

Charakterisierung von inhibitorischen, glyzinerger Synapsen bei Amakrinzellen der Säugernetzhaut

Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor der
Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Jan Weiß
geb. in Hannover

Mainz, 2007

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG:	5
II. MATERIAL UND METHODEN:	13
2.1 VERSUCHSTIERE	13
2.2 HERSTELLUNG UND LAGERUNG DER RETINALEN SCHNITTPRÄPARATE	13
2.3 VERSUCHSANORDNUNG	14
2.3.1 Gesamtaufbau.....	14
2.3.2 Ableitkammer	14
2.3.3 Ableitelektroden.....	15
2.3.4 Ableitapparatur.....	15
2.3.5 Drogenapplikation.....	16
2.4 DIE „PATCH CLAMP“ TECHNIK.....	16
2.5 INTRAZELLULÄRE INJEKTION MIT ALEXA 488 UND NEUROBIOTIN	18
2.6 LÖSUNGEN UND DROGEN.....	19
2.7 IONENVERTEILUNG UND GLEICHGEWICHTSPOTENTIALE.....	20
2.8 VORZEICHENKONVENTION.....	21
2.9 DATENANALYSE	22
2.10 IMMUNZYTOCHEMIE	24
III. ERGEBNISSE:	27
3.1 AMAKRINZELLTYPEN.....	27
3.2 ELEKTROPHYSIOLOGIE.....	28
3.3. SPONTANE HEMMENDE SYNAPTISCHE STRÖME (sIPSCs) VON AMAKRINZELLEN	33
3.4 GLYZINERGE sIPSCs VON AII-AMAKRINZELLEN	36
3.5 IMMUNHISTOCHEMIE VON AII-AMAKRINZELLEN UND DER GLYRA3-UNTEREINHEIT IN DER RATTE	40
3.6 GLYZINERGE sIPSCs BEI NF-AMAKRINZELLEN	42
3.7 ANALYSE DER AMPLITUDEN DER sIPSCs BEI NF- UND AII-AMAKRINZELLEN.....	45
3.8 WEITERE AMAKRINZELLENTYPEN	48
3.9 GLYZINERGE sIPSCs BEI ANDEREN TYPEN VON AMAKRINZELLEN.....	53
3.10 UNTERSUCHUNG DER DENDRITISCHEN FILTERUNG DER GLYZINERGEN sIPSCs.....	59
IV. DISKUSSION:	61
4.1 ANALYSE DER SYNAPTISCHEN STRÖME	61
4.1.1 Spontane exzitatorische postsynaptische Ströme.....	61
4.1.2 Spontane GABAerge postsynaptische Ströme	62
4.2 ANALYSE DER GLYZINREZEPTOREN	62
4.2.1 Histologische Untersuchungen.....	62

4.2.2 <i>Physiologische Untersuchungen</i>	63
a.) Picrotoxinin als GlyR Antagonist.....	63
b.) Glyzin-Empfindlichkeit.....	64
c.) Kinetik der Glyzinrezeptoren in anderen Teilen des ZNS.....	66
d.) Kinetik der Glyzinrezeptoren in der Säugetiernetzhaut.....	68
e.) Vergleich der Glyzinrezeptoren bei AII- und NF-Amakrinzellen.....	70
f.) Vergleich der Amplituden von glyzinergeren sIPSCs bei AII- und NF-Amakrinzellen.....	73
4.3 FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN GLYZINREZEPTOREN	74
4.4 WEITERE AMAKRINZELLTYPEN UND DEREN GLYZINREZEPTOREN.....	75
V. ZUSAMMENFASSUNG:	80
VI. LITERATUR	82
VII. ABKÜRZUNGEN	90
VIII. DANKSAGUNG	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
IX. TABELLARISCHER LEBENS LAUF	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

I. Einleitung:

Die Netzhaut (Retina) der Säugetiere ist ein circa 200 µm dickes, mehrschichtiges Sinnesepithel, welches den Augenhintergrund auskleidet. Sie ist Teil des zentralen Nervensystems (ZNS), da sie sich ontogenetisch aus dem Zwischenhirn (Diencephalon) ausstülpt, und bietet sich daher als ein ideales, leicht zugängliches System zur Untersuchung von Mechanismen des ZNS an. Die Retina erfasst optische Reize aus der Umwelt und leistet erste Verarbeitungsschritte der visuellen Information. Sie gehört zu den am besten untersuchten neuronalen Netzwerken und ihre wesentlichen Zelltypen wurden bereits im 19. Jahrhundert durch Ramon Y Cajal (1893) beschrieben. Aufbau und Verschaltung der Neurone sind durch zahlreiche licht- und elektronenmikroskopische Studien im Detail bekannt (s. Dowling & Boycott, 1966; Wässle & Boycott, 1991).

Insgesamt lässt sich die Säugetierretina in fünf Schichten unterteilen (s. Abb. 1), welche das Licht erst durchdringen muss, um dann von den äußeren Segmenten der Photorezeptoren in einem Phototransduktionsprozeß in ein graduiertes elektrisches Signal umgewandelt zu werden. Die äußeren Segmente der Photorezeptoren sind in die äußerste Zellschicht der Netzhaut, die Pigmentepithelzellen, eingebettet. Die Somata der Photorezeptoren bilden die äußerste Nervenzellschicht, die so genannte äußere Körnerschicht (ONL, outer nuclear layer). In der darauf folgenden äußeren plexiformen Schicht (OPL, outer plexiform layer) wird das Signal der Photorezeptoren über Synapsen auf Bipolar- und Horizontalzellen übertragen. Die Somata dieser Zelltypen liegen in der inneren Körnerschicht (INL, inner nuclear layer). Dabei verzweigen sich die Fortsätze von Horizontalzellen in der OPL und kontaktieren sowohl Photorezeptoren als auch Dendriten von Bipolarzellen. Die Axonterminalien von Bipolarzellen ziehen in die innere plexiforme Schicht (IPL) und bilden dort synaptische Kontakte mit Amakrin- und Ganglienzellen. Die Zellkörper der Amakrinzellen liegen ebenfalls in der INL, die Fortsätze der Amakrinzellen verzweigen sich in der IPL, stehen mit Bipolar-, Ganglien- und weiteren Amakrinzellen in Verbindung und beeinflussen dabei die Verarbeitung des Lichtsignals. Man spricht sowohl bei Horizontal- als auch bei Amakrinzellen von horizontaler Informationsverarbeitung, während die Übertragung des Signals der Photorezeptoren über die verschiedenen Bipolarzelltypen zu den Ganglienzelltypen als vertikale Informationsverarbeitung bezeichnet wird. Das Signal der Photorezeptoren wird auf der Ebene der Bipolarzellen in zwei funktionelle Pfade getrennt.

ON-Bipolarzellen reagieren auf Licht mit Depolarisationen, während OFF-Bipolarzellen bei Belichtung hyperpolarisieren. Die verschiedenen Bipolarzelltypen unterscheiden sich im Aussehen (Morphologie) und in der Ausstattung ihrer Glutamatrezeptoren. Glutamat ist der vorherrschende erregende Neurotransmitter in der Netzhaut, der sowohl von Photorezeptoren als auch von Bipolarzellen bei Depolarisation ausgeschüttet wird.

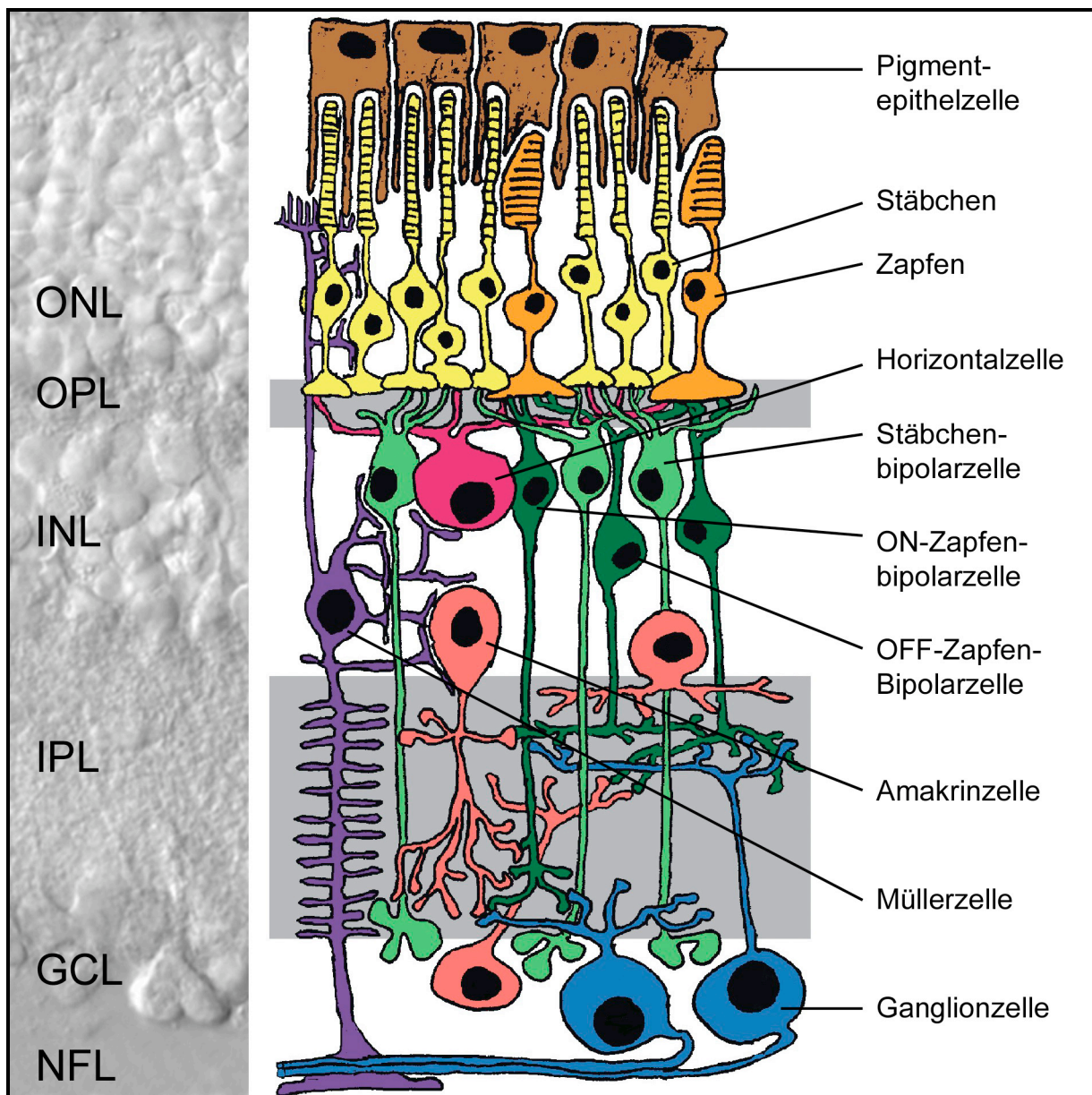


Abb. 1: Links: Nomarski-Aufnahme eines vertikalen Schnitts durch die Mausretina. Es sind mehrere Schichten zu erkennen, die äußere Körnerschicht (ONL), die äußere plexiforme Schicht (OPL), die innere Körnerschicht (INL) gefolgt von der inneren plexiformen Schicht (IPL) und der Ganglienzellschicht (GCL). Die Axone der Ganglienzellen bilden die Nervenfaserschicht (NFL). **Rechts:** Schematischer Aufbau einer Retina.

Die Axonterminalien der OFF-Bipolarzellen enden in der äußeren Hälfte der IPL (Sublamina a), die der ON-Bipolarzellen in der inneren Hälfte der IPL (Sublamina b). Die Signale der Bipolarzellen werden von etwa 10 bis 15 Ganglienzelltypen übernommen. Die Zellkörper der Ganglienzellen bilden die innerste zelluläre Schicht der Netzhaut, die so genannte Ganglienzellschicht (GCL, ganglion cell layer). Die Axone der Ganglienzellen, welche die Informationen in höhere visuelle Zentren des ZNS weiterleiten, bilden die Nervenfaserschicht (NFL, nerv fiber layer) (Wässle & Boycott, 1991; Masland, 2001; Wässle, 2004).

Glyzin ist neben GABA der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter in der Säugetierretina (s. Marc, 1989; Wässle & Boycott, 1991). Der postsynaptische Glyzinrezeptor (GlyR) ist ein ligandengesteuerter Chloridkanal (Legendre, 2001). Er setzt sich aus fünf membrandurchspannenden Untereinheiten zusammen. Ein 48 kDa Protein bildet dabei die ligandenbindende α -Untereinheit. Ein 56 kDa Protein, die so genannte β -Untereinheit, bindet an Gephyrin, das den Rezeptor an der Synapse mit dem Cytoskelett verbindet (Langosch et al., 1988; Kneussel & Betz, 2000; Legendre, 2001). Für die α -Untereinheit wurden vier Gene ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$) und für die β -Untereinheit ein Gen entschlüsselt (Matzenbach et al., 1994; Laube, 2002). Funktionstüchtige Glyzinrezeptoren setzen sich entweder ausschließlich aus α -Untereinheiten zusammen (homomere Rezeptoren) oder aber 2 α - und 3 β -Untereinheiten bilden einen Rezeptor (heteromer) (Grudzinska et al., 2005). Homomere Glyzinrezeptoren scheinen auf extrasynaptische Membranen beschränkt zu sein. Heteromere Rezeptoren dagegen werden hauptsächlich an Synapsen exprimiert (Kneussel & Betz, 2000). Im Rückenmark kommt es während der postnatalen Entwicklung zu einem Austausch der $\alpha 2$ -Untereinheit durch die $\alpha 1$ -Untereinheit (Akagi & Miledi, 1988; Becker et al., 1988; Malosio et al., 1991; Takahashi et al., 1992).

Das von der Präsynapse ausgeschüttete Glyzin bindet am Rezeptor, was zum Öffnen des Kanals und somit zum Einstrom von Chloridionen führt. Unter physiologischen Bedingungen ist in den meisten adulten Neuronen das Cl⁻-Gleichgewichtspotential negativer als das Ruhepotential der Zelle, wodurch es bei einer Aktivierung von Glyzinrezeptoren zum Einstrom von Chloridionen in die Zelle und somit zur Hyperpolarisation der Zelle kommt. Ein hochaffiner Antagonist von Glyzinrezeptoren ist Strychnin; es bindet an die α -Untereinheiten und blockiert die Bindestelle für Glyzin und auf diese Weise den Rezeptor. Es wirkt bereits in nM-Konzentrationen und blockt sowohl homomere als auch heteromere Rezeptoren.

Ein weiterer Antagonist von Glyzinrezeptoren ist PicROTOXININ, auch bekannt als GABA_A-Rezeptor-Antagonist. Es blockt homomere Glyzinrezeptoren, wohingegen heteromere

Glyzinrezeptoren unempfindlich für Picrotoxinin sind, vermutlich weil sie die β -Untereinheit enthalten (Pribilla et al., 1992). Allerdings zeigten sich in heterologen Expressionssystemen auch unter den heteromeren Glyzinrezeptoren Unterschiede in der Wirkung von Picrotoxinin in Abhängigkeit der exprimierten α -Untereinheit und der eingesetzten Picrotoxinin-Konzentration. Heteromere Rezeptoren, die die $\alpha 2$ -Untereinheit in sich trugen, waren bis zu dreimal empfindlicher für Picrotoxinin als heteromere Rezeptoren mit der $\alpha 1$ - oder $\alpha 3$ -Untereinheit (Pribilla et al., 1992).

Neben den moderaten Unterschieden in der Pharmakologie der Glyzinrezeptor-Untereinheiten zeigen sich auch biophysikalische Eigenschaften, die innerhalb der α -Untereinheiten variieren. Bei Einzelkanalmessungen von homomeren $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Rezeptoren konnten verschiedene durchschnittliche Offenzeiten der Kanäle gemessen werden (Takahashi et al., 1992), mit kürzeren Offenzeiten bei Kanälen der $\alpha 1$ -Untereinheit. Einhergehend mit diesen Beobachtungen änderten sich während der Entwicklung des Rückenmarks sowohl die Expression als auch die Zeitkonstante glyzinerger inhibitorischer postsynaptischer Ströme (IPSCs, **i**nhibitory **p**ostsynaptic **c**urrents) von $\alpha 1$ -Untereinheit und $\alpha 2$ -Untereinheit. Im neonatalen Tier findet man eine starke Expression der $\alpha 2$ -Untereinheit, während die $\alpha 1$ -Untereinheit noch nicht vorhanden ist. Nach etwa 10 bis 14 Tagen kehrt sich dieses Bild um und die $\alpha 1$ -Untereinheit ist das stärker exprimierte Protein. Gleichzeitig verringert sich während dieser Zeit auch die Zeitkonstante der an der Synapse gemessenen glyzinerger Ströme (Takahashi et al., 1992; Krupp et al., 1994; Singer et al., 1998). Diese Zeitkonstanten sind unabhängig von der Amplitude der IPSCs, die sich zwischen spontan auftretenden (sIPSCs) und evozierten Ereignissen um etwa das Dreifache erhöhte, während die Zeitkonstante der IPSCs gleich bleibend war (Singer et al., 1998).

In einer Vielzahl immunzytochemischer Arbeiten wurde die Lokalisation von Glyzinrezeptoren bzw. deren Untereinheiten in der Netzhaut untersucht. Hierbei wurde die Verteilung der Rezeptoren in den verschiedenen Schichten der IPL beschrieben. Demzufolge weisen die verschiedenen α -Untereinheiten typische Muster in der IPL auf und konnten mittels Antikörperfärbungen auf Bipolar-, Amakrin- und Ganglienzellen festgestellt werden (Grünert & Wässle, 1993; Greferath et al., 1994; Wässle et al., 1998; Haverkamp et al., 2003, 2004; Heinze et al., 2007).

Auch in der Netzhaut wurden glyzinerge sIPSCs gemessen und anhand der Zeitkonstante der Stromrückbildung analysiert. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Zellgruppen. Bei OFF-Bipolarzellen und bei A-Typ Ganglienzellen wurden sIPSCs mit relativ schnellen Zeitkonstanten ($\tau \sim 5$ ms), vergleichbar mit denen im Rückenmark von adulten

Ratten, gemessen, die mit Hilfe einer Mausmutante (*Glr1^{spd-ot}*) der $\alpha 1$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors zugeordnet werden konnten (Ivanova et al., 2006; Majumdar et al., 2007). Bei Amakrin- und Ganglienzellen wurden auch langsamere Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs beobachtet (τ zwischen 15 und 120 ms) (Frech et al., 2001; Protti et al., 1997; Tian et al., 1998).

Etwa 40 bis 50 % der Amakrinzellen enthalten Glyzin. Die glyzinerger Amakrinzellen zeigen eine große morphologische Variabilität. Sie besitzen alle einen relativ kleinen Dendritenbaum und bilden nur lokale Schaltkreise (Menger et al., 1998). Sie bekommen synaptische Eingänge sowohl von Bipolarzellen, als auch von anderen GABAergen und glyzinerger Amakrinzellen und machen ihrerseits Ausgangssynapsen mit Bipolarzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen in der IPL (Wässle & Boycott, 1991; Masland, 2001; Wässle, 2004)).

Die glyzinerger Zellen besitzen ein effizientes System zur Aufnahme des ausgeschütteten Glyzins, den Glyzintransporter GlyT1 (Pow & Hendrickson, 1999).

Die am besten untersuchte glyzinerger Amakrinzelle ist die AII-Zelle (Kolb & Famiglietti, 1974; Strettoi et al., 1992). Sie ist Teil des Stäbchenpfades. Photorezeptoren lassen sich in zwei Klassen einteilen. Zapfen sind im Vergleich zu den Stäbchen nicht so empfindlich für Photonen und dienen hauptsächlich dem Sehen bei Tageslicht und dem Farbsehen. Stäbchen dagegen reagieren extrem empfindlich auf Photonen und vermitteln das Sehen bei Dunkelheit, das Nacht- oder skotopische Sehen. Die Stäbchen übertragen ihr Signal daraufhin auf einen Typ von Bipolarzelle, die Stäbchenbipolarzelle. Während die Zapfenbipolarzellen das elektrische Signal direkt auf Ganglienzellen übertragen, ist im Stäbchenpfad eine Amakrinzelle, die AII-Zelle, zwischengeschaltet (Bloomfield & Dacheux, 2001). Die AII-Zelle ist die am häufigsten vorkommende Amakrinzelle in der Retina und macht etwa 10 % aller Amakrinzellen aus. Der Dendritenbaum verzweigt sich in zwei Ebenen, nämlich in den Sublaminae a und b der IPL. Das Soma der AII-Zelle liegt in der INL direkt an der Grenze zur IPL. Ein großer zentraler Dendritenast ragt in die IPL. In der Sublamina a, der OFF-Sublamina, entspringen Seitenäste (lobular appendages) vom zentralen Dendriten und kontaktieren OFF-Zapfenbipolarzellen. In der Sublamina b, der ON-Sublamina, verzweigt sich der zentrale Dendritenast diffus und kontaktiert die ON-Zapfenbipolarzellen (aboreal dendrites). Die AII-Zellen speisen die Antworten des Stäbchensystems in den Zapfen-Pfad ein, da das Stäbchensystem in der Säugerretina über keine eigenen Ganglienzellen verfügt. Sie tun dies über hemmende, glyzinerger Synapsen und über erregende elektrische Synapsen (Strettoi et al., 1992; Veruki et al., 2002).

Dabei kontaktieren die glyzineren Synapsen in Sublamina a OFF-Zapfenbipolarzellen und Ganglienzellen, während in Sublamina b AII-Zellen mit ON-Zapfenbipolarzellen und umliegenden AII-Zellen über elektrische Synapsen (gap junctions) verbunden sind. Die elektrischen Synapsen werden durch die vorherrschenden Lichtverhältnisse reguliert (Xin & Bloomfield, 1999).

Die AII-Zellen haben sehr kleine „runde“ Dendritenfelder, die über die gesamte Retina verteilt sind und sich dabei nur geringfügig überlappen. Damit wird die räumliche Auflösung der Retina gewährleistet. Sie erhalten Eingänge von durchschnittlich 30 Stäbchenbipolaren, diese Konvergenz kann allerdings in den verschiedenen Lichtverhältnissen durch Kopplung und Entkopplung von nahe liegenden AII-Zellen und ON-Zapfenbipolarzellen moduliert werden (Bloomfield & Dacheux, 2001; Wässle & Boycott, 1991).

AII-Zellen besitzen ein konzentrisches rezeptives Feld, d.h. die Zelle reagiert auf einen Lichtpunkt, der auf das Zentrum des rezeptiven Feldes fällt, mit einer erregenden Antwort. Fällt der Lichtpunkt dagegen auf die Umgebung des rezeptiven Feldes, wird die AII-Zelle hyperpolarisiert (ON-center/OFF-surround). Am Aufbau des konzentrischen rezeptiven Feldes sind vermutlich weitere Amakrinzellen beteiligt. So wird beispielsweise die „OFF-surround“ Antwort der AII-Zelle durch inhibitorische Eingänge von anderen Amakrinzellen vermittelt. Pharmakologische Studien zeigen, dass diese Hemmung hauptsächlich über den Transmitter GABA erzeugt wird (Bloomfield & Dacheux, 2001; Bloomfield, 2001).

AII-Amakrinzellen exprimieren neben ionotropen Glutamatrezeptoren (Dumitrescu et al., 2006) auch Glyzin- und GABA_A-Rezeptoren (Boos et al., 1993). Außerdem können AII-Amakrinzellen Aktionspotentiale erzeugen, die durch TTX, einem Antagonisten von spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen, blockiert werden (Boos et al., 1993). Dies unterscheidet die AII-Amakrinzellen von anderen glyzineren Amakrinzellen, die auf Änderungen der Lichtreize mit langsamen elektrischen Potentialen antworten.

GABAerge Amakrinzellen haben größere Dendritenbäume, sie bilden Axone aus, besitzen spannungsabhängige Na⁺-Kanäle und können Aktionspotentiale feuern (Völgyi et al., 2001). Es hängt also sowohl von der Funktion als auch von der Morphologie der verschiedenen Amakrinzelltypen ab, ob Aktionspotentiale generiert werden.

Insgesamt gibt es mehr als 30 Typen von Amakrinzellen, die durch ihre Morphologie und die Stratifizierungen der Dendriten unterschieden werden können (McNeil & Masland, 1998; McNeil et al., 1999; Menger et al., 1998; Badea & Nathans, 2004; Lin & Masland, 2006). Bisher ist nur für einige Typen dieser Zellen die genaue Funktion bekannt. Beispielsweise sind die AII-Amakrinzellen und die A17-Amakrinzellen in der Verarbeitung des

Stäbchensignals beteiligt (Kolb & Famiglietti, 1974; Famiglietti & Kolb, 1975; Kolb & Nelson, 1983; Nelson & Kolb, 1984; Wässle et al., 1987). Cholinerge Amakrinzellen spielen bei der Richtungsselektivität von einigen Ganglienzellen eine Rolle (Yoshida et al., 2001).

Die hemmenden Umfelder von Ganglienzellen mit Zentrum/Umfeld-Antagonismus werden durch GABAerge Amakrinzellen gebildet. Während GABAerge Interneurone somit an der räumlichen Bildverarbeitung beteiligt sind, ist die Funktion der glyzineren Amakrinzellen, abgesehen von der AII-Amakrinzelle, weitgehend unbekannt. Glyzinerge Amakrinzellen stratifizieren entweder nur in einzelnen Schichten der IPL (Typ 1 & 2; Menger et al., 1998) oder durchziehen die gesamte IPL (Typ 5, 6, 7; Menger et al., 1998). Dabei ist nicht bekannt, in welcher Schicht diese Zellen synaptischen Eingang von den Bipolarzellen bekommen bzw. wo die glyzineren Ausgangssynapsen dieser Zellen liegen. Die Morphologie dieser Zellen mit ihren kleinen Dendritenbäumen spricht für eine „lokale“ Rolle, indem sie an der Interaktion der ON-Sublamina (Sublamina b) und der OFF-Sublamina (Sublamina a) beteiligt sind und für eine strengere Trennung in den Antworten dieser Schichten sorgen. Dabei wird nicht nur der vertikale Pfad (Bipolarzellen, Ganglienzellen) durch Glyzin gehemmt, sondern es finden auch glyzinerge Amakrin-Amakrinzellkontakte statt (Frech et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob Amakrinzellen spezifische glyzinerge Eingänge erhalten. Ist zum Beispiel die $\alpha 1$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors in den Synapsen exprimiert, kommt es zu einem schnellen Abklingen der glyzineren Hemmung. Bei Expression der $\alpha 2$ -Untereinheit ist eine tonische Hemmung zu erwarten. Deshalb konzentriert sich die Arbeit darauf, die α -Untereinheiten der Glyzinrezeptoren bei den unterschiedlichen Amakrinzellen zu bestimmen. Was diese Untereinheiten für funktionelle Eigenschaften besitzen und in welchen Zellen sie exprimiert sind, wird mit Hilfe der „patch clamp“ Technik untersucht. Die von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelte Ableittechnik (Hamill et al., 1981) ermöglicht die Messung von Glyzin-induzierten Ganzzellströmen und die Bestimmung synaptischer Aktivität. Hierbei wird eine Glas-Mikropipette mit der Zellmembran in Verbindung gebracht und die Membran unterhalb der Elektrodenöffnung eingerissen, um so eine niederohmige Verbindung mit dem Zellinneren herzustellen und Ionenströme in hoher zeitlicher Auflösung zu messen.

Neben Wildtypmäusen werden auch genetisch veränderte Mäuse (*Gla2^{-/-}*, *Gla3^{-/-}* Knock-out-Mäuse (KO-Mäuse); Weiss et al., 2007; Harvey et al., 2004) sowie ein Mausstamm mit einer natürlich entstandenen Mutation in der $\alpha 1$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors (*Gla1^{spd-ot}*; Buckwalter et al., 1994) untersucht. Während die beiden KO-Mäuse keinen offensichtlichen

Phänotyp zeigen und die Amakrinzellen in der adulten Netzhaut untersucht werden können, sterben die Mäuse mit der Mutation in der $\alpha 1$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors innerhalb von 21 Tagen nach der Geburt. Infolgedessen muss dieser Mausstamm im Alter von 16-21 Tagen untersucht und mit Wildtypmäusen dieses Alters verglichen werden.

Durch diesen Einsatz von Mäusen, bei denen spezifische GlyR-Untereinheiten ausgeschaltet sind, soll bestimmt werden, welche Untereinheiten beim Wildtyp in den unterschiedlichen Synapsen vorkommen und welche physiologischen Eigenschaften sie vermitteln.

II. Material und Methoden:

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden neben C57/bl6 Wildtypmäusen auch vier genetisch veränderte Mauslinien verwendet: 1.) *Glr α 1^{spd-ot}*-Mäuse. Bei dieser natürlich vorkommenden Mutante wird die α 1-Untereinheit des Glyzinrezeptors nicht exprimiert (Buckwalter et al., 1994). Diese Tiere sterben üblicherweise im Alter von 21 Tagen. Deshalb wurden diese Tiere im Alter von 16-21 Tagen untersucht. 2.) *Glr α 2^{-/-}*-Mäuse. Bei diesen Tieren ist auf gentechnologischem Wege die Expression der α 2-Untereinheit unterbunden. Die Tiere zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp und pflanzen sich normal fort (Young-Pearce et al., 2006; Weiss et al., 2007). 3.) *Glr α 3^{-/-}*-Mäuse. Bei diesen Tieren ist auf gentechnologischem Wege die Expression der α 3-Untereinheit unterbunden. Die Tiere zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp und pflanzen sich normal fort (Harvey et al., 2004). 4.) GAD67-GFP-Mäuse. Bei dieser Mauslinie wird das grün fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle des Glutamatdecarboxylase 67-Promotors in GABAergen Amakrinzellen exprimiert (Tamamaki et al., 2003).

Die unter 2,3 und 4 aufgeführten Tiere wurden im Alter von 5-8 Wochen für die Experimente herangezogen. Sie wurden mit 4 % Halothan tief narkotisiert und anschließend dekapitiert.

2.2 Herstellung und Lagerung der retinalen Schnittpräparate

Unmittelbar nach der Dekapitation des Tieres wurde ein Auge entnommen und in einer Petrischale wurde die Präparation der Netzhaut bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Petrischale enthielt Ames-Nährlösung (Extrazellulärlösung, siehe Tabelle 2.1) und wurde ständig mit einem Gemisch aus 95% O₂ / 5% CO₂ (Carbogen) begast.

Das Auge wurde zunächst durch einen Schnitt entlang der Ora serrata geöffnet, Linse und Glaskörper wurden entfernt und die Netzhaut vom Augenbecher abgelöst. Darauf folgte die Übertragung der Netzhaut auf einen Membranfilter (Porengröße 0.2 μ m), wobei das Gewebe durch einen angelegten Unterdruck mit der Ganglienzellschicht auf der Membran fixiert wurde. Daraufhin wurde die Netzhaut mit einer Rasierklinge (kontrolliert durch einen Mikromanipulator) in 150 μ m dicke Schnitte (slices) zerteilt. Sie ließen sich über einen

Zeitraum von bis zu 7-8 Stunden für „patch clamp“-Ableitungen verwenden und konnten ebenso lange in einem begasten Vorratsgefäß aufbewahrt werden.

Ableitungen erfolgten in einer Ableitkammer (s. 2.3.2), in die jeweils ein „slice“ überführt wurde und dort durch einen U-förmigen Platin-Iridium-Rahmen, der mit Nylonfäden bespannt war, fixiert wurde.

Für Versuche an GABAergen Amakrinzellen, deren Zellkörper in der Ganglienzellschicht liegen (displaced amacrine cells), wurde die Netzhaut ebenfalls vom Augenbecher gelöst, geteilt und mit der Ganglienzellschicht nach oben, befestigt durch einen U-förmigen Rahmen, in die Ableitkammer gelegt. Um das Soma der jeweiligen Amakrinzelle zu erreichen, wurde vorher die innere Grenzmembran mit einer Glaselektrode direkt oberhalb des Somas entfernt.

2.3 Versuchsanordnung

2.3.1 Gesamtaufbau

Auf dem feststehenden Tisch eines Mikroskops (Zeiss ACM, Oberkochen) war die Ableitkammer in den zwei horizontalen Richtungen mit einem Feintrieb verstellbar. Das Mikroskop (Wasserimmersionsobjektiv, 40fach, 40/0.75 W; Arbeitsabstand 1.4 mm; Optovareinschub 2.5x) hatte einen in der z-Achse beweglichen Tubus, war mit Nomarski- und Fluoreszenzoptik ausgerüstet und mit einer Digitalkamera (CCD imaging, PCO) bestückt. Dadurch war es möglich, Fotos während des Versuchs anzufertigen und den Versuch an einem angeschlossenen Bildschirm mitzuverfolgen. Die gesamte Versuchsanordnung war auf einem höhenregulierten, schwingungsgedämpften Labortisch montiert, um mechanische Erschütterungen zu vermeiden, und, um elektromagnetische Felder abzuschirmen, von einem Faraday'schen Käfig umgeben.

Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur und im Licht durchgeführt, sodass die Netzhaut jeweils helladaptiert war.

2.3.2 Ableitkammer

Als Ableitkammer diente ein Plexiglasgefäß mit einem dünnen Glasboden, welcher etwa 600 µl Lösung fasste. Der durch einen U-förmigen Rahmen fixierte Netzhautschnitt wurde während der gesamten Versuchsdauer mit 95 % O₂ / 5 % CO₂ begaster Ames-Lösung

umspült. Dazu strömte die Lösung hydrostatisch aus höhergestellten Vorratsflaschen seitlich in die Ableitkammer und wurde auf der gegenüberliegenden Seite der Kammer mittels einer peristaltischen Pumpe abgesaugt. Auf diese Weise ergab sich ein Durchfluss von 1 - 2 ml Ames-Lösung pro Minute, der für das Auswaschen nach Drogenapplikation sorgte.

2.3.3 Ableitelektroden

Ableitelektroden wurden aus Borosilikatglas (Harvard Apparatus; GC150F-10, Außendurchmesser 1.5 mm, Innendurchmesser 0.86 mm, mit Filament) an einem halbautomatischen Elektrodenziehgerät (DMZ-Universalpuller, Zeitz-Instrumente, Augsburg) in zwei Stufen gezogen und anschließend auf einen Innendurchmesser von ca. 1 μm hitzepoliert. Somit erreichten diese Elektroden bei Verwendung der intrazellulären Lösung (siehe Tabelle 2.1) einen Elektrodenwiderstand von 6-9 $\text{M}\Omega$ (R_{pip}).

Die Ableitelektrode wurde an einem Elektrodenhalter befestigt und über einen Silberchloriddraht direkt mit dem Vorverstärker des „patch clamp“ Verstärkers (EPC-9) verbunden. Der Elektrodenhalter konnte mit einem Mikromanipulator (Leitz, Wetzlar) bewegt werden. Die Feinregulierung erfolgte mit piezoelektrischen Mikromanipulatoren (Physik Instrumente, Waldbron). Die Genauigkeit lag im μm -Bereich. Über einen Schlauchanschluss am Elektrodenhalter konnte sowohl Sog als auch Druck auf die Elektrodenlösung ausgeübt werden. Eine Ableitelektrode wurde jeweils nur für eine Ableitung verwendet und anschließend verworfen. Als Referenzelektrode diente ein geerdeter Silberchlorid-Draht, der ebenfalls mit dem Vorverstärker verbunden war.

2.3.4 Ableitapparatur

Ein Stromspannungswandler vom Typ EPC-9 (Heka, Lambrecht; Rückkopplungswiderstand 10 $\text{G}\Omega$) diente als „patch clamp“ Verstärker. Er wandelte die analogen Signale in digitale um und speiste sie in einen IBM-kompatiblen Computer (PC, Windows 95) ein. In umgekehrter Richtung wandelte der EPC-9 Strom- und Spannungsprotokolle, die am PC erzeugt wurden, in Analogsignale um. Mit Hilfe der Software Pulse 8.11 (Heka, Lambrecht) wurden Datenaufnahme gesteuert und die Versuchsprotokolle entworfen.

Zur weiteren Datenanalyse und zur grafischen Umsetzung dienten die Programme Igor pro 4.07 (Wavemetrics, USA), Microsoft Excel (Microsoft, 2002) und MiniAnalysis (Synptosoft, USA).

2.3.5 Drogenapplikation

Um die gesamte Zelle mit Agonisten zu umspülen, wurde ein DAD-12 Perfusions-System (ALA Scientific Instruments INC., USA) benutzt. Dieses System ermöglicht die Applikation von Drogen aus zwölf verschiedenen Behältern, die über Schläuche in ein Sammelrohr münden. Ein 13. Schlauch, der ebenfalls in dem Sammelrohr mündet, dient zur Spülung. Die verwendeten Agonisten und Antagonisten wurden in entsprechender Verdünnung in die Behälter des DAD-12 überführt. Das Sammelrohr war etwa drei Zentimeter lang und hatte einen Spitzendurchmesser von 200 μm . Dieses Sammelrohr wurde mithilfe eines Manipulators in die Nähe der abgeleiteten Zelle gebracht. Während des Versuchs wurde das System unter Druckluft gesetzt, so dass es mit dem Öffnen eines Ventils zum Freisetzen der jeweiligen Droge kam. Somit ließen sich die verschiedenen Drogen, gesteuert von einem Computer, gezielt einer Zelle verabreichen. Wenn Glyzin allein bzw. Glyzin gemeinsam mit einem Antagonisten appliziert wurden, so wurde erst nur Glyzin, dann Glyzin + Antagonist und wiederum Glyzin allein appliziert. Zwischen den Applikationen wurde das Gewebe für 90 Sekunden mit der Kontrolllösung (HBS Lösung, s. Tabelle 2.2) umspült, um die Agonisten und Antagonisten auszuwaschen.

Durch die Verdünnung der Substanzen in der Badlösung lässt sich die tatsächliche Konzentration der Drogen an der Zelle nicht exakt bestimmen, sie ist jedoch gewiss geringer als die angesetzte Verdünnung.

2.4 Die „patch clamp“ Technik

Die Experimente wurden im Wesentlichen nach der Beschreibung von Hamill et al. (1981) durchgeführt. Der Ablauf eines Experiments soll hier kurz erläutert werden.

Um von Amakrinzellen abzuleiten, wurden in Schnittpräparaten solche Somata für die Ableitung gewählt, welche im proximalen Teil der INL direkt an der Grenze zur IPL liegen. AII-Amakrinzellen konnten aufgrund der charakteristischen Morphologie ihres Somas und des deutlichen Dendritenstammes erkannt werden, während alle anderen Typen erst nach der Ableitung klassifiziert werden konnten (s. 2.5).

Ableitungen im Netzhautganzpräparat (whole mount) wurden an GAD67-GFP-Mäusen durchgeführt, bei denen die Amakrinzellen, deren Zellkörper in der Ganglienschicht liegen (so genannte ektopische Amakrinzellen), GFP exprimieren und sich somit gezielt als grün fluoreszierende Zellen auswählen ließen. Die Zellen wurden während der Ableitung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 568 und Neurobiotin gefüllt.

Eine mit Intrazellulärlösung (siehe Tabelle 2.1) gefüllte Ableitelektrode wurde am Elektrodenhalter befestigt und mittels eines Schlauches wurde der Druck der Intrazellulärlösung erhöht. Die Pipette wurde in die Badlösung eingetaucht und mittels Manipulator und Mikromanipulator in die Nähe der Zelle gebracht. Dabei erzeugte der Verstärker einen Testspannungspuls (-4 mV, Dauer 5 ms) und durch ständiges Messen des Elektrodenstroms konnte der Elektrodenwiderstand nach $R = \Delta U / \Delta I$ überprüft werden.

Die nach dem Eintauchen der Glaselektrode ins Bad auftretenden unspezifischen Potentiale (Offset-Potentiale) wurden am Verstärker abgeglichen. Da bei diesem Vorgehen auch die Übergangspotentiale zwischen Intrazellulär- und Extrazellulärlösung korrigiert wurden, diese aber nach Bildung der „whole cell“-Konfiguration wegfallen, wurde das entsprechende Übergangspotential berechnet. Es entspricht einem Wert von 2.5 mV (JPcalc, Barry 1994; berechnet zwischen Intrazellulärlösung und Ames-Medium) und wurde nicht korrigiert.

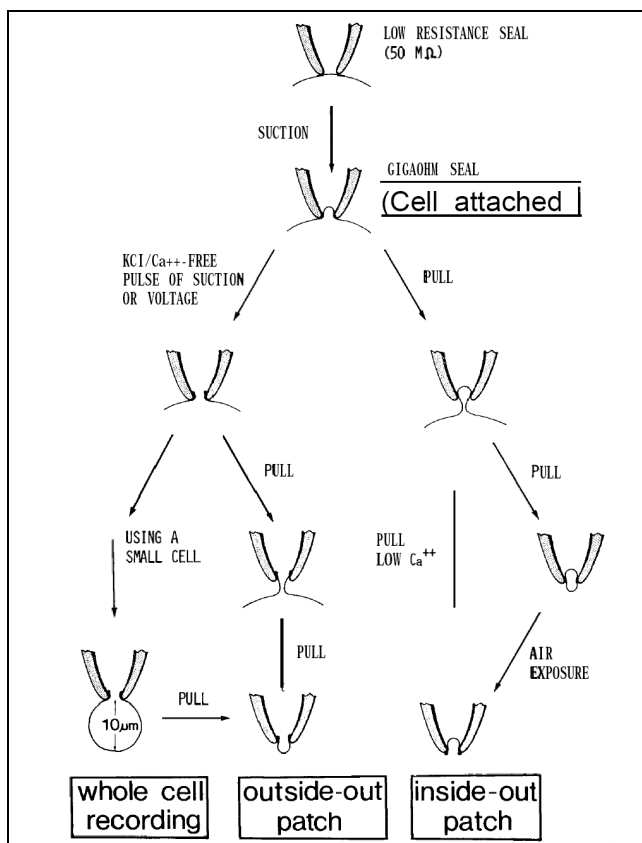


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der verschiedenen "patch clamp" Konfigurationen. Nachdem die Patchpipette auf die Zelle aufgesetzt wurde, stellt man einen engen Pipetten-Membran-Kontakt (Giga-seal) her. Durch vorsichtiges Saugen kann das Membranstück unter der Patchpipette zerstört werden. Man erhält dann einen leitenden Zugang zur gesamten Zelle und kann die Summenströme der gesamten Zellmembran untersuchen (whole-cell Konfiguration). Durch Wegziehen der Pipette aus der "cell-attached" Konfiguration kann man das unter der Pipette befindliche Membranstück von der restlichen Zelle abtrennen und kann bei freiem Zugang zur Zellinnenseite einzelne Ionenkanäle untersuchen (inside-out Konfiguration). Durch Zurückziehen der Pipette in der "whole-cell" Konfiguration erhält man einzelne Kanäle an der Außenseite der Pipette (outside-out Konfiguration).

Aus Hamill et al., 1981.

Die Elektrode wurde vorsichtig auf die Membran der Zielzelle zu bewegt und durch den erhöhten Innendruck in der Elektrode strömte Intrazellulärlösung aus, was zu einer leichten Wölbung der Zellmembran führte. Daraufhin wurde der Druck reduziert und durch leichtes Saugen ein Abdichtwiderstand (R_{seal}) von mehr als 1 G Ω (Giga-seal nach Hamill et al., 1981) hergestellt. Das Aufsetzen und Abdichten der Elektrode führte zu einer Reduktion des Elektrodenstroms während des Testpulses. Diese so genannte „cell-attached“ Konfiguration ist Ausgangspunkt für alle weiteren Ableitanordnungen (s. Abb. 2.1). In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Ganzzelleableitungen im „whole-cell“ Modus durchgeführt. Um diese Konfiguration zu erreichen, wurde die Membran unter der Elektrodenspitze durch leichte Saugstöße geöffnet und so ein niederohmiger Zugang zur Zelle geschaffen. Durch diese Öffnung der Zellmembran diffundiert die Elektrodenlösung in die Zelle, das Zytoplasma wird „ausgewaschen“ und die Intrazellulärlösung entspricht der Elektrodenlösung (Lindau & Fernandez, 1986). Der Serienwiderstand setzt sich aus den verschiedenen in Serie geschalteten Widerständen zusammen, die durch den Zugang zur abgeleiteten Zelle auftreten. Dabei handelt es sich einmal um den Elektrodenwiderstand R_{pip} und den Zugangswiderstand der Zelle (R_{acc}).

In den meisten Ableitungen lag der Serienwiderstand bei 20-40 M Ω und wurde nicht kompensiert. Der Eingangswiderstand der Zellen lag bei etwa 1 G Ω . Die Ableitungen wurden mit dem im EPC9 eingebauten Besselfilter (8 Filterelemente) gefiltert und mit einer mindestens doppelt so hohen Frequenz digitalisiert wie die höchste im Signal vorkommende Frequenz. Die Abtastfrequenz lag bei den Applikationen von Glyzin, Picrotoxinin und Strychnin bei 1 kHz und bei der Messung synaptischer Ströme bei 2-5 kHz.

Es wurden ausschließlich Versuche in der Spannungsklemme (voltage clamp) durchgeführt. Dadurch konnte die Spannung der abgeleiteten Zelle während des Versuchs kontrolliert beziehungsweise verändert werden. Die Antworten der Zelle auf eine Drogenapplikation bei unterschiedlichen Spannungen konnten als Ganzzellströme gemessen werden.

2.5 Intrazelluläre Injektion mit Alexa 488 und Neurobiotin

Die Intrazellulärlösung wurde vor dem Versuch mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 (oder Alexa 568) und mit Neurobiotin versetzt, die mit dem Öffnen der Zellwand ungehindert in das Zellinnere diffundierten. Somit konnte die Zelle mit ihrem Dendritenbaum nach einer Messung durch Auflichtfluoreszenz (Zeiss-Interferenz-Breitbandfilter, Anregungsbereich 400 - 440 nm, Erregungsfilter BP 400 - 440 nm, Farbteiler FT 460 nm, Sperrfilter LP 470 nm)

sichtbar gemacht werden. Dies ermöglichte eine erste morphologische Klassifizierung der Zelle.

Zur Dokumentation der Gestalt der Zelle wurde das Gewebe nach der Ableitung für ca. 15 Minuten in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend das Neurobiotin gefärbt.

Zu diesem Zweck wurde das Gewebe zunächst 3-mal für je zehn Minuten in 0.1 M Phosphat-Puffer (PB, s. Tabelle 2.3) gewaschen und anschließend für 3 Stunden bei Raumtemperatur in 5% Chemiblocker, 0.5% Triton X-100 in PB mit Streptavidin Fluorescein (1:100) inkubiert.

Es folgte ein erneuter 3-maliger Waschvorgang für je 10 Minuten in PB. Anschließend konnte der Schnitt mit einem eigens angefertigten Objektträger an einem inversen konfokalen Mikroskop (Leica TCS konfokales Laser Scanning Mikroskop, Leica Microsystems, Heidelberg) analysiert werden. Die Zellen im Netzhautganzpräparat wurden auf einem Objektträger mit AquaPoly/ Mount eingedeckt und daraufhin fotografiert.

2.6 Lösungen und Drogen

Es wurde jeweils eine intrazelluläre und eine extrazelluläre Lösung genutzt. Die Zusammensetzung der Lösungen ist in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Die intrazelluläre Lösung wurde in Endkonzentration angesetzt, in kleine Portionen aufgeteilt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Vor dem Versuch wurde jeweils eine Portion aufgetaut und mit Alexa 488 und Neurobiotin versetzt.

Tabelle 2.1: Aufstellung der Intrazellulär- und Extrazellulärlösung.

	Intrazellulärlösung [mM]		Extrazellulärlösung (Ames) [mM]
CsCl	110	NaCl	120,03
Mg-ATP	4	CaCl ₂ ·2xH ₂ O	1,15
MgCl ₂	1	MgSO ₄	0,6
Na-GTP	0,40	KCl	3,10
EGTA	10	KHPO ₄	0,40
Na-HEPES	10	D-Glucose	6,01
CaCl ₂ ·2xH ₂ O	0,10	NaHCO ₃	23
TBA	5	Aminosäuren	
Neurobiotin	10	Vitamine	
Alexa 488	0,1		
pH	7,3		7,4

Die extrazelluläre Ames-Lösung (Sigma) wurde für jeden Versuch frisch angesetzt und mit 23 mM Natriumhydrogencarbonat versetzt. Alle während der Ableitung applizierten Agonisten und Antagonisten wurden als konzentrierte Aliquots bei -20°C gelagert und vor jedem Versuch in einer auf Hepes-basierenden Lösung (s. Tabelle 2.2) aufgenommen und anschließend in die 12 Behälter des DAD12-Perfusionssystems übertragen. Hierbei handelte es sich um Glyzin (100 mM in HBS), Picrotoxinin (50 mM in Ethanol), 1,2,5,6-Tetrahydropyridin-4-yl Methylphosphinsäure (TPMPA) (100 mM in Wasser), GABAzine (1 mM in Wasser), Strychnin (5 mM in Wasser), Tetrodotoxin (TTX) (500 µM in Wasser), L(+)-2-Amino-4-phosphonobutyrate (L-AP4) (20 mM in Wasser) und 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulphonamid (NBQX) (20 mM in Wasser).

Tabelle 2.2: In HBS (Hepes-buffered solution) wurden Agonisten und Antagonisten gelöst und damit anschließend das DAD-12 Perfusionssystem beladen.

	HBS	HBS (K ⁺)
NaCl	145	125
KCl	3,1	23,1
CaCl ₂	3	3
MgCl ₂	1,2	1,2
Na-Hepes	5	5
pH	7,4	7,4

Tabelle 2.3:

	Phosphatpuffer (PB) [mM]
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	80
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	20
pH	7,4

2.7 Ionenverteilung und Gleichgewichtspotentiale

Die angegebenen intra- und extrazellulären Lösungen ergeben ein Ungleichgewicht der Ionenverteilung innerhalb und außerhalb der Zelle. Durch Öffnen der abgeleiteten Zelle kann die intrazelluläre Lösung aus der Elektrode innerhalb weniger Sekunden in die Zelle diffundieren. Somit ist sowohl intrazellulär als auch extrazellulär die Ionenkonzentration

bekannt. Diese Ionen sind durch die Zellmembran getrennt und sind bestrebt ein Gleichgewicht zu bilden. Durch das Öffnen von Ionenkanälen in der Zellmembran kann ein Ionenfluß stattfinden, der gemessen wird. Welche Ionen fließen und in welcher Richtung sie fließen, hängt einerseits von der Ionenselektivität der Ionenkanäle ab. Außerdem spielt das Konzentrationsgefälle der jeweiligen Ionenart und das Membranpotential eine Rolle. Die wichtigsten Ionen, die durch Membrankanäle fließen, sind Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} - und Cl^- -Ionen.

Dadurch, dass die Ionenwerte innerhalb und außerhalb der Zelle bekannt sind, kann für jedes Ion das Umkehrpotential mittels der Nernst-Gleichung errechnet werden. Die Gleichung lautet:

$$E_{\text{ion}} = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[\text{Ion}]_a}{[\text{Ion}]_i}$$

E = Gleichgewichtspotential in Volt (V)

R = Allgemeine Gaskonstante ($8,315 \text{ J} \times \text{K}^{-1} \times \text{mol}^{-1}$)

T = Absolute Temperatur in Kelvin (K)

z = Ladung des Ions

F = Faraday-Konstante ($9,648 \times 10^4 \text{ C} \times \text{mol}^{-1}$)

[Ion]_a = Ionenkonzentration außen ($\text{mol} \times \text{l}^{-1}$)

[Ion]_i = Ionenkonzentration innen ($\text{mol} \times \text{l}^{-1}$)

ln = natürlicher Logarithmus

Für Cl^- -Ionen ergibt sich hieraus ein Umkehrpotential von -5,8 mV (berechnet zwischen Intrazellulärlösung und HBS) bzw. von -1,5 mV (zwischen Intrazellulärlösung und Extrazellulärlösung).

2.8 Vorzeichenkonvention

Die Richtung des Stroms wird generell aus Sicht der Zelle dargestellt. Fließt ein Strom von positiv geladenen Ionen als Einwärtsstrom in die Zelle, wird er per Definition als negativer Strom dargestellt. Positive Ionen, die aus der Zelle heraus fließen, werden als positiver Auswärtsstrom beschrieben. Bei negativen Ionen wird ein Einstrom in die Zelle als positiver Strom, ein Ausstrom aus der Zelle als negativer Strom dargestellt.

2.9 Datenanalyse

Alle Messungen erfolgten in der Spannungsklemme und üblicherweise bei einem Haltepotential von -60 mV. Zur Messung des Umkehrpotentials der Glyzinrezeptoren wurde die Spannung in 20 mV-Schritten von -60 mV bis + 40 mV geändert. Die intrazelluläre Cl⁻-Konzentration betrug 117,2 mM. Die Cl⁻-Konzentration in der Ames-Lösung lag bei 124,2 mM und die der HBS-Lösung bei 156,3 mM. Glyzinrezeptor-getragene Chloridströme wurden also bei einem Haltepotential von -60 mV als Einstrom und damit als eine Ablenkung der Nullstromlinie nach unten dargestellt.

Die Zellantworten der Amakrinzellen auf Applikation der Agonisten und Antagonisten von Glyzinrezeptoren wurden aufgezeichnet und die Amplitude der Antwort zum Vergleich herangezogen.

Die glyzinergeren spontanen inhibitorischen postsynaptischen Ströme (sIPSCs) wurden mit einer Abtastfrequenz von 2 - 5 kHz aufgezeichnet. Zur Auswertung wurden nur Einzelereignisse herangezogen. Es wurde die Aktivierungszeit (rise time), Amplitude und die Zeitkonstante (decay time constant) der Deaktivierungs-/Desensitivierungskinetik mit der Software MiniAnalysis ermittelt. Als Aktivierungszeit wurde die Zeit ermittelt, mit der die Ströme von 20 % auf 80 % (T20/80) der maximalen Amplitude ansteigen. Die Stromrückbildung (current decay) wird durch Deaktivierung und Desensitivierung der Ionenkanäle bestimmt. Die Kinetik der Stromrückbildung kann mit Exponentialfunktionen beschrieben werden. Hierfür wurde in etwa 80 % der untersuchten Ereignisse eine Exponentialfunktion (I) verwendet und in 20 % die Summe aus zwei Exponentialfunktionen (II) benötigt. Die Zeitkonstante der Deaktivierungs-/Desensitivierungskinetik wurde mittels dieser Exponentialfunktionen von der maximalen Amplitude bis zur Nullstromlinie berechnet.

$$(I) f(t) = Ae^{-\frac{t}{\tau}} + b \quad (II) f(t) = A_1e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2e^{-\frac{t}{\tau_2}} + b$$

mit A = Amplitude; t = Zeit; τ , τ_1 , τ_2 = Zeitkonstanten; b = Abstand zur Nullstromlinie.

Die mathematische Beschreibung erfolgte nach der Bestimmung der kleinsten Quadrate (least square fit). Durch welche Funktion, d.h. Exponential-Funktion oder Summe aus zwei Exponential-Funktionen, die Deaktivierungs-/Desensitivierungskinetik der einzelnen

postsynaptischen Ereignisse besser beschrieben werden konnte, wurde für jedes Ereignis vom Experimentator durch direkte Beobachtung entschieden (s. Abb. 2.2). Daraus ergaben sich entweder die Zeitkonstante τ oder die Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 aus der Summe zweier Exponential-Funktionen. Ströme, welche sich besser mit einer Exponential-Funktion beschreiben ließen, werden im Folgenden monoexponentielle Ströme genannt, während Ereignisse, die besser mit der Summe aus zwei Exponential-Funktionen beschrieben wurden, als biexponentielle Ströme bezeichnet werden.

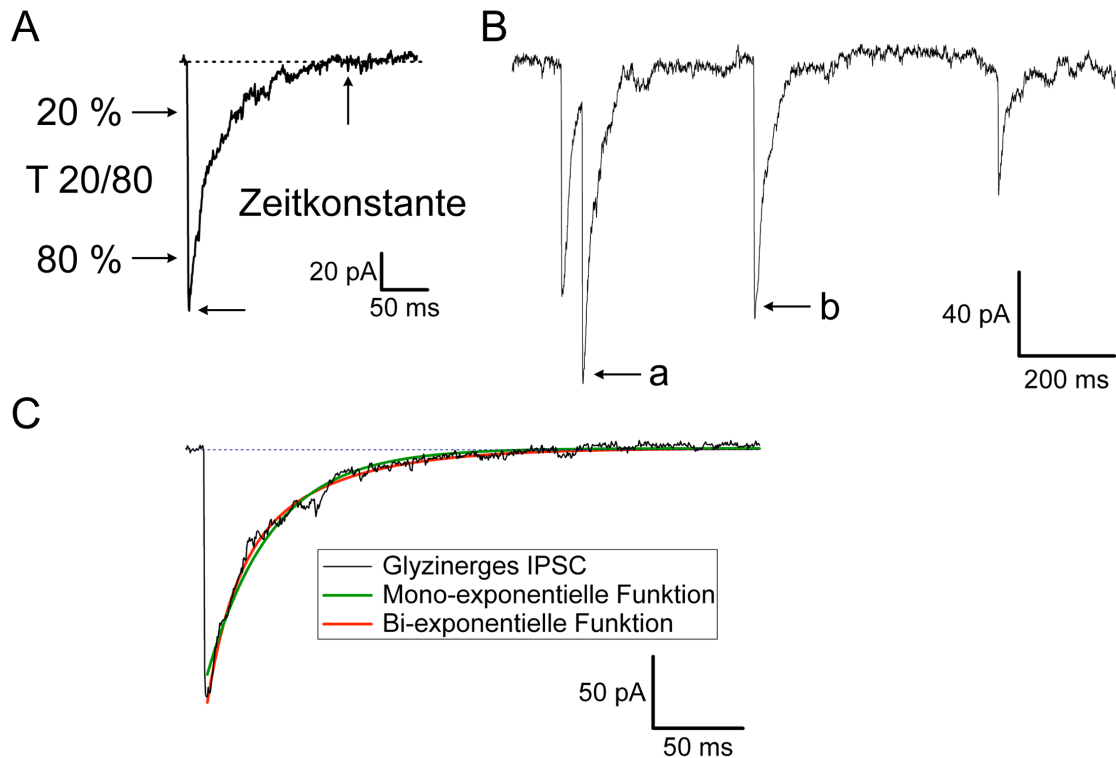


Abb. 2.2: Analyse glyzinerger inhibitorischer postsynaptischer Ströme. **(A)** Glyzineres IPSC: Aktivierungszeit (T20/80), Amplitude und Zeitkonstante der Deaktivierungs/Desensitivierungskinetik wurden für jedes Ereignis bestimmt. **(B)** Beispiel mehrerer sIPSCs. Es wurden nur solche Ereignisse für die Analyse gewählt, die voneinander getrennt auftraten (b) und keine Zeichen von Mehrfachereignissen (a) zeigten. **(C)** Jedes IPSC wurde mit einer Exponential-Funktion (grün) oder zwei Exponential-Funktionen (rot) angepasst (fitted) und anschließend wurde vom Experimentator entschieden, welche Funktion den Verlauf der Stromrückbildung besser beschreibt.

Um diese Ereignisse miteinander vergleichen zu können, wurde eine gewichtete Zeitkonstante τ_w nach folgender Gleichung berechnet:

$$(III) \tau_w = \frac{(A_1 \tau_1 + A_2 \tau_2)}{(A_1 + A_2)}$$

Hierbei bedeuten: A_1 , A_2 = Amplituden, τ_1 , τ_2 = Zeitkonstanten, τ_w = gewichtete Zeitkonstante.

Der Schwellenwert zur Detektierung der IPSCs lag zwischen 5 und 10 pA, je nach Qualität der Ableitung. Für jede Zelle wurde ein normalisiertes Frequenzhistogramm aller IPSCs

erstellt und anschließend wurden alle Frequenzhistogramme einer Zellgruppe zusammengefasst und erneut normalisiert.

Die Messungen der glyzinerger IPSCs wurden bei gleichzeitiger Überspülung des Präparats mit dem GABA_A-Rezeptor Antagonisten GABA_Azine (3 μM) und dem GABA_C-Rezeptor Antagonisten TPMPA (100 μM) durchgeführt. Anschließend wurde untersucht, ob sich alle synaptischen Ereignisse mit einem Gemisch aus GABA_Azine, TPMPA und Strychnin vollständig blockieren ließen.

In einigen Experimenten, insbesondere bei Messungen an AII-Amakrinzellen, wurde zusätzlich ein Agonist von metabotropen Glutamatrezeptoren (L-AP4, 50 μM) appliziert, um exzitatorische postsynaptische Ströme (EPSCs) auszuschalten.

Die Zahl der untersuchten Amakrinzellen ist mit „n“ bezeichnet, die Zahl der untersuchten Ereignisse mit „N“. Die Daten sind entweder als Mittelwert ± Standardfehler oder als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Zur Ermittlung statistischer Signifikanzen wurde der zweiseitige T-Test ($p < 0,05$) und der Kolmogorov-Smirnov-Test für zwei Datensätze ($p < 0,01$) herangezogen.

2.10 Immunzytochemie

Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurden die Tiere tief narkotisiert und dekapitiert. Daraufhin wurden die Augen entnommen. Ein Auge wurde geöffnet, Linse und Glaskörper wurden entfernt. Die Fixierung der Netzhaut im Augenbecher erfolgte mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in eisgekühltem PB bei einer Fixierdauer von 7 und 9 Minuten. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Nach dem Fixieren wurden die Augenbecher dreimal für zehn Minuten in PB gewaschen, um überschüssiges PFA zu entfernen und daraufhin für eine Stunde in 10%iger Saccharose Lösung (in PB) und für eine weitere Stunde in 20%iger Saccharose Lösung inkubiert. Der Augenbecher wurde über Nacht in 30%iger Saccharose Lösung gelagert und am folgenden Tag konnte die Netzhaut herauspräpariert und zu Gefrierschnitten (Leica Kryostat CM3050, ~20 μm dick) verarbeitet werden. Die Inkubation in der aufsteigenden Saccharosereihe dient dem Gefrierschutz, um die Netzhaut für das Schneiden im Gefriermikrotom vorzubereiten.

Die Immunfärbung erfolgte nach der indirekten Fluoreszenzmethode. Dabei wurden die Schnitte mit den Primärantikörpern gegen Parvalbumin und die α3-Untereinheit des Glyzinrezeptors (s. Tabelle 2.4) in 5% Chemieblocker und 0.5 % Triton über Nacht bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubationslösung wurde direkt auf den Objektträger pipettiert, nachdem die darauf befindlichen Schnitte mit einem wasserabweisenden Fettstift umrandet worden waren, um das Auslaufen der Lösung zu verhindern. Am folgenden Tag wurden die Schnitte mit PB 3 mal 10 Minuten gewaschen und anschließend mit den Sekundärantikörpern (s. Tabelle 2.4) inkubiert. Nach 1 bis 2 Stunden wurden die Schnitte erneut 3 mal 10 Minuten mit PB gewaschen und mit AquaPoly/Mount unter einem Deckgläschen eingebettet.

Nun konnten die Färbungen an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Leica TCS konfokales Laser Scanning Mikroskop, Leica Microsystems, Heidelberg) aufgenommen werden.

Tabelle 2.4: Verwendete Antikörper

Antigen	Wirt	Bezugsquelle	Verdünnung
GlyR α 3	Kaninchen	R.J.Harvey, London	1:1700
Parvalbumin	Maus	Sigma	1:10000
Chat	Ziege	Chemicon	1:1000
IgG-Konjugat	Wirt und Antigen	Hersteller	Verdünnung
Cy3 TM	Esel anti Kaninchen	Molecular Probes	1:500
Alexa Fluor 488 TM	Esel anti Maus	Dianova	1:500
Cy5 TM	Esel anti Ziege	Molecular Probes	1:500

Tabelle 2.5: Liste aller verwendeten Substanzen mit Herstellerangabe

Substanz	Hersteller
AlexaFluor 488 hydrazide	MoBiTec, Göttingen, Deutschland
Ames Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
AquaPoly/Mount	Polysciences Europe, Eppelheim, Deutschland
CaCl x 2H ₂ O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Carbogen	Nenner, Messer Griesheim, Deutschland
Chemiblocker	Chemicon Ltd., Hofheim, Deutschland
CsCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
EGTA (ethylene glycol-bis(β -aminoethyl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

ether)N,N,N',N'-tetraacetic acid)	
Glyzin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Halothan	Eurim Pharma, Piding, Deutschland
HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
L(+)-2-Amino-4-phosphonobutyrat (L-AP4)	Biotrend (Tocris), Köln, Deutschland
Mg-ATP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgSO ₄	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaHCO ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na-GTP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NBQX	Biotrend (Tocris), Köln, Deutschland
Neurobiotin	Linaris (Vector)
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Picrotoxinin	Research Biochemicals International, USA
SR-95531 (GABAzine)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Streptavidin Fluorescein	Amersham Biosciences, England
Strychnin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TBA (Tetrabutylammonium Chlorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TTX (Tetrodotoxin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Triton	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

III. Ergebnisse:

Es gibt ~30 unterschiedliche Typen von Amakrinzellen und sie sind die heterogenste Zellklasse der Netzhaut. Ihre Dendritenbäume zeigen eine enorme Vielfalt, was auf unterschiedliche Funktionen der jeweiligen Zellen bei der Verarbeitung des Lichtsignals schließen lässt. Amakrinzellen erhalten glutamatergen, exzitatorischen, synaptischen Eingang von Bipolarzellen und schütten als Transmitter entweder GABA oder Glyzin auf Bipolar-, Ganglien- und andere Amakrinzellen aus.

Um die Expression der verschiedenen Glyzinrezeptor-Untereinheiten und deren synaptische Eigenschaften bei Amakrinzelltypen zu untersuchen, wurden „patch clamp“ Ableitungen von Wildtypmäusen (WT) und drei GlyR-Mausmutanten (*Gla1^{spd-ot}*, *Gla2^{-/-}*, *Gla3^{-/-}*) vorgenommen. Zum einen wurde gemessen, welche Ströme die Applikationen von Glyzin und deren Antagonisten Picrotoxinin und Strychnin bei Amakrinzellen auslösen. Zum anderen wurde die endogene synaptische Aktivität der Zellen abgeleitet, glyzinerge Ströme wurden pharmakologisch isoliert, und ihre Amplitude und Kinetik (Zeitkonstante der Deaktivierungs-/Desensitivierungskinetik) bestimmt. Während ihrer Ableitung wurden die Zellen mit Neurobiotin und einem Fluoreszenzfarbstoff gefüllt und konnten später am Mikroskop aufgenommen und klassifiziert werden. Die Daten eines Zelltyps bzw. einer Zellgruppe in den verschiedenen Mauslinien wurden miteinander verglichen und ließen Aussagen bezüglich der spezifischen Glyzinrezeptoren zu.

3.1 Amakrinzelltypen

Aus der Vielzahl der unterschiedlichen Typen von Amakrinzellen wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Gruppen untersucht und diese sind in Abbildung 3.1 dargestellt. Die beiden Gruppen sind relativ häufig, so dass sie in allen vier Mauslinien in genügender Zahl untersucht werden konnten. Es handelt sich um die AII-Amakrinzelle, die etwa 10 % aller Amakrinzellen umfasst und Teil des vertikalen Stäbchen-Pfades ist (Abb. 3.1 links). Weiterhin wurde von einer Gruppe von „narrow-field“-Amakrinzellen abgeleitet, die sich durch ein kleines Dendritenfeld auszeichnen, das die gesamte IPL durchzieht (s. Abb. 3.1 Mitte und rechts). Die Zellen sehen ähnlich aus, zeigen vergleichbare glyzinerge Ströme und werden deshalb im Folgenden zusammengefasst und als NF-Amakrinzellen (narrow-field) bezeichnet.

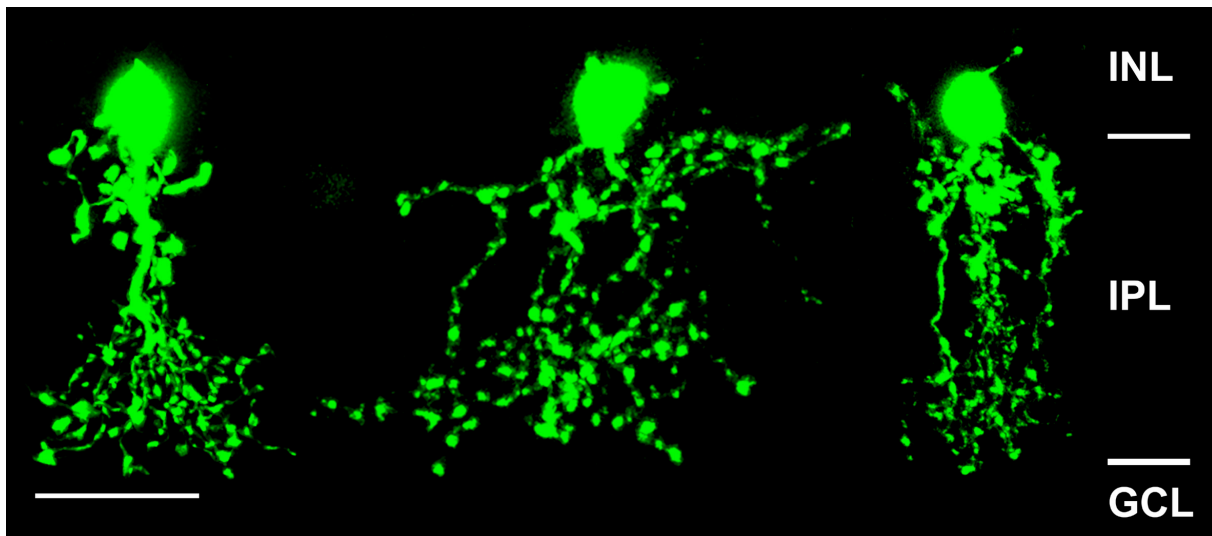


Abbildung 3.1: AII-Amakrinzelle und NF-Amakrinzellen, die während der Ableitung mit Alexa 488 und Neurobiotin gefüllt wurden. Vertikalschnitt. **Links:** AII-Amakrinzelle mit den typischen keulenförmigen Dendriten in der äußeren IPL und einem Primärdendriten, der in der inneren IPL buschig verzweigt. **Mitte:** ein weiterer Zelltyp mit vergleichsweise geringem Durchmesser des Dendritenfeldes, dessen Dendriten annähernd die gesamte IPL durchziehen (Typ 5/6 nach Menger et al., 1998). **Rechts:** Amakrinzelle mit kleinem Dendritenbaum, dessen Dendriten ebenfalls die gesamte IPL durchdringen. Die Zelle ist schlanker als die Zelle in der Mitte und weist Ähnlichkeit mit AII-Amakrinzellen auf (Typ 7 nach Menger et al., 1998). INL: innere Körnerschicht; IPL: innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht. Skala: 20 µm

Es wurden noch weitere Typen von Amakrinzellen abgeleitet und die Abbildungen 3.14 - 3.15 (s. Seite 48 - 50) zeigen eine Auswahl. Sie werden im Rahmen dieser Arbeit nur andeutungsweise behandelt.

Zusätzlich wurden auch Amakrinzellen im Netzhautganzpräparat (whole mount) untersucht. In der Ganglienschicht der Netzhaut liegen Zellkörper von ektopischen Amakrinzellen (displaced amacrine cells). Diese Zellen zeichnen sich alle dadurch aus, dass sie große Dendritenbäume besitzen (wide-field, WF) und GABA als Neurotransmitter ausschütten. Um von diesen Zellen abzuleiten, stand eine Mauslinie zur Verfügung, die unter der Kontrolle des GAD67-Promotors GFP exprimiert, wodurch alle GABAergen Zellen in der Ganglienschicht markiert waren.

3.2 Elektrophysiologie

Die „patch clamp“ Ableitungen an AII- und NF-Amakrinzellen wurden bei einem Haltepotential von -60 mV durchgeführt und die Zellen konnten im Schnittpräparat pharmakologisch untersucht werden. Dafür wurde eine Applikationspipette (200 µm

Durchmesser) in die Nähe der Zelle positioniert, um sowohl Zellkörper als auch die Dendriten der Zelle zu umspülen. Somit konnten alle Glyzinrezeptoren der Zelle aktiviert werden.

Alle untersuchten Amakrinzellen reagierten auf die Applikation von Glyzin mit einem Stromfluss zwischen 200 pA und 2 nA. Unter physiologischen Umständen führt das Öffnen des Chloridkanals üblicherweise zu einem Einwärtsstrom von Chloridionen und somit zur Hyperpolarisation der Zelle. Durch den hohen Anteil an Chloridionen in der Ableitelektrode führte die Applikation von Glyzin in den hier durchgeführten Experimenten zu einem Auswärtsstrom von Chlorid und somit zur Depolarisation der Zelle.

Um die Affinität von Glyzin und Glyzinrezeptor in den verschiedenen Zelltypen zu untersuchen, wurde Glyzin in Konzentrationen zwischen 10 μ M und 20 mM appliziert und aus den gemessenen Strömen wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt. Mit steigender Konzentration des Glyzins erhöhte sich auch die Antwort der Zelle bis ein maximaler Stromfluss erreicht war. Die Antworten von 12 NF-Zellen und 14 - 18 AII-Zellen wurden auf den maximalen Stromfluss (I_{max}) bei 20 bzw. 10 mM Glyzin normalisiert, zusammengefasst und durch eine Hill-Kurve approximiert (s. Abb. 3.2). Abb. 3.2A zeigt die typische Antwort einer NF-Amakrinzelle, die bei einer Konzentration von 10 - 20 μ M Glyzin erstmals reagiert und bei 20 mM in der Sättigung ist. Mithilfe der Daten von 12 NF-Amakrinzellen wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt (s. Abb. 3.2B). Anhand der Kurve lässt sich der EC_{50} -Wert für die Glyzinrezeptoren dieser Amakrinzellen ablesen, der im vorliegenden Fall 375 μ M Glyzin beträgt.

Für AII-Amakrinzellen ergab sich ein vergleichbarer Schwellenwert für die Aktivierung der Glyzinrezeptoren (10 - 20 μ M), jedoch war bereits bei einer Konzentration von 5 mM Glyzin eine Sättigung der Zellantwort erreicht (s. Abb. 3.2C&D). Der EC_{50} -Wert lag bei einer Glyzinkonzentration von 135 μ M ($n = 14 - 18$).

Diese Zellantworten konnten durch den Glyzinrezeptor-spezifischen Antagonisten Strychnin (3 μ M) weitgehend blockiert werden (s. Abb. 3.2E).

Das pflanzliche Alkaloid Picrotoxinin ist bekannt als wirksamer Antagonist von ionotropen GABA- und Glyzin-Rezeptoren. Es wirkt wesentlich stärker bei homomeren als bei heteromeren Glyzinrezeptoren (Pribilla et al., 1992) und deshalb lässt sich anhand der Wirkung von Picrotoxinin auf Glyzinströme der Anteil homomerer Rezeptoren abschätzen. Es ist auch bekannt, dass heteromere $\alpha 2\beta$ -Glyzinrezeptoren empfindlicher für Picrotoxinin sind als $\alpha 1\beta$ - und $\alpha 3\beta$ -Rezeptoren (Pribilla et al., 1992). Deshalb wurde Picrotoxinin in einer Konzentration von 300 μ M Picrotoxinin eingesetzt, um Hinweise auf die Existenz von homo-

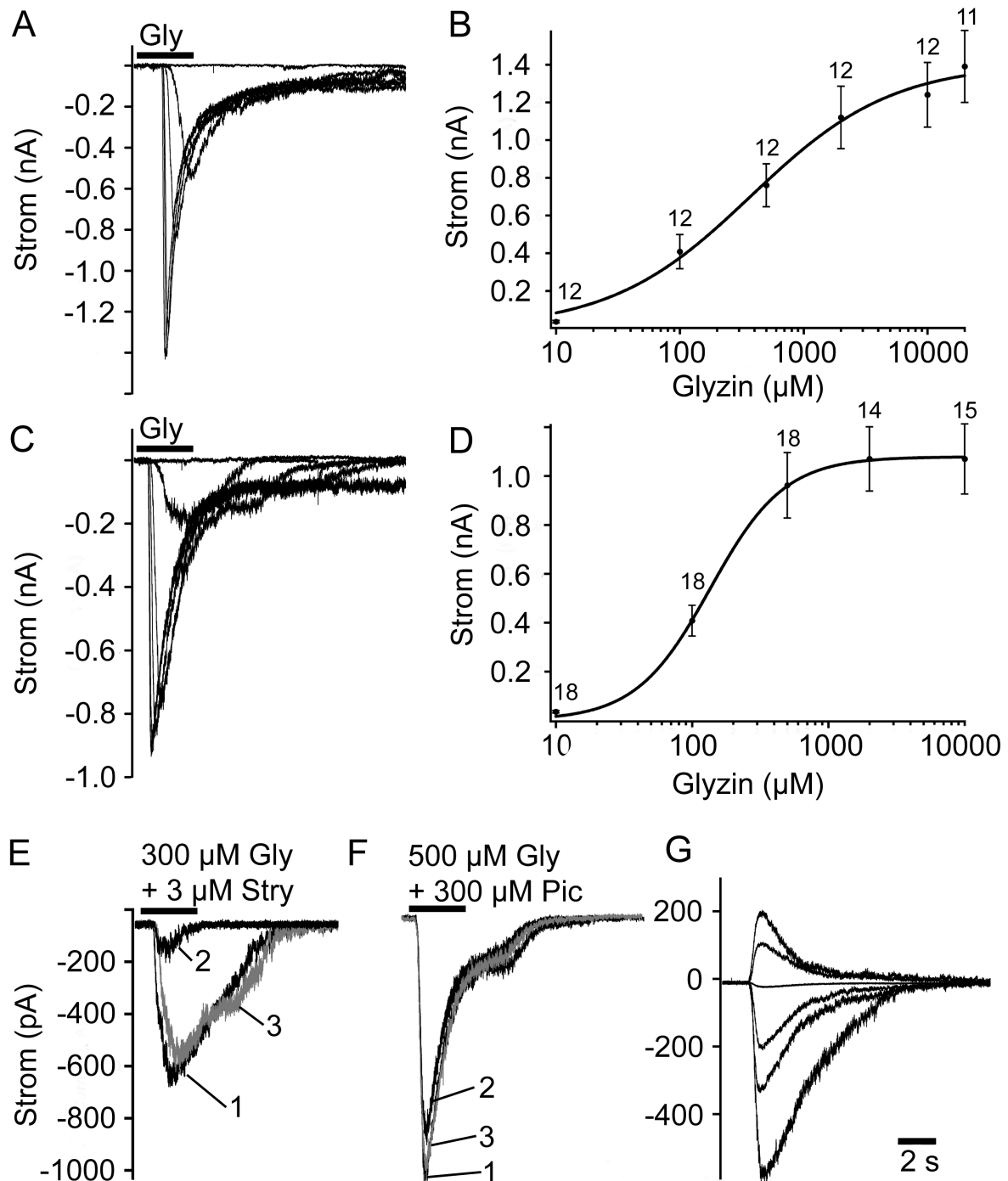


Abbildung 3.2: Applikation von Glyzin und Glyzinrezeptor-Antagonisten. **(A)**, verschiedene Konzentrationen Glyzin wurden bei einer NF-Amakrinzelle appliziert. **(B)**, die mittleren Amplituden von 12 NF-Amakrinzellen bei den Konzentrationen 10, 100, 500, 5000, 10000, 20000 μM Glyzin wurden logarithmisch aufgetragen und mit einer Hill-Funktion angepasst. **(C)**, Antworten einer AII-Amakrinzelle auf verschiedene Glyzinkonzentrationen. **(D)**, Dosis-Wirkungskurve von 14 - 18 AII-Amakrinzellen für die Glyzinkonzentrationen 10, 100, 500, 5000, 10000 μM Glyzin. **(E)**, Glyzinantwort einer AII-Amakrinzelle (1), die durch Koapplikation von Glyzin und Strychnin annähernd vollständig blockiert wurde (2) und reversibel war (3). **(F)**, Stromantwort einer AII-Amakrinzelle auf 500 μM Glyzin (1), reduzierte Antwort auf Koapplikation von 500 μM Glyzin und 300 μM Picrotoxin (2) und erneute Applikation von 500 μM Glyzin nach Auswaschen (3). **(G)**, Glyzinantworten einer AII-Amakrinzelle bei 6 verschiedenen Haltepotentialen der Zelle (-60, -40, -20, 0, 20, 40 mV), mit der negativsten Stromamplitude bei -60 mV und der positivsten Stromamplitude bei 40 mV.

meren Glyzinrezeptoren und die Rolle der $\alpha 2$ -Untereinheit bei diesen Zellen zu bekommen. Abbildung 3.2F zeigt die Wirkung von Picrotoxinin auf die Stromantwort einer AII-Amakrinzelle. Die Zelle reagierte auf die Applikation von 500 μM Glyzin mit einer Stromantwort von etwa 1000 pA (Abb. 3.2F 1). Koapplikation mit 300 μM Picrotoxinin führte zu einer Reduktion der Zellantwort (2), die nach dem Auswaschen des Picrotoxinins reversibel war (3). Die Applikation von 500 μM Glyzin und 300 μM Picrotoxinin führte bei den untersuchten 47 AII-Amakrinzellen zu einer durchschnittlichen Reduktion der Stromantwort um ca. 26 %. Eine vergleichbare Wirkung war auch bei AII-Amakrinzellen der Mausmutanten *Gla1^{spd-ot}*, *Gla2^{-/-}* und *Gla3^{-/-}* festzustellen (s. Abb. 3.3A und Tabelle 3.1). Bei NF-Amakrinzellen blieben während der Koapplikation von Glyzin und Picrotoxinin 69% der Stromantwort im Vergleich zur Kontrollantwort (nur Glyzin) bestehen (n = 43). Auch hier fanden sich vergleichbare Ergebnisse zwischen WT- und KO-Mäusen (s. Abb. 3.3A und Tabelle 3.1).

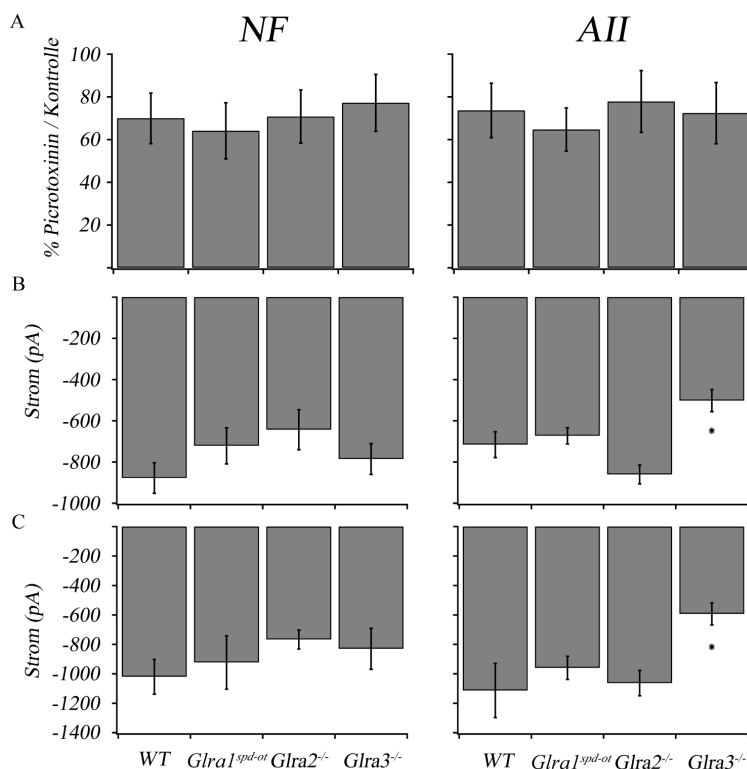


Abbildung 3.3: Auswertung der Picrotoxininempfindlichkeit und der Glyzinantworten von AII- und NF-Amakrinzellen. **(A)**, die Koapplikation von 500 μM Glyzin mit 300 μM Picrotoxinin führte sowohl bei NF-Amakrinzellen (links) als auch bei AII-Amakrinzellen (rechts) in allen untersuchten Mauslinien zu einer reduzierten Stromamplitude, die Reduktion lag zwischen 25 und 35%. **(B)**, **(C)**, Stromamplituden von NF- und AII-Amakrinzellen in allen untersuchten Mauslinien, ausgelöst durch 500 μM (B) bzw. 10 mM (C) Glyzin. Standardfehler ist angezeigt, (*) zeigt signifikanten Unterschied an.

Betrachtet man die Glyzinantworten (500 μM und 10 mM) von AII-Amakrinzellen und NF-Amakrinzellen bei verschiedenen Knock-out-Mäusen, so zeigten sich folgende Unterschiede: Im Falle der AII-Amakrinzellen fanden sich bei beiden Glyzinkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-, *Gla1^{spd-ot}*- und *Gla2^{-/-}*- Mäusen. Dagegen war die Amplitude bei *Gla3^{-/-}*- Mäusen um bis zu 50 % (10 mM) reduziert und auch die Applikation

von 500 μM Glyzin führte zu einer signifikanten Reduktion. Nichtsdestotrotz zeigten AII-Amakrinzellen bei dieser Mauslinie deutliche Zellantworten auf Glyzin (s. Abb. 3.3B&C und Tabelle 3.1).

Bei NF-Amakrinzellen traten bei beiden Glyzinkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Mauslinien auf. Allerdings wiesen die Zellen bei GlyR-defizienten Mäusen geringere Amplituden als beim WT auf, mit der größten Reduktion bei *Gla2*^{-/-}-Mäusen (Reduktion um durchschnittlich 25%, s. Abb. 3.3B&C und Tabelle 3.1).

Abbildung 3.2G zeigt Zellantworten einer AII-Amakrinzelle bei Applikation von 500 μM Glyzin, gemessen bei verschiedenen Haltepotentialen (-60, -40, -20, 0, 20, 40 mV). Der von Glyzinrezeptoren getragene Chloridstrom ändert in Abhängigkeit der Spannung die Fließrichtung. Bei einem Haltepotential von -60 mV führt dies zu einem Ausstrom von Chloridionen (dargestellt als negativer Strom, s. Material und Methoden, 2.8). Mit der Erhöhung des Haltepotentials sinkt die Amplitude der Glyzinantwort bis es zwischen 0 und 20 mV zu einer Änderung der Fließrichtung kommt und die Chloridionen in die Zelle einströmen. Man spricht vom Umkehrpotential.

AII Amakrinzellen	500 μM Gly Stromamplitude			10 mM Gly Stromamplitude			Picrotoxinin		
	(pA)	n	t-Test	(pA)	n	t-Test	Block (%)	n	t-Test
WT	-715 \pm 62	21		-1113 \pm 183	6		73 \pm 1.8	47	
<i>Gla1</i> ^{spd-ot}	-673 \pm 45	16	0,62	-959 \pm 85	7	0,48	64 \pm 2.9	12	0,03*
<i>Gla2</i> ^{-/-}	-860 \pm 53	10	0,16	-1063 \pm 75	7	0,81	77 \pm 4.5	10	0,37
<i>Gla3</i> ^{-/-}	-501 \pm 39	28	0,005*	-592 \pm 78	7	0,03*	72 \pm 2.6	31	0,69
NF									
Amakrinzellen									
WT	-877 \pm 73	28		-1020 \pm 118	18		69 \pm 1.8	43	
<i>Gla1</i> ^{spd-ot}	-721 \pm 87	29	0,21	-923 \pm 180	9	0,6	64 \pm 2.6	25	0,06
<i>Gla2</i> ^{-/-}	-647 \pm 97	9	0,12	-767 \pm 64	8	0,1	70 \pm 4.7	7	0,87
<i>Gla3</i> ^{-/-}	-785 \pm 75	24	0,38	-829 \pm 139	16	0,4	77 \pm 2.5	29	0,01*

Tabelle 3.1: Die Applikation von 500 μM und 10 mM Glyzin bei AII- und NF-Amakrinzellen in WT und GlyR KO-Tieren. Der Mittelwert (+ Standardfehler), die Anzahl der Zellen und die statistische Signifikanz (t-Test) sind angegeben. (*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. Picrotoxininblock (%) gibt den prozentualen Teil des Glyzinstroms an, der unempfindlich gegenüber der Koapplikation von Picrotoxinin und Glyzin war.

Ähnliche Versuche wurden auch bei der Registrierung von spontanen, hemmenden synaptischen Strömen (sIPSCs) unternommen. Diese wurden bei verschiedenen Haltepotentialen gemessen und Abb. 3.4A zeigt Stromspuren dieser sIPSCs bei den Haltepotentialen -60, -40, -20, 0, 20 und 40 mV. Auch hier verringerte sich mit dem Anstieg

der Spannung die Amplitude der sIPSCs bis es zwischen 0 und 10 mV zur Richtungsänderung des Stromflusses kam.

Bei 5 Amakrinzellen wurde der Mittelwert der Amplitude der sIPSCs gegen die jeweilige Spannung aufgetragen und eine Regressionsgerade wurde angepasst. Mittels dieser Darstellung (Abb. 3.4B) ließ sich das Umkehrpotential bei 3,6 mV ablesen. Anhand der bekannten Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle lässt sich das Umkehrpotential von Chloridionen auch über die Nernst-Gleichung berechnen (s. Material und Methoden, 2.7): Das gemessene und das berechnete Umkehrpotential stimmen gut überein.

3.3. Spontane hemmende synaptische Ströme (sIPSCs) von Amakrinzellen

Die spontane synaptische Aktivität von Amakrinzellen wurde im Schnittpräparat gemessen. Dabei zeigte sich von Zelle zu Zelle eine enorme Variabilität der synaptischen Aktivität, die mit dem Zustand des Schnitts und damit den Zellen im Netzwerk der abgeleiteten Zelle in Zusammenhang standen. Es konnten neben glyzineren sIPSCs auch glutamaterge EPSCs sowie GABAerge sIPSCs beobachtet werden, die aber nicht weiter untersucht wurden.

Bei einigen Versuchen wurden die Na⁺-Ionen (20 mM, s. Material und Methoden, Tabelle 2.2) der HBS-Lösung, in der sämtliche Agonisten und Antagonisten gelöst waren, durch K⁺-Ionen ersetzt, um so glyzinerge Amakrinzellen im Präparat zu depolarisieren und die spontane Ausschüttung von Glyzin an den Synapsen zu erhöhen.

Zur Isolierung der glyzineren von GABAergen sIPSCs wurde der Schnitt mit den spezifischen GABA-Rezeptor Antagonisten GABAzine (3 µM) und TPMPA (100 µM) umspült (s. Abb. 3.4C&D 2). Glyzinerge sIPSCs ließen sich anschließend durch Strychnin (3 µM) blockieren (Abb. 3.4C&D 3). Nach dem Auswaschen der Antagonisten wurden wiederum IPSCs gemessen (Abb. 3.4C&D 4). In Abbildung 3.4 sind Stromspuren während eines solchen Versuches für eine NF-Amakrinzelle (C) und für eine AII-Amakrinzelle (D) exemplarisch dargestellt. So zeigte sich vor Zugabe der Antagonisten, dass die jeweilige Zelle synaptischen Eingang bekam (1) und dass dieser nicht durch GABA-Rezeptor-Antagonisten zu blockieren war (2). Doch unmittelbar mit der zusätzlichen Applikation von Strychnin kam es zum Verschwinden aller sIPSCs, die also durch Glyzinrezeptoren getragen werden (3). Erst mit dem Auswaschen der Antagonisten fand sich wieder eine steigende Anzahl der synaptischen Ereignisse (4). Hierbei reagierten die NF- und die AII-Amakrinzelle in ähnlicher Weise.

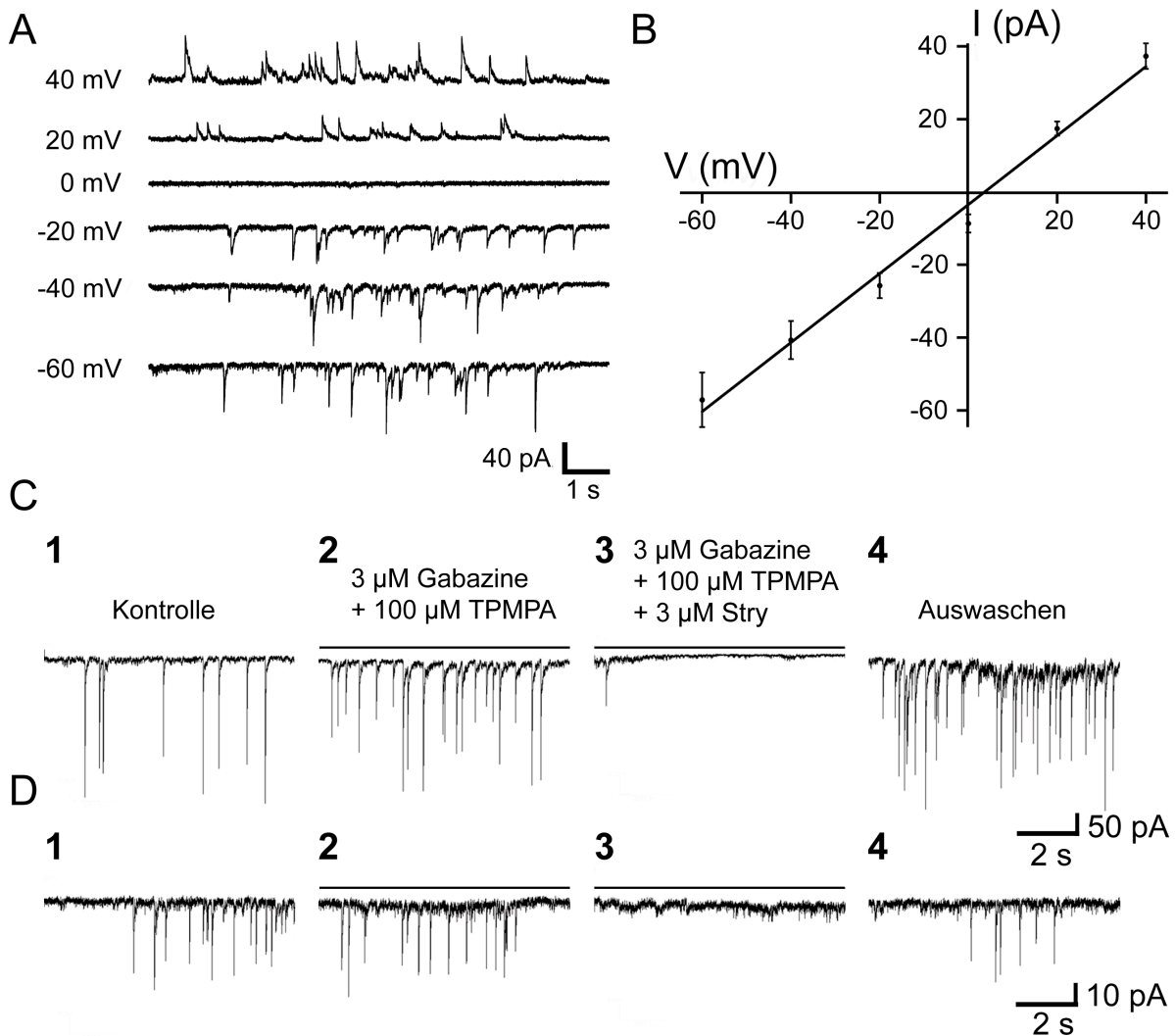


Abbildung 3.4: Glyzinerge sIPSCs von Amakrinzellen. **(A)**, Ableitungen von glyzinergen sIPSCs einer NF-Amakrinzelle bei 6 verschiedenen Haltepotentialen. **(B)**, Strom-Spannungskurve der sIPSCs von 5 Amakrinzellen mit einem Umkehrpotential bei 3,6 mV (mit Standardfehler). **(C)**, Messungen von sIPSCs einer NF-Amakrinzelle bei verschiedenen pharmakologischen Zuständen. (1) Kontrolle mit regelmäßigem Auftreten von sIPSCs. (2) Die sIPSCs werden nicht durch die GABA_A- und GABA_C-Antagonisten Gabazine und TPMPA blockiert. Erst durch den Zusatz von Strychnin (3) kam es zum abrupten Block der sIPSCs, der durch Auswaschen der Antagonisten reversibel war (4). **(D)**, Gleiches gilt für eine AII-Amakrinzelle.

In Abbildung 3.5 A&C sind nun glyzinerge Ereignisse der NF-Amakrinzelle und der AII-Amakrinzelle aus Abb. 3.4C&D mit einer höheren zeitlichen Auflösung wiedergegeben. Der Zeitverlauf der Deaktivierungs-/Desensitivierungskinetik konnte für jedes einzelne Ereignis bestimmt werden, sofern diese Ereignisse Einzellereignisse waren und getrennt voneinander auftraten. Der Zeitverlauf der sIPSCs kann durch Exponentialfunktionen beschrieben werden. Dabei ist es manchmal notwendig den Abfall des Stromes durch die Summe zweier Exponentialfunktionen zu approximieren, in vielen Fällen ergibt jedoch bereits eine einzige Funktion eine zufrieden stellende Anpassung. Letzteres war bei allen AII-Amakrinzellen der Fall. Bei den NF-Zellen war bei etwa 80 % der sIPSCs eine einzige Funktion ausreichend, bei

den restlichen 20 % waren 2 Funktionen notwendig. In Abbildung 3.5B sind ein gemittelt und normalisiertes IPSC einer NF-Amakrinzelle (grau) und die dazugehörige Biexponentialfunktion (schwarz) gezeigt. Die Anpassung erfolgte in diesem Fall mit den Zeitkonstanten $\tau_1 = 13$ ms und $\tau_2 = 37$ ms, wodurch sich eine gewichtete Zeitkonstante von $\tau_w = 21$ ms ergab (s. Material und Methoden 2.9). Das gemittelte und normalisierte IPSC der AII-Amakrinzelle (3.5D, grau) konnte mit einer Exponentialfunktion (schwarz) und einer Zeitkonstante τ von 10 ms approximiert werden.

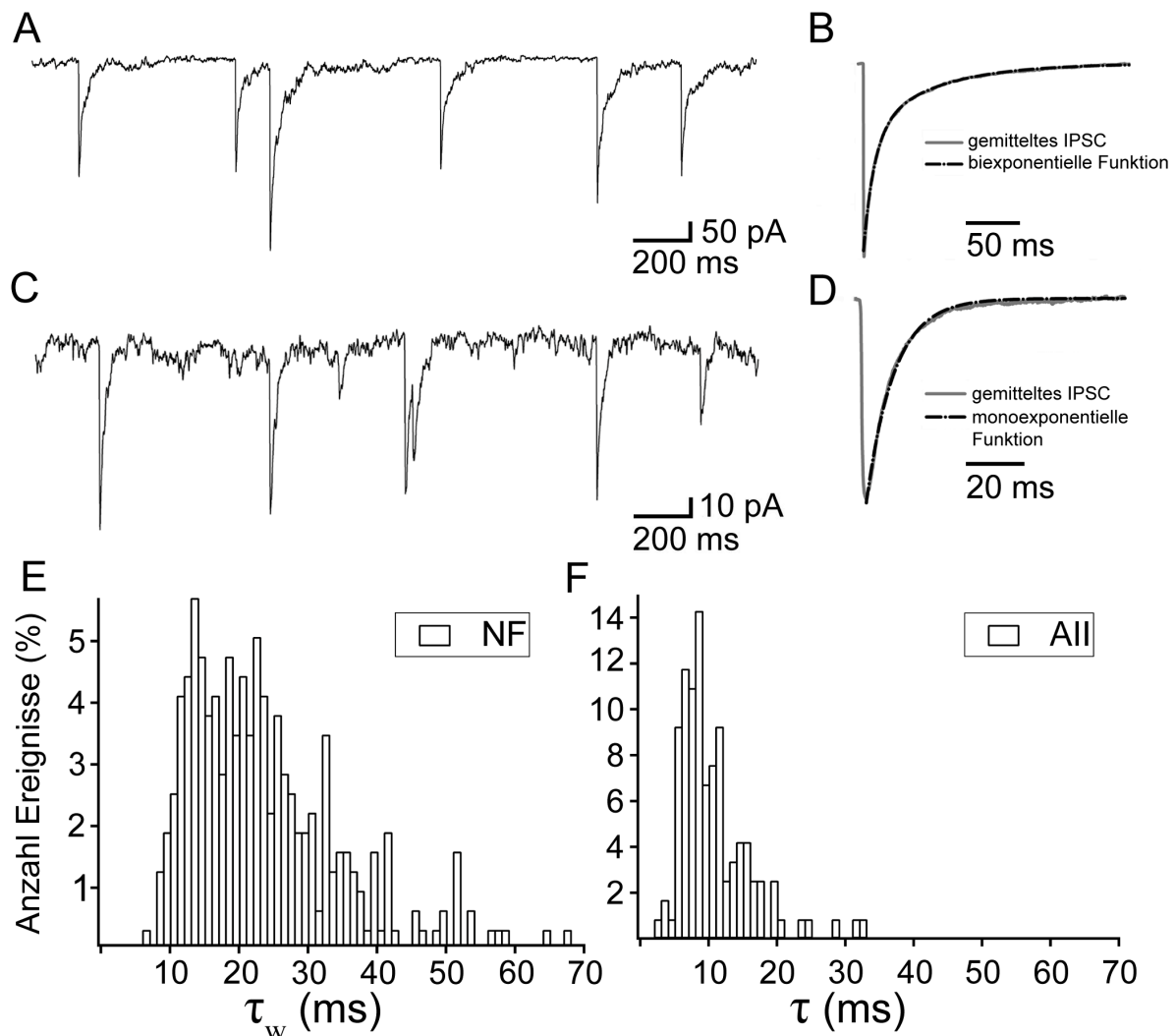


Abbildung 3.5: unterschiedliche sIPSCs bei NF-Amakrinzellen und AII-Amakrinzellen. **(A)**, Darstellung glyzinerger sIPSCs der NF-Amakrinzelle aus Abb. 3.4 in höherer zeitlicher Auflösung. **(B)**, gemittelt und normalisiertes IPSC der NF-Amakrinzelle aus (A) und eine beschreibende biexponentielle Funktion der Stromrückbildung. **(C)**, Darstellung glyzinerger sIPSCs der AII-Amakrinzelle aus Abb. 3.4 in höherer zeitlicher Auflösung. **(D)**, gemittelt und normalisiertes IPSC der AII-Amakrinzelle aus (C) und eine beschreibende monoexponentielle Funktion der Stromrückbildung. **(E)**, Histogramm der gewichteten Zeitkonstanten der NF-Amakrinzelle (N = 316). **(F)**, Histogramm der Zeitkonstanten der AII-Amakrinzelle (N = 119).

Die Häufigkeiten der Zeitkonstanten sind in den Histogrammen der Abbildung 3.5E für die NF-Amakrinzelle und in Abbildung 3.5F für die AII-Amakrinzelle gezeigt. Bei der NF-Amakrinzelle wurden 316 Ereignisse analysiert und der Großteil dieser Ereignisse konnte mit

Zeitkonstanten zwischen 10 und 40 ms beschrieben werden. Der Mittelwert lag bei $\tau = 23 \pm 12$ ms.

Bei der AII-Amakrinzelle (119 analysierte Ereignisse) lagen die Zeitkonstanten zwischen 5 und 20 ms, bei einem Mittelwert von $\tau = 10 \pm 5$ ms. Wendet man den Kolmogorov-Smirnov-Test für zwei Stichproben auf die Histogramme dieser beiden Zellen an, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied für die Verteilung der Zeitkonstanten ($P < 0,01$).

3.4 Glyzinerge sIPSCs von AII-Amakrinzellen

AII-Amakrinzellen konnten in der Regel durch die typische Form und Lage des Zellkörpers und des Hauptdendriten identifiziert werden. Zusätzlich zeigten AII-Amakrinzellen auch typische elektrophysiologische Eigenschaften, die nur bei diesem Zelltyp gemessen wurden. Bei einigen AII-Zellen wurde ein starker exzitatorischer Eingang (EPSCs) gemessen, der offensichtlich durch Stäbchenbipolarzellen erzeugt wird (s. Abb. 3.6A), denn er ließ sich durch die zusätzliche Zugabe von L-AP4 blockieren bzw. stark reduzieren. L-AP4 ist ein Agonist der metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe 3. Dieser Rezeptortyp wird von allen ON-Bipolarzellen exprimiert, unter anderem auch von den Stäbchenbipolarzellen, die mit AII-Amakrinzellen verbunden sind (Wässle & Boycott, 1991). Durch Zugabe von L-AP4 ließ sich das Rauschen der Stromspuren und damit das Verhältnis des Signals zum Rauschen verbessern. Allerdings wurde dabei in Kauf genommen, dass der ON-Pfad während des Versuchs blockiert ist. Abbildung 3.6A zeigt die Wirkung des L-AP4 auf die Stromspur einer AII-Amakrinzelle, die anfangs noch starken exzitatorischen Eingang bekommt. Diese EPSCs sind darunter in Form der gemessenen Stromspur in höherer zeitlicher Auflösung vergrößert dargestellt (Abb. 3.6B). In Abbildung 3.6A rechts ist ein einzelnes glyzineres sIPSC zu sehen, welches unter 3.6C vergrößert dargestellt ist. Betrachtet man jeweils ein gemittelt EPSC (Abb. 3.6D) und IPSC (Abb. 3.6E), so ist erkennbar, dass EPSCs und IPSCs verschiedene Kinetiken haben und so voneinander unterscheidbar sind. Dies wird durch die Histogramme in Abbildung 3.6F dokumentiert. EPSCs haben eine mittlere Zeitkonstante von $\tau = 1,3 \pm 0,07$ ms ($n = 4$) und es zeigt sich keine Überlappung der Zeitkonstanten von EPSCs (schwarze Balken) und IPSCs (weiße Balken). Diese schnellen Ereignisse, die sich durch L-AP4 stark reduzieren ließen, waren nicht durch den Glyzinrezeptor-Antagonisten Strychnin zu blockieren (nicht gezeigt). Durch den Einsatz des ionotropen Glutamatrezeptor-Antagonisten

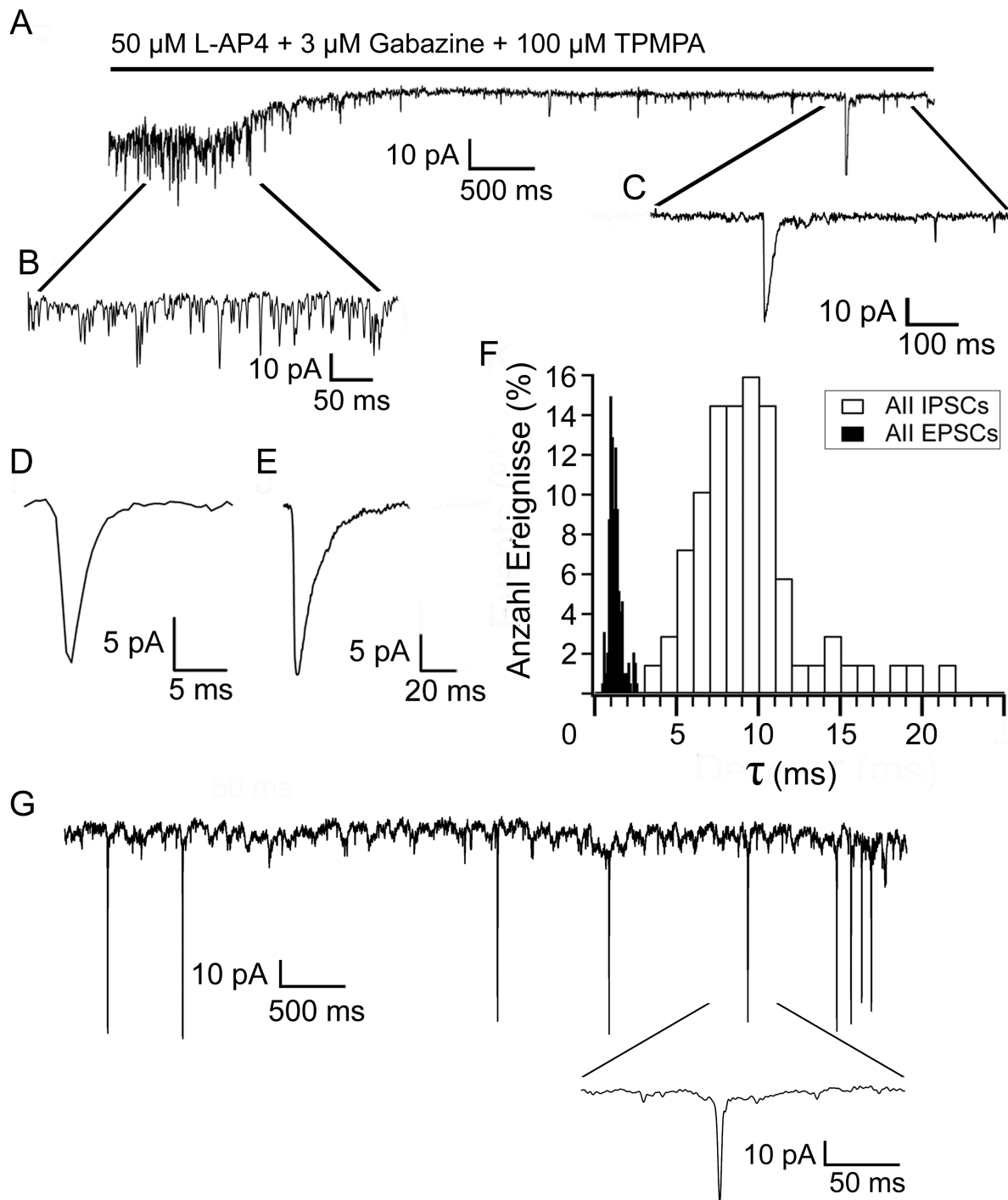


Abbildung 3.6: elektrophysiologische Eigenschaften von All-Amakrinzellen. **(A)**, die Zellen erhielten neben sIPSCs (rechts) auch exzitatorischen Eingang (EPSCs, links). **(B)**, höhere zeitliche Auflösung der EPSCs. **(C)**, höhere zeitliche Auflösung eines IPSCs. **(D)**, gemitteltes EPSC. **(E)**, gemitteltes IPSC. **(F)**, Histogramm der Zeitkonstanten der EPSCs (schwarze Balken) und IPSCs (weiße Balken) dieser Zelle **(G)**, All-Amakrinzellen generierten spontan auftretende Aktionsströme. Unten: Vergrößerung eines Aktionsstroms.

NBQX (10 μM) konnten diese Ströme unterdrückt werden (nicht gezeigt). Eine pharmakologische Ausschaltung der EPSCs während der Versuche wäre grundsätzlich möglich gewesen. Sie wurde aber nicht durchgeführt, weil dadurch auch der erregende Eingang derjenigen glyzinerger Amakrinzellen unterdrückt worden wäre, die bei den hier

untersuchten Amakrinzellen die sIPSCs erzeugen. Die Blockade dieses erregenden Eingangs hätte somit zu einer signifikanten Verringerung der sIPSCs geführt. Um die Aktivität der Amakrinzellen im Schnittpräparat möglichst hoch zu halten, wurde also kein NBQX eingesetzt. Synaptische Ereignisse mit Zeitkonstanten $\tau < 3$ ms wurden als EPSCs interpretiert, während Zeitkonstanten über 3 ms als IPSCs gewertet wurden.

Eine weitere typische Eigenschaft von AII-Amakrinzellen ist das spontane Auftreten von Strompulsen, die bei Aktionspotentialen auftreten. Sie wurden vor allem durch die Applikation von K^+ -Ionen ausgelöst oder traten zu Beginn einer Ableitung auf, wenn gelegentlich die Spannung an den Dendriten der Zelle durch den Verstärker noch nicht ausreichend kontrollierbar war. Eine Reihe solcher Stromstöße ist in Abbildung 3.6G dargestellt (Vergrößerung unten), und auch diese Ströme ließen sich aufgrund ihrer schnellen Kinetik und ihres Aktivierungsverlaufes trennen. AII-Amakrinzellen wurden sowohl in Wildtypmäusen als auch in den Glyzinrezeptor Knock-out Mäusen abgeleitet und in allen Mauslinien wurden diese charakteristischen elektrophysiologischen Eigenschaften der AII-Amakrinzellen beobachtet.

Die Ergebnisse der Analyse glyzinerger sIPSCs von AII-Amakrinzellen sind in Abbildung 3.7 zusammengefasst. Bei 33 AII-Amakrinzellen der adulten Wildtypnetzhaute konnten insgesamt 2407 glyzinerge sIPSCs gemessen und analysiert werden. Das normierte Histogramm für die Zeitkonstanten der Deaktivierungs-/Desensitivierungskinetik der glyzineren sIPSCs zeigt ein Maximum bei $\tau = 8$ ms und der Großteil aller sIPSCs konnte durch Exponentialfunktionen mit Zeitkonstanten zwischen 5 und 25 ms beschrieben werden (Abb. 3.7A, schwarze Balken). Der Mittelwert der Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs lag bei $\tau = 11,2 \pm 2$ ms. Im gleichen Histogramm (weiße Balken) ist auch die Analyse von 2032 Ereignissen aus 27 AII-Amakrinzellen dargestellt, die bei Tieren gemessen wurden, denen die $\alpha 2$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors fehlte (*Gla2*^{-/-}). Auch hier findet sich ein Maximum bei $\tau = 8$ ms und eine Streuung der Zeitkonstanten zwischen 5 und 25 ms. Die Verteilungen bei Wildtypmäusen und *Gla2*^{-/-}-Mäusen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede (Kolmogorov-Smirnov-Test für zwei Stichproben, $P > 0,05$) und der Mittelwert lag bei $11,4 \pm 2,3$ ms. Bei jungen (p16 - 21) Mäusen ohne funktionelle $\alpha 1$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors (*Gla1*^{spd-ot}) wurde eine vergleichbare Verteilung der Zeitkonstanten mit einem Maximum bei $\tau = 9$ ms gemessen (s. Abb. 3.7B, weiße Balken, $n = 9$, $N = 1323$). Im Mittel lagen die Zeitkonstanten bei $10,8 \pm 1,5$ ms. Bei gleichaltrigen Wildtypmäusen (Abb. 3.7B, schwarze Balken, $n = 11$, $N = 857$)

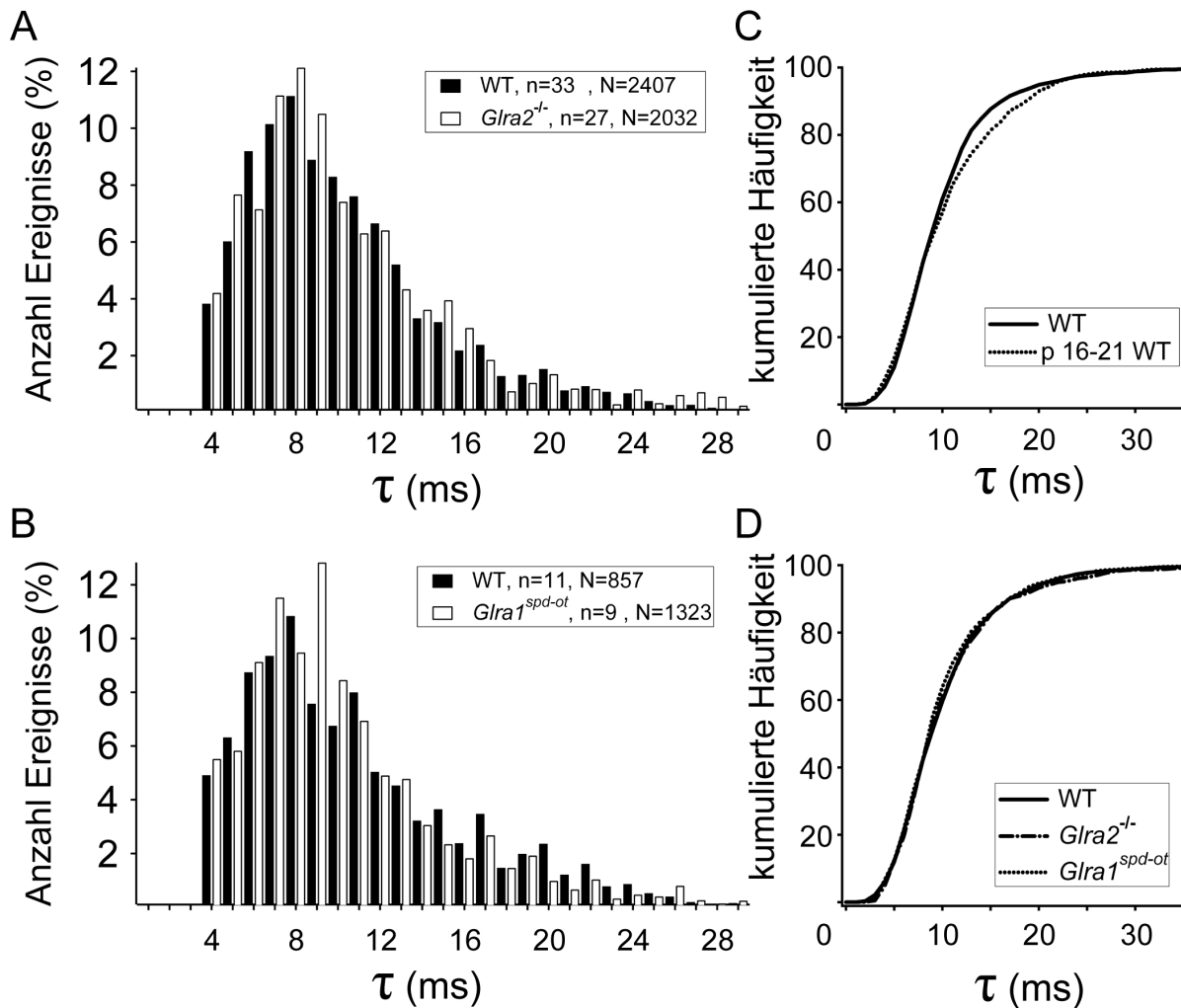


Abbildung 3.7: Analyse glyzinerger sIPSCs von All-Amakrinzellen in WT-, *Glra1^{spd-ot}*- und *Glra2^{-/-}*-Mäusen. **(A)**, Histogramm der Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs in All-Amakrinzellen von adulten WT- (schwarze Balken) und *Glra2^{-/-}*- (weiße Balken) Mäusen. **(B)**, Histogramm der Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs bei All-Amakrinzellen von juvenilen WT- (schwarze Balken) und juvenilen *Glra1^{spd-ot}*- (weiße Balken) Mäusen. **(C)**, Darstellung der Zeitkonstanten von WT All-Amakrinzellen in juvenilen und adulten Mäusen als kumulierte Häufigkeiten. **(D)**, Vergleich der Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs in adulten WT- und *Glra2^{-/-}*-, sowie in juvenilen *Glra1^{spd-ot}*-Mäusen.

wurde eine sehr ähnliche Verteilung der Zeitkonstanten mit einem Maximum bei $\tau = 8$ ms gefunden. Die statistische Analyse ergab auch hier keinen signifikanten Unterschied zwischen jungen Wildtypmäusen und *Glra1^{spd-ot}*-Mäusen (Kolmogorov-Smirnov-Test für zwei Stichproben, $P > 0,05$).

Weiterhin war auch kein Unterschied zwischen den glyzinergeren sIPSCs juveniler und adulter Wildtypmäuse festzustellen (Kolmogorov-Smirnov-Test, $P > 0,05$). Die Verteilung der sIPSC Zeitkonstanten als kumulative Häufigkeit zeigt Abbildung 3.7C für adulte (—) und juvenile Wildtypmäuse (•••••). Beide Kurven zeigen einen nahezu gleichen Verlauf. Dieselbe Form der kumulierten Darstellung wurde auch in Abbildung 3.7D gewählt, um die Verteilungen der glyzinergeren Zeitkonstanten von adulten Wildtypmäusen (—) mit

denen der *Gla2*^{-/-} (— · —) und der *Gla1*^{spd-ot}- (••••••) Maus zu vergleichen und, auch hier zeigen die Kurven einen fast identischen Verlauf.

Bei der *Gla3*^{-/-}-Maus wurden ebenfalls AII-Amakrinzellen untersucht, doch obwohl 50 AII-Amakrinzellen erfolgreich abgeleitet wurden, konnten keine glyzinergen IPSCs gemessen werden. Der $\alpha 3$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors scheint deshalb eine tragende Rolle in der glyzinergen synaptischen Übertragung auf AII-Amakrinzellen zuzukommen. Bei Verlust der $\alpha 3$ -Untereinheit scheinen die synaptischen Glyzinrezeptoren der AII-Zellen nicht mehr funktionsfähig zu sein.

3.5 Immunhistochemie von AII-Amakrinzellen und der GlyRa3-Untereinheit in der Ratte

Als weiteres Mittel zur Bestimmung der synaptischen Glyzinrezeptoren von AII-Amakrinzellen wurden Antikörperfärbungen an Gefrierschnitten der Rattennetzhaut durchgeführt. Bei der Ratte lassen sich AII-Amakrinzellen mit Antikörpern gegen das Protein Parvalbumin markieren. Die gleichen Schnitte wurden mit Antikörpern gegen die $\alpha 3$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors doppelmarkiert. Abbildung 3.8 zeigt eine Doppelfärbung gegen Parvalbumin (grün) und die $\alpha 3$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors (rot). In A oben ist ein Einzelbild der Parvalbuminfärbung mit dem Zellkörper und den verdickten Dendriten (Rechteck) einer AII-Amakrinzelle in der äußeren IPL zu sehen. B zeigt dieselbe Ebene dieses Schnitts mit einer Färbung der $\alpha 3$ -Untereinheit, die cluster-artig zu postsynaptischen Punkten aggregiert ist (Rechteck). In C sind die beiden Färbungen überlagert gezeigt und es finden sich Orte der Kolokalisation. Zur besseren Verdeutlichung dieser Kolokalisation ist darunter ein Bildstapel von acht Fokusebenen gezeigt, wobei sich der Verlauf der Kolokalisation über mehrere Ebenen verfolgen lässt. Und in Abbildung 3.8D sind noch mal die Ausschnitte 5 und 6 (von oben) vergrößert dargestellt: mehrere rote Cluster liegen auf den grünen Dendriten (Abb. 3.8D; Pfeile), d.h. die $\alpha 3$ -Untereinheit wird vermutlich an glyzinergen Synapsen der AII-Zellen exprimiert.

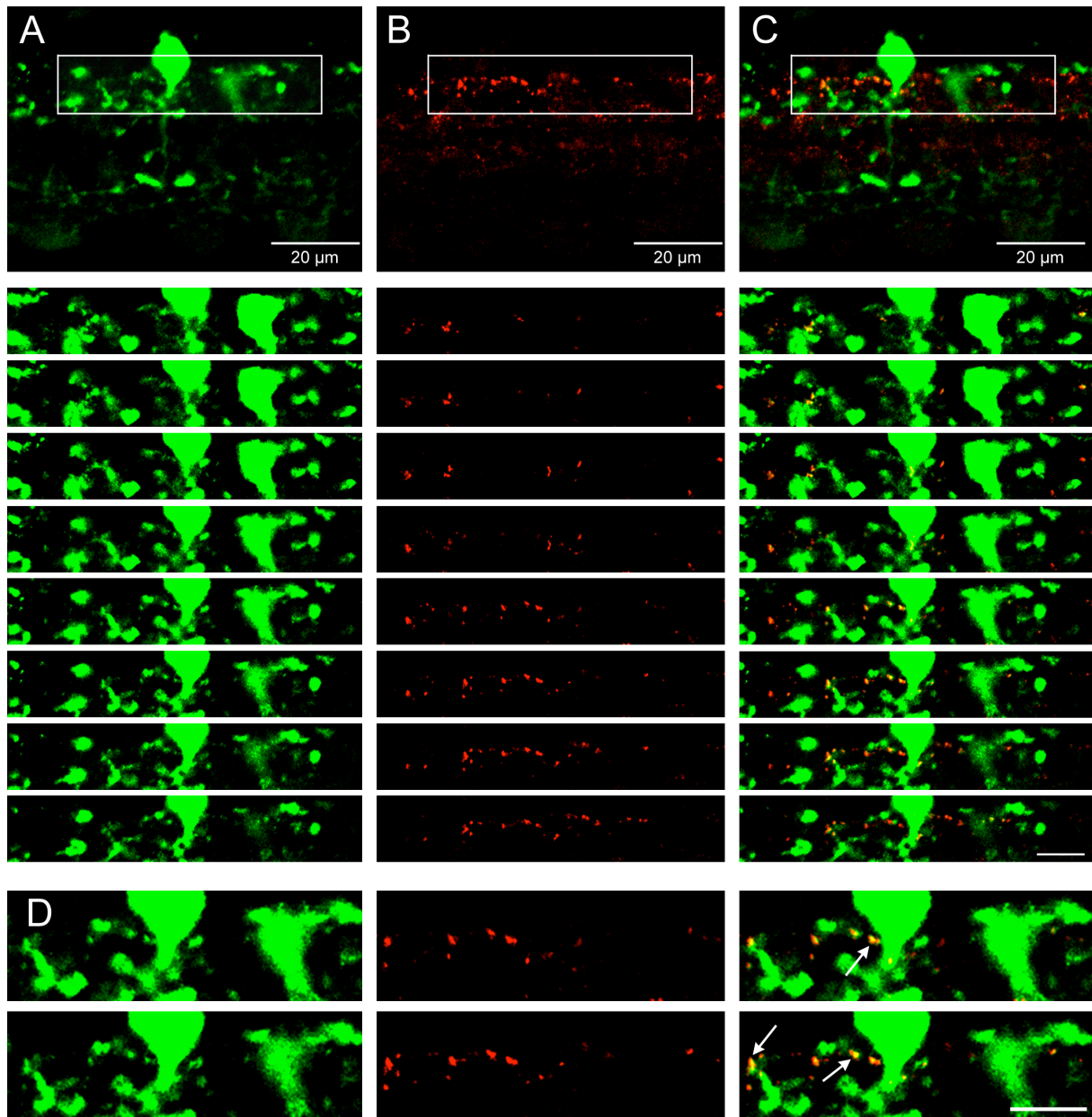


Abbildung 3.8: Vertikalschnitt durch die Netzhaut einer Ratte, gefärbt gegen Parvalbumin (grün) und die $\alpha 3$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors (rot). **(A)**, Einzelbild, Färbung der AII-Amakrinzellen mit Parvalbumin. Darunter: Bildstapel mit 8 Einzelbildern durch eine AII-Amakrinzelle. **(B)**, Rezeptorfärbung gegen die $\alpha 3$ - Untereinheit des Glyzinrezeptors in derselben Ebene wie A. Darunter: Bildstapel mit 8 hintereinander gelegenen Ebenen (wie in A). **(C)**, Überlagerung der Bilder in A und B. **(D)**, vergrößerte Bilder der Ausschnitte in C (5. und 6. Ausschnitt von oben). Skala in den Ausschnitten von A,B,C und in D: 10 μm

Da die Färbung von Parvalbumin im Bereich der buschigeren und feineren Dendriten von AII-Amakrinzellen in der inneren IPL verwischer ist, ließ sich über diesen Bereich der Zelle keine Aussage über eine Kolokalisation der Zelle mit der $\alpha 3$ -Untereinheit machen.

3.6 Glyzinerge sIPSCs bei NF-Amakrinzellen

NF-Amakrinzellen unterschieden sich nicht nur in ihrem Aussehen von AII-Zellen, sie haben auch unterschiedliche Membranströme. Zum Beispiel fehlen spannungsabhängige Na^+ -Kanäle bei NF-Zellen (nicht gezeigt) und infolge dessen konnten auch keine Anzeichen von Aktionspotentialen bei NF-Amakrinzellen beobachtet werden. Auch exzitatorische Ereignisse (EPSCs) waren nur selten und wenn, dann in wesentlich geringerer Frequenz, zu sehen.

Dagegen konnten glyzinerge sIPSCs bei NF-Zellen in WT- und Knock-out-Mäusen gemessen werden (s. Abb. 3.5A und 3.9). Die Zeitkonstanten der Deaktivierungs-/Desensitivierungskinetik waren deutlich verschieden von denen der AII-Amakrinzellen. Durchschnittlich lag die gewichtete Zeitkonstante τ_w bei $27 \pm 7,4$ ms in WT NF-Amakrinzellen (s. Tabelle 3.2, $n = 24$, $N = 3275$). Dieser Wert unterscheidet sich deutlich von der durchschnittlichen Zeitkonstante bei AII-Amakrinzellen ($\tau = 11 \pm 2,0$ ms) und auch die Verteilung der Zeitkonstanten ist statistisch verschieden (Kolmogorov-Smirnov-Test für zwei Stichproben, $P < 0,01$). Abbildung 3.9A zeigt die Verteilung der Zeitkonstanten für NF-Amakrinzellen und man erkennt eine im Vergleich zu AII-Amakrinzellen breitere Verteilung mit Zeitkonstanten zwischen 10 und 50 ms. Das Maximum der Häufigkeit liegt bei 21 ms.

Vergleichbare Verteilungen ergaben sich bei NF-Amakrinzellen von *Glr1^{spd-ot}*-Mäusen (Abb. 3.9B, p 16-21, $n = 8$, $N = 1494$) sowie *Glr3^{-/-}*-Mäusen (Abb. 3.9C, adult, $n = 22$, $N = 1457$) mit Maxima bei 19 und 24 ms. Hier lagen die durchschnittlichen Zeitkonstanten bei $\tau_w = 24 \pm 3,8$ ms (*Glr1^{spd-ot}*) und $\tau_w = 29 \pm 5,6$ ms.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen adulten Wildtyp NF-Amakrinzellen und adulten *Glr3^{-/-}* NF-Amakrinzellen lag nicht vor (Kolmogorov-Smirnov-Test für zwei Stichproben, $P > 0,05$). Desgleichen ließ sich zwischen adulten Wildtyp NF-Amakrinzellen und juvenilen *Glr1^{spd-ot}* NF-Amakrinzellen kein Unterschied feststellen (Kolmogorov-Smirnov-Test für zwei Stichproben, $P > 0,05$).

Da in den eigenen Versuchen für AII-Amakrinzellen, ebenso wie bei Ivanova et al. (2006) und Majumdar et al. (2007) für Bipolar- bzw. Ganglienzellen kein Unterschied zwischen juvenilen (p16-21) und adulten Tieren in Bezug auf die Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs festgestellt wurde, und da sich weiterhin adulte Wildtyp NF-Amakrinzellen und juvenile *Glr1^{spd-ot}* NF-Amakrinzellen in dieser Hinsicht nicht unterschieden, wurde auf Versuche an NF-Amakrinzellen von juvenilen Wildtypmäusen verzichtet. Bei der *Glr2^{-/-}*-Maus zeigte sich

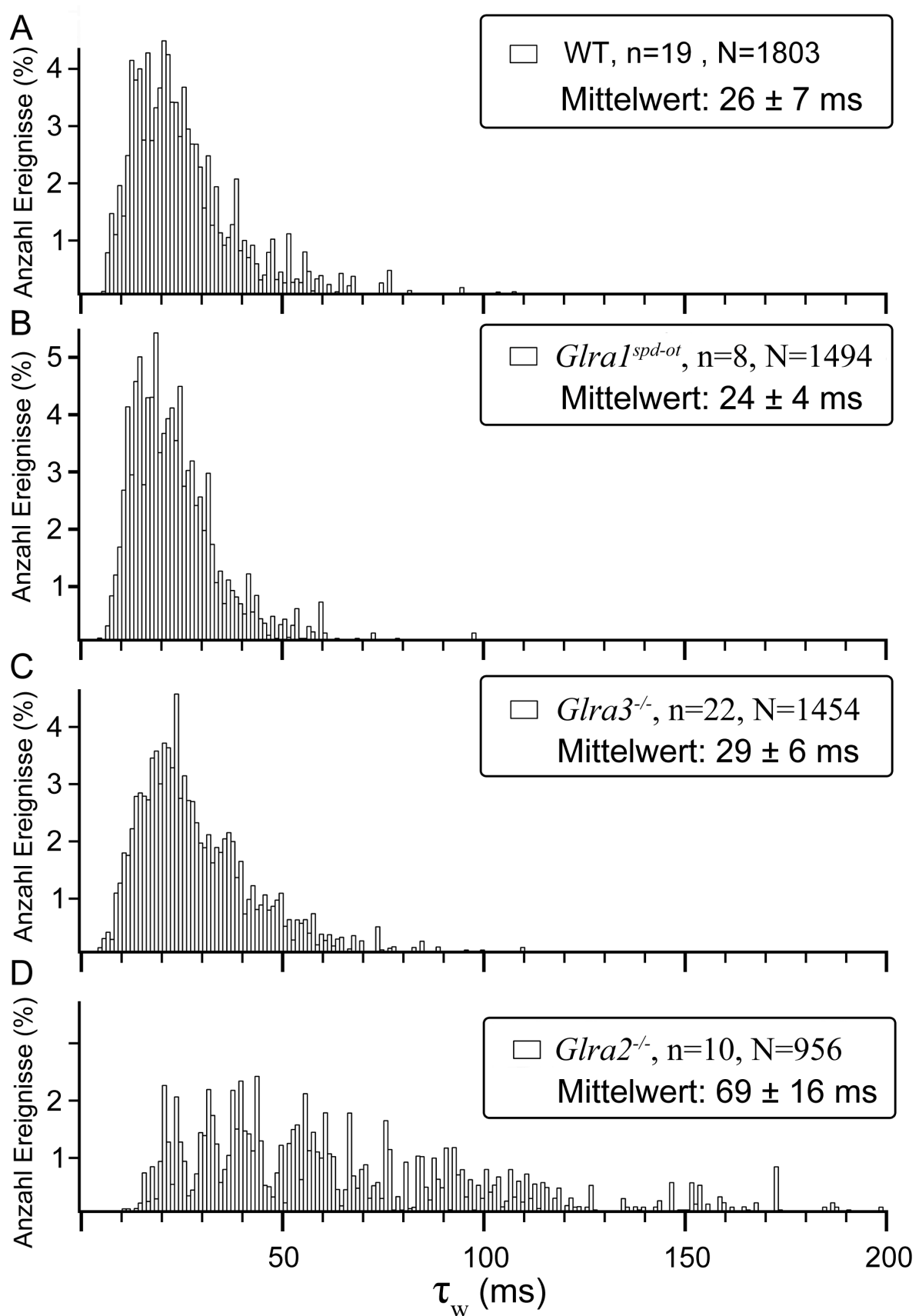


Abbildung 3.9: Analyse glyzinerger sIPSCs von NF-Amakrinzellen in WT-, *Gla1^{spd-ot}*-, *Gla3^{-/-}*-, *Gla2^{-/-}*-Mäusen. (A), Verteilung der Zeitkonstanten von NF-Amakrinzellen in WT-, (B) *Gla1^{spd-ot}*-, (C), *Gla3^{-/-}*- und (D) *Gla2^{-/-}*-Mäusen.

ein anderes Bild bezüglich der Verteilung der Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs (Abb. 3.9D, adult, $n = 10$, $N = 956$). So lag der Anteil langsamer sIPSCs mit Zeitkonstanten $\tau_w > 50$ ms wesentlich höher, während Zeitkonstanten unter 20 ms selten waren. Selbst τ_w -Werte zwischen 100 und 200 ms wurden bei *Gltra2*^{-/-}-Mäusen gemessen. Solch lange Zeitkonstanten wurden weder in Wildtyp-, noch bei *Gltra1*^{spd-ot}- oder *Gltra3*^{-/-}-Mäusen beobachtet. Insgesamt wurde ein durchschnittlicher τ_w -Wert von 69 ± 16 ms ermittelt, und es wurde eine relativ gleichmäßige Verteilung mit einem Maximum bei 44 ms gefunden, die sich deutlich von der Wildtypsituation unterschied (Kolmogorov-Smirnov-Test für zwei Stichproben, $P < 0,01$).

Dies zeigt auch Abbildung 3.10A, in der die kumulierte Häufigkeit der τ -Werte von NF-Amakrinzellen in WT-, *Gltra1*^{spd-ot}-, *Gltra2*^{-/-}- und *Gltra3*^{-/-}-Mäusen gezeigt ist. Während die kumulierten Häufigkeiten der Zeitkonstanten für WT- (—), *Gltra1*^{spd-ot}- (·····) und *Gltra3*^{-/-}- (- · -) Mäuse einen vergleichbaren Verlauf nehmen, sind sie bei *Gltra2*^{-/-}-Mäusen (- - -) deutlich zu längeren Zeitkonstanten verschoben.

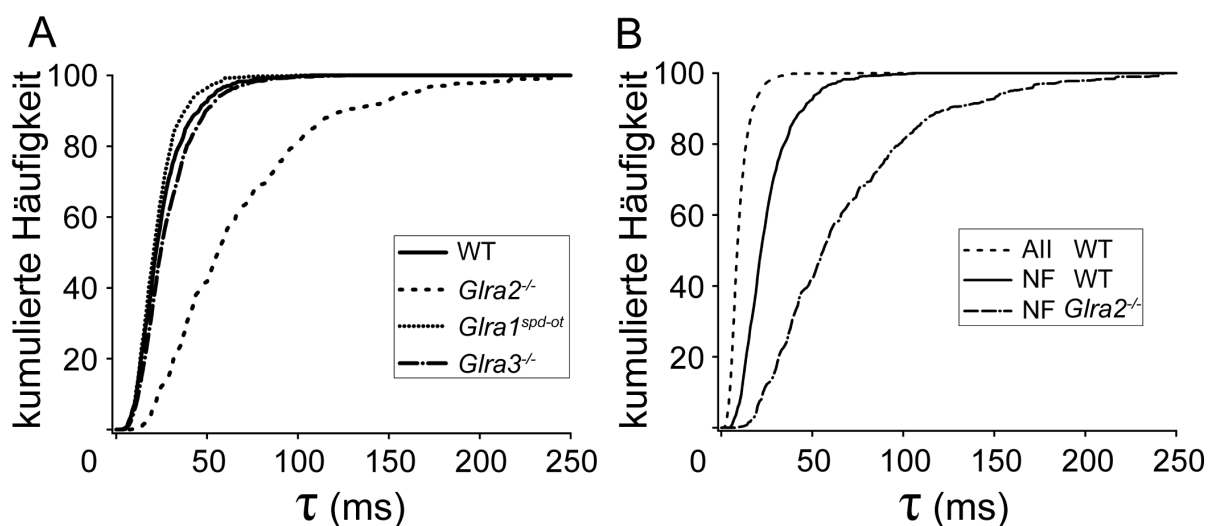


Abbildung 3.10: Darstellung der Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs als kumulierte Häufigkeiten. **(A)**, kumulierte Häufigkeiten glyzinerger sIPSCs von NF-Amakrinzellen in WT- und Knock-out-Mäusen. **(B)**, kumulierte Häufigkeiten von AII- und NF-Amakrinzellen in WT-Mäusen und NF-Amakrinzellen in *Gltra2*^{-/-}-Mäusen.

Zusammenfassend lässt sich sagen: Bei den hier untersuchten Amakrinzellen bekommen AII-Amakrinzellen glyzinerger synaptischer Eingang mit der schnellsten Kinetik (s. Abb.3.10B, - - - -). Diese Art von sIPSCs konnte nicht in *Gltra3*^{-/-}-Mäusen gemessen werden. IPSCs von NF-Amakrinzellen besitzen eine langsamere Kinetik (—), die hauptsächlich durch die $\alpha 2$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors bestimmt wird und im entsprechenden Knock-out-Tier deutlich verändert ist (Abb. 3.10B, - · -). Dies wird auch noch mal durch die Gegenüberstellung der gemittelten und normalisierten IPSCs einer AII-Amakrinzelle (s. Abb. 3.11, 1), einer NF-Amakrinzelle im WT (2) und im *Gltra2*^{-/-} (3) Tier verdeutlicht.

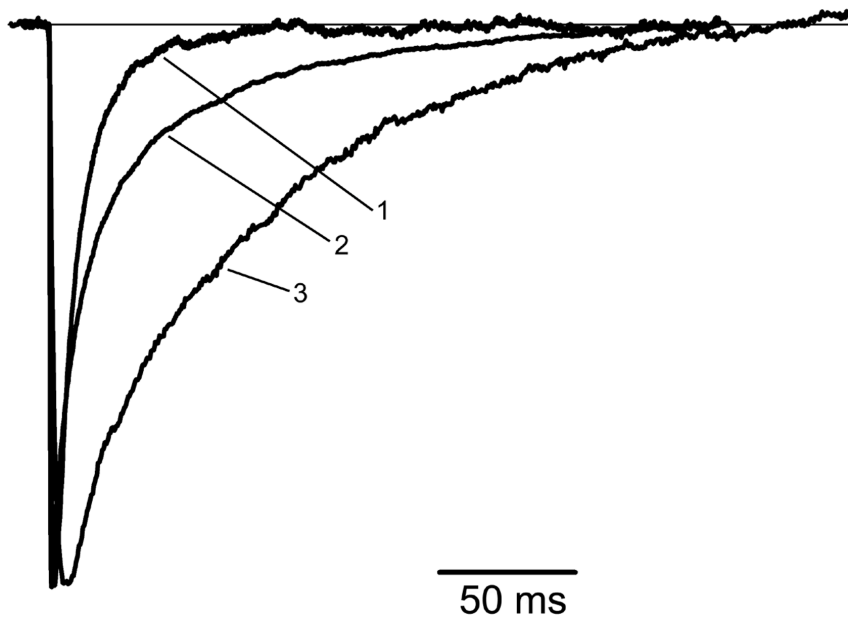


Abbildung 3.11:
Gemittelte glyzinerge IPSCs einer AII- (1) Amakrinzelle, sowie einer NF-Amakrinzelle bei einer WT- (2) und bei einer *Glra2*^{-/-} (3) Maus.

Die gemittelten IPSCs haben Zeitkonstanten von 11, 21 und 80 ms.

3.7 Analyse der Amplituden der sIPSCs bei NF- und AII-Amakrinzellen

Die glyzinergen sIPSCs der NF- und AII-Amakrinzellen können neben der exprimierten Glyzinrezeptor-Untereinheit in der Postsynapse auch von der präsynaptischen Freisetzung der Vesikel abhängen. So kann multivesikuläre und nicht synchrone Transmitterfreisetzung die Amplitude und den Zeitverlauf der sIPSCs beeinflussen. Es wurde analysiert, ob Unterschiede zwischen NF- und AII-Zellen bzw. zwischen Wildtyp- und Knock-out-Mäusen bestehen.

Die Verteilung der Amplituden von glyzinergen sIPSCs bei NF- und AII-Amakrinzellen ist in Abbildung 3.12 gezeigt. Das Maximum des Histogramms für NF-Amakrinzellen liegt bei einer Amplitude von 30 pA, der Mittelwert bei 46 ± 36 pA (s. Abb. 3.12A und Tabelle 3.2). Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant von NF-Amakrinzellen in *Glra1*^{spd-ot}-, *Glra2*^{-/-}- oder *Glra3*^{-/-}-Mäusen. Dies ergab die Analyse der Amplituden-Verteilung durch den Kolmogorov-Smirnov-Test ($P > 0,05$). Abbildung 3.12B vergleicht die kumulierten Häufigkeiten der Amplituden von NF-Amakrinzellen in Wildtyp- (—), *Glra1*^{spd-ot}- (— · —), *Glra2*^{-/-}- (······) und *Glra3*^{-/-}- (— · —)-Mäusen. Glyzinerge sIPSCs von AII-

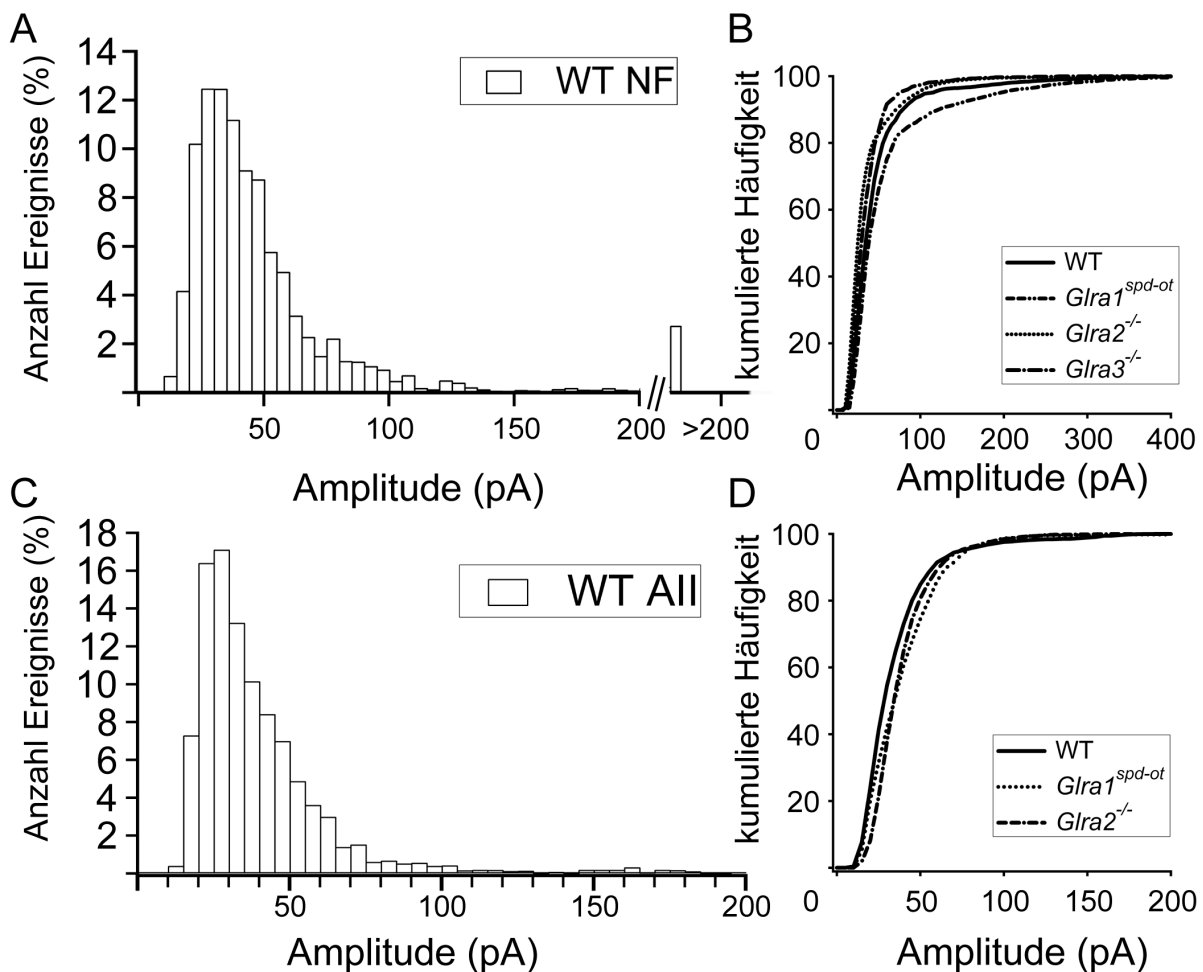


Abbildung 3.12: Amplituden glyzinerger sIPSCs in NF- und AII-Amakrinzellen. **(A)**, Histogramm der Amplitude von allen im WT gemessenen NF-Amakrinzellen. **(B)**, kumulierte Häufigkeiten der Amplituden glyzinerger sIPSCs von NF-Amakrinzellen in WT- und Knock-out-Mäusen. **(C)**, wie A für AII-Amakrinzellen. **(D)**, wie B für AII-Amakrinzellen.

Amakrinzellen (Abb. 3.12C) sind signifikant kleiner als sIPSCs von NF-Amakrinzellen (Kolmogorov-Smirnov-Test für zwei Stichproben, $P < 0,01$). Die Verteilung zeigt ein Maximum bei 25 pA und die mittlere Amplitude der sIPSCs liegt bei 34 ± 16 pA. Auch in der Gruppe der AII-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied der Amplituden zwischen Wildtyp- (—), *Gla1^{spd-ot}*- (·····) bzw. *Gla2^{-/-}*- (— · —) Mäusen festgestellt werden, wie in der Abbildung 3.12D in Form der kumulierten Häufigkeiten dargestellt ist (außerdem: s. Tabelle 3.2).

Um zu überprüfen, ob längere Zeitkonstanten mit der Größe der Amplituden korrelieren und so die längeren Zeitkonstanten in NF-Amakrinzellen zu erklären sind, wurden die Zeitkonstanten der sIPSCs gegen die Amplituden aufgetragen und eine Regressionsgerade wurde angepasst. Abbildung 3.13A zeigt diese Verteilung von Zeitkonstanten und Amplituden für jeweils eine NF-Amakrinzelle (gefüllte Kreise) und eine AII-Amakrinzelle

(offene Kreise), wobei jeder Punkt der Zeitkonstante und Amplitude eines analysierten sIPSCs entspricht. Weder bei AII-Amakrinzellen ($r = -0,010$, $P = 0,89$, $N = 171$) noch bei NF-Amakrinzellen ($r = -0,091$, $P = 0,28$, $N = 118$) war eine Abhängigkeit der Zeitkonstanten von den Amplituden festzustellen.

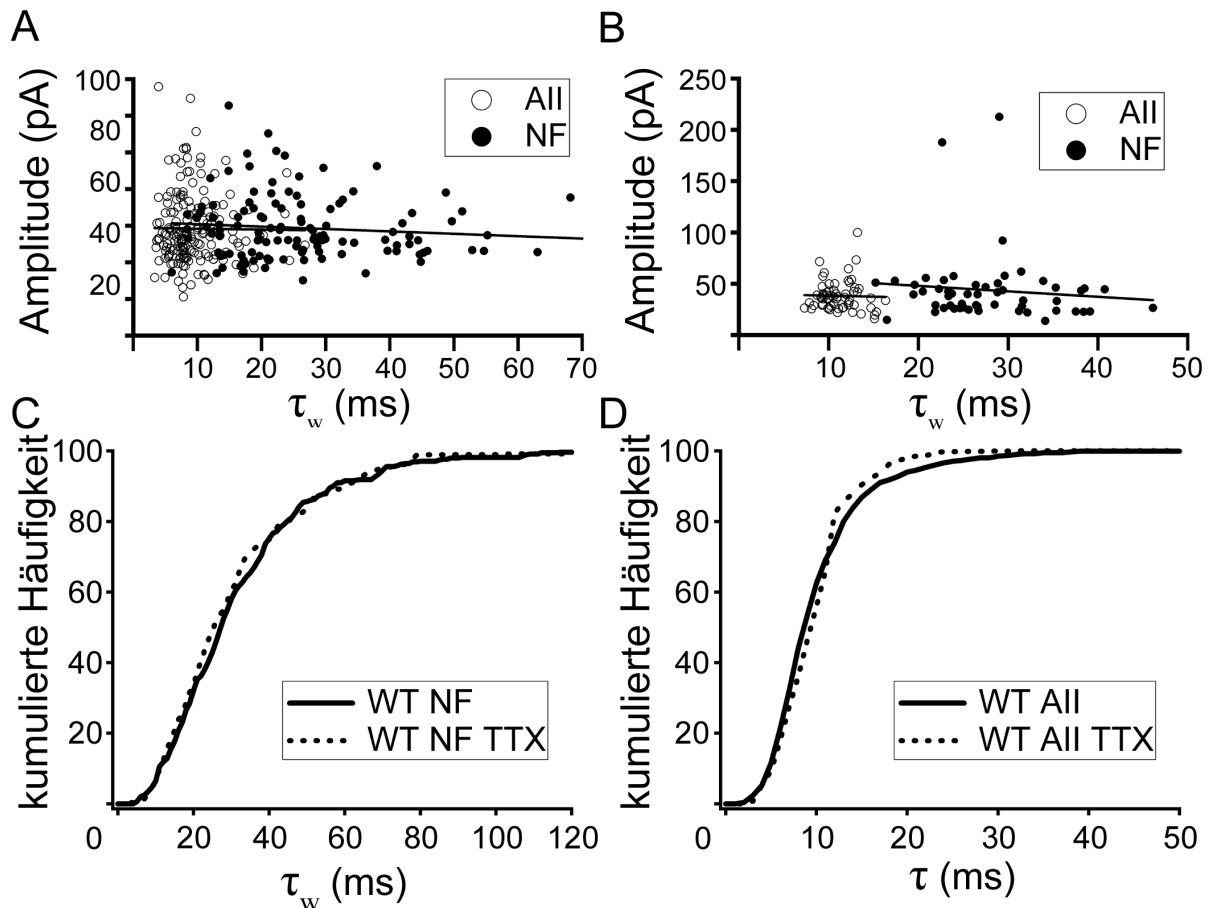


Abbildung 3.13: Amplituden und Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs. **(A)**, Korrelation der Zeitkonstanten und Amplituden einer AII- (offene Kreise) und einer NF- (gefüllte Kreise) Amakrinzelle, die jeweils durch eine Regressionsgerade angepasst wurden. **(B)**, Korrelation der mittleren Zeitkonstante und der mittleren Amplitude aller abgeleiteten AII-Amakrinzellen (offene Kreise) und aller abgeleiteten NF-Amakrinzellen (gefüllte Kreise) (außer den NF-Zellen, die im *Gla2^{-/-}*-Tier abgeleitet wurden); jeweils eine Regressionsgerade für AII- und NF-Amakrinzellen. **(C)**, kumulierte Häufigkeiten der Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs von NF-Amakrinzellen, die in Anwesenheit von TTX und ohne TTX gemessen wurden. **(D)**, wie C für AII-Amakrinzellen.

Ein vergleichbares Bild ergibt sich, wenn man die durchschnittliche Zeitkonstante aller gemessenen AII-Amakrinzellen (gemessen in WT-, *Gla1^{spd-ot}*- und *Gla2^{-/-}*-Mäusen) gegen deren durchschnittliche Amplitude aufträgt und eine Regressionsgerade an die Daten anpasst (s. Abb. 3.13B; offene Kreise; $r = -0,028$, $P = 0,83$, $n = 64$). Beim Vergleich der Zeitkonstanten und Amplituden von NF-Amakrinzellen werden Messungen von WT-, *Gla1^{spd-ot}*- und *Gla3^{-/-}*-Mäusen gezeigt (s. Abb. 3.13B; gefüllte Kreise). Messungen von *Gla2^{-/-}*-Mäusen wurden nicht in das Diagramm eingetragen, da bei diesen Tieren signifikant

längere Zeitkonstanten auftreten. Auch hier war keine Korrelation zwischen Zeitkonstante und Amplitude festzustellen ($r = -0,082$, $P = 0,58$, $n = 54$).

Einige Amakrinzelltypen können Aktionspotentiale generieren (Boos et al., 1993; Feigenspan et al., 1998; Völgyi et al., 2001). Da dies Auswirkung auf die Vesikel- und somit Transmitterfreisetzung haben kann, wurde in einigen Versuchen Tetrodotoxin (TTX; $1\mu\text{M}$) eingesetzt, das spannungsabhängige Na^+ -Kanäle blockiert und somit Aktionspotentiale verhindert. Die Auswirkung des TTX auf die Zeitkonstante glyzinerger sIPSCs wurde überprüft. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 3.13C&D zusammengefasst. Sowohl bei NF-Amakrinzellen (3.13C, $n = 4$) als auch bei AII-Amakrinzellen (Abb. 3.13D; $n = 5$) hatte die Applikation von TTX keine Auswirkung auf die Verteilung der Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs, was anhand der kumulierten Häufigkeiten dargestellt ist.

3.8 Weitere Amakrinzellentypen

Im Verlauf der Untersuchungen wurde neben den AII- und NF-Amakrinzellen noch von weiteren Amakrinzellen abgeleitet. In Abbildung 3.14, 3.15, 3.16 und 3.17 finden sich Beispiele für morphologisch unterschiedliche Amakrinzellen, die während der Ableitung mit Neurobiotin gefüllt wurden. Dabei wurden die Amakrinzellen nach ihren Dendritenbäumen unterschieden.

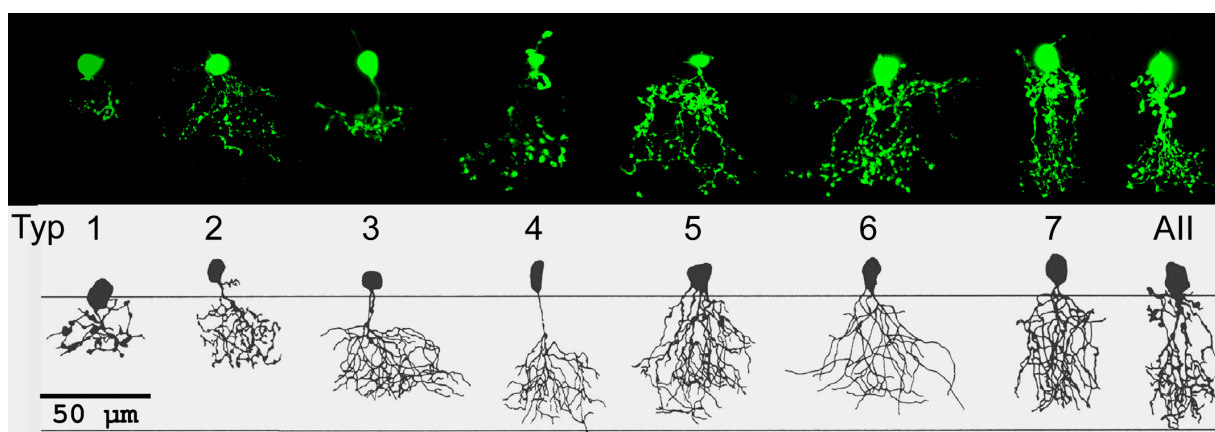


Abbildung 3.14: In der **unteren Reihe** sind Vertikalansichten der 8 Typen von Amakrinzellen dargestellt, die von Menger et al. (1998) in der Netzhaut der Ratte identifiziert wurden (Typ 1 - 7, AII). Die **obere Reihe** zeigt homologe Amakrinzellen wie sie in der vorliegenden Arbeit in der Netzhaut der Maus abgeleitet und mit Farbstoff injiziert wurden.

Solche mit einem geringen Durchmesser des Dendritenfeldes wurden zu den Kleinfeld-Amakrinzellen (small-field oder narrow-field, NF) gezählt (s. Abb. 3.14). Überstieg der

Durchmesser 100 μm , wurde die Zelle als Mittelfeld-Amakrinzelle (medium-field, MF) klassifiziert und wenn der Durchmesser 200 μm überschritt, wurde die Zelle zur Gruppe der Weitfeldzellen (wide-field, WF) gezählt. Durch den Vorgang des Schneidens der Netzhaut konnte es immer wieder zum Abtrennen von Dendriten der Zellen kommen. Demzufolge konnten hauptsächlich Amakrinzellen mit vergleichsweise geringem Dendritenfeld abgeleitet werden.

Alle glyzinergeren Amakrinzellen mit kleinem Dendritenfeld, die auch schon von Menger et al. (1998) bei der Ratte beschrieben wurden (s. Abb. 3.14), konnten abgeleitet und identifiziert werden. Dagegen wurden beispielsweise keine bistratifizierenden Amakrinzellen mit kleinem Dendritenfeld abgeleitet, wie sie z.B. von Heinze et al. (2007) beschrieben wurden.

Amakrinzellen mit größeren Dendritenbäumen sind in Abbildung 3.15 zu sehen. 3.15A zeigt eine bistratifizierende WF-Amakrinzelle: Ein Teil der Dendriten verzweigt sich in Sublamina a, ein weiterer Teil in Sublamina b. Es lässt sich allerdings nur bedingt eine Klassifizierung der WF-Amakrinzellen allein anhand der Stratifizierung vornehmen. In Abbildung 3.15B ist eine WF-Amakrinzelle zu sehen, deren Dendriten auf Sublamina a beschränkt sind (Monostratifizierend).

Die A17-Amakrinzelle (s. Abb. 3.15C) ist eine WF-Amakrinzelle, die fast ausschließlich Stäbchenbipolarzellen kontaktiert (Nelson und Kolb, 1985). Abbildung 3.15C zeigt eine solche A17-Zelle.

Die Zellen in Abbildung 3.15D und E sind MF-Amakrinzellen, deren Dendriten diffus die IPL durchziehen. Eine weitere MF-Amakrinzelle mit charakteristischen Dendriten zeigt Abbildung 3.15F. Die Dendriten dieser Zelle ziehen erst in die innere IPL (Sublamina b), kehren dann um und zielen wieder in die äußere IPL. Ähnliche Zellen wurden wegen ihres charakteristischen Aussehens in der Kaninchen-Netzhaut als „fountain“- und/oder „recurving diffuse“-Amakrinzelle benannt (MacNeil et al., 1999). Abbildung 3.15G zeigt eine Zelle mit einem absteigenden Primärdendriten, aus dem in Sublamina a ein Bündel von Dendriten entspringt, das ausschließlich in eine Richtung zieht. Die Zelle in Abbildung 3.15H hat buschige Dendriten, die sich ausschließlich in der äußeren IPL verzweigen.

Die in Abbildung 3.15 gezeigten Zellen wurden nur sporadisch abgeleitet und deshalb in der vorliegenden Arbeit nicht systematisch untersucht. Außerdem war es schwierig in Vertikalschnitten einen verlässlichen Eindruck der Dendritenverzweigungen zu erzielen.

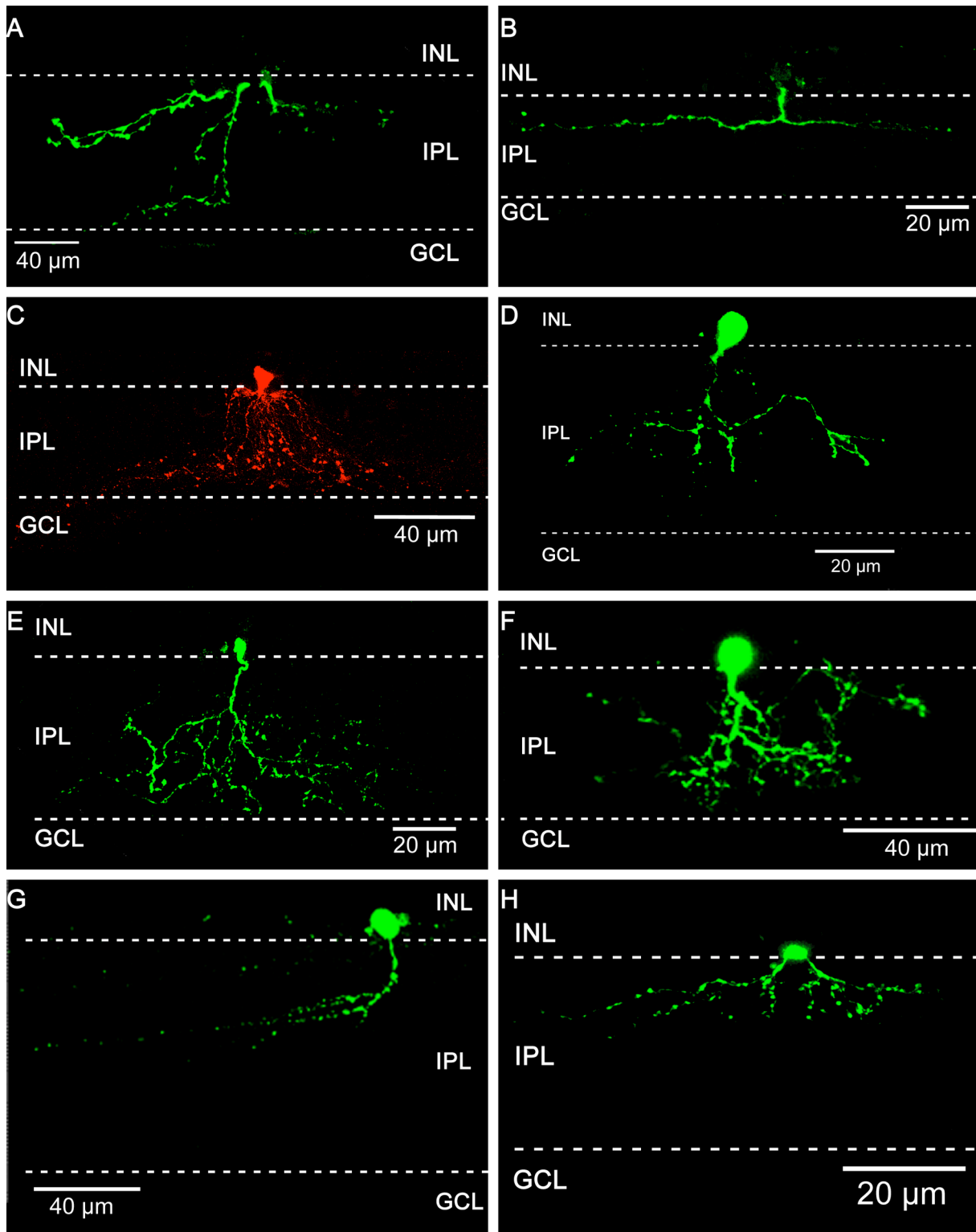


Abbildung 3.15: Zusammenstellung abgeleiteter Amakrinzellen im Vertikalschnitt mit mittlerem oder weitem dendritischem Feld (medium-field, MF; wide-field, WF). **(A)**, bistratifizierende WF-Amakrinzelle (ohne Zellkörper, teilweise abgeschnitten). **(B)**, monostratifizierende WF-Amakrinzelle, deren Dendriten in der Sublamina a liegen. **(C)**, A17-Amakrinzelle. **(D)**, MF-Amakrinzelle mit in mehreren Schichten der IPL liegenden Dendriten. **(E)**, MF-Amakrinzelle mit Ähnlichkeit zu D, allerdings liegen die Dendriten weiter im inneren Teil der IPL. **(F)**, MF-Amakrinzelle, deren Dendriten erst in den inneren Teil der IPL reichen und von dort wieder in die äußere IPL führen. **(G)**, WF-Amakrinzelle mit gebündelten Dendriten, die in einer Richtung liegen. **(H)**, MF-Amakrinzelle mit einem Dendritenfeld in der äußeren IPL.

Dafür besser geeignet waren Ableitungen von WF-Amakrinzellen in Netzhautganzzpräparaten. Sie wurden von ektopischen Amakrinzellen in der GAD67-GFP-Mauslinie gemacht. Bei dieser Mauslinie sind alle GABAergen Amakrinzellen durch grün fluoreszierendes Protein (GFP) markiert, was eine gezielte Ableitung dieser Zellen möglich machte.

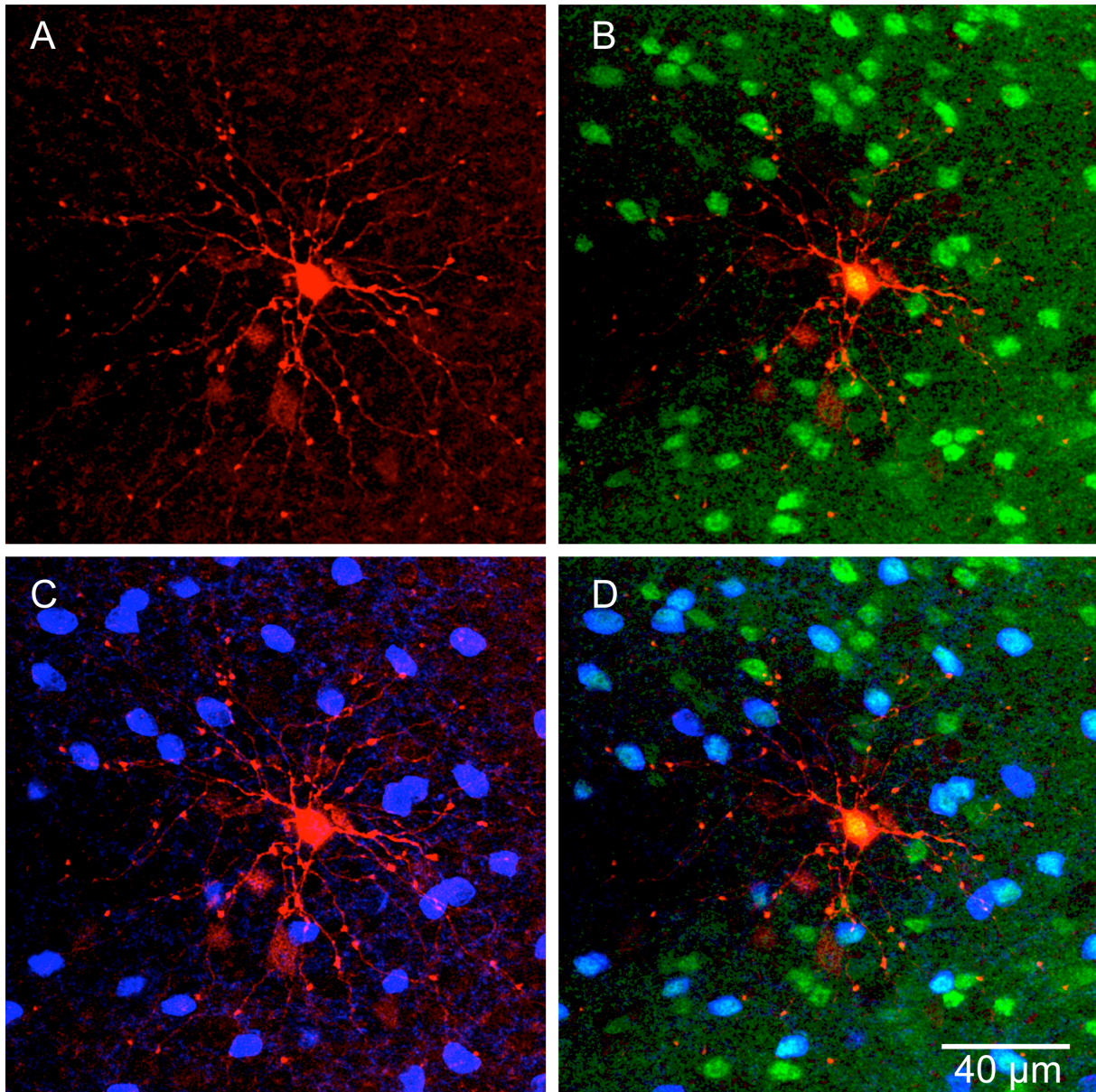


Abbildung 3.16: Dreifachfärbung von Amakrinzellen in der Ganglienzellschicht einer GAD67-GFP-Maus. Eine Zelle, vermutlich eine A17-Zelle, wurde mit rotem Farbstoff injiziert. Die GAD67-Zellen sind durch GFP grün markiert. Die cholinergen Amakrinzellen sind durch Anti-Chat Antikörper blau markiert. **(A)**, injizierte A17-Zelle **(B)**, Überlagerung der Amakrinzelle (rot) und der GFP-Färbung (grün). **(C)**, Überlagerung der Amakrinzelle (rot) und einer Färbung gegen Chat (blau). **(D)**, Überlagerung der Amakrinzelle (rot), des GFPs (grün) und der Chat-Färbung (blau).

Etwa 60 % aller ektopischen Amakrinzellen sind cholinerge (Starburst-) Amakrinzellen. Weitere Typen sind in den Abbildungen 3.16 und 3.17 gezeigt. Abbildung 3.16 zeigt eine konzentrische Zelle mit dünnen Dendriten, die durch Verdickungen an einigen Stellen

einzelner Dendriten unterbrochen werden. Dabei handelt es sich vermutlich um eine ektopische A17-Amakrinzelle. Die Abbildung zeigt in B, dass der Zellkörper der gefüllten Zelle auch GFP exprimiert, was darauf schließen lässt, dass es sich um eine GABAerge Amakrinzelle handelt. Die Zelle ist jedoch nicht positiv für die Antikörperfärbung gegen Cholinacetyltransferase (Chat, C). Abbildung 3.16D zeigt die Überlagerung der gefüllten Zelle mit GFP und der Chat-Färbung.

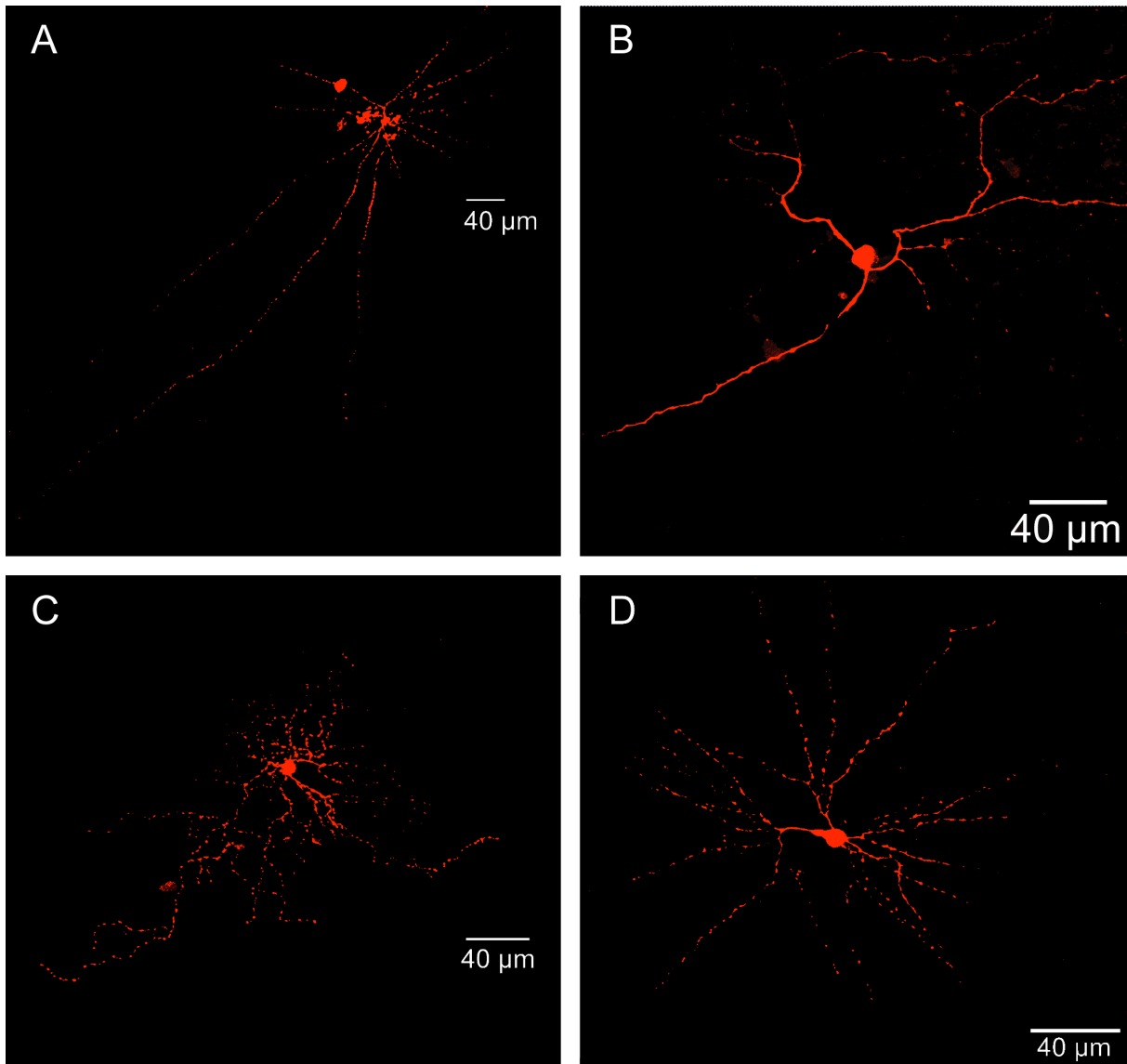


Abbildung 3.17: Beispiele für im Netzhautganzpräparat abgeleitete und gefüllte Amakrinzellen. (A), (D), möglicherweise der gleiche Zelltyp von WF-Amakrinzellen, in A mit längeren Dendriten. (B), (C), weitere Typen ektopischer Amakrinzellen.

In Abbildung 3.17 sind weitere nicht cholinerge Amakrinzellen zu sehen, wobei es sich in A und D offenbar um den gleichen Zelltyp handelt. Die beiden Zellen sind mit Sicherheit unterfärbt und es ist zu erwarten, dass die geraden, radiären Dendriten mehr als einen Millimeter lang sind. Die Stratifizierung der Zellen wurde nicht untersucht.

In B gehen drei Hauptdendriten vom Zellkörper ab, die sich leicht weiter verzweigen und in feinen Dendriten enden. In der Zelle in C verzweigen sich die Dendriten sofort und bleiben etwa gleichstark; dabei ist der Dendritenbaum auf einer Seite stärker ausgeprägt.

Die wenigen Beispiele zeigen die Vielfalt der Typen von Amakrinzellen, die in der vorliegenden Arbeit nicht im Detail untersucht werden konnten. Allerdings wird im Folgenden für einige dieser Amakrinzellen gezeigt, dass auch sie glyzineren synaptischen Eingang erhalten.

3.9 Glyzinerge sIPSCs bei anderen Typen von Amakrinzellen

Alle abgeleiteten Amakrinzellen reagierten mit einem Stromfluss über die Membran, wenn Glyzin appliziert wurde, jedoch konnten nicht in allen Zellen sIPSCs abgeleitet werden.

Bei einer Gruppe von Amakrinzellen mit kleinem Dendritenfeld, das ausschließlich in der Sublamina a lag (s. Abb. 3.14, Typ 1/2), konnten von drei Zellen glyzinerge sIPSCs (N = 198) gemessen werden. Die Verteilung der Zeitkonstanten dieser drei Zellen ist in Abbildung 3.18A (OFF-NF) dargestellt; mit einem Mittelwert von 10 ± 2 ms und einer Streuung zwischen 5 und 25 ms sind die Zeitkonstante vergleichbar mit denen der AII-Zellen. Eine ähnliche Verteilung der sIPSCs wurde auch für eine MF-Amakrinzelle gefunden (s. Abb. 3.18B), deren Dendriten in mehreren Schichten der IPL stratifizieren und die in Abbildung 3.15D abgebildet ist. Der Mittelwert liegt bei 8 ± 4 ms (N = 238).

Davon weicht die Verteilung der glyzineren sIPSCs einer „fountain“-Amakrinzelle (Abb. 3.15F) deutlich ab: es finden sich sowohl Zeitkonstanten unter 20 ms als auch Werte von 30 bis 60 ms. Der Mittelwert liegt bei 37 ± 23 ms (s. Abb. 3.18C). Allerdings konnte hier nur auf die Werte einer Zelle mit 50 analysierten Ereignissen zurückgegriffen werden. Schließlich wurde von zwei Zellen abgeleitet, deren Morphologie in Abbildung 3.15G gezeigt ist, und 434 glyzinerge sIPSCs analysiert; deren Zeitkonstanten lagen zwischen 7 und 40 ms mit einem Maximum bei 18 ms und einem Durchschnittswert von $\tau = 21 \pm 7$ ms (Abb. 3.18D).

Ein ähnlich variables Bild ergibt sich, wenn man die glyzineren Zeitkonstanten von WF-Amakrinzellen betrachtet, die im Ganzpräparat der Netzhaut gemessen worden sind. Das Histogramm der glyzineren Zeitkonstanten aller 25 abgeleiteten WF-Amakrinzellen ist in Abbildung 3.19A zu sehen. Bei insgesamt 3590 analysierten sIPSCs fanden sich τ -Werte von 5 bis zu 200 ms und das Maximum lag bei 14 ms. Diese Verteilung ähnelt der Verteilung der

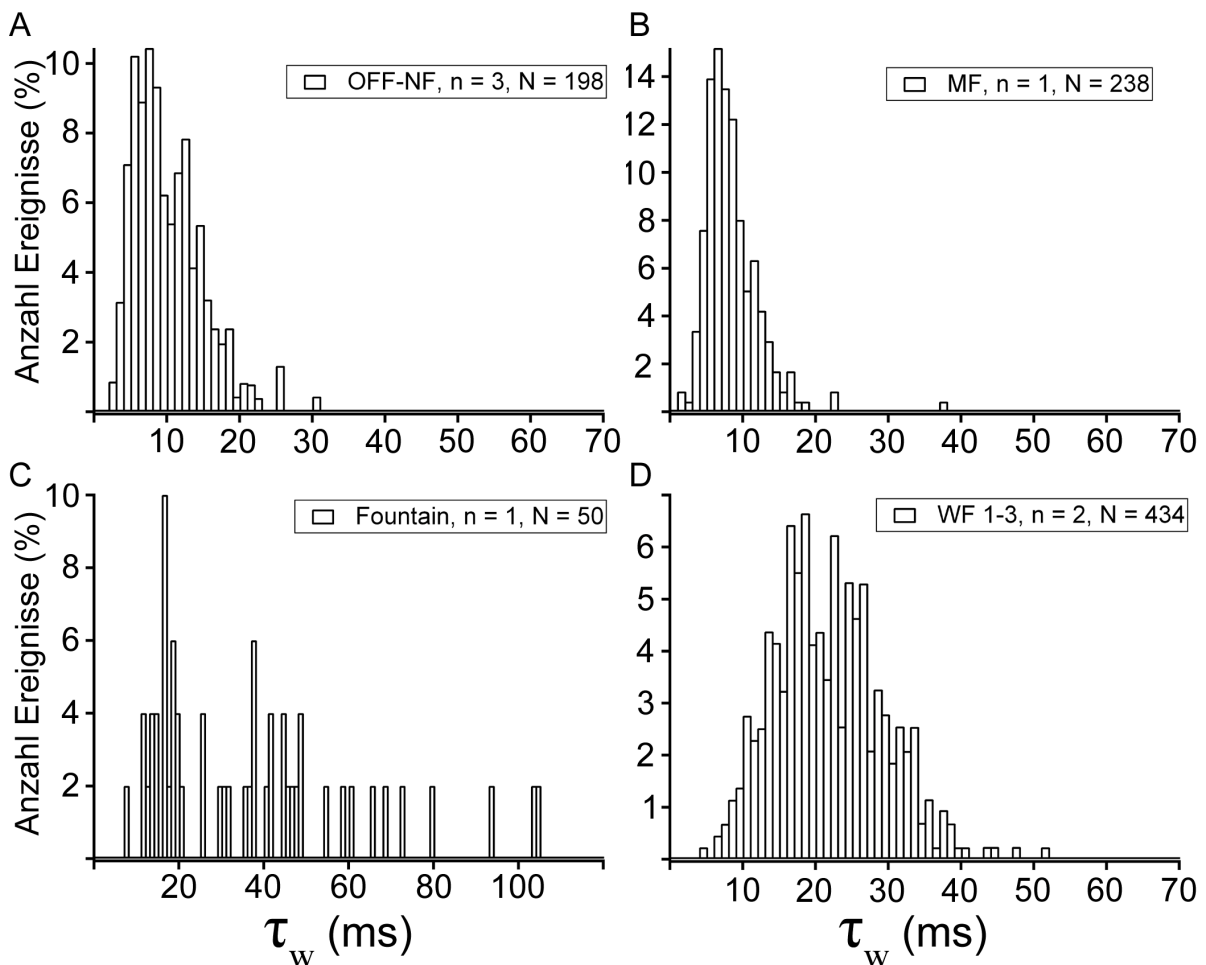


Abbildung 3.18: Verteilung der Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs bei verschiedenen Amakrinzelltypen. **(A)**, für Amakrinzellen mit einem kleinen Dendritenfeld, das nur in der äußeren IPL stratifiziert. **(B)**, bei einer Amakrinzelle mit einem mittleren Dendritenfeld (s. Abb. 3.15C). **(C)**, bei einer MF-Amakrinzelle (Fountain, s. Abb. 3.15F). **(D)**, bei einer WF-Amakrinzelle mit gebündelten Dendriten, die in eine Richtung führen (WF 1-3, s. Abb. 3.15E).

Zeitkonstanten von NF-Amakrinzellen. Allerdings kommen auch Zeitkonstanten vor, die den Bereich von 50 ms überschreiten und bei NF-Amakrinzellen nicht zu beobachten waren. Dies wird noch verdeutlicht durch die Abbildung 3.20, in der die kumulierte Häufigkeit der Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs von NF-Amakrinzellen in WT- (—) und *Gla2*^{-/-} (- - -) Mäusen und von WF-Amakrinzellen (— · —) aufgetragen ist. Dabei zeigt sich, dass die Kurven der NF-Amakrinzellen (WT NF) und der WF-Amakrinzellen (WT WF) bei kleinen Zeitkonstanten noch parallel verlaufen, jedoch bei etwa 30 ms beginnen zu divergieren, wobei die Zeitkonstanten der WF-Amakrinzellen zu den langsameren Werten verschoben sind. Allerdings erreichten sie nicht die Kurve der NF-Amakrinzellen, die im *Gla2*^{-/-}-Tier gemessen wurden.

A17-Amakrinzellen (s. Abb. 3.15C & 3.16) konnten relativ häufig abgeleitet werden und weisen, wie sich durch die Applikation von Glyzin herausstellte, Glyzinrezeptoren auf.

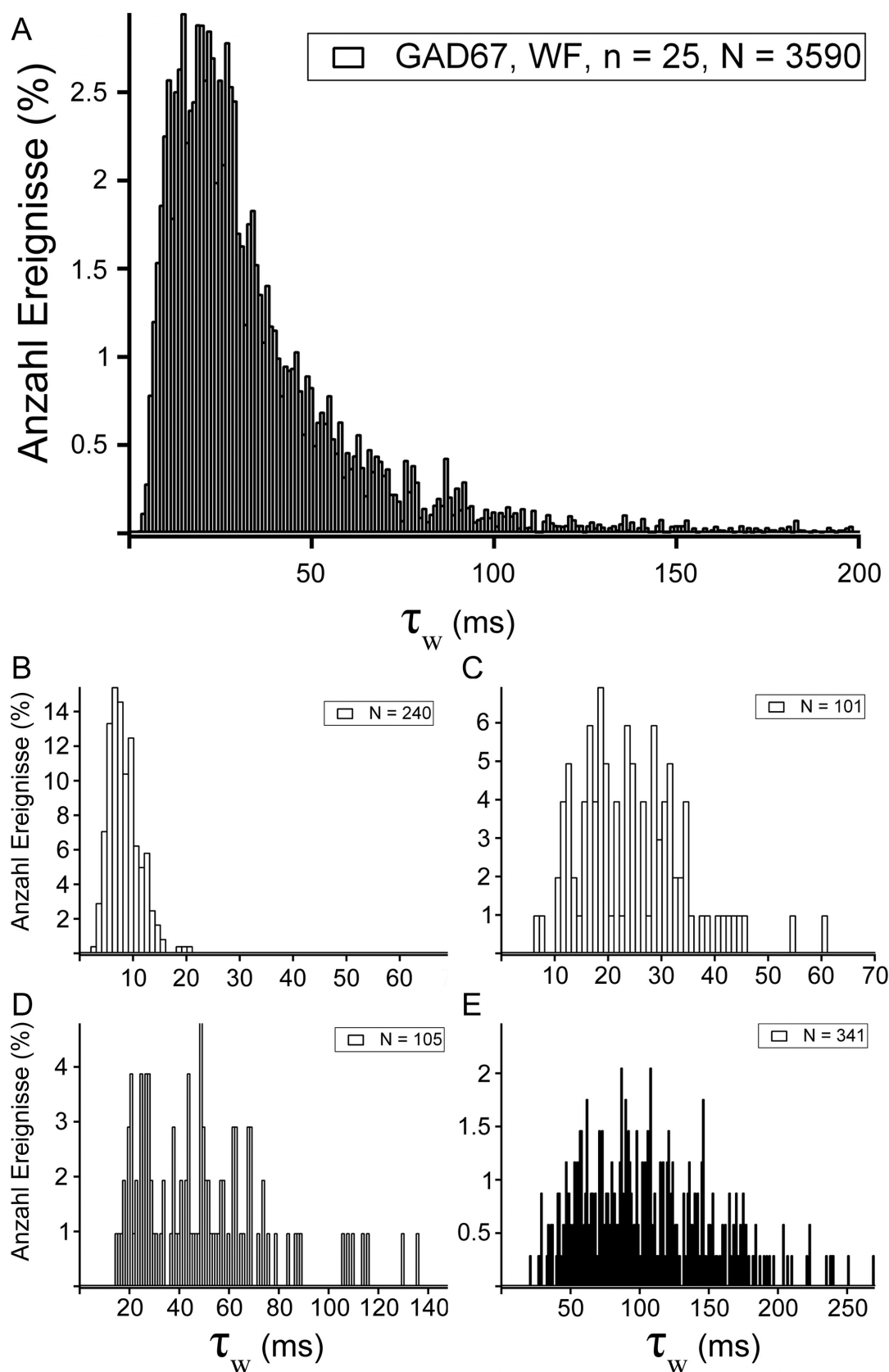


Abbildung 3.19: Analyse glyzinerger sIPSCs von Amakrinzellen, gemessen im Netzhautganzpräparat von GAD67-Mäusen. **(A)**, Verteilung der Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs aller gemessenen WF-Amakrinzellen. **(B)**, **(C)**, **(D)**, **(E)**, vier Beispiele für die Verteilung der Zeitkonstanten bei verschiedenen Zelltypen (s. Text).

Jedoch konnten in keiner von 56 abgeleiteten A17-Amakrinzellen (abgeleitet in WT-, *Gla1^{spd-ot}*-, *Gla2^{-/-}*- und *Gla3^{-/-}*-Mäusen) glyzinerge sIPSCs gemessen werden. Dagegen traten regelmäßig GABAerge sIPSCs auf, die sich durch die Zugabe des GABA_A Rezeptor-Antagonisten GABAzine blockieren ließen.

Es wurden in den Retinaganzpräparaten auch viele (n = 22) ektopische, cholinerge Amakrinzellen abgeleitet. In keinem Fall wurden glyzinerge sIPSCs gemessen.

Im Gegensatz zu A17- und cholinergen Amakrinzellen zeigt die Abbildung 3.17 eine Reihe von Zellen, bei denen glyzinerge Aktivität gemessen wurde, die sich aber in ihrer Glyzinrezeptor-Physiologie deutlich unterschieden.

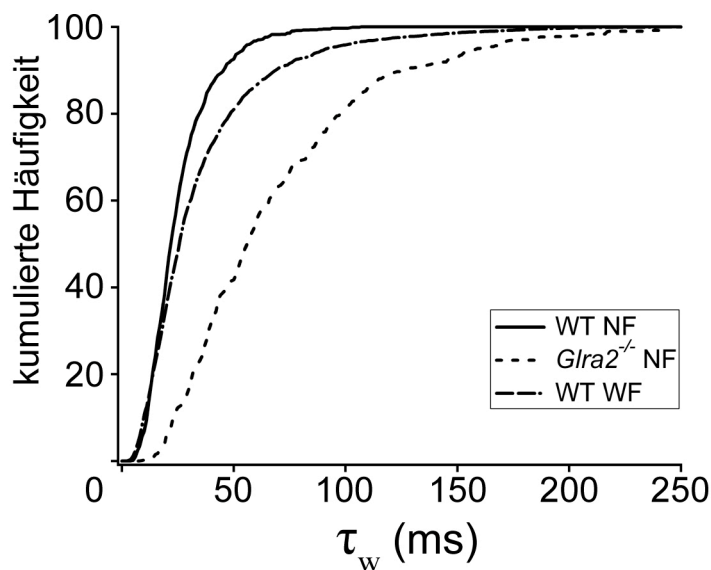


Abbildung 3.20: Vergleich der kumulierten Häufigkeiten glyzinerger sIPSCs in NF-Amakrinzellen von WT- und *Gla2^{-/-}*-Mäusen, sowie von WF-Amakrinzellen (WT WF), die im Netzhautganzzpräparat von GAD67-Mäusen gemessen wurden.

So bekam die in Abbildung 3.17B gezeigte Zelle glyzinergen synaptischen Eingang mit einer Verteilung der Zeitkonstanten, wie sie in Abbildung 3.19B dargestellt ist. Der Mittelwert der Zeitkonstanten dieser Zelle lag bei $\tau = 8 \pm 3$ ms. Weiterhin gab es Zellen, deren sIPSCs Zeitkonstanten aufwiesen die mit denen von NF-Amakrinzellen vergleichbar waren (s. Abb. 3.19C, Mittelwert: 24 ± 10 ms). Andere Zellen besaßen noch langsamere Zeitkonstanten (s. Abb. 3.19D&E), mit Mittelwerten von 49 ± 26 ms bzw. 105 ± 50 ms. Als Besonderheit soll die in Abbildung 3.17C gezeigte Zelle näher betrachtet werden. Bei dieser und einer weiteren Zelle des gleichen Typs traten in hoher Frequenz sIPSCs auf, deren Zeitkonstanten 100 ms überstiegen. Abbildung 3.21 zeigt die Stromspuren der glyzinerger sIPSCs dieser Zelle (C) im Vergleich zu sIPSCs von NF-Amakrinzellen aus WT- (A) und *Gla2^{-/-}*- (B) Mäusen.

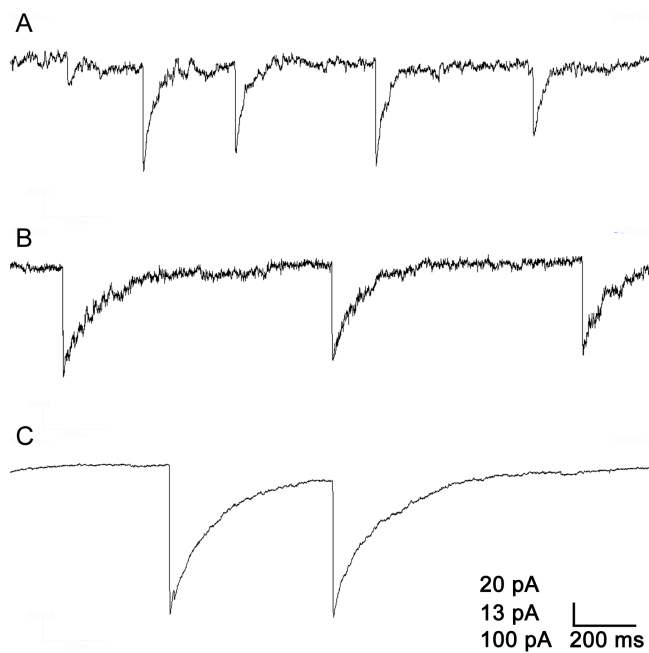


Abbildung 3.21: Ableitungen glyzinerger sIPSCs in NF-Amakrinzellen von WT- (A) und *Gra2*^{-/-} (B) Mäusen und von einer WF-Amakrinzelle (C), gemessen im Netzhautganzpräparat einer GAD67-Maus. In C ist ein Extremfall einer Zelle mit enorm langsamen sIPSCs gezeigt (vgl. Abb. 3.19E).

Die Amplituden der glyzinerger sIPSCs der ektopischen Amakrinzellen zeigten eine ähnliche Verteilung wie die der sIPSCs von NF-Amakrinzellen, mit einem Maximum bei 40 pA und durchschnittlichen 55 ± 32 pA (s. Abb. 3.22 und Tabelle 3.2).

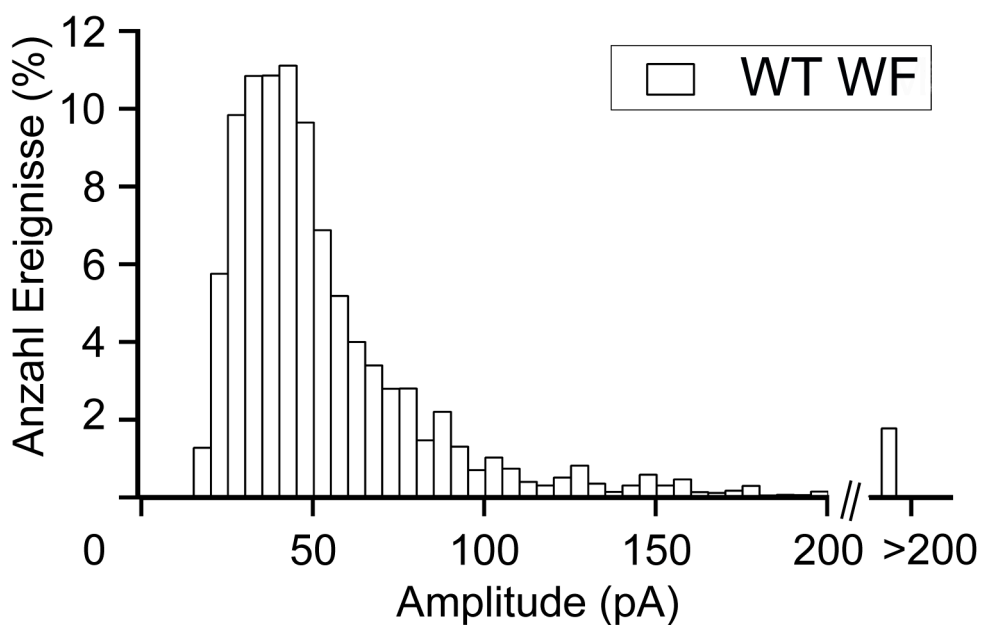


Abbildung 3.22: Amplituden-Histogramm aller 25 ektopischen WF-Amakrinzelle

AII-Amakrin zellen	Amplitude (pA)	K-S-Test	Zeitkonstante τ (ms)	K-S-Test	Aktivierungszeit T20/80 (ms)	K-S-Test
WT	-34 ± 16		11,2 ± 2,0		1,4 ± 0,7	
<i>Gla1^{spd-ot}</i>	-39 ± 13	P > 0,05	10,8 ± 1,5	P > 0,05	1,2 ± 0,5	P > 0,05
<i>Gla2^{-/-}</i>	-38 ± 10	P > 0,05	11,4 ± 2,3	P > 0,05	1,1 ± 0,4	P > 0,01
<i>Gla3^{-/-}</i>	–	–	–	–	–	–
NF-Amakrin zellen						
WT	-46 ± 36		27 ± 7,4		1,5 ± 0,6	
<i>Gla1^{spd-ot}</i>	-59 ± 49	P > 0,05	24 ± 3,8	P > 0,05	1,1 ± 0,6	P > 0,05
<i>Gla2^{-/-}</i>	-35 ± 23	P > 0,05	69 ± 16	P < 0,01**	2,5 ± 1,3	P > 0,05
<i>Gla3^{-/-}</i>	-35 ± 16	P > 0,05	29 ± 5,6	P > 0,05	1,9 ± 0,9	P > 0,05
WF-Amakrin zellen						
	-55 ± 32		36 ± 23		0,9 ± 0,3	

Tabelle 3.2: Amplitude, Zeitkonstante der Deaktivierungs-/Desensitivierungskinetik und die Aktivierungszeit von AII- und NF-Amakrinzellen in WT und GlyR-KO-Tieren sowie ektopischen Amakrinzellen der GAD67-GFP-Maus (Mittelwert + Standardabweichung). K-S-Test: Kolmogorov-Smirnov-Test.

Diese Beispiele zeigen zum einen, dass auch ektopische Amakrinzellen Synapsen von glyzineren Amakrinzellen erhalten, zum anderen aber sind diese Synapsen sehr heterogen und vermutlich auch in ihrer molekularen Zusammensetzung sehr unterschiedlich.

Bei *Gla1^{spd-ot}*-Mäusen konnte von drei monostratifizierenden WF-Amakrinzellen (für die Morphologie s. Abb. 3.15B), deren Dendriten in Sublamina a stratifizieren, glyzinerge Aktivität gemessen werden.

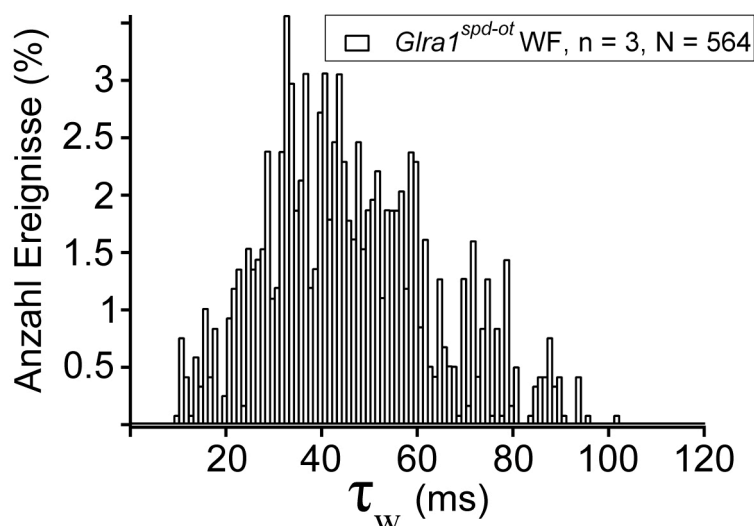


Abbildung 3.23: Verteilung der Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs in WF-Amakrinzellen der *Gla1^{spd-ot}*-Maus, deren Dendriten nur in einer Schicht der IPL stratifizieren (s. Abb. 3.15B).

Auch hier fanden sich Zeitkonstanten der glyzinerigen sIPSCs, die zwischen 10 und 100 ms lagen und damit langsamer waren als die von NF-Amakrinzellen (s. Abb. 3.23). Der Mittelwert der drei Zellen lag bei $\tau = 48 \pm 2$ ms (N = 564).

3.10 Untersuchung der dendritischen Filterung der glyzinerigen sIPSCs

Wie in den Abbildungen 3.14, 3.15, 3.16 und 3.17 gezeigt wurde, unterscheiden sich Amakrinzellen in der Größe ihres Dendritenbaumes, im Verzweigungsmuster und in deren Durchmesser. Es ist nicht bekannt, wo auf diesen Dendriten glyzinerige Synapsen liegen, ob sie gleichmäßig verteilt sind bzw. sehr nah oder sehr fern vom Zellkörpers entfernt liegen. Diese Eigenschaften können aber Einfluss auf die Ableitung synaptischer Ströme haben, da Dendriten wie ein elektrischer Filter wirken können. Je weiter entfernt sich eine Synapse vom

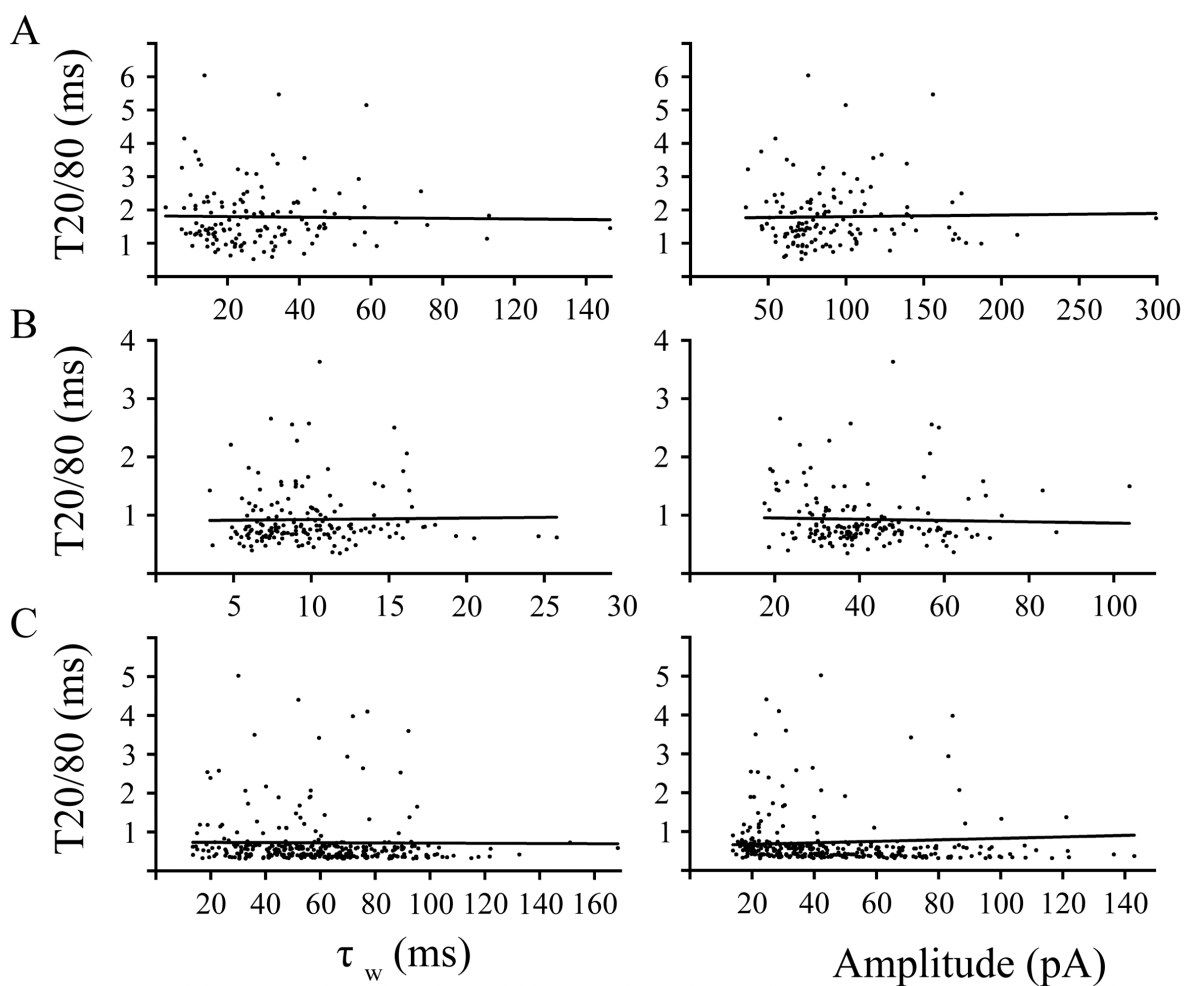


Abbildung 3.24: Aktivierungszeit, Zeitkonstante der Deaktivierungs/Desensitivierungskinetik und Amplitude. Die Aktivierungszeit wurde gegen die Zeitkonstante aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt für eine NF-Amakrinzelle (**A, links**), eine All-Amakrinzelle (**B, links**) und eine WF-Amakrinzelle (**C, links**). **Rechts:** Aktivierungszeit über Amplitude, sonst wie links.

Zellkörper (und damit von der Messelektrode) befindet, desto größer die Abschwächung und Verbreiterung des Signals. Dies kann zu einer Veränderung sowohl der gemessenen Aktivierungszeit als auch der Stromrückbildung führen. Man spricht von dendritischer Filterung. Die Unterschiede in den Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs könnten also auf Filtereffekte der Zellmembran zurückzuführen sein und nicht auf unterschiedliche Rezeptoren. In einem solchen Fall sollte es aber zu einem linearen Zusammenhang von Aktivierungszeit und Deaktivierungs-/Desensitivierungszeit bzw. von Aktivierungszeit und Amplitude kommen. Beide Kinetiken und die sIPSC Amplituden wurden in den vorliegenden Experimenten gemessen und sind in Abbildung 3.24 einander gegenübergestellt. Es ist die Aktivierungszeit ($T_{20/80}$) gegen die Deaktivierungs-/Desensitivierungskinetik und gegen die Amplitude aufgetragen und auf eine Korrelation hin überprüft. Abbildung 3.24 zeigt beispielhaft für drei verschiedene Zelltypen, dass eine solche Korrelation nicht gefunden wurde. In Abbildung 3.24A ist die Aktivierungszeit einer NF-Amakrinzelle gegen die Zeitkonstanten der Deaktivierungs-/Desensitivierungskinetik (links) und gegen die Amplitude (rechts) aufgetragen. Es wurde jeweils eine Regressionsgerade berechnet und es finden sich keine Anzeichen für eine Korrelation (Pearson-Korrelationskoeffizienten $r_{\tau} = 0,018$, $P = 0,83$ und $r_A = 0,021$, $P = 0,81$, $N = 135$). Ähnliche Ergebnisse sind für eine AII-Amakrinzelle (Abb. 3.24B, $r_{\tau} = 0,018$, $P = 0,90$ und $r_A = 0,009$, $P = 0,68$, $N = 169$) und für eine WF-Amakrinzelle (Abb. 3.24C, $r_{\tau} = 0,007$, $P = 0,89$ und $r_A = 0,056$, $P = 0,29$, $N = 328$) gezeigt. Auch alle weiteren geprüften Zellen zeigten keine Anzeichen für Korrelationen zwischen Aktivierungszeit, Deaktivierungs-/Desensitivierungskinetik und Amplitude. Damit kann ein Einfluss von dendritischer Filterung auf die Ergebnisse der Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs ausgeschlossen werden.

IV. Diskussion:

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Amakrinzellen exprimieren unterschiedliche Glyzinrezeptoren. Diese sind an Synapsen aggregiert und bestimmen die Deaktivierungs-/Desensitivierungskinetik der synaptischen Ströme. Spontane IPSCs, die von AII-Amakrinzellen abgeleitet werden, haben eine mittlere Zeitkonstante von $\tau = 11$ ms, wohingegen sIPSCs bei NF-Amakrinzellen mittlere Zeitkonstante von $\tau = 27$ ms besitzen. Diese Differenz in der Zeitkonstante wird durch die Zusammensetzung der α -Untereinheiten des Glyzinrezeptors verursacht. Die synaptische Übertragung bei AII-Amakrinzellen beruht hauptsächlich auf der $\alpha 3$ -Untereinheit und nicht auf der $\alpha 1$ - oder $\alpha 2$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors. Bei NF-Amakrinzellen trägt die $\alpha 2$ -Untereinheit entscheidend zur glyzineren synaptischen Transmission bei und die Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 3$ spielen offenbar eine untergeordnete Rolle.

Bei den WF-Amakrinzellen findet man sIPSCs mit relativ schneller Kinetik ($\tau = 8$ ms), es gibt aber auch WF-Zellen, deren sIPSCs extrem langsam sind ($\tau = 105$ ms). Wegen der geringen Zahl der abgeleiteten WF-Amakrinzellen ist eine Bestimmung ihrer GlyR-Untereinheiten nicht möglich.

4.1 Analyse der synaptischen Ströme

Bei den Messungen der postsynaptischen Ströme konnten zusätzlich zu den glyzineren sIPSCs zwei Arten von spontanen Ereignissen unterschieden werden.

4.1.1 Spontane exzitatorische postsynaptische Ströme

Hauptsächlich bei AII-Amakrinzellen kam es zum Auftreten von spontanen exzitatorischen postsynaptischen Strömen, die sich sowohl durch die Applikation des ionotropen Glutamatrezeptor-Antagonisten NBQX, als auch durch den metabotropen Glutamatrezeptor-Agonisten L-AP4 blockieren bzw. stark reduzieren ließen. Es ist bekannt, dass AII-Amakrinzellen ionotrope AMPA/Kainat-Rezeptoren haben und diese in Synapsen vorkommen (Dumitrescu et al., 2006; Veruki et al., 2003; Pang et al., 2007). Dabei kommt der Großteil der exzitatorischen synaptischen Aktivität der AII-Zellen von Stäbchenbipolarzellen, die bei Licht depolarisiert werden und Glutamat auf AII-

Amakrinzellen ausschütten (Singer & Diamond, 2003). Stäbchenbipolarzellen ihrerseits werden durch die Ausschüttung Glutamats über metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe drei gehemmt (Nomura et al., 1994; Euler et al. 1996; Euler & Masland, 2000). Durch die Applikation des metabotropen Glutamatrezeptor-Agonisten L-AP4 konnte die Depolarisation der Stäbchenbipolarzellen und somit die Ausschüttung von Glutamat auf AII-Amakrinzellen vermindert werden. Dadurch ließ sich das Verhältnis des Signals zum Rauschen vergrößern. Gleichzeitig waren nicht alle ionotropen Glutamatrezeptoren blockiert, die Depolarisation der präsynaptischen glyzineren Amakrinzellen war vermindert aber nicht unterdrückt. Auch bei anderen Amakrinzellen (Frech et al., 2001) sowie bei Ganglienzellen der Ratte (Protti et al., 1997) und der Maus (Tian et al., 1998) konnten bereits früher EPSCs mit ähnlichen Kinetiken gemessen werden und ließen sich dadurch leicht von IPSCs unterscheiden (s. Abb. 3.6A).

4.1.2 Spontane GABAerge postsynaptische Ströme

Bei einer Reihe von Amakrinzellen konnten GABAerge inhibitorische postsynaptische Ströme beobachtet werden, die mit einem Gemisch aus den GABA-Rezeptor-Antagonisten GABAzine und TPMPA während der Messung glyzinerer sIPSCs blockiert wurden. Wegen ihrer zu glyzineren sIPSCs ähnlichen Aktivierungs- und Deaktivierungszeiten (s. Frech et al., 2001) mussten die GABAergen sIPSCs blockiert werden. Ob dies zur Disinhibition anderer Zellen im Netzwerk führte und somit zu einer veränderten Ausschüttung von Glutamat und Glyzin, lässt sich nicht sicher ausschließen. Es konnten aber während der Blockade der GABA-Rezeptoren keine offensichtlichen Veränderungen in der Amplitude oder der Frequenz glyzinerer Ereignisse festgestellt werden.

4.2 Analyse der Glyzinrezeptoren

4.2.1 Histologische Untersuchungen

Immunhistochemische Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern gegen die α -Untereinheiten des GlyR haben gezeigt, dass die Untereinheiten in Synapsen aggregiert sind. Im Lichtmikroskop erkennt man dies durch punktförmige intensive Fluoreszenz (hot spots). Für jede α -Untereinheit wurde eine charakteristische Verteilung der Punkte in der IPL beschrieben (Grünert & Wässle, 1993; Greferath et al., 1994; Haverkamp et al., 2003, 2004;

Heinze et al., 2007). Durch Doppelmarkierungen konnte untersucht werden, ob zwei unterschiedliche α -Untereinheiten an den gleichen Synapsen vorkommen (Haverkamp et al., 2003, 2004; Heinze et al., 2007). Dies ist in der Regel nicht der Fall. Nur die Untereinheiten α_3 und α_4 sind jeweils in einer geringen Zahl der synaptischen Färbungen mit der α_2 -Untereinheit kolokalisiert (Haverkamp et al., 2003, 2004; Heinze et al., 2007). In etwa 15 - 25 % der Rezeptorfärbungen kommt es zu Überlappungen der Untereinheiten.

In weiteren Doppelfärbungen konnten die Untereinheiten α_2 , α_3 und α_4 , jedoch nicht die α_1 Untereinheit, auf Amakrinzellen festgestellt werden (Haverkamp et al., 2003, 2004; Heinze et al., 2007).

In eigenen Färbungen der Rattennetzhaut von AII-Amakrinzellen und der α_1 -Untereinheit konnten zwar Überlappungen an den verdickten Dendriten in Sublamina a festgestellt werden (nicht gezeigt), jedoch wurden diese Kolokalisationen als Postsynapsen von Zapfenbipolarzellen interpretiert, die von den Dendriten der AII-Amakrinzellen umschlossen wurden. Ein solches Umstülpen der postsynaptischen Dendriten durch die AII-Amakrinzelle wurde bereits von Sasso-Pognetto et al. (1994) in elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Rattennetzhaut dargestellt. Die postsynaptischen Partner der AII-Amakrinzellen bilden unter anderem OFF-Zapfenbipolarzellen, in deren Synapsen die α_1 -Untereinheit des Glyzinrezeptors vorhanden sind (Ivanova et al., 2006).

Da die immunhistochemischen Färbungen keine eindeutigen Aussagen darüber zulassen, ob die Synapsen auf der prä- oder postsynaptischen Zelle liegen, ist es notwendig mit physiologischen Methoden die genaue Lokalisation zu untersuchen.

4.2.2 Physiologische Untersuchungen

a.) Picrotoxinin als GlyR Antagonist

Um nun die Ausstattung und die funktionellen Unterschiede der Glyzinrezeptor-Physiologie bei Amakrinzellklassen zu vergleichen, wurden durch Glyzin evozierte und glyzinerge synaptische Ströme an Amakrinzellen gemessen.

Jedoch sind im Moment keine spezifischen Agonisten oder Antagonisten für die einzelnen Untereinheiten vorhanden (Legendre, 2001; Lynch, 2004; Betz & Laube, 2006). Es finden sich Unterschiede im pharmakologischen Profil von homomeren und heteromeren Rezeptoren. Picrotoxinin ist ein pflanzliches Alkaloid, das als nicht-kompetitiver Antagonist von ionotropen GABA-Rezeptoren bekannt ist. Homomere Glyzinrezeptoren sind wesentlich

empfindlicher für Picrotoxinin als heteromere, wie in Expressionssystemen getestet wurde (Pribilla et al., 1992). Dabei wurde auch festgestellt, dass unter den heteromeren Kanälen die Kombination aus $\alpha 2$ -Untereinheit und β -Untereinheit mindestens dreimal so empfindlich für Picrotoxinin ist als die Kombinationen $\alpha 1\beta$ und $\alpha 3\beta$ (Pribilla et al., 1992). Wie die hier durchgeführten Versuche zeigten, scheint in der Netzhaut bei synaptischen $\alpha 2\beta$ Rezeptoren keine erhöhte Picrotoxinin-Empfindlichkeit vorzuliegen, denn es fand sich weder ein Unterschied zwischen AII- und NF-Amakrinzellen, noch ein Unterschied zwischen WT- und *Gla2^{-/-}*-Mäusen. Wie später noch diskutiert wird, beruht der Großteil synaptischer Transmission bei NF-Amakrinzellen auf Synapsen mit $\alpha 2\beta$ -Kanälen, während diese Kanäle keine Rolle bei AII-Amakrinzellen spielen. Trotzdem ist die Wirkung von Picrotoxinin bei beiden Zelltypen annähernd gleich (s. Abb. 3.3). Zusätzlich wurde die Wirkung von Picrotoxinin auch in Tieren ohne die $\alpha 2$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors getestet und auch hier konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Der Anteil homomerer Glyzinrezeptoren ist insgesamt gering und es zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen den Zelltypen und den untersuchten Mauslinien (s. Tabelle 3.1). Bei AII-Amakrinzellen der *Gla1^{spd-ot}*-Maus ist die Wirkung von Picrotoxinin signifikant größer und auch in NF-Amakrinzellen ist annähernd der gleiche Effekt zu sehen. Obwohl bei der Messung synaptischer Ströme kein Unterschied zwischen Jungtieren (p16-21) und adulten Tieren festzustellen war, könnte die Zahl extrasynaptischer, homomerer Glyzinrezeptoren in diesem Altersstadium im Verhältnis etwas größer sein, was die erhöhte Wirkung des Picrotoxinins erklären würde.

Bei NF-Amakrinzellen der *Gla3^{-/-}*-Maus ist die Wirkung des Picrotoxinins dagegen geringfügig niedriger als im WT. Möglicherweise ändert das Fehlen der $\alpha 3$ -Untereinheit die Expression homomerer Rezeptoren. Allerdings gilt es zu beachten, dass die Abweichung zum WT sehr moderat ausfällt.

b.) Glyzin-Empfindlichkeit

Die Applikation von Glyzin führt bei AII-Amakrinzellen ebenso wie bei NF-Amakrinzellen mit dem Anstieg der Glyzinkonzentration zu größeren Stromamplituden, bis es zur Sättigung der Amplitude kommt, wenn alle Kanäle auf der Zelle geöffnet sind. Hierbei musste zwischen den Applikationen jeweils eineinhalb Minuten gewartet werden, um zu verhindern, dass die Desensitivierung der Kanäle noch „aktiv“ ist. Anhand dieser Stromamplituden wurden Dosis-Wirkungs-Kurven angefertigt, die einen sigmoidalen Verlauf hatten (s. Abb. 3.2). Dabei

waren AII-Amakrinzellen geringfügig empfindlicher für Glyzin, die Zellen reagierten etwa bei 10 – 20 μM Glyzin erstmals und die maximale Stromamplitude war bei 5 mM erreicht. Daraus ergab sich ein EC_{50} -Wert von 135 μM Glyzin. NF-Amakrinzellen reagierten ebenfalls bei etwa 10 - 20 μM Glyzin, die sättigende Konzentration von Glyzin lag jedoch bei 10 - 20 mM, und der EC_{50} -Wert bei 375 μM . Diese Werte liegen im Bereich oder etwas über den EC_{50} -Werten, die für Glyzinrezeptoren in künstlichen Expressionssystemen gefunden werden (Mangin et al., 2003; Harvey et al., 2000; Mohammadi et al., 2003; Grudzinska et al., 2005). Die leicht erhöhten Werte lassen sich darauf zurückführen, dass es sich hier um Zellen im Verbund des Gewebes handelt, in das der applizierte Wirkstoff erst eindringen muss. Von Hirnschnitten sind ebenfalls Dosis-Wirkungs-Kurven von Glyzinrezeptoren in Neuronen bekannt. Hierbei sind Werte von 100 bis 270 μM Glyzin als EC_{50} -Wert zu finden (Chattipakorn & McMahon, 2002; Sergeeva & Haas, 2001; Breustedt et al., 2004). Daraus können aber keine Schlüsse auf die vorhandenen Glyzinrezeptor-Untereinheiten in den Zelltypen gezogen werden. Allerdings unterscheiden sich die Affinitäten für Glyzin in den zwei hier untersuchten Typen von Zellen. Da es sich bei AII-Amakrinzellen und NF-Amakrinzellen in beiden Fällen um Zellen mit einem ähnlich großen Dendritenfeld (s. Abb. 3.1) handelt, ist es unwahrscheinlich, dass die Abweichung des EC_{50} -Wertes auf ein Artefakt der Applikationstechnik zurückführen lässt und ein Amakrinzelltyp der Applikation leichter zugänglich war als der andere. Dies lässt den Schluss zu, dass die Zusammensetzung der Glyzinrezeptor-Untereinheiten in den zwei Zellklassen voneinander abweicht.

OFF-Bipolarzellen der Mausnetzhaut exprimieren die $\alpha 1$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors, wie durch die Analyse glyzinerger sIPSCs und den Einsatz der *Glr1^{spd-ot}*-Maus festgestellt wurde (Ivanova et al., 2006). Dabei wird in diesen Zelltypen ausschließlich diese eine Untereinheit exprimiert, denn die prominente Stromantwort der Zellen auf Applikation von Glyzin im WT war in *Glr1^{spd-ot}*-Mäusen nicht vorhanden. Bei Amakrinzellen dagegen ist die Situation komplizierter, da mehr als eine α -Untereinheit pro Zelle vorkommt. Deshalb waren auch in Knock-out-Tieren bei allen Zellen Glyzinströme zu messen. Ob die Rezeptoren, die diesen Strömen zugrunde liegen, synaptisch oder extrasynaptisch verteilt sind, lässt sich anhand der Applikationsversuche nicht sagen. Es gab jedoch Unterschiede bei den Glyzin-induzierten Strömen zwischen AII- und NF-Zellen:

So ist nur bei AII-Amakrinzellen eine signifikante Reduktion der Amplitude bei *Glr3^{-/-}*-Mäusen, jedoch nicht bei *Glr1^{spd-ot}*- oder *Glr2^{-/-}*-Mäusen, zu beobachten. Bei *Glr3^{-/-}*-Mäusen reduziert sich bei gesättigter Glyzinkonzentration die Amplitude im Mittel um 50 %.

Bei NF-Amakrinzellen ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und KO-Mäusen feststellen, trotzdem ist die mittlere Amplitude bei allen KO-Mäusen geringer als im WT. Hierbei fiel der Unterschied im *Gla2*^{-/-}-Tier mit einer Amplitudenreduktion um 25 % am größten aus (s. Abb. 3.3 und Tabelle 3.1).

Diese Daten geben Hinweise darauf, dass AII-Amakrinzellen die $\alpha 3$ -Untereinheit exprimieren, während NF-Amakrinzellen eine andere Ausstattung von Glyzinrezeptoren haben, die sich aus $\alpha 2$ - und noch weiteren Untereinheiten zusammensetzen.

c.) Kinetik der Glyzinrezeptoren in anderen Teilen des ZNS

Durch die Applikationsexperimente konnte keine Aussage über die Kinetik der Glyzinrezeptoren gemacht werden, denn das Applikationssystem hat eine Totzeit, was zu einer Verzögerung in der Zellantwort führt. Außerdem muss das in der Flüssigkeit gelöste Glyzin das Gewebe der Netzhaut durchdringen, um die eigentlich abgeleitete Zelle zu erreichen. Dies kann von Zelle zu Zelle leicht variieren. Zusätzlich kann es beim Auswaschen der Lösung von Fall zu Fall zu Abweichungen kommen.

Es ist indes bekannt, dass die Glyzinrezeptor-Untereinheiten unterschiedliche Kinetiken haben. So haben Versuche in heterologen Expressionssystemen gezeigt, dass bei der $\alpha 1$ -Untereinheit Einzelkanäle wesentlich kürzere durchschnittliche Offenzeiten haben als die $\alpha 2$ -Untereinheit (Takahashi et al., 1992). Es ist deshalb zu vermuten, dass diese Kanäle auch in der Synapse kürzer offen sind und damit die Zeitkonstante der Stromrückbildung eines inhibitorischen postsynaptischen Stroms verkleinern würden.

Für die $\alpha 3$ - und $\alpha 4$ -Untereinheiten liegen keine vergleichbaren Daten vor. Es wurden jedoch Einzelkanäle abgeleitet, wonach sich abschätzen ließ, dass die $\alpha 3$ -Untereinheit kürzere Offenzeiten hat als die $\alpha 2$ -Untereinheit und längere Offenzeiten als die $\alpha 1$ -Untereinheit (Breitinger et al., 2002). Die Kinetik der $\alpha 4$ -Untereinheit scheint zwischen der $\alpha 3$ - und $\alpha 2$ -Untereinheit zu liegen (Harvey et al., 2000). Diese Versuche wurden allerdings mit homomeren Rezeptoren in *Xenopus laevis*-Oozyten oder in HEK293-Zellen durchgeführt. An Synapsen kommen Glyzinrezeptoren nur als heteromere Rezeptoren vor, da die Rezeptoren durch die β -Untereinheit mit dem Protein Gephyrin interagieren, welches als Bindeglied zwischen Mikrotubuli und Rezeptor wirkt und für die Aggregation an der Synapse sorgt (Kneussel und Betz, 2000). Der Einbau von β -Untereinheiten kann die Pharmakologie und Kinetik der Glyzinrezeptoren ändern (Mohammadi et al., 2003; Pribilla et al., 1992). Ob bzw. inwieweit das gewählte Expressionssystem die Eigenschaften des Kanals bestimmt, ist

unbekannt. Zumindest aber finden sich Abweichungen in den EC_{50} -Werten von Glyzinrezeptor Untereinheiten, die in *Xenopus laevis*-Oozyten oder in Zelllinien transfiziert wurden (vgl. Schmieden et al., 1992; Pribilla et al., 1992; Bormann et al., 1993; Lynch et al., 1997; Mascia et al., 1998).

Die kinetischen Eigenschaften von synaptischen Untereinheiten konnten zum Teil entschlüsselt werden. Ähnlich wie an der neuromuskulären Endplatte, wo im Laufe der Entwicklung eine γ -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors durch eine ε -Untereinheit ersetzt wird (Mishina et al. 1986; Witzemann et al. 1989), kommt es während der Entwicklung des Rückenmarks von Nagern zu einer Änderung der Expression der GlyR-Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$. Im Rückenmark wird embryonal und in den ersten postnatalen Tagen die $\alpha 2$ -Untereinheit als homomerer oder als heteromerer ($\alpha 2\beta$) Rezeptor exprimiert. Innerhalb der ersten 14 Tage nach der Geburt kommt es zum Umbau der Glyzinrezeptoren und hauptsächlich Kanäle mit den Untereinheiten $\alpha 1$ und β werden gebildet (Becker et al., 1988; Malosio et al., 1991; Takahashi et al., 1992; Singer et al., 1998; Smith et al., 2000). Einhergehend mit diesem Austausch ändert sich auch die Kinetik der glyzinerger synaptischen Transmission im Rückenmark. Die Zeitkonstante gemittelter glyzinerger IPSCs liegt im Rückenmark neonataler Ratten bei $\tau = 17,8$ ms und verkürzt sich innerhalb der ersten 14 Tage auf $\tau = 5,9$ ms (Takahashi et al., 1992). Die durchschnittliche Offenzeit bei Einzelkanalmessungen von Rückenmarksneuronen verkürzt sich entsprechend (Takahashi et al., 1992).

Die verschiedenen kinetischen Eigenschaften der einzelnen Untereinheiten lassen also Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Glyzinrezeptoren an der Synapse zu. Die Ergebnisse bisheriger Arbeiten lassen darauf schließen, dass die $\alpha 1$ -Untereinheit die schnellste Kinetik besitzt und die $\alpha 2$ -Untereinheit am langsamsten ist. Dazwischen dürften die Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 4$ liegen.

Auch in anderen Teilen des zentralen Nervensystems wurden glyzinerge IPSCs gemessen, dabei zeigten sich vergleichbare Charakteristiken für diese Ereignisse, wie sie bereits von Takahashi et al. (1992) beschrieben sind. So wurde im Gehirn des Zebrafischs eine Zeitkonstante von 4,8 ms für glyzinerge IPSCs gefunden, in Neuronen des medialen vestibulären Nukleus der Maus lag sie bei 4,7 ms und in einer weiteren Arbeit am Rückenmark der Ratte bei 5,8 ms (Legendre & Korn, 1994; Camp et al., 2006; Chery & de Koninck, 1999). In sympathischen präganglionären Neuronen der Ratte ließ sich auch eine Änderung der Zeitkonstante während der Entwicklung beobachten, die mittlere Zeitkonstante

schrumpfte von 16,2 ms bis auf 8,7 ms (Krupp et al., 1994). Glyzinerge IPSCs bei Motoneuronen des Hirnstamms der Ratte verkürzten sich ebenfalls während dieser Periode von 14,2 ms bis auf 6,7 ms (Singer et al., 1998). In der oberen medialen Olive der Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*) wurden die bislang schnellsten glyzineren IPSCs mit einer Zeitkonstante von etwa 2,5 ms gemessen (Magnusson et al., 2005).

In einer weiteren Arbeit im Thalamus der Ratte traten glyzinerge IPSCs auf, deren Zeitkonstante nicht mit den im Rückenmark gefundenen Werten für $\alpha 1\beta$ bzw. $\alpha 2\beta$ Rezeptoren übereinstimmten. Die glyzineren IPSCs waren in zwei voneinander getrennten Clustern im Frequenzhistogramm verteilt und hatten dabei mittlere Zeitkonstanten bei 11 ms und bei 75 ms (Ghavanini et al., 2006).

Damit sind die Zeitkonstanten der $\alpha 1\beta$ und $\alpha 2\beta$ Glyzinrezeptoren in der Synapse gut bekannt. Für die Untereinheiten $\alpha 3\beta$ und $\alpha 4\beta$ konnten bislang noch keine Zeitkonstanten zugeordnet werden. Im dorsalen Horn des Rückenmarks der Maus ist die $\alpha 3$ -Untereinheit an der synaptischen Transmission beteiligt, jedoch wurde die Zeitkonstante von isolierten GlyR- $\alpha 3\beta$ Synapsen nicht untersucht (Harvey et al., 2004).

d.) Kinetik der Glyzinrezeptoren in der Säugetiernetzhaut

In der Säugernetzhaut wurden von Bipolar-, Ganglien- und Amakrinzellen glyzinerge sIPSCs abgeleitet. Sowohl Stäbchenbipolarzellen als auch OFF-Zapfenbipolarzellen wiesen dabei glyzinerge sIPSCs mit schnellen Kinetiken auf, was auf die Expression von $\alpha 1\beta$ Kanälen in den Synapsen schließen lässt (Cui et al., 2003; Frech & Backus, 2004; Ivanova et al., 2006). Der Beweis wurde durch Messungen bei der *Gla1^{spd-ot}*-Maus erbracht: hier konnten keine sIPSCs mehr festgestellt werden und auch die Applikation von Glyzin induzierte keinen Chloridstrom (Ivanova et al., 2006).

Bei Ganglienzellen wurden unterschiedliche Zeitkonstanten der glyzineren sIPSCs gefunden. Bei Ableitungen von Ganglienzellen im Schnittpräparat der Rattennetzhaut ließen sich sIPSCs messen, die mit biexponentiellen Funktionen angepasst werden konnten und deren τ_1 - und τ_2 -Werte eine große Schwankungsbreite aufwiesen mit Werten zwischen 5 und 65 ms (für τ_1) bzw. zwischen 80 und 285 ms (für τ_2) (Protti et al., 1997). Bei Ganglienzellen der Mausnetzhaut berichteten Tian et al. (1998) über eine ähnliche Variabilität in den Kinetiken der sIPSCs mit Zeitkonstanten zwischen 10 und 200 ms. Diese Arbeiten wurden im Schnittpräparat durchgeführt, und der Ganglienzelltyp wurde nicht in die Analyse einbezogen. Hier scheinen je nach Zelltyp jedoch Unterschiede zu bestehen, da die Zeitkonstanten von

A-Typ-Ganglienzellen der Mausnetzhaute nur geringfügig um einen Mittelwert von etwa 4 ms streuen. Auch hier konnten in der *Glr1^{spd-ot}*-Maus keine sIPSCs mehr abgeleitet werden, während in den *Glr2^{-/-}*- und *Glr3^{-/-}*-Mäusen keine Unterschiede zum WT zu finden waren (Majumdar et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit besaßen NF-Amakrinzellen bei WT-Mäusen einen Mittelwert der gewichteten Zeitkonstanten von $\tau_w = 27$ ms. Dabei fanden sich in 24 Zellen Werte zwischen 10 und 50 ms. Bei unidentifizierten Amakrinzellen der Mausnetzhaute ($\tau_w = 25$ ms, Frech et al., 2001), bei Amakrinzellen einer organotypischen Kultur der Mausnetzhaute ($\tau_w = 19$ ms, Perez-Leon et al., 2003) und in monostratifizierenden WF-Amakrinzellen der Rattennetzhaute ($\tau_w = 25$ ms, Veruki et al., 2007) wurden ähnliche τ_w -Werte in der Literatur berichtet.

Die gleichen NF-Amakrinzellen zeigten bei den Glyzinrezeptor Knock-out-Mäusen für die $\alpha 1$ -Untereinheit (*Glr1^{spd-ot}*) und die $\alpha 3$ -Untereinheit (*Glr3^{-/-}*) keinen signifikanten Unterschied zum WT. Bei genauer Betrachtung der Verteilungen der Zeitkonstanten fällt jedoch auf, dass die NF-Amakrinzellen in WT- und *Glr1^{spd-ot}*-Mäusen im Bereich von 10 bis 15 ms einen höheren Anteil haben als in *Glr3^{-/-}*-Mäusen (s Abb. 3.9A&B&C). Ein geringer Teil der synaptischen Transmission könnte durch die $\alpha 3$ -Untereinheit laufen.

Bei NF-Amakrinzellen der *Glr2^{-/-}*-Maus hingegen wurde eine deutliche und signifikante Änderung in der Verteilung der glyzinerger Zeitkonstanten gefunden. Das Maximum der Verteilungen verschob sich von etwa 20 ms nach etwa 40 ms, die mittlere Zeitkonstante von 27 ms nach 69 ms. Dabei fanden sich in der *Glr2^{-/-}*-Maus kaum noch Zeitkonstanten unter 20 ms, während Zeitkonstanten über 70 ms, die weder im WT noch in *Glr1^{spd-ot}*- oder in *Glr3^{-/-}*-Mäusen vorkamen, wesentlich häufiger auftauchten und Einzelwerte bis zu 200 ms annehmen konnten.

Ableitungen glyzinerger IPSCs im Hirnstamm der neonatalen Ratte haben für Rezeptoren, die aus $\alpha 2\beta$ Kanälen bestehen, eine mittlere Zeitkonstante von 14,2 ms ergeben (Singer et al., 1998). Dabei reichten die Werte der Zeitkonstanten von 10 bis 30 ms. Die Reduktion der Zeitkonstanten bei NF-Amakrinzellen der *Glr2^{-/-}*-Maus, die unter 20 ms liegen, können also auf den Verlust der $\alpha 2\beta$ Kanäle in diesen Zellen zurückgeführt werden.

Die zweite deutliche Veränderung ist die Zunahme der langsamen Zeitkonstanten über 70 ms. Es wurden zwar bereits glyzinerge sIPSCs mit vergleichbaren Zeitkonstanten im Thalamus der Ratte und in Ganglienzellen der Ratte und der Maus beschrieben (Ghavanini et al., 2006; Protti et al., 1997; Tian et al., 1998), jedoch konnte nicht die beteiligte Glyzinrezeptor-Untereinheit festgestellt werden. Heinze et al. (2007) haben bei Doppelfärbungen der

Glyzinrezeptor-Untereinheiten wenig Kollokationen beobachtet, was dafür spricht, dass in der Regel die verschiedenen Untereinheiten nicht in ein und derselben Synapse liegen. Allerdings kamen in der Maus in etwa 25 % der Fälle Kollokationen der $\alpha 4$ -Untereinheit mit der $\alpha 2$ -Untereinheit vor. Heinze und Mitarbeiter haben auch die Anzahl der gefärbten Punkte der verschiedenen Glyzinrezeptor-Untereinheiten in der IPL bestimmt. Sie fanden, dass es ausschließlich bei der *Gla2*^{-/-}-Maus zu einer moderaten Hochregulierung der $\alpha 4$ -Untereinheit in der IPL kam, während alle anderen Untereinheiten unverändert waren (Weiss et al., 2007). Dies legt nahe, dass bei NF-Amakrinzellen der WT-Maus Synapsen vorhanden sind, die sowohl $\alpha 2\beta$ -Kanäle als auch $\alpha 4\beta$ -Kanäle enthalten. Bei der *Gla2*^{-/-}-Maus kommen folglich nur noch Synapsen mit $\alpha 4\beta$ -Kanälen vor, die dann für die langsameren sIPSCs verantwortlich sein könnten.

Eine weitere Erklärung für die langsamen sIPSCs könnte in einem Netzwerkeffekt des ausgeschalteten Gens der $\alpha 2$ -Untereinheit liegen. So ist es vorstellbar, dass eine glyzinerge Amakrinzelle, die Synapsen auf NF-Amakrinzellen macht, im WT nicht aktiviert ist. Durch das Fehlen der $\alpha 2$ -Untereinheit könnte diese Zelle disinhibiert sein, Glyzin auf eine NF-Amakrinzelle ausschütten und somit die im WT stummen Synapsen mit langsamen Zeitkonstanten aktivieren. Allerdings finden sich bisher keine Hinweise auf ein solches Szenario.

Es bleibt festzuhalten, dass bei NF-Zellen der *Gla2*^{-/-}-Maus synaptische Ereignisse mit Zeitkonstanten zu registrieren sind, die weit langsamer sind als die im Rückenmark und im Hirnstamm beschriebenen Zeitkonstanten von $\alpha 2\beta$ Kanälen.

e.) Vergleich der Glyzinrezeptoren bei AII- und NF-Amakrinzellen

Die bei AII-Amakrinzellen gemessenen glyzinergeren sIPSCs unterscheiden sich deutlich von denen, die in NF-Amakrinzellen abgeleitet wurden. Während die Aktivierungszeit einen ähnlichen Zeitverlauf hat, ist die Zeitkonstante der Deaktivierungs-/Desensitivierungskinetik deutlich kürzer bei AII-Amakrinzellen. Mit einer mittleren Zeitkonstante von $\tau = 11$ ms liegt sie zwischen den Zeitkonstanten von Bipolarzellen ($\tau = 5,9$ ms, Ivanova et al., 2006) und NF-Amakrinzellen ($\tau_w = 27$ ms) und damit zwischen den Zeitkonstanten von $\alpha 1\beta$ -Kanälen und von Synapsen, in denen zu einem Großteil $\alpha 2\beta$ -Kanäle beteiligt sind. Diese beiden α -Untereinheiten scheinen bei der glyzinergeren synaptischen Transmission der AII-Amakrinzellen keine Rolle zu spielen, denn sowohl in *Gla1*^{spd-ot}-Mäusen als auch in *Gla2*^{-/-}-Mäusen konnten in 9 bzw. 27 AII-Amakrinzellen 50 - 100 sIPSCs analysiert werden. In

keiner der Zellen war ein Unterschied in der Verteilung der Zeitkonstanten glyzinerger sIPSCs im Vergleich zum WT festzustellen. Da *Glr1^{spd-ot}*-Mäuse im Alter von etwa 3 Wochen aufgrund der fehlenden $\alpha 1$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors sterben, wurden diese Tiere im Alter von 16 - 21 Tagen untersucht. Es konnte kein Unterschied zwischen den in juvenilen *Glr1^{spd-ot}*-Mäusen und in adulten WT-Mäusen gemessenen sIPSCs von AII-Amakrinzellen festgestellt werden. Zusätzlich wurden auch in juvenilen WT-Mäusen glyzinerge sIPSCs von AII-Amakrinzellen abgeleitet. Auch hier konnte weder ein Unterschied zu adulten WT-Mäusen noch zu juvenilen *Glr1^{spd-ot}*-Mäusen beobachtet werden. Diese Daten und die Versuche an Bipolarzellen und Ganglienzellen der Maus (Ivanova et al., 2006; Majumdar, 2007) lassen darauf schließen, dass die Entwicklung der glyzinerger synaptischen Transmission nach 16 Tagen bereits abgeschlossen ist.

Bei der *Glr3^{-/-}*-Maus wurden 50 AII-Amakrinzellen abgeleitet, doch bei keiner der untersuchten Zellen konnten IPSCs gemessen werden. Dies legt nahe, dass die Synapsen bei AII-Amakrinzellen mit $\alpha 3\beta$ -Kanälen bestückt sind. Damit würde die mittlere Zeitkonstante von $\alpha 3\beta$ Synapsen genau zwischen der von $\alpha 1\beta$ Synapsen und $\alpha 2\beta$ Synapsen liegen. Dies deckt sich mit den mittleren Offenzeiten in Einzelkanalmessungen von homomeren Glyzinrezeptoren (Breitinger et al., 2002; Takahashi et al., 1992).

AII-Amakrinzellen der *Glr3^{-/-}*-Maus hatten bei den Applikationsversuchen geringere Amplituden, im Gegensatz zu den anderen untersuchten Mauslinien, bei denen keine Reduktion der Amplitude bei AII-Amakrinzellen beobachtet wurde. Jedoch hatten AII-Amakrinzellen bei *Glr3^{-/-}*-Tieren immer noch deutliche Antworten bei Applikation von Glyzin, was bedeutet, dass weitere Untereinheiten von AII-Zellen exprimiert werden. Diese Rezeptoren könnten aber auch extrasynaptisch gelegen sein und keine Rolle bei der synaptischen Transmission spielen. Es ist auch möglich, dass weitere Synapsen, die mit anderen α -Untereinheiten bestückt sind, unter den Versuchsbedingungen (zum Beispiel: helladaptierte Netzhaut) nicht aktiv waren.

Ein weiterer Hinweis für $\alpha 3\beta$ Synapsen auf AII-Amakrinzellen sind die Antikörperfärbungen der $\alpha 3$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors und des Proteins Parvalbumin in der Rattennetzhaut. Parvalbumin färbt AII-Amakrinzellen in der Rattennetzhaut (Wässle et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit (Abb. 3.8) konnten deutliche Kolokalisationen der Parvalbuminfärbung und der punktförmigen Färbung der $\alpha 3$ -Untereinheit in der äußeren IPL festgestellt werden. Diese punktartigen Färbungen werden als postsynaptische Aggregate von $\alpha 3\beta$ Synapsen interpretiert (Haverkamp et al., 2003, 2004; Heinze et al., 2007). Da es zu Überlappungen in den Färbungen kommt, spricht dies für glyzinerge Synapsen auf AII-Amakrinzellen, die die

$\alpha 3$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors enthalten. In der inneren IPL konnten solche Kolokalisationen nicht festgestellt werden, da in dieser Region die Färbung der Dendriten zu verwischt ist und nicht deutlich abgegrenzt werden kann. Aus demselben Grund wurden diese Versuche nicht bei der Maus durchgeführt. Es gibt zwar die Möglichkeit AII-Amakrinzellen in der Netzhaut der Maus mit Antikörpern gegen „disabled“ zu färben, die Dendriten der Zellen sind aber nur schwer zu erkennen (Lee et al., 2004).

Eine vor kurzem veröffentlichte Arbeit über glyzinerge sIPSCs von AII-Amakrinzellen der Ratte zeigte, dass die Zeitkonstanten der gemessenen sIPSCs schneller als in anderen bereits untersuchten Amakrinzellen waren (vgl. Gill et al., 2007 und Frech et al., 2001; Veruki et al., 2007). Die Zeitkonstanten waren aber auch schneller als die hier bei AII-Amakrinzellen der Maus gemessenen sIPSCs. Das gemittelte IPSC der AII-Amakrinzellen bei der Ratte wurde mit einer biexponentiellen Funktion angepasst und hatte eine schnelle Zeitkonstante von $\tau_{\text{schnell}} = 4,8$ ms, die einen Anteil von 97 % der Amplitude ausmachte, und eine langsamere Zeitkonstante $\tau_{\text{langsam}} = 33$ ms (Gill et al., 2007). Aufgrund dieser schnellen Kinetik haben Gill und Mitarbeiter gefolgert, dass es sich um $\alpha 1\beta$ Glyzinrezeptoren und um homomere $\alpha 1$ Rezeptoren handelt.

In der vorliegenden Arbeit konnten bei AII-Amakrinzellen der Maus keine glyzinergen sIPSCs abgeleitet werden, die vergleichbare Zeitkonstanten hatten. Weiterhin gab es keinen Unterschied zwischen der WT-Maus und der *Glr1^{spd-ot}*-Maus, was die $\alpha 1$ -Untereinheit als Ursache für die sIPSCs mit einer Zeitkonstante von $\tau = 11$ ms ausschließt.

Der scheinbar einzige Unterschied in der Durchführung der Experimente war, dass Gill et al. (2007) der extrazellulären Lösung während der Ableitung einen Antagonisten von ionotropen Glutamatrezeptoren der AMPA/Kainat Familie (CNQX) zusetzten. Dies könnte dazu geführt haben, dass eine zur abgeleiteten AII-Amakrinzelle präsynaptische glyzinerge Amakrinzelle in den Ableitungen der Maus aktiv war, in den Ableitungen der Ratte jedoch durch den Antagonisten inaktiviert wurde. Ebenso ist ein umgekehrtes Szenario vorstellbar, nämlich dass eine glyzinerge Amakrinzelle, die für die schnellen sIPSCs verantwortlich ist, durch die Applikation von CNQX disinhibiert wurde. CNQX wurde grundsätzlich nicht in den vorliegenden Mausexperimenten verwendet, da durch dessen Applikation alle ionotropen Glutamatrezeptoren blockiert und somit die synaptische Aktivität im Netzhautschnitt stark verringert wurde. In einem Kontrollversuch wurde eine AII-Amakrinzelle unter Zugabe von NBQX und TTX abgeleitet. Die glyzinergen sIPSCs dieser Zelle zeigten keinen Unterschied in der Verteilung der Zeitkonstanten (nicht gezeigt).

Ferner wurde in den vorliegenden Experimenten an der Maus ein Antagonist für GABA_C-Rezeptoren (TPMPA) verwendet, die in Bipolarzellen exprimiert sind (Euler & Wässle, 1998). Dies könnte zu einer Depolarisation der Bipolarzellen und somit zur erhöhten Ausschüttung von Glutamat auf eine Amakrinzelle geführt haben, die ihrerseits Glyzin auf eine AII-Amakrinzelle ausschüttet.

Es verbleibt die Möglichkeit, dass es Unterschiede zwischen AII-Amakrinzellen der Ratte und der Maus gibt.

f.) Vergleich der Amplituden von glyzineren sIPSCs bei AII- und NF-Amakrinzellen

Die glyzineren sIPSCs von NF- und AII-Amakrinzellen unterscheiden sich neben der Zeitkonstante auch in der Amplitude. Es ist möglich, dass die Unterschiede in den Kinetiken der sIPSCs nicht nur durch die Rezeptor-Untereinheiten an der Postsynapse bedingt sind, sondern dass auch unterschiedliche präsynaptische Mechanismen eine Rolle spielen. So ist denkbar, dass durch die Freisetzung mehrerer Vesikel, die nicht synchron mit der Zellmembran verschmelzen, sowohl die Amplitude als auch die Kinetik beeinflusst werden. Betrachtet man die Amplituden-Histogramme von NF- und AII-Amakrinzellen, so zeigt sich eine schiefe unimodale Verteilung, die zu größeren Amplituden verzerrt ist. Eine solche Verteilung ist ein Hinweis darauf, dass multivesikuläre Freisetzung vorkommt (Llano et al. 2000). Die mittlere Amplitude und die mittlere Zeitkonstante der sIPSCs von NF-Amakrinzellen sind größer als die entsprechenden Werte der AII-Amakrinzellen. Dies könnte also tatsächlich bedeuten, dass präsynaptische Mechanismen die Ursachen für die entsprechenden Unterschiede sind. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, denn bei den Knock-out-Mäusen ändern sich die Amplituden der sIPSCs weder bei den AII- noch bei den NF-Zellen. Trotzdem sind die Kinetiken stark verändert, und dies spricht für molekulare Veränderungen an der Postsynapse.

Ob die Amplituden überhaupt einen Einfluss auf die Zeitkonstante von IPSCs haben, ist bisher umstritten. Beispielsweise wurde von Gleason et al. (1993) berichtet, dass mit der Erhöhung der Amplituden auch die Zeitkonstanten von GABAergen IPSCs bei Amakrinzellen der Hühnchennetzhaut anstiegen. Dagegen unterschieden sich die Zeitkonstanten von glyzineren IPSCs, die im Hirnstamm abgeleitet wurden, und deren Amplituden stark variierten, nicht. Bei diesen Zellen wurden sowohl spontane als auch evozierte glyzinerge IPSCs gemessen und obwohl die Amplituden der evozierten IPSCs 3mal so groß waren wie

spontan auftretende Ereignisse, waren die Zeitkonstanten unverändert (Singer et al., 1998). Ebenso konnten von Legendre & Korn (1994) bei Mauthner-Zellen des Zebrafischs glyzinerge IPSCs mit variierenden Amplituden beobachtet werden. Auch hier hatten die Amplituden keinen Einfluss auf die Zeitkonstante.

Unabhängig davon, ob bei NF- und/oder AII-Amakrinzellen multivesikuläre Freisetzung stattfindet, oder ob andere Parameter für die variierenden Amplituden verantwortlich sind, wie z.B. Differenzen in den Größen der Synapsen (Anzahl der Kanäle in der Synapse) (Bekkers, 1994; Singer & Berger, 1999), ist für die Interpretation der Zeitkonstanten unerheblich, da weder bei NF- noch bei AII-Amakrinzellen eine Korrelation zwischen Amplituden und τ -Werten gefunden wurde.

Einige Amakrinzelltypen können Aktionspotentiale generieren (Boos et al., 1993; Feigenspan et al., 1998; Völgyi et al., 2001), andere Amakrinzellen signalisieren nur durch gradierte elektrische Potentiale. Unter den glyzineren Amakrinzellen sind nur bei AII-Zellen Aktionspotentiale beobachtet worden (Boos et al., 1993). Bei eigenen Ableitungen von Kleinfeld-Amakrinzellen (s. Abb. 3.14), die in der Ratte als glyzinerg charakterisiert wurden (Menger et al., 1998), konnten außer bei AII-Zellen (s. Abb. 3.6) keine Aktionsströme gemessen werden. Nichtsdestotrotz ist es möglich, dass z.B. AII-Zellen von Amakrinzellen innerviert werden, die Aktionspotentiale feuern, während dies bei NF-Zellen nicht der Fall ist. Deshalb wurde die Wirkung von TTX auf die Zeitkonstanten der sIPSCs bei NF- und AII-Amakrinzellen überprüft. Bei keinem der beiden Zelltypen hatte die TTX Applikation einen Einfluss auf die Zeitkonstante der sIPSCs. Dies bedeutet, dass der glyzinerge Eingang von NF- und AII-Amakrinzellen unabhängig von Aktionspotentialen abläuft.

4.3 Funktionelle Bedeutung der unterschiedlichen Glyzinrezeptoren

Die Ergebnisse zeigen, dass sich AII- und NF-Zellen in der molekularen Ausstattung der glyzineren Synapsen unterscheiden. NF-Amakrinzellen haben langsamere Zeitkonstanten als AII-Amakrinzellen an den Synapsen, die sie von glyzineren Amakrinzellen erhalten, und sind infolgedessen *in vivo* auch stärker bzw. für längere Zeit hyperpolarisiert.

Die Rolle von Glyzin bei der Verarbeitung des Lichtsignals ist noch weitgehend unbekannt. Die Morphologie der glyzineren Amakrinzellen und Versuche an der Netzhaut der Katze legen jedoch nahe, dass Glyzin bei der gegenseitigen Hemmung der OFF- und ON-Kanäle eine Rolle spielt (Wässle et al., 1986; O'Brien et al., 2003). NF-Amakrinzellen haben ein

Dendritenfeld, das annähernd alle Schichten der IPL durchzieht und könnten eine Rolle bei dieser Interaktion spielen. Es ist allerdings weder bekannt, welche Zelltypen die präsynaptischen Partner, noch, welche Typen die postsynaptischen Partner von NF-Amakrinzellen sind. NF-Amakrinzellen sind modulatorische Interneurone. Sie verändern und formen das Lichtsignal. Dafür ist keine hohe zeitliche Auflösung nötig.

AII-Amakrinzellen dagegen sind Teil des Stäbchen-Pfades und damit Teil des vertikalen Pfades. Sie übertragen das Signal der Stäbchenbipolarzellen in den Zapfen-Pfad, indem sie in der Sublamina a glyzinerge Synapsen mit OFF-Zapfenbipolarzellen und OFF-Ganglienzellen und in Sublamina b elektrische Synapsen mit ON-Zapfenbipolarzellen machen (Kolb & Famiglietti, 1974; Famiglietti & Kolb, 1975; Strettoi et al., 1992). Betrachtet man die glyzinergen Synapsen im Stäbchenpfad, so zeigt sich, dass Stäbchenbipolarzellen, OFF-Zapfenbipolarzellen und A-Typ Ganglienzellen sIPSCs mit schnellen Zeitkonstanten haben und die $\alpha 1$ -Untereinheit in diesen Synapsen exprimieren (Ivanova et al., 2006; Majumdar et al., 2007). AII-Amakrinzellen sind ebenfalls mit „schnellen“ Rezeptoren ausgestattet und Teil dieses vertikalen Pfades des Lichtsignals, für den anscheinend eine hohe zeitliche Auflösung der weitergeleiteten Information nötig ist. Es fällt auf, dass die AII-Amakrinzelle mit der $\alpha 3$ -Untereinheit eine andere und etwas langsamere Untereinheit des Glyzinrezeptors exprimiert als Bipolarzellen und Ganglienzellen. Es ist möglich, dass Amakrinzellen die $\alpha 1$ -Untereinheit grundsätzlich nicht exprimieren, denn in den vorliegenden Versuchen wurden bei keiner Zelle ganz schnelle sIPSCs abgeleitet. Weiterhin wurden keine Unterschiede gefunden zwischen sIPSCs bei WT- und *Gral1*^{-/-}-Mäusen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die langsamere $\alpha 3$ -Untereinheit eine Anpassung an den Stäbchenpfad ist, der im Vergleich zum Zapfenpfad langsamere Übertragungseigenschaften besitzt (Baylor & Hodgkin, 1973; Pasino & Marchiafava, 1976; Rabl et al., 2005).

4.4 Weitere Amakrinzelltypen und deren Glyzinrezeptoren

In der vorliegenden Arbeit wurden auch weitere Amakrinzellen wie z.B. A17- und cholinerge Amakrinzellen untersucht. Dabei zeigte sich eine große Variabilität in der Glyzinrezeptor-Physiologie. Die anatomisch und physiologisch (Pourcho & Goebel, 1983; Nelson & Kolb, 1985; Dacheux & Raviola, 1986; Menger & Wässle, 2000; Famiglietti, 1983; Tauchi & Masland, 1984) bereits untersuchten A17-Amakrinzellen und cholinerge Amakrinzellen reagierten beide auf die Applikation von Glyzin mit deutlichen Stromantworten. Jedoch

konnten in keiner der beiden Zelltypen glyzinerge sIPSCs gemessen werden, während ebenfalls in beiden Zelltypen die Frequenz GABAerger sIPSCs sehr hoch war. Auf cholinergen Amakrinzellen wurde kürzlich die $\alpha 4$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors beschrieben. Die Färbung war punktförmig und Heinze und Mitarbeiter (2007) vermuteten, dass cholinerge Amakrinzellen glyzinerge Eingänge über $\alpha 4\beta$ Glyzinrezeptoren erhalten. Es konnten in der vorliegenden Arbeit keine sIPSCs von solchen Synapsen gemessen werden. Dabei ist es möglich, dass die Bedingungen, unter denen die Experimente durchgeführt wurden, eine Aktivierung der Synapsen verhinderten. So ist beispielsweise denkbar, dass die Lichtbedingungen (helladaptiert) die falschen Voraussetzungen dafür waren oder dass nur ein bewegter Lichtreiz die Synapsen auf den cholinergen Amakrinzellen aktiviert (Masland et al., 1984; Famiglietti, 1992; Yoshida et al., 2001; Euler et al., 2002; Gavrikov et al., 2003).

Bei anderen Amakrinzellen konnten glyzinerge sIPSCs gemessen werden. So haben Kleinfeld-Amakrinzellen, deren Dendriten ausschließlich in der äußeren IPL (Sublamina a) stratifizieren, sIPSCs mit mittleren Zeitkonstanten, die mit denen von AII-Amakrinzellen vergleichbar sind. Dies spricht für die Beteiligung der $\alpha 3$ -Untereinheit in den Synapsen dieser Zellen. Antikörperfärbungen gegen die $\alpha 3$ -Untereinheit haben gezeigt, dass die gefärbten „hot spots“ in der IPL in vier Banden verteilt sind und dass die Färbung in der äußeren IPL am stärksten ist und dort somit besonders viele Synapsen vorhanden sind (Haverkamp et al., 2003). Diese Verteilung passt sowohl zu den anatomischen Daten von AII-Amakrinzellen in der Ratte und den physiologischen Daten von AII-Amakrinzelle der Maus als auch zu der Verteilung der Zeitkonstanten bei OFF-Kleinfeld-Amakrinzellen. Allerdings konnte diese Zellklasse nur sporadisch abgeleitet werden, weshalb vergleichbare Daten in den Glyzinrezeptor-defizienten Mäusen fehlen.

Eine MF-Amakrinzelle, die eine vergleichbare Morphologie wie die „diffuse multistratified“-Amakrinzelle des Kaninchens hat, ist ein weiterer Zelltyp, dessen glyzinerge sIPSCs eine Verteilung der Zeitkonstanten hat, die auf die $\alpha 3$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors schließen lässt. Dabei ist weder die Funktion der OFF-Kleinfeld-Amakrinzellen noch dieser MF-Amakrinzelle bekannt.

Die in Abbildung 3.15D gezeigte Zelle, deren Dendriten erst in die innere IPL reichen und von dort wieder zurück in Sublamina a führen, hat Ähnlichkeit mit zwei Zelltypen, die bereits im Kaninchen beschrieben sind und als „fountain“- bzw. „recurving-diffuse“-Amakrinzelle bezeichnet wurden (MacNeil & Masland, 1998). Bei der in Abbildung 3.15G gezeigten Zelle könnte es sich um eine ebenfalls im Kaninchen beschriebene Zelle handeln, die als WF1-3 benannt wurde (MacNeil et al., 1999). Diese beiden Zelltypen haben langsamere

Zeitkonstanten. Dabei ist die Verteilung bei der „fountain“-Amakrinzelle weit gestreut und es treten Zeitkonstanten zwischen 10 und 30 ms auf, die der $\alpha 2$ -Untereinheit zugeschrieben werden können, sowie Zeitkonstanten zwischen 30 und 100 ms, die auf eine Expression der $\alpha 4$ -Untereinheit hinweisen. Die WF1-3-Amakrinzelle spiegelt dagegen das typische Bild von NF-Amakrinzellen wieder, bei denen $\alpha 2\beta$ -Kanäle in den Synapsen dominieren.

Die Amakrinzelle aus Abbildung 3.15H, die ausschließlich in der Sublamina a stratifiziert, wurde von Badea & Nathans (2004) als Cluster 1 oder Cluster 4 der MF-Amakrinzellen klassifiziert.

Bei der *Glr1^{spd-ot}*-Maus wurden sIPSCs von WF-Amakrinzellen gemessen, deren Dendriten ausschließlich in einer Schicht der IPL stratifizieren. Die Zeitkonstanten der glyzinergen sIPSCs dieser Zellen sind vergleichsweise langsam ($\tau = 48$ ms), deshalb ist es unwahrscheinlich, dass bei diesem Zelltyp im WT die $\alpha 1$ -Untereinheit eine Rolle spielt. Man kann also davon ausgehen, dass diese Zellen auch in WT-Mäusen ähnliche Zeitkonstanten haben. In der Rattenetzhaut wurden kürzlich Amakrinzellen mit vergleichbarem Stratifizierungsmuster (monostratifizierend) untersucht (Veruki et al., 2007), und es wurde eine mittlere Zeitkonstante von 25 ms gemessen. Allerdings scheint die Verteilung zwischen den 8 von Veruki und Mitarbeitern untersuchten Zellen zu variieren, denn die in der Arbeit abgebildete und beschriebene Zelle hatte Zeitkonstanten zwischen 10 und 139 ms mit einem Mittelwert von 42 ms (Veruki et al., 2007). Dies ist vergleichbar mit den in *Glr1^{spd-ot}* abgeleiteten sIPSCs von monostratifizierenden WF-Zellen in der Mausetzhaut. Auch bei diesen Zellen stellt sich die Frage nach der Ausstattung der Glyzinrezeptor-Untereinheiten, wobei die $\alpha 2$ -Untereinheit eine Rolle spielen könnte, jedoch ist die Expression einer weiteren α -Untereinheit wahrscheinlich, die langsamere Zeitkonstanten als die $\alpha 2$ -Untereinheit bedingt. Dies ist nach der derzeitigen Hypothese die $\alpha 4$ -Untereinheit bzw. eine Kombination von zwei Untereinheiten, die in einer Synapse gemeinsam vorhanden sind, wobei die $\alpha 2$ -Untereinheit und die $\alpha 4$ -Untereinheit die wahrscheinlichen Kandidaten für solche Synapsen sind. Allerdings kann diese Hypothese nur für Glyzinrezeptoren in der Mausetzhaut postuliert werden, da in der Ratte bisher keine GlyR- $\alpha 4$ -Untereinheit gefunden wurde und dort somit eine andere Situation herrscht als bei der Maus.

Die GAD67-GFP Mauslinie exprimiert das grün fluoreszierende Protein in GABAergen Amakrinzellen. Dieser Umstand wurde genutzt, um WF-Amakrinzellen, deren Zellkörper in der Ganglienschicht liegen (ektopische Amakrinzellen) im Netzhautganzpräparat

auszuwählen und glyzinerge sIPSCs bei diesen Zellen abzuleiten. Dabei konnten neben cholinergen Amakrinzellen weitere WF-Amakrinzelltypen identifiziert werden.

Diese Zellen hatten beispielsweise Ähnlichkeit mit Zelltypen, die im Kaninchen schon je nach ihrer Stratifizierung mit WF1-WF4 bezeichnet wurden (Abbildung 3.17A&D) und Varianten dieses Zelltyps sein könnten (MacNeil et al., 1999). Die Stratifizierung der Zellen wurde nicht untersucht.

Diese Zellen bekamen zum Teil massiven glyzineren Eingang verschiedenster Qualität. So wurden Zelltypen mit glyzineren sIPSCs, deren mittlere Zeitkonstante bei $\tau = 8$ ms lag, ebenso abgeleitet wie Zellen mit Zeitkonstanten von über 100 ms. Solche langsamen Zeitkonstanten konnten nicht einmal bei sIPSCs von NF-Amakrinzellen der *Gla2^{-/-}*-Maus gemessen werden. Da WF-Amakrinzellen weitaus größere und verzweigtere Dendritenfelder als Kleinfeld-Amakrinzellen aufweisen, ist es möglich, dass die Dendriten als Filter wirken und den Zeitverlauf der IPSCs verändern könnten. Jedoch würde sich dabei sowohl Aktivierungszeit als auch Deaktivierungszeit verlangsamen. In diesem Fall sollte es zu einer Korrelation dieser beiden Parameter kommen. Eine solche Korrelation konnte aber weder bei Kleinfeld-Amakrinzellen noch bei WF-Amakrinzellen festgestellt werden. Ebenso verhält es sich mit dem Vergleich der Aktivierungszeit und der Amplitude. Dies lässt darauf schließen, dass dendritische Filterung für die Zeitkonstanten der glyzineren IPSCs eine untergeordnete Rolle spielt. Daraus folgt, dass die Kinetik der IPSCs weitgehend durch die molekularen Eigenschaften der in der jeweiligen Synapse exprimierten Rezeptoren bestimmt wird.

Die Zusammenfassung aller 25 WF-Amakrinzellen, an denen glyzinerge sIPSCs gemessen werden konnten, zeigte, dass Zeitkonstanten von 5 ms bis zu 200 ms streuen. Dies ist weit mehr als bei anderen abgeleiteten Amakrinzellen gefunden wurde. Die Abbildung der kumulierten Häufigkeiten von WF-Amakrinzellen und NF-Amakrinzellen der WT- und der *Gla2^{-/-}*-Maus unterstreicht dies: sie sind signifikant voneinander verschieden. Es scheinen also bei WF-Amakrinzellen glyzinerge sIPSCs vorzukommen, die langsamer sind als die für $\alpha 2\beta$ Synapsen beschrieben sind.

Amakrinzellen sind inhibitorische Interneurone, die das Lichtsignal verändern und formen. Sie kontaktieren nicht nur Bipolarzellen und Ganglienzellen, sondern es bestehen auch Amakrin-Amakrinzellverbindungen. GABAerge Amakrinzellen sind an der räumlichen Signalverarbeitung beteiligt. Die Rolle von Glyzin dürfte mehr darin liegen, dass die zeitlichen Übertragungseigenschaften der Netzhaut durch glyzinerge Amakrinzellen moduliert

werden. Dazu exprimieren verschiedene Amakrinzellen unterschiedliche Glyzinrezeptor- α -Untereinheiten in den Synapsen und dies führt dazu, dass die Kinetik dieser Synapsen variiert. Dabei wird ein Spektrum von Zeitkonstanten zwischen 8 und 200 ms mit Amplituden von 10 bis zu einigen hundert pA abgedeckt, was dafür spricht, dass die jeweilige Funktion des Amakrinzelltyps ein bestimmtes Zeitfenster für die Inhibition benötigt. Hieran sind die Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ des Glyzinrezeptors beteiligt, wohingegen die $\alpha 1$ -Untereinheit in Bipolarzellen und Ganglienzellen (Ivanova et al., 2006; Majumdar et al., 2007) eine Rolle spielt. Die Kinetiken der exprimierten Untereinheiten könnten zumindest teilweise neben der Funktion auch mit der Morphologie der Amakrinzellen (und damit wiederum einhergehend mit der Funktion) zusammenhängen, denn Amakrinzellen mit vergleichsweise kleinen Dendritenbäumen, wie AII- und NF-Amakrinzellen, hatten, zumindest teilweise, relativ schnellere Kinetiken in ihrer Glyzinrezeptor-Physiologie als WF-Amakrinzellen. Es ist möglich, dass das größere Dendritenfeld von WF-Amakrinzellen und die damit verbundene weitere räumliche Integration des Lichtsignals eine langsamere glyzinerge Inhibition benötigt. Ob eine zeitliche Staffelung der Inhibition auch für GABA-Rezeptoren vorliegt, ist wahrscheinlich. So sind GABA_A-Rezeptoren schnell, aber unempfindlich im Gegensatz zu GABA_C-Rezeptoren, die langsam sind, aber eine hohe GABA-Empfindlichkeit aufweisen. Um das Verständnis der Rolle von Glyzin in Amakrinzellen weiter voran zu treiben, ist zum einen erforderlich, eine Maus mit fehlender $\alpha 4$ -Untereinheit herzustellen sowie Doppel- und Dreifach-Knock-out-Mäuse zu untersuchen. Andererseits ist es nötig, weitere transgene Mäuse herzustellen, bei denen in bestimmten Amakrinzelltypen GFP exprimiert wird, sodass diese Zellen markiert sind und sich leicht für Ableitungen identifizieren lassen. Von diesen Zellen lassen sich dann bei Wildtyp-Mäusen und Mutanten die Lichtantworten der unterschiedlichen Zellen messen und untersuchen, wie diese Lichtantworten durch die glyzinerge Hemmung beeinflusst werden. Weiterhin müssen die prä- und postsynaptischen Partner der Amakrinzellen und deren Rolle in der Signalverarbeitung untersucht werden.

V. Zusammenfassung:

Amakrinzellen sind hemmende Interneurone der Netzhaut. Sie exprimieren erregende, ionotrope Glutamat-Rezeptoren und hemmende Glyzin- bzw. GABA-Rezeptoren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Glyzinrezeptoren von Amakrinzellen mit Hilfe der „Patch Clamp“ Technik in Wildtyp- und Glyzin-Rezeptor Knock-out-Mäusen (*Glr1^{spd-ot}*, *Glr2^{-/-}*, *Glr3^{-/-}*) untersucht. In Schnitten und Ganzpräparaten von akut isolierten Netzhäuten wurden Glyzin-induzierte und spontane inhibitorische postsynaptische Ströme (sIPSCs) gemessen. Die Untersuchungen beschränkten sich auf eine Gruppe von Amakrinzellen, die sich durch ein relativ kleines Dendritenfeld auszeichnen, das alle Schichten der IPL durchzieht. Dabei wurden die Ströme von zwei Typen von Amakrinzellen, den AII-Zellen und den NF-Zellen, miteinander verglichen.

Alle untersuchten Amakrinzellen reagierten mit einem Stromfluss über die Membran, wenn Glyzin appliziert wurde. Bei AII-Zellen war die Amplitude des Stromes bei der *Glr3^{-/-}*-Maus um etwa 50 % reduziert, während bei den anderen Mauslinien kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt wurde. Bei NF-Zellen wurde nur ein geringer Unterschied der Stromamplituden zwischen Wildtyp und Mutanten gefunden. Er war am deutlichsten bei der *Glr2^{-/-}*-Maus.

Picrotoxinin ist ein effektiver Antagonist von homomeren Glyzinrezeptoren, während heteromere Glyzinrezeptoren relativ unempfindlich sind. Die Wirkung von Picrotoxinin war bei allen untersuchten Zellen ähnlich und reduzierte die Glyzinantwort um etwa 25 - 30 %. Dieser Effekt war unabhängig von der Mauslinie. Amakrinzellen exprimieren also zum Großteil heteromere Rezeptoren

Zur Untersuchung der synaptischen Glyzinrezeptoren der Amakrinzellen wurden die spontanen inhibitorischen postsynaptischen Ströme dieser Zellen gemessen und deren Amplituden und Kinetiken bestimmt. Dabei unterschieden sich die Zeitkonstanten der Deaktivierungs/Desensitivierungskinetik (τ_w) von AII- und NF-Zellen, wohingegen die Aktivierungszeit nicht voneinander abwich. Spontane IPSCs, die von AII-Amakrinzellen abgeleitet wurden, hatten eine mittlere Zeitkonstante von $\tau = 11$ ms und streuten zwischen 5 und 30 ms. Die Zeitkonstanten der sIPSCs von NF-Amakrinzellen lagen zwischen 10 und 50 ms und wiesen eine mittlere Zeitkonstante von $\tau_w = 27$ ms auf.

Die unterschiedlichen Zeitkonstanten spiegeln die Zusammensetzung der α -Untereinheiten des Glyzinrezeptors wider. AII-Zellen in der *Gla1*^{-/-}- und in der *Gla2*^{-/-}-Maus hatten vergleichbare Zeitkonstanten wie die AII-Zellen im Wildtyp. Bei der *Gla3*^{-/-}-Maus konnten bei 50 untersuchten AII-Amakrinzellen keine sIPSCs gemessen werden. Dies und die Ergebnisse der Glyzin-induzierten Ströme von AII-Zellen lassen darauf schließen, dass die glyzinergeren Synapsen dieser Zellen bevorzugt die $\alpha 3$ -Untereinheit enthalten.

Bei NF-Amakrinzellen konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp-, *Gla1*^{spd-ot}- und *Gla3*^{-/-}-Mäusen festgestellt werden. Dagegen zeigten die sIPSCs der NF-Amakrinzellen der *Gla2*^{-/-}-Maus signifikant längere Zeitkonstanten. Der Mittelwert verlängerte sich von 27 ms auf 69 ms und es war eine breitere Streuung mit Zeitkonstanten zwischen 15 und 200 ms zu sehen. Die glyzinergeren Synapsen der NF-Zellen enthalten vor allem die $\alpha 2$ -Untereinheit des Glyzinrezeptors.

Die Zeitkonstanten der sIPSCs sind unabhängig von der Verteilung ihrer jeweiligen Amplituden, und zwischen Wildtyp- und KO-Mäusen wurden keine Unterschiede in den Amplituden der sIPSCs beobachtet.

Während der Untersuchungen wurden sporadisch noch weitere Amakrinzellen, vor allem „widefield“- (WF) Zellen abgeleitet. Die Verteilungen der Zeitkonstanten der sIPSCs dieser Zellen streuten zwischen 8 und über 100 ms. Dabei wurden Zeitkonstanten gemessen, die noch langsamer waren als die von NF-Amakrinzellen und bei einigen WF-Zellen wurden mittlere Zeitkonstanten von mehr als 50 ms beobachtet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass unterschiedliche Klassen von Amakrinzellen verschiedene α -Untereinheiten des Glyzinrezeptors in den Synapsen exprimieren. Dies hat Auswirkung auf die Kinetik der glyzinergeren Hemmung bei diesen Zellen und lässt darauf schließen, dass sie bei der zeitlichen Modulation der Lichtsignale unterschiedliche Aufgaben haben.

VI. Literatur

- Akagi H, Miledi R.** Heterogeneity of glycine receptors and their messenger RNAs in rat brain and spinal cord. *Science*. 242(4876):270-3 (1988).
- Badea TC, Nathans J.** Quantitative analysis of neuronal morphologies in the mouse retina visualized by using a genetically directed reporter. *J Comp Neurol*. 2004 Dec 20;480(4):331-51.
- Barry PH.** JPCalc, a software package for calculating liquid junction potential corrections in patch-clamp, intracellular, epithelial and bilayer measurements and for correcting junction potential measurements. *J Neurosci Methods*. 1994 Jan;51(1):107-16.
- Baylor DA, Hodgkin AL.** Detection and resolution of visual stimuli by turtle photoreceptors. *J Physiol*. 1973 Oct;234(1):163-98.
- Becker CM, Hoch W, Betz H.** Glycine receptor heterogeneity in rat spinal cord during postnatal development. *EMBO J*. 7(12):3717-26. (1988).
- Bekkers JM.** Quantal analysis of synaptic transmission in the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol*. 1994 Jun;4(3):360-5.
- Betz, H., Laube, B.** Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J. Neurochem*. 97, 1600-1610 (2006).
- Bloomfield SA.** Plasticity of AII amacrine cell circuitry in the mammalian retina. *Prog Brain Res*. 131, 185-200 (2001).
- Bloomfield SA, Dacheux RF.** Rod vision: pathways and processing in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res*. 20(3), 351-84. (2001)
- Boos R, Schneider H, Wassle H.** Voltage- and transmitter-gated currents of all-amacrine cells in a slice preparation of the rat retina. *J Neurosci*. 13(7), 2874-88 (1993).
- Bormann J, Rundström N, Betz H, Langosch D.** Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *EMBO J*. 1993 Oct;12(10):3729-37.
- Breitinger HG, Villmann C, Rennert J, Ballhausen D, Becker CM.** Hydroxylated residues influence desensitization behaviour of recombinant alpha3 glycine receptor channels. *J Neurochem*. 2002 Oct;83(1):30-6.
- Breustedt J, Schmitz D, Heinemann U, Schmieden V.** Characterization of the inhibitory glycine receptor on entorhinal cortex neurons. *Eur J Neurosci*. 2004 Apr;19(7):1987-91.
- Buckwalter, M.S., Cook, S.A., Davisson, M.T., White, W.F., Camper, S.A.** A frameshift mutation in the mouse alpha 1 glycine receptor gene (Gla1) results in progressive neurological symptoms and juvenile death. *Hum. Mol. Genet*. 3, 2025-2030 (1994).

- Camp AJ, Callister RJ, Brichta AM.** Inhibitory synaptic transmission differs in mouse type A and B medial vestibular nucleus neurons in vitro. *J Neurophysiol.* 2006 May;95(5):3208-18. Epub 2006 Jan 11.
- Chattipakorn SC, McMahon LL.** Pharmacological characterization of glycine-gated chloride currents recorded in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol.* 87(3), 1515-25 (2002).
- Chéry N, de Koninck Y.** Junctional versus extrajunctional glycine and GABA(A) receptor-mediated IPSCs in identified lamina I neurons of the adult rat spinal cord. *J Neurosci.* 1999 Sep 1;19(17):7342-55.
- Cui, J.J., Ma, Y.P. Lipton, S.A., Pan, Z.H.** Glycine receptors and glycinergic synaptic input at the axon terminals of mammalian retinal rod bipolar cells. *J. Physiol. (Lond)* 553, 895-909 (2003).
- Dacheux RF, Raviola E.** The rod pathway in the rabbit retina: a depolarizing bipolar and amacrine cell. *J Neurosci.* 1986 Feb;6(2):331-45.
- Dowling, J.E. & Boycott, B.B.** Organisation of the primate retina: electron microscopy. *Proc.R.Soc.Lond.(Biol.)* 166, 80-111 (1966).
- Dumitrescu ON, Protti DA, Majumdar S, Zeilhofer HU, Wässle H.** Ionotropic glutamate receptors of amacrine cells of the mouse retina. *Vis Neurosci.* 2006 Jan-Feb;23(1):79-90.
- Euler T, Detwiler PB, Denk W.** Directionally selective calcium signals in dendrites of starburst amacrine cells. *Nature.* 2002 Aug 22;418(6900):845-52. Epub 2002 Aug 4.
- Euler T, Masland RH.** Light-evoked responses of bipolar cells in a mammalian retina. *J Neurophysiol.* 2000 Apr;83(4):1817-29.
- Euler T, Schneider H, Wässle H.** Glutamate responses of bipolar cells in a slice preparation of the rat retina. *J Neurosci.* 1996 May 1;16(9):2934-44.
- Famiglietti EV.** 'Starburst' amacrine cells and cholinergic neurons: mirror-symmetric on and off amacrine cells of rabbit retina. *Brain Res.* 1983 Feb 14;261(1):138-44.
- Famiglietti EV.** Dendritic co-stratification of ON and ON-OFF directionally selective ganglion cells with starburst amacrine cells in rabbit retina. *J Comp Neurol.* 1992 Oct 15;324(3):322-35.
- Famiglietti EV Jr, Kolb H.** A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Res.* 84(2):293-300 (1975).
- Famiglietti EV, Tumosa N.** Immunocytochemical staining of cholinergic amacrine cells in rabbit retina. *Brain Res.* 1987 Jun 16;413(2):398-403.
- Feigenspan, A., Gustincich, S., Bean, B.P., Raviola, E.** Spontaneous activity of solitary dopaminergic cells of the retina. *J. Neurosci.* 18, 6776-6789 (1998).
- Frech MJ, Backus KH.** Characterization of inhibitory postsynaptic currents in rod bipolar cells of the mouse retina. *Vis Neurosci.* 2004 Jul-Aug;21(4):645-52.

- Frech MJ, Pérez-León J, Wässle H, Backus KH.** Characterization of the spontaneous synaptic activity of amacrine cells in the mouse retina. *J Neurophysiol.* 86(4):1632-43 (2001).
- Gavrikov KE, Dmitriev AV, Keyser KT, Mangel SC.** Cation--chloride cotransporters mediate neural computation in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 23;100(26):16047-52. Epub 2003 Dec 9.
- Ghavanini AA, Mathers DA, Kim HS, Puil E.** Distinctive glycinergic currents with fast and slow kinetics in thalamus. *J Neurophysiol.* 2006 Jun;95(6):3438-48. Epub 2006 Mar 22.
- Gill, S.B., Veruki, M.L., Harveit, E.** Functional properties of spontaneous IPSCs and glycine receptors in rod amacrine (AII) cells in the rat retina. *J. Physiol. (Lond)* 575, 739-759 (2006).
- Gleason, E., Borges, S., Wilson, M.** Synaptic transmission between pairs of retinal amacrine cells in culture. *J. Neurosci.* 13, 2359-2370 (1993).
- Greferath U, Brandstatter JH, Wässle H, Kirsch J, Kuhse J, Grünert U.** Differential expression of glycine receptor subunits in the retina of the rat: a study using immunohistochemistry and in situ hybridization. *Vis Neurosci.* 11(4):721-9 (1994).
- Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, Laube B.** The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron.* 45(5):727-39 (2005)
- Grünert U, Wässle H.** Immunocytochemical localization of glycine receptors in the mammalian retina. *J Comp Neurol.* 1993 Sep 22;335(4):523-37.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ.** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391(2), 85-100 (1981).
- Harvey, R.J., Depner, U.B., Wässle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T.G., Harvey, K., Schütz, B., Abo-Salem, O.M., Zimmer, A., Poisbeau, P., Welzl, H., Wolfer, D.P., Betz, H., Zeilhofer, H.U., Müller, U.** GlyR alpha 3: an essential target for spinal PGE(2)-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304, 884-887 (2004).
- Harvey RJ, Schmieden V, Von Holst A, Laube B, Rohrer H, Betz H.** Glycine receptors containing the alpha4 subunit in the embryonic sympathetic nervous system, spinal cord and male genital ridge. *Eur J Neurosci.* 2000 Mar;12(3):994-1001.
- Haverkamp S, Müller U, Harvey K, Harvey RJ, Betz H, Wässle H.** Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha3 subunit. *J Comp Neurol.* 465(4):524-39 (2003).
- Haverkamp S, Müller U, Zeilhofer HU, Harvey RJ, Wässle H.** Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha2 subunit. *J Comp Neurol.* 477(4):399-411 (2004).

- Heinze L, Harvey RJ, Haverkamp S, Wässle H.** Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha4 subunit. *J Comp Neurol.* 500(4):693-707 (2007).
- Ivanova E, Müller U, Wässle H.** Characterization of the glycinergic input to bipolar cells of the mouse retina. *Eur J Neurosci.* 23(2):350-64 (2006).
- Kneussel M, Betz H.** Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J Physiol.* 525, 1-9(2000).
- Krupp J, Larmet Y, Feltz P.** Postnatal change of glycinergic IPSC decay in sympathetic preganglionic neurons. *Neuroreport.* 1994 Dec 20;5(18):2437-40.
- Kolb H, Famiglietti EV.** Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of cat retina. *Science.* 1974 Oct 4;186(4158):47-9.
- Kolb H, Nelson R.** Rod pathways in the retina of the cat. *Vision Res.* 1983;23(4):301-12.
- Langosch D, Thomas L, Betz H.** Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(19), 7394-8. (1988)
- Lee EJ, Kim HJ, Lim EJ, Kim IB, Kang WS, Oh SJ, Rickman DW, Chung JW, Chun MH.** All amacrine cells in the mammalian retina show disabled-1 immunoreactivity. *J Comp Neurol.* 2004 Mar 15;470(4):372-81.
- Legendre P.** The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci.* 58(5-6), 760-93 (2001)
- Legendre, P., Korn, H.** Glycinergic inhibitory synaptic currents and related receptor channels in the zebrafish brain. *Eur J Neurosci.* 1994 Oct 1;6(10):1544-57.
- Lin B, Masland RH.** Populations of wide-field amacrine cells in the mouse retina. *J Comp Neurol.* 2006 Dec 10;499(5):797-809.
- Lindau M, Fernandez JM.** IgE-mediated degranulation of mast cells does not require opening of ion channels. *Nature* 319(6049), 150-3 (1986).
- Llano, I., González, J., Caputo, C., Lai, F.A., Blayney, L.M., Tan, Y.P., Marty, A.** Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients. *Nature Neurosci.* 3, 1256-1265 (2000).
- Lynch, J.W.** Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol. Rev.* 84, 1051-1095 (2004).
- Lynch JW, Rajendra S, Pierce KD, Handford CA, Barry PH, Schofield PR.** Identification of intracellular and extracellular domains mediating signal transduction in the inhibitory glycine receptor chloride channel. *EMBO J.* 1997 Jan 2;16(1):110-20.
- MacNeil MA, Heussy JK, Dacheux RF, Raviola E, Masland RH.** The shapes and numbers of amacrine cells: matching of photofilled with Golgi-stained cells in the rabbit retina and comparison with other mammalian species. *J Comp Neurol.* 1999 Oct 18;413(2):305-26.

- MacNeil MA, Masland RH.** Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron*. 1998 May;20(5):971-82.
- Magnusson AK, Kapfer C, Grothe B, Koch U.** Maturation of glycinergic inhibition in the gerbil medial superior olive after hearing onset. *J Physiol*. 2005 Oct 15;568(Pt 2):497-512. Epub 2005 Aug 11.
- Majumdar S, Heinze L, Haverkamp S, Ivanova E, Wässle H.** Glycine receptors of A-type ganglion cells of the mouse retina. *Vis Neurosci*. 1-17 (2007).
- Malosio ML, Marquèze-Pouey B, Kuhse J, Betz H.** Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J*. 10(9):2401-9 (1991).
- Mangin JM, Baloul M, Prado De Carvalho L, Rogister B, Rigo JM, Legendre P.** Kinetic properties of the alpha2 homo-oligomeric glycine receptor impairs a proper synaptic functioning. *J Physiol*. 2003 Dec 1;553(Pt 2):369-86.
- Marc, R.E.** The role of glycine in the mammalian retina. *Progress in retinal research* 8, 67-107 (1989).
- Mascia MP, Wick MJ, Martinez LD, Harris RA.** Enhancement of glycine receptor function by ethanol: role of phosphorylation. *Br J Pharmacol*. 1998 Sep;125(2):263-70.
- Masland, RH.** The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci*. 4(9), 877-86 (2001).
- Masland RH, Mills JW, Hayden SA.** Acetylcholine-synthesizing amacrine cells: identification and selective staining by using radioautography and fluorescent markers. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1984 Nov 22;223(1230):79-100.
- Matzenbach B, Maulet Y, Sefton L, Courtier B, Avner P, Guenet JL, Betz H.** Structural analysis of mouse glycine receptor alpha subunit genes. Identification and chromosomal localization of a novel variant. *J Biol Chem*. 269(4), 2607-12. (1994)
- Menger N, Pow DV, Wässle H.** Glycinergic amacrine cells of the rat retina. *J Comp Neurol*. 401(1), 34-46 (1998).
- Menger N, Wässle H.** Morphological and physiological properties of the A17 amacrine cell of the rat retina. *Vis Neurosci*. 2000 Sep-Oct;17(5):769-80.
- Mishina M, Takai T, Imoto K, Noda M, Takahashi T, Numa S, Methfessel C, Sakmann B.** Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature*. 1986 May 22-28;321(6068):406-11.
- Mohammadi B, Krampfl K, Cetinkaya C, Moschref H, Grosskreutz J, Dengler R, Bufler J.** Kinetic analysis of recombinant mammalian alpha(1) and alpha(1)beta glycine receptor channels. *Eur Biophys J*. 2003 Sep;32(6):529-36. Epub 2003 Feb 19.
- Nelson R, Kolb H.** Amacrine cells in scotopic vision. *Ophthalmic Res*. 1984;16(1-2):21-6.

- Nelson R, Kolb H.** A17: a broad-field amacrine cell in the rod system of the cat retina. *J Neurophysiol.* 1985 Sep;54(3):592-614.
- Nomura A, Shigemoto R, Nakamura Y, Okamoto N, Mizuno N, Nakanishi S.** Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell.* 1994 May 6;77(3):361-9.
- O'Brien BJ, Richardsen RC, Berson DM.** Inhibitory network properties shaping the light evoked responses of cat alpha retinal ganglion cells. *Vis Neurosci.* 2003 Jul-Aug;20(4):351-61.
- Pang, J.-J., Abd-El-Barr, M.M., Gao, F., Bramblett, D.E., Paul, D.L., Wu, S.M.** Relative contributions of rod and cone bipolar cell inputs to AII amacrine cell light responses in the mouse retina. *J. Physiol.* 580, 397-410 (2007).
- Pasino E, Marchiafava PL.** Transfer properties of rod and cone cells in the retina of the tiger salamander. *Vision Res.* 1976;16(4):381-6.
- Pérez-León J, Frech MJ, Schröder JE, Fischer F, Kneussel M, Wässle H, Backus KH.** Spontaneous synaptic activity in an organotypic culture of the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Mar;44(3):1376-87.
- Pribilla I, Takagi T, Langosch D, Bormann J, Betz H.** The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *EMBO J.* 11(12):4305-11 (1992).
- Pourcho RG, Goebel DJ.** Neuronal subpopulations in cat retina which accumulate the GABA agonist, (3H)muscimol: a combined Golgi and autoradiographic study. *J Comp Neurol.* 1983 Sep 1;219(1):25-35.
- Pow DV, Hendrickson AE.** Expression of glycine and the glycine transporter Glyt-1 in the developing rat retina.. *Vis Neurosci.* 2000 May-Jun;17(3):1R-9R.
- Protti DA, Gerschenfeld HM, Llano I.** GABAergic and glycinergic IPSCs in ganglion cells of rat retinal slices. *J Neurosci.* 1997 Aug 15;17(16):6075-85.
- Rabl K, Cadetti L, Thoreson WB.** Kinetics of exocytosis is faster in cones than in rods. *J Neurosci.* 2005 May 4;25(18):4633-40.
- Sassoè-Pognetto M, Wässle H, Grünert U.** Glycinergic synapses in the rod pathway of the rat retina: cone bipolar cells express the alpha 1 subunit of the glycine receptor. *J Neurosci.* 1994 Aug;14(8):5131-46.
- Schmieden V, Kuhse J, Betz H.** Agonist pharmacology of neonatal and adult glycine receptor alpha subunits: identification of amino acid residues involved in taurine activation. *EMBO J.* 11(6), 2025-32 (1992).
- Sergeeva OA, Haas HL.** Expression and function of glycine receptors in striatal cholinergic interneurons from rat and mouse. *Neuroscience* 104(4), 1043-55 (2001)

- Singer JH, Berger AJ.** Contribution of single-channel properties to the time course and amplitude variance of quantal glycine currents recorded in rat motoneurons. *J Neurophysiol.* 1999 Apr;81(4):1608-16.
- Singer JH, Diamond JS.** Sustained Ca²⁺ entry elicits transient postsynaptic currents at a retinal ribbon synapse. *J Neurosci.* 2003 Nov 26;23(34):10923-33.
- Singer JH, Talley EM, Bayliss DA, Berger AJ.** Development of glycinergic synaptic transmission to rat brain stem motoneurons. *J Neurophysiol.* 80(5):2608-20 (1998).
- Smith, A.J., Owens, S., Forsythe, I.D.** Characterisation of inhibitory and excitatory postsynaptic currents of the rat medial superior olive. *J. Physiol.* 529, 681-698 (2000).
- Strettoi E, Raviola E, Dacheux RF.** Synaptic connections of the narrow-field, bistratified rod amacrine cell (AII) in the rabbit retina. *J Comp Neurol.* 325(2), 152-68 (1992)
- Takahashi T, Momiyama A, Hirai K, Hishinuma F, Akagi H.** Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels. *Neuron* 9(6), 1155-61 (1992)
- Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T.** Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol.* 2003 Dec 1;467(1):60-79.
- Tauchi M, Masland RH.** The shape and arrangement of the cholinergic neurons in the rabbit retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1984 Nov 22;223(1230):101-19.
- Tian N, Hwang TN, Copenhagen DR.** Analysis of excitatory and inhibitory spontaneous synaptic activity in mouse retinal ganglion cells. *J Neurophysiol.* 1998 Sep;80(3):1327-40.
- Veruki ML, Gill SB, Hartveit E.** Spontaneous IPSCs and glycine receptors with slow kinetics in wide-field amacrine cells in the mature rat retina. *J Physiol.* 2007 May 15;581(Pt 1):203-19. Epub 2007 Mar 1.
- Veruki ML, Hartveit E.** AII (Rod) amacrine cells form a network of electrically coupled interneurons in the mammalian retina. *Neuron* 33(6), 935-46 (2002).
- Veruki, M.L., Morkve, S.H., Hartveit, E.** Functional properties of spontaneous EPSCs and non-NMDA receptors in rod amacrine (AII) cells in the rat retina. *J. Physiol.* (Lond) 549, 759-774 (2003).
- Völgyi B, Xin D, Amarillo Y, Bloomfield SA.** Morphology and physiology of the polyaxonal amacrine cells in the rabbit retina. *J Comp Neurol.* 2001 Nov 5;440(1):109-25.
- Wässle, H.** Parallel processing in the mammalian retina. *Nature Reviews Neurosci.* Oct;5(10):747-57 (2004)
- Wässle, H. & Boycott, B. B.** Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol. Rev.* 71, 447-480 (1991).

- Wässle H, Grünert U, Röhrenbeck J.** Immunocytochemical staining of AII-amacrine cells in the rat retina with antibodies against parvalbumin. *J Comp Neurol.* 1993 Jun 22;332(4):407-20.
- Wässle H, Koulen P, Brandstätter JH, Fletcher EL, Becker C-M.** Glycine and GABA receptors in the mammalian retina. *Vision Res* 38, 1411–1430 (1998)
- Wässle H, Schäfer-Trenkler I, Voigt T.** Analysis of a glycinergic inhibitory pathway in the cat retina. *J Neurosci.* 1986 Feb;6(2):594-604.
- Wässle H, Voigt T, Patel B.** Morphological and immunocytochemical identification of indoleamine-accumulating neurons in the cat retina. *J Neurosci.* 1987 May;7(5):1574-85.
- Weiss J., O'Sullivan G. A., Heinze L., Chen H.-X., Betz H., Wässle H.** Glycinergic Input of Small-Field Amacrine Cells in the Retinas of Wildtype and Glycine Receptor Deficient Mice. Eingereicht.
- Witzemann V, Barg B, Criado M, Stein E, Sakmann B.** Developmental regulation of five subunit specific mRNAs encoding acetylcholine receptor subtypes in rat muscle. *FEBS Lett.* 1989 Jan 2;242(2):419-24.
- Xin D, Bloomfield SA.** Comparison of the responses of AII amacrine cells in the dark- and light-adapted rabbit retina. *Vis Neurosci.* 16(4), 653-65 (1999).
- Yoshida K, Watanabe D, Ishikane H, Tachibana M, Pastan I, Nakanishi S.** A key role of starburst amacrine cells in originating retinal directional selectivity and optokinetic eye movement. *Neuron.* 2001 Jun;30(3):771-80.
- Young-Pearse TL, Ivic L, Kriegstein AR, Cepko CL.** Characterization of mice with targeted deletion of glycine receptor alpha 2. *Mol Cell Biol.* 2006 Aug;26(15):5728-34.

VII. Abkürzungen

Chat	Cholinacetyltransferase
EPSCs	Exzitatorische postsynaptische Ströme
GABA	γ -amino Buttersäure
GCL	Ganglienzellschicht
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gly	Glyzin
GlyR	Glyzinrezeptoren
HBS	auf HEPES basierende Lösung
I	Strom
INL	innere Körnerschicht
IPL	innere plexiforme Schicht
IPSCs	inhibitorische postsynaptische Ströme
KO-Mäuse	Knock-out-Mäuse
MF	Mittelfeld-Amakrinzellen
N	Anzahl der analysierten Ereignisse
n	Anzahl der Zellen
NF	Kleinfeld-Amakrinzellen
NFL	Nervenfaserschicht
ONL	äußere Körnerschicht
OPL	äußere plexiforme Schicht
P	Wahrscheinlichkeit
PB	Phosphatpuffer
PFA	Paraformaldehyd
PIC	Picrotoxinin
PNS	peripheres Nervensystem
r	Pearson-Korrelationskoeffizient
sIPSCs	spontane inhibitorische postsynaptische Ströme
Stry	Strychnin
TTX	Tetrodotoxin
T20/80	Aktivierungszeit
τ , $\tau_{1,2}$	Zeitkonstanten
τ_w	gewichtete Zeitkonstante
WF	Weitfeld-Amakrinzellen
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem
-/-	homozygoter Gen-defizienter Genotyp

