

PHYSIOLOGISCHE
UNTERSUCHUNGEN
AN DER
STÄBCHENBAHN DER
NAGERRETINA

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES

„DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN“

AM FACHBEREICH BIOLOGIE DER
JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITÄT
IN MAINZ

Christopher Josef Habermann
geb. in Bingen am Rhein

Mainz, März 2002

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	7
1.1	DIE RETINA.....	7
1.1.1	Die Zapfenbahn.....	9
1.1.2	Die Stäbchenbahn	9
1.2	KALZIUM.....	10
1.2.1	Kalziumkanäle	11
1.2.2	Kalziumkanäle in der Retina.....	12
1.3	GLUTAMAT-REZEPTOREN	13
1.3.1	Ionotropen Glutamat-Rezeptoren	14
1.3.1.1	Glutamat-Rezeptoren von AMPA Typ.....	14
1.3.1.2	Glutamat-Rezeptoren vom Kainat Typ.....	15
1.3.2	Glutamat-Rezeptoren in der Retina	15
1.4	ELEKTRISCHE SYNAPSEN.....	16
1.4.1	Elektrische Synapsen in der Retina	17
1.5	AII AMAKRINZELLEN.....	18
1.5.1	Anatomie.....	18
1.5.2	Physiologie.....	19
1.5.2.1	Spannungsgesteuerte Kanäle auf AII Amakrinzellen.....	20
1.5.2.2	Glutamat-Rezeptoren auf AII Amakrinzellen	20
1.5.2.3	Elektrische Synapsen auf AII Amakrinzellen	21
1.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	22
2	MATERIAL UND METHODE.....	23
2.1	VERSUCHSTIERE	23
2.2	PRÄPARATION DER RETINA	23
2.2.1	Ektomie der Retina.....	23
2.2.2	Schneiden der eingebetteten Retina am Vibratom.....	23
2.3	VERSUCHSAPPARATUR	24
2.3.1	Elektrophysiologie	25
2.3.1.1	Die Ganzzellableitung.....	25
2.3.1.2	Protokolle zur Untersuchung spannungsgesteuerter Kanäle	26
2.3.2	Kalziumfluorimetrie.....	27
2.4	DIE FÄRBUNG MIT DIAMINO BENZIDIN.....	27
2.5	DATENANALYSE	28
2.5.1	Die Berechnung von DF/F	28
2.6	DIE VERWENDETEN LÖSUNGEN.....	29
2.6.1	Badapplikation	30
2.6.2	Applikationssystem.....	30
3	ERGEBNISSE	32
3.1	MORPHOLOGIE.....	32
3.2	PHYSIOLOGIE	33
3.2.1	Spannungsgesteuerte Kanäle	34
3.2.1.1	Pharmakologie der Kalziumströme.....	38
3.2.1.2	Lokalisation der Kalziumströme	42
3.2.1.3	Kalziumkanäle in den keulenförmigen Fortsätzen	43
3.2.2	Vergleich unterschiedlicher Indikatoren	45
3.2.3	Glutamat-Rezeptor vermittelte Ströme	46

3.2.3.1	Durch Glutamat-Applikation evozierte Veränderungen der Fluoreszenz.....	46
3.2.3.2	Pharmakologie der glutamatinduzierten Ströme	49
3.2.3.3	Glutamat-Rezeptoren unter dem Einfluss von Nimodipine.....	52
3.2.4	<i>Die Lichtreaktion</i>	52
3.3	UNTERSUCHUNGEN AN DER REELER MUTANTE	53
3.4	MESSUNGEN AN A17 AMAKRINZELLEN	55
4	DISKUSSION	58
4.1	MORPHOLOGIE.....	58
4.1.1	<i>Koppelung</i>	58
4.2	SPONTANE SYNAPTISCHE AKTIVITÄT	60
4.2.1	<i>Inhibitorische spontane synaptische Aktivität</i>	60
4.2.2	<i>Schnelle spontane Ströme</i>	60
4.3	SPANNUNGSGESTEUERTE KANÄLE	60
4.3.1	<i>Spannungsgesteuerte Natriumkanäle:</i>	60
4.3.2	<i>Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle</i>	62
4.4	LIGANDENGESTEUERTE KANÄLE	64
4.4.1	<i>Der Mechanismus der Erhöhung der intrazellulären</i> <i>Kalziumkonzentration nach Glutamat-Applikation</i>	66
4.4.2	<i>Physiologische Bedeutung des Kalziums in den distalen Dendriten</i>	66
4.5	UNTERSUCHUNGEN AN DER REELER MUTATION.....	67
4.6	UNTERSUCHUNGEN AN DER A17 AMAKRINZELLE	68
4.7	DISKUSSION DER VERWENDETEN TECHNIK UND DEREN LIMITIERUNGEN ..	68
4.8	AUSBLICK	69
5	ZUSAMMENFASSUNG	71
6	LITERATURVERZEICHNIS	73
7	DANKSAGUNG	87
8	LEBENS LAUF	88

ABKÜRZUNGEN

[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
AII	Sprich: A-zwei
AMPA	(±)-α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-Isoxazolpropionsäure
APB	2-Amino-4-Phosphonobutyrat
Bay K 8644	R-1,4-Dihydro-2,6-Dimethy-5-Nitro-(2-[Trifluoromethyl]-Phenyl)-3-Pyridin
BIC	Bicucullin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBC	Cone bipolar cell = Zapfenbipolarzelle
CG1	Calcium Green-1 (K _d = 190 nM)
cGMP	zyklisches Guaninmonophosphat
CNQX	6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion
CPP	(RS)-3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)-Propyl-1-Phosphorsäure
Cyclothiazid	6-Chloro-3,4-Dihydro-3-(2-Norbornen-5-yl)-2H-1,2,4-Benzothiadiazine-7-Sulphonamide-1,1-Dioxid
DAB	Diaminobenzidin
DHP	Dihydropyridin
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
EGTA	Ethylenglykol-bis-N,N'-Tetraessigsäure
GABA	g-Aminobuttersäure
GCL	Ganglion cell layer = Ganglienzellschicht
Glu	Glutamat
Gly	Glyzin
GYKI 52466	1-(4-Aminophenyl)-4-Methyl-7,8-Methylenedioxy-5H-2,3-Benzodiazepin
GYKI 53655	1-(4-Aminophenyl)-3-Methylcarbamyl-4-Methyl-3,4-Dihydro-7,8-Methylenedioxy-5H-2,3-Benzodiazepin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethansulfonsäure
INL	Inner nuclear layer = Innere Körnerschicht
IPL	Inner plexiform layer = Innere synaptische Schicht
KA	Kainic acid = Kainat (2-Carboxy-3-Carboxymethyl-4-Isopropenylpyrrolidin)
MF4	Mag-fluo-4 (K _d = 22 μM)
NB	Neurobiotin
NBQX	2,3-Dihydroxy-6-Nitro-7-Sulfamoylbenzo(f)Quinoxalin
NFL	Nerv Fibre Layer = Nervenfaserschicht
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxyd
OG2	Oregon Green-488 BAPTA-2 (K _d = 580 nM)
OG5	Oregon Green 488 BAPTA-5N (K _d = 20 μM)
ONL	Outer nuclear layer = Äußere Körnerschicht
OPL	Outer plexiform layer = Äußere synaptische Schicht
PA	Paraformaldehyd
PE	Pigmentepithel
(i)PSC	(inhibitorischer)-Post-Synaptischer-Strom (current)
RBC	Rod bipolar cell = Stäbchenbipolarzelle
Stry	Strychnin
SYM 2081	(2S,4R)-4-Methylglutaminsäure
TBA	Tetra-butyl-Amonium

Meiner Ansicht nach ist die Sehkraft für uns deshalb Ursache des größten Gewinns, weil ja wohl von den jetzt über das All angestellten Betrachtungen keine stattgefunden hätte, wenn wir weder die Sterne noch die Sonne noch den Himmel erblickt hätten.
PLATON

1 Einleitung

Seit den Tagen des klassischen Altertums wird die Frage nach der Funktion und der Arbeitsweise des Gehirns gestellt. Zunächst philosophisch bald aber auch experimentell wurden Antworten gesucht. Gerade bei den experimentellen Ansätzen nimmt die Netzhaut bis heute eine herausgehobene Position ein. Die erstaunliche Leistungs- und Anpassungsfähigkeit, die leichte Zugänglichkeit und die bestechende Schönheit des Gewebes, sowie die verblüffenden psychophysischen „Täuschungen“ und vielfältigen individuellen Erfahrungen mit „dem Sehen“ machen die Retina zum Primus inter pares der neuronalen Gewebe. Ich möchte einleitend einen Überblick über den heutigen Stand der Erkenntnis geben.

1.1 Die Retina

Die Retina besteht aus fünf neuronalen Zellklassen und den Gliazellen. Diese Zellen sind in, wiederum fünf, diskreten Schichten angeordnet, wobei sich drei somatische Schichten, welche die Zellkörper enthalten, mit zwei synaptischen Schichten abwechseln.

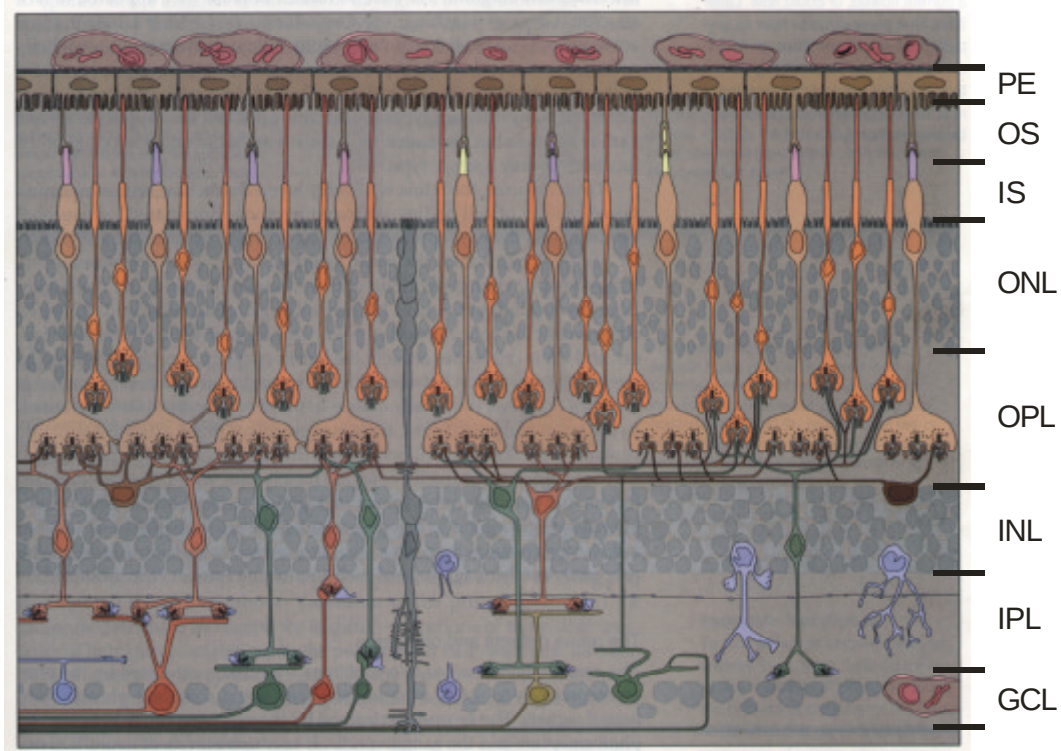


Abbildung 1-1 zeigt eine schematisierte Primaten Retina. Zapfen sind sandfarben, Stäbchen orange, ON-Bipolarzellen in Rot, OFF-Bipolarzellen in Grün, Amakrinzellen in Blau dargestellt. PE = pigment epithelia, OS = outer segments, IS = inner segments, ONL = outer nuclear layer, OPL = outer plexiform layer, INL = inner nuclear layer, IPL = inner plexiform layer, GCL = ganglion cell layer. Aus (Rodieck 1998).

Die Lichtsinneszellen nennen wir Photorezeptoren. Sie bestehen aus einem äußeren und einem inneren Segment, aus dem Zellkörper und einer Ausgangssynapse. Die Zellkörper der Photorezeptoren bilden die vom Augennittelpunkt gesehen äußerste somatische Schicht, die äußere Körnerschicht (ONL von engl. outer nuclear layer). Die Ausgangssynapsen der Photorezeptoren sind mit den Dendriten der Horizontal- und Bipolarzellen in der äußeren synaptischen Schicht verschaltet (OPL von engl. outer plexiform layer). Die Zellkörper dieser Horizontal- und Bipolarzellen bilden mit denen der Amakrinzellen die innere Körnerschicht (INL von engl. inner nuclear layer). In der inneren synaptischen Schicht (IPL von engl. inner plexiform layer) liegen jene Synapsen, welche die Bipolarzellen und Amakrinzellen untereinander und mit den Dendriten der Ganglienzellen ausbilden. Die Ganglienzellschicht ihrerseits besteht aus den Somata der Ganglienzellen und weiterer Amakrinzellen.

Das ins Auge einfallende Licht durchdringt zunächst alle retinalen Schichten, bevor es in den äußeren Segmenten der Photorezeptoren eine biochemische Kaskade auslöst. An deren Anfang steht die Isomerisation von 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal und am Ende die Hyperpolarisation des Photorezeptors sowie die damit einhergehende Verringerung der im Dunkeln tonischen Glutamatausschüttung. Wie Photorezeptoren, so schütten auch Bipolar- und Ganglienzellen Glutamat als Neurotransmitter aus. Diesem Signalweg, der Glutamat als Transmitter verwendet und der sozusagen vertikal, oder besser radial, angeordnet ist, kann man einen horizontalen Signalweg gegenüberstellen: Horizontal- und Amakrinzellen, die hauptsächlich GABA und Glyzin als Neurotransmitter verwenden, modulieren das vertikale Signal.

Die Zellen der Retina werden darüber hinaus nach ihrer Reaktion auf einen Lichtreiz in ON-, OFF- und ON-OFF-Zellen unterteilt (Kaneko 1970, Werblin und Dowling 1969). Zellen, die mit einer Depolarisation der Zellmembran auf Licht reagieren, werden als ON-Zellen bezeichnet. Solche, deren Zellmembran auf Lichtreizung hyperpolarisieren (wie es auch die Photorezeptoren tun) als OFF-Zellen. ON-OFF-Zellen reagieren entsprechend auf beide Reize.

OFF-Bipolarzellen besitzen ionotrope Glutamat-Rezeptoren und werden durch Glutamat erregt. Sie geben ihr Signal an OFF- und ON-OFF-Ganglienzellen weiter. Die Synapsen der OFF-Bipolarzellen mit den Dendriten der OFF- und ON-OFF-Ganglienzellen liegen in der äußeren Hälfte der IPL, der OFF-Schicht.

ON-Bipolarzellen verhalten sich genau entgegengesetzt zu den OFF-Zellen und werden durch Glutamat inhibiert. Dieses Verhalten wird durch einen metabotropen Rezeptor vermittelt (Slaughter und Miller 1985, Nawy und Jahr 1990, Yamashita und Wässle 1991). ON-Bipolarzellen sind mit ON- und mit ON-OFF-Ganglienzellen verschaltet. Diese Verschaltungen liegen überwiegend in der inneren Hälfte der IPL, auch ON-Schicht genannt (zur Übersicht siehe Boycott und Wässle 1999).

Die gängigsten Klassifizierungen retinaler Zellen stützen sich vor allem auf deren Morphologie. Wir unterscheiden mindestens drei Typen von Photorezeptoren, ein bis zwei Typen von Horizontalzellen, 8-12 Bipolarzell-Typen, 30-40 Typen von Amakrinzellen und zwischen 10 und 20 Ganglienzell-Typen. Die Klasse der Amakrinzellen ist sehr heterogen (MacNeil und Masland 1998).

1.1.1 Die Zapfenbahn

Mit den Zapfen sehen wir bei Tageslicht (photopisches Sehen). Diese Lichtsinneszellen liegen bei Primaten in drei Typen vor, die sich in ihren Absorptionsspektren unterscheiden. Jeder einzelne Zapfen ist mit mehreren hundert postsynaptischen Elementen, nämlich Dendriten von Bipolar- und Horizontalzellen, verschaltet (Chun et al. 1996, Dowling und Boycott 1965, Haverkamp et al. 2000).

Dabei bilden ON- und OFF-Bipolarzellen unterschiedliche Kontakt aus. Die beiden Aspekte „Licht an“ und „Licht aus“ werden also in der Zapfenbahn schon an der ersten Synapse in zwei unterschiedliche Signalwege aufgeteilt. Danach werden die Signale in separaten Bahnen über ON-Bipolar- und ON-Ganglienzellen beziehungsweise OFF-Bipolar- und OFF-Ganglienzellen zum visuellen Cortex weitergeleitet.

Schnelle und langsame Komponenten der erregenden Lichtreize werden zum Teil über unterschiedliche Zapfenbipolarzell-Typen parallel zu den Ganglienzellen übertragen (Boycott und Wässle 1999, DeVries 2000, Euler und Masland 2000, Freed 2000).

1.1.2 Die Stäbchenbahn

Mit den Stäbchen sehen wir bei Dunkelheit (skotopisches Sehen). Stäbchen übertragen ihr Signal auf Stäbchenbipolarzellen. Diese exprimieren den metabotropen Glutamat-Rezeptor Typ 6 (Nomura et al. 1994) und unter Umständen auch verschiedene Untereinheiten von ionotropen Rezeptoren (GluR2, GluR4 und NMDAR1 Hughes 1997, Morigiwa und Vardi 1999). Stäbchenbipolarzellen sind ON-Bipolarzellen und übertragen ihr Signal, nicht wie die Zapfenbipolarzellen direkt auf Ganglienzellen, sondern auf (mindestens) zwei spezielle Amakrinzellen: die AII und A17 Zellen. Die AII teilt das von den Stäbchen stammende Signal in einen ON- und einen OFF-Anteil auf und leitet es an ON- und OFF- Zapfenbipolarzellen weiter (siehe Abbildung 1-5).

Die evolutionär jüngere Stäbchenbahn ist der Zapfenbahn in gewissem Sinne also aufgesetzt (Strettoi et al. 1992), was phylogenetisch in Übereinstimmung mit Untersuchungen zur Homologie der Opsine steht (Nathans 1999).

Die Stäbchenbahn ist, nach den bislang vorliegenden Ergebnissen, zumindest innerhalb der Klasse der Säugetiere, hoch konserviert (Katze: Freed und Sterling 1988, Kolb und Famiglietti 1974; Kaninchen: Strettoi et al. 1990, Vaney et al. 1991; Ratte: Chun et al. 1993; Primaten: Mills und Massey 1991).

Stäbchen und Zapfen sind über elektrische Synapsen miteinander verbunden (Cohen 1965, Nelson 1977, Schneeweis und Schnapf 1995, Smith et al. 1986). Dies eröffnet einen weiteren möglichen Signalweg von Stäbchen zu den Zapfenbipolarzellen; er umgeht die Stäbchenbipolarzelle und AII Amakrinzelle (DeVries und Schwartz 1999, Nelson 1977).

Ein weiterer, alternativer Signalweg für das Stäbchensignal wurde in jüngster Zeit vorgeschlagen. Soucy et al. (1998) schlussfolgern aus ihren Ergebnissen, dass Signale von Stäbchen direkt in OFF-Zapfenbipolarzellen gelangen. Sie schlagen einen Signalweg von Stäbchen zu OFF-Zapfenbipolarzellen vor, den auch Hack et al. (1999) bei der Ratte auf elektronenmikroskopischer Ebene beschrieben haben. In einer Analyse von Serienschnitten konnten Tsukamoto et al. (2001) zeigen, dass, bei der Maus Retina, 20% der Stäbchen direkte Kontakte mit

Zapfenbipolarzellen ausbilden. Ausserdem beschreiben die Autoren elektrische Synapsen die Stäbchen untereinander ausbilden. Solche Stäbchen-Stäbchen Kontakte waren bei niederen Vertebraten nicht aber bei Säugern beschrieben. So muss man von wenigstens drei möglichen Wegen ausgehen, über welche das Stäbchensignal in die Ganglienzellen gelangen kann (zur Übersicht siehe Bloomfield und Dacheux 2001).

1.2 Kalzium

Kalzium ist als intrazellulärer Botenstoff oder englisch „second messenger“ überall gegenwärtig und von Proliferation/Differenzierung bis zu Apoptose/Nekrose an vielen zellulären Prozessen beteiligt.

Zellen haben ihrerseits ein fast unüberschaubares Repertoire an Kanälen, Pumpen, Rezeptoren und Puffern um die intrazelluläre Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ präzise zu steuern (in Millisekunden, Nanometern und Nanomol).

Die Ruhekonzentration in vivo liegt unter 100 nM, was wegen der toxischen beziehungsweise Phosphat-präzipitierenden Eigenschaften notwendig ist. Ausgelöst durch ein Signal kann diese Ruhekonzentration sehr schnell bis auf das tausendfache ansteigen. Kalzium kann dabei entweder aus dem extrazellulären Raum in die Zellen einströmen oder aus intrazellulären Speichern, z.B. aus Mitochondrien oder aus dem endoplasmatischen Reticulum freigesetzt werden.

Neurone haben in verschiedenen Zellkompartimenten unterschiedliche Ca^{2+} Signalwege. Im Soma existieren Proteine deren Aktivität von der Ca^{2+} Konzentration abhängig ist. Die Aktivierung von Adenylatzyklen vom Typ I und III führt beispielsweise zu einer Erhöhung des cAMP Spiegels. Die Prolin reiche Tyrosinkinase (PYK2), die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), die

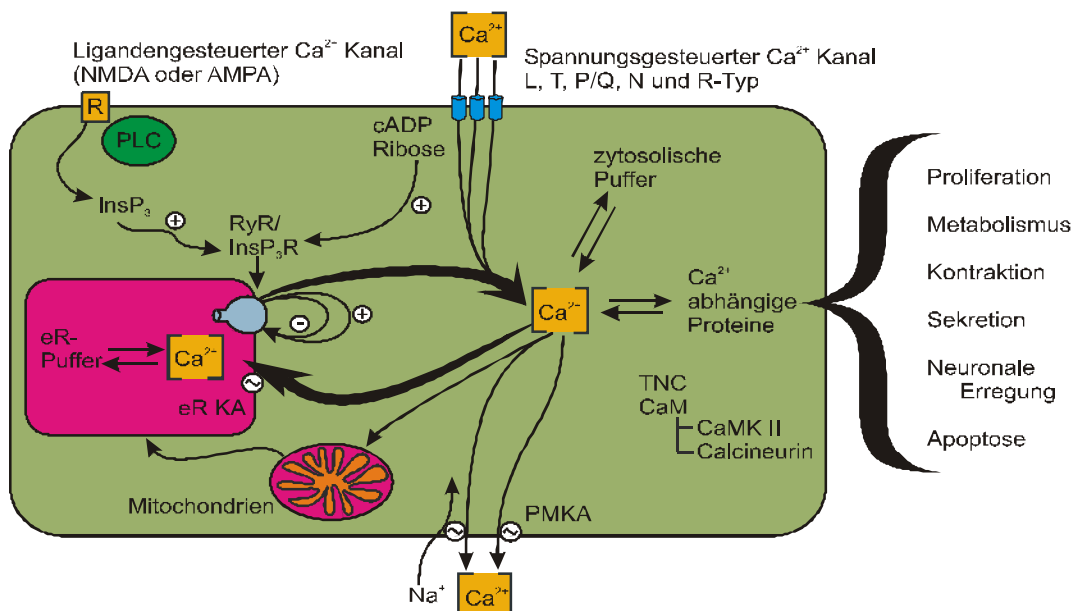


Abbildung 1-2 zeigt die Zusammenhänge zwischen intrazellulärem Kalzium und den verschiedenen biochemischen Prozessen bei lebenden Zellen. RyR = Ryanodin Rezeptor, $InsP_3R$ = Inositol-drei-Phosphat-Rezeptor, PMKA = Plasmamembran-Kalzium-ATPase, eRKA = Kalzium ATPase des endoplasmatischen Reticulum, CaM = Calmodulin, TNC = Troponin C; CaMKII = Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II.

Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und Calmodulin-Calzineurin (CAM-CN) sind weitere Rezeptoren der Kalziumkonzentration im Soma, die zum Teil auch auf die Gentranskription wirken.

In den postsynaptischen Dichten können ionotrope Glutamat-Rezeptoren selbst Ca^{2+} permeabel sein oder metabotrope Glutamat-Rezeptoren über IP_3 Kalzium aus intrazellulären Speichern freisetzen.

In den präsynaptischen Endigungen werden spannungsgesteuerte Kalziumkanäle durch eine Depolarisation der Zellmembran geöffnet. Der resultierende Ca^{2+} Einstrom löst die Fusion der synaptischen Vesikel mit der Zellmembran aus und damit die Freisetzung der Neurotransmitter. Kalziumkanäle sind also ein Schlüsselement bei der Signalübertragung an chemischen Synapsen.

Es ist offensichtlich, dass die Amplitude und Dauer der Kalziumströme eine große Bedeutung für die Amplitude und Dauer der Neurotransmitter-Ausschüttung haben. Im zentralen und peripheren Nervensystem findet man, auf Neuronen mit schnellen Aktionspotentialen, vor allem schnelle Kanäle (N und P/Q-Typ), bei sensorischen Nervenzellen, welche sich durch gradierte Membranpotentiale auszeichnen, häufig tonische Kalziumkanäle (L-Typ, Juusola et al. 1996).

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration kann heute in ihrem zeitlichen und räumlichen Verlauf sehr genau beobachtet werden. Dies wird durch die Nutzung von Kalziumindikatorfarbstoffen erreicht. Diese Indikatoren reagieren auf eine Veränderung in der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit einer Veränderung ihrer Fluoreszenzeigenschaften (Tsien et al. 1982). Die Indikatorfarbstoffe werden durch Inkubation in einer Indikatorlösung oder, wie bei der vorliegenden Arbeit, über die Ableitelektrode in die lebenden Zellen eingebracht. Bei gegebener $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und gegebener Farbstoffkonzentration emittiert eine solche Zelle in geeignetem Anregungslicht Fluoreszenz. Geeignetes Anregungslicht für z.B. *Oregon Green BAPTA 5N* ist blaues Licht von 488 nm Wellenlänge. Ändert sich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$, so ändert sich die Intensität der Fluoreszenz, welche sich leicht beobachten lässt.

1.2.1 Kalziumkanäle

Kalziumkanäle sind membranständige Proteine, die zur Familie der spannungsabhängigen Ionenkanäle gehören. Ihre Sequenz, Topologie und Funktion weist Homologien mit spannungsabhängigen Natrium- und zum Teil mit Kaliumkanälen auf. Die Natriumkanäle haben sich wahrscheinlich aus den Kalziumkanälen entwickelt, während Kalziumionen zunehmend spezifischere, signaltragende Aufgaben in den Zellen übernommen haben (Hille 1992).

Kalziumkanäle werden in Bezug auf biophysikalische Eigenschaften, Pharmakologie und molekulare Identität in sechs Typen, unterteilt. In

Tabelle 1 sind einige ihrer Eigenschaften aufgeführt.

Die Geschwindigkeit von Deaktivierung und Inaktivierung ist maßgeblich für die Kinetik des resultierenden Stromes. So sind L-Typ Kalziumkanäle während der gesamten Dauer einer Depolarisation geöffnet, sie inaktivieren sehr langsam. Kanäle vom T-Typ dagegen übersetzen eine tonische Depolarisation in einen phasischen Kalziumeinstrom.

Der spannungsgesteuerte Kalziumkanal ist ein Heteromultimer von ~450 kD. Die Untereinheiten werden $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ und δ genannt, wobei von der $\alpha 1$ Untereinheit die meisten Funktionen bekannt sind. Sie besteht aus vier homologen Domänen,

1 Einleitung

Tabelle 1: Eigenschaften der unterschiedlichen Kalziumkanäle. Verändert nach RBI - Handbuch

	<i>L</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>P</i>	<i>Q</i>	<i>R</i>
Leitfähigkeit	~25	~8	~10-20	~9-19	~16	?
Aktivierungsschwelle	Hoch	Niedrig	Hoch	Hoch	Hoch	Hoch
Deaktivierung	Schnell	Langsam	Schnell	Schnell	Schnell	Schnell
Inaktivierung	Langsam	Schnell	Moderat	Langsam	Moderat	Schnell
Zelltypen	Kardiovaskuläres System, glatte Muskulatur, endokrine Zellen, Neurone	Glatte Muskulatur, endokrine Zellen, Neurone	Neurone	Neurone	Neurone	Neurone
Agonisten	BayK 8644					
Antagonisten	Nimodipine		Conotoxin		Agatoxin	

die jeweils aus sechs Transmembrandomänen aufgebaut sind. Die Kanalpore sowie die Bindungsstelle für Modulatoren werden von α_1 gebildet. Die vierte Transmembrandomäne trägt viele positive Ladungen, was sie zum wahrscheinlichen Träger der Schaltungsfunktion macht (Horn 2000).

Die sechs Typen der Kalziumkanäle werden weiter unterteilt in die hochschwelligen Kanäle (HVA, high voltage activated) und die niederschwelligen Kanäle (LVA, low voltage activated). Die Gruppe der niederschwelligen Kanäle wird nur von Kanälen des T-Typs gebildet, die Untereinheiten werden mit $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$, $\text{Ca}_v3.3$ bezeichnet (bislang α_{1G} , α_{1H} , α_{1I} ; Ertel et al. 2000).

Insgesamt sind 10 verschiedene α_1 Untereinheiten bekannt. Davon bilden vier, $\text{Ca}_v1.1$ bis $\text{Ca}_v1.4$ (bislang α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} , α_{1F}) die Gruppe der L-Typ Kalziumkanäle. $\text{Ca}_v1.4$ (α_{1F}) wurde ausschließlich in der Retina gefunden. Die anderen L-Typ Kanäle finden sich vor allem auch in nicht neuronalen Geweben. In Skelettmuskeln ($\text{Ca}_v1.1$ (α_{1S}); Tanabe et al. 1993), im Herzmuskel ($\text{Ca}_v1.2a$ (α_{1C}); Mikami et al. 1989), in glatter Muskulatur ($\text{Ca}_v1.2b$) und in verschiedenen Drüsen, wo auch $\text{Ca}_v1.3$ (α_{1D}) gefunden wurde (Bokvist et al. 1995). $\text{Ca}_v1.3$ und $\text{Ca}_v1.2$ (α_{1C}) kommen auch im Gehirn vor werden aber mit somatischen Kalziumsignalen zur Steuerung der Genexpression in Verbindung gebracht (Bito et al. 1997), beziehungsweise mit der Ausschüttung von dendritischen Neuropeptiden (Simmons et al. 1995). Zur Übersicht sei auf Catterall (1988) und Berridge (1998) verwiesen.

1.2.2 Kalziumkanäle in der Retina

In der Retina sind verschiedene Typen von Kalziumkanälen nachgewiesen. Die langsam inaktivierenden Kalziumkanäle vom L-Typ sind immer wieder in Verbindung mit den Bandsynapsen der Photorezeptoren und Bipolarzellen gefunden worden (zur Übersicht von Gersdorff 2001).

Bei Photorezeptoren von Salamandern wurden L-Typ Kanäle nachgewiesen (Barnes und Hille 1989, Henderson et al. 2001). Stäbchen von Ratten exprimieren spezielle Isoformen von L-Typ Kanälen (Morgans 2001). Endknöpfchen von Zapfen bei Tupaia zeigen einen langsam inaktivierenden Kalziumstrom der teilweise durch DHPs zu unterdrücken war (Taylor und Morgans 1998). Bei

Hühnchen und Tigersalamandern wurden ebenfalls L-Typ Kalziumkanäle auf Photorezeptoren gefunden (Hühnchen α_{1F} , Firth et al. 2001; Tigersalamander: α_{1D} , Wilkinson und Barnes 1996).

Bei Horizontalzellen wurden T-Typ und P/Q-Typ Kalziumkanäle gemessen (Akopian et al. 1997, Pfeiffer-Linn und Lasater 1998).

L-Typ Kalziumkanäle wurden auf Axonendigungen von Stäbchenbipolarzellen in der Retina von Säugetieren nachgewiesen (delaVilla et al. 1998, Pan 2000, Pan und Lipton 1995, Protti und Llano 1998, Satoh et al. 1998). Auch beim Goldfisch sind L-Typ Kalziumkanäle nachgewiesen (Burrone und Lagnado 1997, Heidelberger und Matthews 1992, Tachibana et al. 1993). Schnell inaktivierende beziehungsweise T-Typ Kalziumkanäle sind auf den Axonendigungen von Zapfenbipolarzellen gefunden worden (Pan 2000, Protti und Llano 1998).

Beim Goldfisch exprimieren Mb1 Bipolarzellen Dihydropyridin (DHP) sensitive Kanäle (Tachibana et al. 1993), das sind Kanäle vom L-Typ. Bei Maus Bipolarzellen wurden schnell inaktivierende Kalziumströme, wahrscheinlich vom T-Typ, im Soma, und langsam inaktivierende Ströme in den Axonterminalien gemessen (delaVilla et al. 1998, Kaneko et al. 1989, Satoh et al. 1998).

Bei Stäbchenbipolarzellen der Ratte wurden ausschließlich auf den Terminalien Kalziumkanäle gefunden, diese waren vom L-Typ (Protti und Llano 1998). Andere Autoren haben auch einen schnell inaktivierenden Kalziumstrom bei diesen Zellen gemessen, der als T-Typ Strom beschrieben ist (Hartveit 1999, Pan 2000).

Bei Amakrinzellen sind viele verschiedene Typen von Kalziumkanälen gefunden worden. Auf dopaminergen Amakrinzellen sind nicht-inaktivierende Kalziumströme gefunden worden (Feigenspan et al. 1998). Auf GABA-ergen Zellen bei Hühnchen wurden ebenfalls Kalziumströme gemessen (Huba et al. 1992). Beim Tigersalamander sind ebenfalls funktionelle Kalziumkanäle auf Amakrinzellen nachgewiesen worden (Maguire 1999).

Bei Ganglienzellen wurden phasische und nicht-inaktivierende Komponenten bei Kalziumströmen gefunden (Karschin und Lipton 1989).

Auch bei retinalen Epithelzellen (Zhang und O'Neil 1996), sowie bei Müller-Gliazellen (Firth et al. 2001), sind L-Typ Kalziumkanäle nachgewiesen.

In der Retina werden die verschiedenen Typen von Kalziumkanälen von verschiedenen Zelltypen exprimiert. Die Zellen besitzen dabei solche Kalziumkanäle deren biophysikalische Eigenschaften den jeweiligen Aufgaben der Zellen angepasst sind.

1.3 Glutamat-Rezeptoren

Glutamat-Rezeptoren sind Membranproteine, die Glutamat binden und daraufhin ein Signal in das Zellinnere weitergeben. Sie werden in metabotrope und ionotrope Rezeptoren unterteilt. Die metabotropen Glutamat-Rezeptoren gehören zu der Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Acht verschiedene Typen, mGluR1 bis mGluR8, die in drei Gruppen zusammengefasst werden, sind bekannt. Auf metabotrope Rezeptoren wird im Folgenden nicht weiter eingegangen.

1.3.1 Ionotropen Glutamat-Rezeptoren

Ionotrope Glutamat-Rezeptoren gehören zu der Klasse der ligandenabhängigen Ionenkanäle. Sie werden, nach ihren Agonisten und biophysikalischen Eigenschaften, in NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren unterteilt. Der NMDA-Rezeptor zeigt ein spannungsabhängiges Verhalten, das durch einen Magnesium Block verursacht wird: Mg^{2+} (und andere bivalente) Ionen blockieren bei negativen Membranpotentialen und physiologischen extrazellulären Mg^{2+} Konzentrationen den Ionenkanal. Ist die Zellmembran allerdings depolarisiert und Glutamat in der Bindungstasche gebunden, so öffnet sich der Kanal und zeigt eine besonders große Leitfähigkeit für Kalziumionen. Diese Kalziumionen sind intrazelluläre Botenstoffe. Aufgrund seiner biophysikalischen Besonderheiten wird der NMDA-Rezeptor mit Lernen und Plastizität in Verbindung gebracht. Fünf Untereinheiten sind bekannt, sie werden als NR1 und NR2A bis NR2D bezeichnet. Die NMDA-Rezeptoren sollen hier nicht eingehender besprochen werden.

1.3.1.1 Glutamat-Rezeptoren von AMPA Typ

AMPA-Rezeptoren sind, wie Kainat-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren auch, unspezifische Kationenkanäle. Es handelt sich um tetramere Proteinkomplexe (Rosenmund et al. 1998). Die Leitfähigkeit für einzelne Ionen, die Selektivität also, ist abhängig von der Zusammensetzung der Untereinheiten. Vier Untereinheiten sind für den AMPA-Rezeptor bekannt, sie heißen GluR1 - GluR4, diese liegen außerdem in zwei Varianten vor, „flip“ und „flop“ (Sommer et al. 1990). Die Untereinheiten können, zumindest in Expressionssystemen homomere und heteromere Rezeptorkomplexe bilden (Lomeli et al. 1994). Im Hippocampus sind endogene AMPA-Rezeptoren meist Heteromere aus GluR1/GluR2 und GluR2/GluR3 (Wenthold et al. 1996).

GluR2 ist, durch den Austausch von nur einer Aminosäure – Glutamin gegen Arginin (Dingledine et al. 1992), maßgeblich an den Eigenschaften des AMPA-Rezeptors beteiligt, insbesondere an der Selektivität für Ca^{2+} Ionen, den gleichrichtenden Eigenschaften und der Empfindlichkeit gegenüber Polyaminen (Bochet et al. 1994, Hollmann et al. 1991, Washburn et al. 1997). Die Kalziumpermeabilität von AMPA-Rezeptoren (P_{Ca}/P_{Na}) liegt zwischen 0.07 und 2.8 (Faktor 40!) und ist reziprok zu der Menge an GluR2 mRNA (Koh et al. 1995). Je mehr GluR2 eine Zelle exprimiert um so weniger permeabel sind die AMPA-Rezeptoren für Kalzium. AMPA und Glutamat führen am AMPA-Rezeptor zu einer raschen und deutlichen Desensibilisierung. Kainat, das auch als Agonist am AMPA-Rezeptor wirkt, induziert nur wenig desensibilisierende Ströme. Verschiedene Wirksubstanzen greifen an drei verschiedenen Stellen den AMPA-Rezeptor an. NBQX, ein unspezifischer Blocker, greift an der Glutamat Bindestelle, Cyclothiazid hebt die rasche Desensibilisierung auf und das Spinnengift Joro-Toxin bindet an einer Stelle im Inneren des Ionenkanal an und blockiert diesen dadurch. Die beiden Benzodiazepine GYKI 52466 und GYKI 53655 sind hoch spezifische nicht kompetitive Antagonisten für AMPA-Rezeptoren. Als Wirkmechanismus dieser Substanzen wurde eine Beschleunigung der (ohnehin schnellen!) Desensibilisierung diskutiert. Abschließend bekannt ist der Wirkmechanismus allerdings nicht (zu Übersicht siehe Ozawa et al. 1998).

Die meisten Neurone im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimieren GluR2 und ihre AMPA-Rezeptoren sind entsprechend nur wenig Ca^{2+} permeabel. Wenn Ca^{2+} permeable AMPA-Rezeptoren auf Neuronen beschrieben sind, dann handelt es sich dabei um solche Neurone, die GABA als Neurotransmitter verwenden und das Kalziumbindende-Protein Parvalbumin exprimieren (Bochet et al. 1994, Jonas und Burnashev 1995)

1.3.1.2 Glutamat-Rezeptoren vom Kainat Typ

Fünf Untereinheiten bauen den Kainat-Rezeptor auf. Sie werden mit GluR5 - GluR7 und KA1 und KA2 bezeichnet (Überblick bei Seeburg 1993). Die physiologischen Eigenschaften der Kainat-Rezeptoren sind im ZNS nur wenig untersucht. Einerseits löst Kainat auch am AMPA-Rezeptor große, nicht desensitisierende Antwortströme aus. Andererseits überlagern die AMPA-Rezeptor vermittelten Ströme, da AMPA- und Kainat-Rezeptoren häufig coexprimiert werden, die kleineren und schnelleren Kainat-Rezeptor vermittelten Antworten (Ozawa et al. 1998).

Zur Klassifizierung der Kainat-Rezeptoren werden verschiedene Wirksubstanzen, sowie die biophysikalischen Eigenschaften des Rezeptors herangezogen.

Concanavalin A ist ein Wirkstoff, der selektiv die Desensitisierung an Kainat-Rezeptoren, nicht aber an AMPA-Rezeptoren, verringert. Von einer weiteren Substanz, SYM 2081, ein Glutamat-Analogen, wurde in jüngster Zeit gezeigt, dass sie selektiv Kainat-Rezeptor-vermittelte Ströme desensitisiert (Zhou et al. 1997).

Kainat löst am Kainat-Rezeptor Ströme aus, die sehr schnell und fast vollständig desensitisieren. Am AMPA-Rezeptor löst Kainat ebenfalls Ströme aus, diese desensitisieren aber nicht vollständig und mit einer längeren Zeitkonstanten. Einigen Autoren gilt nur als Kainat Strom, was nicht durch Gyki 53655, einen hoch spezifischen AMPA-Antagonisten, zu blockieren ist. (Lerma et al. 2001)

1.3.2 Glutamat-Rezeptoren in der Retina

Da Photorezeptoren und Bipolarzellen Glutamat als Neurotransmitter verwenden werden auf den postsynaptischen Zellen, also Bipolar- und Horizontalzellen einerseits sowie Amakrinzellen und Ganglienzellen andererseits, Glutamat-Rezeptoren erwartet.

Auf den unterschiedlichen Zelltypen finden sich jeweils verschiedene Untereinheiten der Rezeptoren. Die kinetischen und biophysikalischen Eigenschaften dieser Rezeptoren sind wiederum maßgeblich für die zeitliche Verarbeitung der Lichtsignale. Verschiedene Aspekte des optischen Signals werden so durch Rezeptor-Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften in parallele Signalwege segregiert (Boycott und Wässle 1999, DeVries 2000)

Glutamat-Rezeptoren in der äußeren synaptischen Schicht:

Kainat-Rezeptoren wurden auf OFF-Bipolarzellen und Horizontalzellen gefunden, wobei die verschiedenen Untereinheiten nicht gemeinsam, sondern von unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden (Erdhörnchen: DeVries und Schwartz 1999; Katze: Qin und Pourcho 2001; Karpfen: Schultz et al. 2001; Primaten: Haverkamp et al. 2001a).

AMPA-Rezeptoren wurden ebenfalls auf OFF-Bipolarzellen nachgewiesen (Katze: Morigiwa und Vardi 1999, Qin und Pourcho 1999a; Karpfen: Schultz et

al. 2001), sowie auf Horizontalzellen (Primaten: Haverkamp et al. 2001b). AMPA-Rezeptoren wurden auch auf ON-Bipolarzellen und Stäbchenbipolarzellen gefunden (Katze: Morigiwa und Vardi 1999). Bei Maus und Ratte wurden AMPA-Rezeptoren auf OFF- Zapfenbipolarzellen, Horizontalzellen und überraschend auch auf Stäbchenbipolarzellen gefunden (Hack et al. 2001).

Glutamat-Rezeptoren in der inneren synaptischen Schicht:

In der IPL sind die Verhältnisse weniger genau bekannt. Alle Untereinheiten von ionotropen Glutamat-Rezeptoren konnten auch in der IPL nachgewiesen werden, wo sie von Amakrin- und Ganglienzellen exprimiert werden (Brandstätter et al. 1997, Qin und Pourcho 1996, Qin und Pourcho 1999b, Qin und Pourcho 2001). Ein häufig gefundenes Phänomen ist, dass postsynaptisch zu den Bandsynapsen der Bipolarzellen nur eine postsynaptische Zelle einer Diade einen jeweiligen Rezeptor exprimiert (Brandstätter et al. 1997)

NMDA-Rezeptoren wurden vor allem auf Amakrinzellen gefunden die postsynaptisch zu Zapfenbipolarzellen sind (Fletcher et al. 2000).

AMPA-Rezeptoren werden, während der Ontogenese, in der Retina schon vor der Bildung der Synapsen exprimiert. Eine Beteiligung an der Bildung der retinalen Signalwege ist damit sehr wahrscheinlich (Grunder et al. 2000).

1.4 Elektrische Synapsen

Elektrische Synapsen sind Zell-Zellkontakte mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 50-150 pS (Witkovsky et al. 1983, Bennett et al. 1991). Zwei Zellen bilden hierbei gemeinsame Komplexe aus 12 Connexinen, jeweils sechs - ein Connexon - in jeder Zellmembran (Abbildung 1-3). Die Connexone liegen derartig gegenüber, dass die Kanallumen miteinander in Verbindung stehen (Makowski et al. 1977). Die Kanäle sind in Feldern aggregiert, bei welchen die beiden Zellen sich auf 3,5 nm annähern. In diesen Feldern sind 2000-8000 Kanäle pro Quadrat Mikrometer Fläche angeordnet (Peracchia 1973, Witkovsky et al. 1983, Baldrige et al. 1989). Allerdings wurde bei Mauthner-Zellen von Goldfischen gezeigt, dass dort nur 1-2% der Kanäle einer elektrischen Synapse gleichzeitig geöffnet sind (Lin und Faber 1988).

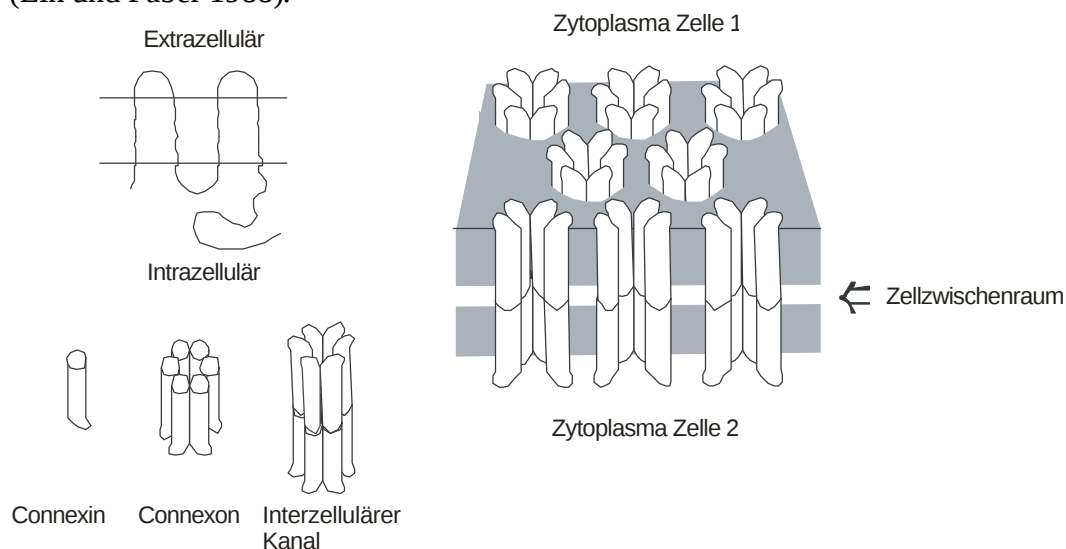


Abbildung 1-3 zeigt die Anordnung der Connexine in einer elektrischen Synapse.

Elektrische Synapsen sind entweder symmetrisch, d.h. sie leiten in beide Richtungen mit gleichem Widerstand oder sie sind asymmetrisch (beziehungsweise gleichrichtend), wobei sich der elektrische Widerstand von Zelle A nach Zelle B deutlich von dem in umgekehrter Richtung unterscheidet. Zellen die über elektrische Synapsen miteinander in Verbindung stehen sind nicht nur elektrisch sondern auch metabolisch gekoppelt, da Moleküle bis zu einer Größe von 1000 Dalton die Kanäle passieren können (Bruzzone et al. 1996). Diese Eigenschaft macht man sich zunutze, wenn man Zellen auf elektrische Synapsen untersuchen will. Man injiziert einen niedermolekularen Farbstoff in eine Zelle und beobachtet die Diffusion desselben in andere, gekoppelte Zellen. Elektrische Synapsen sind dabei keineswegs statisch, die Kanäle werden über eine Reihe von Parametern (Ca^{2+} , pH, cAMP-Konzentration, Dopamin, NO, Membranpotential) reguliert. Im Genom der Maus sind 15 verschiedene Connexine identifiziert worden, diese werden mit Cx + einer Zahl, die das molekulare Gewicht in Kilo Dalton angibt bezeichnet (z.B. Cx26 oder Cx45). Die einzelnen Connexine besitzen jeweils vier Membran-durchspannende Domänen, wobei der N- sowie der C-Terminus intrazellulär zu finden sind (Abbildung 1-3).

1.4.1 Elektrische Synapsen in der Retina

Elektrische Synapsen sind in der Retina sehr häufig. Photorezeptoren, Horizontalzellen, Bipolarzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen sind über Connexine miteinander verbunden. Zum Teil bilden die Zellen riesige Netzwerke von miteinander verbundenen Zellen (zur Übersicht siehe Vaney 1994). Das Vorhandensein einer elektrischen Synapse gibt dabei noch nicht eindeutig über die elektrische Koppelung zweier Zellen Aufschluss. Elektrische Synapsen werden (gerade auch in der Retina) häufig über Farbstoff-Koppelung nachgewiesen und nicht über gleichzeitige elektrische Ableitung der in Frage kommenden Zellen. Das wäre die Methode der Wahl um elektrische Verbindungen als solche zu untersuchen.

Photorezeptoren sind homolog und heterolog gekoppelt (Raviola und Gilula 1973), Horizontalzellen sind bei allen Vertebraten homolog gekoppelt (zur Übersicht siehe Piccolino et al. 1987, Sakai und Naka 1988 und Yagi und Kaneko 1987).

Zapfenbipolarzellen sind zumindest teilweise miteinander gekoppelt (Mills 1999). Bei Ganglienzellen konnte ebenfalls Farbstoffkoppelung nachgewiesen werden; sowohl zwischen Ganglienzellen als auch zwischen Ganglienzellen und Amakrinzellen (Vaney 1999, Xin und Bloomfield 1997).

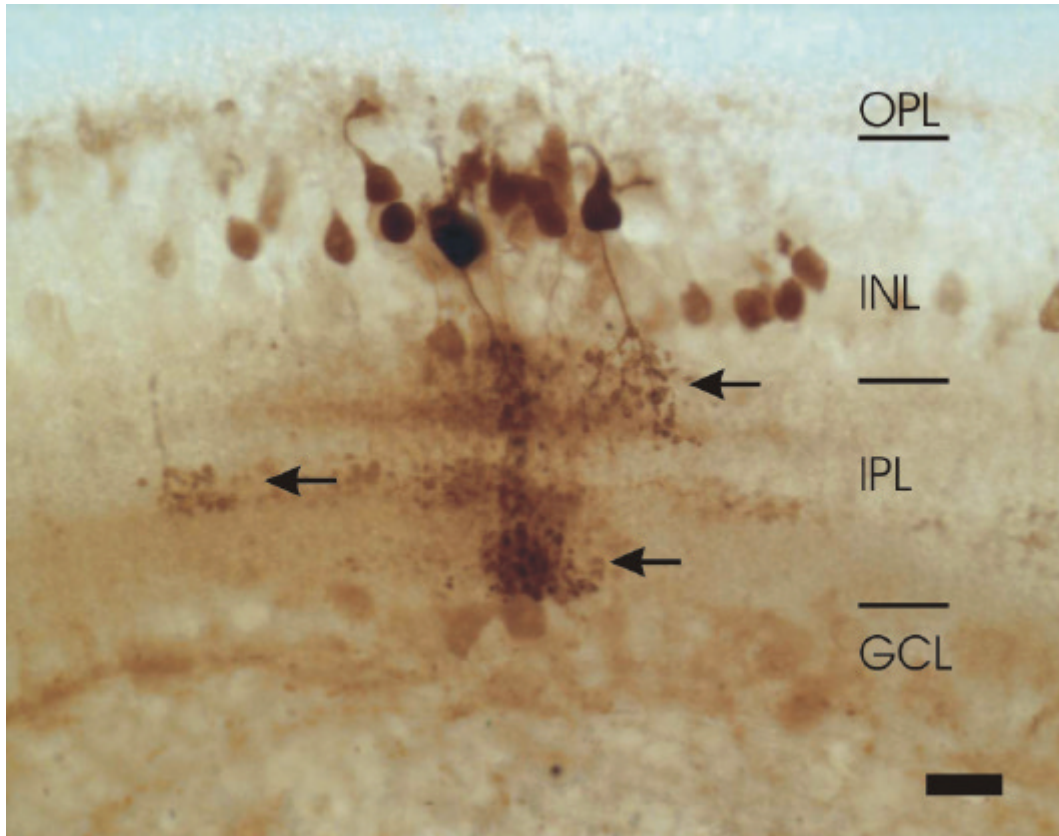


Abbildung 1-4 zeigt farbstoffgekoppelte Zellen in einem Radialschnitt der Retina. Nur eine Zelle wurde über die Ableitelektrode mit Farbstoff gefüllt. Offensichtlich sind verschiedene Zelltypen (heterologe Kopplung) über elektrische Synapsen mit dieser Zelle und untereinander verbunden. Die Somata der gefüllten Zellen liegen in der INL. Mindestens drei Ebenen der Stratifizierung lassen sich in der IPL unterscheiden (Pfeile). Skala 10µm.

1.5 All Amakrinzellen

Kolb und Famiglietti zeigten 1974 dass die AII Amakrinzelle ein Interneuron der Stäbchenbahn ist. Von den zirka 30 Amakrinzell-Typen sind vier im Detail beschrieben. Davon wiederum Typ AII am ausführlichsten (MacNeil und Masland 1998). Beim Kaninchen sind etwa 12,5% aller Amakrinzellen vom Typ AII (MacNeil und Masland 1998, Katze 10%; Ratte 8-9%, Wässle et al. 1993). Andere Typen von Amakrinzellen umfassen weniger als 5% der Gesamtpopulation.

1.5.1 Anatomie

Das vergleichsweise kleine Soma (~7 µm, Maus, eigene Daten) liegt am inneren Rand der inneren Körnerschicht; von hier zieht ein (selten zwei oder mehr) prägnanter primärer Fortsatz in die innere synaptische Schicht. Die Somata der AII werden in charakteristischer Weise von den Fortsätzen dopaminerge Zellen umringt (Tork und Stone 1979).

Im äußeren Teil der IPL (10%-35% der Schichtdicke der IPL), unweit des Soma, entspringen an dem primären Dendriten kleine keulenförmige Dendriten, welche strahlenförmig in die IPL ziehen; im englischen Sprachraum „lobular appendages“ genannt.

Ein einzelner oder einige wenige primäre Dendriten ziehen in das innere Drittel (55%-85%), wo sich die Fortsätze verzweigen. Diese distalen Dendriten sind von buschiger Gestalt und reichen deutlich weiter von der zentralen Achse der Zelle weg. Mit weniger als 100 µm Durchmesser des Dendritenbaums ist die Zelle ein Vertreter der Kleinfeld-Amakrinzellen, die man solchen mit mittleren und mit großen dendritischen Feldern gegenüberstellt. Die Zelldichte beträgt bei der Ratte 2000-7000 Zellen/mm² (Wässle et al. 1993), was einen Überdeckungsfaktor von etwa 1,5 für die keulenförmigen Fortsätze und 3,5 für die distalen Dendriten ergibt.

Signale von 500 Stäbchen konvergieren auf eine AII Zelle (durch 30 Stäbchenbipolarzellen vermittelt), während das Signal von jedem Stäbchen auf fünf AII divergiert (durch zwei Stäbchenbipolarzellen vermittelt Smith und Vardi 1995, Sterling et al. 1988).

Jede AII erhält etwa 20% ihres Eingangssignals von Zapfenbipolarzellen, 30% von Stäbchenbipolarzellen und 50% von Amakrinzellen (bezogen auf die Anzahl der Synapsen). Das Ausgangssignal wird etwa zu 90% auf Zapfenbipolarzellen übertragen (Strettoi et al. 1992).

Die AII Amakrinzellen bilden untereinander Netzwerke aus. Sie sind über homologe, homotypische elektrische Synapsen aus Connexin Cx36 (Feigenspan et al. 2001, Mills und Massey 1995) untereinander, und darüber hinaus heterologe, heterotypische mit ON-Zapfenbipolarzellen gekoppelt.

1.5.2 Physiologie

AII Amakrinzellen reagieren auf einen Lichtreiz mit einer transienten Depolarisation, die nach einigen Millisekunden auf ein leicht depolarisiertes Plateau zurückgeht. Das Abschalten eines Lichtreizes führt zu einer ausgeprägten Hyperpolarisation die eine deutlich langsamere Kinetik zeigt (Katze: Nelson 1982, Kaninchen: Bloomfield 1992, Dacheux und Raviola 1986).

Man nimmt an, dass AII Amakrinzellen das Lichtsignal, welches ihnen von Stäbchenbipolarzellen übermittelt wird durch folgende Signalwege (Abbildung 1-5) in eine ON- und eine OFF-Komponente aufteilen: AII Amakrinzellen schütten, wenn sie selbst depolarisiert werden, an chemischen Synapsen im äußeren Teil der IPL Glyzin aus, welches OFF-Zapfenbipolarzellen hyperpolarisiert (Grünert und Wässle 1996, Sassoe-Pognetto et al. 1994). An dieser Synapse wird aus einer Depolarisation eine Hyperpolarisation, man spricht von Vorzeichen invertierender Synapse oder engl.: „sign inverting synapse“. Im Gegensatz dazu werden ON-Zapfenbipolarzellen, welche durch elektrische Synapsen mit der AII verbunden sind, depolarisiert.

Werden AII Amakrinzellen gehemmt, so setzt sich diese Hyperpolarisation ebenfalls über die elektrischen Synapsen in die ON-Zapfenbipolarzelle fort.

Stäbchenbipolarzellen geben ihre Information als graduiertes Signal an AII Amakrinzellen weiter, sie setzen an einer Bandsynapse permanent Glutamat in Abhängigkeit von der Lichtintensität frei. Auch Zapfenbipolarzellen, die

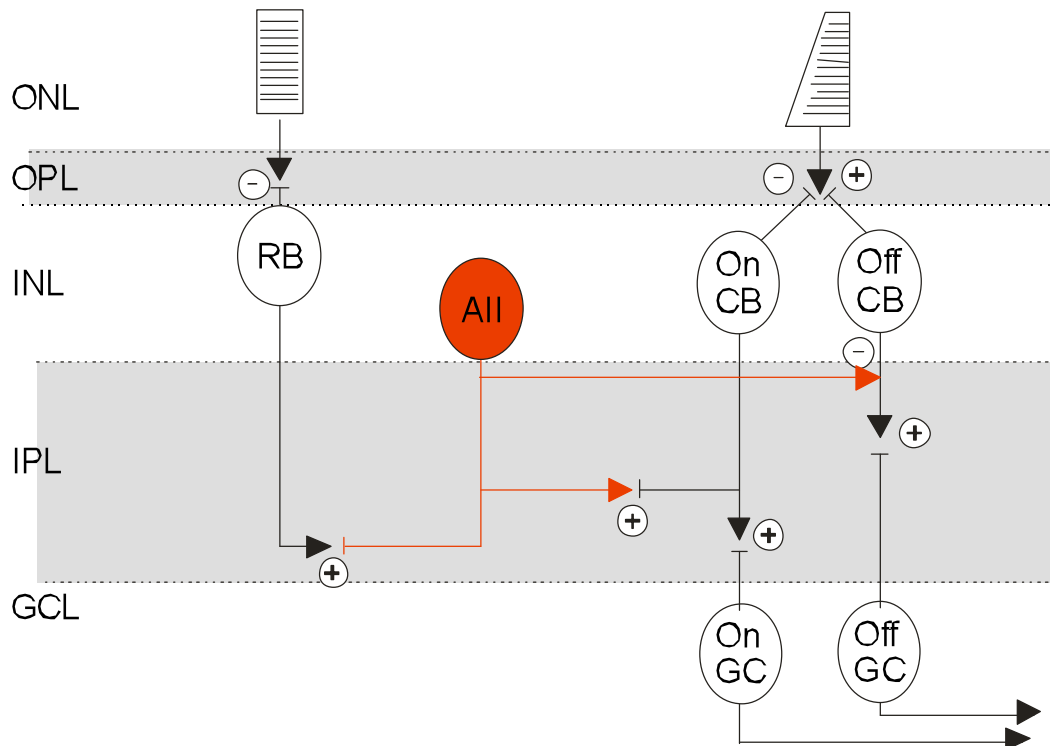


Abbildung 1-5 zeigt die Signalwege in der Retina. Rechts sind die wesentlichen Elemente der Zapfenbahn dargestellt: Zapfen → ON- und OFF-Zapfenbipolarzelle → ON- und OFF-Ganglienzelle. Links die Stäbchenbahn: Stäbchen → Stäbchenbipolarzelle → AII-Amakrinzelle → ON- und OFF-Zapfenbipolarzelle → ON- und OFF-Ganglienzelle. Synapsen, die das Vorzeichen erhalten, sind mit einem Plus (+) gekennzeichnet, solche die das Vorzeichen invertieren, mit einem Minus (-). Die synaptischen Schichten sind grau hinterlegt. Die Abbildung ist grob schematisch und lässt aus Gründen der Übersichtlichkeit wesentliche Teile unberücksichtigt. RB = rod bipolar; CB = cone bipolar; GC = ganglien cell.

postsynaptisch zur AII sind, zeigen gradierte Potentiale. Andererseits sind bei AII Amakrinzellen Aktionspotentiale nachgewiesen (Boos et al. 1993, Nelson 1982, Smith und Vardi 1995).

Ob AII Amakrinzellen Neuronen mit gradiertem Membranpotential sind die auch Aktionspotentiale generieren oder sich in verschiedenen Adaptationszuständen der Retina unterschiedlich verhalten ist zur Zeit unklar.

1.5.2.1 Spannungsgesteuerte Kanäle auf AII Amakrinzellen

Boos et al. konnten 1993 bei AII Amakrinzellen der Ratte sowohl Natrium- als auch Kaliumströme messen. Die gefundenen Na^+ -Ströme aktivierten bei einem Potential von unter -60 mV .

Die Kaliumströme (mit Amplituden bis zu 4 nA) die Boos et al. beschreiben, entsprechen zwei unterschiedlichen K^+ Kanälen einem transienten und einem phasischen.

Kalziumströme der AII Amakrinzellen wurden in der Arbeit von Boos et al. nicht untersucht.

1.5.2.2 Glutamat-Rezeptoren auf AII Amakrinzellen

In der selben Arbeit, (Boos et al. 1993) beschreiben die Autoren ligandenabhängige Ströme. Sie konnten zeigen, dass Glutamat, AMPA und

Kainat, CNQX sensitive Ströme evozieren. Sie konnten keine NMDA-Antworten messen.

In der Rattenretina konnten Hartveit und Veruki 1997 NMDA vermittelte Ströme auf AII Amakrinzellen messen. Diese waren CPP sensitiv, gleichrichtend und hatten ein Umkehrpotential von etwa +5 mV (Hartveit und Veruki 1997).

Immunzytochemisch wurden AMPA-Rezeptoren auf AII Amakrinzellen nachgewiesen (Katze: Qin und Pourcho 1999a GluR2/3; andere Säuger: Ghosh et al. 2001a GluR 2/3 und 4).

Die $\delta 1/2$ Untereinheit des Glutamat-Rezeptors (GluR $\delta 1/2$) konnten von Brandstätter et al. (1997) auf AII Amakrinzellen in der Rattenretina nachgewiesen werden. Bei Makaken konnten Ghosh et al. (2001) GluR $\delta 1/2$ nicht auf AII finden. Diese Proteine gehören zu der Familie der ionotropen Glutamat-Rezeptoren, bilden aber wahrscheinlich keine funktionierenden Ionenkanäle. Es wird diskutiert, ob sie modulatorische Eigenschaften aufweisen (Villmann EJNS 99). Wegen der unbekannten Funktion werden diese Proteine auch als „Orphan“-Rezeptor bezeichnet (engl.: orphan, das Waisenkind).

1.5.2.3 Elektrische Synapsen auf AII Amakrinzellen

Schon 1974 zeigten Kolb und Famiglietti, dass AII Amakrinzellen homolog (d.h. mit anderen AII) und mit Zapfenbipolarzellen heterolog gekoppelt sind (siehe auch Vaney 1991, Vardi et al. 1989). Mills und Massey konnten 1995 zeigen, dass es sich um zwei Typen von elektrischen Synapsen handelt und dass diese unterschiedlich reguliert werden. Zyklisches GMP spielt dabei eine entscheidende Rolle. Es akkumuliert unter photopischen Bedingungen in ON-Zapfenbipolarzellen durch die verringerte Aktivierung von mGluR6 und schließt die elektrischen Synapsen zu den AII Amakrinzelle. So spielen elektrische Synapsen zwischen AII Amakrinzelle und ON-Zapfenbipolarzellen wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Lichtadaptation der Retina.

Heute wissen wir, dass AII Amakrinzellen Cx36 exprimieren (Feigenspan et al. 2001) und damit homotypische (also nur aus Cx36 zusammengesetzte) als auch heterotypische elektrische Synapsen bildet, diese liegen vor allem in den inneren zwei Dritteln der IPL aber auch auf den Somata. Vardi und Smith zeigten 1996 elektrische Synapsen zwischen AII Somata bei der Katze mit einer Größe bis zu $5 \mu\text{m}^2$ (arithmetisches Mittel = $2 \mu\text{m}^2 \pm 2 \mu\text{m}^2$, n=13).

Elektrische Synapsen könnten das Verhältnis vom Signal zum Rauschen verbessern (Lamb und Simon 1976, Tessier-Lavigne und Attwell 1988), da das Rauschen unkorreliert, das Signal eines Photons aber korreliert über fünf Bipolarzellen gleichzeitig das AII Netzwerk erreicht. Außerdem besitzen die AII Amakrinzellen spannungsabhängige Natrium- und Kaliumkanäle und verfügen somit potentiell über einen Mechanismus um zwischen unter- und überschwelligen Signalen zu unterscheiden (Smith und Vardi 1995).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, die Signalverarbeitung bei AII Amakrinzellen besser zu verstehen. Dazu wurden insbesondere die Glutamat-Rezeptoren der Eingangssynapsen sowie die Kalziumkanäle der chemischen Ausgangssynapsen experimentell untersucht.

AII Amakrinzellen spielen eine herausragende Rolle bei der Verarbeitung optischer Reize unter skotopischen Bedingungen. Ihre präsynaptischen Neurone zeigen graduierte Potentiale während sie selbst Natrium getragene Aktionspotentiale zeigen (Boos et al. 1993). Insofern könnten AII Amakrinzellen ein Grenzfall zwischen „spikenden“ Neuronen mit echten Aktionspotentialen einerseits und Neuronen mit graduiertem Membranpotential andererseits sein.

Kalziumkanäle auf AII Amakrinzellen sollten physiologisch und pharmakologisch untersucht werden. Die Frage, welche Typen von Kalziumkanälen von AII Amakrinzellen exprimiert werden, sollte beantwortet werden. Durch fluorimetrische Messungen sollten diese Kalziumströme subzellulär lokalisiert werden.

Ionotrope Glutamat-Rezeptoren auf AII Amakrinzellen sollten ebenfalls physiologisch und pharmakologisch charakterisiert und ihre biophysikalischen Eigenschaften untersucht werden. Durch fluorimetrische Messungen sollten die Rezeptoren subzellulär lokalisiert werden.

Da bereits zahlreiche experimentelle Befunde an AII Amakrinzellen aus verschiedenen Spezies vorliegen, ließen sich die gefundenen Ergebnisse sinnvoll in bestehende Konzepte einarbeiten. Die charakteristische Anatomie dieser Zellen machte es zudem möglich mit sehr hoher Erfolgsrate gezielt von diesen abzuleiten und damit in überschaubarer Zeit eine Datenbasis zu schaffen, die quantitative Bewertungen zuließ.

Um bei kommenden Untersuchungen von gentechnisch veränderten Maus-Modellorganismen profitieren zu können wurde die Maus als Versuchstier gewählt. Erste solche Wildtyp/Mutanten-Untersuchungen werden hier beispielhaft an der spontanen Reeler Maus-Mutanten vorgestellt.

Einige Ergebnisse von A17 Amakrinzellen sollen die Ergebnisse zu AII Amakrinzellen ergänzen. Da es beim Versuch gezielt von AII Zellen abzuleiten - trotz hoher Erfolgsquoten- immer wieder zu Ableitungen von „falschen“ Zellen gekommen ist, andererseits über diesen Zelltyp nicht viel bekannt ist, sollen diese Ergebnisse nur qualitativ vorgestellt werden. In der Diskussion werden sie nur am Rande berücksichtigt werden.

Ein Ausblick auf die Möglichkeiten künftiger experimenteller Ansätze soll abschließend gegeben werden.

So ging der Geist, wohin das Sehen zeigte.
HANS JONAS

2 Material und Methode

2.1 Versuchstiere

Die Mäuse, die bei den Versuchen verwendet wurden, entstammten der institutseigenen Zucht. Es handelte sich um Mäuse des Stammes C57/bl6 im Alter von 5-8 Wochen. Die Reeler Mäuse wurden von Herrn Dr. Drakev von der Universität Freiburg zur Verfügung gestellt. Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet.

2.2 Präparation der Retina

Ein rechteckiges Stück Retina wurde im Zuge der Präparation in Agarose eingebettet und mit einem Vibratom in 200 µm dicke Radialschnitte zerteilt. Dies geschah rasch und in begastem AMES Medium, um die Zellen möglichst nahe an der *in vivo* Situation studieren zu können (Ames III und Nesbett 1981).

2.2.1 Ektomie der Retina

Den Mäusen wurde sofort nach der Tötung ein Auge, in der Regel das linke, entnommen. Die Ektomie des Auges gelang problemlos. Das Fell wurde mit Daumen und Zeigefinger über den Schädel gestrafft und mit einem Schnitt von der Augenhöhle zur Nase eingeschnitten. Das Auge trat dabei deutlich aus dem Schädel hervor, wurde durch einen flach geführten Schnitt mit einer gebogenen Schere von der Augenmuskulatur getrennt und wurde sofort in begastem AMES Medium überführt.

In einer mit AMES Medium gefüllten Petrischale wurde unter der Stereolupe, bei sechzehnfacher Vergrößerung, das Auge mit einer spitzen Skalpellklinge angestochen. Mit einer Schere wurde das Auge entlang der Ora Serata in eine vordere und eine hintere Hälfte geschnitten. Die Linse verblieb dabei meist im hinteren Augenbecher, aus dem sie vorsichtig entfernt wurde. Mit einem Raspatorium wurde die Retina von der Sklera getrennt. Das Pigmentepithel verblieb dabei zum größten Teil im Augenbecher. Ein möglichst zentraler, unverletzter Teil der Retina wurde zu einem etwa 1 mal 2 mm großen Rechteck zurecht geschnitten.

2.2.2 Schneiden der eingebetteten Retina am Vibratom

Agarose, aus 400 mg AGAR (Sigma A-7002) 18 ml AMES Medium (SIGMA A-1420) und 2 ml Aqua destillata, unmittelbar vor der Präparation gekocht, diente bei 36°-37°C zur Einbettung der Retinastücke. Die Agarose wurde nach dem Erstarren zu einem Würfel, der die Retina enthielt, geschnitten. Dieser Agarosewürfel wurde mit Uhu-Sekunden-Alleskleber (Lösungsmittelfrei) auf dem Halteblock eines Vibratoms (D.S.K., Kyoto, Japan) geklebt und in 200 µm dicke Scheiben geschnitten. Der Agarosewürfel wurde dabei so im Vibratom

positioniert und geschnitten, dass die Retina radial geschnitten wurde. Von diesen Radialschnitten wurden pro Präparation etwa sechs bis acht Stück gewonnen.

Die Radialschnitte wurden in AMES Medium in einem Vorratsbecher aufbewahrt, das Medium wurde dabei permanent mit Gasgemisch aus 5% CO₂ und 95% O₂ begast. Zu einem Versuch wurde jeweils ein einziger Radialschnitt verwendet. Dieser wurde mit einer hitzepolierten Pasteurpipette in die Probenkammer überführt und mit einem mit Zahnseide bespannten U-förmigen Platin-Iridium-Rahmen beschwert. Jeder Retinaschnitt wurde nur zu einem Experiment verwendet.

Um den Zustand, den das Gewebe nach der Präparation aufwies zu verbessern, wurde zum Teil mit gekühlten Lösungen gearbeitet. Es zeigte sich aber, dass dies nur bei besonders hohen Raumtemperaturen (über 23°C) erforderlich, und dann eine moderate Kühlung vorzuziehen war.

2.3 Versuchsaapparatur

Die Probenkammer mit dem Radialschnitt wurde auf einen Mikroskop - Kreuztisch montiert. Das Gewebe wurde permanent mit ein bis zwei Millilitern Medium pro Minute überspült. Ein regulierbarer, hydrostatischer Zulauf diente zur Kontrolle der Flussrate.

Die Lösungen hatten Raumtemperatur (18°-25°C). Auf der dem Zulauf gegenüberliegenden Seite der Kammer wurde die Lösung durch eine Peristaltikpumpe abgesaugt.

Das aufrechte Mikroskop, Axioplan (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) war mit Normaski-Optik und einem 63x Objektiv sowie 16x Okularen ausgestattet. Es stand auf einem schwingungsgedämpften Tisch innerhalb eines Faraday'schen Käfigs. Bei der Fokussierung wurde der Tubus des Mikroskops bewegt, der Mikroskoptisch war fest montiert.

Ein Mikromanipulator wurde verwendet um eine auf einen Vorverstärker gesteckte Pipette in der Badlösung zu bewegen. Der Vorverstärker war mit einem „patch-clamp“ Verstärker verbunden.

Der Messstand war mit diesem Verstärker und mit einem System zur fluorimetrischen Beobachtung von Kalziumsignalen ausgestattet.

Die wesentlichen Bestandteile dieses Systems waren: ein Monochromator, der das Licht einer 150 W Xenon-Lichtbogenlampe durch ein Interferenzgitter in seine spektralen Bestandteile aufteilte und über einen Lichtleiter in das Mikroskop einspeiste. Ein Farbteiler spiegelte das monochromatische Licht von oben auf das Präparat und ließ das langwelligere, vom Farbstoff emittierte Licht durch zu einem Restlichtverstärker. Dieser war unmittelbar einer 8 Bit CCD Kamera vorgeschaltet die das Signal analog aufnahm und an einen Rechner weiterleitete. Dort wurden die Daten digitalisiert und in Form kurzer Bildsequenzen abgespeichert. Die Bildrate lag dabei zwischen ein und zehn Bildern pro Sekunde.

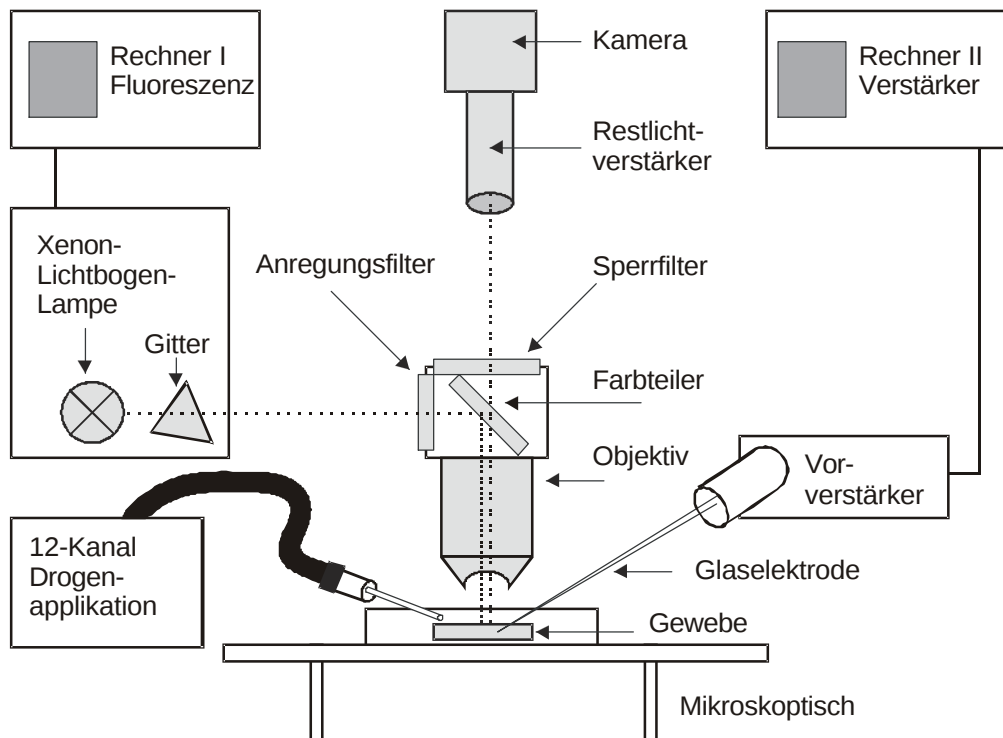


Abbildung 2-1 zeigt eine schematische Darstellung der Versuchsanordnung. Eine Xenon-Lichtbogenlampe strahlt über ein Interferenzgitter monochromatisches Licht in das Mikroskop ein, wo es von oben auf das Präparat gespiegelt wird. Vom Fluoreszenzfarbstoff emittiertes Licht gelangt über die Mikroskopoptik in einen Restlichtverstärker und weiter in eine Kamera. Ein Rechner (PC) steuert Monochromator und Kamera, ein zweiter PC Verstärker und Vorverstärker und ein dritter PC das 12-Kanal-Applikations-System.

Ein 12 Kanal Applikationssystem stand darüber hinaus zur fokalen Applikation von Wirksubstanzen zur Verfügung. Es wurde über einen dritten Rechner angesteuert. Die Rechner waren untereinander verbunden um Versuchsprotokolle von einer zentralen Stelle aus starten zu können.

2.3.1 Elektrophysiologie

Die elektrophysiologischen Ableitungen wurden in der Ganzzellkonfiguration der „patch-clamp“ Technik in der Spannungs-klemme durchgeführt (Hamill et al. 1981). Durch Veränderungen der Kommandospannung, und damit der Membranspannung, und durch gezielte Applikation von Wirksubstanzen wurden Ionenströme ausgelöst. Diese Ströme wurden digitalisiert aufgezeichnet und ausgewertet.

Die Glaselektroden wurden jeweils am Versuchstag angefertigt. Sie wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren ($\varnothing$ 1,5 mm außen, 0,86 mm innen; Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) an einem halbautomatischen Pipettenziehgerät (Zeitz, Augsburg, Deutschland) in zwei Schritten gezogen. Die Spitzen der Elektroden wurden in einem abschließenden Schritt hitzepoliert und hatten, bei Verwendung der Standard Cäsium-Gluconat Intrazellulär-Lösung einen elektrischen Widerstand von 8-12 M Ω .

2.3.1.1 Die Ganzzelleableitung

Die Glaselektroden wurden mit 8 μ l Intrazellulär-Lösung gefüllt, auf den Pipettenhalter aufgesteckt und festgeschraubt. Dabei tauchte eine chlorierte

Silberdraht-Elektrode in die IC-Lösung ein. Der Pipettenhalter war auf einen Vorverstärker aufgesteckt, der seinerseits auf einem Mikromanipulator montiert war (Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland). Die Badlösung in der Probenkammer war über eine Silberchlorid Elektrode mit dem Vorverstärker verbunden und wurde so geerdet.

Der Vorverstärker war mit einem Patch-Clamp-Verstärker (EPC9, HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) verbunden. Dieser war an einen Rechner angeschlossen der in Verbindung mit dem Programm PULSE V 8.3 sowohl für die Steuerung des Verstärkers als auch zur Anzeige und Speicherung der digitalisierten Daten verwendet wurde.

Die nach dem Eintauchen der Glaselektrode ins Bad auftretenden unspezifischen Potentiale wurden am Verstärker automatisch abgeglichen. Da bei diesem Vorgehen auch die Diffusionspotentiale zwischen Intrazellulär- und Extrazellulär-Lösung korrigiert wurden, diese aber nach Ausbildung der $G\Omega$ Widerstandes zwischen Pipette und Zelle wegfallen, wurde das Diffusionspotential nachträglich wieder vom Haltepotential subtrahiert. Das Diffusionspotential wurde gemessen (12 mV) und mit dem Programm JPCalc (Barry 1994) berechnet (13 mV). Bei den nachträglichen Korrekturen wurde ein Wert von 12,5 mV verwendet.

Die Glaselektrode wurde zunächst im Bad grob über dem Gewebe positioniert und dann mit einem Mikromanipulator langsam unter mikroskopischer Kontrolle an die zu untersuchende Zelle herangeführt. In dieser Phase des Experiments wurde ein leichter Überdruck in der Elektrode, die über einen Schlauch mit einem Mundstück verbunden war, erzeugt. Die Glaselektrode wurde senkrecht von oben auf die Zellmembran aufgesetzt, wobei eine leichte Eindellung in der Membran zu sehen war. Das war der Moment, den Überdruck, durch saugen am Mundstück, in einen leichten Unterdruck umzukehren. Die Zellmembran dichtete dabei sofort mit dem Rand der Glaselektrode ab und es entstanden elektrische Widerstände im Bereich von mehreren $G\Omega$. Die jetzt zu beobachtenden kapazitiven Artefakte wurden durch den Verstärker automatisch kompensiert.

Um von der so gebildeten „cell-attached“ Konfiguration zur Ganzzellableitung zu gelangen, musste das Stück Zellmembran, welches von der Pipette eingeschlossen war, aufgerissen werden. Dazu wurde, wiederum über das Mundstück, ein Saugstoß an die Zelle angelegt, bis diese schließlich aufriss. Neuerliche kapazitative Artefakte, die nach dem Aufreißen der Zelle auftraten, wurden halbautomatisch am Verstärker kompensiert und während des Experiments gegebenenfalls nachjustiert. Die Serienwiderstände der Zellen lagen zwischen 30 und 100 $M\Omega$.

2.3.1.2 Protokolle zur Untersuchung spannungsgesteuerter Kanäle

Spannungsgesteuerte Kanäle wurden durch Sprungprotokolle und kontinuierliche Veränderungen in der Membranspannung (Spannungsrampen) untersucht. Bei den Sprungprotokollen wurde die Sollspannung bei aufeinander folgenden Sprüngen auf zunehmend depolarisierte Potentiale geklemmt. Also von einem Haltepotential von zum Beispiel -95 mV auf -85 mV im ersten Sprung, -75 mV im zweiten und so weiter. Die Amplituden der aktivierten Ströme wurden als Funktion der Spannung in Strom-Spannungs-Kennlinien aufgetragen.

Bei den Sprüngen auftretende kapazitative Artefakte und unspezifische Leckströme wurden automatisch subtrahiert. Dies wurde durch ein P/n Protokoll

realisiert. Bei einem P/n Protokoll springt, nach dem Sprung auf das zu untersuchende Potentiale, die Spannung P mal auf Potentiale die um den Faktor n kleiner sind als der zu untersuchende Sprung. Die gemessenen Ströme werden mit dem Faktor n multipliziert und von dem Strom abgezogen der bei den Sprung auf das zu untersuchende Potential auftrat. Die Parameter P und n wurden so gewählt, dass keine spannungsabhängigen Kanäle durch die der Messung folgenden Sprünge ausgelöst wurden.

Bei den Spannungsrampen wurde die Kommandospannung kontinuierlich vom Haltepotential aus depolarisiert, (0,5 V/s). Leckströme wurden als linear angenommen und aus dem Verlauf der Strom-Spannungs-Kennlinie unterhalb der Aktivierungsschwelle spezifischer Leitfähigkeiten berechnet.

Die Sammelfrequenz lag bei allen Aufzeichnungen zwischen fünf und 20 kHz.

2.3.2 Kalziumfluorimetrie

Die Veränderungen der Fluoreszenzintensität von Kalziumindikatorfarbstoffen wurden in Abhängigkeit von der Membranspannung und als Reaktion auf die Applikation verschiedener Wirkstoffe untersucht. Die Indikatorfarbstoffe wurden über die Ableitelektrode in die Zellen eingebracht.

Kalziumindikatorfarbstoffe verändern ihre fluoreszierenden Eigenschaften in Abhängigkeit von der Kalziumionenkonzentration der sie umgebenden Lösung. Die Lage des Emissionsmaximums innerhalb des Spektrums verändert sich dabei nicht mit der $[CA^{2+}]_i$ sondern nur dessen Amplitude.

Verwendet wurden unter anderem *Oregon Green 488 BAPTA 5N* sowie *Calcium Green 1* und *Oregon Green 488 BAPTA-2* (alle Molecular Probes, Oregon, USA). Unterschiedliche Indikatoren zeichnen sich durch unterschiedlich große Affinitäten zum Kalzium aus (siehe Tabelle 2). Es wurde mit Farbstoffkonzentration von 100 bis 250 μM gearbeitet. Alle in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse wurden mit einer Konzentration von 200 μM gemessen.

Tabelle 2 zeigt K_D -Werte verschiedener Kalziumindikatoren.

Calcium Green 1	190 nM
Oregon Green 2	580 nM
Oregon Green 5N	20 μM
Mag Fluo 4	22 μM

2.4 Die Färbung mit Diaminobenzidin

Das Gewebe wurde zum Teil nach den elektrophysiologisch-fluorimetrischen Messungen noch anatomisch aufgearbeitet um die abgeleiteten Zellen sichtbar zu machen und sie aufgrund ihrer Morphologie genauer zu klassifizieren.

Dazu wurde das 15-20 Minuten in Paraformaldehyd fixierte Gewebe mit Phosphatpuffer gewaschen (2 mal 15 Minuten), eine Stunde in 5% Triton inkubiert, wieder gewaschen (3 mal 15 Minuten), ein bis zwei Stunden in Peroxidase gekoppeltem Extravidin (1:200) inkubiert und ein weiteres Mal gewaschen (3 mal 15 Minuten).

Danach folgte die eigentliche histochemische Färbung mit 0,05% Diaminobenzidin (DAB) und 0,02% Wasserstoffsuperoxyd (H_2O_2). Bei diesem

letzten Schritt wurde das Gewebe unter der Stereolupe permanent beobachtet, um ein Überfärben zu vermeiden.

Abschließend wurden die Retinaschnitte in Phosphatpuffer gewaschen (3 mal 15 Minuten). Die Schnitte wurden in Aqua-Polymount (Polysciences, Inc., Warrington, USA) eingebettet (Horikawa und Armstrong 1988, Vaney 1992).

2.5 Datenanalyse

Die elektrophysiologischen Daten wurden mit dem Programm PULSE (HEKA, Lambrecht, Deutschland) aufgezeichnet und gespeichert.

Die Kalziumfluorimetrie wurde mit dem Programm MERLIN (LSR, London, Großbritannien) durchgeführt. Auch hier wurden die Daten als Rohdaten gespeichert.

Zur Auswertung der gewonnenen Daten wurde das Programm IGOR_{Pro} 4.0 (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, Oregon, USA) verwendet. Die dazu notwendigen Auswertalgorithmen wurden zum Teil selbst programmiert.

Die Amplituden der durch Spannungssprünge induzierten Ströme wurden als deren Mittelwerte 5 ms - 25 ms nach dem Beginn des Spannungssprunges berechnet.

Die Pharmakologie der spannungsgesteuerten Ströme wurde an normalisierten Ladungen untersucht. Dazu wurden die unter Kontrollbedingungen gemessene Ladungsmenge gleich eins gesetzt. Meßwerte wurden als arithmetisches Mittel $\pm$ Standardabweichung angegeben.

Durch gleichzeitige Applikation von Wirksubstanzen und kontinuierlicher Veränderung der Membranspannung (Spannungsrampen, 250 ms, 0,5 V/S) wurden Umkehrpotentiale bestimmt. Als Umkehrpotentiale wurden Potential bezeichnet, bei denen kein messbarer Nettostrom über die Membran floss.

Eine Spannungsrampe, unmittelbar vor der Applikation, diente dazu unspezifische Membranströme auszulösen. Diese unspezifischen Ströme wurden von den Strömen die unter dem Einfluss der Wirksubstanzen gemessen wurden abgezogen. Der so berechnete Strom kann als „Nettostrom“ betrachtet werden der durch die Applikation der Wirksubstanz ausgelöst wurde.

Von den gefundenen Umkehrpotentialen wurde auf die Ionen geschlossen, welche die evozierten Ströme trugen.

2.5.1 Die Berechnung von $\Delta F/F$

Um zu beurteilen ob ein Stimulus eine Veränderung in der Fluoreszenz einer Zelle ausgelöst hatte, wurden in den aufgezeichneten Filmsequenzen vier kleine, meist runde Fenster von besonderem Interesse definiert. Je eines über dem Soma, den keulenförmigen Fortsätzen, den distalen Dendriten und über einer weiteren Region zwischen den beiden letztgenannten. Diese vier Fenster wurden durch vier weitere ergänzt, die außerhalb der Zelle lagen und später zu einem Wert für die Hintergrundfluoreszenz verrechnet wurden. Die Graustufen der einzelnen Bildpunkte innerhalb der definierten Regionen wurden in jedem Bild zum arithmetischen Mittel verrechnet. Diese arithmetischen Mittelwerte ergaben die Intensität der Fluoreszenz in einem Zellkompartiment gegen die Zeit aufgetragen. Die Werte der Rohdaten lagen zwischen 0 und 255 entsprechend der 8 Bit Kamera.

Um nicht die absolute Höhe der Fluoreszenz F , sondern deren Veränderung ΔF zu betrachten wurden diese Werte durch die Ruhefluoreszenz F_0 dividiert. Die Messung wurde für die Hintergrundfluoreszenz F_h korrigiert, wobei die Hintergrundfluoreszenz aus 4 peripheren Gebieten berechnet wurde.

$$\Delta F / F = \frac{(F_i - F_0)}{(F_0 - F_h)}$$

Die so erhaltenen Werte für relative Veränderungen wurden mit 100 multipliziert um die Veränderung in Prozent zu erhalten.

2.6 Die verwendeten Lösungen

Bei allen Experimenten wurde eine auf Cäsium-Gluconat basierende Intrazellulär-Lösung verwendet. Die Bestandteile waren im Einzelnen:

Cäsium-Gluconat	106 mM
MgCl ₂	4,6 mM
TBA	10 mM
HEPES	30 mM
Na-ATP	4 mM
Na-GTP	0,5 mM

Der pH-Wert wurde mit CsOH auf 7,28-7,3, die Osmolarität durch Zugabe von H₂O auf 290 Milliosmol eingestellt.

In dieser Lösung wurden an Stelle von Kaliumionen Cäsiumionen eingesetzt. Diese dienen, zusammen mit TBA, dazu etwaige Kaliumkanäle zu blockieren. Gluconat ersetzt die organischen Anionen, es wurde Chlorid vorgezogen, um die Chloridkonzentration in der Zelle in einem möglichst physiologischen Bereich zu halten. HEPES stabilisiert den pH-Wert und puffert diesen gegen Veränderungen ab. ATP und GTP dienen allen metabolischen Prozessen in der Zelle als Energielieferant und darüber hinaus als Ausgangssubstanz für zelluläre Botenstoffe.

Dieser Lösung wurden unmittelbar vor dem Experiment noch Neurobiotin (Endkonzentration 1%) und ein Kalziumindikatorfarbstoff (100-250 µM siehe auch Kapitel 2.3.2) zugesetzt.

AMES Medium (SIGMA A1420) ist eine NaCl-Lösung. Diese wurde 1981 entwickelt um die Kaninchen Retina unter physiologischen Bedingungen zu halten (Ames III und Nesbett 1981). Ein Liter destilliertes Wasser wurde an jedem Experimentiertag frisch mit 5% CO₂ und 95% O₂ für mindestens 30 Minuten begast, bevor 1,9 Gramm Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) zugegeben wurden. Nach weiteren mindestens 15 Minuten wurden 8,9 Gramm AMES-Pulver zugegeben.

Die wichtigsten Bestandteile sind:

NaCl	120 mM
KCl	3 mM
CaCl ₂	1,5 mM
MgSO ₄	1,24 mM
NaHCO ₃	22,5 mM
KH ₂ PO ₄	0,5 mM
D-Glucose	6 mM
Glutamat	8 µM
Glyzin	6 µM

AMES Medium enthält darüber hinaus weitere Aminosäuren und Vitamine.

2.6.1 Badapplikation

Kleinere Mengen AMES Medium konnten auf bis zu acht 50 ml Spritzen aufgeteilt werden. Diese, über einen acht Wege Hahn mit der Probenkammer verbunden, dienten als Vorratsbehälter für verschiedene Badlösungen zwischen welchen schnell umgeschaltet werden konnte. Das Medium in diesen Reservoirs war mit unterschiedlichen Wirksubstanzen (meist Neurotransmitter-Antagonisten) angereichert. Die Neurotransmitter-Antagonisten wurden entweder einzeln oder in Gemischen aus bis zu vier Wirksubstanzen appliziert.

Im Einzelnen:

Tetrodotoxin	0,5-1 µM,
Bicucullin	10 µM,
Strychnin	1 µM,
Nimodipin	10 µM,
BayK 8644	10 µM,
NBQX	10 µM,
Gyki 52466	20 µM.

Außerdem verwendet, in dieser Dissertation aber nicht gezeigt:

CPP	10 µM,
Cyclothiazid	10 µM.

2.6.2 Applikationssystem

Wirksubstanzen konnten über ein Applikationssystem (DAD-12 Superfusion-System, ALA Scientific Inst. Inc., Westbury, NY, USA) fokal an der zu untersuchenden Zelle appliziert werden. Zwölf parallele Kanäle standen dazu zur Verfügung, ein weiterer diente zur ständigen Perfusion von wirkstofffreier Lösung. Die Applikationen waren rechnergesteuert, erfolgten mittels Druckluft und konnten dabei bis zu 1ms kurz sein. Die Menge an Wirkstoff und dessen Verdünnung an der untersuchten Zelle konnte nicht kontrolliert werden. Die Spitze der Applikationskapillare (innen Ø 100 µm) war etwa 200-300 µm von der Zelle entfernt und lag gerade außerhalb des mikroskopischen Sichtfeldes.

2. Material und Methode

Die Applikationen konnten von dem Rechner, der die Elektrophysiologie steuerte, ausgelöst werden.

Die Konzentration der Wirksubstanzen lag zwischen 3 und 300 μM , und, wo nicht anders angegeben, bei 30 μM (Ausnahme NMDA: 100 μM Standard).

Die Wirksubstanzen wurden in einer Hepes gepufferten NaCl-Lösung jeweils am Versuchstag frisch angesetzt. Die Hepes Stammlösung enthielt im Einzelnen:

NaCl	145 mM
KCl	2.5 mM
CaCl ₂	2.0 mM
MgCl ₂	1.0 mM
Hepes	10.0 mM

Der pH Wert lag bei 7.4, er wurde mit NaOH 1 M eingestellt, die Osmolarität lag zwischen 290 und 300 Milliosmol.

Das er zuerst aus dem Gesichtssinne heraus wirkt und ihn für diesmal zum Mittelpunkt der übrigen macht, ist mir um so viel erfreulicher, weil es auch gerade derjenige Sinn ist durch welchen ich die Außenwelt am vorzüglichsten ergreife.
JOHANN WOLFGANG GOETHE. (über Purkinje)

3 Ergebnisse

3.1 Morphologie

Die Morphologie von AII Amakrinzellen sind bei vielen Spezies auf Licht- und elektronenmikroskopischer Ebene untersucht worden (Katze: Kolb und Famiglietti 1974, Sterling 1983, Kaninchen: Strettoi et al. 1992, Ratte: Chun et al. 1993). AII Amakrinzellen sind kleinfeld-bistratifizierende Zellen (engl. small field bistratifying). Ihre kleinen Somata (Durchmesser $\sim 7 \mu\text{m}$) liegen am inneren Rand der INL. Ihr Dendritenfeld durchspannt die gesamte IPL, wobei sich zwei Teile unterscheiden lassen: Keulenförmige Fortsätze unmittelbar unterhalb des Soma und dünne, buschige Fortsätze im innersten Drittel der IPL: die distalen Dendriten (Abbildung 3-1). Der Bereich dazwischen, in dem besonders viele

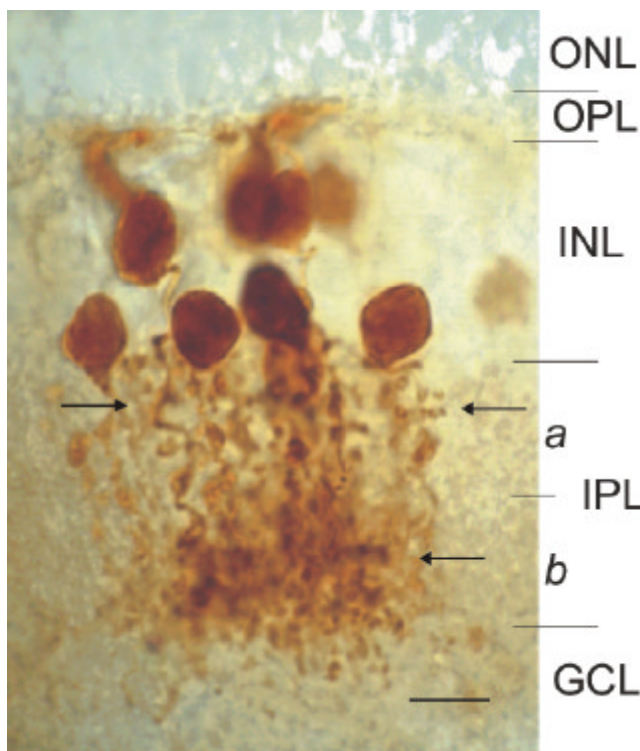


Abbildung 3-1 zeigt eine Gruppe von farbsoffgekoppelten AII Amakrinzellen, die durch DAB-Reaktion gefärbt wurden. Die typische Bistratifizierung der Zellen ist deutlich zu erkennen (Pfeile). Die Somata der AII liegen in der INL am inneren Rand zur IPL. Die im Bild weiter oben, im äußeren Teil der Retina gelegenen Zellsomata gehören zu heterolog gekoppelten ON- Zapfenbipolarzellen. Skala $10 \mu\text{m}$.

elektrische Synapsen liegen, wird, vor allem in älteren Publikationen, manchmal als dritte Stratifizierungsebene gewertet.

Bei der Maus fehlten diese detaillierten morphologischen Information bisher. Im Rahmen dieser Arbeit wurden AII Amakrinzellen der Maus Retina morphologisch untersucht. Die gefundene Morphologie entspricht der bei anderen Spezies. Die Somata liegen am inneren Rand der INL und ragen mit einem primären Dendriten in die IPL. Aufgrund dieser „Radieschen“ Form des Soma konnten die Zellen mit guter Erfolgsrate für

elektrophysiologische Experimente in ungefärbten Schnittpräparat ausgewählt werden.

Die Zellen wurden, nach dem Füllen mit Kalziumindikator-farbstoff, anhand des Fluoreszenzbildes vorläufig

klassifiziert. Die Ableitelektrode enthielt bei allen Experimenten 1% Neurobiotin, welches im Anschluss an die physiologischen Experimente durch DAB-Färbung sichtbar gemacht werden konnte. So wurden anfangs alle Zellen zur Kontrolle, später die im Fluoreszenzbild nicht eindeutig zu klassifizierenden Zellen, bei stärkerer Vergrößerung, untersucht.

Durch die Färbung mit DAB wurden häufig mit der jeweils abgeleiteten Zelle weitere Zellen gefärbt (siehe Abbildung 3-1). Man spricht von Farbstoff-Koppelung. Das Neurobiotin gelangte durch die Connexine von einer Zelle zur nächsten. Dabei wurden einerseits benachbarte AII gefärbt, andererseits auch ON-Bipolarzellen. Das so entstandene Mosaik war sehr heterogen. Von Einzelzellen bis zu Gruppen mit bis zu 30 Zellen konnten verschiedenste Färbemuster beobachtet werden.

Die verwendeten Kalziumindikatoren waren, im Gegensatz zu Neurobiotin, nicht connexingängig. In keinem Fall konnte der Kalziumindikatorfarbstoffe in benachbarten Zellen beobachtet werden (weder bei AII noch bei anderen Zellen). Selbst Mag-Fluo-4, mit einem Molekulargewicht von nur 680 g pro Mol deutlich kleiner als die anderen Indikatoren, konnte nur in der Zelle beobachtet werden, von der tatsächlich abgeleitet wurde.

Wie bei allen retinalen Neuronen veränderte sich die Morphologie der AII Amakrinzellen mit der Exzentrizität. Die IPL verjüngt sich von innen nach außen, womit die radiale Ausdehnung der Zelle abnimmt. Gleichzeitig wird der Durchmesser des dendritischen Feldes größer. Bei der Präparation wurde darauf geachtet einen möglichst zentralen Teil der Retina zu verwenden.

3.2 Physiologie

Die untersuchten AII Amakrinzellen (n=123 mit mehr als sieben Minuten Experimentierzeit) waren zum Teil spontan aktiv (Abbildung 3-2). Solche spontane Aktivität ist von Neuronen des ZNS bekannt. Sie rührt von spontanen Transmitterfreisetzungen präsynaptischer Zellen her. Man unterscheidet erregende und hemmende postsynaptische Ströme (EPSP von engl. excitatory post synaptic current und IPSC von engl. inhibitory post synaptic current). Die spontanen exzitatorischen Ströme im ZNS werden meistens durch Glutamat ausgelöst, die inhibitorischen durch GABA oder Glyzin.

Bei Haltepotentialen von -90 mV bis -60 mV in physiologischer Lösung (AMES), ohne Zusatz von Antagonisten oder Toxinen, konnten sowohl hemmende als auch erregende spontane postsynaptische Ströme aufgezeichnet werden. Diese waren durch Zusatz eines GABA-Antagonisten (Bicucullin 10 µM), eines Glyzin-Antagonisten (Strychnin 1 µM) und eines Antagonisten für spannungsaktivierte Natriumkanäle (Tetrodotoxin TTX 0,5 – 1 µM) zum Extrazellulärmedium zu unterdrücken.

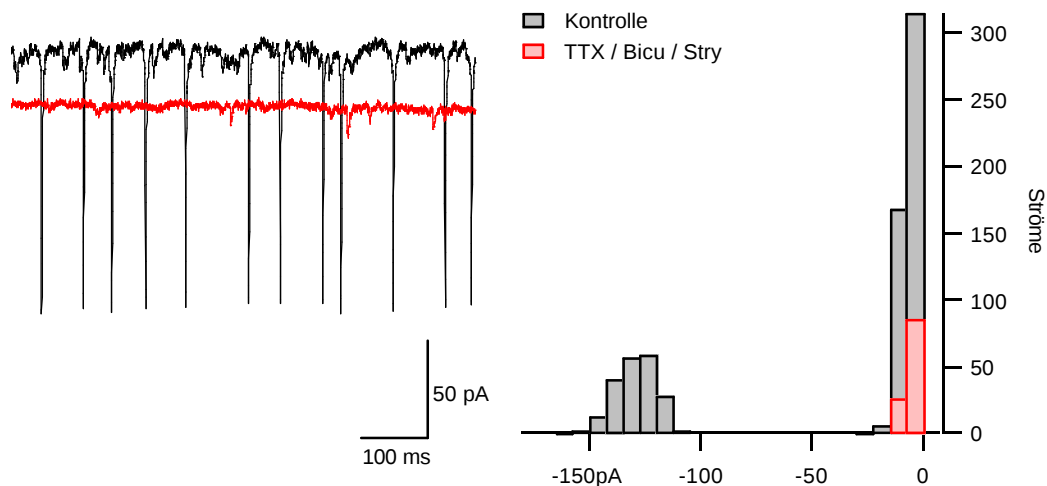


Abbildung 3-2 zeigt einen Ruhestrom bei $V_h -95$ mV. Die schwarze Stromspur wurde ohne Zusatz von Antagonisten in AMES Medium aufgezeichnet. Die in Rot dargestellte unter Bicucullin, Strychnin und Tetrodotoxin. Deutlich ist die Verringerung der Aktivität zu erkennen, die unter Einfluss der Antagonisten stattgefunden hat. Rechts ein Histogramm, das die Verteilung der Ströme unter Kontrollbedingungen (in Schwarz) und unter dem Einfluss der Drogen (in Rot) zeigt. Die Detektionsschwelle war 4 pA, die Anzahl der Ströme in der Kontrolle 697, unter Einfluss der Antagonisten 113.

Insbesondere die durch TTX blockierbare Komponente der spontanen Aktivität fiel ins Auge (Abbildung 3-2, in Schwarz). Diese hatte nicht selten Amplituden von über -100 pA und Frequenzen von 10 - 180 Hz. Diese sehr schnellen Ströme (Abklingcharakteristik $\tau \sim 1$ ms, Abbildung 3-3) konnten vor allem in den ersten Minuten eines Experimentes beobachtet werden.

Bei 61 Zellen (entsprechend 50%) konnte spontane Aktivität beobachtet werden. Die Amplituden lagen dabei in einem Bereich von -10 pA bis -270 pA (-10 pA ist die Detektionsschwelle; unterhalb wurden die Ströme als Rauschen interpretiert). Die durchschnittliche Amplitude der durch TTX zu blockierenden Ströme lag bei -112 pA ($n=26$, Bereich -63 pA bis -270 pA). Diese Ströme waren ausgesprochen homogen. Abbildung 3-3 zeigt einen aus 600 Einzelströmen berechneten Durchschnitt. Da diese spontane Aktivität deutlich größer war als die Kalziumströme die gemessen werden sollten wurde, durch Zugabe von TTX zur Badlösung, dieser Teil der spontanen Aktivität unterdrückt.

Die Komponenten die durch Bicucullin- und Strychnin zu blockieren waren hatten sehr viel kleinere Amplituden (-10 pA bis -50 pA). Der Zeitverlauf dieser Ströme war vergleichsweise heterogen (ohne Abbildung). Auch diese inhibitorischen spontanen Ströme wurden in der Regel durch Zugabe von Bicucullin und Strychnin unterdrückt.

Vergleicht man die Histogramme der Amplituden der spontanen Aktivität vor und nach Applikation der Antagonisten so sieht man, dass sowohl die Häufigkeit als auch die Größe der Maxima deutlich zurückgehen (Abbildung 3-2).

3.2.1 Spannungsgesteuerte Kanäle

Spannungsgesteuerte Kanäle wurden durch Sprungprotokolle untersucht. Die Membranspannung wurde in zwölf aufeinanderfolgenden Sprüngen von einem Haltepotential aus auf zunehmend positivere Potentiale gesetzt.

3. Ergebnisse

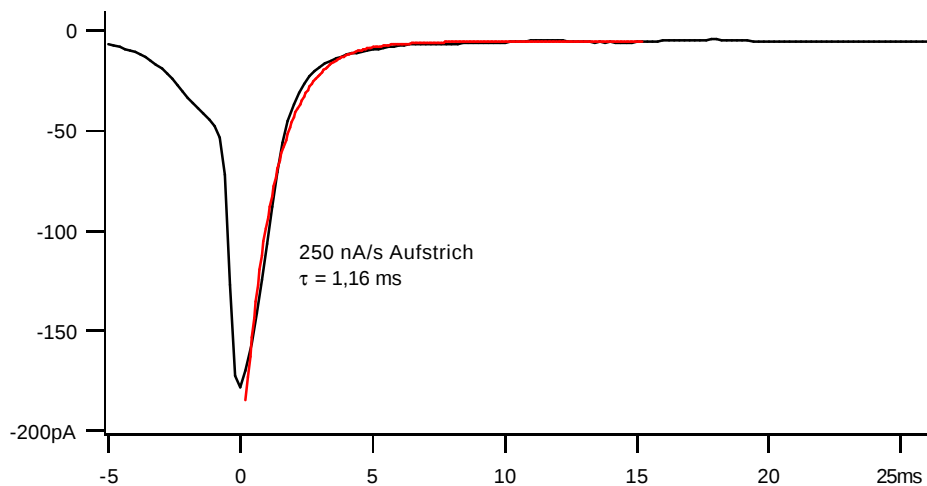


Abbildung 3-3 zeigt einen aus 600 Einzelströmen gemittelten spontanen Strom (in Schwarz) und eine monoexponentielle Regression von diesem (in Rot). Die Zeitkonstante dieser Regression ist kleiner als 1,2 ms. Diese Ströme wurden durch TTX blockiert und darum als Natriumströme klassifiziert. Auffällig ist die Aufstrichphase, die sich aus mindestens zwei, einer ersten langsamen und einer zweiten schnellen Phase zusammensetzt. Haltepotential -75 mV; AMES; Cs-Gluconat

Die induzierten Ströme eines solchen Protokolls sind gemeinsam in einer Grafik (Abbildung 3-4) dargestellt und die Amplituden in einer Strom-Spannungs-Kennlinie aufgetragen. Durch die Zusammensetzung der Intrazellulärlösung, Cäsium-Gluconat und TBA, sowie die Verwendung von TTX in der Extrazellulärlösung, waren spannungsgesteuerte Kalium- und Natriumkanäle weitgehend blockiert. Die verbleibenden Einwärtsströme sind Kalziumströme, die Auswärtsströme nicht blockierte Kaliumströme.

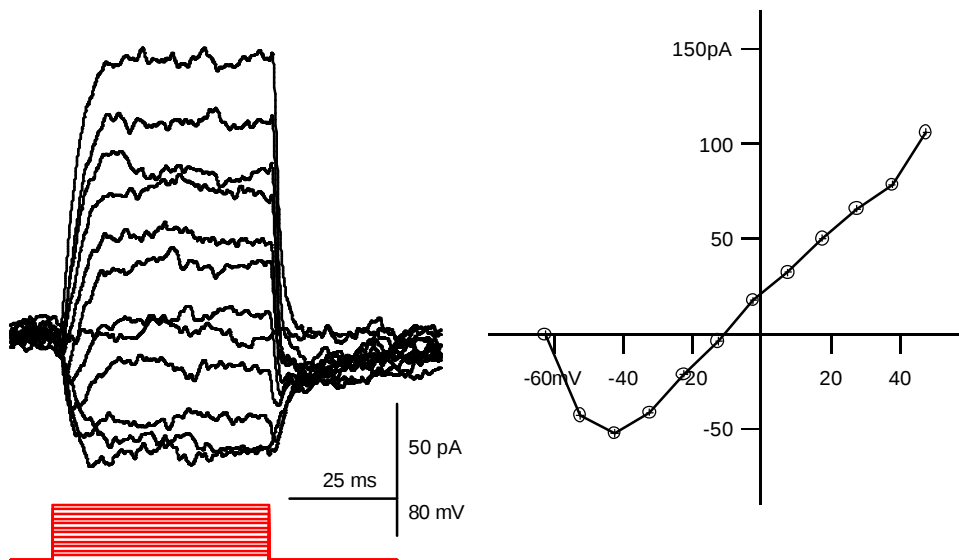


Abbildung 3-4 zeigt links ein Sprungprotokoll (in Rot) und die induzierten Ströme (in Schwarz). $V_h = -75$ mV, 12 Sprünge mit je 10 mV gegenüber dem vorausgehenden Sprung. Rechts die Strom-Spannungs-Kennlinie. Die Einwärtsströme aktivieren zwischen -60 und -50 mV, maximale Amplitude von etwa -50 pA bei -40 mV. Für Übergangspotentiale korrigiert; AMES; IC: Cs-Gluconat + TBA.

Aus der Strom-Spannungs-Kennlinie kann man die Aktivierungsschwelle der Kalziumströme ablesen, sie lag zwischen -60 mV und -50 mV. Das Maximum des Einwärtsstroms lag bei der gezeigten Zelle bei -50 pA, es wurde bei etwa -40 mV erreicht. Durchschnittlich erreichten die Ströme -40 pA/Zelle (Abbildung 3-6). Das Umkehrpotential der induzierten Ionenströme lag im gezeigten Beispiel bei etwa -10 mV. Aus der Nernst-Gleichung ergab sich für Kalziumionen ein Umkehrpotential von über +100 mV. Die gemessenen Kalziumströme wurden vermutlich von nicht blockierten Kaliumströmen maskiert. Dies beeinflusste vor allem die Bestimmung des Umkehrpotentials, welches zu negativen Werten hin verschoben ist. In Abbildung 3-5 ist der Zusammenhang zwischen Experimentdauer und der Ausbildung des Blocks der Kaliumkanäle veranschaulicht. Die in Rot dargestellte Strom-Spannungs-Kennlinie ist etwa 3 Minuten nach der in Schwarz dargestellten aufgezeichnet. Mehr Kaliumkanäle sind blockiert, der Kaliumausstrom trägt weniger zu dem gemessenen Strom bei. Die Stromstärken der depolarisationsinduzierten Kalziumströme waren in etwa normalverteilt, das arithmetische Mittel lag bei -37 pA, Median war -35 pA. Die Standard Abweichung betrug $\pm 17,5$ pA/Zelle. Bei 59 von 121 Zellen (48,8%) wurden depolarisationsinduzierte Einwärtsströme beobachtet (-10 pA bis -170 pA) siehe Abbildung 3-6.

Bei den depolarisationsinduzierten Kalziumströmen wurden nie transiente Komponenten gefunden. Um phasische und tonische Anteile zu vergleichen wurde die gemittelte Amplitude zu Beginn einer Depolarisation (0-20% der Dauer) durch die am Ende (80-100% der Dauer) dividiert. Das Verhältnis der Amplituden zu Beginn einer Depolarisation zu denen am Ende war nie größer als zwei. Amplituden von weniger als -10 pA wurden nicht ausgewertet, da das Verhältnis von Signal zum Rauschen unterhalb von -10 pA zu klein wurde.

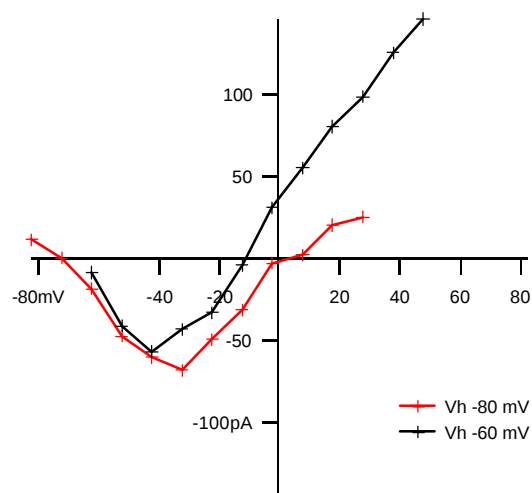


Abbildung 3-5 zeigt einen Vergleich der Strom-Spannungs-Kennlinien bei Haltepotentialen von -60 mV (in Schwarz) beziehungsweise -80 mV (in Rot). Die Ströme aktivieren bei der selben Membranspannung. Die maximale Amplitude sowie das Umkehrpotential sind bei der Aktivierung von einem Haltepotential von -80 mV nach rechts verschoben. Die Aufzeichnung der Strom-Spannungs-Kennlinie bei -80 mV erfolgte etwas später als die Aufzeichnung bei -60 mV. Der Anteil der durch TBA blockierten Kaliumkanäle war bei der späteren Aufzeichnung größer. Für Übergangspotentiale korrigiert. AMES; IC: Cs-Gluconat + TBA.

3. Ergebnisse

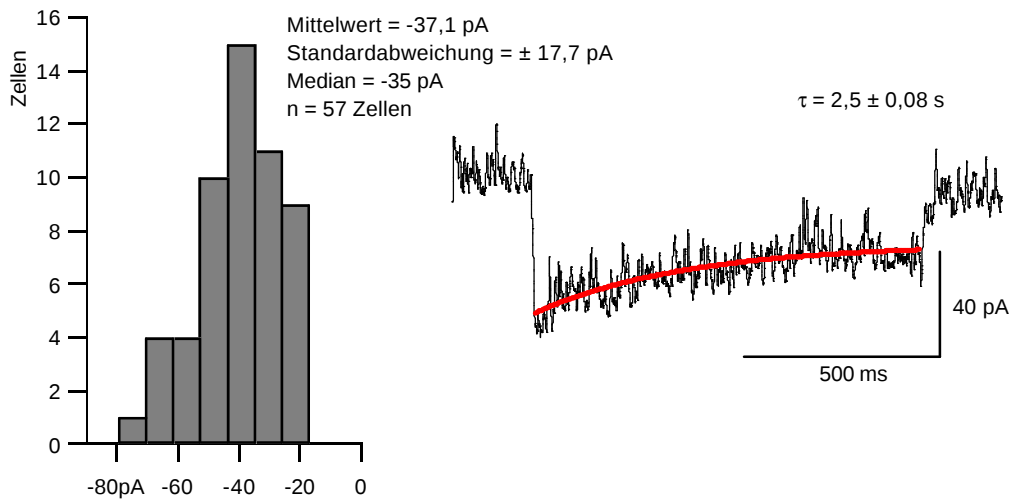


Abbildung 3-6 zeigt links das Amplitudenhistogramm für die depolarisationsinduzierten Ströme aller untersuchten AII Amakrinzellen, die solche Ströme zeigten (zwei „Ausreißer“ von -170 mV und -115 mV nicht gezeigt). Rechts: Beispiel eines depolarisationsinduzierten Einstroms mit darübergelegter monoexponentieller Regression (in Rot). Es ergibt sich eine Zeitkonstante von 2,5 Sekunden.

Die Geschwindigkeit der Inaktivierung von Kalziumströmen stellt ein Kriterium dar, nach dem man die verschiedenen Typen unterscheidet. Einige Typen von Kalziumkanälen inaktivieren schnell (P/Q-, R- und N-Typ), man spricht von phasischen Kanälen. Andere inaktivieren langsam (L-Typ) und werden tonische Kanäle genannt.

Um die Geschwindigkeit der Inaktivierung zu bestimmen wurde die Zeitkonstante der Abklingcharakteristik durch eine monoexponentielle Regression abgeschätzt. Diese Regression war für depolarisationsinduzierte Ströme durch eine Zeitkonstante τ von 2,5 Sekunden gekennzeichnet (Abbildung 3-6).

In Abbildung 3-7 ist links ein Spannungsprotokoll gezeigt, bei welchem die Amplitude konstant gehalten, die Dauer der Depolarisation jedoch verändert wurde. Die Ladungsmenge, welche während einer Depolarisation verschoben wurde, steht in linearer Abhängigkeit zur Dauer der Depolarisation (Abb. 3-7,

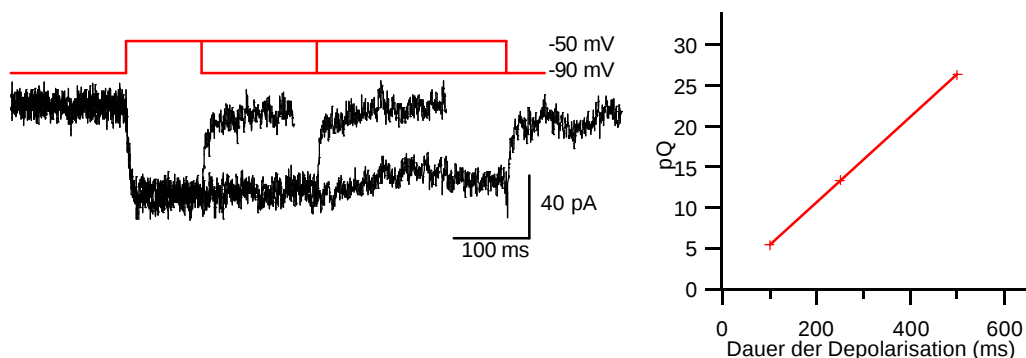


Abbildung 3-7 Depolarisationen von unterschiedlicher Dauer (100, 250 und 500 ms) lösen nicht-inaktivierende Einwärtsströme von entsprechender Dauer aus. Trägt man die Ladungsmenge in Picocoulomb gegen die Dauer der Depolarisation auf so zeigt sich ein linearer Zusammenhang (rechte Teilabbildung).

rechts). Eine solcher linearer Zusammenhang zwischen der Dauer der Depolarisation und der Ladungsmenge ist nur für tonische Kanäle zu erwarten. Aus der Aktivierungsschwelle, der Kinetik der Inaktivierung und der Größe der Ströme ergaben sich erste Hinweise auf die molekulare Identität der zu Grunde liegenden Kalziumkanäle.

Es handelte sich offenbar um Kanäle die durch kleine, tonische Ströme charakterisiert waren. Diese Ströme wurden durch Spannungssprünge von mittleren Potentialen aus aktiviert.

3.2.1.1 Pharmakologie der Kalziumströme

Die vorgenannten Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass es sich bei den bei AII exprimierten Kalziumkanälen um solche vom L-Typ handeln könnte. Zumal dieser Kanaltyp in der Retina schon auf Photorezeptoren und am Axonende von Stäbchenbipolarzellen nachgewiesen wurde (siehe Einleitung). L-Typ Kalziumkanäle können durch Dihydropyridine (DHPs) moduliert werden. Nimodipin, Nifedipin und Nitrendipin wirken antagonistisch, während BayK 8644 agonistisch auf Kalziumkanäle vom L-Typ wirkt.

Die Wirkung dieser Wirkstoffe auf die depolarisationsinduzierten Ströme von AII Amakrinzellen wurde untersucht (siehe Abbildung 3-8).

Unter dem Einfluss von BayK 8644 wurde in etwa eine Verdoppelung der Stromamplituden beobachtet (Abbildung 3-12). Die Kinetik der Ströme, insbesondere das Verhältnis der Amplituden im ersten Drittel der Depolarisation verglichen mit den Amplituden im letzten Drittel, änderte sich nicht. Die Ströme waren auch unter BayK 8644 überwiegend tonischer Natur, siehe Abbildung 3-9. Es wurden keine Hinweise darauf gefunden, dass sich der Kalziumstrom aus mehr als einer Komponente zusammensetzt.

Beobachtet wurde allerdings eine Veränderung bei den Strömen, die nach der wieder Einstellung des Ruhepotentials noch fließen, sogenannte Repolarisationsströme (engl.: tail currents). Diese waren zum Teil erheblich vergrößert und in ihrer Kinetik deutlich langsamer als unter Kontrollbedingungen (ohne Abbildung). Der in Abbildung 3-9 gezeigte direkte Vergleich der depolarisationsinduzierten Ströme zeigt, dass sich die Amplitude, nicht aber der zeitliche Verlauf der Ströme unter dem Einfluss von Dihydropyridinen verändert.

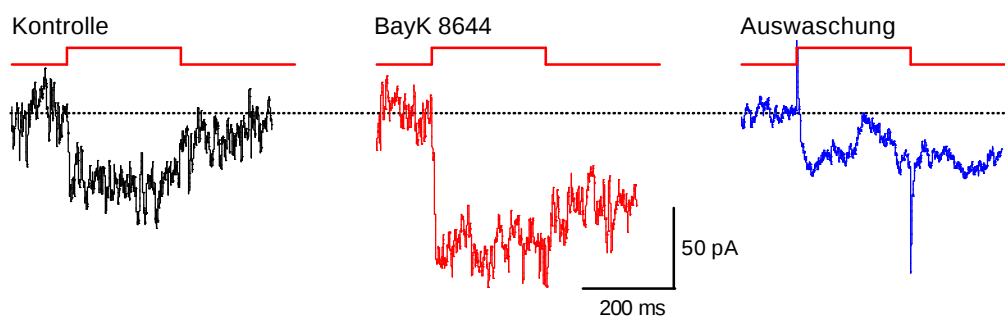


Abbildung 3-8 zeigt depolarisationsinduzierte Ströme unter Kontrollbedingungen (in Schwarz), während der Überspülung mit BayK 8644 (in Rot) und nach dem Auswaschen dieses Agonisten (in Blau). Die Depolarisationen sind in Rot über den Antworten dargestellt. Die Nulllinie ist gepunktet angegeben. AMES, IC= Cs-Gluconat, $V_h = -95$ mV, Sprünge jeweils 40 mV.

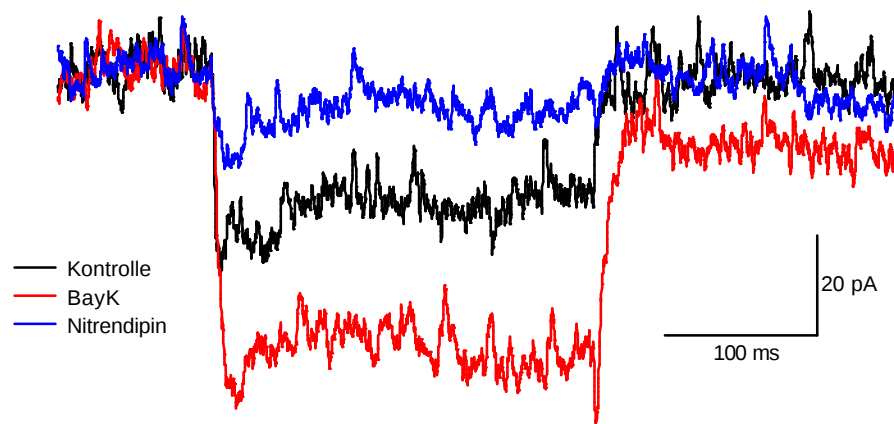


Abbildung 3-9 zeigt durch Depolarisation ausgelöste Einwärtsströme. Kontrolle (in Schwarz) während der Überspülung mit BayK (In Rot) und unter dem Einfluss von Nitrendipin (in Blau). Die Ströme sind übereinandergelegt, um die Abklingcharakteristik miteinander vergleichen zu können. $V_h = -95$ mV, AMES, IC = Cs-Gluconat, Sprünge jeweils 40 mV.

Gezeigt sind drei depolarisationsinduzierte Ströme einer Zelle in verschiedenen Badlösungen.

Der unter Kontrollbedingungen gemessene Strom verdoppelt etwa seine Amplitude unter dem Einfluss von BayK 8644. Die Abklingcharakteristik blieb unverändert tonisch. Nach der Applikation von BayK 8644 wurde das Gewebe mit AMES Medium gewaschen und es wurde eine Badlösung eingespült die Nimodipine enthielt. Die Amplitude des depolarisationsinduzierten Stroms verkleinerte sich. Die Abklingcharakteristik blieb unverändert.

Nach den Untersuchungen unter Einwirkung der Droge wurde auch untersucht, ob die erzielten Effekte reversibel waren. Dazu wurden die Schnittpräparate nach dem Einspülen der Wirksubstanzen wieder mit physiologischer Lösung überspült – also „gewaschen“. Nach Inkubation mit BayK konnte nach kurzer Zeit eine Rückkehr der Amplituden auf den Kontrollwert beobachtet werden. Nach der Inkubation mit Nimodipine wurde der Kontrollwert nicht mehr erreicht. Ein entsprechendes Experiment ist in Abbildung 3-10 dargestellt.

Die Ergebnisse der Pharmakologie sind eindeutig. An insgesamt 31 Zellen wurden die Effekte von BayK 8644 untersucht. 20 Zellen konnten ausgewertet werden. In den Abbildung 3-10 und 3-11 ist zu erkennen, dass die ersten Depolarisationen nach dem Einspülen der Wirksubstanzen noch nicht deren volle Wirkung erkennen lassen. Darum wurden nicht nur die Mittelwerte aller Depolarisationen ($n=88$) sondern auch die jeweils stärksten Effekte bestimmt ($n=20$).

Die durchschnittliche Erhöhung der Amplitude betrug dabei, unter Berücksichtigung aller gemessenen Werte 37,9% ($n=88$). Die entsprechende Veränderung, unter ausschließlicher Berücksichtigung der maximalen Veränderung beträgt 92,8% ($n=20$). Die Werte sind in Abbildung 3-12 B graphisch dargestellt.

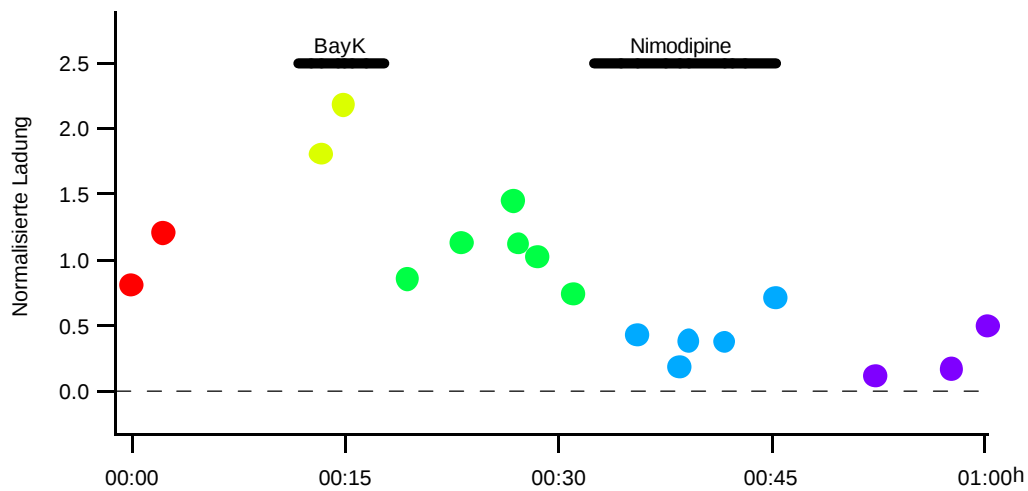


Abbildung 3-10 zeigt die durch Depolarisation ausgelösten Ladungsverschiebungen gegen die Dauer des Experimentes aufgetragen. Die Ladungen sind für Kontrollbedingungen normalisiert. Die Dauer der Perfusion mit BayK und Nimodipine ist durch die Balken markiert. Die nach den Wirksubstanzen durchgeführten Auswaschungen sind in Grün beziehungsweise Violett dargestellt.

Nimodipin (in einigen Experimenten auch Nitrendipin oder Nifedipin) wurde verwendet um die Kanäle zu charakterisieren. Dieser L-Typ spezifische Antagonist wurde an insgesamt 14 Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass die spannungsaktivierten Kalziumströme unter Nimodipine weitgehend blockiert sind. Der Mittelwert der verschobenen Ladungsmenge unter dem Einfluss von Nimodipine betrug 51,7%.

Der Mittelwert der Minima (minimale Ladungsmenge, entsprechend dem maximalen Block) unter dem Einfluss von Nimodipine betrug 21,3% der Kontrollwerte (n=14, siehe Abbildung 3-12 A). Das bedeutet, dass unter dem Einfluss von Nimodipine 78,7% der durch Depolarisation ausgelösten Ströme blockiert waren.

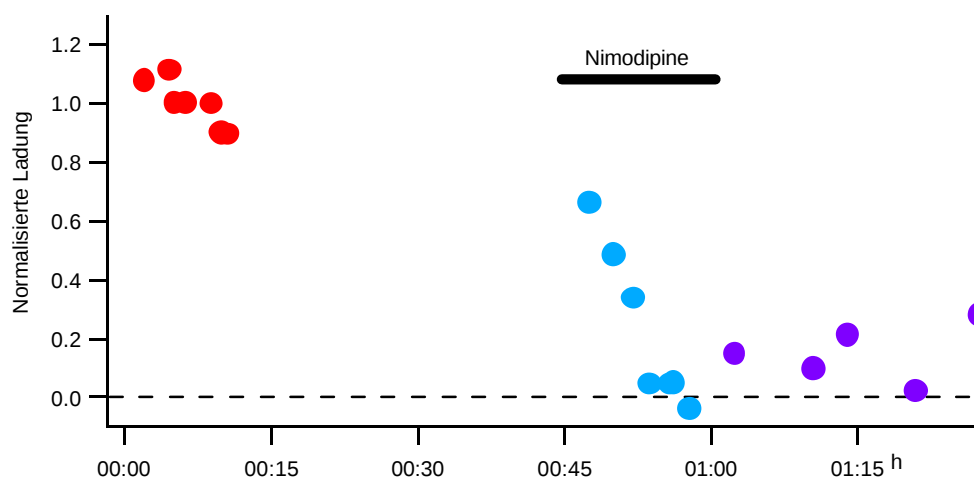


Abbildung 3-11 zeigt den Einfluss von Nimodipine auf die Größe der Ladungsverschiebung. Die Ströme sind für Kontrollbedingungen normalisiert. Die Menge der Ladung nimmt unter dem Einfluss von Nimodipin langsam bis auf Null ab.

Diese „Einspüleffekte“ (und ebensolche „Auswaschungseffekte“) ließen sich bei einem so langsamen Applikationssystem wie der Badapplikation nicht ganz vermeiden. Das Badvolumen betrug etwa 2 ml, die Flussrate war auf 0,6 bis 2,5 ml/min eingestellt. Berücksichtigt man darüber hinaus die Totvolumina in den Schläuchen so ergaben sich Einstellzeiten für die angestrebten Konzentrationen von Agonisten und Antagonisten von mehreren Minuten. In Abbildung 3-11 waren die spannungsaktivierten Kalziumkanäle während der ersten drei Depolarisationen unter dem Einfluss von Nimodipin noch nicht vollständig blockiert, während der drei folgenden sehr wohl (hellblaue Markierungen).

Die Wirkung der Dihydropyridine auf AII Amakrinzellen ist in Abbildung 3-12 zusammengefasst. Unter dem Einfluss von Nimodipine blieben rund 20% der Ströme unblockiert. Unter dem Einfluss von BayK 8644 verdoppelte sich etwa die Amplitude des depolarisationsinduzierten Stroms.

Der Effekt von Nimodipine war nur zu einem kleinen Teil reversibel, der von BayK war vollständig reversibel.

Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten für alle Depolarisationen unter dem Einfluss der Wirksubstanz zu den jeweiligen Maxima erklärten sich durch die Einspüleffekte und die damit verbundene verzögerte Wirksamkeit der Substanzen.

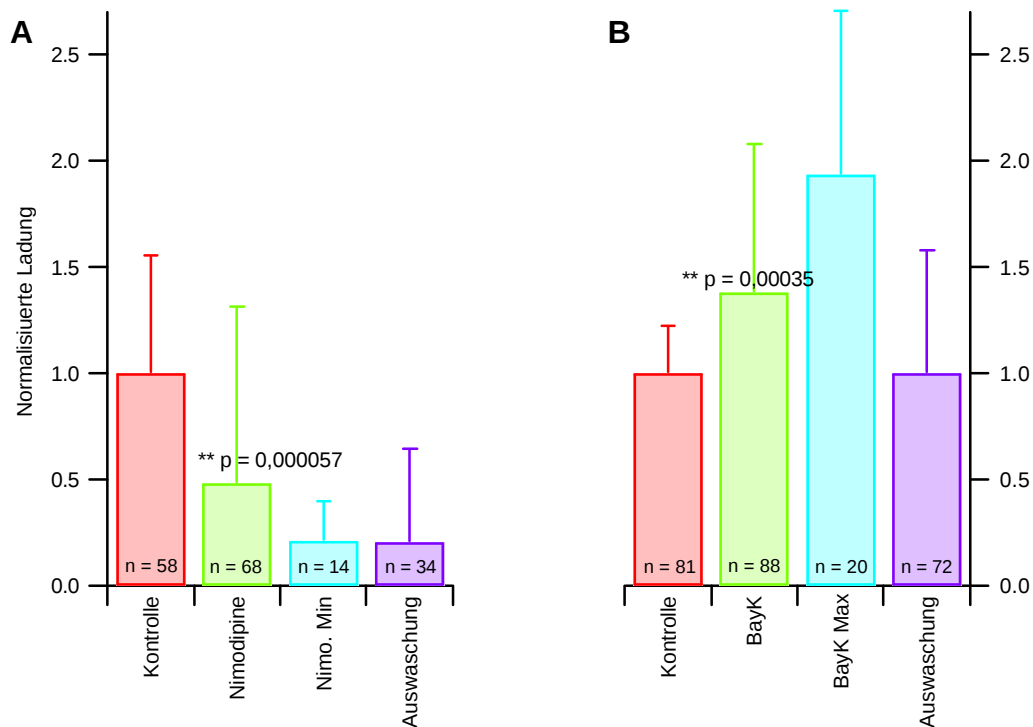


Abbildung 3-12 zeigt die Veränderung der Amplitude unter Einfluss von A) Nimodipin und B) BayK. Die Ladungsmengen sind auf die Kontrollbedingungen normiert. Außer den Werten für die durchschnittliche Veränderung sind zusätzlich die Werte für „maximalen Block“ (Nimodipin) und für „maximale Verstärkung“ (BayK) angegeben. Nimodipine: n = 14; BayK: n = 20.

3.2.1.2 Lokalisation der Kalziumströme

Für die Signalverarbeitung der AII Amakrinzelle ist es entscheidend wo auf der Zelle die spannungsgesteuerten Kalziumkanäle liegen. Um diese Frage zu klären wurden Kalziumabhängige Farbstoffe, Kalziumindikatoren, durch die Glaselektrode in die Zellen eingebracht. Eine solchermaßen gefüllte Zelle ist in Abbildung 3-13 zu sehen.

Wie in Abbildung 3-13 exemplarisch gezeigt, wurden drei kreisförmige Gebiete definiert, welche jeweils einem Zellkompartiment entsprachen. Die Veränderung der Fluoreszenz als Reaktion auf eine Depolarisation ist rechts daneben als $\Delta F/F$ dargestellt. Bei allen Experimenten wurde, vor allem in den keulenförmigen Fortsätzen, einer Veränderung der Fluoreszenz bei Depolarisation der Zellmembran beobachtet. Die Fluoreszenz im Soma sowie in den distalen Dendriten veränderte sich in einem wesentlich geringeren Umfang. Die Bedingungen der Experimente wurden dabei so gewählt, dass die Fokusebene und andere Parameter (Beleuchtungsstärke, Belichtungszeit und eventuell Dauer des Reizes) auf die verschiedenen Kompartimente abgestimmt wurden. Die prozentualen Veränderungen waren von diesen Größen abhängig und sind daher als qualitative Aussagen zu verstehen.

Bei einer Depolarisation von 250 ms Dauer reagierten alle untersuchten AII Zellen mit einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenz in den keulenförmigen Fortsätzen.

Die Erhöhung, bei Verwendung des niederaffinen *Oregon Green BAPTA 5N*, lag zwischen 20% und 100%. Der arithmetische Mittelwert der Veränderung betrug $44\% \pm 20\%$ Stab ($n=11$). Die beobachteten Veränderungen im Soma ($a M 7,5\% \pm 5,5\%$, Wertebereich: 0%-16%) und in den distalen Dendriten ($a M 13\% \pm 8\%$, Wertebereich: 6%-33%) waren dagegen gering.

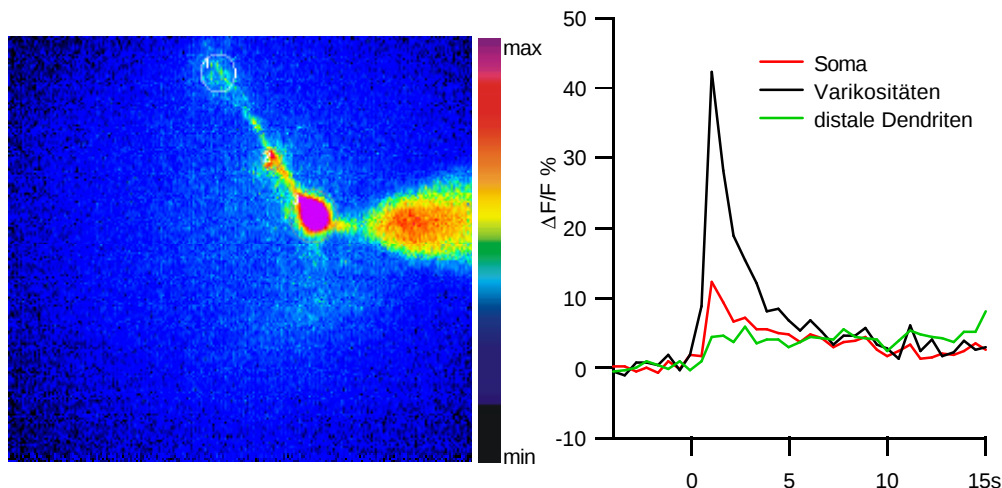


Abbildung 3-13: Falschfarbenbild einer AII Amakrinzelle. Man erkennt deutlich das Soma (Region 3) die keulenförmigen Fortsätze (Region 2) und die distalen Dendriten (Region 1). Rechts vom Soma befindet sich die Spitze der Glaselektrode (nicht in der Fokusebene). Die Skala in der Mitte zeigt die Codierung: schwache Fluoreszenz ist in Schwarz, die stärkste Fluoreszenz in Violett dargestellt. Die Kurven rechts zeigen die Veränderungen der Fluoreszenz in den drei Zellkompartimenten bei einer 500 ms Depolarisation von -95 mV auf -55 mV. Die Veränderung ist als DF/F in % angegeben, die Abszisse zeigt den Zeitverlauf. Indikator: OG-5N. AMES, IC = Cs-Gluconat.

Die angegebenen Werte sind arithmetische Mittel aus 11 zufällig gewählten Zellen, für die jeweils erste Depolarisation. Es wurde mit Depolarisationen von unterschiedlicher Dauer gearbeitet. Die kürzesten Depolarisationen, die gerade noch messbare Veränderungen in der Fluoreszenz induzierten waren 10 ms. Die längsten Depolarisationen dauerten zwei Sekunden, diese wurden verwendet um unter „extremen“ Bedingungen noch Veränderungen in der Fluoreszenz auslösen zu können (zum Beispiel in der Auswaschungsphase nach Nimodipin-Inkubation oder unter Verwendung des hochaffinen „Calcium Green 1“, um Veränderungen in den distalen Dendriten beobachten zu können oder bei A17 Amakrinzellen). Die Veränderung der Fluoreszenz war, stärker noch als die Amplitude der Ströme, von der Dauer eines Experimentes abhängig und ging stetig zurück, bis sie unter die Detektionsschwelle sank (rundown Effekt).

3.2.1.3 Kalziumkanäle in den keulenförmigen Fortsätzen

Die Frage welche Typen von Kalziumkanälen für den Anstieg in der $[Ca^{2+}]_i$ in den keulenförmigen Fortsätzen verantwortlich waren, wurde mit pharmakologischen Mitteln angegangen. In Abbildung 3-14 ist dargestellt, wie sich die Veränderung der Fluoreszenz der keulenförmigen Fortsätze unter dem Einfluss von BayK verhielt. Verglichen wurden hier nicht verschiedene Kompartimente aus einem Experiment, sondern ein Kompartiment unter verschiedenen Bedingungen. Unter Kontrollbedingungen löste eine Depolarisation der Zellmembran eine etwa 60% Verstärkung der Fluoreszenz aus. Unter dem Einfluss von BayK 8644 stieg dieser Wert auf über 120% an. Der gefundene Effekt war reversibel, nach dem Auswaschen der Drogen erreichte die Amplitude wieder das Ausgangsniveau. Es fällt auf, dass sich die Kinetik der Fluoreszenzänderung beim Übergang von Kontrolle zur Droge nicht, beim Übergang von der Droge zurück zum Kontrollmedium aber sehr wohl ändert. Die Abnahme der Fluoreszenz zur Ruheintensität ist deutlich verlangsamt. Bei einigen Experimenten vergrößerte sich die Amplitude in Anwesenheit von BayK um den Faktor zwei (n=3).

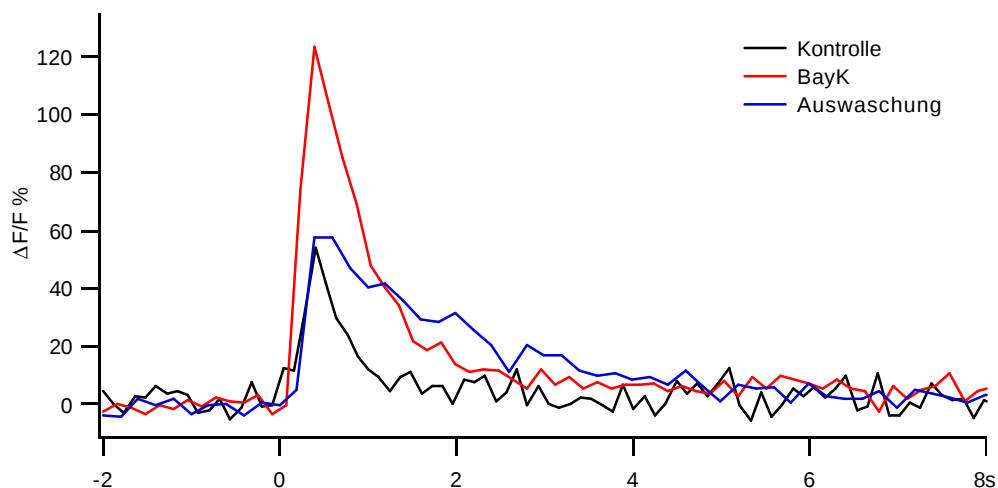


Abbildung 3-14 zeigt den Einfluss von BayK auf die Veränderung der Fluoreszenz in den keulenförmigen Fortsätzen. Die prozentuale Veränderung der Fluoreszenz unter Kontrollbedingungen ist in Schwarz, unter BayK 8644 in Rot und die Auswaschung in Blau dargestellt. Indikator: OG-5N, AMES, IC = Cs-Gluconat.

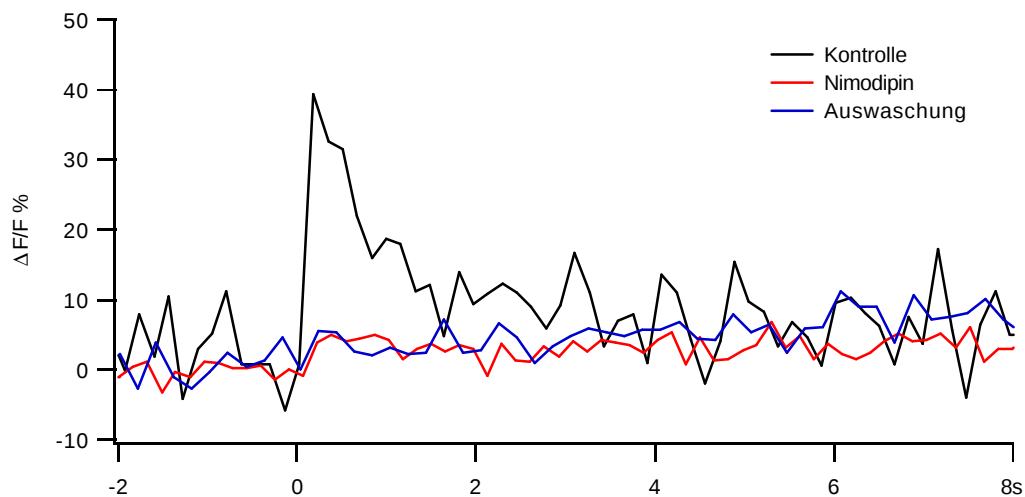


Abbildung 3-15 zeigt den Einfluss von Nimodipin auf die Veränderung der Fluoreszenz in den keulenförmigen Fortsätzen. Die prozentuale Veränderung der Fluoreszenz unter Kontrollbedingungen ist in Schwarz, unter Nimodipin in Rot und die Auswaschung in Blau dargestellt. Indikator: OG-5N, AMES, IC = Cs-Gluconat.

Nach Inkubation mit Nimodipine war der depolarisationsinduzierte Anstieg in der Fluoreszenz der keulenförmigen Fortsätze vollständig blockiert. Wie in Abbildung 3-15 exemplarisch gezeigt war dieser Effekt nicht reversibel ($n=12$). Zur besseren Beschreibung der räumlichen und zeitlichen Veränderung, bot sich die zeitliche Analyse der Fluoreszenzintensität der Zellachse an. Die Veränderung der Intensität der Fluoreszenz ($\Delta F/F$) entlang der Zellachse wurde farbkodiert und entlang der Zeitachse angeordnet (Abbildung 3-16, rechts). Die Veränderung der Fluoreszenz in verschiedenen Zellkompartimenten und das Ausbleiben einer solchen Veränderung in anderen, wird dadurch besonders deutlich.

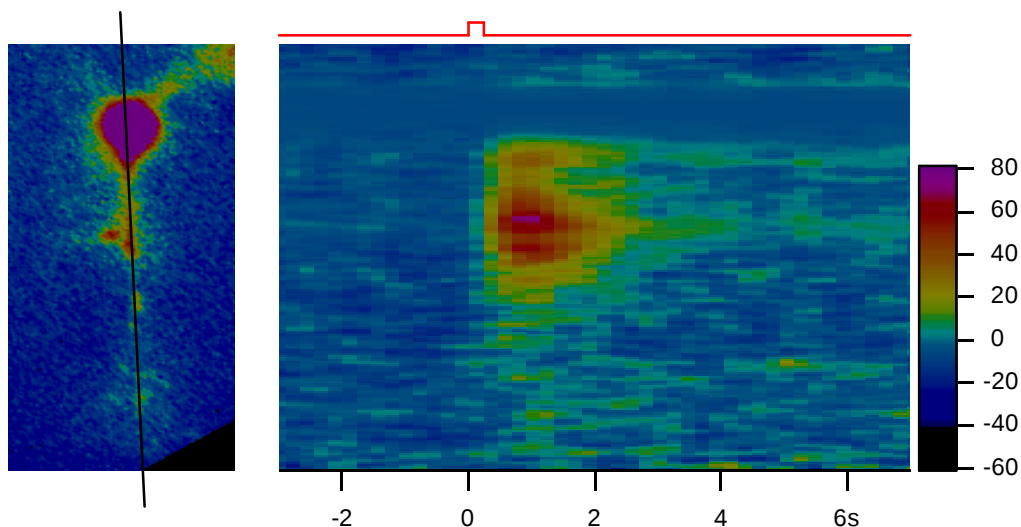


Abbildung 3-16 zeigt die Veränderung der Fluoreszenz, ausgelöst durch eine 250 ms Depolarisation als Funktion der Zeit. Links ein Bild der AII Zelle mit der Schnittlinie (Farbskala wie in 3-13). Rechts ein Raum-Zeit-Diagramm der Veränderung in der Fluoreszenzintensität, das eine Erhöhung der Fluoreszenz vor allem in den Varikositäten zeigt. Rechts oben der Stimulus. Farbskala $\Delta F/F$ in %. Indikator OG-5N, AMES, IC = Cs-Gluconat.

Abbildung 3-16 zeigt ein entsprechendes Raum-Zeit-Diagramm der Veränderung in der Fluoreszenzintensität. Die evozierte Veränderung der Fluoreszenz ist in den keulenförmigen Fortsätzen am deutlichsten. In anderen Kompartimenten bleibt die Fluoreszenz nahezu unverändert.

3.2.2 Vergleich unterschiedlicher Indikatoren

Kalziumindikatorfarbstoffe unterscheiden sich unter anderem durch ihre Affinität für Kalzium und ihre spezifische Quantenausbeute, das ist der Quotient zwischen absorbierten und emittierten Photonen. Um eine Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ detektieren zu können, muss die Affinität des Farbstoffes auf diese Konzentration abgestimmt werden. Farbstoffe wie *Calcium Green 1* mit einem K_d -Wert von 190 nM eignen sich besonders für niedrige Kalziumkonzentrationen und Veränderungen im nanomolaren Bereich, während *Oregon Green BAPTA 5N*, ein niederaffiner Indikator, mit einem K_d -Wert von 20 μ M gut für die Detektion von Veränderungen der Kalziumkonzentrationen im millimolaren Bereich geeignet ist. Verwendet man, wie bei dem in Abbildung 3-16 gezeigten Experiment, einen Farbstoff mit niedriger Affinität zur Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ so sind die Veränderungen der Fluoreszenz in den distalen Dendriten nahezu Null.

Verwendet man aber einen Indikator mit hoher Affinität, so zeigt sich auch in diesem distalen Zellkompartiment als Reaktion auf eine Depolarisation eine deutliche Veränderung der Fluoreszenz. Die prozentuale Veränderung in der Fluoreszenz der distalen Dendriten entsprach unter diesen Versuchsbedingungen bei einem Experiment in etwa denen in den keulenförmigen Fortsätzen.

Bei den Experimenten mit hochaffinen Kalziumfarbstoffen stieg die Ruhefluoreszenz innerhalb kurzer Zeit so stark an, dass keine weitere Veränderung als Reaktion auf einen Reiz mehr zu beobachten war. Der Farbstoff war mit Kalzium gesättigt. Dieser Umstand engte die Zeit für Experimente derart ein, dass keine pharmakologischen Untersuchungen an AII Amakrinzellen mit hoch-affinen Kalziumindikatoren durchgeführt wurden.

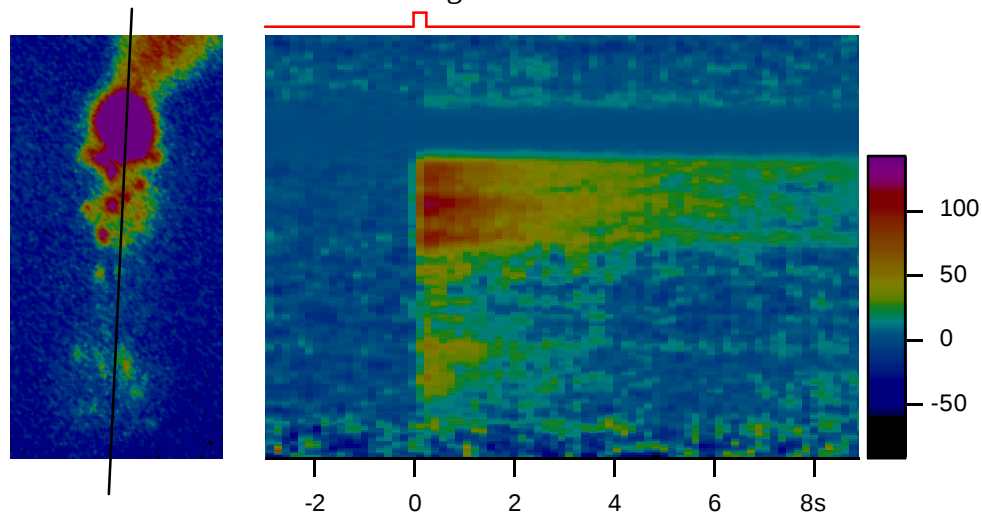


Abbildung 3-17 zeigt ein Raum-Zeit-Diagramm der Veränderung in der Fluoreszenzintensität bei Verwendung eines Kalziumindikators mit hoher Affinität (Oregon Green-2, 200 μ M, K_d = 580 nM). Links: das Falschfarbenbild der Zelle, mit der rechts analysierten Schnittlinie. Zusätzlich zu der Erhöhung der Fluoreszenz in den Varikositäten erkennt man deutlich die in den distalen Dendriten, im unteren Drittel des Bildes. Der Reiz ist rechts oben in Rot angegeben. Die Farbskala als DF/F in % ganz rechts. OG-2, AMES, IC = Cs-Gluconat.

3.2.3 Glutamat-Rezeptor vermittelte Ströme

Ligandengesteuerte Ionenkanäle wurden durch fokale Drogenapplikationen untersucht (siehe 2.6.2). Glutamat, AMPA, Kainat und NMDA wurden appliziert um Glutamat-Rezeptoren zu charakterisieren, Glyzin und GABA wurden appliziert um Glyzin- und GABA-Rezeptoren zu untersuchen. GABA und Glyzin wurden in erster Linie als Kontrollsubstanzen eingesetzt um die Umkehrpotentiale der induzierten Ströme bestimmen und um diese mit den Umkehrpotentialen der glutamatinduzierten Ströme zu vergleichen. Aus diesem Vergleich konnten die Ionen bestimmt werden, welche den unterschiedlichen Ströme zugrunde liegen.

3.2.3.1 Durch Glutamat-Applikation evozierte Veränderungen der Fluoreszenz

Applikation von Glutamat, AMPA und Kainat führte zu einer Veränderung der Fluoreszenzintensität der AII Amakrinzellen (n=60 Zellen für AMPA, n=42 für Kainat, n=47 für Glutamat). Applikation von NMDA führte nicht zu einer Veränderung der Intensität der Fluoreszenz (n=30 Zellen). Bei sieben von 23 Zellen die durch NMDA-Applikation untersucht wurden konnten Ströme gemessen werden (arithmetisches Mittel der Ströme -27,5 pA Wertebereich -5 pA - +100 pA).

Die Veränderungen der Fluoreszenz einer AII Amakrinzelle bei Applikation von Glutamat ist in Abbildung 3-18 und in anderer Darstellung in Abbildung 3-19 gezeigt.

Die Größe und Kinetik der Veränderungen der Fluoreszenz $\Delta F/F$ bei Glutamat-Applikation ist in Abbildung 3-19 gezeigt. Die Veränderung war in den distalen Dendriten am deutlichsten (zwischen 30% und 400%, n=47), im Soma nur marginal (bis 40%) zu sehen. Die Veränderung in den keulenförmigen Fortsätzen war mit durchschnittlich etwa 40% deutlich kleiner als in den distalen Dendriten.

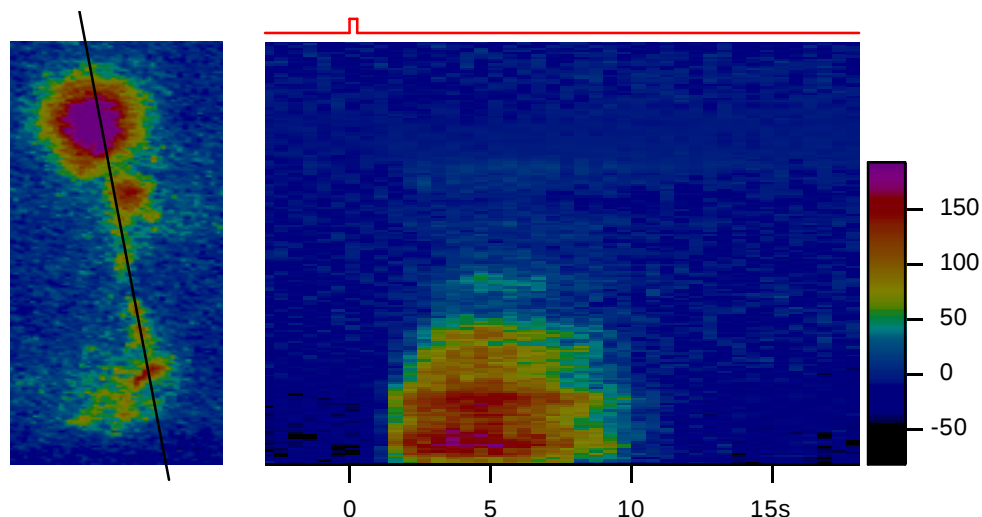


Abbildung 3-18 zeigt links eine AII Amakrinzelle und rechts deren Reaktion auf die Applikation von 100 mM Glutamat für 100 ms. Rechts das Raum-Zeit-Diagramm der Veränderung in der Fluoreszenzintensität der links eingezeichneten Schnittlinie als Funktion der Zeit. Rechts oben der Stimulus. Farbskala links wie in Abbildung 3-12, rechts als $\Delta F/F$ in %. OG-5N, AMES, IC = Cs-Gluconat.

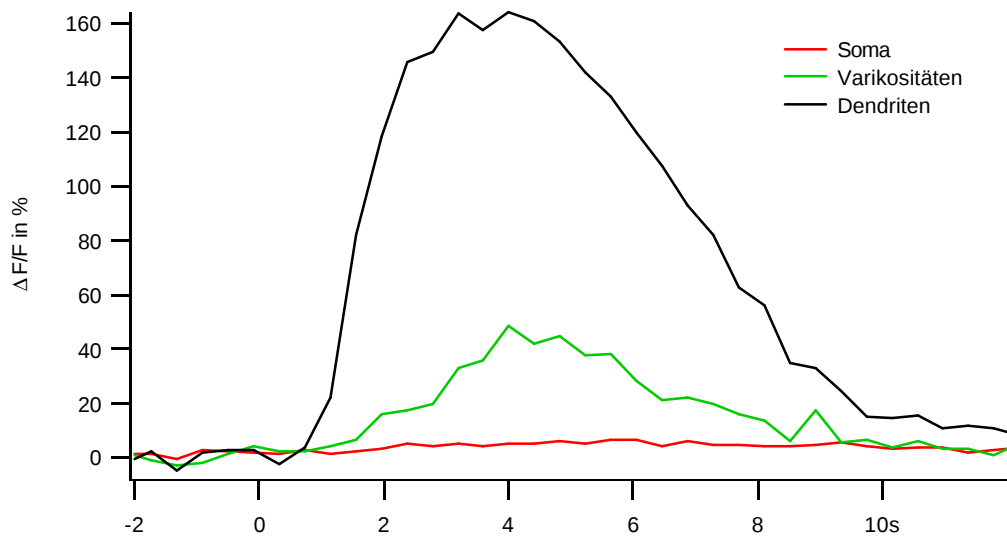


Abbildung 3-19 zeigt die Erhöhung der Intensität in der Fluoreszenz $\Delta F/F$ in drei verschiedenen Zellkompartimenten, ausgelöst durch die Applikation von $100 \mu\text{M}$ Glutamat für 100 ms. Die Applikation erfolgte bei 0 Sekunden. OG-5N, AMES, IC = Cs-Gluconat.

Bei dem gezeigten Experiment löste eine 100 ms lange Applikation von $100 \mu\text{M}$ Glutamat eine Verstärkung der Fluoreszenz in den distalen Dendriten von 160% aus. Das Maximum dieser Veränderung wird zwei Sekunden früher erreicht als das Maximum der Veränderung in den keulenförmigen Dendriten

Gleichzeitig mit den Fluoreszenzdaten wurden, mit Hilfe der Mikroelektrode, die applikationsinduzierten Ströme gemessen. In Abbildung 3-20 sind solche Ströme für die Applikation von AMPA, Kainat, Glutamat und NMDA dargestellt. Ströme die durch Glyzin beziehungsweise GABA induziert wurden ergänzen die Abbildung.

Die Applikationen lösten Einwärtsströme aus, wobei nicht unmittelbar ersichtlich war, ob es sich dabei um kationengetragene Einwärtsströme oder um anionengetragene Auswärtsströme handelte (die wegen des umgekehrten Vorzeichens ebenfalls als Ablenkung der Stromspur nach unten aufgezeichnet werden). Um Anionen- und Kationen-Ströme zu unterscheiden wurden die Umkehrpotentiale der Ströme experimentell bestimmt. Das dazu verwendete Protokoll hob die Membranspannung insgesamt vier mal vom Haltepotential aus auf $+40 \text{ mV}$ an (siehe Abbildung 3-20 oben rechts). Diese „Rampen“ im Membranpotential führten bei geöffneten Kanälen dazu, dass die Ionen zunächst einwärts, dann aber infolge der veränderten elektrochemischen Kräfte auswärts strömten. Das Potential, bei dem die Ionen gerade keinen Netto-Strom mehr erzeugen heißt Umkehrpotential. Dieses wurde auch mit Hilfe der Nernst-Gleichung berechnet, es lag für die gegebenen intra- und extrazellulären Lösungen für Chlorid bei etwa -54 mV und für unspezifische Kationen-Ströme nahe $\pm 0 \text{ mV}$. Abbildung 3-21 zeigt die Ströme, die durch solche Rampen im Haltepotential ausgelöst wurden.

Die Umkehrpotentiale geben Aufschluss darüber, ob es sich bei einem induzierten Strom um einen primären oder sekundären, das heißt durch vorgeschaltete Neurone vermittelten, Effekt handelte. Die Applikation von Glutamat könnte ein

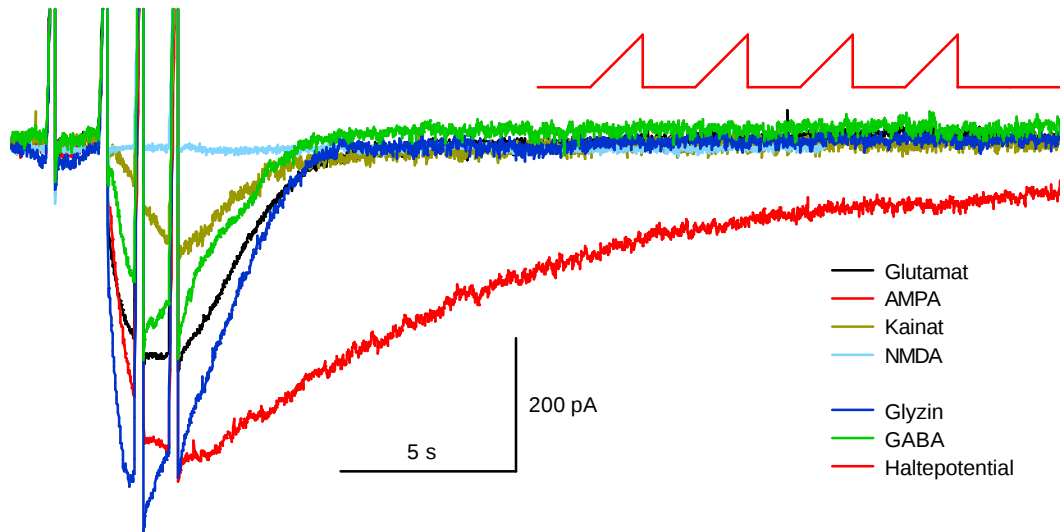


Abbildung 3-20 zeigt die durch Applikation verschiedener Agonisten ausgelösten Ströme. Die Ströme werden von Rampen im Haltepotential durchbrochen (-95 mV bis 45 mV in 150 ms), mit deren Hilfe die Art der Ionen bestimmt werden konnten, die den jeweiligen Strom tragen. Das Rampen-Stimulusprotokoll der ersten fünf Sekunden ist rechts oben dargestellt. Die Abbildung zeigt die Ordinate nur bis +200 pA, darüber hinaus gehende Ströme sind nicht gezeigt.

vorgeschaltetes Neuron erregen und über dieses Zwischenglied zur Ausschüttung eines inhibitorischen Neurotransmitters führen. Durch die Messung der Umkehrpotentiale ließ sich hierüber eine Aussage treffen. In Abbildung 3-21 sind die Umkehrpotentiale für die AMPA-, kainat- und glutamatinduzierten Ionenströme als Schnittpunkt mit der Abszisse abzulesen, sie lagen zwischen 0 und +10 mV. Die Umkehrpotentiale der GABA- und glyzininduzierten Ionenströme liegen zwischen -40 mV und -50 mV. Bei einer linearen Regression der Glyzin- beziehungsweise AMPA-induzierten Ströme errechnete sich ein Umkehrpotential von -42 mV beziehungsweise +4 mV.

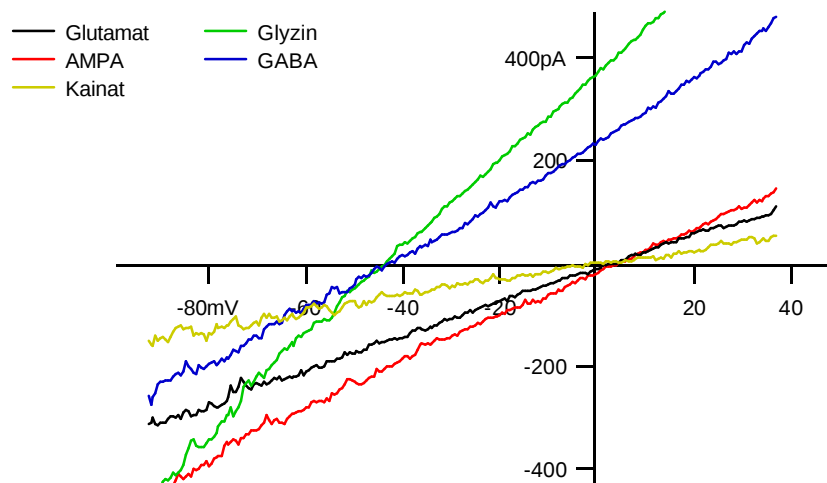


Abbildung 3-21 zeigt die Bestimmung der Umkehrpotentiale (V_U) für verschiedene Applikationen. Die kationengetragenen Ströme invertieren bei etwa +5 mV, die Anionen getragenen bei etwa -45 mV. Lineare Regression: $y=ax+b$ mit $a=4,5$ mV/pA; $b=-17$ pA; $V_U=4$ mV für AMPA und $a=8,7$ mV/pA; $b=370$ pA $V_U=-42$ mV für Glyzin.

3.2.3.2 Pharmakologie der glutamatinduzierten Ströme

Verschiedene Untereinheiten der ligandengesteuerten Glutamat-Rezeptoren sind in unterschiedlichem Maß empfindlich gegenüber verschiedenen Drogen und Toxinen.

Da sich bei den Applikationsexperimenten keine Hinweise darauf gefunden hatten, dass es sich bei den Glutamat-Rezeptoren um solche vom NMDA-Typ handelt, wurde vor allem mit Wirksubstanzen gearbeitet, die an Rezeptoren vom AMPA/Kainat-Typ angreifen. NBQX (Zeman und Lodge 1992) wurde dabei als unspezifischer Antagonist für AMPA- und Kainat-Rezeptoren verwendet, Gyki 52466 (Tarnawa et al. 1989) als spezifischer Antagonist für AMPA-Rezeptoren.

Nachdem das Gewebe in 10 mM NBQX inkubiert worden war, wurden die unterschiedlichen Agonisten appliziert. Bei allen unter diesen Bedingungen untersuchten Zellen (n=5) wurden eine nahezu vollständige Blockade der induzierten Ströme (99,6% Glutamat, 99,0% AMPA, 98,5% Kainat) beobachtet (Ladungsverschiebung gemessen als bestimmtes Integral vom Zeitpunkt der Applikation bis 20 Sekunden danach). Ein deutlicher Rückgang in der Veränderung der Fluoreszenz (~90%) begleitete den Rückgang in der Größe der Ladungsverschiebung. Die Effekte waren zum Teil reversibel, wie aus der sich langsam erholenden Antwort nach dem Auswaschen der Drogen zu ersehen ist (Abbildung 3-25). Eine vollständige Erholung auf den Anfangswert konnte nie beobachtet werden.

Gyki 52466 ist ein spezifischer Antagonist an AMPA-Rezeptoren. Die induzierten Ströme gingen unter dem Einfluss von Gyki 52466 auf 40% zurück (n=2), unter dem Einfluss von NBQX auf 1%. Die Auswaschung erreichte ein Niveau von ~30% bezogen auf die Kontrolle (Ladungsverschiebung gemessen als bestimmtes Integral vom Zeitpunkt der Applikation bis 20 Sekunden danach). Bei den verwendeten Gyki 52466 Konzentrationen von 20 μ M konnte kein vollständiger Block der AMPA-induzierten Einwärtsströme beobachtet werden.

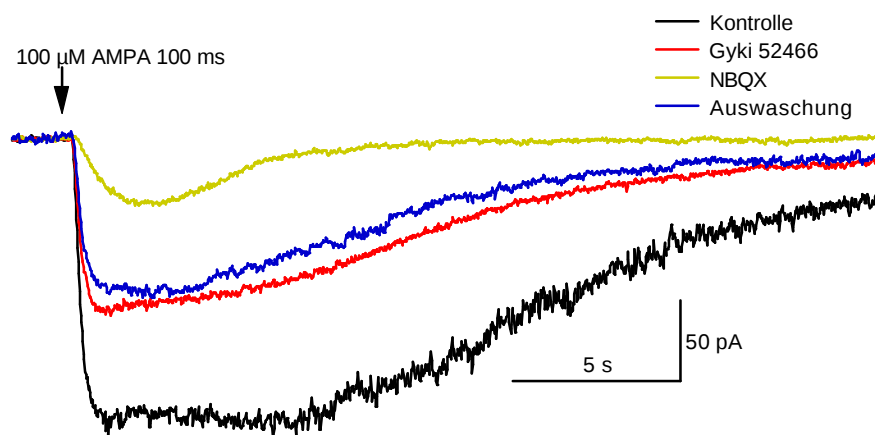


Abbildung 3-22 zeigt die durch AMPA (100 mM, 100 ms) induzierten Ströme einer AII Amakrinzelle unter Kontrollbedingungen und unter dem Einfluss verschiedener Wirkstoffe. Die Ströme sind unter Gyki 52466 nur etwa zur Hälfte blockiert, auch unter NBQX konnte hier kein vollständiger Block erreicht werden. Die verwendete AMPA Konzentration war mit 100 μ M ausgesprochen hoch. AMES, IC = Cs-Gluconat.

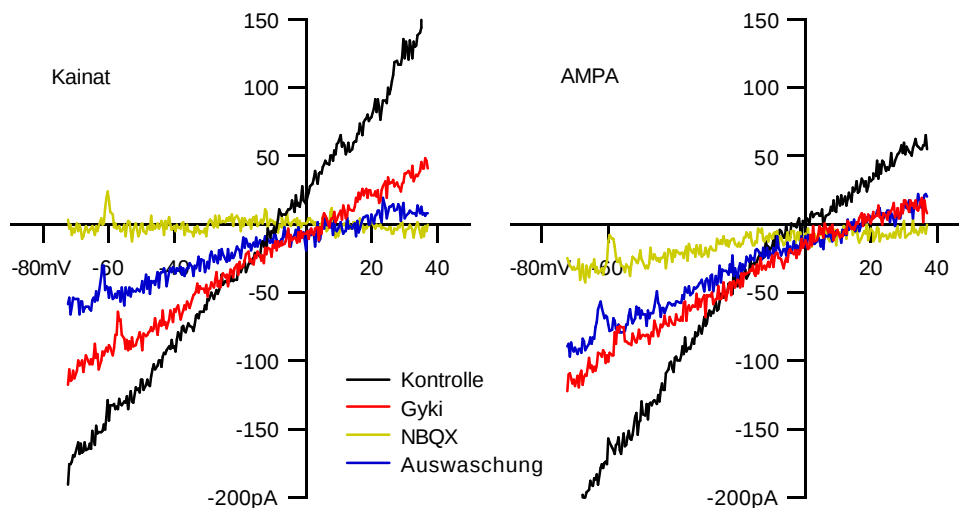


Abbildung 3-23 zeigt die Bestimmung der Umkehrpotentiale der induzierten Ströme unter dem Einfluss von Kainat und AMPA. Die kainatevozierten Ströme konnten durch NBQX vollständig blockiert werden, die AMPA-evozierten zu über 80%. In beiden Fällen ist das Umkehrpotential für die Ströme unter Kontrollbedingungen am weitesten links. AMES, IC = Cs-Gluconat.

Untersuchungen des Umkehrpotentials der induzierten Ströme zeigten, dass es sich bei den AMPA- und kainatinduzierten Antworten und bei den teilweise blockierten Komponenten nicht um unterschiedliche, eventuell sekundäre Ströme oder Netzwerkeffekte handelte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-23 dargestellt. Die Umkehrpotentiale lagen zwischen 0 und +20 mV, was auf kationengetragene Ströme hinweist. Die Umkehrpotentiale wurden unter NBQX und in Anwesenheit von Gyki 52466 wenn überhaupt zu positiveren Werten hin verschoben.

Aus Abbildung 3-23 kann man auch erkennen, dass der Kainatinduzierte Strom unter 10 μ M NBQX vollständig blockiert war. Der AMPA-induzierte Strom war dagegen mit etwa -20 pA bei -80 mV noch relativ groß.

Die pharmakologischen Untersuchungen zeigten, dass bei allen untersuchten Zellen die glutamatinduzierten Ströme (sowie die kainat- und AMPA-induzierten Ströme) zu mehr als 98% durch NBQX blockiert wurden. Die Untersuchung der Umkehrpotentiale weist darauf hin, dass es sich bei den Veränderungen unter dem Einfluss von NBQX um einen primären Effekt handelt. Gyki 52466, ein AMPA spezifischer Antagonist, reduzierte bei zwei daraufhin untersuchten Zellen den glutamatinduzierten Strom auf 40% des Anfangswertes. Der Anstieg der Fluoreszenz in den distalen Dendriten wurde durch NBQX auf etwa 10% des Ausgangswertes verringert.

Die antagonistischen Wirksubstanzen konnten teilweise ausgewaschen werden.

In Abbildung 3-24 sind die Ergebnisse der Elektrophysiologie zusammengefasst, die glutamat-, AMPA- und kainatevozierten Ströme sind jeweils für Kontrollbedingungen normalisiert.

3. Ergebnisse

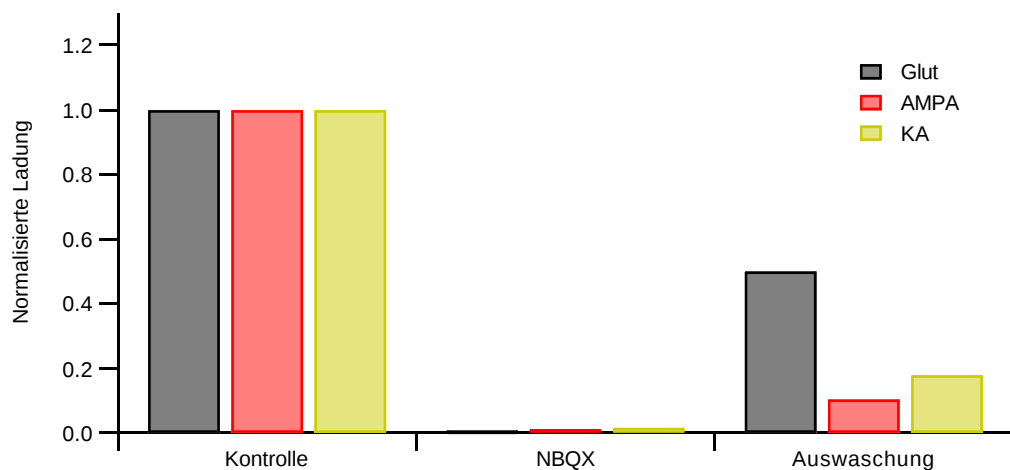


Abbildung 3-24 zeigt die Auswirkungen von NBQX auf die applikationsinduzierten Ströme ($n=5$). Die Ströme sind für die jeweiligen Kontrollbedingungen normalisiert. Die evozierten Ströme lassen sich zu über 95% durch NBQX blockieren. Der Effekt war zumindest teilweise reversibel, die Auswaschung unvollständig.

Die AMPA-induzierten Ströme und deren Veränderung unter dem Einfluss einer Wirksubstanz ist in Abbildung 3-25 gezeigt. Die Größe der Ströme ist als normalisierte Ladung dargestellt. Man erkennt deutlich den blockierenden Effekt von NBQX sowie die langsame Erhöhung der Ströme nach dem Ende der NBQX-Applikation. Die Auswaschungseffekte sind in Abbildung 3-25 deutlich zu sehen. Die AMPA-Applikationen in den Minuten nach dem Einwirken der Droge induzierten zunehmend größere Ströme, wobei die Anfangswerte nicht wieder erreicht wurden.

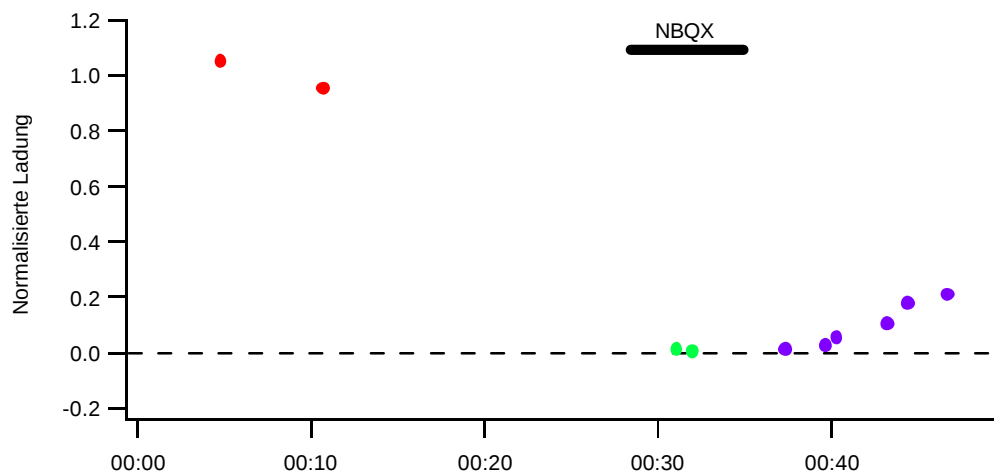


Abbildung 3-25 zeigt einen Zeitverlauf der Ladungverschiebungen induziert durch AMPA-Applikationen unter Kontrollbedingungen (in Rot), unter NBQX (in Grün) und während der Auswaschung (in Blau). Die Anzahl der Applikationen unter den einzelnen Bedingungen wurde bewusst klein gewählt, um die Zelle möglichst wenig zu stören, alle nicht AMPA-Applikationen sind zur Verbesserung der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.

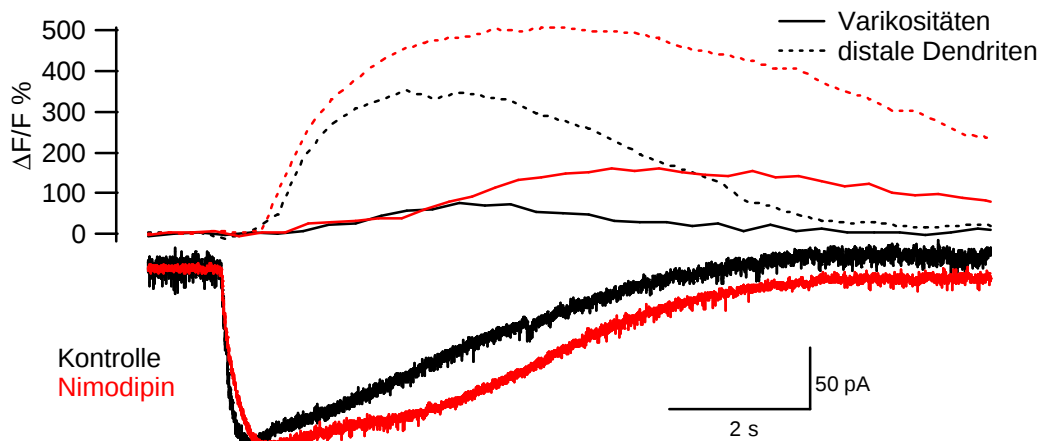


Abbildung 3-26 zeigt die Reaktionen einer AII Amakrinzelle auf eine Glutamat-Applikation unter dem Einfluss von Nimodipine. Dargestellt ist die Veränderung der Fluoreszenz (oben) und darunter der evozierte Strom. Die unter Kontrollbedingungen gemessenen Daten sind in Schwarz, die unter dem Einfluss von Nimodipine in Rot dargestellt. Die Zeitskala ist für die beiden Teilabbildungen gleich. AMES, IC = Cs-Gluconat.

3.2.3.3 Glutamat-Rezeptoren unter dem Einfluss von Nimodipine

Die Veränderung der Fluoreszenz in den distalen Dendriten bei Glutamat-Applikation ist auf eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration zurückzuführen.

Um zu untersuchen, durch welchen Mechanismus das Kalzium in die Zelle gelangte wurden die Applikationsexperimente auch nach Inkubation mit Nimodipin durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-26 dargestellt. An insgesamt vier Zellen wurden die Auswirkungen von Nimodipine auf die glutamatinduzierten Ströme untersucht. Es zeigte sich, dass die evozierten Ströme unter dem Einfluss von Nimodipine ähnliche Amplituden und Abklingcharakteristik hatten wie unter Kontrollbedingungen (Abbildung 3-26 untere Teilabbildung).

Die Fluoreszenz der distalen Dendriten (Abbildung 3-26 obere Teilabbildung) stieg unter Kontrollbedingungen bei dieser Zelle auf etwa 300%. Unter dem Einfluss von Nimodipin stieg die Fluoreszenz auf über 500% des Ruhewertes an. In den keulenförmigen Fortsätzen stieg die durch Glutamat-Applikation induzierte Veränderung der Fluoreszenz von 80% auf 160% an. Die Fluoreszenz erreichte unter dem Einfluss von Nimodipin bei diesen Fortsätzen ihr Maximum 3 Sekunden später als im Kontrollexperiment.

3.2.4 Die Lichtreaktion

Die abgeleiteten Zellen reagierten in einigen Fällen auf das Anschalten des Mikroskoplichtes oder der Fluoreszenz-Auflichtbeleuchtung. Dies war unerwartet, da während der Präparation und Aufbewahrung der Retinaschnitte nicht im Dunkeln gearbeitet wurde und keine besonderen Vorkehrungen getroffen wurden um die Retina vor Licht zu schützen. Ein Ausbleichen der Retina wäre deshalb zu erwarten gewesen.

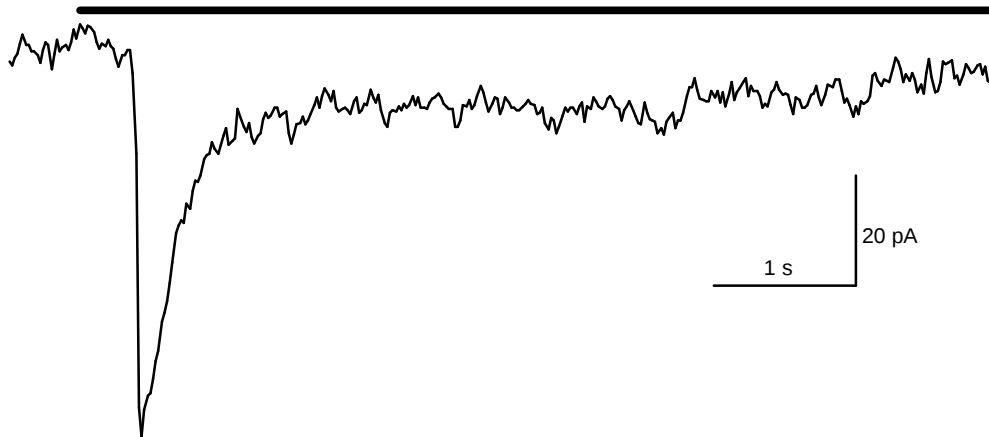


Abbildung 3-27 zeigt die Reaktion einer AII Amakrinzelle auf das Anschalten der Fluoreszenz - Auflichtbeleuchtung. Die gezeigte Reaktion ist ein Durchschnitt aus drei Einzelantworten. Deutlich ist der schnelle Einstrom kurz nach Beginn der Beleuchtung. Auf das Abschalten der Beleuchtung erfolgte keine Reaktion (hier nicht gezeigt). Man beachte die Zeitskala. Der Balken markiert das Einschalten des Lichtreizes. AMES, IC = Cs-Gluconat.

Dennoch konnten von Zeit zu Zeit Lichtantworten beobachtet werden, diese waren ein Indiz für den guten Gewebeerhalt der Retina.

Lichtantworten wurden nicht systematisch untersucht. Die gefundene Lichtantwort zeigte aber gute Übereinstimmung zu den in der Literatur beschriebenen (Boos et al. 1993).

3.3 Untersuchungen an der Reeler Mutante

Die Reeler Mutante ist eine spontan aufgetretene Mutation. Mäuse, die homozygot für diese Mutation sind (Reeler^{-/-}) fallen beim Laufen oder Gehen häufig auf die Seite. Sie sind nur teilweise in der Lage die hintere Körperhälfte aufrecht zu halten. Das Cerebellum ist stark verkleinert, die geordneten und in diskreten Schichten organisierten Strukturen im Cerebellum, Cortex und im Hippocampus sind auffällig verändert. Vitalität und Fertilität sind deutlich verringert.

Das Protein Reelin ist ein Ligand von VLDLR (engl.: very low density lipoprotein receptor) und ApoER2 (engl.: apolipoprotein E receptor 2), welche nach Ligandenbindung die Phosphorylierung des Proteins Disabled-1 stimulieren (D'Arcangelo et al. 1999). Disabled-1 wird von AII Amakrinzellen exprimiert (Rice und Curran 2000). Die Autoren berichten außerdem (Rice et al. 2001, Rice und Curran 2001), dass der Reelin-Disabled-1 Signalweg eine Rolle bei der Entwicklung der retinalen Verschaltung spielt.

Um zu untersuchen, ob die in der Literatur beschriebenen morphologischen Veränderungen der AII Amakrinzellen bei der Reeler - Maus Retina sich auch in deren funktioneller Architektur wiederfinden und um diese Veränderungen gegebenenfalls zu analysieren, wurden auch an Re^{nl} Mäusen Experimente durchgeführt.

3. Ergebnisse

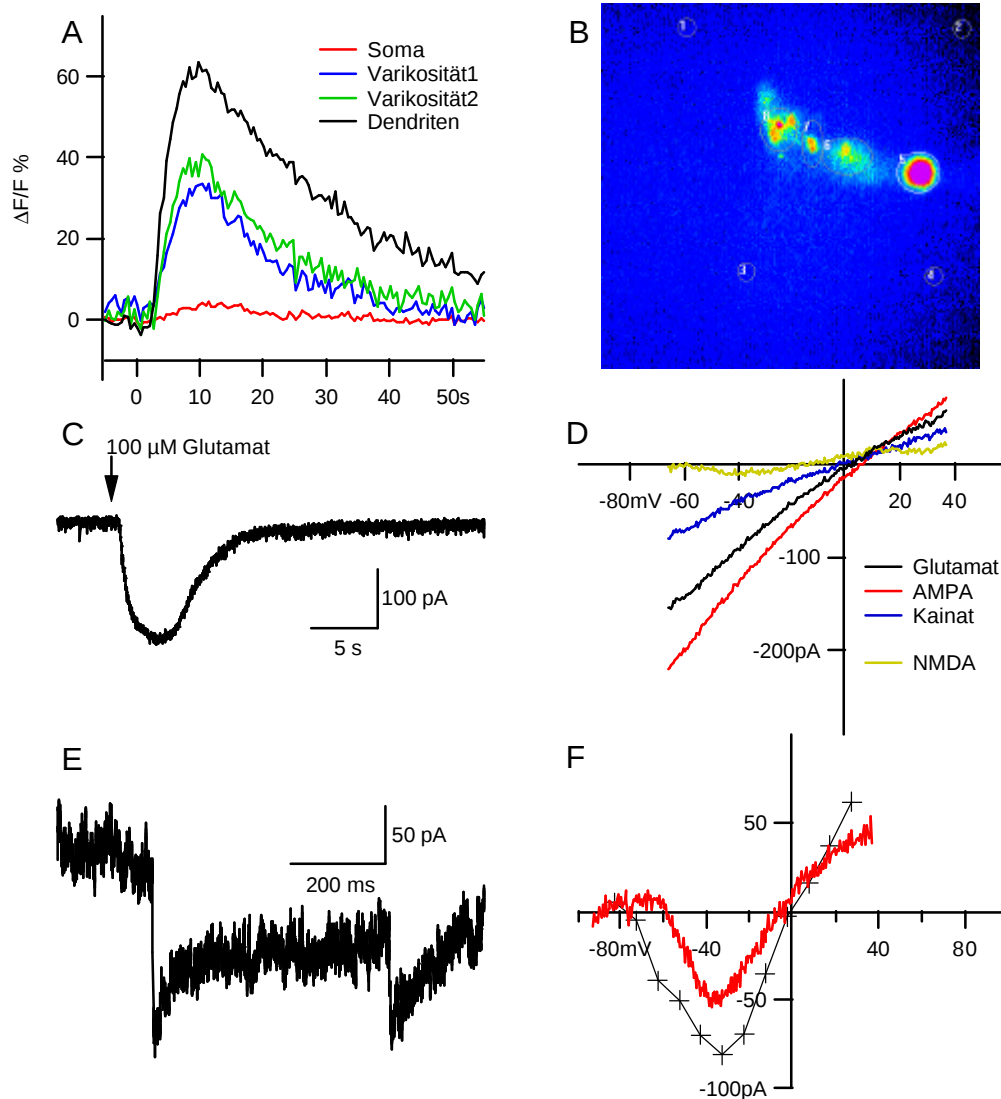


Abbildung 3-28 A) zeigt die Veränderung in der Fluoreszenz, der in B) dargestellten AII Amakrinzelle einer *Reeler^{-/-}* Maus bei Applikation von Glutamat. Der evozierte Strom ist in C) dargestellt. In D) sind die evozierten Ströme in Abhängigkeit vom Membranpotentials gezeigt. Man kann die Umkehrpotentiale der einzelnen Ströme ablesen, sie liegen zwischen 0 und +10 mV. E) zeigt einen depolarisationsinduzierten Strom, der aus vier Einzelströmen berechnet wurde. Besonders auffällige Repolarisationsströme fließen nach dem Abschalten des Pulses und dem Wiedereinstellen des Haltepotentials. F) zeigt zwei Strom-Spannungs-Kennlinien der Zelle. Die rote Stromspur wurde durch eine Rampe in der Kommandospannung von -92 auf +40 mV ausgelöst, die in Schwarz dargestellte durch ein Sprungprotokoll.

Achtzehn für die Mutation homozygote Mäuse wurden für die Experimente verwendet, dazu weitere 15 heterozygote Tiere. Bei den heterozygoten Tieren wurden insgesamt vier AII Zellen abgeleitet. Davon konnte nur eine Zelle analysiert werden (Daten nicht gezeigt).

Bei homozygoten Tieren wurden Ableitungen von 14 als AII identifizierten Zellen aufgezeichnet. Ein erster Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp, der sich nicht quantifizieren ließ, war die deutlich schlechtere optische Identifizierbarkeit der Zellen im Radialschnitt. Das Auffinden von Zellen mit der charakteristischen „Radischenform“ war erheblich schwerer als bei Wildtyp Mäusen. Auch die durchschnittliche Dauer der Aufzeichnungen war mit 23 Minuten unter dem

Durchschnitt der Ableitungen von Wildtyp AII (37 Minuten; n=123). Spontane synaptische Ströme konnten bei acht von 14 Zellen beobachtet werden.

Die durch eine Depolarisation ausgelösten Ströme zeigten beim Wildtyp nach der Repolarisation auf das Haltepotential eine sehr schnelle Deaktivierung, bei der Mutanten waren dagegen zum Teil erhebliche Nachströme zu beobachten (engl.: tail currents; Abbildung 3-28 E).

Die Amplituden der depolarisationsinduzierten Ströme lagen zwischen -50 pA und -100 pA. Die Umkehrpotentiale lagen wie im Wildtyp bei 0 mV für die spannungsabhängigen Ströme (Abbildung 3-28 F).

Glutamat, AMPA und Kainat lösten Einwärtsströme aus (Glutamat n=9; AMPA n=8; Kainat n=7 Amplituden um -200 pA bei $V_U = -75$ mV), NMDA löste nur bedingt Ströme aus (bei sieben von 23 Zellen, a.M. = -27,5 pA bei $V_U = +20$ mV). Die Umkehrpotentiale der ligandenaktivierten Ströme lagen für Glutamat, AMPA und Kainat bei 0 mV. Bei einem Experiment konnten die durch Glutamat, AMPA und Kainat ausgelösten Ströme mit NBQX blockiert werden (nicht gezeigt).

Die meisten AII Amakrinzellen der Reeler Maus (13 von 14) sahen wie AII Zellen der Wildtyp Maus aus (Abbildung 3-28 B), nur eine Zelle war auffällig verändert.

3.4 Messungen an A17 Amakrinzellen

Im Zuge dieser Arbeit wurde von 16 Zellen abgeleitet, die auf Grund der Morphologie, wie sie sich im kalziumfluorimetrischen Bild zeigt als A17 Amakrinzellen klassifiziert wurden. A17 Amakrinzellen konnten im Schnitt 71 Minuten lang abgeleitet werden, deutlich länger als AII Amakrinzellen.

Die Zellen zeigten deutlich spontane Aktivität (Abbildung 3-29 D). Die beobachteten spontanen Ströme hatten sehr unterschiedliche Amplituden (-5 pA bis -100 pA) und Intervalle und sie zeigten eine langsame Kinetik. Der Zeitverlauf entsprach dem für inhibitorische postsynaptische Ströme.

Spannungsabhängige Ströme wurden mit den gleichen Sprungprotokollen untersucht, wie sie bei AII Amakrinzellen verwendet wurden. Bei diesen Zellen waren die depolarisationsinduzierten Kalziumströme maximal -20 pA. Bei einigen Zellen konnten keine Kalziumströme nachgewiesen werden. Die Aktivierungsschwelle lag zwischen -60 mV und -40 mV. Das Maximum der Einwärtsströme wurde bei einer Depolarisation auf -40 mV bis -30 mV erreicht. Die Kalziumströme zeigten eine deutliche phasische Komponente (Abbildung 3-29 E). Der Einfluss von Nimodipine wurde Bei fünf Zellen untersucht, wobei weder bei den induzierten Strömen noch bei den Fluoreszenzmessungen statistisch verwertbaren Unterschiede zu den Kontrollbedingungen gefunden wurden (Daten nicht gezeigt).

Die gemessenen Auswärtsströme waren vermutlich, wie schon bei den AII Zellen, Cäsium / TBA resistente Kaliumströme. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass diese kurz nach der Ausbildung der Ganzzellkonfiguration am größten waren, dann aber schnell kleiner wurden. Allerdings konnten diese Auswärtsströme durch Cäsium / TBA nicht vollständig blockiert werden.

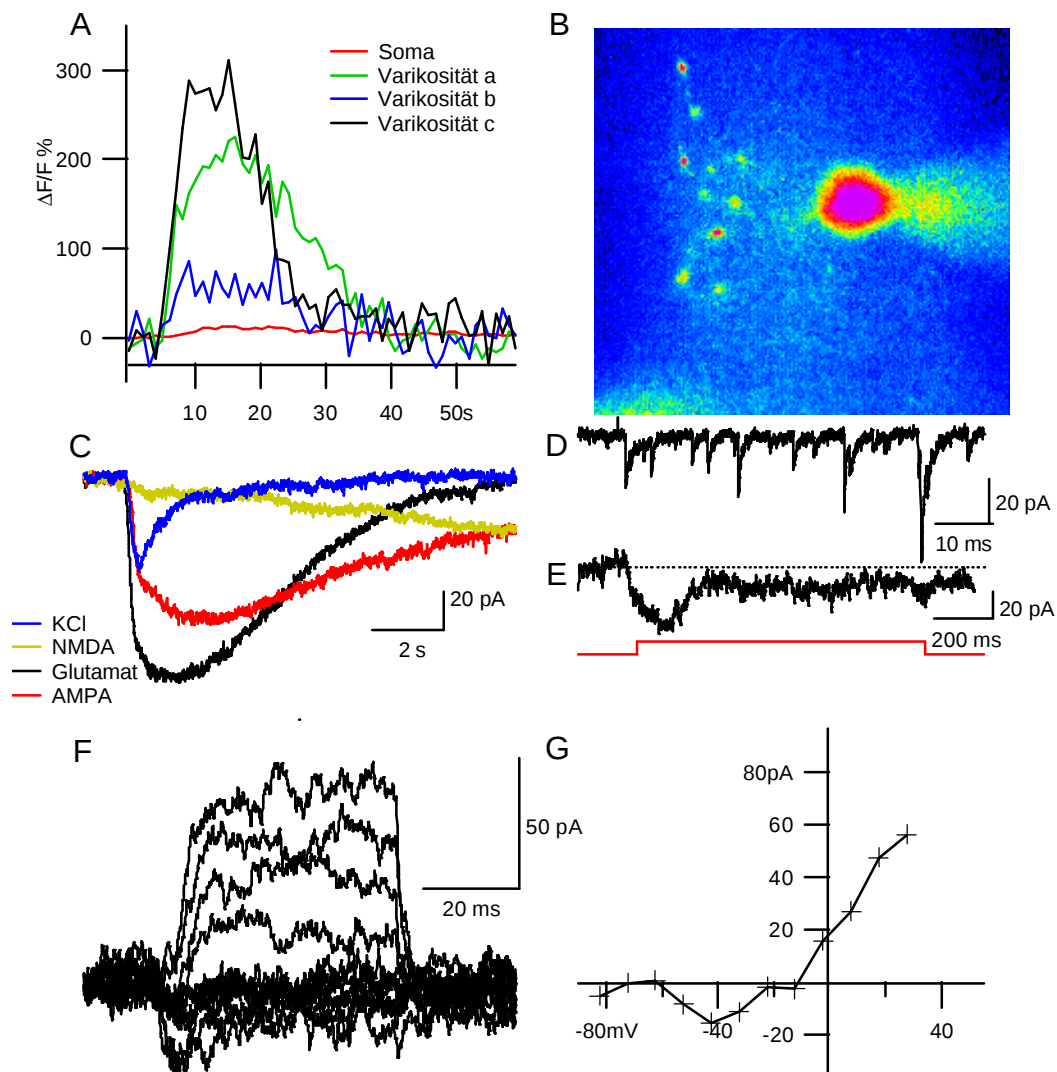


Abbildung 3-29 physiologische Charakterisierung einer A17 Amakrinzelle. A) zeigt die Veränderungen der Intensität der Fluoreszenz bei Stimulation mit 100 μ M Glutamat B) Falschfarbenbild einer A17 Amakrinzelle. C) Ströme die durch Applikation von Glutamat, AMPA, NMDA und KCl ausgelöst wurden. In D) ist eine Stromspur dargestellt, welche die spontane Aktivität der Zelle zeigt. Man beachte die Heterogenität der auftretenden PSCs. E) zeigt einen durch Depolarisation ausgelösten Einwärtsstrom, der eine phasische Komponente zeigt. F) zeigt eine Spannungsfamilie, die zu der in G) dargestellten Strom-Spannungs-Kennlinie führt. Es waren im wesentlichen nur Auswärtsströme zu beobachten.

Die Applikationen von Glutamat, AMPA und Kainat (n=10 Zellen) lösten dabei immer einen Einwärtsstrom aus (-20 pA bis -200 pA). Die Applikation von NMDA nur bei drei von acht untersuchten Zellen (-20 pA bis -50 pA). Etwa 10 bis 20 Minuten nach der Ausbildung der Ganzzellkonfiguration war die Beladung mit Kalziumindikator ausreichend um fluorimetrische Messungen vornehmen zu können. Die Dauer der Depolarisationen wurde gegenüber den Messungen an AII Zellen verlängert, auf bis zu zwei Sekunden. Depolarisationsinduzierte Veränderungen der Fluoreszenz konnten nur in wenigen Ausnahmefällen beobachtet werden.

Die Applikation von Wirksubstanzen verstärkte bei sieben von 16 Zellen deutliche die Fluoreszenz in zumindest einigen der Fortsätzen. Die in Abbildung 3-29 A) dargestellte Reaktion auf die Applikation von 100 μ M Glutamat zeigt, dass die Fluoreszenz auf das bis zu dreifache ansteigt, und für 10 beziehungsweise 20 Sekunden deutlich erhöht bleibt. Die Abbildung zeigt auch, dass die Reaktionen bei den einzelnen Fortsätzen sehr unterschiedlich waren. Die glutamat-, AMPA- und kainatinduzierten Ströme sowie die Veränderungen der Fluoreszenz konnten durch NBQX zumindest teilweise blockiert werden (n=5, Daten nicht gezeigt).

Bei einigen der untersuchten A17 Amakrinzellen konnten Lichtantworten beobachtet werden. Es wurde nicht versucht solche systematisch auszulösen und zu analysieren (nicht gezeigt).

Die durch DAB-Färbung sichtbar gemachten A17 waren immer gekoppelt. Die Färbung trat bei so vielen Zellen auf (über 100 Zellen jeweils), dass die Morphologie einzelner A17 nicht rekonstruiert werden konnte.

Bei zwei Experimenten wurde durch Zugabe von Carbenoxolon, einem Antagonisten von elektrischen Synapsen, versucht die elektrischen Synapsen zu schließen um einzelne Zelle anfärben zu können. Leider zeigte Carbenoxolon keine Wirkung und war nicht in der Lage die Zellen zu entkoppeln.

Nicht denkendes Denken, nicht Denken, das nur sich zum Subjekt und
Objekt, zum Organ und Zweck hat, sondern sehendes Denken,
hörendes, fühlendes Denken! Oder auch umgekehrt, denkendes Sehen,
denkendes Fühlen.
LUDWIG FEUERBACH

4 Diskussion

AII Amakrinzellen der Maus wurden simultan elektrophysiologisch und Kalziumfluorimetrisch untersucht. Durch den Einsatz von Kalziumindikatorfarbstoffen konnten spannungsabhängige (engl. voltage gated calcium channels: VGCC) Kalziumströme an verschiedenen Stellen der AII gemessen werden. Weiterhin wurden die Glutamat-Rezeptoren der AII Amakrinzellen auf ihre biophysikalischen Eigenschaften hin untersucht, ihre Verteilung wurde bestimmt. Die Zellen wurden durch DAB-Reaktion sichtbar gemacht und anhand ihrer Morphologie klassifiziert.

4.1 Morphologie

AII Amakrinzellen der Maus sind wie AII Amakrinzellen anderer Spezies Kleinfeld Zellen. Die Dendriten der AII Amakrinzelle verzweigen sich in zwei Ebenen (Bistratifizierung). AII Amakrinzellen sind im lichtmikroskopischen Bild eine homogene Population, die schon im ungefärbten Radialschnitt gut zu erkennen ist.

4.1.1 Koppelung

Die untersuchten AII Amakrinzellen waren in der Regel mit anderen AII Zellen und mit einer Klasse von Bipolarzellen gekoppelt. Bei den Bipolarzellen handelt es sich wahrscheinlich um ON-Zapfenbipolarzellen. Die Zahl der gekoppelten Zellen war unterschiedlich. Teilweise wurden nur jene Zellen angefärbt, von welchen abgeleitet wurde, teilweise waren größere Gruppen von bis zu 30 Zellen zu sehen. Färbemuster wie sie von Vaney 1991 beschrieben wurden mit über 200 gefärbten Zellen konnten nicht beobachtet werden. Die Größe der Zellgruppen und die Frage von welchen Parametern die Gruppengröße abhängt wurde nicht systematisch untersucht.

Dieser Befund unterscheidet sich von jenem den Boos et al. 1993 beschrieben haben. Sie konnten keine Farbstoff-Koppelung bei AII Amakrinzellen bei Ratten feststellen (n=6). Da elektrische Synapsen durch eine ganze Reihe von Parametern moduliert werden, kommen verschiedene Ursachen für diesen Unterschied in Frage. Einmal wurde in der vorliegenden Arbeit extrazellulär mit AMES Medium gearbeitet, während Boos et al. eine Extrazellulärlösung verwendeten, der eine Reihe von Stoffen und möglichen Modulatoren fehlten. Auch die verwendeten Intrazellulärlösungen waren nicht identisch. Boos et al. verwendeten hohe Chloridkonzentrationen (140 mM bis 240 mM), die in unserer Intrazellulärlösung durch Gluconat ersetzt war. Retinale Kalziumströme welche von L-Typ Kanälen getragen sind, unterliegen bei Photorezeptoren und bei Bipolarzellen einer Regulation durch extrazelluläres Chlorid (Thoreson und Miller 1996). Dies unterstreicht die Notwendigkeit die Chloridkonzentrationen intra- und extrazellulär nahe dem physiologischen Wert einzustellen.

Unsere Experimente (und deren Vorbereitung) wurden in abgedunkelten Räumen durchgeführt, was wegen der Fluorimetrie notwendig war. Es ist möglich, und wurde schon vielfach diskutiert, dass die Größe der gekoppelten Zellgruppen mit dem Adaptationszustand der Retina variiert (Baldrige et al. 1998, Bloomfield et al. 1997, Dowling 1991). Auch die Tageszeit der Experimente ist eine mögliche Ursache für die gefundenen Unterschiede. Die Dopaminkonzentration schwankt im Lauf der circadianen Rhythmik (Djamgoz und Wagner 1992, Maguire und Hamasaki 1994, McMahon und Brown 1994, Nir et al. 2000, Reme und Wirz-Justice 1985). AII sind postsynaptisch zu Typ 1 dopaminergen Zellen (A18) (Pourcho 1982), und es ist deshalb zu erwarten, dass dopaminerge Amakrinzellen den Adaptationszustand der AII modulieren (Daw et al. 1990, Kolb 1997, Wässle und Boycott 1991, Fisch: Witkovsky und Schutte 1991).

Dopamin und auch cAMP reduzieren die Kopplung zwischen AII Zellen (Hampson et al. 1992). Die Menge des intrazellulär eingesetzten ATP könnte ebenfalls die Koppelung beeinflussen.

Auch der pH-Wert der Retina unterliegt einer intrinsischen Rhythmik (Dmitriev und Mangel 2000, Dmitriev und Mangel 2001) und beeinflusst elektrische Synapsen (Spray et al. 1981). Der pH-Wert unserer Intrazellulärlösung wurde auf 7,2 bis 7,3 eingestellt. Die IC-Lösungen wurden bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Inwieweit sich der pH-Wert dabei mit der Zeit veränderte wurde nicht untersucht. Der pH-Wert von AMES Medium liegt bei 7,4.

Eine weitere Einflussgröße ist die Temperatur. Unsere Experimente wurden generell an Nachmittagen (zwischen 13 und 20 Uhr) bei Raumtemperatur durchgeführt. Über die Tageszeit, zu der Boos et al. ihre Experimente machten liegen keine Angaben vor.

Stickstoffmonoxyd (NO) und cGMP reduzieren die Kopplung zwischen AII Amakrinzellen und Zapfenbipolarzellen, was zu der Vorhersage führt, dass ein erhöhter cGMP Spiegel (auf der Seite der Zapfenbipolarzellen) ein Umschalten von der Stäbchen- auf die Zapfenbahn bewirkt (Mills und Massey 1995).

Bei den hier vorgestellten Experimenten konnten die kapazitiven Artefakte, wie sie beim Umladen der Membran auftreten, nicht mit einer einfachen monoexponentiellen Funktion beschrieben werden (so auch bei Boos et al. 1993). Das lässt Aussagen über die Geometrie der Zellen zu. Bei mehr oder weniger kugeliger Gestalt würde man einen monoexponentiellen Verlauf der Artefakte erwarten. AII Amakrinzellen haben einen sehr kleinen Dendritenbaum, und man kann davon ausgehen, dass sie isopotential sind (Vardi und Smith 1996). Sind die elektrischen Synapsen zumindest teilweise geöffnet so wird die Geometrie der Membranoberfläche komplexer. Dies könnte eine Erklärung für die nicht monoexponentiellen kapazitiven Artefakte sein. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die AII Amakrinzellen während der Experimente zumindest teilweise untereinander elektrisch gekoppelt waren. Direkte Beweise, zum Beispiel synchrone Ableitungen von zwei gekoppelten AII Amakrinzellen, liegen uns jedoch nicht vor.

4.2 Spontane synaptische Aktivität

Das Auftreten spontaner Aktivität wurde als ein Zeichen guter Gewebeerhaltung gewertet, da offensichtlich präsynaptische Zellen noch Transmitter freisetzen und die untersuchte Zelle noch Membranströme im physiologischen Bereich zeigt.

4.2.1 Inhibitorische spontane synaptische Aktivität

Bei 36 von 121 Zellen konnte eine spontane synaptische Aktivität mit Amplituden von bis zu -60 pA beobachtet werden. Diese langsamen spontanen Ströme konnten durch Bicucullin und Strychnin blockiert werden, und entsprechen daher inhibitorischer spontaner Aktivität.

Diese Ströme waren sehr heterogen in Bezug auf die Amplitude, Abklingcharakteristik und Frequenz. Keiner dieser Parameter wurde weitergehend untersucht. Die inhibitorischen spontanen Aktivitäten wurden in der Regel in den ersten Minuten der Experimente durch Zugabe von Bicucullin und Strychnin blockiert.

4.2.2 Schnelle spontane Ströme

Schnelle spontane Ströme mit Amplituden von bis zu -270 pA und Frequenzen bis 180 Hz wurden bei 26 von 121 AII Amakrinzellen gefunden. Diese konnten durch TTX blockiert werden. Daher und auf Grund ihrer Spannungsabhängigkeit wurden diese nicht als synaptische Aktivität sondern als spannungsgesteuerte Natriumströme interpretiert.

4.3 Spannungsgesteuerte Kanäle

Die spannungsgesteuerten Kalium- und Natriumkanäle von AII Amakrinzellen wurden bei der Rattenretina von Boos et al. 1993 beschrieben. Bei der vorliegenden Arbeit wurden durch die Art der Protokolle und die verwendeten Extra- und Intrazellulärlösungen vor allem Kalziumströme untersucht. Eine Form "spontaner" Natriumströme wurde jedoch häufig beobachtet und wird im folgenden besprochen.

4.3.1 Spannungsgesteuerte Natriumkanäle:

Bei AII Amakrinzellen sind Aktionspotentiale beschrieben worden (Boos et al. 1993, Dacheux und Raviola 1986).

Hier konnten bei 26 von 121 Zellen schnelle spontane Ströme beobachtet werden. Diese konnten durch TTX blockiert werden (n=12). Diese Blockade war reversibel (n=5), wobei die Amplituden und Frequenzen der Ströme, die nach der TTX-Applikation auftraten, nie den Anfangswert erreichten. Bei konstantem Membranpotential traten diese Ströme zu Beginn der Experimente mit einer Frequenz von bis zu 180 Hz auf. Sie erreichten Amplituden von bis zu -270 pA. Wurde kein TTX eingesetzt, die Membran aber auf einem Potential gehalten, bei dem die spontanen Ströme konstant auftraten, wurden diese kleiner und verschwanden nach einigen Minuten in der Ganzzellkonfiguration. Bei 5 Zellen konnte ein Auswaschen des TTX beobachtet werden. Alle Experimente wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt, was das Auswaschen der Droge zusätzlich erschwert hat.

Diese spontanen Ströme konnte bei Haltepotentialen zwischen -90 mV und -60 mV beobachtet werden, was gut mit Angaben aus der Literatur übereinstimmt (Ratte -55 bis -60 mV Boos et al. 1993). Bei anderen Neuronen aktivieren spannungsgesteuerte Natriumkanäle bei -40 mV (Hille 1992).

Die Potentiale bei welchen spontane Natriumströme bei AII beobachtet werden konnten, waren veränderlich und verschoben sich im Laufe eines Experiments zunehmend zu negativeren Potentialen.

Als mögliche Funktion der Natriumströme wird eine lokale Signalverstärkung diskutiert (Boos et al. 1993). Spannungsaktivierte Natriumkanäle könnten auf den distalen Dendriten der AII Amakrinzelle exprimiert sein, in engem Kontakt zu den postsynaptischen Rezeptoren. Kleine Signale könnten verstärkt und schnell weitergeleitet werden und so die sehr schnelle Antwort der AII Amakrinzellen für Lichtreize erklären. Diese erreicht ihr Maximum schneller als das Signal bei den präsynaptischen Stäbchenbipolarzellen (Nelson 1982).

Diese Ströme konnten auch beobachtet werden wenn die Zellmembran auf einem konstanten Potential gehalten wurde. Die Kanäle durch die dieser Strom floß müssen sich daher auf einem Teil der Zelle befunden haben, wo die Membranspannung nicht vom Verstärker kontrolliert wurde. Dies könnten zum Beispiel die keulenförmigen Dendriten sein, die auf Grund ihrer Morphologie elektrisch isoliert sein könnten, oder benachbarten Zellen, die über elektrische Synapsen mit der untersuchten Zelle gekoppelt waren.

Robert Smith und Noga Vardi haben 1995 vorgeschlagen, dass es sich bei dem AII Amakrinzell-Synzytium um eine Struktur handelt, welche die Aufgabe hat unter skotopischen Bedingungen die korrelierten Signale, wie sie von einzelnen Photonen ausgelöst werden, von dem unkorrelierten Rauschen zu unterscheiden, also zu filtern. Die Autoren simulierten bei ihrer Arbeit ein Netzwerk von AII Amakrinzellen. Sie konnten unter geeigneten Rahmenbedingungen zeigen, dass das Vorhandensein von spannungsaktivierten Natrium- und Kaliumkanälen in Verbindung mit elektrischen Synapsen zu einer nicht linearen Verstärkung der Signale und damit zu einer Verbesserung des Signal / Rausch Verhältnisses führt. Bei ihrer „Strom-Klemme“ Simulation gehen die Autoren von „langsamen“ Aktionspotentialen aus, die mehr als 10 ms Halbwertsbreite zeigen (Smith und Vardi 1995).

Bei Maus AII Amakrinzellen konnten wir in der „Spannungs-Klemme“ zeigen, dass die Natriumströme deutlich schneller sind, und zwar zeigten diese Halbwertsbreiten um etwa 3 ms. Die gefundenen Frequenzen, zwischen 10 Hz und 180 Hz könnten, wie von Smith und Vardi vorgeschlagen, eine Anpassung an die jeweiligen Lichtverhältnisse sein.

Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle waren bei unserer Präparation durch intrazelluläres Cäsium und Tetra-Butyl-Ammonium (TBA) unterdrückt. Inwieweit sich dieser Umstand auf das Auftreten und die Geschwindigkeit von spontanen Natriumströmen auswirkte wurde nicht untersucht. Die Ströme konnten schon beobachtet werden, wenn die Glaselektrode nur auf die Membran aufgesetzt war, aber bevor diese aufgerissen wurde. Es erscheint daher ausgeschlossen, dass es sich um ein durch die künstliche intrazelluläre Lösung verursachtes Artefakt handelt. Die Ströme zeigten allerdings bei den meisten Zellen eine deutliche Tendenz dazu im Laufe des Experimentes kleiner zu werden und letztlich ganz zu verschwinden. Es kann sich dabei um einen Auswaschungseffekt handeln, der

durch die Substitution des Zytoplasmas durch die intrazelluläre Lösung bedingt war. Oder die Blockade der Kaliumkanäle durch Cäsium und TBA verursachte diesen Effekt mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung. Bei einigen Experimenten konnten die spontanen Ströme jedoch noch nach mehr als 45 Minuten beobachtet werden, sie waren dann aber klein und weniger zahlreich.

Ob AII Amakrinzellen unter physiologischen Bedingungen Aktionspotentiale feuern oder ob die von uns gefundenen Ströme durch die in vitro Situation induziert sind, kann nicht eindeutig entschieden werden. Die gefundenen Hinweise lassen eine physiologische Funktion dieser Ströme als sehr wahrscheinlich erscheinen.

Da sowohl die zur AII präsynaptischen Stäbchenbipolarzellen als auch die postsynaptischen Zapfenbipolarzellen gradierte Membranpotentiale aufwiesen könnte es sein, dass die AII Amakrinzellen bei bestimmten Adaptationsstufen Aktionspotentiale generierten, während sie sich bei anderen wie ein gradiertes Neuron verhielt. An gradierten Synapsen können Potentialdifferenzen von nur 100 μ V zuverlässig zu einer Veränderung der Transmitter Ausschüttung führen (von Gersdorff 2001). Eine Kombination dieser gradierten Eigenschaften einerseits mit Aktionspotentialen andererseits zur Anpassung an bestimmte Adaptationsniveaus erscheint zumindest möglich.

Wir konnten schnelle Natriumströme bei AII Amakrinzellen messen, diese traten bei untypisch niedrigen Potentialen auf. Ob diese Ströme bei benachbarten Zellen synchron auftreten und ob ihre Frequenz und Amplitude durch die Lichtintensität zu beeinflussen ist muss durch simultane Ableitung von zwei benachbarten AII Amakrinzellen bei zukünftigen Experimenten geklärt werden.

4.3.2 Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle

Unter Bedingungen, bei denen spannungsgesteuerte Natrium- und Kaliumkanäle weitgehend blockiert waren, konnten Kalziumströme beobachtet und untersucht werden. Bei 59 von 121 AII Amakrinzellen wurden Einwärtsströme als Reaktion auf eine Depolarisation gemessen. Die Kinetik und die Amplitude der Ströme sowie deren Pharmakologie lassen auf Kalziumkanäle vom L-Typ schließen.

L-Typ Kalziumkanäle sind Kalziumkanäle die von einem moderaten Haltepotential aus aktiviert werden können (engl. high voltage activated: HVA). Von diesen Kanälen werden solche unterschieden, die nur von stark hyperpolarisierten Membranpotentialen aus zu aktivieren sind (engl. low voltage activated: LVA). Wir haben für die Kalziumströme von AII Amakrinzellen eine Aktivierungsschwelle zwischen -60 und -50 mV gefunden.

Diese niedrige Aktivierungsschwelle weist darauf hin, dass es sich um Kanäle vom Typ $\text{Ca}_v1.3\alpha1$ handeln könnte. Diese sind als L-Typ Kalziumkanäle mit untypisch niedriger Aktivierungsschwelle beschrieben (Xu und Lipscombe 2001). Bei keiner der 121 untersuchten AII Amakrinzellen fanden sich Hinweise auf phasische Ströme.

Die im Experiment zur Untersuchung der Kalziumströme zur Verfügung stehende Zeit war begrenzt. Erstens unterdrückten Cäsium und TBA die Kaliumkanäle erst nach einiger Zeit. Zweitens unterliegen Kalziumkanäle einer Selbstregulation. Das bedeutet, dass zu Beginn eines Experimentes die Kalziumströme von den größeren Kaliumströmen maskiert, zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt die Kalziumströme durch Selbstregulation verschwunden waren.

Die depolarisationsinduzierten Veränderungen in der Fluoreszenz waren im Vergleich dazu robuster, sie konnten vom Beginn der Experimente an beobachtet werden und waren auch dann noch zu messen, als die Ströme schon nicht mehr zu beobachten waren.

Das führte dazu, dass die Veränderung in der Fluoreszenz bei einigen Fällen noch zu beobachten war, während die ohnehin kleinen Kalziumströme schon im Rauschen „untergegangen“ waren.

Die Pharmakologie der Kanäle war eindeutig. Durch die langen „Einspülzeiten“ der Wirksubstanzen und noch längerer Auswaschzeiten waren die Durchschnittswerte alleine zur Abschätzung der Effekte der Wirksubstanzen nicht geeignet. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen sind auch die jeweils maximalen Veränderungen unter dem Einfluss der jeweiligen Wirksubstanzen angegeben. Diese überschätzen den tatsächlichen Wert durch statistische Fehler, geben aber in Verbindung mit dem Mittelwert ein besseres Bild der Verhältnisse. Bei Anwendung von Nimodipin bleiben etwa 20% der Ströme unblockiert. Es kann sich dabei entweder um Ströme handeln, die von anderen Kanaltypen vermittelt wurden oder um nicht blockierte L-Typ Ströme. Da die Kinetik der Ströme sich unter Nimodipin (wie unter BayK 8644 auch) nicht veränderten und in den Strom-Spannungs-Kennlinien nie die charakteristischen Merkmale von phasischen Kalziumkanälen zu beobachten waren, schließen wir, dass es sich um nicht blockierte Anteile an einem L-Typ Kalziumkanal vermittelten Strom handelt.

Die verbleibenden Restströme bei Anwendung von Nimodipin lassen sich durch die Pharmakologie der $\text{Ca}_v1.3\alpha1$ erklären. Diese L-Typ Kalziumkanäle sind um etwa den Faktor 20 weniger sensitiv gegenüber den DHPs als die $\text{Ca}_v1.2\alpha1$ (IC_{50} 2.7 μM gegenüber 139 nM, Xu und Lipscombe 2001). Die hier gefundenen Merkmale sind die ersten Befunde zu diesem „untypischen“ L-Typ Kalziumkanal die bei einer Schnittpräparation gefunden wurden.

Mit letzter Sicherheit kann eine Beteiligung anderer Kalziumkanäle jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die Veränderungen der Fluoreszenz in den keulenförmigen Fortsätzen unter dem Einfluss von Nimodipin fällt fast auf Null. Eine Beteiligung von nicht L-Typ Kanälen an den Ausgangssynapsen in den keulenförmigen Fortsätzen ist daher nahezu ausgeschlossen.

Andere Kalziumkanaltypen könnten auf anderen Zellkompartimenten (z.B. dem Soma) zu den gemessenen Strömen beitragen.

L-Typ Kalziumkanäle wurden häufig in direkter Verbindung mit Bandsynapsen gefunden (von Gersdorff 2001). Da diese Kalziumkanäle auf einen tonischen Reiz mit einer tonischen Veränderung ihrer Leitfähigkeit reagieren erscheint ihre Assoziation zu Bandsynapsen sinnvoll.

Auf den Terminalien von Stäbchen und auf den Terminalien von Stäbchenbipolarzellen wurden L-Typ Kalziumkanäle nachgewiesen (siehe Einleitung). Hier konnte gezeigt werden, dass an den Ausgangssynapsen der AII Amakrinzelle ebenfalls L-Typ Kalziumkanäle beteiligt sind. Dieser Kalziumkanaltyp ist also offensichtlich in der Stäbchenbahn konserviert, zumindest bis zu der Stufe der AII Amakrinzellen.

Bei Dunkel adaptierten Zapfenbipolarzellen sind Lichtantworten gemessen worden, welche ebenfalls tonische Komponenten zeigten (Berntson und Taylor

2000). Diese tonischen Bestandteile der Lichtsignale scheinen also noch über eine weitere Synapse unverändert übertragen zu werden.

Da man von der AII Amakrinzelle einerseits annimmt, dass sie Aktionspotentiale generiert, Neurone die Aktionspotentiale feuern aber schnell inaktivierende Kalziumkanäle vom N, R oder P/Q-Typ an ihren Ausgangssynapsen besitzen ergibt sich eine außergewöhnliche Kombination.

Die hier vorgestellte Lokalisation tonischer Kalziumkanäle an den chemischen Ausgangssynapsen der AII Amakrinzelle spricht für die Hypothese, dass es sich bei den Aktionspotentialen bei AII um eine lokale Erscheinung handelt. Spannungsabhängige Natriumkanäle könnten lokale Signale verstärken und würden nicht, wie echte Aktionspotentiale, über die Fortsätze der Zelle weitergeleitet, sondern wären auf die distalen Dendriten beschränkt. Die L-Typ Kalziumkanäle an den Ausgangssynapsen würden ein mehr oder weniger graduiertes Membranpotential in eine Neurotransmitterfreisetzung umwandeln.

Die chemischen Ausgangssynapsen der AII Amakrinzellen sind keine Bandsynapsen. Inwieweit andere Spezialisierungen eine tonische Transmitterausschüttung an diesen Synapsen ermöglicht ist noch nicht untersucht (bis auf die hier vorgestellte Beteiligung eines $\text{Ca}_v1.3\alpha1$ L-Typ Kalziumkanals).

Postsynaptisch zur AII ist die $\alpha1$ Untereinheit des Glyzin-Rezeptors gefunden worden (Sassoe-Pognetto, Wässle et al. 1994). Diese zeigt fast keine Desensitisierung (zur Übersicht s. Legendre 2001). Diese Glyzin-Rezeptoren wären also gut geeignet tonische Signale auf postsynaptischen Bipolarzellen zu übertragen.

Metabotrope GABA-Rezeptoren verstärken L-Typ und inhibieren N-Typ Kalziumkanäle bei Ganglienzellen von Salamander Retinae (Shen und Slaughter 1999). Da AII Amakrinzellen auch postsynaptisch zu GABA-ergen Amakrinzellen sind, ist eine Regulation der L-Typ Kalziumkanäle über einen solchen Mechanismus denkbar.

4.4 Ligandengesteuerte Kanäle

Wurden Glutamat, AMPA oder Kainat, appliziert, lösten sie zuverlässig und reproduzierbar Einwärtsströme und einen Anstieg der Fluoreszenz der untersuchten Zelle aus. NMDA führte nicht zu einer messbaren Veränderung in der Fluoreszenz, induzierte aber bei einigen Fällen Membranströme. Glyzin und GABA lösten reproduzierbare, deutliche Einwärtsströme aus jedoch ohne messbare Veränderung der Fluoreszenz.

Applikation von Glutamat, AMPA und Kainat führte zu vergleichbaren Reaktionen, eine Veränderungen der Fluoreszenz wurde dabei vor allem in den distalen Dendriten beobachtet.. NMDA vermittelte zwar bei einigen Zellen kleine Ströme (7 von 23 Zellen, a.M. = $-27,5 \text{ pA}$ bei $V_{\text{Membr}} = +20 \text{ mV}$), löste aber nie eine Veränderung in der Fluoreszenz aus.

NMDA-vermittelte Ströme konnten bei anderen, nicht AII Amakrinzellen, gemessen werden. Die verwendeten NMDA Konzentrationen lagen um den Faktor drei über denen der anderen Wirksubstanzen. Ausserdem wurde das Membranpotential der Zellen während der NMDA-Applikation auf bis zu $+20 \text{ mV}$ gesetzt. Darüber hinaus enthielt die Applizierte NMDA-Lösung Glyzin um die Glyzin-Bindungstasche des NMDA-Rezeptors zu besetzen. Es erscheint wenig

wahrscheinlich, dass wir funktionale NMDA-Rezeptoren aus methodischen Gründen übersehen haben. Gegenteilige Befunde aus der Literatur (Hartveit und Veruki 1997) beruhen entweder auf Unterschieden zwischen den verwendeten Spezies (hier Maus, dort Ratte) oder auf unterschiedlichen Versuchsprotokollen. Die bei Rattenretina gefundenen NMDA-Rezeptoren unterlagen offensichtlich einer sehr starken Regulation durch sekundäre Signalwege und konnten nur in den ersten Minuten nach der Ausbildung der Ganzzellkonfiguration gemessen werden. Eine Beteiligung von NMDA-Rezeptoren an der Regulation des intrazellulären Milieus, insbesondere wenn es sich um extrasynaptische Rezeptoren handelt, kann durch unsere Experimente nicht völlig ausgeschlossen werden. Andere Autoren konnten keine NMDA-evozierten Ströme bei AII Amakrinzellen messen (Boos, Schneider et al. 1993).

Die Permeabilität von AMPA-Rezeptoren für Kalzium wird vor allem durch den relativen Anteil der GluR2 Untereinheiten bestimmt (Sommer et al. 1990). Je geringer die Menge an GluR2 um so größer die Kalziumpermeabilität. Allerdings sind Glutamat-Rezeptoren vom AMPA-Typ ohne GluR2 besonders rektifizierend (Hollmann et al. 1991).

Die durch Wirkstoff-Applikation ausgelösten Ströme von AII Amakrinzellen zeigten hier eine lineare Abhängigkeit von der Membranspannung und so gut wie keine Vorzugsrichtung.

Dieser Befund widerspricht der Hypothese, dass es sich bei den glutamatevozierten Veränderungen in der Fluoreszenz um Auswirkungen von Kalzium handelt, welches direkt durch einen kalziumpermeablen Rezeptor in die Zelle gelangt. Die exprimierten Rezeptoruntereinheiten könnten natürlich auch modifiziert sein und somit eine untypische Physiologie zeigen. (Die Kalziumpermeabilität wird zum Beispiel nur von einer Aminosäure bestimmt: bei der Transmembrandomäne II des GluR2 ist in Pos 586 Glutamin durch Arginin ersetzt.)

Die applikationsinduzierten Reaktionen waren NBQX-sensitiv, woraus sich folgern lässt, dass sie durch Rezeptoren vom AMPA-/ Kainat-Typ vermittelt wurden. Bei zwei Zellen konnten die Reaktionen durch einen AMPA-Rezeptor spezifischen Blocker: Gyki 52466 deutlich beeinflusst werden.

Von immunzytochemischen Untersuchungen weiß man, dass die GluR2/3 Untereinheiten des Glutamat-Rezeptors postsynaptisch zu Stäbchenbipolarzellen lokalisiert sind. Die GluR1 Untereinheit konnte dagegen nicht postsynaptisch zur Stäbchenbipolarzelle nachgewiesen werden (Katze: Qin und Pourcho 1999).

Die GluR2/3 und GluR4 Untereinheiten des Glutamat-Rezeptors wurde bei der Makaken Retina von Ghosh et al. (2001b) auf AII Amakrinzellen, nicht aber auf A17 Amakrinzellen gefunden.

Die in der Literatur gefunden Ergebnisse und die hier vorgestellten Daten sprechen dafür, dass es sich bei den ionotropen Glutamat-Rezeptoren auf den distalen Dendriten von AII um solche vom AMPA-Typ handelt. Gegenüber von Bandsynapsen wurden häufig AMPA-Rezeptoren beschrieben (Morigiwa und Vardi 1999).

4.4.1 Der Mechanismus der Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Glutamat-Applikation

Der Einstrom von Kalziumionen durch kalziumpermeable Glutamat-Rezeptoren ist ein möglicher Mechanismus für den beobachteten Anstieg der Fluoreszenz bei Glutamat-Applikation. Eine eng benachbarte Anordnung von ligandengesteuerten Rezeptoren und spannungsabhängigen Kalziumkanälen eine weitere. Bei einer solchen Anordnung würden ligandenabhängige Kanäle nach Ligandenbindung öffnen, die Einstömenden Kationen würden die Membran lokal depolarisieren. Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle würden sich als Reaktion auf diese Depolarisation öffnen und Kalzium würde in die Zelle einströmen.

Um das Vorliegen einer solchen Anordnung zu überprüfen wurden Applikationsexperimente auch unter dem Einfluss von Nimodipin durchgeführt. Diese Experimente zeigten, dass zumindest keine L-Typ Kalziumkanäle an einem solchen Mechanismus beteiligt sind. Die Reaktionen der Zelle auf Glutamat-Applikation waren nicht verkleinert, sondern es konnte im Gegenteil eine deutliche Zunahme der Veränderung in der Fluoreszenz beobachtet werden.

Xin und Bloomfield beschrieben 1999 eine durch CNQX zu blockierende Komponente bei Lichtantworten von AII Amakrinzellen bei der helladaptierten Kaninchen Retina. Bei ihren Experimenten konnten sie eine hyperpolarisierende Antwort der AII Amakrinzellen durch einen Lichtreiz erreichen, diese aber nur in den ersten Minuten nach der Hell Adaptation, der anfänglich Dunkel adaptierten Retina. Diese Hyperpolarisation einer helladaptierten AII konnte durch CNQX blockiert werden. Die Autoren interpretieren ihre Ergebnisse als Hinweis auf glutamaterge Synapsen zwischen OFF-Zapfenbipolarzellen und den keulenförmigen Dendriten der AII. Bei der hier vorgestellten Arbeit wurde nicht zwischen dunkel und hell adaptierten Retinae unterschieden. Deutliche Hinweise auf kalziumpermeable ionotrope Glutamat-Rezeptoren auf den keulenförmigen Fortsätzen konnten nicht gefunden werden. Sollten diese Rezeptoren nicht kalziumpermeabel sein wären sie mit der verwendeten Technik nicht nachzuweisen. Die von Xin und Bloomfield gefundenen Antworten im helladaptierten Zustand sind aber vor allem auch deshalb interessant, weil sie zeigen, dass AII Amakrinzellen auch unter photopischen Bedingungen an der Signalverarbeitung der Retina mitwirken. Die von Xin und Bloomfield gemessenen Lichtantworten wurden von Stickstoffmonoxyd und cGMP moduliert, was dafür spricht, dass es sich um Signale handelt, welche zumindest an einer Stelle im Signalweg über elektrische Synapsen weitergeleitet werden.

4.4.2 Physiologische Bedeutung des Kalziums in den distalen Dendriten

Ein Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die Erhöhung der Kalziumkonzentration in den distalen Dendriten ausgelöst durch lokale Applikation von Glutamat, AMPA oder Kainat. Die physiologische Bedeutung dieses Anstieges in $[Ca^{2+}]_i$ ist zum Teil abhängig von den Mechanismen die dazu führen (spannungsabhängige Kanäle, ionotrope Rezeptoren oder Freisetzung aus intrazellulären Speichern). Die Tatsache aber, dass die Konzentration an intrazellulärem Kalzium deutlich ansteigt ist interessant, auch ohne den Auslösemechanismus mit letzter Sicherheit zu kennen.

Die Modulation von VGCC vom L-Typ ist eine bei Horizontalzellen nachgewiesene Funktion von Kalziumionen (dort durch ionotrope Glutamat-

Rezeptoren und durch kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern vermittelt, Linn und Gafka 2001).

Auch bei Ganglienzellen wurde beobachtet, dass Glutamat VGCC beeinflusst (Shen und Slaughter 1998). In diesem Fall waren neben ionotropen auch metabotrope Glutamat-Rezeptoren beteiligt.

Die unterschiedlichen Signalwege greifen so bei verschiedenen Zellen ineinander und modulieren sich gegenseitig. Eine solch komplexe Verzahnung der Kalziumsignalwege ist auch für AII Amakrinzellen zu postulieren.

Bei AII Amakrinzellen ist die Modulation der elektrischen Synapsen der distalen Dendriten eine wahrscheinliche Funktion des Ca^{2+} (Pereda et al. 1998). Eine weitere mögliche Funktion ist die Aktivierung von Calmodulin und weiter von calmodulinabhängigen Proteinen. Diese könnten Rezeptoren phosphorylieren oder dephosphorylieren, und somit modulieren. Neurone exprimieren auch kalziumabhängige Kaliumkanäle. Zwar wurden kalziumabhängige Kaliumkanäle meist in Verbindung mit spannungsgesteuerten Kalziumkanälen gefunden, doch wurden bei neuesten Untersuchungen auch kalziumpermeable NMDA-Rezeptoren in enger Verbindung mit kalziumabhängigen Kaliumkanälen gefunden (Isaacson und Murphy 2001). Diese vermittelten bei Zellen des Riechkolbens einen inhibitorischen Effekt. Eine eben solche Verbindung von kalziumpermeablen AMPA-Rezeptoren mit VGCC ist bisher nicht beschrieben, aber prinzipiell denkbar.

4.5 Untersuchungen an der Reeler Mutation

Die Experimente an Reeler Mäusen zeigten keine wesentlichen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp. Lediglich die Repolarisationsströme, welche nach dem Wiedereinstellen der Ruhepotentiale noch fließen, waren auffällig vergrößert.

Eine Veränderung der Morphologie, wie sie in der Literatur beschrieben ist, konnte nur bei einer von 22 Zellen beobachtet werden (acht für die Mutation heterozygote, 14 homozygote Tiere). Bei dieser Zelle war die Stratifizierung nicht mehr so klar wie bei Wildtypzellen. Statt dessen konnten im mittleren Bereich der IPL, wo beim Wildtyp keine Spezialisierungen zu finden waren, sowohl spannungsinduzierte als auch ligandenevozierte Veränderungen der Fluoreszenz beobachtet werden.

Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein Problem mit der Erkennung der Zellen im ungefärbten Schnittpräparat. Die Retina der Reeler Mäuse war am Lichtmikroskop auffällig morphologisch verändert. Die im Wildtyp zur Identifizierung genutzten morphologischen Besonderheiten der AII konnten nicht zur Auswahl der Zellen verwendet werden.

Wurde von den wenigen „AII ähnlichen“ Zellen abgeleitet zeigen diese eine „AII ähnliche“ Morphologie. Aufgrund der geringen Zahl dieser Zellen im Schnitt ist zu vermuten, dass ein Teil der AII Amakrinzellen morphologisch verändert war, und zwar derart, dass die Zellen im ungefärbten Schnitt nicht mehr als AII erkannt wurden. Eine physiologische Untersuchung von AII Amakrinzellen bei Reeler Mäusen müsste sich auf eine zufällige Stichprobe oder auf eine Vormarkierung der Zellen stützen. Diese Zellen müssten nach den physiologischen Experimenten immunzytochemisch als AII Zellen identifiziert werden.

4.6 Untersuchungen an der A17 Amakrinzelle

Von insgesamt 16 als A17 identifizierten Zellen konnten Ableitungen gewonnen werden. Die Klassifizierung der A17 Amakrinzellen war dabei weniger zuverlässig als die der AII Amakrinzellen. Die massive homologe Koppelung der A17 Zellen führte dazu, dass nicht selten mehrere hundert Zellen pro Radialschnitt gefärbt waren. Da A17 Amakrinzellen (wie andere Weitfeld-Amakrinzellen auch) sehr große Dendritenbäume besitzen waren die Schnitte so intensiv gefärbt, dass einzelne Zellen nicht mehr zu rekonstruieren waren. Die Klassifizierung stützt sich daher im Fall der A17 Amakrinzellen auf die aus der Fluorimetrie gewonnenen Morphologie. Diese ist jedoch, aufgrund der geringen räumlichen Auflösung und des kleinen Bildausschnittes nur eingeschränkt für eine sichere Klassifizierung geeignet.

Carbenoxolon, ein Wirkstoff der elektrische Synapsen blockieren soll konnte die A17 Amakrinzellen (n=2) nicht entkoppeln.

Die spontane Aktivität der A17 Zellen war ausgesprochen hoch. Schnelle durch TTX zu blockierende Ströme wurden nicht beobachtet, jedoch zahlreiche inhibitorische Ströme mit variabler Amplitude und Abklingcharakteristik.

Die Kalziumströme waren klein und unterschieden sich von Zelle zu Zelle. Bei A17 Amakrinzellen wurden phasische Komponenten bei Kalziumströmen gefunden. Nimodipin löste keine Veränderung in der Amplitude oder Kinetik der induzierten Ströme aus (n=5).

Glutamat, GABA, Glyzin, Kainat oder AMPA Applikationen führten bei A17 Amakrinzellen zu einwärtsgerichteten Strömen. Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen von Menger und Wässle (2000) überein. Bei sieben von 13 Zellen wurden Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ als Reaktion auf Wirkstoff-Applikation in den Varikositäten beobachtet. Die Veränderungen dauerten länger an als bei AII Amakrinzellen. Die applikationsinduzierten Ströme und die begleitenden Veränderungen in der Fluoreszenz der Varikositäten wurden zum Teil durch NBQX blockiert.

4.7 Diskussion der verwendeten Technik und deren Limitierungen

Bei der vorliegenden Arbeit konnten Kalziumströme, die über die Membran von AII Amakrinzellen flossen, durch eine Kombination aus Spannungs-klemme und Fluorimetrie gemessen und lokalisiert werden. Die pharmakologische Isolation der Kalziumströme durch intrazelluläres Cäsium und TBA gelang weitgehend, wobei Kaliumkanäle kurz nach der Etablierung der Ganz-Zell-Konfiguration noch zu den gemessenen Strömen beitrugen.

Mit Kalziumindikatorfarbstoffen unterschiedlicher Affinität wurden Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ unterschiedlichen Bereichen der Zelle beobachtbar. Die verschiedenen Farbstoffe hatten dabei spezifische Vor- und Nachteile. Die niederaffinen Farbstoffe erlaubten Messungen von mehreren Stunden Dauer ohne dass der Farbstoff mit Kalzium gesättigt worden wäre. Jedoch waren Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ unterhalb einer bestimmten Grenze mit diesen Farbstoffen nicht zu beobachten. Mit Indikatoren von hoher Affinität zu Kalzium konnten zwar Veränderungen in der $[Ca^{2+}]_i$ von niedrigen Ausgangskonzentrationen aus beobachtet werden, jedoch waren die Farbstoffe nach kurzer Zeit gesättigt und ließen keinerlei Beobachtung von

Intensitätsunterschieden in der Fluoreszenz mehr zu. Die „Ruhekonzentration“ des Kalzium veränderte sich im Laufe der Experimente und war nach wenigen Minuten so hoch, dass hochaffine Farbstoffe keine Veränderungen in der Fluoreszenz mehr zeigten.

Bereits nach weniger als einer Minute war genug Kalziumindikator aus der Elektrode in die Zelle diffundiert um Messungen durchführen zu können. Im Falle der A17 Amakrinzellen konnte dagegen zum Teil erst nach 30 Minuten mit der Beobachtung des ΔF begonnen werden, da die Diffusion in die sehr langen, dünnen Fortsätze dieser Zellen sehr langsam ist.

Die geringe Intensität des Anregungslichtes und die hohe Verstärkung der Fluoreszenz durch einen Restlichtverstärker machten Experimente von mehreren Stunden mit Belichtungszeiten von bis zu 30 Minuten möglich ohne dass es dabei zu Gewebeschäden (Phototoxizität) kam.

Der Limitierung der fluorimetrischen Messungen, durch den engen dynamischen Bereich der 8 Bit CCD - Kamera, wurde durch Messungen mit angepassten Parametern begegnet. So war die Fluoreszenz im Soma in der Regel gesättigt, wenn die Aufnahmeparameter auf die Varikositäten oder die distalen Dendriten abgestimmt waren. Wurden diese Parameter so gewählt, dass die Veränderungen der Fluoreszenz im Soma in dem beobachtbaren Bereich lagen so waren die Signale von anderen Bereichen der Zelle zu schwach um noch gemessen werden zu können. Die Zahl der Spannungssprünge und besonders die der Drogenapplikationen wurde klein gehalten um $[Ca^{2+}]_i$ nicht mehr als notwendig zu erhöhen, beziehungsweise um der untersuchten Zelle Zeit zu geben wieder zur Kalzium - Ruhekonzentration zurückzukehren.

Die Messungen von ΔF am Soma werfen noch eine andere Frage auf. Die Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ sind sehr lokal und gerade im Falle des Soma sehr wahrscheinlich auf die Bereiche dicht an der Zellmembran beschränkt. So könnten wegen des Verhältnisses zwischen Oberfläche und Volumen selbst große Mengen von somatischen Kalziumkanälen nur eine relativ kleine (und schwer zu beobachtende) Veränderung in der somatischen $[Ca^{2+}]_i$ auslösen. Dendritische Kalziumkanäle könnten im Gegensatz dazu schon bei niedriger Anzahl deutliche Veränderungen in der dendritischen $[Ca^{2+}]_i$ auslösen. Mit den gemessenen Strömen verhielte es sich genau umgekehrt. Somatische Ströme würden bei einer elektrischen Ableitung vom Soma systematisch überbewertet gegenüber solchen von den distalen Bereichen einer Zelle. Zur Messung der somatischen $[Ca^{2+}]_i$ können Farbstoffe verwendet werden, die aufgrund ihrer amphiphilen Struktur in die Membranen eingelagert werden und nur lokale Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ wider spiegeln.

4.8 Ausblick

Mit modernen Methoden lassen sich inzwischen weitreichendere Experimente realisieren. Sehr interessant sind simultane Ableitungen von zwei Zellen, die funktionell miteinander in Verbindung stehen.

Dies könnten zum Beispiel zwei über elektrische Synapsen gekoppelte AII Amakrinzellen sein. Die elektrischen Eigenschaften dieser Verbindungen und deren Pharmakologie könnten durch solche Experimente geklärt werden. Die Eigenschaften dieses AII Synzytiums sollten sich so untersuchen lassen.

Die simultane Ableitung einer AII Amakrinzelle und einer ON-Zapfenbipolarzelle wäre ebenfalls vielversprechend. Ob die elektrischen Synapsen wie von Mills und Massey (1995) vorgeschlagen, unterschiedlich reguliert werden ließe sich so experimentell überprüfen. Denkbar wäre die Kombination verschiedener Kalziumindikatoren, die bei unterschiedlichen Wellenlängen Fluoreszenzlicht emittieren. So könnte gezeigt werden ob sich Membranspannungen in benachbarte Zellen fortsetzen und dort zu einem Kalziumanstieg führen.

Auch das gleichzeitige Ableiten einer Stäbchenbipolarzelle und einer zu dieser postsynaptischen AII Amakrinzelle sollte ein lohnendes Experiment sein. Ist die AII Amakrinzelle in einer solchen Konfiguration mit Kalziumindikator gefüllt, sollte ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz innerhalb der distalen Dendriten zu beobachten sein wenn die Bipolarzelle depolarisiert würde. Ob dieser Anstieg dann im gesamten Bereich der Dendriten auftritt oder nur lokal und ob es in der Folge auch zu einer Erhöhung der Fluoreszenz an den Ausgangssynapsen kommt, könnte beantwortet werden. Es wäre auch interessant über Doppelableitungen die Glutamat-Rezeptoren zu untersuchen die bei der synaptischen Übertragung zwischen Stäbchenbipolarzelle und AII Amakrinzelle eine Rolle spielen.

Würde man dagegen von einer AII und einer OFF-Zapfenbipolarzelle ableiten, und wäre diese mit einem Chlorid-sensitiven Farbstoff gefüllt, ließen sich weitreichendere Aussagen über die chemischen Ausgangssynapsen der AII und die biophysikalischen Eigenschaften der Glyzin-Rezeptoren der OFF-Bipolarzellen machen.

Simultane Ableitungen von AII Amakrinzellen und Ganglienzellen sollten Rückschlüsse auf die Verschaltung der Zapfenbipolarzellen zulassen.

Bei einer kleinen Versuchsreihe im Rahmen meiner Doktorarbeit in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Euler am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg haben wir versucht lichtinduzierte Veränderungen in der intrazellulären Kalziumkonzentration bei AII Amakrinzellen mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie zu beobachten. Diese Versuche haben noch kein Ergebnis gezeigt, sind aber sehr vielversprechend verlaufen und sollen auch fortgesetzt werden.

Spannungsabhängige Farbstoffe, die Aktionspotentiale im Bereich von Millisekunden auflösen, könnten weitere Eigenschaften der AII und A17 Amakrinzelle zeigen.

5 Zusammenfassung

AII Amakrinzellen sind Interneurone in der Retina und ein wichtiges Element der Stäbchenbahn von Säugetieren. Man nimmt an, dass sie die von den Stäbchen stammenden ON-Signale in die ON und OFF Signalwege der Zapfenbahn aufteilen und weiterleiten. Amakrinzellen vom Typ AII sind mit 10-12% die häufigsten Amakrinzellen in der Retina, alle übrigen Typen bilden nur etwa 2 - 5% der Amakrinzellen (bei 20- 30 Typen von Amakrinzellen, MacNeil und Masland 1998).

Die Somata von AII Amakrinzellen liegen am inneren Rand der INL. Ein zentraler Fortsatz reicht in die IPL und verzweigt in einer ersten Stratifizierungsebene nahe der INL in keulenförmige Dendriten. Auf diesen Dendriten finden sich chemische Ausgangssynapsen zu OFF Bipolarzellen. AII Amakrinzellen verwenden Glyzin als Neurotransmitter.

Der am Soma entspringende zentrale Fortsatz zieht weiter durch die gesamte IPL und verzweigt sich in einer zweiten Stratifizierungsebene nahe der GCL (Bistratifizierung). Auf diesen distalen Dendriten liegen, postsynaptisch zu Stäbchenbipolarzellen, Eingangssynapsen die Glutamat-Rezeptoren exprimieren. AII Amakrinzellen sind untereinander und mit ON-Zapfenbipolarzellen durch elektrische Synapsen verbunden.

Bei der vorliegenden Arbeit wurden Membranströme von AII Amakrinzellen und Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration simultan gemessen. Die Zellen wurden in der Ganzzell - Konfiguration der Patch – Clamp - Technik untersucht. Die Membranspannung wurde auf einem festen Haltepotential gehalten (Spannungsklemme). Ströme wurden durch sprunghafte Veränderungen des Haltepotentials oder durch Applikation von Wirksubstanzen ausgelöst. Durch die gewählte Versuchsbedingungen waren Kalium- und Natriumströme weitgehend blockiert. Ein über die Ableitelektrode in die Zellen eingebrachter Indikatorfarbstoff, dessen Fluoreszenzintensität von der Konzentration der Kalziumionen abhängig ist, diente zur Beobachtung von Kalziumströmen.

Die Experimente zeigen, dass eine Depolarisation der AII Amakrinzellen spannungsabhängige Kalziumkanäle in der Zellmembran öffnet. Es kommt zu einem tonischen Einstrom von Kalziumionen in die AII Amakrinzellen. Die Ströme ließen sich mit Nimodipine (10 μ M) auf etwa 20% des Ausgangswertes reduzieren und durch BayK 8644 (10 μ M) um den Faktor zwei verstärken. Die Kinetik der Ströme änderte sich nicht unter dem Einfluss der Wirksubstanzen.

Die Depolarisation der AII Amakrinzellen führte auch zu einer deutlichen Erhöhung der Fluoreszenz des Kalziumindikators. In den keulenförmigen Fortsätzen dicht an der Grenze zwischen INL und IPL wurde die größte Erhöhung gemessen. Sie konnte, wie schon die Ströme, durch Nimodipine reduziert und durch BayK 8644 verstärkt werden. In den distalen Dendriten am inneren Rand der IPL konnten, bei Verwendung eines hochaffinen Indikatorfarbstoffes, geringe Veränderungen in der Fluoreszenz beobachtet werden.

Aus den dargestellten Ergebnissen folgt, dass es sich bei den spannungsabhängigen Kalziumkanälen auf den keulenförmigen Fortsätzen von AII Amakrinzellen um solche vom L-Typ handelt.

Lokale Applikationen von Glutamat, AMPA oder Kainat lösten einwärtsgerichtete Ströme aus. Diese Ströme gingen einher mit einer Erhöhung der Fluoreszenz und zwar vor allem in den distalen Dendriten. Die Ströme waren durch Umkehrpotentiale gekennzeichnet wie sie für kationengetragene Ströme charakteristisch sind.

GABA und Glyzin lösten ebenfalls einwärtsgerichtete Ströme aus. Diese waren jedoch nicht von einer Veränderung der Fluoreszenz begleitet und durch Umkehrpotentiale gekennzeichnet wie sie für anionengetragene Ströme zu erwarten waren.

Die durch Glutamat, AMPA oder Kainat ausgelösten Ströme wurden vollständig durch NBQX unterdrückt. Die simultan mit den Strömen auftretende Veränderung der Fluoreszenz in den distalen Dendriten wurde durch NBQX zu 90% blockiert. NBQX ist ein unspezifischer Antagonist für ionotrope Glutamat-Rezeptoren vom AMPA/Kainat Typ. Ein AMPA-Rezeptor spezifischer Antagonist (Gyki 52466) blockierte in der verwendeten Konzentration (20 μM) die durch Applikation von AMPA ausgelösten Ströme zu 60%.

Applikation von NMDA lösten bei 7 von 23 untersuchten Zellen sehr unterschiedliche Ströme aus. Die Ströme waren in keinem Fall mit einer Veränderung der Fluoreszenz verbunden.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass es sich bei den ionotropen Glutamat-Rezeptoren auf AII Amakrinzellen um solche vom AMPA Typ handelt. Diese befinden sich, sofern sie kalziumpermeabel sind (oder durch andere Mechanismen zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führen) auf den distalen Dendriten nahe der Ganglienzellschicht.

Die Erhöhung der Fluoreszenz bei Applikation von 30 μM AMPA oder 30 μM Glutamat betrug nicht selten über 300% $\Delta F/F$. Ob Kalziumionen durch kalziumpermeable Glutamat-Rezeptoren oder über andere Mechanismen (Pumpen, spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle) in die Zelle gelangte wurde nicht untersucht.

Weiterhin wurden bei AII Amakrinzellen Einwärtsströme gefunden die durch TTX blockiert werden konnten. Die Ströme hatten eine auffällig niedrige Aktivierungsschwelle von unter -70 mV, waren deutlich größer als spontane synaptische Ströme und ausgesprochen homogen. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Natrium-Aktions-Potentiale die an einer lokalen Signalverstärkung beteiligt sind.

6 Literaturverzeichnis

- Akopian, Krizaj, und Witkovsky (1997) "Both high- and low voltage-activated calcium currents contribute to the light-evoked responses of luminosity horizontal cells in the *Xenopus* retina.", *Brain Res.* 762:121-130
- Ames III und Nesbett (1981) "In vitro retina as an experimental model of the central nervous system", *J.Neurochem.* 37:867-877
- Baldrige, Ball, und Miller (1989) "Gap junction particle density of horizontal cells in goldfish retinas lesioned with 6-OHDA", *J.Comp Neurol.* 287:238-246
- Baldrige, Vaney, und Weiler (1998) "The modulation of intercellular coupling in the retina", *Semin.Cell Dev.Biol.* 9:311-318
- Barnes und Hille (1989) "Ionic channels of the inner segment of tiger salamander cone photoreceptors", *J.Gen.Physiol* 94:719-743
- Barry (1994) "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* 51:107-116
- Bennett, Barrio, Bargiello, Spray, Hertzberg, und Saez (1991) "Gap junctions: new tools, new answers, new questions", *Neuron* 6:305-320
- Berntson und Taylor (2000) "Response characteristics and receptive field widths of on-bipolar cells in the mouse retina", *J.Physiol* 524 Pt 3:879-889
- Berridge (1998) "Neuronal calcium signaling", *Neuron* 21:13-26
- Bito, Deisseroth, und Tsien (1997) "Ca²⁺-dependent regulation in neuronal gene expression", *Curr.Opin.Neurobiol.* 7:419-429
- Bloomfield (1992) "Relationship between receptive and dendritic field size of amacrine cells in the rabbit retina", *J.Neurophysiol.* 68:711-725
- Bloomfield und Dacheux (2001) "Rod vision: pathways and processing in the mammalian retina", *Prog.Retin.Eye Res.* 20:351-384
- Bloomfield, Xin, und Osborne (1997) "Light-induced modulation of coupling between AII amacrine cells in the rabbit retina", *Vis.Neurosci.* 14:565-576

- Bochet, Audinat, Lambolez, Crepel, Rossier, Iino, Tsuzuki, und Ozawa (1994) "Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel", *Neuron* 12:383-388
- Bokvist, Eliasson, Ammala, Renstrom, und Rorsman (1995) "Co-localization of L-type Ca^{2+} channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells", *EMBO J.* 14:50-57
- Boos, Schneider, und Wässle (1993) "Vol", *J.Neurosci.* 13:2874-2888
- Boycott und Wässle (1999) "Parallel processing in the mammalian retina: the Proctor Lecture", *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 40:1313-1327
- Brandstätter, Koulen, und Wässle (1997) "Selective synaptic distribution of kainate receptor subunits in the two plexiform layers of the rat retina", *J.Neurosci.* 17:9298-9307
- Bruzzone, White, und Paul (1996) "Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling", *Eur.J.Biochem.* 238:1-27
- Burrone und Lagnado (1997) "Electrical resonance and Ca^{2+} influx in the synaptic terminal of depolarizing bipolar cells from the goldfish retina", *J.Physiol* 505 (Pt 3):571-584
- Catterall (1988) "Structure and function of voltage-sensitive ion channels", *Science* 242:50-61
- Chun, Grünert, Martin, und Wässle (1996) "The synaptic complex of cones in the fovea and in the periphery of the macaque monkey retina", *Vision Res.* 36:3383-3395
- Chun, Han, Chung, und Wässle (1993) "Electron microscopic analysis of the rod pathway of the rat retina", *J.Comp Neurol.* 332:421-432
- Cohen (1965) "Some electron microscopic observations on inter-receptor contacts in the human and macaque retinae", *J.Anat.* 99:595-610
- D'Arcangelo, Homayouni, Keshvara, Rice, Sheldon, und Curran (1999) "Reelin is a ligand for lipoprotein receptors", *Neuron* 24:471-479
- Dacheux und Raviola (1986) "The rod pathway in the rabbit retina: a depolarizing bipolar and amacrine cell", *J.Neurosci.* 6:331-345

- Daw, Jensen, und Brunken (1990) "Rod pathways in mammalian retinae", Trends Neurosci. 13:110-115
- delaVilla, Vaquero, und Kaneko (1998) "Two types of calcium currents of the mouse bipolar cells recorded in the retinal slice preparation", Eur.J.Neurosci. 10:317-323
- DeVries (2000) "Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels", Neuron 28:847-856
- DeVries und Schwartz (1999) "Kainate receptors mediate synaptic transmission between cones and 'Off' bipolar cells in a mammalian retina", Nature 397:157-160
- Dingledine, Hume, und Heinemann (1992) "Structural determinants of barium permeation and rectification in non- NMDA glutamate receptor channels", J.Neurosci. 12:4080-4087
- Djamgoz und Wagner (1992) "Localization and function of dopamine in the adult vertebrate retina", Neurochem.Int. 20:139-191
- Dmitriev und Mangel (2000) "A circadian clock regulates the pH of the fish retina", J.Physiol 522 Pt 1:77-82
- Dmitriev und Mangel (2001) "Circadian clock regulation of pH in the rabbit retina", J.Neurosci. 21:2897-2902
- Dowling (1991) "Retinal neuromodulation: the role of dopamine", Vis.Neurosci. 7:87-97
- Dowling und Boycott (1965) "Neural connections of the retina: fine structure of the inner plexiform layer", Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. 30:393-402
- Ertel, Campbell, Harpold, Hofmann, Mori, Perez-Reyes, Schwartz, Snutch, Tanabe, Birnbaumer, Tsien, und Catterall (2000) "Nomenclature of voltage-gated calcium channels", Neuron 25:533-535
- Euler und Masland (2000) "Light-evoked responses of bipolar cells in a mammalian retina", J.Neurophysiol. 83:1817-1829
- Feigenspan, Gustincich, Bean, und Raviola (1998) "Spontaneous activity of solitary dopaminergic cells of the retina", J.Neurosci. 18:6776-6789

- Feigenspan, Teubner, Willecke, und Weiler (2001) "Expression of neuronal connexin36 in AII amacrine cells of the mammalian retina", *J.Neurosci.* 21:230-239
- Ferrer-Montiel und Montal (1996) "Pentameric subunit stoichiometry of a neuronal glutamate receptor", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:2741-2744
- Firth, Morgan, Boelen, und Morgans (2001) "Localization of voltage-sensitive L-type calcium channels in the chicken retina", *Clin.Experiment.Ophthalmol.* 29:183-187
- Fletcher, Hack, Brandstätter, und Wässle (2000) "Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina", *J.Comp Neurol.* 420:98-112
- Freed (2000) "Parallel cone bipolar pathways to a ganglion cell use different rates and amplitudes of quantal excitation", *J.Neurosci.* 20:3956-3963
- Freed und Sterling (1988) "The ON-alpha ganglion cell of the cat retina and its presynaptic cell types", *J.Neurosci.* 8:2303-2320
- Ghosh, Haverkamp, und Wässle (2001b) "Glutamate receptors in the rod pathway of the mammalian retina", *J.Neurosci.* 21:8636-8647
- Grunder, Kohler, und Guenther (2000) "Distribution and developmental regulation of AMPA receptor subunit proteins in rat retina", *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 41:3600-3606
- Grünert und Wässle (1996) "Glycine receptors in the rod pathway of the macaque monkey retina", *Vis.Neurosci.* 13:101-115
- Hack, Frech, Dick, Peichl, und Brandstätter (2001) "Heterogeneous distribution of AMPA glutamate receptor subunits at the photoreceptor synapses of rodent retina", *Eur.J.Neurosci.* 13:15-24
- Hack, Peichl, und Brandstätter (1999) "An alternative pathway for rod signals in the rodent retina: rod photoreceptors, cone bipolar cells, and the localization of glutamate receptors", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:14130-14135
- Hamill, Marty, Neher, Sakmann, und Sigworth (1981) "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches", *Pflugers Arch.* 391:85-100

- Hampson, Vaney, und Weiler (1992) "Dopaminergic modulation of gap junction permeability between amacrine cells in mammalian retina", J.Neurosci. 12:4911-4922
- Hartveit (1999) "Reciprocal synaptic interactions between rod bipolar cells and amacrine cells in the rat retina", J.Neurophysiol. 81:2923-2936
- Hartveit und Veruki (1997) "All amacrine cells express functional NMDA receptors", Neuroreport 8:1219-1223
- Haverkamp, Grünert, und Wässle (2000) "The cone pedicle, a complex synapse in the retina", Neuron 27:85-95
- Haverkamp, Grünert, und Wässle (2001a) "Localization of kainate receptors at the cone pedicles of the primate retina", J.Comp Neurol. 436:471-486
- Haverkamp, Grünert, und Wässle (2001b) "The synaptic architecture of AMPA receptors at the cone pedicle of the primate retina", J.Neurosci. 21:2488-2500
- Heidelberger und Matthews (1992) "Calcium influx and calcium current in single synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons", J.Physiol 447:235-256
- Henderson, Doerr, Gottesman, und Miller (2001) "Calcium channel immunoreactivity in the salamander retina", Neuroreport 12:1493-1499
- Hille Bertile (1992) "Ion Channels of Excitable Membranes", Sinauer Associates; Zweite Ausgabe, ISBN: 0878933212
- Hollmann, Hartley, und Heinemann (1991) "Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition", Science 252:851-853
- Hollmann und Heinemann (1994) "Cloned glutamate receptors", Annu.Rev.Neurosci. 17:31-108
- Horikawa und Armstrong (1988) "A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates", J.Neurosci.Methods 25:1-11
- Horn (2000) "A new twist in the saga of charge movement in voltage-dependent ion channels", Neuron 25:511-514

- Huba, Schneider, und Hofmann (1992) "Voltage-gated currents of putative GABAergic amacrine cells in primary cultures and in retinal slice preparations", Brain Res. 577:10-18
- Hughes (1997) "Are there ionotropic glutamate receptors on the rod bipolar cell of the mouse retina?", Vis.Neurosci. 14:103-109
- Isaacson und Murphy (2001) "Glutamate-mediated extrasynaptic inhibition: direct coupling of NMDA receptors to Ca^{2+} -activated K^{+} channels", Neuron 31:1027-1034
- Jonas und Burnashev (1995) "Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels", Neuron 15:987-990
- Juusola, French, Uusitalo, und Weckstrom (1996) "Information processing by graded-potential transmission through tonically active synapses", Trends Neurosci. 19:292-297
- Kaneko (1970) "Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina", J.Physiol 207:623-633
- Kaneko, Pinto, und Tachibana (1989) "Transient calcium current of retinal bipolar cells of the mouse", J.Physiol 410:613-629
- Karschin und Lipton (1989) "Calcium channels in solitary retinal ganglion cells from post-natal rat", J.Physiol 418:379-396
- Koh, Geiger, Jonas, und Sakmann (1995) " Ca^{2+} -permeable AMPA and NMDA receptor channels in basket cells of rat hippocampal dentate gyrus", J.Physiol 485 (Pt 2):383-402
- Kolb (1997) "Amacrine cells of the mammalian retina: neurocircuitry and functional roles", Eye 11 (Pt 6):904-923
- Kolb und Famiglietti (1974) "Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of cat retina", Science 186:47-49
- Lamb und Simon (1976) "The relation between intercellular coupling and electrical noise in turtle photoreceptors", J.Physiol 263:257-286
- Legendre (2001) "The glycinergic inhibitory synapse", Cell Mol.Life Sci. 58:760-793

- Lerma, Paternain, Rodriguez-Moreno, und Lopez-Garcia (2001) "Molecular physiology of kainate receptors", *Physiol Rev.* 81:971-998
- Lin und Faber (1988) "Synaptic transmission mediated by single club endings on the goldfish Mauthner cell. I. Characteristics of electrotonic and chemical postsynaptic potentials", *J.Neurosci.* 8:1302-1312
- Linn und Gafka (2001) "Modulation of a voltage-gated calcium channel linked to activation of glutamate receptors and calcium-induced calcium release in the catfish retina", *J.Physiol* 535:47-63
- Lomeli, Mosbacher, Melcher, Hoyer, Geiger, Kuner, Monyer, Higuchi, Bach, und Seeburg (1994) "Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing", *Science* 266:1709-1713
- MacNeil und Masland (1998) "Extreme diversity among amacrine cells: implications for function", *Neuron* 20:971-982
- Maguire (1999) "Spatial heterogeneity and function of vol", *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 266:987-992
- Maguire und Hamasaki (1994) "The retinal dopamine network alters the adaptational properties of retinal ganglion cells in the cat", *J.Neurophysiol.* 72:730-741
- Makowski, Caspar, Phillips, und Goodenough (1977) "Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data", *J.Cell Biol.* 74:629-645
- McMahon und Brown (1994) "Modulation of gap-junction channel gating at zebrafish retinal electrical synapses", *J.Neurophysiol.* 72:2257-2268
- Menger und Wässle (2000) "Morphological and physiological properties of the A17 amacrine cell of the rat retina", *Vis.Neurosci.* 17:769-780
- Mikami, Imoto, Tanabe, Niidome, Mori, Takeshima, Narumiya, und Numa (1989) "Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel", *Nature* 340:230-233
- Mills (1999) "Unusual coupling patterns of a cone bipolar cell in the rabbit retina", *Vis.Neurosci.* 16:1029-1035
- Mills und Massey (1991) "Labeling and distribution of AII amacrine cells in the rabbit retina", *J.Comp Neurol.* 304:491-501

- Mills und Massey (1995) "Differential properties of two gap junctional pathways made by AII amacrine cells", *Nature* 377:734-737
- Morgans (2001) "Localization of the alpha(1F) calcium channel subunit in the rat retina", *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 42:2414-2418
- Morigiwa und Vardi (1999) "Differential expression of ionotropic glutamate receptor subunits in the outer retina", *J.Comp Neurol.* 405:173-184
- Nathans (1999) "The evolution and physiology of human color vision: insights from molecular genetic studies of visual pigments", *Neuron* 24:299-312
- Nawy und Jahr (1990) "Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells", *Nature* 346:269-271
- Nelson (1977) "Cat cones have rod input: a comparison of the response properties of cones and horizontal cell bodies in the retina of the cat", *J.Comp Neurol.* 172:109-135
- Nelson (1982) "AII amacrine cells quicken time course of rod signals in the cat retina", *J.Neurophysiol.* 47:928-947
- Nir, Haque, und Iuvone (2000) "Diurnal metabolism of dopamine in the mouse retina", *Brain Res.* 870:118-125
- Nomura, Shigemoto, Nakamura, Okamoto, Mizuno, und Nakanishi (1994) "Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells", *Cell* 77:361-369
- Ozawa, Kamiya, und Tsuzuki (1998) "Glutamate receptors in the mammalian central nervous system", *Prog.Neurobiol.* 54:581-618
- Pan (2000) "Differential expression of high- and two types of low-voltage-activated calcium currents in rod and cone bipolar cells of the rat retina.", *J.Neurophysiol.* 83:513-527
- Pan und Lipton (1995) "Multiple GABA receptor subtypes mediate inhibition of calcium influx at rat retinal bipolar cell terminals", *J.Neurosci.* 15:2668-2679
- Peracchia (1973) "Low resistance junctions in crayfish. II. Structural details and further evidence for intercellular channels by freeze-fracture and negative staining", *J.Cell Biol.* 57:54-65

- Pereda, Bell, Chang, Czernik, Nairn, Soderling, und Faber (1998) "Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II mediates simultaneous enhancement of gap-junctional conductance and glutamatergic transmission", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:13272-13277
- Pfeiffer-Linn und Lasater (1998) "Multiple second-messenger system modulation of voltage-activated calcium currents in teleost retinal horizontal cells", *J.Neurophysiol.* 80:377-388
- Piccolino, Witkovsky, und Trimarchi (1987) "Dopaminergic mechanisms underlying the reduction of electrical coupling between horizontal cells of the turtle retina induced by d-amphetamine, bicuculline, and veratridine", *J.Neurosci.* 7:2273-2284
- Pourcho (1982) "Dopaminergic amacrine cells in the cat retina", *Brain Res.* 252:101-109
- Protti und Llano (1998) "Calcium currents and calcium signaling in rod bipolar cells of rat retinal slices", *J.Neurosci.* 18:3715-3724
- Qin und Pourcho (1996) "Distribution of AMPA-selective glutamate receptor subunits in the cat retina", *Brain Res.* 710:303-307
- Qin und Pourcho (1999b) "AMPA-selective glutamate receptor subunits GluR2 and GluR4 in the cat retina: an immunocytochemical study", *Vis.Neurosci.* 16:1105-1114
- Qin und Pourcho (1999a) "Localization of AMPA-selective glutamate receptor subunits in the cat retina: a I", *Vis.Neurosci.* 16:169-177
- Qin und Pourcho (2001) "Immunocytochemical localization of kainate-selective glutamate receptor subunits GluR5, GluR6, and GluR7 in the cat retina", *Brain Res.* 890:211-221
- Raviola und Gilula (1973) "Gap junctions between photoreceptor cells in the vertebrate retina", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 70:1677-1681
- Reme und Wirz-Justice (1985) "[Circadian rhythm, the retina and light]", *Klin.Monatsbl.Augenheilkd.* 186:175-179
- Rice und Curran (2000) "Disabled-1 is expressed in type AII amacrine cells in the mouse retina", *J.Comp Neurol.* 424:327-338
- Rice und Curran (2001) "Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development", *Annu.Rev.Neurosci.* 24:1005-1039

- Rice, Nusinowitz, Azimi, Martinez, Soriano, und Curran (2001) "The reelin pathway modulates the structure and function of retinal synaptic circuitry", Neuron 31:929-941
- Rodieck (1998) "The First Steps in Seeing" Sinauer Assoc; Erste Ausgabe, ISBN: 0878937579
- Rosenmund, Stern-Bach, und Stevens (1998) "The tetrameric structure of a glutamate receptor channel", Science 280:1596-1599
- Sakai und Naka (1988) "Dissection of the neuron network in the catfish inner retina. I. Transmission to ganglion cells", J.Neurophysiol. 60:1549-1567
- Sassoe-Pognetto, Wässle, und Grünert (1994) "Glycinergic synapses in the rod pathway of the rat retina: cone bipolar cells express the alpha 1 subunit of the glycine receptor", J.Neurosci. 14:5131-5146
- Satoh, Aoki, Watanabe, und Kaneko (1998) "L-type calcium channels in the axon terminal of mouse bipolar cells", Neuroreport 9:2161-2165
- Schneeweis und Schnapf (1995) "Photovoltage of rods and cones in the macaque retina", Science 268:1053-1056
- Schultz, Janssen-Bienhold, und Weiler (2001) "Selective synaptic distribution of AMPA and kainate receptor subunits in the outer plexiform layer of the carp retina", J.Comp Neurol. 435:433-449
- Seeburg (1993) "The TiPS/TINS lecture: the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels", Trends Pharmacol.Sci. 14:297-303
- Shen und Slaughter (1998) "Metabotropic and ionotropic glutamate receptors regulate calcium channel currents in salamander retinal ganglion cells", J.Physiol 510 (Pt 3):815-828
- Shen und Slaughter (1999) "Metabotropic GABA receptors facilitate L-type and inhibit N-type calcium channels in single salamander retinal neurons", J.Physiol 516 (Pt 3):711-718
- Simmons, Terman, Gibbs, und Chavkin (1995) "L-type calcium channels mediate dynorphin neuropeptide release from dendrites but not axons of hippocampal granule cells", Neuron 14:1265-1272
- Slaughter und Miller (1985) "Characterization of an extended glutamate receptor of the on bipolar neuron in the vertebrate retina", J.Neurosci. 5:224-233

- Smith, Freed, und Sterling (1986) "Microcircuitry of the dark-adapted cat retina: functional architecture of the rod-cone network", J.Neurosci. 6:3505-3517
- Smith und Vardi (1995) "Simulation of the AII amacrine cell of mammalian retina: functional consequences of electrical coupling and regenerative membrane properties", Vis.Neurosci. 12:851-860
- Sommer, Keinanen, Verdoorn, Wisden, Burnashev, Herb, Kohler, Takagi, Sakmann, und Seeburg (1990) "Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS", Science 249:1580-1585
- Soucy, Wang, Nirenberg, Nathans, und Meister (1998) "A novel signaling pathway from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian retina", Neuron 21:481-493
- Spray, Harris, und Bennett (1981) "Gap junctional conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH", Science 211:712-715
- Sterling (1983) "Microcircuitry of the cat retina", Annu.Rev.Neurosci. 6:149-185
- Sterling, Freed, und Smith (1988) "Architecture of rod and cone circuits to the on-beta ganglion cell", J.Neurosci. 8:623-642
- Strettoi, Dacheux, und Raviola (1990) "Synaptic connections of rod bipolar cells in the inner plexiform layer of the rabbit retina", J.Comp Neurol. 295:449-466
- Strettoi, Raviola, und Dacheux (1992) "Synaptic connections of the narrow-field, bistratified rod amacrine cell (AII) in the rabbit retina", J.Comp Neurol. 325:152-168
- Tachibana, Okada, Arimura, Kobayashi, und Piccolino (1993) "Dihydropyridine-sensitive calcium current mediates neurotransmitter release from bipolar cells of the goldfish retina", J.Neurosci. 13:2898-2909
- Tanabe, Mikami, Niidome, Numa, Adams, und Beam (1993) "Structure and function of voltage-dependent calcium channels from muscle", Ann.N.Y.Acad.Sci. 707:81-86
- Tarnawa, Farkas, Berzsényi, Pataki, und Andrasi (1989) "Electrophysiological studies with a 2,3-benzodiazepine muscle relaxant: GYKI 52466", Eur.J.Pharmacol. 167:193-199

- Taylor und Morgans (1998) "Localization and properties of voltage-gated calcium channels in cone photoreceptors of *Tupaia belangeri*", *Vis.Neurosci.* 15:541-552
- Tessier-Lavigne und Attwell (1988) "The effect of photoreceptor coupling and synapse nonlinearity on signal:noise ratio in early visual processing", *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 234:171-197
- Thoreson und Miller (1996) "Removal of extracellular chloride suppresses transmitter release from photoreceptor terminals in the mudpuppy retina", *J.Gen.Physiol* 107:631-642
- Tork und Stone (1979) "Morphology of catecholamine-containing amacrine cells in the cat's retina, as seen in retinal whole mounts", *Brain Res.* 169:261-273
- Tsien, Pozzan, und Rink (1982) "Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator", *J.Cell Biol.* 94:325-334
- Tsukamoto, Morigiwa, Ueda, und Sterling (2001) "Microcircuits for night vision in mouse retina", *J.Neurosci.* 21:8616-8623
- Vaney (1991) "Many diverse types of retinal neurons show tracer coupling when injected with biocytin or Neurobiotin", *Neurosci.Lett.* 125:187-190
- Vaney (1992) "Photochromic intensification of diaminobenzidine reaction product in the presence of tetrazolium salts: applications for intracellular labelling and immunohistochemistry", *J.Neurosci.Methods* 44:217-223
- Vaney (1999) "Neuronal coupling in the central nervous system: lessons from the retina", *Novartis.Found.Symp.* 219:113-125
- Vaney, Gynther, und Young (1991) "Rod-signal interneurons in the rabbit retina: 2. AII amacrine cells", *J.Comp Neurol.* 310:154-169
- Vardi, Masarachia, und Sterling (1989) "Structure of the starburst amacrine network in the cat retina and its association with alpha ganglion cells", *J.Comp Neurol.* 288:601-611
- Vardi und Smith (1996) "The AII amacrine network: coupling can increase correlated activity", *Vision Res.* 36:3743-3757
- von Gersdorff (2001) "Synaptic ribbons: versatile signal transducers", *Neuron* 29:7-10

- Washburn, Numberger, Zhang, und Dingledine (1997) "Differential dependence on GluR2 expression of three characteristic features of AMPA receptors", J.Neurosci. 17:9393-9406
- Wässle und Boycott (1991) "Functional architecture of the mammalian retina", Physiol Rev. 71:447-480
- Wässle, Grünert, und Röhrenbeck (1993) "Immunocytochemical staining of AII-amacrine cells in the rat retina with antibodies against parvalbumin", J.Comp Neurol. 332:407-420
- Wentholt, Petralia, Blahos, II, und Niedzielski (1996) "Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons", J.Neurosci. 16:1982-1989
- Werblin und Dowling (1969) "Organization of the retina of the mudpuppy, Necturus maculosus. II. Intracellular recording", J.Neurophysiol. 32:339-355
- Wilkinson und Barnes (1996) "The dihydropyridine-sensitive calcium channel subtype in cone photoreceptors", J.Gen.Physiol 107:621-630
- Witkovsky, Owen, und Woodworth (1983) "Gap junctions among the perikarya, dendrites, and axon terminals of the luminosity-type horizontal cell of the turtle retina", J.Comp Neurol. 216:359-368
- Witkovsky und Schutte (1991) "The organization of dopaminergic neurons in vertebrate retinas", Vis.Neurosci. 7:113-124
- Xin und Bloomfield (1997) "Tracer coupling pattern of amacrine and ganglion cells in the rabbit retina", J.Comp Neurol. 383:512-528
- Xu und Lipscombe (2001) "Neuronal Ca(V)1.3alpha(1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines", J.Neurosci. 21:5944-5951
- Yagi und Kaneko (1987) "Membrane properties and the signal conduction of the horizontal cell syncytium of the teleost retina", Neurosci.Res.Suppl 6:S119-S132
- Yamashita und Wässle (1991) "Responses of rod bipolar cells isolated from the rat retina to the glutamate agonist 2-amino-4-phosphonobutyric acid (APB)", J.Neurosci. 11:2372-2382

- Zeman und Lodge (1992) "Pharmacological characterization of non-NMDA subtypes of glutamate receptor in the neonatal rat hemisected spinal cord in vitro", Br.J.Pharmacol. 106:367-372
- Zhang und O'Neil (1996) "An L-type calcium channel in renal epithelial cells", J.Membr.Biol. 154:259-266
- Zhou, Gu, Costa, Yamada, Mansson, Giordano, Skolnick, und Jones (1997) "(2S,4R)-4-methylglutamic acid (SYM 2081): a selective, high-affinity ligand for kainate receptors", J.Pharmacol.Exp.Ther. 280:422-427

7 Danksagung

Zu Dank verpflichtet bin ich vor allem Herrn Professor Heinz W., für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in der Abteilung Neuroanatomie am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main. Durch die großzügig gewährten Freiheiten auch und vor allem bei der Wahl der zu untersuchenden Fragen wurde ich an wissenschaftliches Denken und Arbeiten herangeführt.

Herrn Professor Christoph von C. muss ich für die Erstellung des 2. Gutachtens danken. Danken will ich ihm darüber hinaus dafür, dass er schon in den ersten Semestern meines Studiums den Wunsch in mir wachsen lies „Patch-Clamper“, zu werden. Seine wunderbar chaotischen Vorlesungen waren stets eine echte Bereicherung meines Studiums.

Herrn Dario A. P. möchte ich für die hervorragende und intensive Betreuung danken. Seine Begeisterung für „unser“, Gewebe ist so erfrischend und mitreißend wie ein guter Mate-Tee am Nachmittag. Bei den unzähligen Diskussionen konnte er stets durch sein profundes Wissen überzeugen und durch seine vielfältigen Erfahrungen helfen. Auch hätte ich keinen Lehrer finden können, der mir die spanische Sprache plastischer hätte vor Augen führen können. Ihm verdanke ich auch meine junge Liebe zu Onkel IGOR.

Meinen Freunden und Kollegen Moritz F. und Nicolas F. sei für die vielen tausend Kleinigkeiten gedankt, die der Patcher plötzlich braucht und die sich dann bei einem Kollegen finden - so oder so.

Nicole, Daniele, Brigitte, Anja, Frauke, Erica, Arleen, Iris, Michael, Maik, Jorge, Karsten, Jörn, Dieter und Max haben die Tage und Nächte zu dem gemacht was sie waren. Ich hoffe euch hat es eben soviel Spaß gemacht wie mir.

Meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle danken, dass sie mir mein Studium in dieser Form ermöglicht haben. Sie haben mich stets darin bestärkt, das zu tun was mir am meisten Spaß macht.

Meiner Schwester Susanne danke ich für die orthographische Überarbeitung der Dissertation.

Lilija möchte ich für ihre Geduld mit mir danken, sie hat es nicht immer leicht. Außerdem danke ich Ihr, dass sie mir unsere Töchter Rhea und Linn geschenkt hat.

Παντῶ Πρῆι

8 Lebenslauf

Name: Christopher Josef Habermann

Geboren am: 23.09.1970 in Bingen am Rhein

Staatsangehörigkeit: Deutsch

1981-1990 Stefan-George-Gymnasium, Bingen

1990-1991 Zivildienst

1991-1997 Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

1997-1998 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt, Abteilung Neuroanatomie.

1998 Diplomhauptprüfung

1998-2002 Promotion am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main.