton-mediated feedback inhibition of presynaptic calcium channels at the cone photoreceptor synapse. *Journal of Neuroscience* 25(16):4108-4117.

- Volgyi B, Deans MR, Paul DL, Bloomfield SA. 2004. Convergence and segregation of the multiple rod pathways in mammalian retina. *Journal of Neuroscience* 24(49):11182-11192.
- Völgyi B, Chheda S, Bloomfield S. 2009. Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 512(5):664-687.
- Weiler R, Guldenagel M, Ammermuller J, Feigenspan A, Teubner B, Willecke K. 2001. Functional consequences of a lack of connexin36 in the mammalian retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42(4):3960.
- Weiler R, Pottek M, He S, Vaney DI. 2000. Modulation of coupling between retinal horizontal cells by retinoic acid and endogenous dopamine. *Brain Research Reviews* 32(1):121-129.
- Weiler R, Schultz K, Pottek M, Tieding S, Janssen-Bienhold U. 1998. Retinoic acid has light-adaptive effects on horizontal cells in the retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(12):7139-7144.
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G. 2002. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biological Chemistry* 383(5):725-737.
- Wässle H, Boycott BB. 1991. FUNCTIONAL ARCHITECTURE OF THE MAMMALIAN RETINA. *Physiological Reviews* 71(2):447-480.
- Wässle H, Peichl L, Boycott BB. 1981. DENDRITIC TERRITORIES OF CAT RETINAL GANGLION-CELLS. *Nature* 292(5821):344-345.
- Wässle H, Puller C, Müller F, Haverkamp S. 2009. Cone Contacts, Mosaics, and Territories of Bipolar Cells in the Mouse Retina. *Journal of Neuroscience* 29(1):106-117.
- Wässle H, Yamashita M, Greferath U, Grunert U, Müller F. 1991. THE ROD BIPOLAR CELL OF THE MAMMALIAN RETINA. *Visual Neuroscience* 7(1-2):99-112.
- Xin D, Bloomfield SA. 1999a. Effects of nitric oxide on the responses of horizontal cells in the rabbit retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40(4):1277B1185.
- Xin DY, Bloomfield SA. 1999b. Dark- and light-induced changes in coupling between horizontal cells in mammalian retina. *Journal of Comparative Neurology* 405(1):75-87.
- Zaghloul KA, Boahen K. 2004. Optic nerve signals in a neuromorphic chip I: Outer and inner retina models. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 51(4):657-666.
- Zhang A-J, Wu SM. 2009. Receptive fields of retinal bipolar cells are mediated by heterogeneous synaptic circuitry. *J Neurosci* 29(3):789-797.
- Zhang A-J, Zhang J, Wu SM. 2006. Electrical coupling, receptive fields, and relative rod/cone inputs of horizontal cells in the tiger salamander retina. *J Comp Neurol* 499(3):422-431.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
at al.	und Andere
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
ASCII	<i>American Standard Code for Information Interchange</i>
CCD	Charge Coupled Device
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
Cx	Connexin
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Medien
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
INL	<i>inner nuclear layer</i>
IPL	<i>inner plexiform layer</i>
IR	Infrarot
kHz	10 ³ Hertz
<i>lacZ</i>	Das <i>lacZ</i> -Gen codiert für das Enzym β -Galactosidase
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
Lösg.	Lösung
μm	Micrometer [10 ⁻⁶ m]
mg	Milligramm [10 ⁻³ g]
ml	Milliliter [10 ⁻³ l]
mM	Millimolar [10 ⁻³ mol/l]
nS	Nano Siemens [10 ⁻⁶ S]
OPL	<i>outer plexiform layer</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
RT	Raumtemperatur
U/ml	<i>Units</i> (ein μmol Substratumsatz pro Minute) pro Milliliter
Upm	Umdrehungen pro Minute

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeichnung der Retina von Santiago Ramón y Cajal um 1880	6
Abbildung 2: Bipolarzellen der Mausretina	7
Abbildung 3: Gap Junctions in der Retina	11
Abbildung 4: Die Kopplung der Horizontalzellen ist Abhängig von der Intensität des Hintergrundlichts	14
Abbildung 5: Versuchsaufbau.	20
Abbildung 6: Dissoziierte Zellen unter dem Mikroskop	22
Abbildung 7: Emissionsspektrum der roten LED	24
Abbildung 8 Emissionsspektrum der grünen LED	25
Abbildung 9: Steuerspannung für die Stimulations-LED	26
Abbildung 10: Verteilung des erg1-Kanals in der Retina	35
Abbildung 11: GluR2/3 Färbung im Retinaquerschnitt	35
Abbildung 12: GluR2/3 Färbung an dissoziierten Horizontalzellen	36
Abbildung 13: Verteilung von KCC2 in der Retina	38
Abbildung 14: Verteilung von NKCC1 in der Retina	39
Abbildung 15: Patch-Clamp Messungen isolierter Horizontalzellen	41
Abbildung 16: Depolarisierende Spannungssprünge lösen starke K^+ -Ströme aus.	42
Abbildung 17. Eingangswiderstände der Horizontalzellen	43
Abbildung 17: Durch Hyperpolarisation ausgelöste Ströme	44
Abbildung 18: Glutamatströme der Horizontalzellen	45
Abbildung 19: Lichtantworten der Typ 5 Bipolarzelle (WT)	48
Abbildung 20: Lichtantworten der Typ 5 Bipolarzelle (KO)	49
Abbildung 21: Lichtantworten der Typ 7 Bipolarzelle (WT)	51
Abbildung 22: Lichtantworten der Typ 7 Bipolarzelle (KO)	52
Abbildung 23: Lichtantworten der Stäbchen-Bipolarzelle (WT)	54
Abbildung 24: Lichtantworten der Stäbchen-Bipolarzelle (KO)	55

Lebenslauf

PERSÖNLICHES

Geburtsdatum 20.10.1978
Geburtsort Oldenburg
Familienstand Verheiratet, 2 Kinder
Nationalität Deutsch

AUSBILDUNG

1991 - 1995 Realschule Paulus- Schule Oldenburg
1995 - 1998 Fachgymnasium Ernährung und Hauswirtschaft
Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife
1999 - 2005 Biologiestudium an der C.v.O. Universität
Oldenburg. Abschluss: Diplom

WEHRDIENST

1998 – 1999 Grundwehrdienst bei den Fallschirmjägern

BERULICHE AKTIVITÄTEN

2005 – 2009 Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr.
Reto Weiler an der C.v.O. Universität Oldenburg
2006 – 2009 Assoziiertes Mitglied im Internationalen
Graduierten Kolleg Neurosensory Science and
Systems der C.v.O. Universität Oldenburg
Okt. - Dez. 2007 Auslandsaufenthalt am Baylor College of
Medicine, Department of Ophthalmology in
Houston, Texas bei Prof. Dr. Sam Wu

Oldenburg, den 29.09.2009

Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Frau Dr. Karin Dedek. Sie hat mir beigebracht, wie man Zellen mit Hilfe der *Patch Clamp* Technik erfolgreich ableitet. Sie stand mir beim Experimentieren, Auswerten und Schreiben bei. Sprich: Ohne sie wäre ich aufgeschmissen gewesen.

Meinem Betreuer Prof. Dr. Reto Weiler danke ich für das Vertrauen, das er in mich gesetzt hat und mir die Möglichkeit gegeben hat in dieser Arbeitsgruppe zu promovieren.

Herrn Prof. Dr. Henrik Mouritsen danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Für ihre Hilfe und Unterstützung gebührt Dank: Malte für hilfreiche technische Unterstützung, Bettina für die Herstellung von Kryoschnitten und Genotypisieren der Mäuse, Susanne für die Hilfe beim Dissoziieren von Zellen, Fritz für das Lösen von Computerproblemen, Ulrike, Konrad, Viola, Daniel, Gabriel, Hoto, Gerrit, Petra und Gabriele.

Aber mein größter Dank gilt meiner Frau. Sie hat mir den Rücken freigehalten, immer an mich geglaubt, mich unterstützt und mir vor Allem alle Freiheiten gegeben, um diese Arbeit realisieren zu können.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt, nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet und sie in dieser oder ähnlicher Form noch nicht anderweitig eingereicht habe.

Oldenburg, den 29.09.2009

Mario Pieper