

# **Differenzielle Verteilung von Glyzinrezeptoruntereinheiten auf Amakrin- und Ganglienzellen in der Mausretina**

---

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14  
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von **Liane Heinze**  
aus Leipzig

Frankfurt 2006

D30

Für meinen Großvater

Man sollte alle Dinge im Leben mindestens einmal bezweifeln.

Johann Christoph Lichtenberg

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
Abbildungsverzeichnis .....	5
Tabellenverzeichnis .....	7
Abkürzungsverzeichnis .....	8
1) Einleitung .....	10
2.1) Methoden .....	19
2.1.1) Versuchstiere und Gewebepräparation .....	19
2.1.1.1) Präparation für Lichtmikroskopie .....	19
2.1.1.2) Präparation für postembedding-Elektronenmikroskopie .....	20
2.1.1.3) Präparation für preembedding-Elektronenmikroskopie .....	21
2.1.1.4) Präparation für <i>in-situ</i> -Hybridisierung .....	21
2.1.2) Immunzytochemie .....	21
2.1.2.1) Immunzytochemie für die Lichtmikroskopie .....	21
2.1.2.2) Postembedding Immunzytochemie für die Elektronenmikroskopie .....	23
2.1.2.3) Preembedding-Immunzytochemie für die Elektronenmikroskopie .....	25
2.1.3) Mikroskopie .....	26
2.1.3.1) Konfokale Mikroskopie .....	26
2.1.3.2) Fluoreszenzmikroskopie .....	27
2.1.3.3) Transmissionselektronenmikroskopie .....	27
2.1.4) Quantifizierung der Glyzinrezeptorfärbungen .....	27
2.1.5) Quantifizierung der Kolo-kalisation von Immunfärbungen .....	28
2.1.6) Genotypisierung .....	28
2.1.6) HEK-Zell-Transfektion .....	29
2.1.7) Western Blot .....	30
2.1.7.1) Gewinnung des Extrakts .....	30
2.1.7.2) Proteinmengenbestimmung .....	31
2.1.7.3) Deglykosylierung des Extraktes .....	31
2.1.7.4) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Western-Blot- Transfer und PonceauS-Färbung .....	31
2.1.7.5) Western-Blot-Analyse .....	32
2.1.8) <i>in-situ</i> -Hybridisierung .....	32
2.1.8.1) Synthese der RNA-Sonden .....	32
2.1.8.2) Hybridisierung, Antikörper- und Farbreaktion .....	34
2.2) Material .....	35
2.2.1) Lösungen und Medien .....	35
2.2.2) Chemikalien und Reagenzien .....	38
2.2.3) Geräte und Hilfsmittel .....	40
3) Ergebnisse .....	43
3.1) Glyzinrezeptoruntereinheit $\alpha 4$ (GlyR $\alpha 4$ ) .....	43
3.1.1) Westernblotanalyse .....	43
3.1.2) <i>In-situ</i> -Hybridisierung .....	44
3.1.3) Transfektion von HEK293-Zellen .....	45
3.1.3) Lokalisation von GlyR $\alpha 4$ in der Mausretina .....	46
3.1.4) Synaptische Lokalisation von GlyR $\alpha 4$ .....	48
3.2) Ganglienzelltypen der GFP-O-Maus .....	53

3.2.1) Typ-A-Ganglienzellen.....	54
3.2.2) Typ-B-Ganglienzellen.....	56
3.2.3) Typ-C-Ganglienzellen.....	57
2.4) Typ-D-Ganglienzellen.....	60
3.2.5) Unklassifizierte Ganglienzellen.....	62
3.2.6) Melanopsin exprimierende Ganglienzellen.....	62
3.3) Verteilung der Glyzinrezeptoruntereinheiten auf verschiedenen Typen von Ganglienzellen .....	64
3.3.1) Glyzinrezeptoruntereinheit $\alpha 1$ (GlyR $\alpha 1$ ) .....	65
3.3.2) Glyzinrezeptoruntereinheit $\alpha 2$ (GlyR $\alpha 2$ ) .....	69
3.3.3) Glyzinrezeptoruntereinheit $\alpha 3$ (GlyR $\alpha 3$ ) .....	70
3.3.4) Glyzinrezeptoruntereinheit $\alpha 4$ (GlyR $\alpha 4$ ) .....	70
3.4) Amakrinzelltypen der GFP-O-Maus .....	72
3.5) Verteilung der Glyzinrezeptoruntereinheiten auf verschiedenen Typen von small-field Amakrinzellen .....	75
3.5.1) Glyzinrezeptoruntereinheit $\alpha 1$ (GlyR $\alpha 1$ ) .....	75
3.5.2) Glyzinrezeptoruntereinheit $\alpha 2$ (GlyR $\alpha 2$ ) .....	76
3.5.3) Glyzinrezeptoruntereinheit $\alpha 3$ (GlyR $\alpha 3$ ) .....	77
3.5.4) Glyzinrezeptoruntereinheit $\alpha 4$ (GlyR $\alpha 4$ ) .....	78
3.6) Verteilung der Glyzinrezeptoruntereinheiten auf dopaminergen, cholinergen und den vesikulären Glutamattransporter 3 exprimierenden Amakrinzellen .....	79
3.6.1) Dopaminerge Amakrinzellen .....	80
3.6.2) Cholinerge Amakrinzellen („Starburst“ Amakrinzellen).....	81
3.6.3) Amakrinzellen die den vesikulären Glutamattransporter 3 exprimieren... 84	
3.7) Quantifizierung der Dichte der GlyR $\alpha$ -Untereinheiten in den Mauslinien <i>Gla1<sup>spd-ot</sup></i> (Oszillator), <i>Gla2<sup>-/-</sup></i> und <i>Gla3<sup>-/-</sup></i> .....	85
7.1) Oszillator-Maus .....	86
7.2) <i>Gla2<sup>-/-</sup></i> -Maus .....	87
7.3) <i>Gla3<sup>-/-</sup></i> -Maus .....	88
4) Diskussion .....	90
4.1) GlyR $\alpha 4$ .....	90
4.2) Zelltypen der GFP-O-Maus.....	94
4.3) Analyse der Kolokalisation von Glyzinrezeptoren mit einzelnen Neuronen ... 96	
4.4) Lokalisation von GlyR $\alpha 1$ .....	96
4.5) Kolokalisation von Ganglienzellen mit GlyR $\alpha 2$ , GlyR $\alpha 3$ und GlyR $\alpha 4$ .....	98
4.6) Kolokalisation von Amakrinzellen mit GlyR $\alpha 2$ , GlyR $\alpha 3$ und GlyR $\alpha 4$ .....	98
4.7) Quantifizierung von GlyR $\alpha 1$ bis GlyR $\alpha 4$ in den glyzinrezeptordefizienten Mauslinien <i>Gla1<sup>spd-ot</sup></i> (Oszillator), <i>Gla2<sup>-/-</sup></i> und <i>Gla3<sup>-/-</sup></i> .....	99
4.8) Ausblick .....	100
5) Zusammenfassung .....	102
6) Literaturverzeichnis .....	104
Anhang .....	113
1) Kolokalisation von Glyzinrezeptoren mit verschiedenen Ganglienzelltypen.....	113
2) Gensequenzen der verschiedenen Glyzinrezeptoruntereinheiten .....	116
7) Danksagung	
9) Eidesstattliche Erklärung	
8) Lebenslauf	

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Schemazeichnung der Retina, Ramon y Cajal, 1900	Seite 12
Abbildung 1.2	schematische Darstellung der Verschaltung der All-Amakrinzelle in der IPL (leicht modifiziert nach Rodieck 1998)	Seite 16
Abbildung 1.3	Fluoreszenzaufnahme einer Dreifachfärbung gegen GlyR $\alpha$ 1, GlyR $\alpha$ 2 und GlyR $\alpha$ 3	Seite 17
Abbildung 3.1	Westernblotanalyse für GlyR $\alpha$ 4 aus der Gesamtproteinfraktion des Retinahomogenats	Seite 43
Abbildung 3.2	in-situ-Hybridisierung am Vertikalschnitt durch die adulte Mausretina	Seite 44
Abbildung 3.3	HEK293-Zellen transfiziert mit Glra1-4, immunzytochemisch angefärbt mit mAb4a und pAb GlyR $\alpha$ 4	Seite 45
Abbildung 3.4	Fluoreszenzaufnahme von GlyR $\alpha$ 4 im Vertikal-schnitt durch die Mausretina	Seite 46
Abbildung 3.5	GlyR $\alpha$ 4 mit Peptidblock	Seite 46
Abbildung 3.6	Fluoreszenzaufnahme von GlyR $\alpha$ 4 (rot) mit Calretinin (grün) im Vertikalschnitt	Seite 47
Abbildung 3.7	GlyR $\alpha$ 4 mit Gephyrin	Seite 49
Abbildung 3.8	Die unterschiedlichen Verteilungsmuster der 4 GlyR $\alpha$ -Untereinheiten in der IPL	Seite 50
Abbildung 3.9	Kolokalisation von GlyR $\alpha$ 4 (rot) mit GlyR $\alpha$ 2	Seite 51
Abbildung 3.10	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines vertikalen Gewebeschnittes durch die IPL der Mausretina, immunzytochemisch markiert mit pAb GlyR $\alpha$ 4	Seite 52
Abbildung 3.11	Fotomontage der Retina einer GFP-O-Maus im Aufsichtpräparat	Seite 53
Abbildung 3.12	Fluoreszenzaufnahmen von A-Ganglienzellen im Aufsichtpräparat	Seite 55
Abbildung 3.13	Fluoreszenzaufnahmen von B-Ganglienzellen im Aufsichtpräparat	Seite 57
Abbildung 3.14	Fluoreszenzaufnahme von C-Ganglienzellen im Aufsichtpräparat	Seite 59
Abbildung 3.15	Fluoreszenzaufnahme von D-Ganglienzellen im Aufsichtpräparat	Seite 61
Abbildung 3.16	Fluoreszenzaufnahme einer C3-Ganglienzelle mit Melanopsin	Seite 63
Abbildung 3.17	Zur Methode der Untersuchung von Kolokalisationen	Seite 65
Abbildung 3.18	Kolokalisation von A1-Ganglienzellen mit GlyR $\alpha$ 1	Seite 66
Abbildung 3.19	Kolokalisation von A2-Ganglienzellen mit GlyR $\alpha$ 1	Seite 67
Abbildung 3.20	Kolokalisation von B1-Ganglienzellen mit GlyR $\alpha$ 1	Seite 68
Abbildung 3.21	Kolokalisation einer B3 <sub>inner</sub> -Ganglienzelle mit GlyR $\alpha$ 2	Seite 69
Abbildung 3.22	Kolokalisation einer B3 <sub>inner</sub> -Ganglienzelle mit GlyR $\alpha$ 3	Seite 70

Abbildung 3.23	Kolokalisation einer B3 <sub>inner</sub> -Ganglienzelle mit GlyR4	Seite 71
Abbildung 3.24	diverse small-field Amakrinzelltypen als z-Projektionen konfokaler Bildserien	Seite 74
Abbildung 3.25	A8-Amakrinzelle (grün) mit GlyRα1	Seite 76
Abbildung 3.26	A <sub>s</sub> 1-3/4-Amakrinzelle (grün) mit GlyRα2	Seite 77
Abbildung 3.27	A <sub>s</sub> 2-3-Amakrinzelle (grün) mit GlyRα3	Seite 78
Abbildung 3.28	A <sub>s</sub> 2-3-Amakrinzelle (grün) mit GlyRα4	Seite 79
Abbildung 3.29	TH mit GlyRα-Untereinheiten im Vertikalschnitt als z- Achsen-Projektionen konfokaler Bilderstapel	Seite 80
Abbildung 3.30	mit GlyRα4 im Vertikalschnitt als z-Achsen-Projektion fluoreszenz-mikroskopisch aufgenommener Bilderstapel	Seite 81
Abbildung 3.31	ChAT mit GlyRα-Untereinheiten im Vertikalschnitt als konfokale Aufnahmen	Seite 82
Abbildung 3.32	ChAT (grün) mit GlyRα4 (rot) im Vertikalschnitt	Seite 83
Abbildung 3.33	vGluT3 mit GlyRα2 im Vertikalschnitt	Seite 85
Abbildung 3.34	graphische Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabelle 3.4	Seite 87
Abbildung 3.35	graphische Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabelle 3.5	Seite 88
Abbildung 3.36	graphische Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabelle 3.6	Seite 89
Abbildung 4.1	Schematische Darstellung der Glyzinrezeptoruntereinheit α1	Seite 93

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	für die Immunhistochemie verwendete Primärantikörper	Seite 22
Tabelle 2.2	für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzte Sekundärantikörper	Seite 23
Tabelle 2.3	für die Elektronenmikroskopie eingesetzte Sekundärantikörper	Seite 24
Tabelle 2.4	Tabelle zur Herstellung des Mastermix	Seite 29
Tabelle 2.5	Komponenten des PCR-Ansatzes	Seite 33
Tabelle 2.6	Zyklusparameter der PCR	Seite 33
Tabelle 2.7	Komponenten des Ansatzes für die Sondensynthese	Seite 33
Tabelle 3.1	Kolokalisation von GlyR $\alpha$ 4 mit Bassoon und Gephyrin	Seite 48
Tabelle 3.2	Kolokalisation von GlyR $\alpha$ 4 mit GlyR $\alpha$ 1, GlyR $\alpha$ 2 und GlyR $\alpha$ 3	Seite 51
Tabelle 3.3	Quantifizierung der GlyR $\alpha$ -Untereinheiten in der <i>Oszillator</i> -Maus	Seite 86
Tabelle 3.4	Quantifizierung der GlyR $\alpha$ -Untereinheiten in der <i>Gla2</i> <sup>-/-</sup> -Maus	Seite 87
Tabelle 3.5	Quantifizierung der GlyR $\alpha$ -Untereinheiten in der <i>Gla3</i> <sup>-/-</sup> -Maus	Seite 88
Tabelle A.1	Übersicht zur statistischen Auswertung der Kolokalisation der Glyzinrezeptor-untereinheit $\alpha$ 1 mit den Ganglienzelltypen A1, A2 <sub>inner</sub> , A2 <sub>outer</sub> und B1	Seite 112
Tabelle A.2	Übersicht zur statistischen Auswertung der Kolokalisation der Glyzinrezeptor-untereinheit $\alpha$ 1 mit den Ganglienzelltypen B2, B3 <sub>inner</sub> , B3 <sub>outer</sub> und B4	Seite 113
Tabelle A.3	Übersicht zur statistischen Auswertung der Kolokalisation der Glyzinrezeptor-untereinheit $\alpha$ 1 mit den Ganglienzelltypen C1, C2 <sub>inner</sub> , C2 <sub>outer</sub> und C3	Seite 114
Tabelle A.4	Übersicht zur statistischen Auswertung der Kolokalisation der Glyzinrezeptor-untereinheit $\alpha$ 1 mit den Ganglienzelltypen C4, C5, C6 und D2	Seite 115

## Abkürzungsverzeichnis

$\sigma$	Standardabweichung vom Mittelwert
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{m}^2$	Quadratmikrometer
5-HT	<b>5-Hydroxytryptamin</b> (Serotonin)
AMPA	$\alpha$ - <b>Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure</b> ; [engl.: - acid]
Aq. bidest.	<b>Aqua bidestillata</b> (siehe 2.2.1)
BCIP	<b>5-Brom-4-Chlor-3-Indoylphosphat</b> , Toluidinsalz
BSA	<b>bovines Serumalbumin</b>
CB	<b>Chemiblocker</b> (siehe 2.2.1)
CDI	<b>Carbodiimid</b> (siehe 2.2.1)
cDNA	[engl.: <b>copy desoxyribonucleic acid</b> ]
ChAT	<b>Cholinacetyltransferase</b>
DAB	<b>3,3'-Diaminobenzidin</b>
DEPC	<b>Diethylpyrocarbonat</b>
dk	Esel [engl.: <b>donkey</b> ]
DMEM	<b>Dulbecco's Modified Eagles Medium</b>
DNA	<b>Desoxyribonukleinsäure</b> [engl.: -acid]
dNTP	<b>Desoxynukleosidtriphosphat</b>
DTT	<b>1,4-Dithiothreitol</b>
EC <sub>50</sub>	halbmaximale effektive Konzentration
EDTA	<b>Ethylendiamintetraessigsäure</b> [engl.: - acetic acid]
engl.	englisch
GABA	$\gamma$ - <b>Aminobuttersäure</b> [engl.: <b>gamma aminobutyric acid</b> ]
GCL	Ganglienzellschicht [engl.: <b>ganglion cell layer</b> ]
GFP	<b>grün fluoreszierendes Protein</b>
GlyR	<b>Glyzinrezeptor</b>
GlyT1	<b>Glyzintransporter 1</b>
gp	Meerschweinchen [engl.: <b>guineapig</b> ]
gt	Ziege [engl.: <b>goat</b> ]
HEK-Zellen	menschliche embryonale Nierenzellen [engl.: <b>human embryonic kidney cells</b> ]
HSA	<b>humanes Serumalbumin</b>
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibierende Konzentration



INL	innere nukleäre Schicht [engl.: inner <b>nuclear layer</b> ]
IPL	innere plexiforme Schicht [engl.: inner <b>plexiform layer</b> ]
IS	innere Segmente [engl.: inner <b>segments</b> ]
lat.	lateinisch
mg	<b>Milligramm</b>
mGluR6	<b>metabotroper Glutamatrezeptor 6</b>
ml	<b>Milliliter</b>
ms	Maus [engl.: <b>mouse</b> ]
n	Anzahl der Stichproben
NBT	<b>Nitroblautetrazoliumchlorid</b>
ng	<b>Nanogramm</b>
NGS	normales Ziegen Serum [engl.: <b>normal goat serum</b> ] (siehe 2.2.1)
NMDA	<b>N-Methyl-D-Aspartat</b>
ONL	äußere nukleäre Schicht [ <b>outer nuclear layer</b> ]
OS	äußere Segmente [engl.: <b>outer segments</b> ]
p	Signifikanzgrad
pA	<b>Picoampere</b>
PAGE	<b>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>
PB	Phosphatpuffer [engl.: <b>phosphate buffer</b> ] (siehe 2.2.1)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung [engl.: <b>phosphate buffered saline</b> ] (siehe 2.2.1)
PCR	Polymerasekettenreaktion [engl.: <b>polymerase chain reaction</b> ]
PFA	<b>Paraformaldehyd</b> (siehe 2.2.1)
pH	Säuregrad [lat.: <b>potentia hydrogenii</b> ]
pS	<b>Picosiemens</b>
PVDF	<b>Polyvinylidenfluorid</b>
rb	Kaninchen [engl.: <b>rabbit</b> ]
RNA	Ribonukleinsäure [engl.: <b>ribonucleic acid</b> ]
SDS	Natriumdodecylsulfat [engl.: <b>sodium dodecyl sulfate</b> ]
SSC	Standardnatriumcitrat [engl.: <b>standard sodium citrate</b> ] (siehe 2.2.1)
TBE	<b>Trizma-Borsäure-EDTA-Puffer</b> (siehe 2.2.1)
TBS	trisgepufferte Salzlösung [engl.: <b>Tris buffered saline</b> ]
TBST	trisgepufferte Salzlösung mit Tween 20 [ <b>Tris buffered saline Tween</b> ]
TH	<b>Tyrosinhydroxylase</b>
vGluT3	<b>vesikulärer Glutamattransporter 3</b>
ZNS	<b>Zentralnervensystem</b>

## 1) Einleitung

Glyzin ist neben  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem (ZNS).

Glyzinrezeptoren (GlyR) sind pentamere ligandengesteuerte Chloridionenkanäle, deren Öffnung normalerweise zu einem Chloridioneneinstrom und damit zu einer Hyperpolarisation des postsynaptischen Neurons führt. Im adulten ZNS der Säugetiere ist Glyzin essentiell für die Kontrolle der Motorfunktionen, die Koordination von Reflexantworten und die Weiterleitung und Verarbeitung sensorischer Reize. Aktuelle Publikationen belegen, daß die glyzinerge Neurotransmission auf der Ebene des Rückenmarks eine bedeutende Rolle bei der Nozizeption spielt (Ahmadi et al. 2002, Harvey et al. 2004, Laube und Betz 2006).

Glyzinrezeptoren sind strukturell eng mit den nikotinischen Acetylcholinrezeptoren, 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren, GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren verwandt. Sie alle bestehen aus 5 Untereinheiten, von denen jede 4 Transmembrandomänen besitzt.

Synaptische Glyzinrezeptoren sind aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten im stöchiometrischen Verhältnis von 2:3 aufgebaut (Grudzinska et al. 2005). Dabei sind alle Untereinheiten an der Ligandenbindung beteiligt, die an den Grenzflächen zwischen den Untereinheiten stattfindet. Die Verankerung des Rezeptorkomplexes in der Membran erfolgt mit Hilfe der  $\beta$ -Untereinheiten, die über spezielle Bindungsstellen mit dem Gerüstprotein Gephyrin interagieren können, das den Rezeptor mit dem Zytoskelett verbindet (Meyer et al. 1995, Kirsch und Betz 1995).

Damit ist auch verständlich, warum homomere Rezeptoren ohne  $\beta$ -Untereinheiten ausschließlich extrasynaptisch vorkommen. Sie werden hier nicht näher betrachtet.

In Vertebraten wurden bisher 4 Gene (*Glrα 1-4*) identifiziert, die für verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten kodieren (GlyR $\alpha$ 1-4) und ein Gen (*Glrβ*), das für die  $\beta$ -Untereinheit kodiert (Matzenbach et al. 1994, Laube et al. 2002, Lynch 2004).

Mit Ausnahme der GlyR $\alpha$ 4-Untereinheit wurden die jeweiligen Transkripte bereits alle auf Proteinebene beschrieben (Becker et al. 1988, Sassoé-Pognetto et al. 1994, Sassoé-Pognetto und Wässle 1997, Haverkamp et al. 2003 und 2004). Bei einer Stöchiometrie von 2  $\alpha$  zu 3  $\beta$  bestehen bereits innerhalb eines einzelnen Kanals und unabhängig von der Gesamtkomposition der Synapse 10 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten, jede davon mit anderen physiologischen und pharmako-

logischen Charakteristika ( $EC_{50}^1$ ,  $IC_{50}^2$ , Zeitkonstante  $\tau^3$ ). Dabei ist nicht berücksichtigt, daß die Anordnung der Untereinheiten innerhalb des Pentamers theoretisch variieren kann. Über diese Möglichkeit und ihre funktionellen Konsequenzen ist nichts bekannt. Darüberhinaus existieren je 2 Splice-Varianten der Untereinheiten  $\alpha 1$  und  $\alpha 3$  (Kuhse et al. 1995, Lynch 2004, Meier et al. 2005), die die Situation noch komplexer gestalten. Alternatives Splicing der  $\alpha 2$ -Untereinheit resultiert in einer nur geringfügig veränderten Untereinheit und ist nicht mit funktionellen Unterschieden assoziiert (Kuhse et al. 1991). Im Gegensatz dazu ist eine andere Variante dieser Untereinheit mit nur einer veränderten Aminosäure (G167E) nicht mehr für den kompetitiven GlyR-Antagonisten Strychnin empfindlich (Kuhse et al. 1990). Die Splice-Variante der  $\beta$ -Untereinheit führt zu einem 90 %igen Verlust dieser Untereinheit und verursacht den murinen Phenotyp „*spastic*“ (Chai 1961).

Dieser molekularen Vielfalt denkbarer Glyzinrezeptoren steht eine morphologische Vielfalt an prä- und postsynaptischen Neuronen mit unterschiedlichen Funktionen gegenüber. Aus der Kenntnis dieser Situation ergeben sich die Fragen, ob in der Natur erstens alle theoretisch möglichen Rezeptorkombinationen realisiert werden und zweitens, ob es hinsichtlich der präsynaptisch lokalisierten glyzinergen Interneurone zelltypisch bevorzugt verwendete Rezeptorkompositionen gibt. Drittens stellt sich diese Frage natürlich auch für die noch viel größere Zahl der postsynaptischen Partner.

Diese Fragestellungen wurden an der Retina untersucht, die ein Teil des ZNS ist, und aufgrund ihrer klaren Gewebestruktur mit nur 6 verschiedenen Zellklassen und 2 synaptischen Schichten ein gutes Modellsystem darstellt.

Die Retina ist etwa 200  $\mu\text{m}$  dick und entwickelt sich ontogenetisch als Ausstülpung des Diencephalons, weshalb sie *per definitionem* Bestandteil des ZNS ist. Sie gehört zu den am besten untersuchten neuronalen Netzwerken, und bereits im 19. Jahrhundert beschrieb Cajal (1893) ihre wichtigsten Zellklassen. Durch die licht- und elektronenmikroskopischen Arbeiten des 20. Jahrhunderts ist inzwischen viel über den Aufbau und die synaptische Verschaltung ihrer Neurone bekannt.

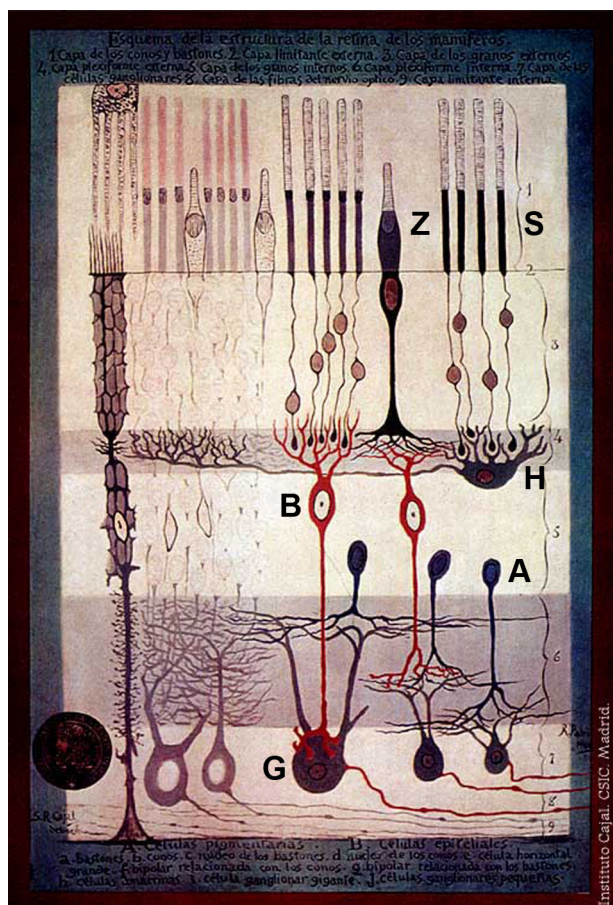
---

<sup>1</sup> die Konzentration an Agonist, bei der die Hälfte der vorhandenen Rezeptoren aktiviert sind

<sup>2</sup> die Konzentration an Antagonist, bei der die Hälfte der vorhandenen Rezeptoren inhibiert sind

<sup>3</sup> Deaktivierungskonstante

Abbildung 1.1 zeigt den anatomischen Aufbau der Retina. Die äußere Schicht umfaßt die inneren (IS) und äußeren Segmente (OS) der Photorezeptoren, der Zapfen und Stäbchen. Sie unterscheiden sich in ihrer Lichtempfindlichkeit, wobei die Stäbchen für das skotopische und die Zapfen für das photopische Sehen verantwortlich sind. Zapfen dienen dem Farbsehen und enthalten deshalb verschiedene Photopigmente, die Licht verschiedener Wellenlängen absorbieren. Die Zellkörper der Photorezeptoren bilden die äußere Körnerschicht (ONL). Es folgt die erste synaptische Schicht (OPL), an die sich die innere Körnerschicht anschließt (INL). Dort sind die Zellkörper von Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen zu finden. Weiter proximal liegt die zweite synaptische Schicht (IPL). Die innere Schicht (GCL) wird von den Zellkörpern der Ganglienzellen und ektopischen Amakrinzellen gebildet. Die Nervenfaserschicht (NFL) beherbergt die Axone der Ganglienzellen, die über den optischen Nerv aus dem Auge austreten und zum Gehirn ziehen.



**Abbildung 1.1: Schemazeichnung der Retina, Ramon y Cajal, 1900 (aus Hubel 1988, leicht modifiziert)**

OS [engl. *outer segments*]: äußere Segmente der Photorezeptoren; IS [engl. *inner segments*]: innere Segmente der Photorezeptoren (Zapfen – Z und Stäbchen – S); ONL [engl. *outer nuclear layer*]: äußere Körnerschicht mit den Zellkörpern der Photorezeptoren; OPL [engl. *outer plexiform layer*]: äußere plexiforme (synaptische) Schicht; INL [engl. *inner nuclear layer*]: innere Körnerschicht mit den Zellkörpern von Horizontal- (H), Bipolar- (B) und Amakrinzellen (A); IPL [engl. *inner plexiform layer*]: innere plexiforme (synaptische) Schicht; GCL [engl. *ganglion cell layer*]: Ganglienzellschicht mit den Zellkörpern der Ganglienzellen (G) und mancher Amakrinzellen; NFL; [engl. *nerve fiber layer*]: Nervenfaserschicht

Das Lichtsignal wird von den Photorezeptoren in ein elektrisches Signal umgewandelt und in der OPL über den Neurotransmitter Glutamat an die Bipolarzellen weitergegeben, die es ihrerseits, wiederum über Glutamat, in der IPL

an die Ganglienzellen weitergegeben, deren Axone über den Sehnerv ins Gehirn ziehen und so die Information zu den höheren visuellen Zentren senden.

Zapfen schütten in Dunkelheit permanent Glutamat aus, und durch die Absorption eines Lichtreizes wird die Glutamatfreisetzung unterbunden. Bipolarzellen bilden zwei Klassen, nämlich die, die das ankommende glutamaterge Signal über ionotrope Glutamatrezeptoren direkt weitergeben (OFF-Bipolarzellen, die in Dunkelheit erregt sind) und die, die eben dieses Signal über metabotrope Glutamatrezeptoren umkehren (ON-Bipolarzellen, die durch Licht erregt werden). Diese unterschiedliche Funktion spiegelt sich in der Stratifizierung ihrer Axone wider: die Axone der ON-Bipolarzellen stratifizieren im inneren Teil, die der OFF-Bipolarzellen im äußeren Teil der IPL, die entsprechend in ON- und OFF-Sublamina unterteilt wird. Die postsynaptisch zu den Bipolarzellen gelegenen Ganglienzellen werden nach ihrer Physiologie ebenfalls in ON- und OFF-Ganglienzellen unterteilt. ON-Ganglienzellen erhalten Eingang von ON-Bipolarzellen und werden durch Licht erregt. Umgekehrt erhalten OFF-Ganglienzellen Eingang von OFF-Bipolarzellen und werden durch Licht gehemmt.

Diese Unterscheidung in ON und OFF ist lediglich eine übergeordnete Einteilung, denn bei allen bisher untersuchten Säugetierspezies sind insgesamt mindestens 9 Typen von Bipolarzellen beschrieben worden (Katze: Kolb et al. 1981, Affe: Boycott und Wässle 1991, Ratte: Euler et al. 1996, Maus: Ghosh et al. 2004, Pignatelli und Strettoi 2004, Kaninchen: MacNeil et al. 2004). Dabei werden mindestens 4 ON- und 4 OFF-Bipolarzellen unterschieden, die ausschließlich Zapfen kontaktieren. Hinzu kommt eine ON-Bipolarzelle, die ausschließlich Eingang von Stäbchen erhält (Stäbchenbipolarzelle). Sie alle unterscheiden sich durch die Stratifizierung ihrer Axone in der IPL und durch ihre Lichtantworten (Euler et al. 1996, Awatramani und Slaughter 2000, DeVries 2000, Freed 2000, McGillem und Dacheux 2001).

Die gleiche Vielfalt findet sich auch bei den Ganglienzellen. In der Retina gibt es mindestens 10 bis 15 morphologisch verschiedene Typen von Ganglienzellen (Masland 2001, Rockhill et al. 2002, Sun et al. 2002, Wässle 2004, Coombs et al. 2006), die unterschiedliche Aspekte des Bildes der Umwelt auf der Netzhaut ins Gehirn weiterleiten. Wie elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, gibt es neben den Ganglienzellen, die auf die Wahrnehmung lokaler Helligkeitsunterschiede oder von Bewegung spezialisiert sind (Kuffler et al. 1953), auch Ganglienzellen, die absolute Helligkeit (Hattar et al. 2002, Belenky et al. 2003, Dacey et al. 2005), Farbe

(Martin 1998, Martin et al. 2001, Dacey und Packer 2003), Kanten (Amthor et al. 1989, Pellegrino et al. 2004, Zeck et al. 2005), Orientierung (Caldwell et al. 1978, Brunken und Daw 1988, Amthor 1989, Bloomfield 1994, He und Masland 1998) oder Bewegungsrichtung (Barlow und Levick 1965, Amthor et al. 1984, Borg-Graham 2001, Fried et al. 2002, Taylor und Vaney 2002) bevorzugt detektieren.

Diese enorme Differenzierungsleistung kann nicht nur durch einfaches Weiterleiten des Lichtreizes erbracht werden, sondern erfordert seine Auftrennung in verschiedene Kanäle und horizontale Verschaltungen in beiden synaptischen Schichten der Retina.

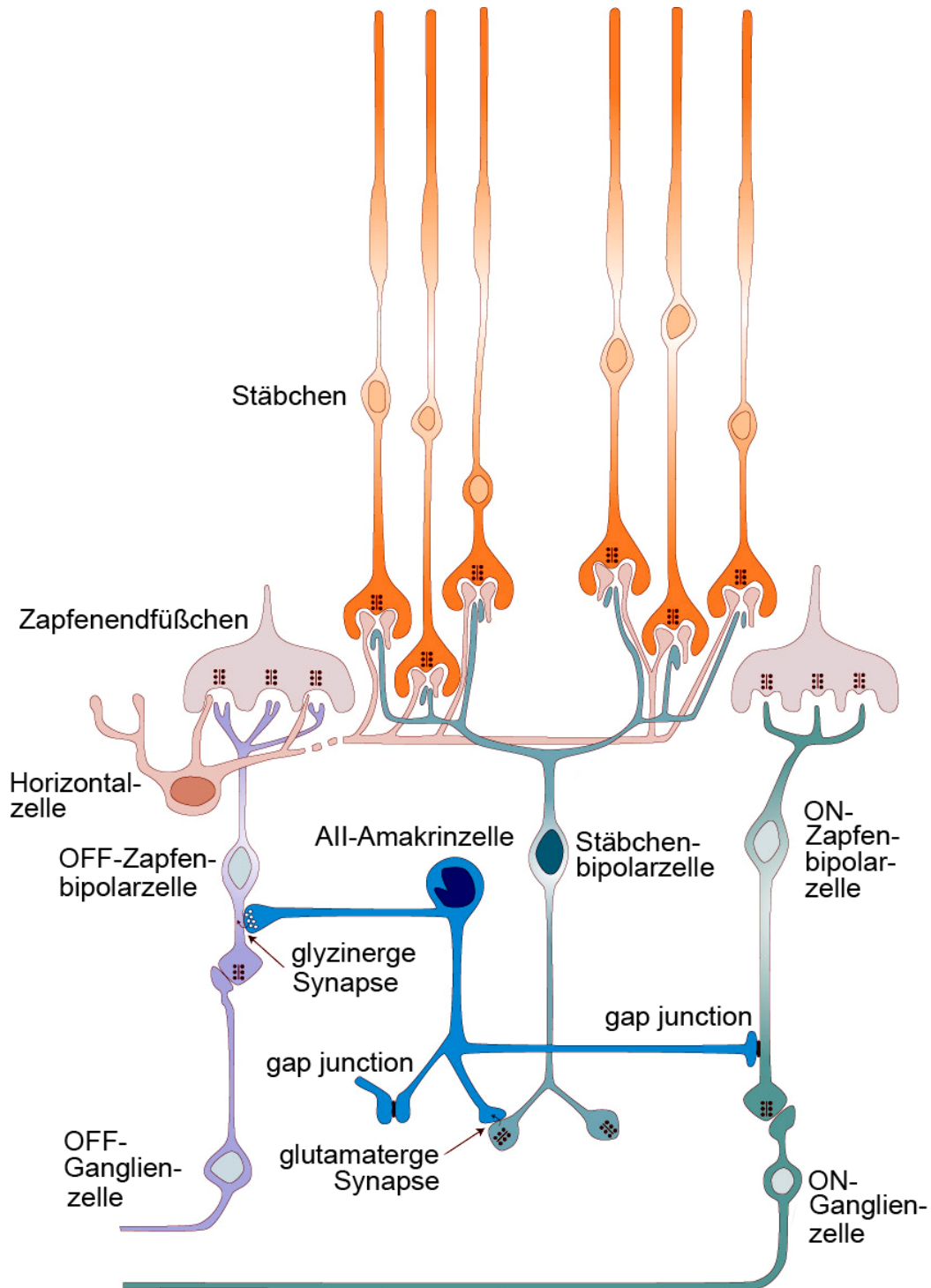
Die Horizontalzellen summieren die Lichtantworten der Photorezeptoren, von denen sie in der OPL glutamatergen Eingang erhalten. Sie sind über *gap junctions* [engl. elektrische Synapsen] miteinander gekoppelt, was in Abhängigkeit von der Lichtintensität zu einer Vergrößerung ihrer rezeptiven Felder führt. Horizontalzellen verrechnen die Lichtantworten der Photorezeptoren über negative Rückkopplung mit dem lokalen Lichtsignal. Diese laterale Inhibition verbessert unter anderem die Kontrastwahrnehmung (Wässle 2004). Der zugrundeliegende Mechanismus ist Gegenstand intensiver Forschung und wird kontrovers diskutiert. Horizontalzellen sind GABAerge Interneurone, weshalb man lange davon ausging, daß die beschriebene negative Rückkoppelung über ihren inhibitorischen Neurotransmitter realisiert wird. Bisher konnte allerdings weder gezeigt werden, daß Horizontalzellen in der Lage sind, aktiv GABA aufzunehmen, noch daß Photorezeptoren GABA-Rezeptoren besitzen. Alternative Wege führen von „*hemi-gap-junction*“-vermittelter elektrischer Rückkopplung (Kamermans et al. 2001) über pH-Wert-induzierte Modulation von  $Ca^{2+}$ -Kanälen (Hirasawa und Kaneko 2003) bis hin zu einem völlig anderen Modell, das davon ausgeht, der Angriffspunkt der lateralen Inhibition seien Bipolarzellen [engl. *feedforward* Inhibition] (Wässle 2004).

Die Interneurone der IPL sind die Amakrinzellen, von denen etwa die Hälfte GABA enthält. Für die wenigsten dieser Zelltypen wurde bisher explizit bewiesen, daß sie GABA auch tatsächlich synaptisch als Neurotransmitter ausschütten. Diese mutmaßlich GABAergen Zellen haben meist sehr große dendritische Felder und enthalten neben GABA oft andere Transmitter oder neuromodulatorische Substanzen wie Acetylcholin, Dopamin, Serotonin oder Substanz P (Brecha et al. 1982, Karten und Brecha 1983). Sie werden funktionell mit räumlich ausgedehnten Mechanismen der lateralen Inhibition, der Verarbeitung richtungsselektiver

Lichtantworten sowie diffusen, parakrin vermittelten Adaptationsvorgängen in Verbindung gebracht.

Die andere Hälfte der Amakrinzellen ist glyzinerig. Es ist davon auszugehen, daß es in der Säugetierretina mehr als 10 verschiedene Typen glyzinerger Amakrinzellen gibt (Kolb 1981, Menger et al. 1998, MacNeil et al. 1999). Ihnen sind kleine, vertikal orientierte dendritische Felder gemein, die darauf hindeuten, daß sie lokale Interaktionen zwischen den verschiedenen Ebenen der IPL vermitteln. Sie erhalten sowohl von Bipolarzellen als auch von anderen GABAergen und glyzinerigen Amakrinzellen synaptischen Eingang und sind ihrerseits präsynaptisch zu Amakrinzellen, Bipolarzellen und Ganglienzellen. Ihren Bedarf an Neurotransmitter decken sie zu einem großen Teil durch Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt, wozu sie spezifisch den Glyzintransporter 1 (GlyT1) exprimieren (Pow und Hendrickson 1999).

Die am besten beschriebene und am häufigsten vorkommende glyzinerige Amakrinzelle ist die bistratifizierte AII-Amakrinzelle (Kolb und Famiglietti 1974). Sie ist essentieller Bestandteil des Stäbchen-Signalweges, der an dieser Stelle kurz beschrieben sei (Abbildung 1.2): Stäbchen geben ihr Signal über metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR6) an die Stäbchenbipolarzelle weiter, die also auf Licht mit einer Depolarisation reagiert und dann ihrerseits Glutamat ausschüttet. Im Gegensatz zum Zapfensignalweg innervieren Stäbchenbipolarzellen die Ganglienzellen nicht direkt, sondern enden an AII-Amakrinzellen. AII-Zellen besitzen ionotrope Glutamatrezeptoren vom AMPA- und Kainat-Typ (Dumitrescu et al. 2006), reagieren also auf Licht ebenfalls mit Depolarisation und der Ausschüttung von Glyzin, das wiederum postsynaptische OFF-Bipolar- und Ganglienzellen hemmt. Mit ihren Dendriten in der ON-Sublamina hingegen erregt die AII-Amakrinzelle über elektrische Synapsen die ON-Bipolarzellen des Zapfensignalweges. Von den Bipolarzellen gelangt das Signal schließlich zu ON- und OFF-Ganglienzellen. Damit wird das Signal der Stäbchen über einen Umweg in die Zapfenbahn eingespeist, was allgemein als einer der Belege dafür gilt, daß Zapfen phylogenetisch älter sind als Stäbchen.



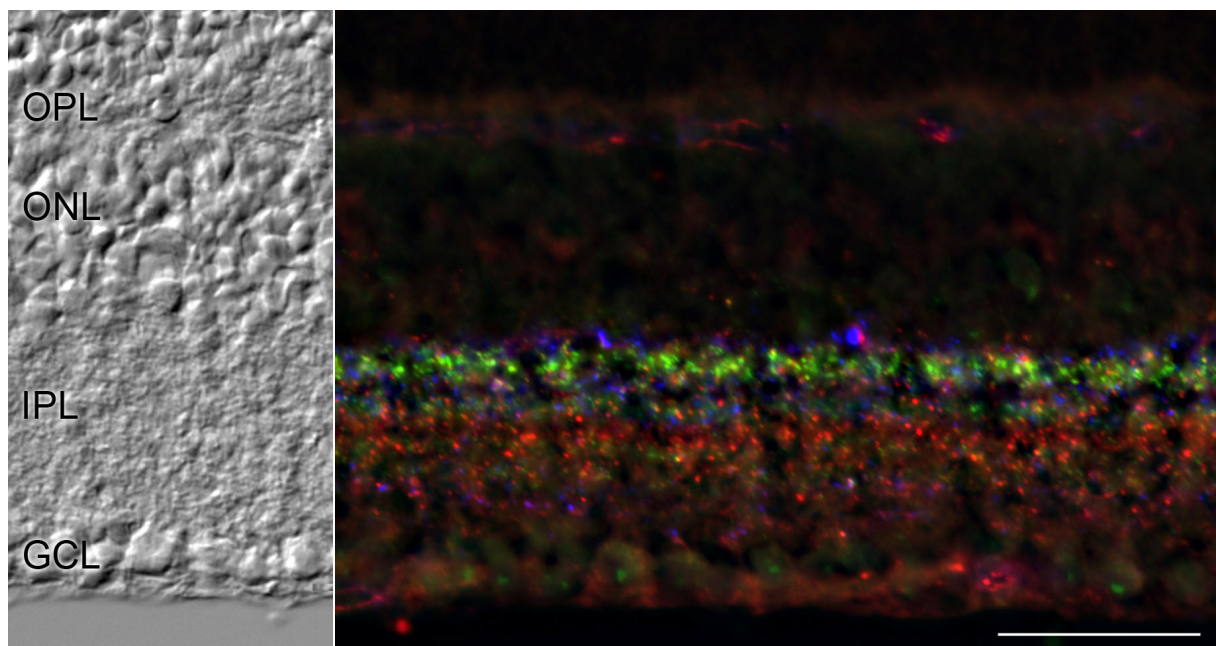
**Abbildung 1.2: schematische Darstellung der Verschaltung der All-Amakrinzelle in der IPL (leicht modifiziert nach Rodieck 1998)**

Die All-Amakrinzelle (in blau) erhält in der ON-Sublamina der IPL glutamatergen Eingang von Stäbchenbipolarzellen (in grün) und erregt über Gap junctions ON-Zapfenbipolarzellen (in grün) und andere All-Amakrinzellen. Über hemmende glyzinerge Synapsen ist die All-Zelle mit der OFF-Zapfenbahn verbunden (in violett).

Die Synapsen zwischen All-Amakrin- und OFF-Bipolarzellen in der OFF-Sublamina der IPL enthalten GlyR $\alpha$ 1 $\beta$ -heteropentamere Glyzinrezeptoren (Sassoé-Pognetto et



al. 1994). Wie aktuelle Untersuchungen elektrophysiologisch bewiesen haben, exprimieren OFF-Bipolarzellen von den 4 möglichen  $\alpha$ -Untereinheiten lediglich die GlyR $\alpha$ 1-Untereinheit, ON-Bipolarzellen hingegen besitzen keine Glyzinrezeptoren (Ivanova et al. 2006). Diese Befunde decken sich hervorragend mit der Glyzinrezeptorverteilung innerhalb der IPL. Eine Dreifachfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen die GlyR $\alpha$ 1-, GlyR $\alpha$ 2- und GlyR $\alpha$ 3-Untereinheit ergibt folgendes Bild (Abbildung 1.3): eine punktförmige Färbung, wobei jeder Punkt eine Aggregation von Glyzinrezeptoren in der postsynaptischen Membran, einem sogenannten „Cluster“ entspricht, der entweder GlyR $\alpha$ 1, GlyR $\alpha$ 2 oder GlyR $\alpha$ 3 enthält.



**Abbildung 1.3: Fluoreszenzaufnahme einer Dreifachfärbung gegen GlyR $\alpha$ 1 (blau), GlyR $\alpha$ 2 (rot) und GlyR $\alpha$ 3 (grün); Balkenlänge 50  $\mu$ m**

Die Färbung ist fast ausschließlich auf die IPL beschränkt, wo Glyzinrezeptoren an Synapsen zwischen glyzinergen Amakrinzellen und Amakrinzellen, Bipolarzellen und Ganglienzellen exprimiert werden. Die drei Untereinheiten unterscheiden sich deutlich in ihren Verteilungsmustern innerhalb der IPL. Selten sind zwei verschiedenfarbige Punkte kolokalisiert.

In der OFF-Sublamina ist die Dichte der GlyR $\alpha$ 1-Punkte hoch, in der ON-Sublamina dagegen niedrig. Ein ähnlich charakteristisches Verteilungsmuster zeigt auch GlyR $\alpha$ 3 mit seinen 4 Schichten von oben nach unten abnehmender Punktedichte. Lediglich GlyR $\alpha$ 2-Punkte sind mit Ausnahme des untersten Bereiches gleichmäßig über die gesamte IPL verteilt. Es ist auffällig, daß offenbar nur sehr wenige Synapsen mehr als eine GlyR $\alpha$ -Untereinheit enthalten (siehe auch Haverkamp et al. 2003, 2004), denn man findet in Abbildung 1.3 nur sehr selten eine in Mischfarben resultierende Überlagerung verschiedenfarbiger Punkte.

Dies läßt vermuten, daß die Natur nicht alle ihre zahlreichen GlyR-Kombinationsmöglichkeiten realisiert. Es ist bereits bekannt, daß Bipolarzellen ausschließlich GlyR $\alpha$ 1 exprimieren, jedoch bestand Unklarheit darüber, welche GlyR-Untereinheiten Amakrin- und Ganglienzellen besitzen. Ziel dieser Arbeit war, bei morphologisch unterschiedlichen Amakrin- und Ganglienzellen das Repertoire der GlyR-Untereinheiten aufzuzeigen.

Dafür stand eine transgene Mauslinie (GFP-O-Linie, Feng et al. 2000) zur Verfügung, die unter der Kontrolle des *thy1*-Promotors in einem Teil der Amakrin- und Ganglienzellen das grün-fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert. Dadurch konnten die Zelltypen morphologisch unterschieden und so auf eine differenzielle Kolo-kalisation mit den verschiedenen Glyzinrezeptoruntereinheiten untersucht werden.

Allerdings eröffnet das Vorliegen dieser Art von Spezifität auch die Frage nach möglicher Plastizität. Auch dieser sollte hier nachgegangen werden, indem bei drei Mauslinien, bei denen durch Genveränderung einzelne GlyR-Untereinheiten ausgeschaltet waren [engl. *knock-out*]: (*Oszillator* - *Gla1*<sup>spd/ot</sup>, *Gla2*<sup>-/-</sup>, *Gla3*<sup>-/-</sup>) die Anzahl der Punkte der jeweils verbleibenden GlyR $\alpha$ -Untereinheiten quantifiziert wurden. Auf diese Weise konnte untersucht werden, ob das Fehlen einer Untereinheit durch die vermehrte Expression einer anderen Untereinheit kompensiert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch ein neuer Antikörper gegen die GlyR $\alpha$ 4-Untereinheit charakterisiert. In der Vergangenheit standen nur Antikörper gegen GlyR $\alpha$ 1, GlyR $\alpha$ 2 und GlyR $\alpha$ 3 zur Verfügung. Durch diesen neuen Antikörper konnten zum ersten Mal alle  $\alpha$ -Untereinheiten untersucht werden, was die Verfolgung der oben formulierten Versuchsziele erst ermöglichte.

## 2.1) Methoden

### 2.1.1) Versuchstiere und Gewebepräparation

Es wurden die Retinae verschiedener Mauslinien für die Untersuchungen herangezogen: Wildtypmäuse des Stammes C57/B6, transgene Mäuse mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) unter der Kontrolle des thy1-Promotors (GFP-O-Linie, Feng et. al. 2000) sowie *knock-out*-Mäuse, bei denen die Untereinheiten  $\alpha 1$  (*Oszillator*-Maus, natürlich vorkommende Mutante),  $\alpha 2$  (*Gira2<sup>-/-</sup>*, Gregory O'Sullivan) bzw.  $\alpha 3$  (*Gira3<sup>-/-</sup>*, Harvey et al. 2004) des Glyzinrezeptors fehlen bzw. nicht funktionsfähig sind.

#### 2.1.1.1) Präparation für Lichtmikroskopie

Die Mäuse wurden mit Isofluran in Narkose versetzt und danach dekapitiert. Die Augen wurden entnommen und in eisgekühlten 0.1 M Phospatpuffer (PB) überführt. Danach wurde die Cornea aufgeschnitten, die Linse entnommen und der Augenbecher samt Retina in 4 % Paraformaldehyd (PFA) immersionsfixiert. Die Fixierzeit war abhängig von der anschließenden Immunfärbung; für Rezeptorfärbungen wurde generell zwischen 7 und 9 Minuten fixiert, für Färbungen mit Zellmarkern bis zu einer Stunde.

Nach der Fixierung wurden die Augenbecher 3 mal 10 Minuten in PB gewaschen, für eine Stunde in 10 % Saccharose in PB, danach eine weitere Stunde in 20 % Saccharose und über Nacht in 30 % Saccharose gegeben, um das Gewebe zu entwässern und dadurch vor Frostschäden zu schützen.

Am nächsten Tag wurden die Retinae aus dem Augenbecher herauspräpariert und danach entweder zu Gefrierschnitten verarbeitet oder als Ganzpräparat belassen.

Um die Ganzpräparate für Antikörper zugänglicher zu machen, wurde das Gewebe durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen [engl. *cracking*] aufgebrochen. Dazu wurde die Retina mit einem Tropfen Saccharoselösung auf einen Objektträger gegeben und über einem, zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlten, Messingblock eingefroren und direkt danach wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde insgesamt 3 mal wiederholt. Nach dem *Cracking* wurde die Retina 3 mal 10 Minuten in PB gewaschen und dann dem Färbeprotokoll unterzogen.

In bestimmten Fällen mußte statt mit PFA mit Carbodiimid fixiert werden. Da diese Fixierung sehr viel schwächer ist, kam ein anderes Präparationsprotokoll zur Anwendung. Die Retina wurde direkt nach der Entnahme des Auges in Hanks-

Medium unter Sauerstoffbegasung freipräpariert, auf einen Nitrocellulosefilter (Millipore) aufgezogen und dann mit dem Filter 20 bis 25 Minuten fixiert.

Um die Retina in ihren Schichten besser betrachten zu können, wurden außerdem Vertikalschnitte angefertigt. Dazu wurde aus der gefriereschützten Retina ein zentrales Quadrat ausgeschnitten und 15 Minuten in TFM-Einbettmedium (*tissue freezing medium* [engl.]) inkubiert. Anschließend wurde infiltrierte Netzhaut bei etwa -35°C auf die Objektträgerplatte des Kryostaten (Leica CM 3050S) aufgefroren, vertikal orientiert und von diesem Präparat bei etwa -17°C 16 bis 50 µm dicke Schnitte angefertigt. Sie wurden auf speziell geschliffene Objektträger (Menzel SuperFrost Plus) aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

#### **2.1.1.2) Präparation für postembedding-Elektronenmikroskopie**

Die vorbereitende Präparation der Retina erfolgte wie in 2.1.1.1 beschrieben, anschließend wurde sie 15 bis 30 Minuten in PFA fixiert, dann 3 mal 10 Minuten in PB gewaschen und aus dem Augenbecher herauspräpariert. Der Gefrierschutz wurde hier durch eine aufsteigende Glycerolreihe erreicht (10 und 20 % für je 1 Stunde, 30 % über Nacht).

Für die folgende Kryosubstitution mit dem Kunstharz Lowicryl (HM20) wurde das Gewebe zunächst in ungefähr 3 x 3 mm große Stückchen geschnitten, auf ein Lochträgernetzchen platziert und sodann in -150°C kaltem Propan schockgefroren.

Danach wurde es in der Kryokammer (Leica EM AFS) bei -90°C mit 50 %iger methanolischer Uranylacetatlösung behandelt und anschließend 3 mal 15 Minuten bei -45°C in Methanol gewaschen. Es schloß sich eine aufsteigende Lowicrylreihe an (1 Stunde 1:3, 1 Stunde 1:2, reines Lowicryl über Nacht). Am nächsten Tag wurden die Gewebestücke mit frischem Kunstharz eingebettet und dieses, initiiert durch UV-Strahlung, in der Kryokammer polymerisiert, wobei ein Temperaturanstieg von -90°C auf -10°C innerhalb von 3 Tagen programmiert wurde. Nach Erreichen der Zieltemperatur von -10°C wurden die fertigen Blöcke aus den Einbettformen entnommen, mit einem Ultramikrotom etwa 50 bis 60 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt und diese auf mit Pioloform überzogene Nickel-Lochträgernetzchen aufgezogen.

### **2.1.1.3) Präparation für preembedding-Elektronenmikroskopie**

Der Augenbecher wurde wie in 2.1.1.1 beschrieben präpariert, 10 bis 30 Minuten in PFA immersionsfixiert, danach in PB gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Saccharosereihe gefriereschützt. Am nächsten Tag wurde die Retina aus dem Augenbecher freipräpariert, ein zentrales Stück daraus zurechtgeschnitten und dieses vorsichtig einmal über einem stickstoffgekühlten Metallblock eingefroren und wieder aufgetaut (siehe 2.1.1.1).

Dieses Stück Retina wurde sodann in 4 % Agar in PB eingebettet und am Vibratom zu 60 bis 70 µm dicken Vertikalschnitten verarbeitet.

### **2.1.1.4) Präparation für *in-situ*-Hybridisierung**

Der Augenbecher wurde wie in 2.2.1.1 beschrieben präpariert und mindestens 24 Stunden in PFA fixiert, die Retina dann aus dem Augenbecher herauspräpariert und in BSA/Gelatine eingebettet. Danach wurden 75 µm dicke Vibratomschnitte angefertigt, diese in einer aufsteigenden Methanolreihe (25 %, 50 % und 75 % in PBST) dehydriert und bei -20°C in reinem Methanol aufbewahrt.

## **2.1.2) Immunzytochemie**

### **2.1.2.1) Immunzytochemie für die Lichtmikroskopie**

Es wurde fast ausschließlich nach der indirekten Fluoreszenzmethode gearbeitet. Dabei wurde zunächst über Nacht bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper bzw. bei Doppel- oder Dreifachmarkierungen der Primärantikörpermischung in 5 % Chemiblocker mit 0,5 % (bei Dünnschnitten) oder 1 % Triton (bei Ganzpräparaten) inkubiert. Für den Peptidblock wurde die Primärantikörperlösung mit einem Überschuß an Kontrollpeptid versetzt und 90 Minuten bei Raumtemperatur präinkubiert. Die Inkubationslösung wurde bei den Gefrierschnitten direkt auf den Objektträger pipettiert, nachdem die darauf befindlichen Schnitte mit einem wasserabweisenden Fettstift umrandet worden waren, um das Auslaufen der Lösung zu verhindern. Die Ganzpräparate wurden frei schwimmend in Multiwellplatten inkubiert. Am nächsten Tag wurde in PB gewaschen (Gefrierschnitte 3 mal 10 Minuten, Ganzpräparate 4 mal 10 Minuten), anschließend 1 bis 2 Stunden mit dem Sekundärantikörper bzw. der Sekundärantikörpermischung, ebenfalls in CB verdünnt, inkubiert. Abschließend wurde das Gewebe in PB gewaschen (Gefrierschnitte 3 mal 10 Minuten, Ganzpräparate 4 mal 10 Minuten) und mit Aqua

Polymount unter einem Deckgläschen eingebettet. Die Ganzpräparate mußten dazu vorsichtig mit 2 Pinseln auf einem Objektträger ausgebreitet werden. Das Einbettmedium Aqua Polymount ist ein Kunstharz und dient der Fixierung des Gewebes auf dem Objektträger. Es soll darüber hinaus dem Ausbleichen der an die Sekundärantikörper gekoppelten Fluorophore entgegenwirken. In den Tabellen 2.1 und 2.2 sind die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper aufgelistet.

<b>Antigen</b>	<b>Wirt</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Verdünnung</b>
Bassoon (mAb7f)	Maus (ms)	StressGen	1:5000
Calretinin	ms	Chemicon	1:2000
Calretinin	Ziege (gt)	Chemicon	1:1000
Cholinacetyltransferase (ChAT)	gt	Chemicon	1:200
ChAT	Kaninchen (rb)	Chemicon	1:500
Gephyrin	ms	H. Betz, Frankfurt/M.	1:100
GFP	rb	Molecular Probes	1:4000
GFP	gt	Chemicon	1:1000
GlyR (mAb4a)	ms	H. Betz, Frankfurt/M.	1:100
GlyRa1 (mAb2b)	ms	H. Betz, Frankfurt/M.	1:100
GlyRa2	gt	Santa Cruz	1:300
GlyRa3	rb	R. Harvey, London	1:500
GlyRa3	gt	Santa Cruz	1:300
GlyRa4	rb	R. Harvey, London	1:400 – 1:600
Glyzin	Ratte (rat)	D. Pow, Newcastle, NSW, Australia	1:1000
Glyzintransporter 1 (GlyT1)	rat	D. Pow, Newcastle, NSW, Australia	1:500
Melanopsin	rb	I. Provencio, Charlottesville (Virginia)	1:5000
Tyrosinhydroxylase (TH)	rb	Chemicon	1:400
TH	ms	H. Rohrer, Frankfurt/M.	1:1000
vesikulärer Glutamat-transporter 3 (vGluT3)	Meerschweinchen (gp)	Erickson, New Orleans	1:2000

**Tabelle 2.1: für die Immunhistochemie verwendete Primärantikörper**

IgG-Konjugat	Wirt und Antigen	Hersteller	Verdünnung	Filter/Fluorophor-Spezifikationen
Alexa Fluor 488™	Esel (dk) anti rb	Molecular Probes	1:500	<b>Zeiss # 10</b> Absorption: $\lambda_{\max} = 495 \text{ nm}$ Emission: $\lambda_{\max} = 519 \text{ nm}$
	dk anti ms			
	dk anti gt			
	dk anti gp			
	gt anti rat			
Cy3™	dk anti rb	Dianova	1:500	<b>Zeiss # 31</b> Absorption: $\lambda_{\max} = 550 \text{ nm}$ Emission: $\lambda_{\max} = 570 \text{ nm}$
	dk anti ms			
	dk anti gt			
	dk anti gp			
	dk anti rat			
Cy5™	dk anti ms	Dianova	1:200	<b>Zeiss # 26</b> Absorption: $\lambda_{\max} = 649 \text{ nm}$ Emission: $\lambda_{\max} = 670 \text{ nm}$
	gt anti rb			
	dk anti rb			
	dk anti gt			
	dk anti gp			

**Tabelle 2.2:** für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzte Sekundärantikörper und die dafür geeigneten Filtersätze

### 2.1.2.2) Postembedding Immunzytochemie für die Elektronenmikroskopie

Die auf Lochträgernetzchen aufgebrauchten Ultradünnschnitte (siehe 2.1.1.2) wurden optional etwa 1 Sekunde mit einer ethanolischen Natriumhydroxidlösung (gesättigt, vor Verwendung frisch mit reinem Ethanol auf 50 % verdünnt) behandelt, um die Oberfläche der Schnitte für die Antikörper zugänglicher zu machen. Danach wurde dreimal kurz in destilliertem Wasser gewaschen und 10 Minuten in einer Lösung mit 50 mM Glyzin-Lösung inkubiert. Durch diese Behandlung soll reduktiv überschüssiges Fixativ inaktiviert und die Fixierung durch Bildung Schiffscher Basen stabilisiert werden.

Anschließend wurden mit humaner Serumalbumin-Lösung (HSA) 10 Minuten lang unspezifische Bindungsstellen im Gewebe blockiert und über Nacht wurde mit dem Primärantikörper (pAb GlyR $\alpha$ 4, 1:10 bis 1:80), verdünnt in HSA, inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 mal 3 Minuten in HSA gewaschen und 2 Stunden mit einem goldkonjugierten Zweitantikörper (siehe Tabelle 2.3), ebenfalls verdünnt in HSA, inkubiert.

IgG-Konjugat	Wirt und Antigen	Hersteller	Verdünnung
Immunogold 10 nm	gt anti rabbit	Aurion	1:20 bis 1:40
Immunogold 12 nm	dk anti rabbit	Jackson Research	
Nano-Gold	gt anti rabbit	Aurion	1:40

**Tabelle 2.3: für die Elektronenmikroskopie eingesetzte Sekundärantikörper**

Es schlossen sich weitere Waschgänge über einmal 3 Minuten in HSA und zweimal 3 Minuten in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) an.

Sodann wurde 5 Minuten mit 2,5 % Glutaraldehyd in PBS nachfixiert und noch dreimal drei Minuten in Aq. bidest. gewaschen.

Die mit Nanogold-Sekundärantikörper behandelten Präparate wurden einer Silberverstärkung nach Danscher unterzogen. Dazu wurden 4 Lösungen hergestellt:

- Schutzkolloid: 50 % Gummi Arabicum in Aq. bidest.
- Puffer: 25,5 % Zitronensäure und 23,5 % Natriumcitrat in Aq. bidest.
- Entwickler: 5,7 % Hydroquinon in Aq. bidest.
- Silbersalz: 0,73 % Silberlactat in Aq. bidest.

Diese Lösungen wurden im Verhältnis 6:1:1,5:1,5 gemischt. Die Präparate wurden je 10 Minuten mit der resultierenden Lösung inkubiert und danach gründlich in Aq. bidest. gewaschen.

Schließlich wurde eine maschinelle Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat durchgeführt. Das standardmäßig verwendete Programm behandelt die Schnitte zunächst 30 Minuten mit Uranylacetatlösung (1,5 % in Citratpuffer) und in einem zweiten Schritt 90 Sekunden mit Bleicitratlösung (Leica Ultrastain 2).



### **2.1.2.3) Preembedding-Immunzytochemie für die Elektronenmikroskopie**

Die Vibratonschnitte wurden 2 Stunden in 10 % normalem Ziegen Serum (NGS) präinkubiert, danach 4 Tage bei 4°C in der Primärantikörperlösung (pAb GlyR $\alpha$ 4, 1:500 in 3 % NGS) inkubiert.

Danach wurde 4 mal 15 Minuten in PB gewaschen und zwei Stunden mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (Vector, gt anti rb 1:100 in NGS) inkubiert. Nach anschließenden Waschgängen in PBS folgte die Behandlung der Schnitte mit dem ABC-Kit. Dazu wurden zunächst die Komponenten A und B (Avidin und biotinylierte Peroxidase) im Verhältnis 1:1 und einer Verdünnung von 1:100 in PBS gemischt und 30 Minuten stehen gelassen. Mit dem dabei entstandenen Komplex wurden dann die Vibratonschnitte für 1 bis 2 Stunden inkubiert. Bei einer solchen Reaktion bindet der Komplex aus Avidin und Peroxidase aufgrund der hohen Bindungsaffinität von Avidin gegenüber Biotin an den biotinylierten Sekundärantikörper, so daß das Antigen schließlich mit Peroxidase gekoppelt vorliegt. Diese Peroxidase erzeugt dann unter Zugabe von Diaminobenzidin (DAB) und Wasserstoffperoxid ein licht- und elektronenmikroskopisch sichtbares Reaktionsprodukt. Um diese Reaktion herbeizuführen, wurden die Schnitte 10 Minuten lang mit 0,05 % DAB in Trispuffer versetzt und anschließend mit Wasserstoffperoxid (Endkonzentration im Reaktionsgefäß 0,01 %) behandelt. Der Verlauf der Reaktion wurde visuell verfolgt und bei ausreichender Dunkelfärbung des Gewebes mit einem Überschuss an Tris-Puffer gestoppt.

Die Schnitte wurden danach in Tris- und Cacodylat-Puffer gewaschen, mit 2,5 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer eine Stunde nachfixiert, mit Cacodylat-Puffer gewaschen und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Am nächsten Morgen wurden die Schnitte in Schnappdeckelgläser überführt und mehrfach gründlich mit Aq. bidest. gewaschen, um vor der Silberverstärkung alle freien Phosphationen aus dem Gewebe zu entfernen.

Für die Silberverstärkung wurden zunächst 5 verschiedene Lösungen, jeweils in Aq. bidest, hergestellt:

- 3 % Hexamethylentetramin (A)
- 5 % Silbernitrat (B)
- 2,5 % Borax (C)
- 0,05 % Gold(III)-chlorid-chlorwasserstoffsäure (D)
- 2,5 % Natriumthiosulfat (E)

Eine Mischung aus 5 ml Lösung A, 250 µl Lösung B und 500 µl Lösung C wurde auf die Schnitte gegeben und diese 10 Minuten bei 60 °C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Schnitte in Aq. bidest. gewaschen, danach hintereinander je 3 Minuten mit Lösungen D und E inkubiert. Dazwischen und danach wurde mit Aq. bidest gewaschen.

An die Silberverstärkung schloss sich eine 30-minütige Kontrastierung mit 0,5 % Osmiumtetroxid bei 4°C an, die vor allem Membranlipide elektronendicht macht und quervernetzt. Danach wurde gründlich mit Cacodylatpuffer gewaschen.

Es folgte dann eine aufsteigende Ethanolreihe zur Entwässerung des Gewebes (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 2 mal 100 %, je 15 Minuten). Danach wurden die Schnitte zur vollständigen Entwässerung 2 mal 5 Minuten mit Propylenoxid und 30 Minuten mit einer 1:1-Mischung aus Propylenoxid und Epon behandelt. Die Schnitte wurden schließlich über Nacht in reinem Epon inkubiert und am nächsten Tag flach zwischen Folie in frisches Epon eingebettet, das dann 48 Stunden bei 60°C polymerisiert wurde.

Diese Präparate wurden an einem Mikrotom zu vertikalen Ultradünnschnitten (60 nm) verarbeitet, auf mit Pioloform beschichtete Lochträgernetzchen aus Kupfer aufgezogen und schließlich einer maschinellen Kontrastierung unterzogen (siehe 1.2.2.2).

### **2.1.3) Mikroskopie**

Die gezeigten Bilder wurden an verschiedenen Mikroskopen aufgenommen (siehe 2.2.3.) und anschließend in Adobe Photoshop 7.0 nachbearbeitet.

#### **2.1.3.1) Konfokale Mikroskopie**

Für konfokale Aufnahmen stand das Laser-Scan-Modul LSM 5 Pascal mit einem Zeiss Axioskop MOT und den Zeiss Öl-Immersionsobjektiven Plan-Neofluar 40x/1,3 Oil und Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil zur Verfügung. Zur Anregung der Fluoreszenz dienten ein Helium-Neon-Laser, der Licht der Wellenlänge 543 nm, und ein Argon-Laser, der Licht der Wellenlänge 450 bis 514 nm erzeugt. Dementsprechend konnten unter Verwendung der Fluorophore Alexa 488 und CY3 (jeweils gekoppelt an den Sekundärantikörper) Bildstapel aufgenommen werden. Dabei wird nach einer Aufnahme die Fokusebene jeweils um eine definierte Distanz – für die Analyse von Kollokalisierungen mit den 63x bzw. 100x Ölimmersionsoberktiven durchschnittlich um

0,4  $\mu\text{m}$  - entlang der z-Achse verschoben und dann das nächste Bild erzeugt. Die Steuerung der Aufnahmen erfolgte über die Software LSM Pascal Version 3.2 von Zeiss.

### **2.1.3.2) Fluoreszenzmikroskopie**

Zunächst wurden Fluoreszenzaufnahmen an einem Zeiss Axiophot mit Hilfe der MetaView Software und der Digitalkamera „Spot 2“ angefertigt, später stand dafür ein Mikroskop mit z-Achsen-Motorisierung zur Verfügung (Zeiss Axioplan 2, ausgestattet mit den Zeiss Objektiven Plan-Neofluar x2,5/0,075, Plan-Neofluar x10/0,30, Plan-Neofluar x20/0,50, Plan-Neofluar x40/0,75, Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil und Plan-Neofluar 100x/1,3 Oil, das über die Axiovision Software Version 4.2 bedient wird). Mit diesem Mikroskop wurden wie am konfokalen Mikroskop Bilderstapel aufgenommen, wobei mit einer digitalen Kamera (Zeiss AxioCam MRm) bis zu 5 Kanäle pro Bild erfaßt werden konnten. Die dafür verwendeten Filtersätze sind der Tabelle 2.2 zu entnehmen.

Das in die Software integrierte Dekonvolutionswerkzeug vermindert über ein mathematisches Verfahren physikalisch bedingte Abbildungsfehler (wie Lichtstreuung an Objekten in anderen Fokusebenen) und erzeugt dadurch ein schärferes Bild mit weniger Hintergrundfluoreszenz. Als Lichtquelle diente eine Osram Quecksilber-Kurzbogenlampe (HBO 100 W).

### **2.1.3.3) Transmissionselektronenmikroskopie**

Die Auswertung der mittels pre- und post-embedding markierten Präparate erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM 10 CR). Zur digitalen Fotografie wurde eine Gatan BioScan Kamera (Gatan Inc.) verwendet, die über die Software Digital Micrograph 3.1 (Gatan Inc.) bedient wurde.

### **2.1.4) Quantifizierung der Glyzinrezeptorfärbungen**

Zur Bestimmung der Punktedichte verschiedener Glyzinrezeptoren wurden Fluoreszenzaufnahmen mit dem 100x Objektiv angefertigt, bearbeitet und mit hoher Qualität und bei Endvergrößerung von 2650:1 ausgedruckt. Über einen 30  $\mu\text{m}$  breiten Ausschnitt der IPL wurden alle Punkte gezählt und anschließend auf die Dichte pro 100  $\mu\text{m}^2$  umgerechnet.

### 2.1.5) Quantifizierung der Kolokalisation von Immunfärbungen

Zur Quantifizierung der Kolokalisation beispielsweise verschiedener Glyzinrezeptor-untereinheiten wurden zunächst Doppel- bzw. Dreifachfärbungen angefertigt und am Fluoreszenzmikroskop als Mehrkanalbilder aufgenommen.

In Photoshop wurde dann der entsprechende Bildausschnitt aus der ins TIF-Format exportierten Datei markiert und die Kanäle getrennt voneinander mit hoher Qualität und Endvergrößerungen von 2650 bis 8000:1 ausgedruckt. Die punktförmige Rezeptorfärbung wurde für jeden Kanal separat auf Klarsichtfolie übertragen, diese dann passend übereinandergelegt und die Punkte gezählt, die kolokalisiert waren. Die Analyse der Kolokalisation von Ganglienzellen mit GlyR $\alpha$ 1 wurde direkt am Bildschirm durchgeführt. Die Kontrolle bestand in je einer spiegelverkehrten, somit zufälligen, Überlagerung der Kanäle und erneuten Auszählung der kolokalisierten Punkte. Beide Wertereihen wurden mittels T-Test verglichen und die Kolokalisation als gegeben betrachtet, wenn beide Wertereihen signifikant ( $p < 0,05$ ) voneinander abwichen.

### 2.1.6) Genotypisierung

Die Genotypisierung mit Hilfe der PCR [engl. *polymerase chain reaction*, Polymerasekettenreaktion] sei am Beispiel der GFP-O-Maus-Linie ausgeführt, da alle anderen Mauslinien bereits unter Angabe ihres Genotyps zur Verfügung standen.

Die Mäuseschwänze wurden mit 500  $\mu$ l Lysispuffer sowie 20  $\mu$ l Proteinase K über Nacht bei 55°C auf einem Thermoschüttler aufgelöst. Am nächsten Morgen wurde durch 10 minütiges Erhitzen auf 95°C die Proteinase K inaktiviert, dann 5 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert und je 4  $\mu$ l des Überstandes mit 21  $\mu$ l Mastermix (siehe Tabelle 2.4) versetzt und das für GFP kodierende Gen in einem PCR-Thermocycler amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide waren:

Thy1F1: TCT GAG TGG CAA AGG ACC TTA GG

YFPR1: CGC TGA ACT TGT GGC CGT TTA CG

Die PCR verlief in folgenden Zyklen: zunächst 3 Minuten bei 96°C, dann 40 mal die folgende Schleife: 96°C eine Minute, 62°C eine Minute, 68°C 3 Minuten. Das Programm schloss mit einer Phase von 10 Minuten bei 68°C und kühlte dann auf 4°C ab.

Die PCR-Produkte wurden mit DNA [engl.: **desoxyribonucleic acid**]-Ladepuffer versetzt, auf ein Agarosegel (2 % in Trizma-**B**orsäure-**E**DTA-Puffer, TBE) aufge-

tragen und bei 110 Volt 2 Stunden lang aufgetrennt. Pro Geltasche wurden etwa 10 µl Probengemisch aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben wurde auch ein Größenstandard (*Smart Ladder™*) aufgetragen.

Das Gel wurde 15 Minuten in Ethidiumbromidlösung gelegt, danach gewaschen und im UV-Durchlicht fotografiert (Eagle Eye Geldokumentationssystem). Die GFP-Bande lag bei ungefähr 300 Basenpaaren.

<b>Probenzahl</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>44</b>	<b>48</b>	<b>52</b>
HPLC-Wasser	210	420	462	504	546
MgCl <sub>2</sub>	35	70	77	84	91
10 x PCR Puffer	50	100	110	120	130
Q-Solution	100	200	220	240	260
dNTPs	10	20	22	24	26
Primer A	5	10	11	12	13
Primer B	5	10	11	12	13
Taq-Polymerase	5	10	11	12	13

**Tabelle 2.4: Tabelle zur Herstellung des Mastermix (Angaben in µl)**

### **2.1.6) HEK-Zell-Transfektion**

Die HEK293-Zellen wurden freundlicherweise von der Abteilung Neurochemie des Max-Planck-Institutes für Hirnforschung bereits aufgetaut in Kulturmedium zur Verfügung gestellt. Das Medium wurde vorsichtig von den Zellen abgesaugt, dann wurden sie mit PBS gewaschen und 1 ml Trypsinlösung (0,25 % Trypsin und 0,05 % EDTA in PBS) zugegeben, um die Zellen vom Boden der Petrischale abzulösen. Außerdem wurden kurz darauf 4 ml Kulturmedium zupipettiert und alles gut durchmischt. Diese Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Kulturmedium auf 10 ml aufgefüllt. Je etwa 50 µl der Zellsuspension (variabel je nach Zelldichte) wurden zusammen mit 1 ml DMEM auf in Multiwellplatten (Nunc) vorgelegte und für 2 Stunden mit Fibronectinlösung (50 µg pro ml in PBS) vorbehandelte Deckgläschen gegeben und etwa 24 Stunden zum Anwachsen bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Dabei sind 50.000 bis 60.000 Zellen pro Deckgläschen angestrebt.

Am nächsten Tag wurden die Zellen mittels Lipofektamin (Invitrogen) mit Glra1, Glra2, Glra3 und Glra4, alle murin und vorliegend im pCis-Vektor, transfiziert. Die cDNA wurde wiederum von der Abteilung Neurochemie des Max-Planck-Institutes für Hirnforschung zur Verfügung gestellt, die Sequenzen sind im Anhang angegeben. Für die Transfektion wurde folgendermaßen vorgegangen: zunächst wurden Lipofektamin und Opti-MEM (Invitrogen) in einem Verhältnis von 1:25 gemischt und 5 Minuten inkubiert. Währenddessen wurde die cDNA in Opti-Medium vorverdünnt (variabel je nach Ausgangskonzentration). Dann wurde die cDNA-Vorverdünnung mit der Lipofektamin-Vorverdünnung gemischt und 20 Minuten inkubiert. Von den HEK-Zellen wurden je 500 µl Medium abgezogen und dann von der Lipofektamin-cDNA-Mischung etwa 100 µl zugegeben, so daß die Endkonzentration der cDNA 250 ng pro Well betrug. Die Zellen wurden sodann weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Am Tag darauf wurde die Lösung über den Zellen vorsichtig abgesaugt und mit PBS gewaschen. Dann wurde für 5 bzw. 10 Minuten mit PFA fixiert, wiederum mit PBS gewaschen und 5 Minuten mit Triton (0,25 % in PBS) permeabilisiert. Anschließend wurde eine Stunde mit BSA (2 % in PBS) geblockt und danach eine Stunde mit der Primärantikörpermischung (mAb4a 1:100 und anti GlyRα4 1:500, verdünnt in 2 % BSA in PBS) inkubiert. Anschließend wurde wieder mit PBS gewaschen, dann mit der Sekundärantikörpermischung (Alexa 488 dk anti ms und Alexa CY3 dk anti rb, verdünnt 1:500 in 2 % BSA in PBS) inkubiert. Nach einer Stunde wurde wieder in PBS gewaschen und die Zellen schließlich auf einem Objektträger unter Aqua Polymount eingebettet.

## **2.1.7) Western Blot**

### **2.1.7.1) Gewinnung des Extrakts**

Zunächst wurde ein Proteinextrakt aus der Retina gewonnen. Dafür wurden beide Retinae einer adulten Maus des Stammes C57/B6 in 1 ml eisgekühltem Homogenisierungspuffer homogenisiert. Die Proteine wurden dann mit 20 % Trichloressigsäure (in Aq. bidest.) gefällt und anschließend bei 14.000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen. Danach wurde wieder zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 200 µl mit Dithiothreitol (DTT) versetztem Probenpuffer aufgenommen und für 20 Minuten bei 37°C geschüttelt. Dabei reduziert DTT Disulfidbrücken. Sodann wurde 10 Minuten auf 95°C erhitzt, danach 2 Minuten

bei 14.000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in frische Reaktionsgefäße überführt.

#### **2.1.7.2) Proteinmengenbestimmung**

Die Konzentration der so aus dem Homogenat gewonnenen Proteine wurde photometrisch mit Amidoschwarz bestimmt. Dazu wurden 5 und 10 µl des fertigen, mit Probenpuffer versetzten Extraktes mit destilliertem Wasser auf je 100 µl aufgefüllt, dazu 200 µl Amidoschwarzlösung gegeben und bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert. Dann wurde 5 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in methanolischer Essigsäure gewaschen und wieder zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt bis der Überstand farblos war. Dann wurde das Pellet in 0,1 N NaOH aufgenommen und bei Raumtemperatur 30 Minuten stehengelassen. Die Absorption der resultierenden Lösung wurde bei 620 nm gemessen, wobei reine 0,1 N NaOH als Nullwert definiert wurde. Für eine BSA-Konzentrationsreihe wurde identisch verfahren, daraus in Excel eine Eichkurve erstellt und so die Proteinkonzentration der Probe ermittelt.

#### **2.1.7.3) Deglykosylierung des Extraktes**

Zur Deglykosylierung des Proteinextraktes wurde die N-Glykosidase PNGase F eingesetzt. Für die Deglykosylierung von etwa 15 µg Protein wurde dabei ein *Unit* (entspricht 1 µl) PNGase F verwendet. Zusätzlich wurden von den in 10facher Konzentration mitgelieferten Puffern NP40 und G7 so viel zugegeben, daß ihre Endkonzentration im Extrakt je 1 % betrug. Diese Mischung wurde 45 Minuten bei 37°C inkubiert.

#### **2.1.7.4) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Western-Blot-Transfer und PonceauS-Färbung**

Pro Geltasche wurden umgerechnet 20 bis 25 µg Protein sowie ein Proteinstandard (HiMark™, Invitrogen) auf ein Tris-Acetat-Gel (NuPAGE 3-8 %, Invitrogen) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70 V (Sammelgel) bzw. 100 V (Trenngel).

Die aufgetrennten Proteine wurden schließlich bei 200 mA 90 Minuten auf Polyvinylidenfluorid-Membranen (PVDF) geblottet, mit Ponceaurot gefärbt,

anschließend in Aq. bidest. gewaschen, kurz in Methanol getaucht, getrocknet und aufbewahrt.

### **2.1.7.5) Western-Blot-Analyse**

Die Blotstreifen wurden mit pAb GlyR $\alpha$ 4 (1:500) und einem gegen alle GlyR-untereinheiten gerichteten Antikörper (mAb4a 1:100) markiert. Der Peptidblock erfolgte wie in 2.1.2.1 beschrieben. Im Falle der Deglykosylierung wurde noch eine Positivkontrolle durchgeführt (vAChT, gt, 1:500). Dazu wurden die Blotstreifen zunächst kurz mit Methanol benetzt, dann in Aq. bidest. und in trisgepufferter Saline mit Tween 20 (TBST) gewaschen, eine Stunde in 5 % Magermilchpulver (in TBST) geblockt und schließlich bei 4°C über Nacht in der Primärantikörperlösung (Antikörper in TBST mit 3 % BSA und 0,2 % Natriumazid) inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal in TBST gewaschen, dann eine Stunde mit dem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (gt anti rb bzw. dk anti gt 1:10.000 in TBST) inkubiert. Nach 3 weiteren Waschgängen in TBST bzw. TBS wurde für 5 Minuten ein Chemolumineszenz-Kit (Amersham Biosciences) auf die Blotstreifen gegeben, aus dem die Meerrettich-Peroxidase ein lumineszierendes Substrat freisetzt, das danach einen Röntgenfilm belichtete, der schließlich maschinell (Curix 60, AGFA) entwickelt wurde. Eine positive Antigen-Antikörper-Reaktion konnte so als dunkle Bande detektiert werden.

### **2.1.8) *in-situ*-Hybridisierung**

#### **2.1.8.1) Synthese der RNA-Sonden**

Ausgehend von dem im pCis-Vektor vorliegenden murinen *Gla4* (freundlicherweise von Gregory O'Sullivan, Abteilung Neurochemie, Max-Planck-Institut für Hirnforschung, zur Verfügung gestellt) wurden mittels PCR die Teile der Gensequenz amplifiziert, gegen die die RNA-Sonden synthetisiert werden sollten. Die dazu benötigten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) hergestellt und hatten die folgenden Sequenzen:

Upper: GGA ACA CTC GAG CGG CAG CAG TGG AAT GA

Lower (+T7): GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAT CTA GAT TGG  
GGA CTAT AAA TGC TGG AAC C



Die resultierende DNA-Sequenz entspricht den Basenpaaren 309 bis 1212 des murinen *Gira4*. PCR-Ansatz und –Zyklusabfolge waren wie folgt komponiert (Tabellen 2.5 und 2.6).

Komponente	Volumen [µl]
10x Puffer	2,5
dNTPs	0,5
U-Oligonukleotid	0,5
L-Oligonukleotid + T7	0,5
Taq Polymerase	0,1
Aq. bidest. (HPLC)	20,9

**Tabelle 2.5: Komponenten des PCR-Ansatzes**

PCR-Zyklus-Parameter		
1x	94°C	5 min
19x	94	1 min
	56	1 min
	72	1,5 min
1x	72	5 min
	4°C	∞

**Tabelle 2.6: PCR-Zyklusparameter**

Das PCR-Produkt wurde ohne Aufreinigung für die RNA-Sondensynthese weiterverwendet. Die Synthese der RNA-Sonden erfolgte mittels *in vitro* Transkription unter Verwendung einer RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 (E.coli). Mit dem zuvor amplifizierten DNA-Fragment als Matritze wurde die RNA-Sonde in Gegenwart Digoxygenin-markierter Ribonukleotide 2 Stunden bei 37°C mit dem folgenden Reaktionsansatz synthetisiert (Tabelle 2.7).

Komponente	Volumen [µl]
10x Transkriptionspuffer	2
10x NTPs (UTP Digoxygenin-markiert)	2
PCR-Produkt	3
T7-RNA-Polymerase	2
RNase-Inhibitor	0,5
Aq. bidest. (DEPC)	10,5

**Tabelle 2.7: Komponenten des Ansatzes für die Sondensynthese**

Die resultierende RNA wurde durch Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl Ethanol 2 Stunden bei -20°C präzipitiert und 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die RNA-Pellets luftgetrocknet und in 100 µl Aq. bidest. gelöst. Um die Reaktion zu überprüfen, kann ein Aliquot dieser Lösung gelelektrophoretisch

aufgetrennt werden. Dabei sollte die RNA-Bande erheblich intensiver erscheinen als die Bande der Matritze.

Zu der in Aq. bidest. gelösten RNA wurden 500 µl Hybridisierungspuffer gegeben und in dieser Lösung bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

### **2.1.8.2) Hybridisierung, Antikörper- und Farbreaktion**

Zunächst wurden die in Methanol aufbewahrten Vibratomschnitte in einer absteigenden Methanolreihe rehydriert, anschließend 10 Minuten mit 6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBST behandelt und danach zweimal in PBST gewaschen. Es folgte die 3-stündige Inkubation im Präinkubationspuffer bei 68°C, der dann durch die Inkubationslösung (RNA-Sonde 1:150 verdünnt in Hybridisierungspuffer) ausgetauscht wurde, in der die Schnitte über Nacht bei 68°C verblieben.

Am nächsten Tag wurde bei 68°C in 1x SSC [engl. **s**tandard **s**odium **c**itrate] und 0,2x SSC gewaschen. Die anschließenden Waschschrte in TBST erfolgten bei Raumtemperatur, ebenso wie die Inkubation mit Hitze-inaktiviertem Schafserum, die durchgeführt wurde, um vor der Inkubation mit dem Antikörper gegen Digoxygenin unspezifische Bindungsstellen im Gewebe zu blockieren. Die Vibratomschnitte wurden anschließend über Nacht mit besagtem Antikörper inkubiert, am nächsten Tag mehrfach in TBST und NTMT (**N**aCl, **T**rispuffer, **M**gCl, **T**riton-X 100, siehe 2.1.1) gewaschen und über Nacht in die Färbelösung gegeben, die die Farbstoffe NBT (**N**itro**b**lauret**r**azoliumchlorid) und BCIP (5-**B**rom-4-**C**hlor-3-**I**ndo**y**l**p**hosphat) enthält. Die Farbreaktion verläuft über die an den anti-Digoxygenin-Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase, die aus BCIP durch Dephosphorylierung seine aktive Form freisetzt, die ihrerseits NBT reduziert, das daraufhin violett ausfällt. Zusammen bilden die beiden Farbstoffe überall dort im Gewebe ein schwerlösliches blau-violettes Präzipitat, wo die markierte RNA-Sonde zuvor ein komplementäres Stück mRNA gebunden hat.

Dann wurde zweimal kurz mit NTMT und über Nacht in PBST gewaschen, bevor die Schnitte am nächsten Tag mindestens eine Stunde in 4 % PFA mit 0,1 % Glutaraldehyd nachfixiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte in PBS pH 6,3 und PBS pH 6,3 mit 25 % Glycerin gewaschen und mit Aqua Polymount auf Objektträgern unter Deckgläschen eingebettet.

## 2.2) Material

### 2.2.1) Lösungen und Medien

Lösung	Zusammensetzung
BSA-Gelatine-Einbettmedium	450 ml PBS 2,2 g Gelatine bei 60°C lösen, auf Raumtemperatur abkühlen darin 70 g BSA lösen
Cacodylatpuffer 0,1 M, pH 7,4	2,14 g Dinatriumdimethylarsinat in 90 ml Aq. bidest. lösen, pH mit 1 M HCl einstellen Aqua bidestillata (Aq. bidest.) ad 100 ml
Carbodiimid-Lösung (CDI)	4 % in PB
Chemiblocker-Lösung (CB)	5 % Chemiblocker 0,5 % oder 1 % Triton X-100 0,05 % NaN <sub>3</sub> in PB
3,3'-Diaminobenzidin-Lösung (DAB)	0,05 % DAB in Tris-Puffer
DNS-Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylen Cyanol FF 30 % Glycerol in Aq. dest aliquotieren und bei -20°C lagern
dNTPs 5 mM	5 µl 100 mM dATP 5 µl 100 mM dCTP 5 µl 100 mM dGTP 5 µl 100 mM dTTP Aq. bidest. ad 100 µl
EDTA	0,5 M (146 g/l) mit NaOH einstellen auf pH 7,5
Ethidiumbromid-Stammlösung	0,5 % in Aq. bidest.
Ethidiumbromid-Gebrauchslösung (1 µg/ml)	80 µl Stammlösung Aq. bidest. ad 400 ml
Färbelösung für <i>in-situ</i> -Hybridisierung	2 ml NBT/BCIP-Stammlösung NTMT ad 100 ml
Glutaraldehyd-Lösung	10 µl Glutaraldehyd 25 % in H <sub>2</sub> O PBS ad 100 µl
Glyzin-Lösung 50 mM	187,5 mg Glyzin TBST ad 50 ml
Hanks-Medium, modifiziert	1,25 mM CaCl <sub>2</sub> (0,184 g/l) 0,81 mM MgCl <sub>2</sub> (0,077 g/l) 5,36 mM KCl (0,399 g/l) 10 mM HEPES 2,493 g/l) 136,89 mM NaCl (7,999 g/l) 10 mM D-Glucose (1,802 g/l) in Aq. bidest.
Homogenisierungspuffer	10 ml PBS 0,01 M 1 Proteaseinhibitortablette
humane Serumalbumin-Lösung (HSA)	2 % HSA in TBST

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Hybridisierungspuffer	15 ml Formamid ultrarein 6 ml Dextransulfatlösung 50 % 3 ml 10x Salzlösung 2,4 ml Aq. bidest. (DEPC) 0,6 ml 50x Denhardt's 0,6 g Boehringer blocking reagent
Inkubationslösung 3 % Tierserum für preembedding	3 % normales Ziegenserum 1 % Rinderserumalbumin 0,025 % bis 0,1 % Triton X-100 in PB
Kulturmedium für HEK 293T-Zellen	10 fötales Kälberserum (FCS) 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)
Lowicryl (HM20)	2,98 g Crosslinker D 17,02 g Monomer E 0,1 g Initiator C+
Lysepuffer	0,5 ml 5 M Natriumchloridlösung 0,25 ml 1 M Trizma-Lösung (pH 8,0) Aq. bidest. ad 25 ml
methanolische Essigsäure	10 % Eisessig in Methanol
Natriumazid-Stammlösung	2 % in Aq. bidest.
Natriumborhydrid-Lösung	0,1 % NaBH <sub>4</sub> in 50 mM Glyzin-Lösung
Natriumhydroxidlösung, ethanolisch	gesättigte Lösung von NaOH in 100 % Ethanol
NTMT	10 ml NaCl 5 M 50 ml 1 M Trispuffer pH 9,5 25 ml 1 M MgCl-Lösung 500 µl Triton-X 100 Aq. bidest. (DEPC) ad 500 ml
Osmiumtetroxid-Stammlösung	4 % in Cacodylatpuffer vor Gebrauch mit Cacodylatpuffer auf 0,5 % Endkonzentration verdünnen (1:8)
Paraformaldehyd-Lösung (PFA)	4 % in PB, im Wasserbad bei 65°C unter ständigem Rühren lösen und anschließend filtrieren
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	8,76 g NaCl 0,2 g KCl 50 ml PB 0,2 M Aq. bidest. ad 1000 ml
Phosphatpuffer 0,2 M (PB 0,2 M)	43,42 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O 5,24 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O Aq. bidest. ad 1000 ml
Phosphatpuffer 0,1 M pH 7,4 (PB 0,1 M)	50 % PB 0,2 M in Aq. bidest.
Pioloform	4 % Polyvinylformaldehyd in Chloroform

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Prähybridisierungspuffer	50 ml Formamid ultrarein 20 ml Dextransulfatlösung 50 % 10 ml 10x Salzlösung 2 g Boehringer blocking reagent Aq. bidest. (DEPC) ad 100 ml
Präinkubationslösung 10 % Tierserum für preembedding	10 % normales Ziegen Serum 1 % Rinderserumalbumin 0,025 % bis 0,1 % Triton X-100 in PB
Rinderserumalbumin(BSA)-Lösung für Western Blot	3 g BSA 1 ml NaN <sub>3</sub> -Stammlösung TBST ad 100 ml
Saccharose 10 %, 20 %, 30 %	10 %, 20 %, 30 % in PB
10x Salzlösung für <i>in-situ</i> -Hybridisierung	114 g NaCl 14,04 g Trizma HCl 1,34 g Trizma-Base 7,8 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 7,1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 ml 0,5 M EDTA Aq. bidest. (DEPC) ad 1000 ml autoklavieren!
SDS-Probenpuffer	10 ml Glycerol 3,03 g Trizma-Base 2 g SDS 100 µl 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) 10 mg Bromphenolblau mit HCl auf pH 8,5 einstellen 30 mg DTT (1,4-Dithiothreitol) pro ml Puffer hinzufügen
20x SSC (Saline Sodium Citrate)	3 M NaCl (175,32 g/l) 0,3 M Natriumcitrat (78,63 g/l) in Aq. bidest. (DEPC) mit HCl auf pH 4,5 einstellen
1x SSC	5 ml 20x SSC 50 ml Formamid 100 µl Triton-X 100 Aq. bidest. (DEPC) ad 100 ml
0,2x SSC	1 ml 20x SSC 50 ml Formamid 100 µl Triton-X 100 Aq. bidest. Ad 100 ml
10x Trizma-Borsäure-EDTA(TBE)-Puffer für die Gelelektrophorese	108 g Trizma-Base 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 Aq. bidest. ad 1000 ml vor Gebrauch 1:20 verdünnen
Trisgepufferte Salzlösung (TBS)	100 ml Tris-Puffer 0,05 M pH 7,4 17,53 g NaCl Aq. bidest. ad 1000 ml

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Trisgepufferte Salzlösung mit Tween (TBST)	100 ml Tris-Puffer 0,05 M pH 7,4 17,53 g NaCl 1 ml Tween 20 Aq. bidest. ad 1000 ml
Tris-Puffer, 0,05 M, pH 7,4	12,114 g Trizma Base in 900 ml Aq. bidest. lösen und pH mit 37 % HCl einstellen Aq. bidest. ad 1000 ml
Tris-Puffer, 1 M, pH 9,5	24,23 g Trizma Base in 90 ml Aq. bidest. (DEPC) lösen, mit HCl auf pH 9,5 einstellen Aq. bidest. (DEPC) ad 100 ml
Triton X-100-Stammlösung	5 % in PB oder PBS
Uranylacetat-Lösung pH 5,2	1,5 % Uranylacetat in Aq. bidest. pH mit Natriumacetat einstellen

### 2.2.2) Chemikalien und Reagenzien

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
ABC-Kit Vectastain	Vector
Agar	Sigma
Agarose	Boehringer Mannheim
Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragmente	Boehringer Mannheim
Aqua bidestillata (Aq. bidest.)	bidestilliertes, entionisiertes und gefiltertes Wasser
Aq. bidest. mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)	1 ml DEPC/1000 ml Aq. bidest. autoklavieren!
Bleicitrat (Ultrastain 2)	Leica
Boehringer blocking reagent	Boehringer Mannheim (1 096 176)
Borax (Dinatriumtetraborat)	Merck
Borsäure	Sigma
bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V	Merck
Bromphenolblau	Roth
Cacodylat (Dinatriumdimethylarsinat)	Merck
Carbodiimid	Sigma
Chemiblocker	Chemicon
Chemolumineszenz-Kit für Western Blot	Amersham Biosciences
50x Denhardt's	Sigma
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP)	Invitrogen
Dextransulfat	Sigma (D8906)
Diaminobenzidin	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Boehringer Mannheim
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Invitrogen
Essigsäure 100 %	Roth
Ethanol	J. T. Baker
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Ethidiumbromid	Sigma
Formamid	Boehringer Mannheim (1 814 320)
Formamid, ultrarein	Sigma (F5786)
Fotofilme Kodak® BioMax MR	Sigma Aldrich
G7-Puffer für PNGase F	New England Biolabs
Gelatine	Sigma-Aldrich
Glutaraldehyd 25 %	Sigma-Aldrich
Glycerol	Merck
Glyzin	Sigma
Gold(III)-Chlorid-Chlorwasserstoffsäure	Merck
Hefe-RNA	Boehringer Mannheim (109 223)
Hexamethylentetramin	Merck
humanes Serumalbumin	Sigma
Isofluran	Curamed Pharma
Kaliumchlorid	Sigma
Kontrastiergerät (EM STAIN)	Leica
Lowicryl (HM20)	Polysciences
Magermilchpulver	BIO-RAD
Magnesiumchlorid (PCR)	Invitrogen
Methanol	J. T. Baker
Natriumborhydrid	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdocecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	Riedel-de Haen
Natriumthiosulfat	Merck
NBT/BCIP-Stammlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid/5-Brom-4-Chlor—3-indoylphosphat, Toluidinsalz)	Boehringer Mannheim (1 681 451)
Normales Ziegenserum	Sigma
NP40-Puffer für PNGase F	New England Biolabs
Opti-Medium	Invitrogen

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Osmiumtetroxid	Roth
Paraformaldehyd	Merck
Pioloform (Polyvinylformaldehyd)	Plano
PNGase F	New England Biolabs
Polyacrylamidgele für Western Blot NuPAGE 3-8 %	Invitrogen
Ponceau S Solution	Sigma
Propylenoxid	Merck
Proteaseinhibitorenmischung	Roche
Proteinase K	Sigma
Proteinstandard HiMark™	Invitrogen
PVDF-Membranen für Western Blot WESTRAN®	Schleicher&Schuell
RNase-Inhibitor	Boehringer (799 017)
Saccharose D(+)	Roth
Salzsäure 1 N	Roth
Salzsäure 37 %	Merck
Schwenkschüttler Duomax 1030	Heidolph
Serumalbumin (human)	Merck
Serumalbumin (bovin)	Merck
Silbernitrat	Merck
Smart Ladder	Eurogentec
T7 RNA Polymerase	Boehringer
Taq-DNA Polymerase	Invitrogen
Trichloressigsäure	Merck
Trishydroxymethylaminomethan (Base)	Sigma
Trishydroxymethylaminomethan (HCl)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Merck-Schuchard
Uranylacetat	Agar Scientific
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck

### 2.2.3) Geräte und Hilfsmittel

<b>Gerät bzw. Hilfsmittel</b>	<b>Hersteller</b>
Adobe Photoshop CS	Adobe Systems
Aqua Polymount	Polysciences Europe



<b>Gerät bzw. Hilfsmittel</b>	<b>Hersteller</b>
Axiophot (Photomikroskop)	Zeiss
Axioplan 2 (Photomikroskop)	Zeiss
Axiovision 4.2	Carl Zeiss Vision
Axiovision LE	Carl Zeiss Vision
Binokular OpMi-1	Zeiss
Blotkammer Trans-Blot Cell	BIO-RAD
Brutschrank Hera cell	Heraeus
Corel Draw 10.0	Corel Corporation
Deckgläser 12x12 mm rund	Superior
Deckgläser 24x24 mm	Roth
Deckgläser 24x40 mm	Corning
Deckgläser 24x50	Menzel-Gläser
DNA-Photometer ND1000	Nano Drop Technologies
Eagle Eye Geldokumentationssystem	Stratagene
Einbettmedium für Gefrierschnitte (TFM, [engl.]: <i>tissue freezing medium</i> )	Reichert-Jung
Entwicklermaschine Curix60	AGFA
Farbdrucker Tektronix	Xeron
Filter 0,8 µm, black, AABP, 25 mm	Millipore
Gelelektrophoresekammer Novex Mini-Cell für Western Blot	Invitrogen
Gelelektrophoresekammer für PCR	C.B.S. Scientific Company
Gewebekleber Histoacryl	Braun Aesculap
Kryokammer EM AFS	Leica
Kryostat CM3050 S	Leica
Laser-Scan-Mikroskop (LSM 5 Pascal)	Zeiss
Objektträger	Menzel-Gläser
Microsoft Office XP	Microsoft
Mikrotom Ultracut S	Reichert-Jung
Multiwellplatten	Nunc
Objektträger	Menzel-Gläser
Pap-Pen	SCI Science Service
PCR-Kit	Qiagen
PCR-Primer	Invitrogen
Photometer LC55	Perkin Elmer
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Sauerstoff	Messer

<b>Gerät bzw. Hilfsmittel</b>	<b>Hersteller</b>
Stickstoff (flüssig)	Messer
Scanner PowerLook	Umax
Thermocycler PTC-225 DNA Engine Tetrad Cycler	MJ Research
Thermoschüttler	Eppendorf
Vibratom VT 1000S	Leica
Waage CP 124S	Sartorius
Wärmeschrank U25	Memmert
Wasseraufreinigungsanlage Elix 5 mit 60 l Tank und MilliQ Academic	Millipore
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge 5417R	Eppendorf

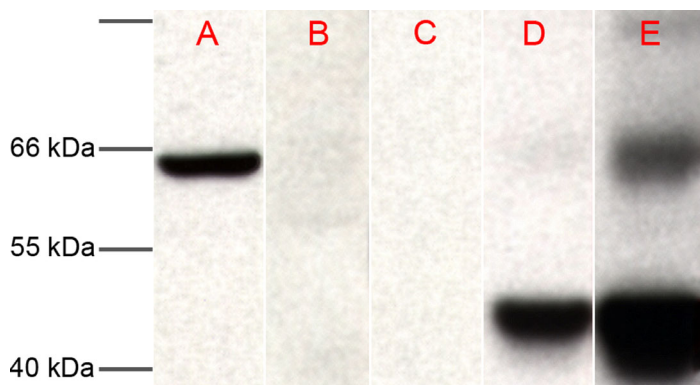
### 3) Ergebnisse

#### 3.1) Glyzinrezeptoruntereinheit $\alpha 4$ (GlyR $\alpha 4$ )

Von den vier auf DNA-Ebene kodierten GlyR $\alpha$ -Untereinheiten sind bisher GlyR $\alpha 1$  bis GlyR $\alpha 3$  auf Proteinebene beschrieben. Dieses Kapitel befaßt sich mit der Charakterisierung der GlyR $\alpha 4$ -Untereinheit in der Mausretina. Dazu wurde ein polyklonaler Antikörper eingesetzt, der im Kaninchen hergestellt wurde. Er ist gegen die 14 C-terminalen Aminosäuren der murinen GlyR $\alpha 4$ -Untereinheit mit einem zusätzlichen terminalen Cysteinrest (CVYKVLRSEDIHQAL) gerichtet (pAb GlyR $\alpha 4$ ).

##### 3.1.1) Westernblotanalyse

Der zu charakterisierende Antikörper wurde zunächst im Westernblot untersucht, wo er eine einzelne saubere Bande bei etwa 60 kDa anfärbte, deren Auftreten sich sowohl durch Weglassen des Erstantikörpers als auch durch Blocken der Inkubationslösung mit dem Kontrollpeptid<sup>4</sup> unterbinden ließ. Diese Bande wurde außerdem von einem monoklonalen Antikörper gegen alle GlyR $\alpha$ -Untereinheiten (mAb4a) erkannt (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1: Westernblotanalyse für GlyR $\alpha 4$  aus der Gesamtproteinfraktion des Retinahomogenats:**

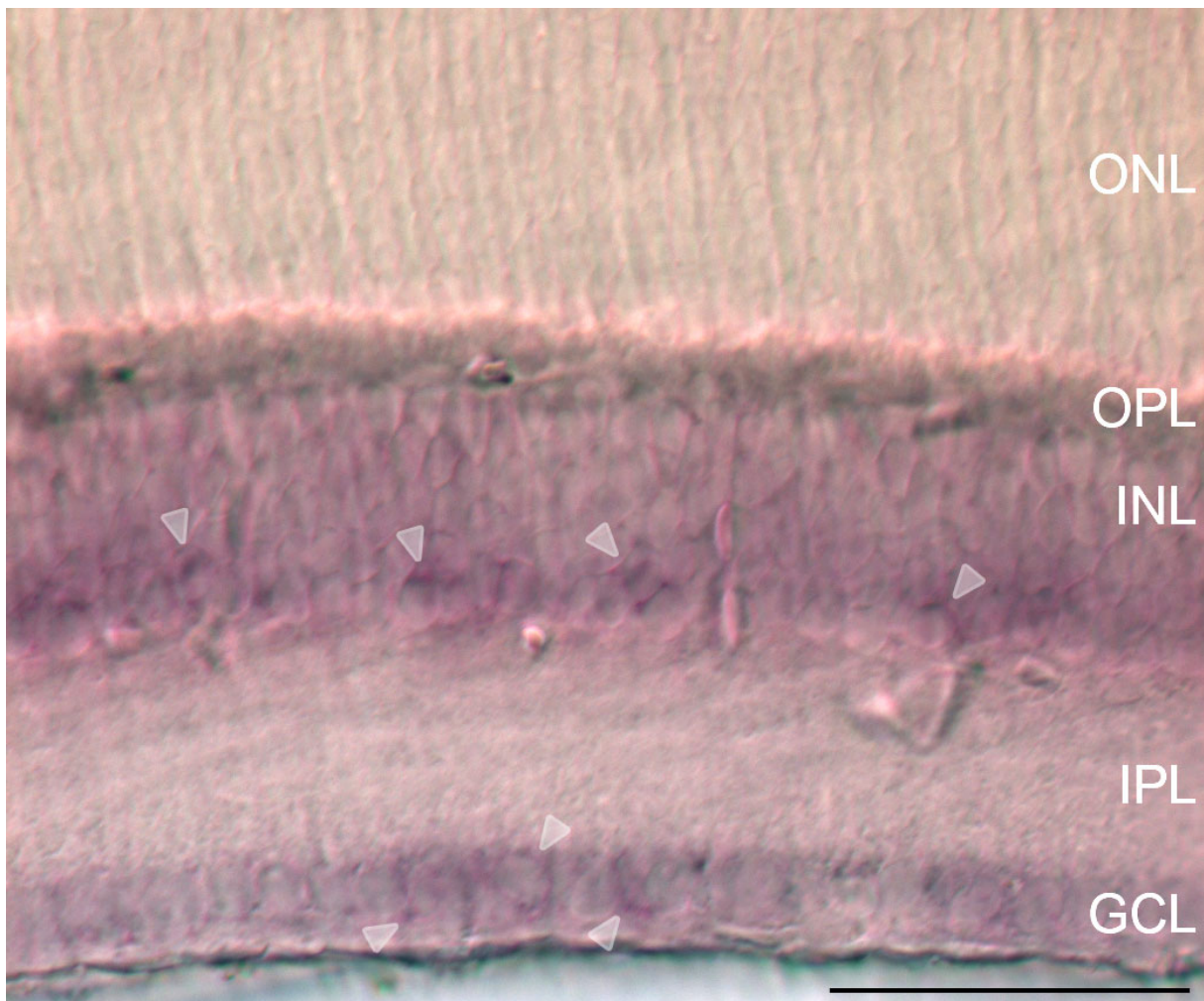
**A.:** inkubiert mit pAb GlyR $\alpha 4$ ;  
**B:** Negativkontrolle ohne Erstantikörper;  
**C:** Negativkontrolle mittels Peptidblock;  
**D:** inkubiert mit mAb4a;  
**E:** Streifen D bei längerer Belichtung, es tritt eine zweite Bande hervor, die auf gleicher Höhe mit der von pAb GlyR $\alpha 4$  erkannten Bande läuft

Es stellt sich die Frage, warum hier ein Molekulargewicht von etwa 60 kDa gefunden wurde, obwohl eines von 52,5 kDa zu erwarten gewesen wäre. Die bei Membranproteinen naheliegende Vermutung einer möglichen Glykosylierung wurde mit Hilfe der Endoglykosidase PNGase F untersucht, die spezifisch N-glykosidische Bindungen zu lösen vermag. Im Falle des hier untersuchten GlyR $\alpha 4$  scheint eine solche N-Glykosylierung unter den gegebenen Versuchsbedingungen allerdings nicht vorzuliegen (ohne Abbildung). Andere mögliche Ursachen für das (vermeintlich) zu hohe Molekulargewicht bleiben zu diskutieren.

<sup>4</sup>jenes Peptid, gegen das der Antikörper generiert wurde

### 3.1.2) *In-situ*-Hybridisierung

In einer früheren Untersuchung (Harvey et al. 2000) konnte mittels *in-situ*-Hybridisierung keine für GlyR $\alpha$ 4 kodierende mRNA detektiert werden, so daß der hier erhobene positive Befund auf Proteinebene überraschend war. Um diesen Widerspruch zu klären, wurden erneut *in-situ*-Hybridisierungen durchgeführt, die dieses Mal erfolgreich verliefen. Sowohl in der inneren INL als auch in der GCL konnten Signale für die entsprechenden RNA detektiert werden (Pfeilspitzen in Abbildung 3.2).

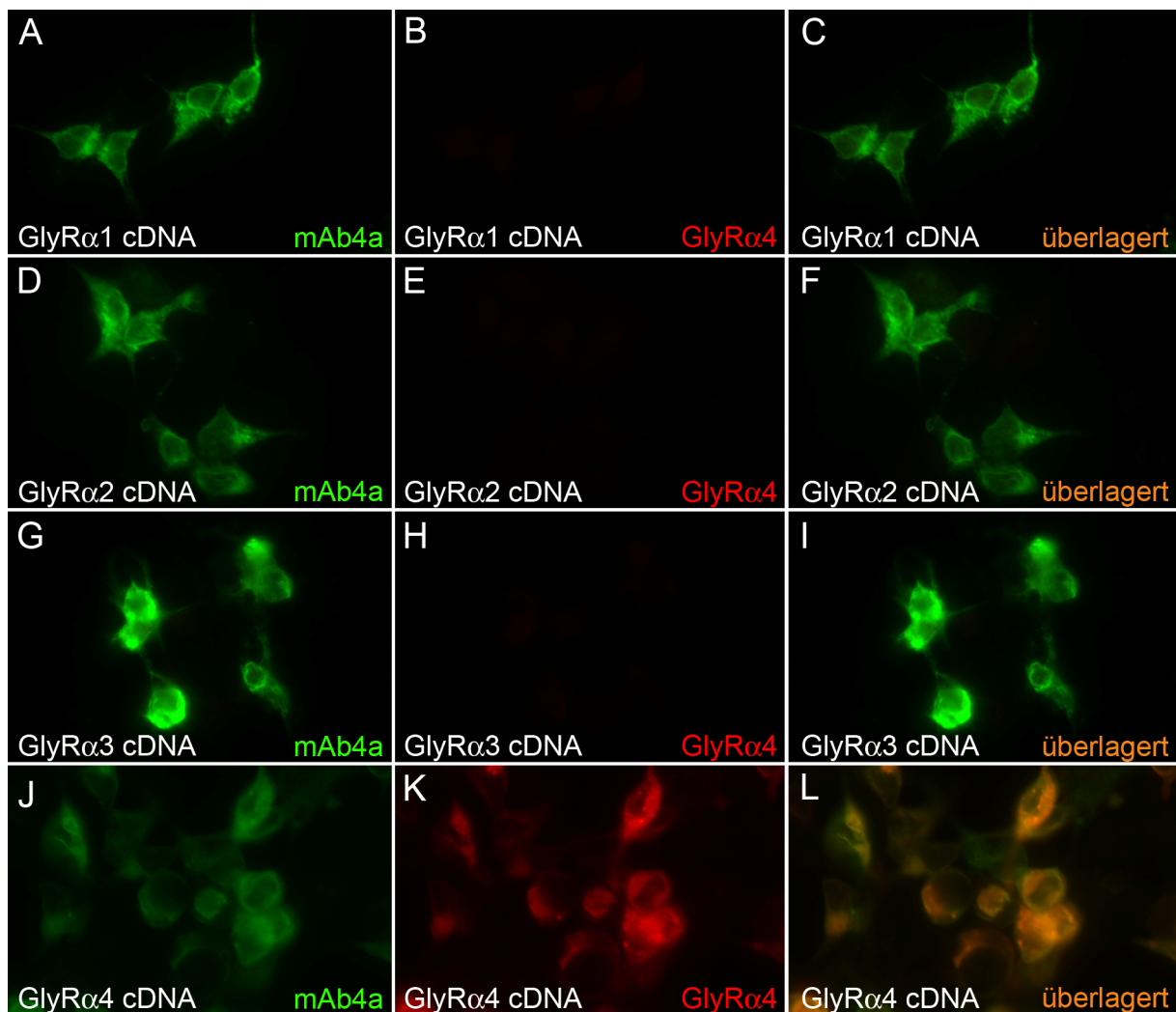


**Abbildung 3.2: *in-situ*-Hybridisierung am Vertikalschnitt durch die adulte Mausretina**

Das violette Präzipitat zeigt die mRNA für GlyR $\alpha$ 4 an, ein positives Signal findet sich in der GCL und im unteren Bereich der INL, wo sich die Zellkörper der Amakrinzellen befinden; einige der Zellkörper, in denen die mRNA für GlyR $\alpha$ 4 detektiert werden konnte, sind durch weiße Pfeilspitzen markiert; Balkenlänge 50  $\mu$ m

### 3.1.3) Transfektion von HEK293-Zellen

Um abzuklären, ob der Antikörper gegen GlyR $\alpha$ 4 mit den Epitopen der anderen GlyR $\alpha$ -Untereinheiten kreuzreagiert, wurden HEK293-Zellen mit den cDNAs für GlyR $\alpha$ 1 bis GlyR $\alpha$ 4 transfiziert und danach mit pAb GlyR $\alpha$ 4 reagiert. Als Positivkontrolle diente wiederum mAb4a. Er markierte alle HEK-Zellen, unabhängig davon, mit welcher der 4 Untereinheiten sie transfiziert waren (Abbildung 3.3 A, D, G, J). Im Unterschied dazu markierte der hier zu charakterisierende Antikörper ausschließlich die mit *Gla*4 transfizierten Zellen (Abbildung 3.3 K). Diese Ergebnisse zeigen, daß pAb GlyR $\alpha$ 4 nicht mit den anderen GlyR $\alpha$ -Untereinheiten kreuzreagiert, sondern spezifisch GlyR $\alpha$ 4 erkennt.

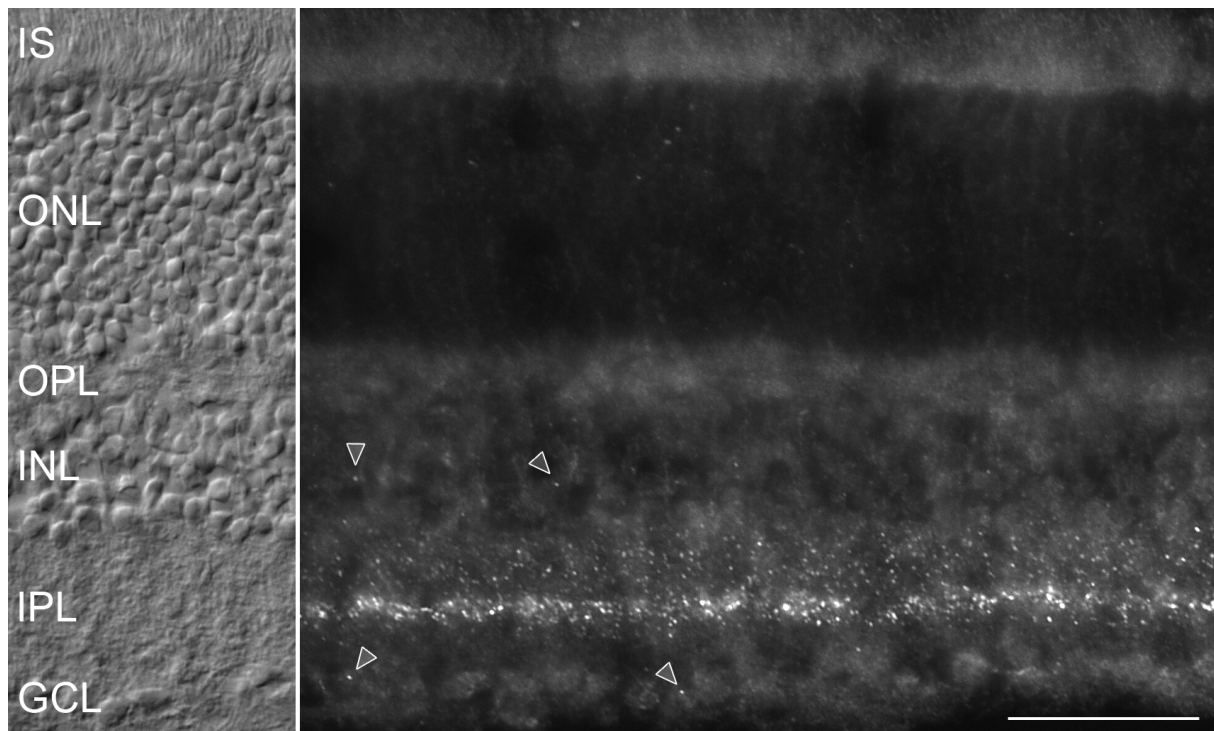


**Abbildung 3.3:** HEK293-Zellen transfiziert mit *Glra*1-4, angefärbt mit mAb4a und pAb GlyR $\alpha$ 4

**A, B, C:** mit *Glra*1 transfizierte Zellen, Antikörperreaktion mit mAb4a in grün (**A**) gegen GlyR $\alpha$ 4 in rot (**B**) bzw. beide Kanäle überlagert (**C**); **D, E, F:** mit *Glra*2 transfizierte Zellen, Antikörperreaktion mit mAb4a in grün (**D**) gegen GlyR $\alpha$ 4 in rot (**E**) bzw. beide Kanäle überlagert (**F**); **G, H, I:** mit *Glra*3 transfizierte Zellen, Antikörperreaktion mit mAb4a in grün (**G**) gegen GlyR $\alpha$ 4 in rot (**H**) bzw. beide Kanäle überlagert (**I**); **J, K, L:** mit *Glra*4 transfizierte Zellen, Antikörperreaktion mit mAb4a in grün (**J**) gegen GlyR $\alpha$ 4 in rot (**K**) bzw. beide Kanäle überlagert (**L**)

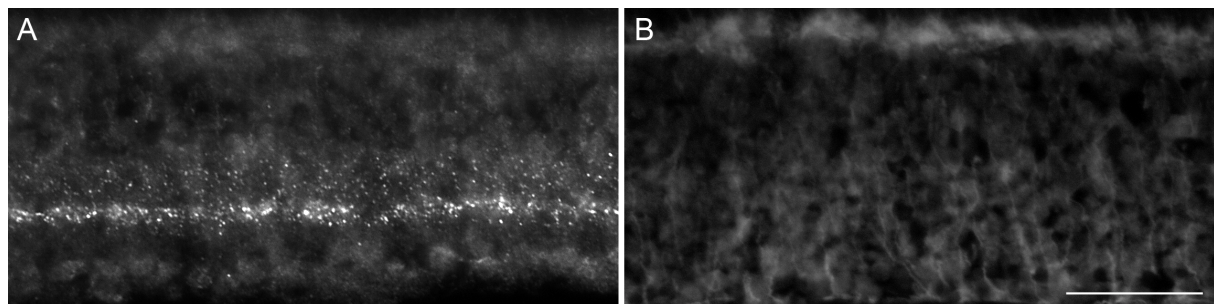
### 3.1.3) Lokalisation von GlyR $\alpha$ 4 in der Mausretina

GlyR $\alpha$ 4 zeigte im Vertikalschnitt durch die Retina eine punktförmige Färbung in einem spezifischen und hauptsächlich auf die IPL beschränkten Verteilungsmuster (Abbildung 3.4). Die Punkte werden, der allgemein anerkannten Interpretation folgend (Brandstätter et al. 1998, Wässle et al. 1998), als synaptische Anhäufung von GlyR $\alpha$ 4 betrachtet. Die Antikörperfärbung ließ sich – wie im Westernblot - durch Blocken mit dem Kontrollpeptid komplett unterdrücken, was beweist, daß pAb GlyR $\alpha$ 4 auch direkt im Gewebe spezifisch das gewünschte Eptitop erkennt (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.4: Fluoreszenzaufnahme von GlyR $\alpha$ 4 im Vertikalschnitt durch die Mausretina**

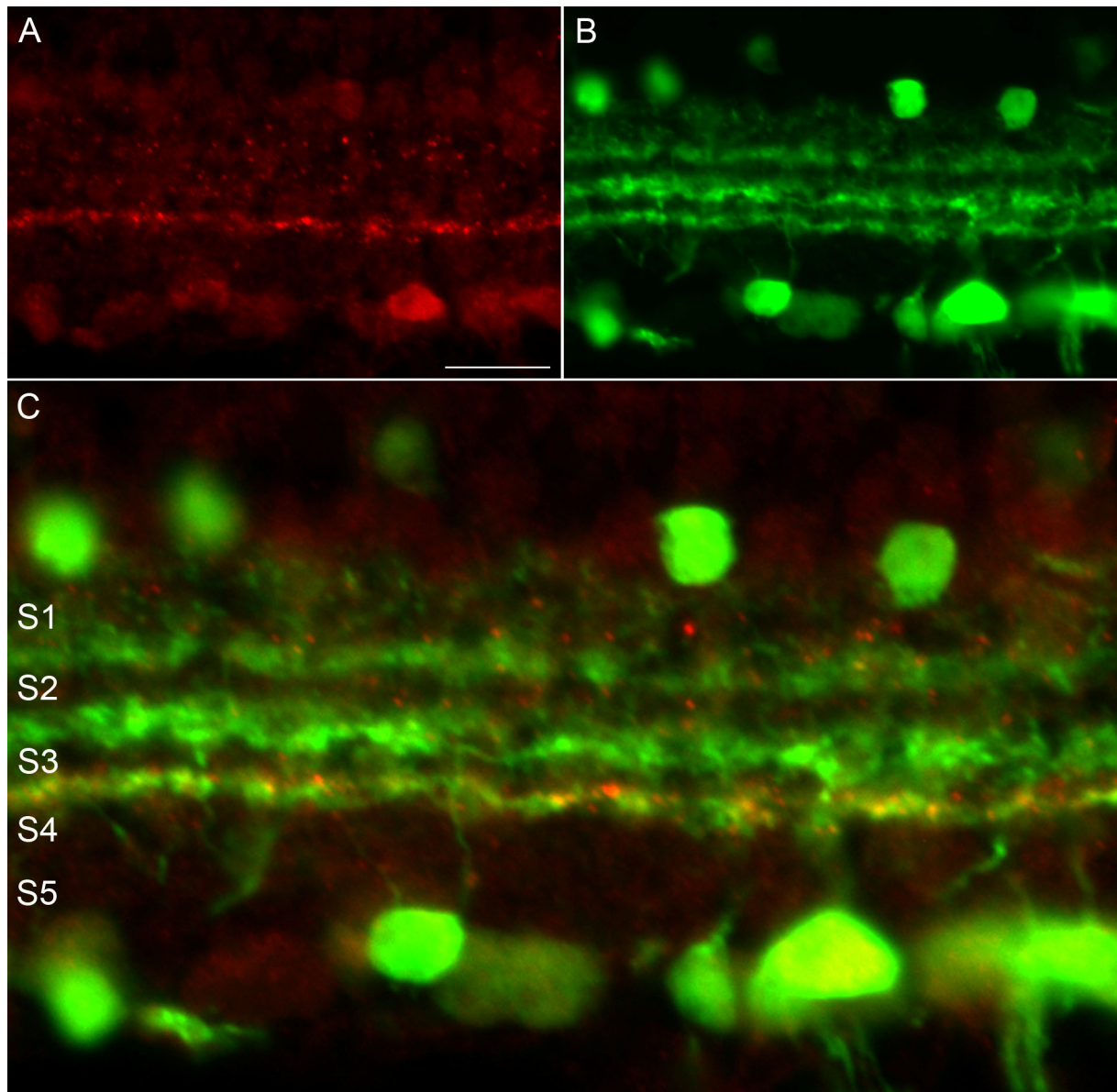
**A:** Gewebestruktur gezeigt anhand einer Aufnahme mit Normarski-Optik; **B:** immunzytochemische Markierung von GlyR $\alpha$ 4, sie offenbart eine punktförmige Färbung mit spezifischem Verteilungsmuster innerhalb der IPL, einzelne Punkte sind jedoch auch auf Zellkörpern innerhalb der INL und der GCL zu beobachten (Pfeile); Balkenlänge 50  $\mu$ m



**Abbildung 3.5: GlyR $\alpha$ 4 mit Peptidblock**

**A:** immunzytochemische Färbung gegen GlyR $\alpha$ 4; **B:** immunzytochemische Färbung gegen GlyR $\alpha$ 4 mit Peptidblock, wobei die Färbung vollkommen unterdrückt wird; Balkenlänge 50  $\mu$ m

Die IPL wird in 5 Schichten gleicher Dicke (S1-S5) unterteilt, die sich aus der Lage der Calretinin-Banden ergeben (Abbildung 3.6). GlyR $\alpha$ 4 ist hauptsächlich von S1 bis S3/S4 lokalisiert, wobei sich das Band der höchsten Punktedichte an der Grenze von S3 zu S4 findet. In der unteren IPL ist kaum Färbung zu sehen, einzelne Punkte wurden aber auch auf Zellkörpern in der Ganglienzellschicht und der inneren Körnerschicht (vermutlich Amakrinzellkörper) gefunden (Pfeile in Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.6: Fluoreszenzaufnahme von GlyR $\alpha$ 4 (rot) mit Calretinin (grün) im Vertikalschnitt**  
**A:** immunzytochemische Färbung gegen GlyR $\alpha$ 4 (rot); **B:** immunzytochemische Färbung gegen Calretinin (grün); **C:** GlyR $\alpha$ 4 (rot) mit Calretinin (grün) in vergrößerter Darstellung; GlyR $\alpha$ 4-Punkte finden sich den Strata S1 bis S3/4 der IPL, das Band der höchsten Punktedichte liegt an der Grenze zwischen S3 und S4, wo es mit dem unteren Calretininband kolokalisiert; Balkenlänge 50  $\mu$ m

### 3.1.4) Synaptische Lokalisation von GlyR $\alpha$ 4

Um zu prüfen, ob die GlyR $\alpha$ 4-Punkte synaptisch lokalisiert sind, wurden Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen Gephyrin als postsynaptischen und Bassoon als präsynaptischen Marker sowie mit Antikörpern gegen die GlyR-Untereinheiten GlyR $\alpha$ 1, GlyR $\alpha$ 2 und GlyR $\alpha$ 3 durchgeführt, deren synaptische Lokalisation bereits in früheren Arbeiten belegt wurde (Sassoé-Pognetto et al. 1994, Haverkamp 2003, 2004).

#### 3.1.4.1) Kolokalisation von GlyR $\alpha$ 4 mit Bassoon und Gephyrin

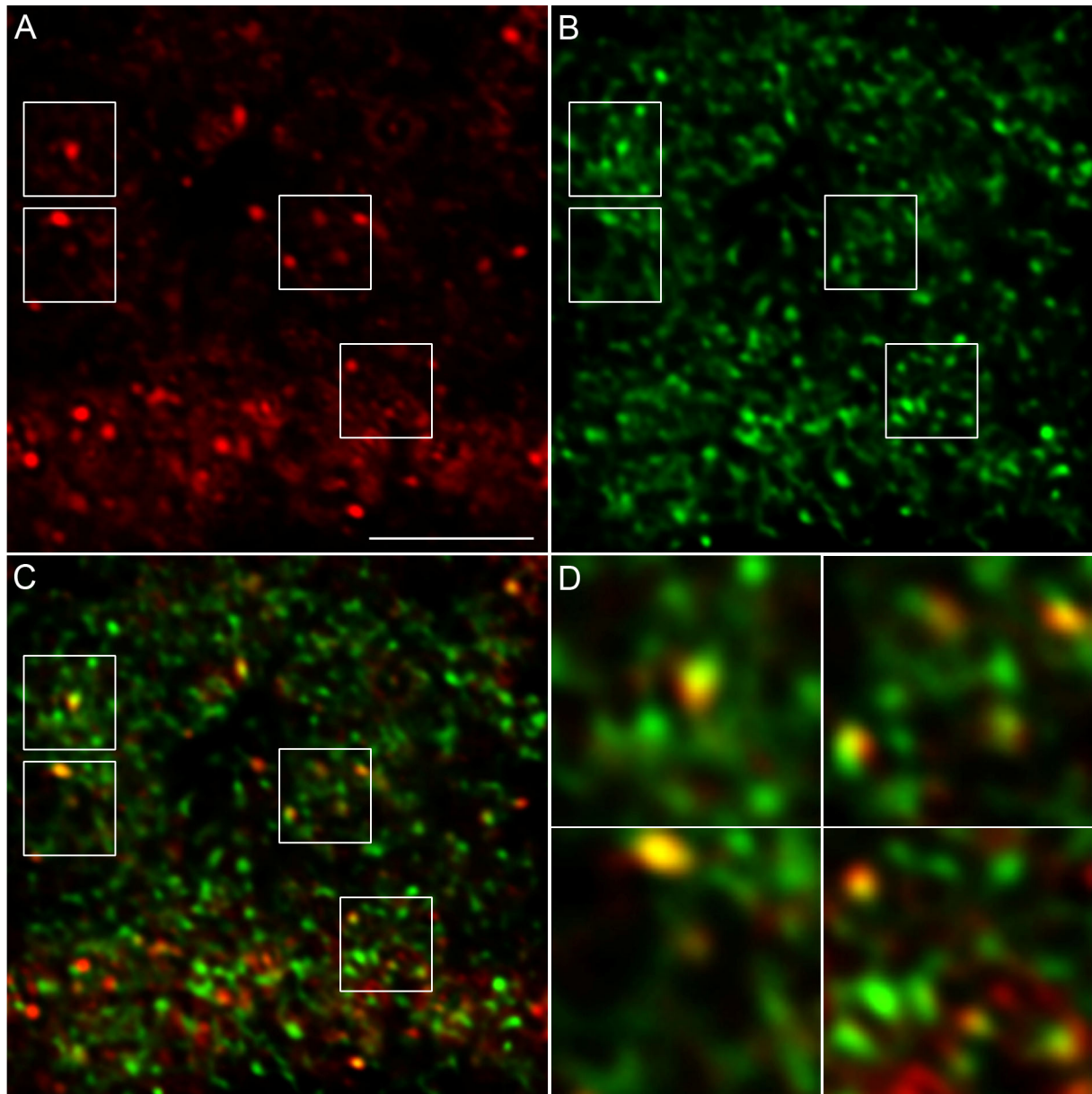
Gephyrin verankert über spezielle, in den  $\beta$ -Untereinheiten des Glyzinrezeptors befindliche Bindungsstellen, den Glyzinrezeptorkomplex am Zytoskelett (Kirsch und Betz 1995). Es wurde aus diesem Grunde als postsynaptischer Marker herangezogen um die synaptische Lokalisation von GlyR $\alpha$ 4 zu zeigen (Abbildung 3.7). GlyR $\alpha$ 4 war zu durchschnittlich 43,7 % mit Gephyrin kolokalisiert. Dieser Wert war hochsignifikant ( $p < 10^{-7}$ ) verschieden von der durch zufällige Überlagerung der Kanäle erhaltenen Koinzidenzrate. Ähnlich verhielt es sich bei Bassoon, einem präsynaptischen Zytomatrixprotein (tom Dieck et al. 1998, Brandstätter et al. 1999), mit dem GlyR $\alpha$ 4 zu durchschnittlich 50,6 % kolokalisiert vorlag. Aufgrund der hohen Punktedichte von Bassoon in der IPL und dem sehr diffusen Färbefeld ergab sich auch für die Negativkontrolle eine beträchtliche Koinzidenzrate von über 25 %, dennoch bestand ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ). Diese Ergebnisse deuten auf eine synaptische Lokalisation von GlyR $\alpha$ 4 hin und sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt.

	GlyR $\alpha$ 4		GlyR $\alpha$ 4	
	mit Bassoon	Kontrolle	mit Gephyrin	Kontrolle
<b>Kolokalisation (%)</b>	<b>50,6</b>	25,5	<b>43,7</b>	15,9
$\sigma$	8,4	10	4,7	5,4
<b>n</b>	5		8	
<b>p</b>	<b>0,006</b>		<b>5,67 x 10<sup>-8</sup></b>	

**Tabelle 3.1: Kolokalisation von GlyR $\alpha$ 4 mit Bassoon und Gephyrin**

$\sigma$ : Standardabweichung; **n**: Anzahl der Stichproben; **p**: Signifikanzgrad erhalten aus einem t-Test nach Student



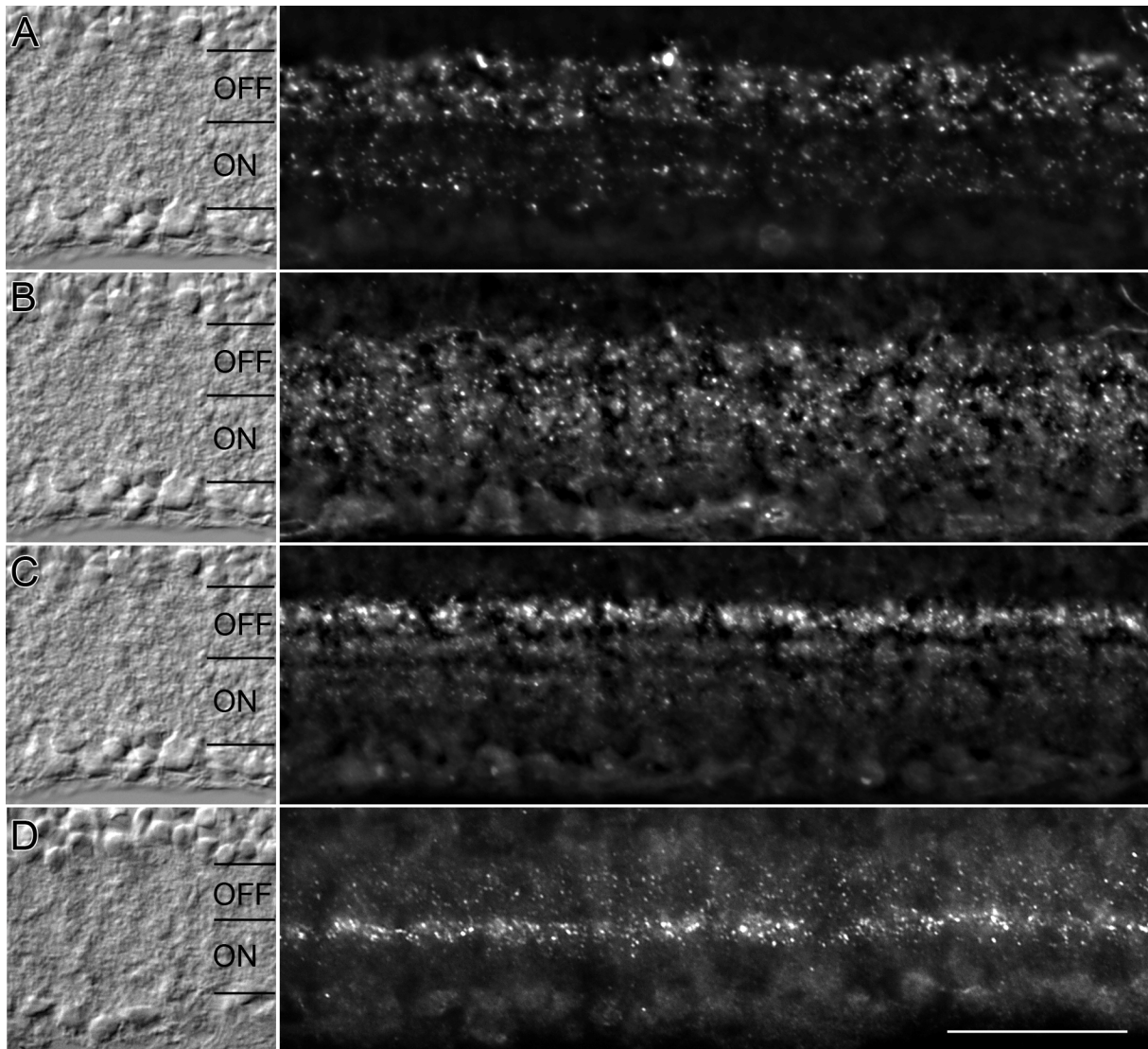


**Abbildung 3.7: GlyR $\alpha$ 4 (rot) mit Gephyrin (grün)**

**A:** immunzytochemische Färbung gegen GlyR $\alpha$ 4 (im roten Kanal); **B:** immunzytochemische Färbung gegen Gephyrin (im grünen Kanal); **C:** Überlagerung beider Kanäle, aus der deutlich wird, daß viele der GlyR $\alpha$ 4-Punkte mit Gephyrin kolokalisiert sind, einige Beispiele dafür sind in D vergrößert dargestellt; **D:** umrahmte Details aus C vergrößert dargestellt; Balkenlänge 20  $\mu$ m

### 3.1.4.2) Kolokalisation von GlyR $\alpha$ 4 mit GlyR $\alpha$ 1, GlyR $\alpha$ 2 und GlyR $\alpha$ 3

Außerdem wurde untersucht, ob GlyR $\alpha$ 4 mit den anderen GlyR $\alpha$ -Untereinheiten an gemeinsamen Synapsen vorkommt. Bereits die deutlich verschiedenen Verteilungsmuster der GlyR $\alpha$ -Untereinheiten innerhalb der IPL sprechen dagegen (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8: die unterschiedlichen Verteilungsmuster der 4 GlyR $\alpha$ -Untereinheiten in der IPL**

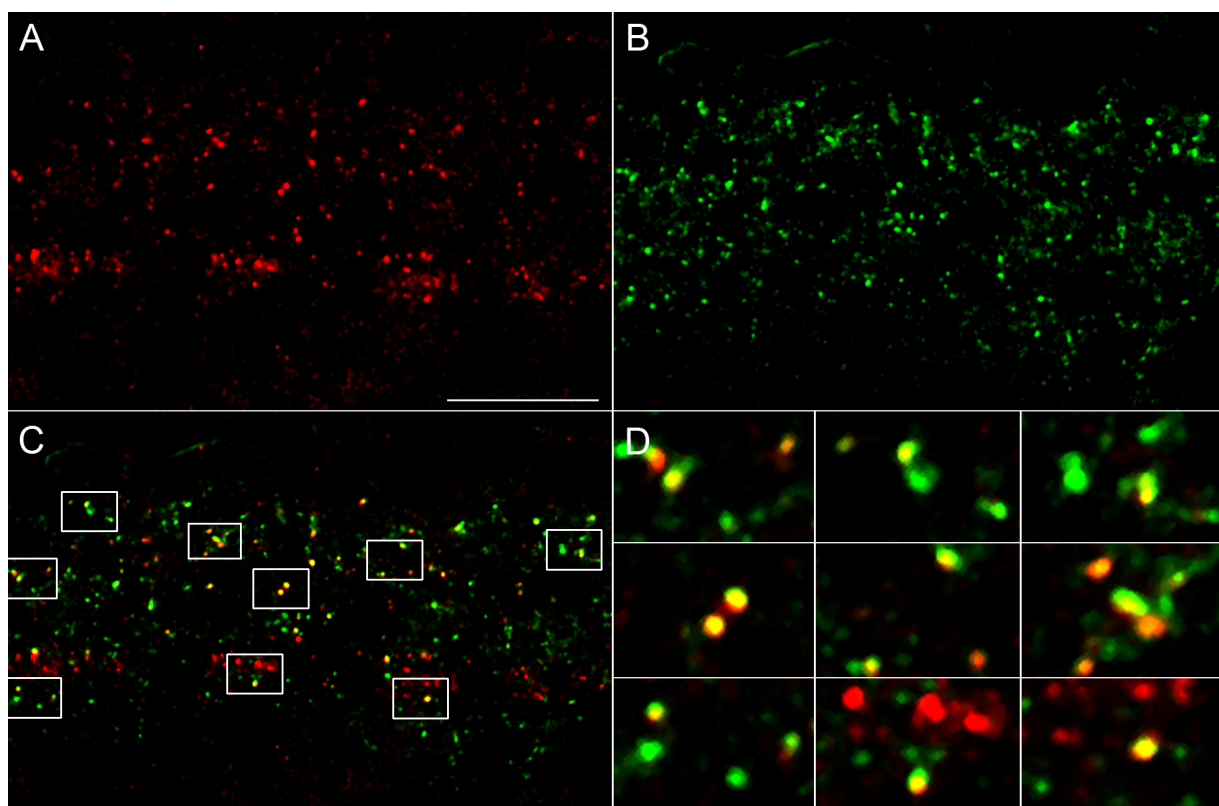
**A:** immunzytochemische Färbung gegen GlyR $\alpha$ 1, es findet sich eine hohe Punktedichte in der OFF-Sublamina der IPL, dagegen sind nur wenige Punkte in der ON-Sublamina zu sehen; **B:** die immunzytochemische Färbung gegen GlyR $\alpha$ 2 zeigt eine gleichmäßige Punkteverteilung über die gesamte IPL mit Ausnahme von S5; **C:** immunzytochemische Färbung gegen GlyR $\alpha$ 3 mit den charakteristischen 4 Bändern von OFF nach ON abnehmender Punktedichte; **D:** immunzytochemische Färbung gegen GlyR $\alpha$ 4 mit der höchsten Dichte an der Grenze von S3 zu S4 und fast völlig ohne Signal in S5; die Verteilungsmuster unterscheiden sich deutlich voneinander und deuten an, daß die verschiedenen GlyR-Untereinheiten bevorzugt an unterschiedlichen Synapsen vorkommen; alle Vertikalschnitte sind mit Normarski-Optik gezeigt (jeweils am linken Bildrand); Balkenlänge 50  $\mu$ m

So zeigte sich eine signifikante Kolo-kalisationrate (31,5 %) auch lediglich für GlyR $\alpha$ 4 und GlyR $\alpha$ 2 (Abbildung 3.9). Bei GlyR $\alpha$ 1 und GlyR $\alpha$ 3 waren die Unterschiede in der Verteilung der Rezeptorcluster bereits im mikroskopischen Bild so offensichtlich, daß die Quantifizierung dieses Befundes lediglich an 3 Stichproben erfolgte. Die Zusammenfassung der Daten hierzu findet sich in Tabelle 3.2.

	GlyRa4		GlyRa4		GlyRa4	
	mit GlyRa1	Kontrolle	mit GlyRa2	Kontrolle	mit GlyRa3	Kontrolle
Kolokalisation (%)	7,8	6,9	<b>31,5</b>	6	5,8	5,1
$\sigma$	4,6	3,5	7,9	1,8	2,7	1,9
n	3		12		3	
p	0,77		<b><math>1,5 \times 10^{-6}</math></b>		0,57	

**Tabelle 3.2: Kolokalisation von GlyRa4 mit GlyRa1, GlyRa2 und GlyRa3**

$\sigma$ : Standardabweichung; n: Anzahl der Stichproben; p: Signifikanzgrad aus t-Test nach Student



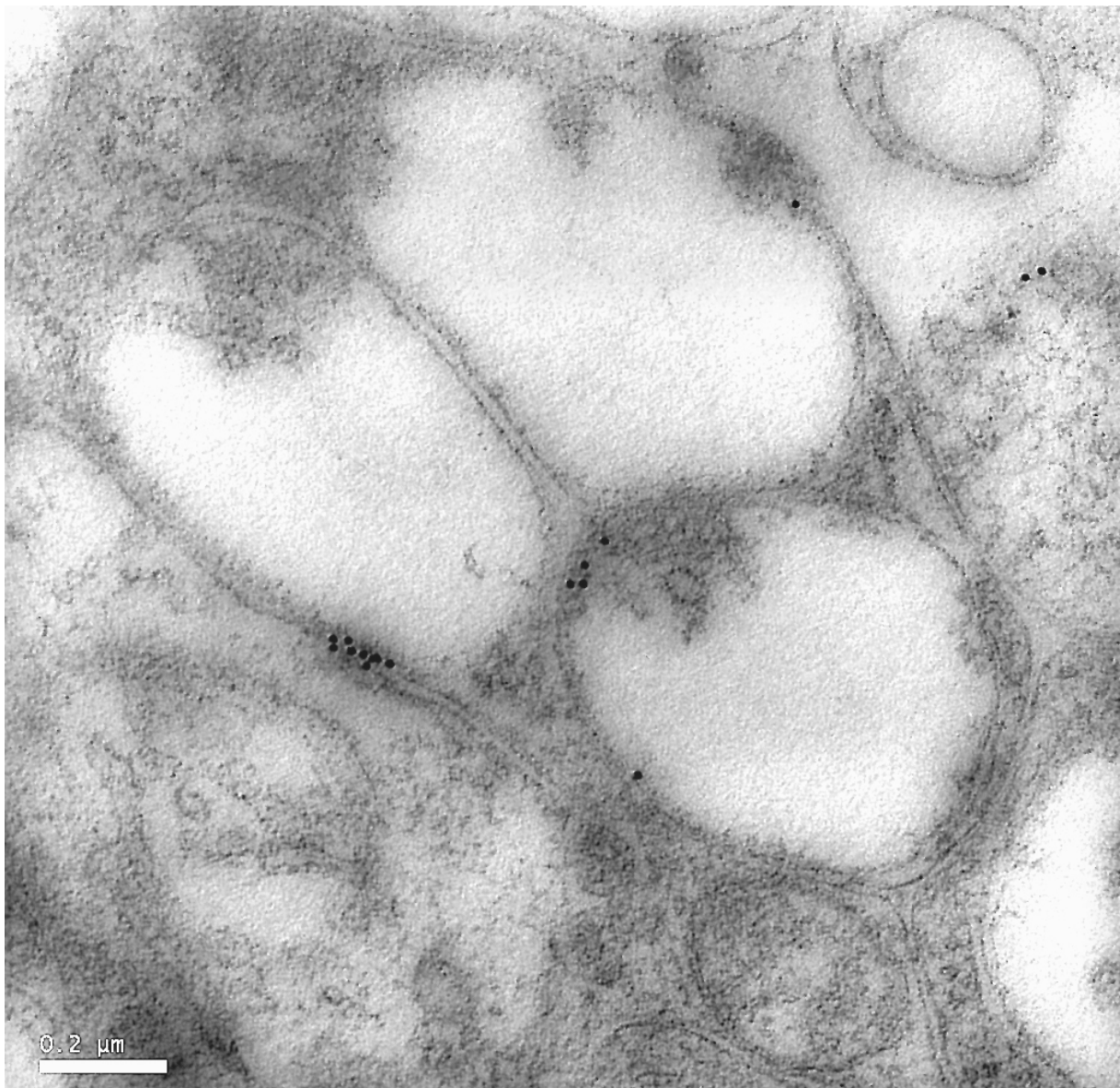
**Abbildung 3.9: Kolokalisation von GlyRa4 (rot) mit GlyRa2 (grün)**

**A:** immunzytochemische Färbung gegen GlyRa4 (rot); **B:** immunzytochemische Färbung gegen GlyRa2 (grün); **C:** die Überlagerung beider Kanäle zeigt, daß viele der GlyRa4-Punkte mit GlyRa2 kolokalisiert sind, einige Beispiele dafür sind in D vergrößert dargestellt; **D:** umrahmte Details aus C vergrößert dargestellt; Balkenlänge 30  $\mu\text{m}$

### 3.1.4.3) Elektronenmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von GlyRa4

Um die synaptische Lokalisation auch mit hoher Vergrößerung näher zu untersuchen, wurden *postembedding*-Immunogoldfärbungen für die Elektronenmikroskopie angefertigt. Da das durch den Antikörper erkannte Epitop offenbar sehr fixierempfindlich ist und auch in der Lichtmikroskopie nur durch den Einsatz relativ

hoher Tritonkonzentrationen für den Antikörper erreichbar wird, war jeder der durchgeführten Versuche ein Kompromiss zwischen den Erfordernissen der Strukturhaltung einerseits und denen der Immunfärbung andererseits. Aus diesem Grund geben die erhaltenen Ergebnisse leider keinen Aufschluß über die Zellklassen, die GlyR $\alpha$ 4 exprimieren, es wird lediglich deutlich, daß die Färbung membranassoziiert ist (Abbildung 3.10). Diese Schwierigkeiten konnten auch mit der preembedding-Methode nicht überwunden werden. Ab einem Tritonzusatz von 0,1 % war die Färbung erfolgreich, allerdings nur um den Preis des völligen Verlustes der Gewebestruktur. Die Gründe dafür werden noch näher zu diskutieren sein.

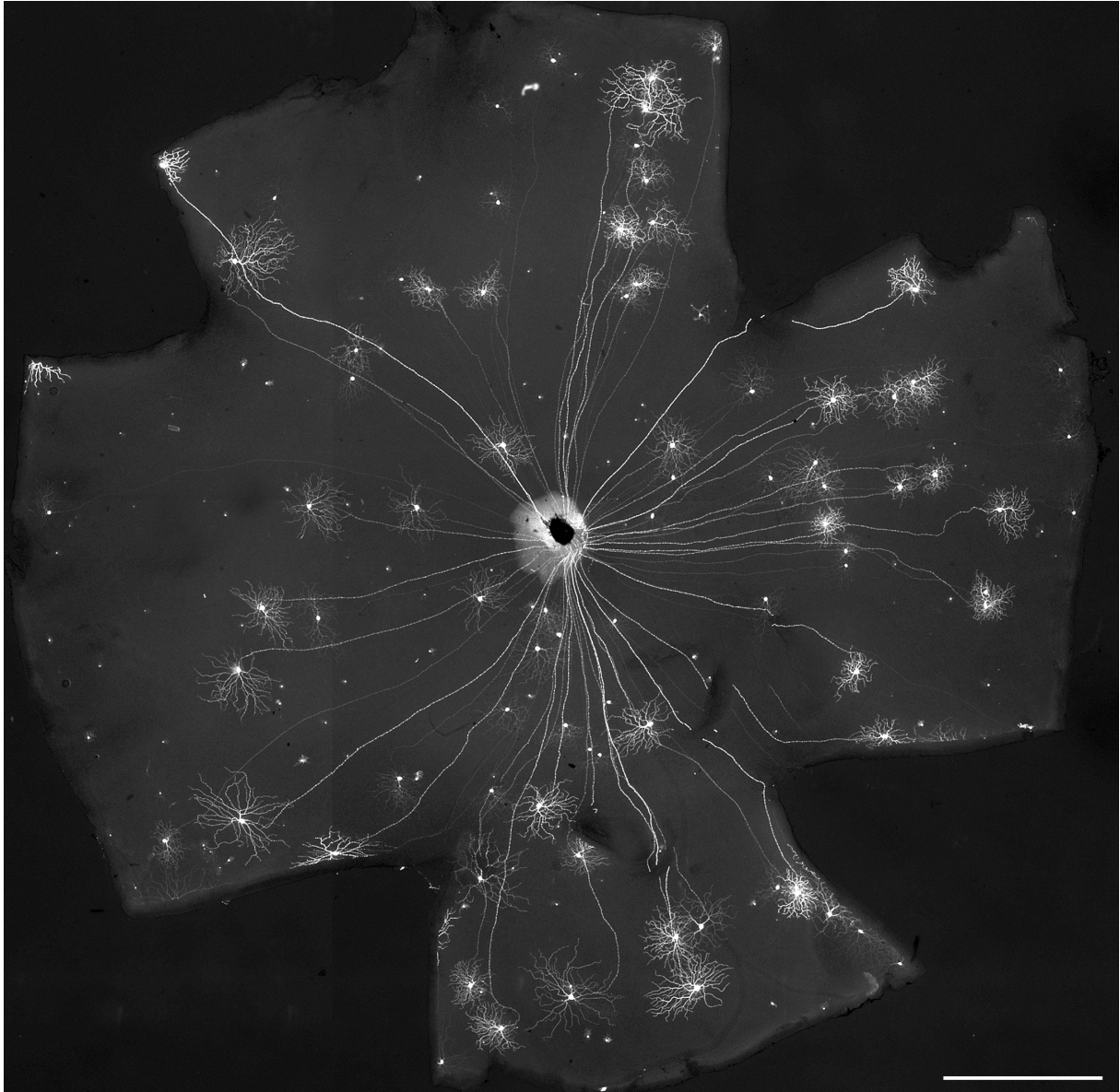


**Abbildung 3.10: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines vertikalen Gewebeschnittes durch die IPL der Mausretina, immunzytochemisch markiert mit pAb GlyR $\alpha$ 4**

Die postembedding-Immunogoldfärbung (schwarze Punkte) befindet sich membranassoziiert an aufgrund der schlechten Strukturhaltung nicht näher charakterisierbaren Zellfortsätzen in der IPL; Balkenlänge 0,2  $\mu$ m

### 3.2) Ganglienzelltypen der GFP-O-Maus

In der transgenen GFP-O-Maus (Feng et al. 2000) sind etwa 15 bis 35 Ganglienzellen und 10 bis 30 Amakrinzellen durch das grün-fluoreszierende Protein (GFP) markiert (Abbildung 3.1). GFP wird in diesen Zellen unter der Kontrolle des *thy1*-Promotors exprimiert.



**Abbildung 3.11: Fotomontage der Retina einer GFP-O-Maus im Aufsichtpräparat;**  
Die Eigenfluoreszenz der Zellen wurde mit einem Antikörper gegen GFP verstärkt;  
Balkenlänge 500  $\mu\text{m}$

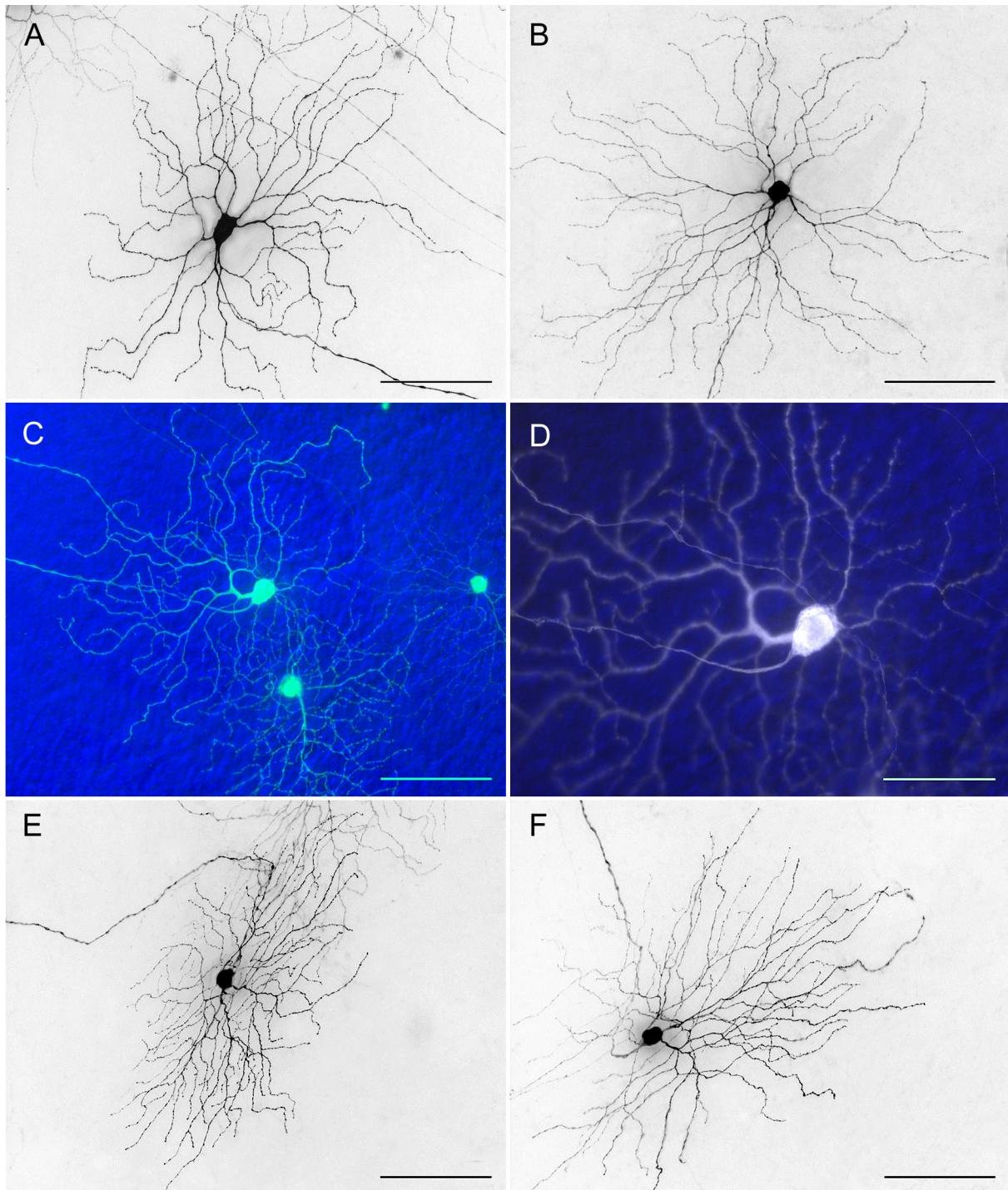
Es füllt die Zellen bis in ihre feinsten Fortsätze, und durch eine zusätzliche Anfärbung mit Antikörpern gegen GFP lässt sich der gesamte Dendritenbaum darstellen. Der Ganglienzellklassifizierung nach Sun et. al. (2002) folgend, wurden die Ganglienzelltypen nach Größe ihrer Somata und dendritischen Felder in 4 Klassen eingeteilt

(A, B, C, D). Weitere Subklassen wurden nach Morphologie und Stratifizierungsebene unterschieden. Die IPL wird dazu in Ebenen von 0 bis 100 % eingeteilt, wobei sich die OFF-Sublamina von 0 bis 40 und die ON-Sublamina von 40 bis 100 % erstreckt.

Alle 14 Zelltypen der Sun-Klassifizierung, zu denen es fast durchweg Entsprechungen in der Ratte gibt (Perry 1979, Dreher et al. 1985, Martin 1986, Dann und Buhl 1987, Peichl 1989, Tauchi et al. 1992, Huxlin und Goodchild 1997), wurden auch in der Retina der GFP-O-Maus gesehen. Einige der angefärbten Zellen konnten jedoch nicht anhand des von Sun und Kollegen eingeführten Schemas klassifiziert werden.

### **3.2.1) Typ-A-Ganglienzellen**

A-Ganglienzellen besitzen große Somata (mittlerer Durchmesser 22  $\mu\text{m}$ ) und große dendritische Felder (mittlerer Durchmesser 300  $\mu\text{m}$ ). Man unterscheidet A1- und A2-Ganglienzellen (Abbildung 3.12 A-F), letztere treten jeweils als ON- ( $71 \pm 7 \%$ ) und OFF-Paare ( $38 \pm 12 \%$ ) auf; A1-Zellen stratifizieren ausschließlich in der ON-Sublamina der IPL ( $73 \pm 9 \%$ ). A2-Ganglienzellen haben dichtere dendritische Felder als A1-Zellen sowie höhere Verzweigungsgrade nahe dem Zellkörper. Darüberhinaus besitzen sie überwiegend runde Somata, im Gegensatz zu A1-Zellen, deren Zellkörper typischerweise polygonal sind. Die A-Zellen werden als Pendant zu den erstmals in der Katze beschriebenen Alpha-Zellen (Boycott und Wässle 1974) angesehen, die ihre Entsprechung auch in allen anderen bisher untersuchten Spezies gefunden haben.



**Abbildung 3.12: Fluoreszenzaufnahmen von A-Ganglienzellen im Aufsichtpräparat**

**A:** A1-Ganglienzelle; **B:** A1-Ganglienzelle; **C:** mit Normaski-Optik (blau) unterlegte Fluoreszenzaufnahme dreier Ganglienzellen (grün), A2<sub>inner</sub>-Ganglienzelle ist mittig im Bild; **D:** vergrößerte Aufnahme der in C gezeigten A2-Ganglienzelle, **E:** A2<sub>inner</sub>-Ganglienzelle; **F:** A2<sub>outer</sub>-Ganglienzelle; allen A-Typ Ganglienzellen sind große Somata und große dendritische Felder gemein, A1-Zellen besitzen jedoch geradere und weniger stark verzweigte Dendriten als A2-Zellen; Balkenlänge A-C und E-F: 100 µm, D: 50 µm

### 3.2.2) Typ-B-Ganglienzellen

B-Ganglienzellen zeichnen sich durch kleine bis mittelgroße Somata und durch kleine dendritische Felder aus. Ihr mittlerer Zellkörperdurchmesser liegt bei 14  $\mu\text{m}$ , der mittlere Durchmesser ihrer dendritischen Felder bei 173  $\mu\text{m}$ . Sie werden weiter in die Typen B1, B2, B3 und B4 unterteilt (Abbildung 3.13 A-D).

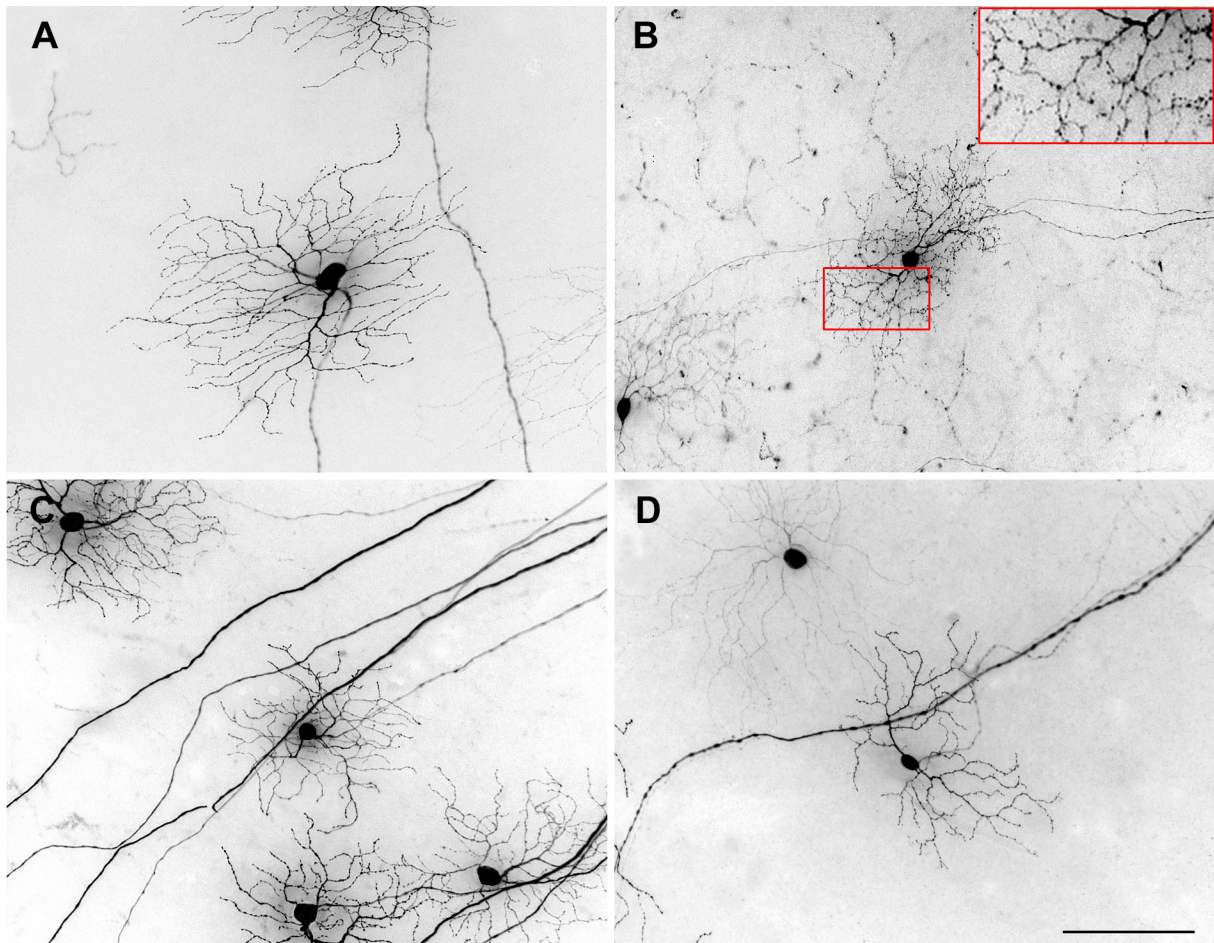
B1-Zellen sind die größten ihrer Klasse und besitzen hauptsächlich radial vom Soma wegführende Dendriten. Sie stratifizieren meist in der OFF-Sublamina der IPL ( $38 \pm 16 \%$ ).

B2-Zellen haben die kleinsten dendritischen Felder der B-Zell-Klasse. Ihre Dendriten sind dicht und stark verzweigt, tragen Varikositäten sowie dendritische Dornen. Auch sie stratifizieren hauptsächlich in der OFF-Sublamina der IPL ( $33 \pm 16 \%$ ) und sind möglicherweise zu den Beta-Zellen der Katze homolog (Wässle et al. 1981). Sie ähneln aber auch den Zeta-Zellen der Katze (Berson et al. 1998). Hier müssen physiologische Untersuchungen klären, welche Zuordnung korrekt ist, da die Beta-Zellen der Katze nachweislich für das hochauflösende Sehen benötigt werden.

B3-Zellen nehmen von ihrer Größe her eine Mittelposition unter den B-Zellen ein und treten als ON- ( $67 \pm 10 \%$ ) und OFF-Paare ( $25 \pm 16 \%$ ) auf. Ihre Dendriten sind kurvig und rekursiv, ihr dendritisches Feld ist weniger dicht als das der anderen B-Zellen.

B4-Zellen ähneln morphologisch den B2-Zellen, sie sind allerdings etwas größer und besitzen weniger dicht verzweigte dendritische Felder. Sie stratifizieren ausschließlich in der OFF-Sublamina der IPL ( $34 \pm 12 \%$ ). Sie ähneln den lokalen Kantendetektoren [engl. *local edge detectors*] im Kaninchen (van Wyk, persönliche Mitteilung - Publikation im Druck; Amthor et al. 1989).





**Abbildung 3.13: Fluoreszenzaufnahmen von B-Ganglienzellen im Aufsichtpräparat**

**A:** B1-Ganglienzelle, sie ist die größte der B-Ganglienzellen; **B:** B2-Ganglienzelle, sie ist die kleinste der B-Ganglienzellen, ihre Dendriten sind mit Varikositäten besetzt (rot umrahmtes Detail vergrößert dargestellt); **C:** B3<sub>inner</sub>-Ganglienzelle, der B3-Zelltyp tritt als B3<sub>outer</sub> auch in der OFF-Sublamina der IPL stratifizierend auf; **D:** B4-Ganglienzelle, dieser Typ ähnelt dem B2-Typ, ist aber etwas größer und besitzt weniger dicht verzweigte Dendriten; Balkenlänge für A-F: 100 µm

### 3.2.3) Typ-C-Ganglienzellen

C-Zellen weisen kleine bis mittelgroße Somata von durchschnittlich 16 µm bei mittelgroßen bis großen dendritischen Feldern von durchschnittlich 241 µm auf. Die folgenden Unterklassen werden beschrieben: C1, C2, C3, C4, C5 und C6 (Abbildung 3.14 A-F).

C1-Zellen stratifizieren in der ON-Sublamina der IPL ( $62 \pm 15 \%$ ). Morphologisch auffällig ist ihr Verzweigungsmuster: von dicken Primärdendriten zweigen netzartig dünnere Dendriten ab; ihr dendritisches Feld ist von mittlerer Dichte. Sie ähneln morphologisch den Delta-Zellen der Katze (Boycott und Wässle 1974, Kolb et al. 1981), die wiederum funktionell den ON-richtungsselektiven Ganglienzellen zu entsprechen scheinen, deren Physiologie von Levick (1967) im Kaninchen

beschrieben wurde. Die zugehörige Morphologie wurde 1989 durch Amthor und Kollegen ebenfalls im Kaninchen enthüllt.

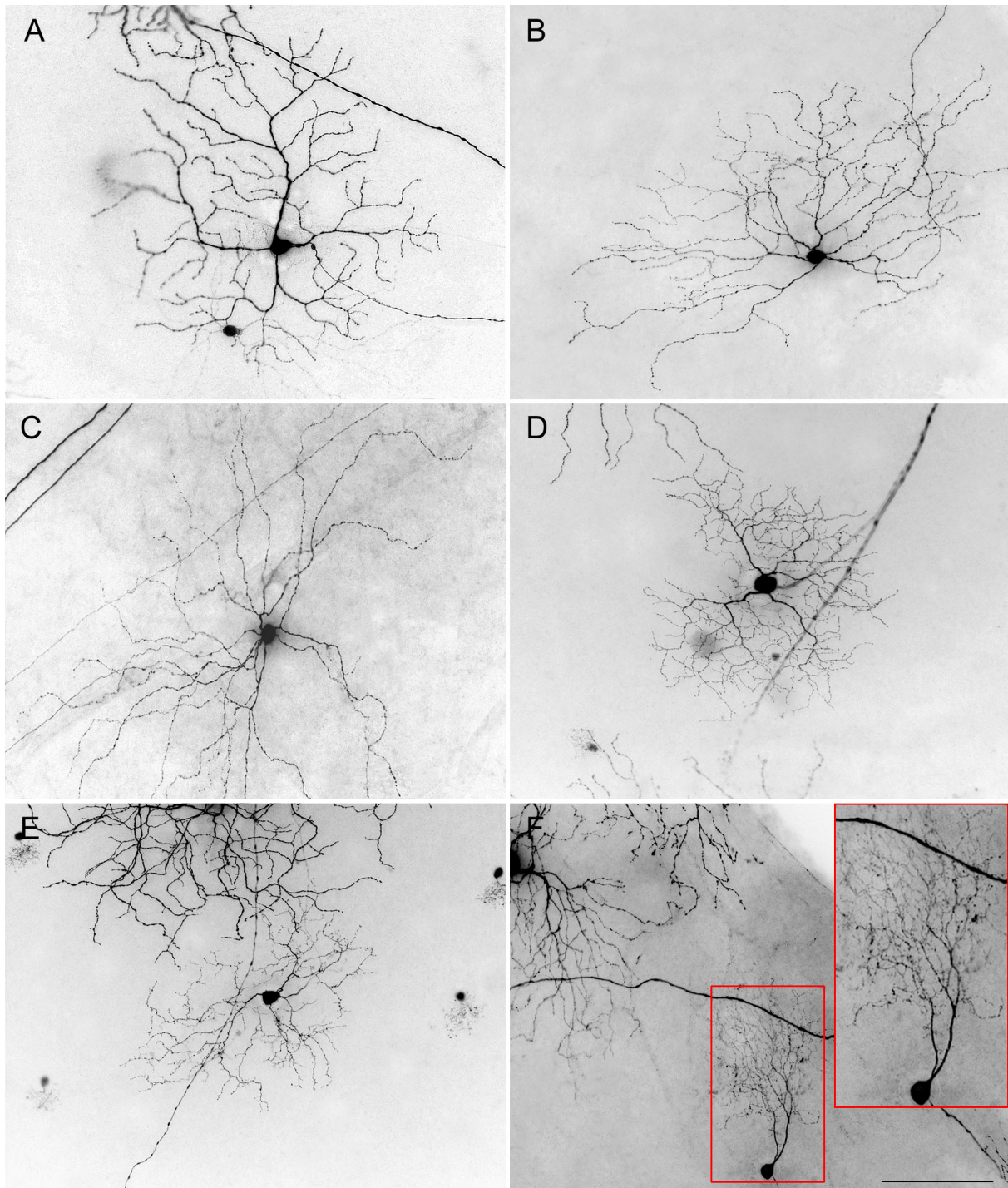
C2-Zellen ähneln den C1-Zellen, ihre Dendriten sind jedoch geschwungener und ihr dendritisches Feld ist dichter verzweigt. Sie treten als ON- und OFF-Paare auf. Bei der Klassifizierung dieses Zelltypes taten sich dahingehend Schwierigkeiten auf, daß aus der Vorlage von Sun et al. (2002) die Morphologie desselben nicht widerspruchsfrei zu ersehen ist. Die Zeichnung in der Übersichtsabbildung (Abbildung 1 bei Sun et al. 2002) unterscheidet sich maßgeblich von der gezeigten Fotografie (Abbildung 5 bei Sun et al. 2002). Orientiert man sich an der Zeichnung, so ergibt sich die Frage, ob die Ganglienzellklasse C2 nicht eigentlich ein Untertyp der Klasse A1 ist. Hilfreich zur Klärung derselben ist die morphologische Ähnlichkeit zwischen C2-Zellen in der Maus und den von Peichl (1989) beschriebenen Delta-Zellen in der Ratte (Shigang He, persönliche Mitteilung). Die Dendriten der Delta-Zellen sind weniger dick und geschwungener als die der Alpha-Zellen, dies läßt sich auf die Maus übertragen und erleichtert die Unterscheidung.

C3-Zellen sind leicht an ihrem sehr großen dendritischen Feld, das von einigen wenigen Dendriten gebildet wird, zu erkennen. Stratifizierungsebene ist die ON-Sublamina der IPL ( $68 \pm 16 \%$ ). Sie ähneln den in der Katze beschriebenen Epsilon-Zellen (Leventhal et al. 1980).

Das dendritische Feld der C4-Zellen erstreckt sich in der OFF-Sublamina der IPL ( $34 \pm 14 \%$ ), es ist relativ dicht, die Dendriten sind geschwungen, mit Dornen besetzt, und gelegentlich sind Varikositäten zu beobachten. Auch hier gibt es homologe Zellen bei der Katze, die Eta-Zellen (Berson et al. 1999).

Die C5-Zellen sind von den C4-Zellen fast nicht zu unterscheiden, sie stratifizieren in nahezu derselben Ebene der IPL ( $39 \pm 12 \%$ ), haben ähnliche Größe und Morphologie. Sun et al. sehen allerdings (für die Klassifizierung hilfreiche) morphologische Ähnlichkeiten zwischen dem C5- und D2-Zelltyp (siehe 2.4).

C6-Zellen haben eine sehr charakteristische Morphologie: alle Dendriten scheinen in eine Richtung zu streben. Dieser asymmetrische Zelltyp stratifiziert ebenfalls in der OFF-Sublamina der IPL ( $27 \pm 14 \%$ ).



**Abbildung 3.14: Fluoreszenzaufnahmen von C-Ganglienzellen im Aufsichtpräparat**

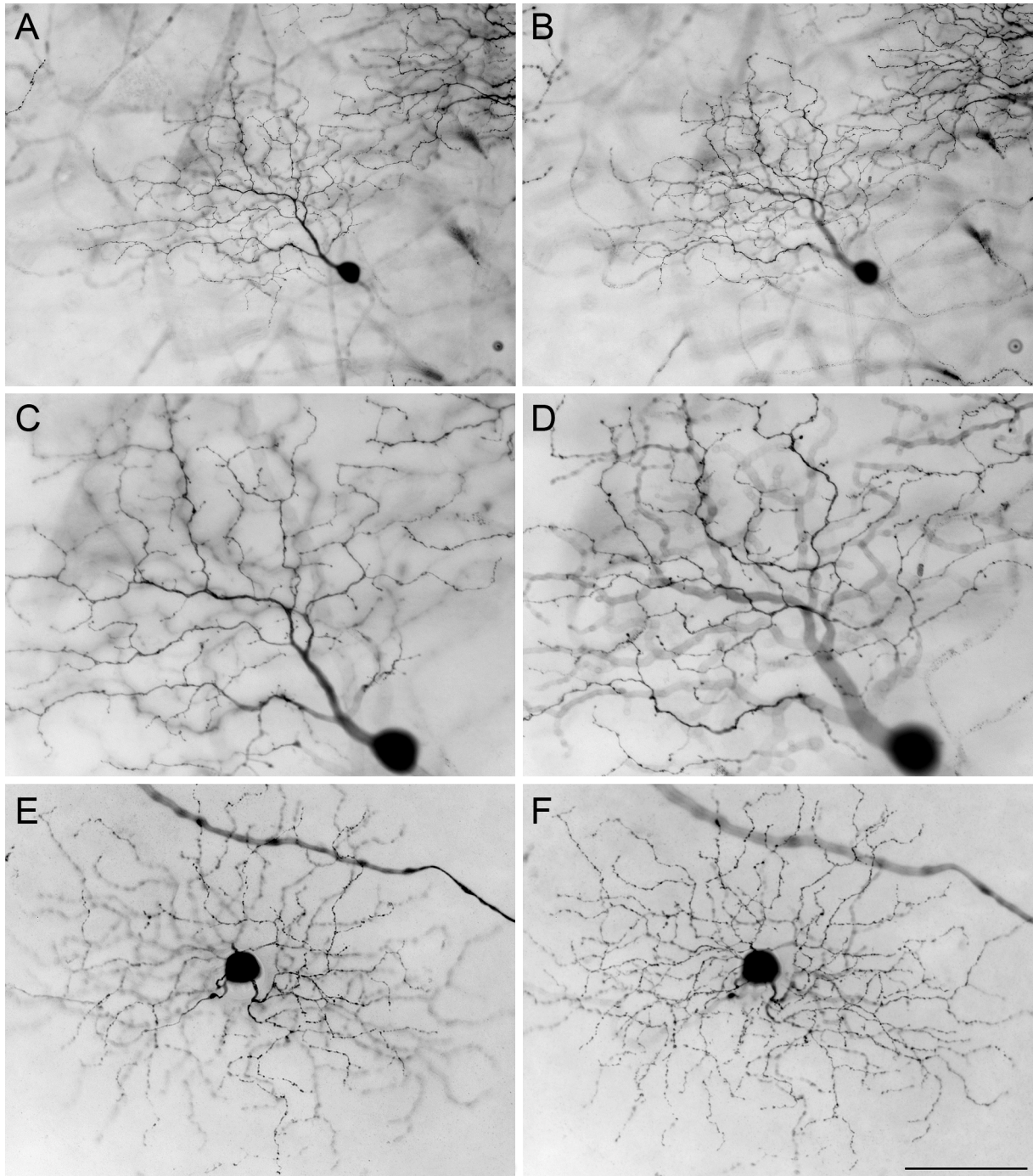
**A:** C1-Ganglienzelle, von dicken Primärdendriten zweigen netzartig dünnere Dendriten ab; **B:** C2<sub>inner</sub>-Ganglienzelle, dieser Zelltyp tritt auch als C2<sub>outer</sub> in der OFF-Sublamina der IPL stratifizierend auf; **C:** C3-Ganglienzelle, charakteristisch ist das von wenigen Dendriten gebildete sehr große dendritische Feld; **D:** C4-Ganglienzelle, sie zeichnet sich durch ein dicht verzweigtes dendritisches Feld aus; **E:** C5-Ganglienzelle, sie ähnelt einer D2-Zelle ohne den inneren Dendritenbaum; **F:** C6-Ganglienzelle, charakteristisch für diesen Zelltyp ist seine Asymmetrie, alle Dendriten streben in eine Richtung (eingerahmter Bildausschnitt vergrößert dargestellt); Balkenlänge für A-F: 100 µm

## 2.4) Typ-D-Ganglienzellen

Die D-Ganglienzellen sind bistratifiziert, mit je einem Dendritenbaum in der ON- und der OFF-Sublamina der IPL. Es werden D1 und D2-Typ unterschieden (Abbildung 3.15).

D1-Zellen besitzen ein kleines dendritisches Feld, das von extrem dünnen, geschwungenen und rekursiven Dendriten gebildet wird. Es ist nicht symmetrisch sondern bedeckt nur einen Halbkreis um den Zellkörper. Die Dendritenbäume stratifizieren bei  $56 \pm 8$  % IPL (ON) bzw.  $29 \pm 8$  % IPL (OFF). Dieser Zelltyp ist sehr selten (Shigang He, persönliche Mitteilung) und wurde in der Retina der GFP-O-Maus (in auswertbarer Form) nur wenige Male gesehen.

D2-Zellen haben ein dendritisches Feld mittlerer Größe und Dichte (durchschnittlich  $241 \pm 53$   $\mu\text{m}$ ). Ihre Dendriten stratifizieren bei  $61 \pm 10$  % IPL (ON) bzw.  $29 \pm 12$  % IPL (OFF) in den gleichen Schichten wie die Dendriten der cholinergen Amakrinzellen (siehe 3.6.2). D2-Ganglienzellen zeigen richtungsspezifische Lichtantworten (Weng et al. 2005). Mit ihren rekursiven teilweise Schlaufen bildenden Dendriten entsprechen sie auch morphologisch den richtungsselektiven Ganglienzellen des Kaninchens (Amthor et. al. 1984).



**Abbildung 3.15: Fluoreszenzaufnahmen von D-Typ-Ganglienzellen im Aufsichtpräparat**

**A:** D1-Ganglienzelle, innerer Dendritenbaum (ON-Sublamina); **B:** in A gezeigte D1-Ganglienzelle, äußerer Dendritenbaum (OFF-Sublamina), auffällig sind die asymmetrischen Dendritenbäume, die nur einen Halbkreis um den Zellkörper bedecken; **C** und **D:** Zelle aus A und B in höherer Vergrößerung; **E:** D2-Ganglienzelle, innerer Dendritenbaum (ON-Sublamina); **F:** in E gezeigte D2-Ganglienzelle, äußerer Dendritenbaum (OFF-Sublamina), charakteristisch für diesen symmetrischen Zelltyp sind seine rekursiven und teilweise schlaufenbildenden Dendriten; Balkenlänge für A und B 100  $\mu\text{m}$ , für C-F 50  $\mu\text{m}$

### **3.2.5) Unklassifizierte Ganglienzellen**

Gelegentlich wurden Zellen gesehen, die von ihrer Morphologie einem bestimmten Typ zugeordnet werden konnten, deren Stratifizierungsebene innerhalb der IPL aber von Sun et. al. anders beschrieben worden sind. Beispielfhaft seien eine B4-, eine C4- sowie eine C5-Ganglienzelle genannt, die in der ON-Sublamina stratifizierten, jedoch im Katalog nach Sun et al. nur als OFF-Varianten geführt werden. Dabei ist durchaus möglich, daß diese Zellen tatsächlich in beiden Varianten existieren und bisher lediglich nicht beschrieben wurden.

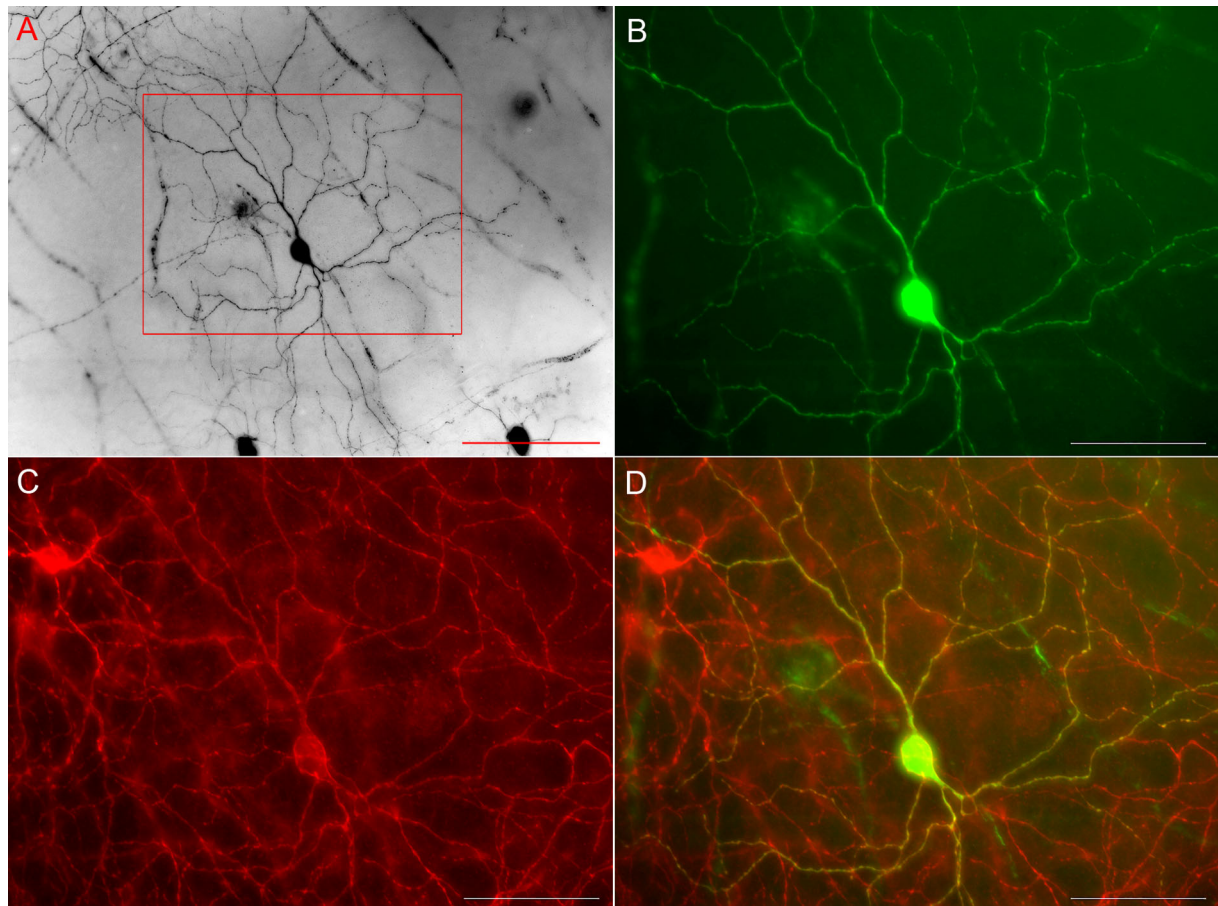
Des weiteren sei eine C6-ähnliche Ganglienzelle genannt, die jedoch in zwei Ebenen stratifizierte. Nach Sun et al. (2002) sollte dieser Zelltyp in der OFF-Sublamina der IPL stratifizieren.

Darüberhinaus gab es einige wenige Zellen, die in keiner Weise in das Klassifizierungsschema paßten (nach Morphologie, Größe des dendritischen Feldes und des Zellkörpers). Bei den weitergehenden Untersuchungen wurden diese Zellen nicht berücksichtigt, zumal sich keine Auffälligkeiten bezüglich ihres Glyzinrezeptorbesatzes offenbarten.

### **3.2.6) Melanopsin exprimierende Ganglienzellen**

Die in der Literatur beschriebenen Melanopsin exprimierenden intrinsisch lichtsensitiven Ganglienzellen (Hattar et al. 2002, Belenky et al. 2003, Hannibal und Fahrenkrug 2004, Dacey et al. 2005) vermitteln nicht das bewußte Sehen, sondern steuern lichtabhängige, reflexartige Vorgänge im Gehirn. So leiten sie Informationen an spezielle Regionen des Gehirns wie den suprachiasmatischen Nucleus (SCN) weiter und sind auf diese Weise an der Modulation der Freisetzung von Melatonin und der Kontrolle des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt. Weiterhin steuern diese Ganglienzellen durch ihre Projektion in das Mittelhirn die Pupillengröße. Sie können mit Antikörpern gegen Melanopsin selektiv angefärbt werden. Belenky und Kollegen (2003) beschreiben die melanopsinexprimierenden Ganglienzellen in der Mausretina als einen Ganglienzelltyp, der hauptsächlich in der OFF-Sublamina der IPL nahe der Grenze zur INL stratifiziert. Es gibt aber auch Hinweise, daß ein weiterer Typ von Melanopsin-Ganglienzelle in der ON-Sublamina stratifiziert (Belenky et al. 2003). Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß C3-Ganglienzellen Melanopsin enthalten (Abbildung 3.16). Dieser Befund ist interessant, weil der C3-Ganglienzelltyp ausschließlich in der ON-Sublamina der IPL stratifiziert und

möglicherweise den Plexus bildet, den Belenky und Kollegen in der ON-Sublamina der IPL beschrieben haben. Damit wäre ein Hinweis darauf geliefert, daß die beiden beschriebenen Dendritenbäume tatsächlich zu zwei verschiedenen Ganglienzelltypen gehören. Diese Situation findet sich im Primaten, wo Melanopsin exprimierende Ganglienzellen zwei Populationen bilden, von denen eine in der ganz äußeren IPL und die andere in der ganz inneren IPL stratifiziert. Die Zellkörper des OFF-Typs befinden sich meistens ektopisch in der INL (Dacey et al. 2005).



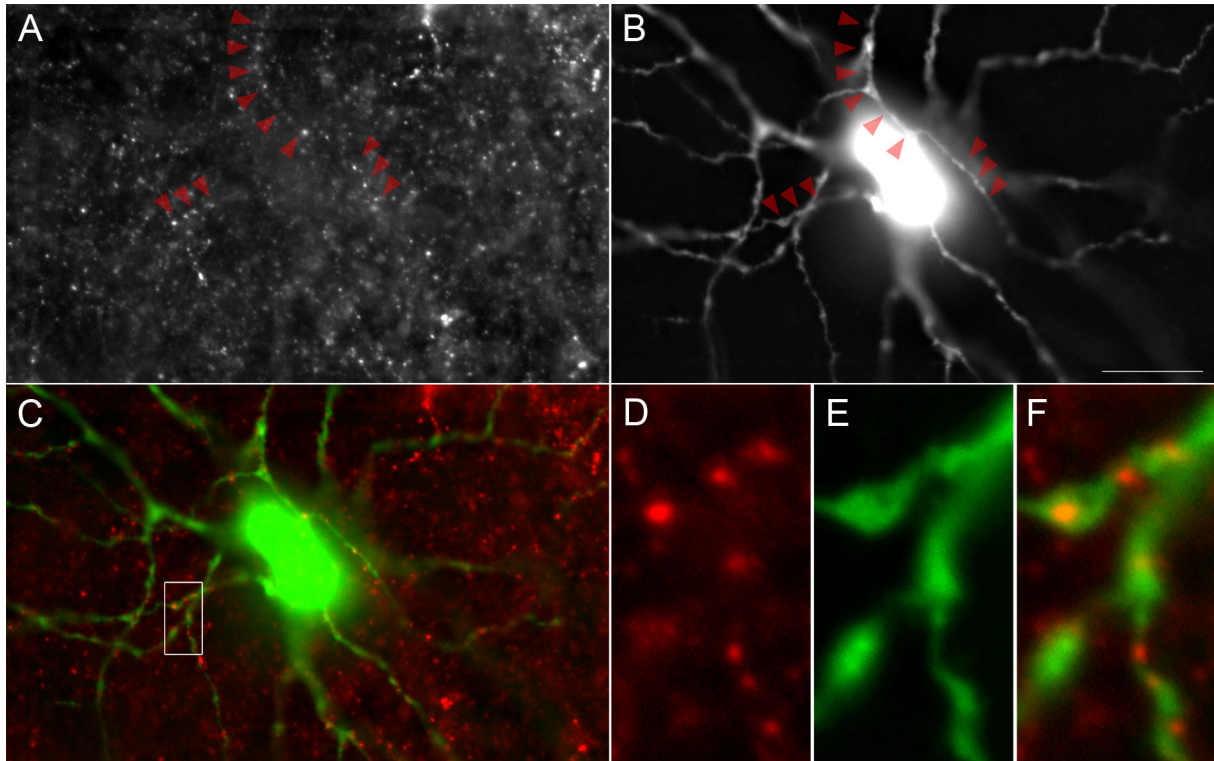
**Abbildung 3.16: Fluoreszenzaufnahme einer C3-Ganglienzelle (grün) mit Melanopsin (rot) im Aufsichtpräparat**

**A:** C3-Ganglienzelle; **B:** rot eingerahmter Bildausschnitt der in A gezeigten C3-Ganglienzelle mit höherer Vergrößerung aufgenommen, die GFP exprimierende C3-Ganglienzelle ist grün dargestellt; **C:** der gleiche Bildausschnitt wie in B, die rote Fluoreszenz zeigt die Melanopsinfärbung; **D:** die Überlagerung von B und C zeigt deutlich, daß die rote und die grüne Fluoreszenz kolokalisiert sind, d. h. daß die C3-Ganglienzelle Melanopsin exprimiert; Balkenlänge 100 µm

### **3.3) Verteilung der Glyzinrezeptoruntereinheiten auf verschiedenen Typen von Ganglienzellen**

Wie aus früheren anatomischen Arbeiten und physiologischen Untersuchungen bekannt ist, besitzen Ganglienzellen Glyzinrezeptoren (Protti et al. 1997, Tian et al. 1998, Wässle et al. 1998, Grünert 2000, Lin et al. 2000, Rotolo und Dacheux 2003). Es ist bislang jedoch nicht untersucht worden, welche Ganglienzelltypen welchen Glyzinrezeptor-Subtyp exprimieren. Mit den inzwischen verfügbaren spezifischen Antikörpern gegen GlyR $\alpha$ 1, GlyR $\alpha$ 2, GlyR $\alpha$ 3 und GlyR $\alpha$ 4 sowie transgenen Mauslinien wie der hier verwendeten GFP-O-Linie läßt sich die differenzielle Verteilung der verschiedenen GlyR-Untereinheiten auf den verschiedenen Ganglienzelltypen durch Doppelfärbungen gegen die entsprechende GlyR-Untereinheit und GFP untersuchen. Dies wurde wie folgt getan (Abbildung 3.17): Von den Zellen und der jeweiligen Rezeptorfärbung wurden Mehrkanalbilder aufgenommen, und die Kanäle anschließend überlagert. Die Rezeptorfärbung wurde im roten Kanal dargestellt, die Dendriten der Zellen in grün. Abbildung 3.17 zeigt eine A-Ganglienzelle mit GlyR $\alpha$ 1. Die Kanäle sind zunächst einzeln (A und B) und schließlich zusammen gezeigt (C). Bereits in A läßt sich der Verlauf einzelner Dendriten erkennen, da viele GlyR $\alpha$ 1-Punkte ihnen exakt folgen. Die Teilabbildungen D, E und F verdeutlichen dies bei höherer Vergrößerung an einem einzelnen Dendriten. Diese Zelle wird als mit GlyR $\alpha$ 1 kolokalisiert betrachtet, und da Ganglienzellen keine Ausgangssynapsen bilden, ist davon auszugehen, daß diese Zelle GlyR $\alpha$ 1 exprimiert.





**Abbildung 3.17: Zur Methode der Untersuchung von Kollokationen am Beispiel einer A1-Ganglienzelle mit GlyR $\alpha$ 1 im Aufsichtpräparat**

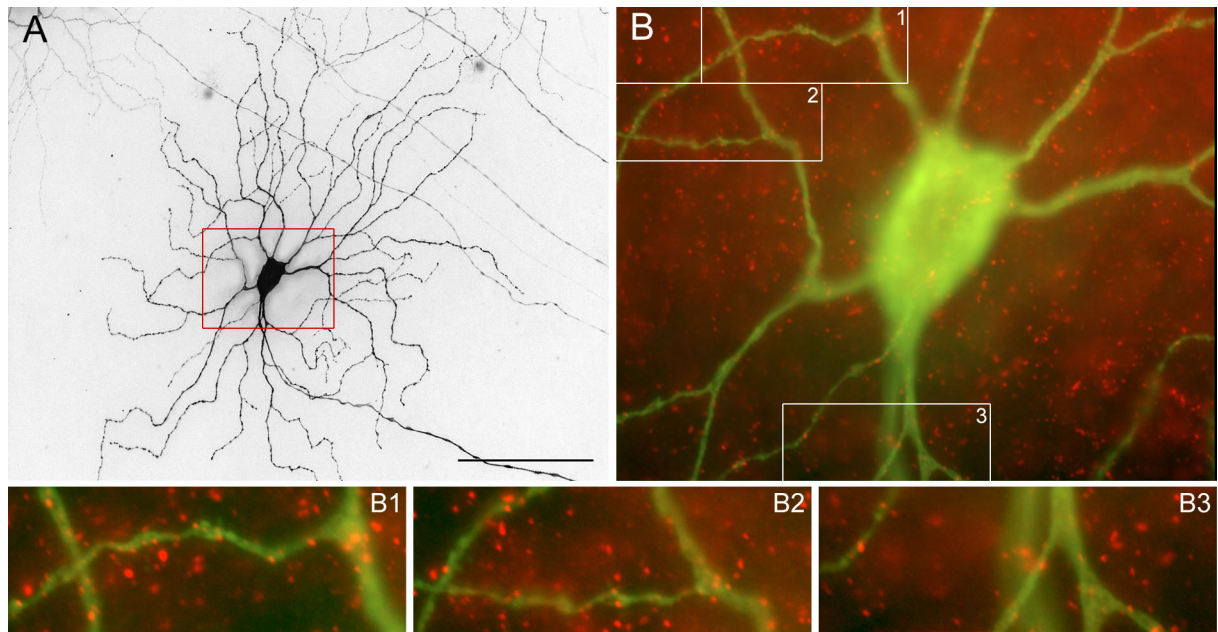
**A:** Rezeptorfärbung als Einzelbild; **B:** Ganglienzelle als Einzelbild; **C:** Überlagerung von A und B in Farbe; **D:** Vergrößerte Darstellung eines Details, Rezeptorfärbung im roten Kanal; **E:** das in D gezeigte Details, Ganglienzelle im grünen Kanal; **F:** Überlagerung des roten und grünen Kanals; Balkenlänge für A bis C 20  $\mu$ m

Diese Art der Untersuchung wurde für alle 4 GlyR $\alpha$ -Untereinheiten und alle Ganglienzelltypen systematisch durchgeführt, und die Ergebnisse sind im folgenden dargestellt.

### 3.3.1) Glyzinrezeptoruntereinheit $\alpha$ 1 (GlyR $\alpha$ 1)

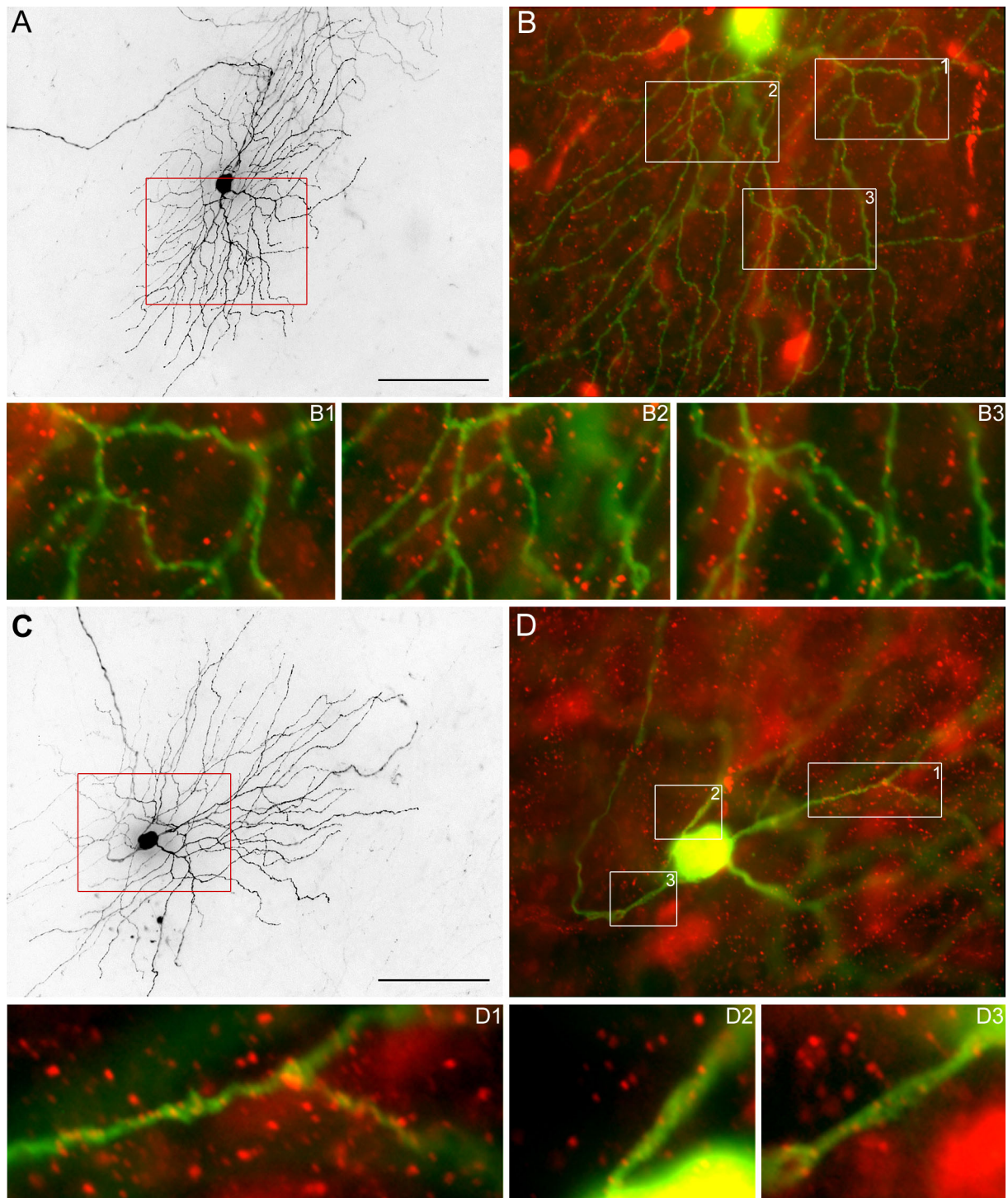
Die eingangs beschriebene Methode zur Bestimmung der Kollokation von Ganglienzellen mit Glyzinrezeptoren lieferte für GlyR $\alpha$ 1 folgendes Ergebnis: Die Ganglienzelltypen A1, A2inner, A2outer sowie B1 exprimieren GlyR $\alpha$ 1 (Abbildung 3.18 bis 3.20, vorab gezeigt in Abbildung 3.12 A, C, E, F und 3.13 A). Die beobachtete Kollokation war signifikant verschieden von der durch inverse Überlagerung der Farbkanäle generierten zufälligen Kollokation (Tabelle A 1 im Anhang). Für die A-Typ-Ganglienzellen stehen diese Ergebnisse in Einklang mit früheren Untersuchungen an Ratten-, Kaninchen- und Primatenretina (Koulen et al. 1996, Grünert und Ghosh 1999). Die B-Typ-Ganglienzellen wurden diesbezüglich

erstmalig in der vorliegenden Arbeit untersucht. Ferner ist bisher nicht geklärt, zu welchem Zelltyp anderer Spezies der B1-Typ der Maus homolog ist.



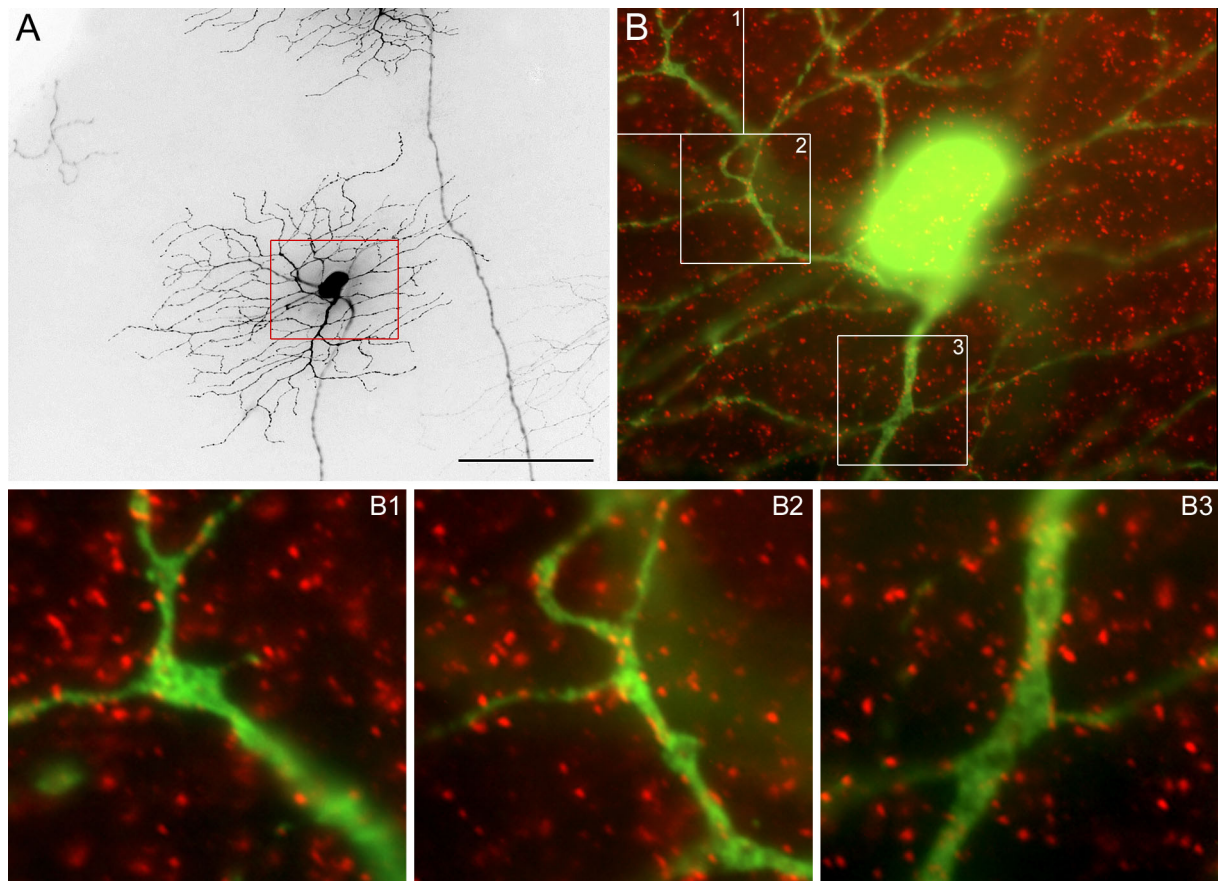
**Abbildung 3.18: Kolokalisation von A1-Ganglienzellen mit GlyR $\alpha$ 1**

**A:** Fluoreszenzaufnahme einer A1-Ganglienzelle im Aufsichtpräparat; **B:** Aufnahme der in A gezeigten Zelle (grün) mit GlyR $\alpha$ 1 (rot) mit höherer Vergrößerung; **B1-B3:** die vergrößerten Ausschnitte aus B zeigen deutlich, daß viele der GlyR $\alpha$ 1-Punkte sich auf den Dendriten befinden; Balkenlänge in A 100  $\mu$ m



**Abbildung 3.19: Kolokalisation von A2-Ganglienzellen mit GlyR $\alpha$ 1**

**A:** Fluoreszenzaufnahme einer A2<sub>inner</sub>-Ganglienzelle im Aufsichtpräparat; **B:** Aufnahme der in A gezeigten Zelle (grün) mit GlyR $\alpha$ 1 (rot) mit höherer Vergrößerung; **B1-B3:** die vergrößerten Ausschnitte aus B zeigen, daß viele der GlyR $\alpha$ 1-Punkte auf den Dendriten der A2<sub>inner</sub>-Ganglienzelle liegen; **C:** Fluoreszenzaufnahme einer A2<sub>outer</sub>-Ganglienzelle im Aufsichtpräparat; **D:** Aufnahme der in C gezeigten Zelle (grün) mit GlyR $\alpha$ 1 (rot) mit höherer Vergrößerung; **D1-D3:** die vergrößerten Ausschnitte aus D zeigen, daß auch die Dendriten der A2<sub>outer</sub>-Ganglienzelle mit GlyR $\alpha$ 1 kolokalisiert sind; Balkenlänge in A und C 100  $\mu$ m



**Abbildung 3.20: Kolokalisation von B1-Ganglienzellen mit GlyR $\alpha$ 1**

**A:** Fluoreszenzaufnahme einer B1-Ganglienzelle im Aufsichtpräparat; **B:** Aufnahme der in A gezeigten Zelle (grün) mit GlyR $\alpha$ 1 (rot) bei höherer Vergrößerung; **B1-B3:** die vergrößerten Ausschnitte aus B zeigen deutlich, daß sich viele der GlyR $\alpha$ 1-Punkte auf den Dendriten der B1-Ganglienzelle befinden; Balkenlänge 100  $\mu$ m

Alle anderen beschriebenen Zelltypen zeigten keine derart überzeugende Kolokalisation (Tabellen A 2 bis A 4 im Anhang), die für sie erhaltenen p-Werte differierten untereinander dennoch deutlich. Die Nullhypothese, bei der Kolokalisation der Punkte mit den Ganglienzellen handle es sich um bloße Zufallsprodukte, wurde ausschließlich für p-Werte unter 0,01 abgelehnt, also nur im Falle der Zelltypen A1, A2 und B1. Alle übrigen Werte erlauben keine eindeutige quantitative Aussage. Vielmehr nehmen die anderen Zelltypen Zwischenstellungen ein. Weder sind sie sicher mit GlyR $\alpha$ 1 kolokalisiert, noch kann man mit hinreichend niedriger Irrtumswahrscheinlichkeit behaupten, sie exprimierten diese Rezeptoruntereinheit überhaupt nicht. Inwieweit ein solch fraglicher Rezeptorbesatz funktionell relevant ist, können nur elektrophysiologische Untersuchungen klären. Hinzu kommt, daß die statistische Untersuchung der oben besprochenen Zelltypen lediglich stichprobenartig durchgeführt werden konnte, da Präparate und Rezeptorfärbungen

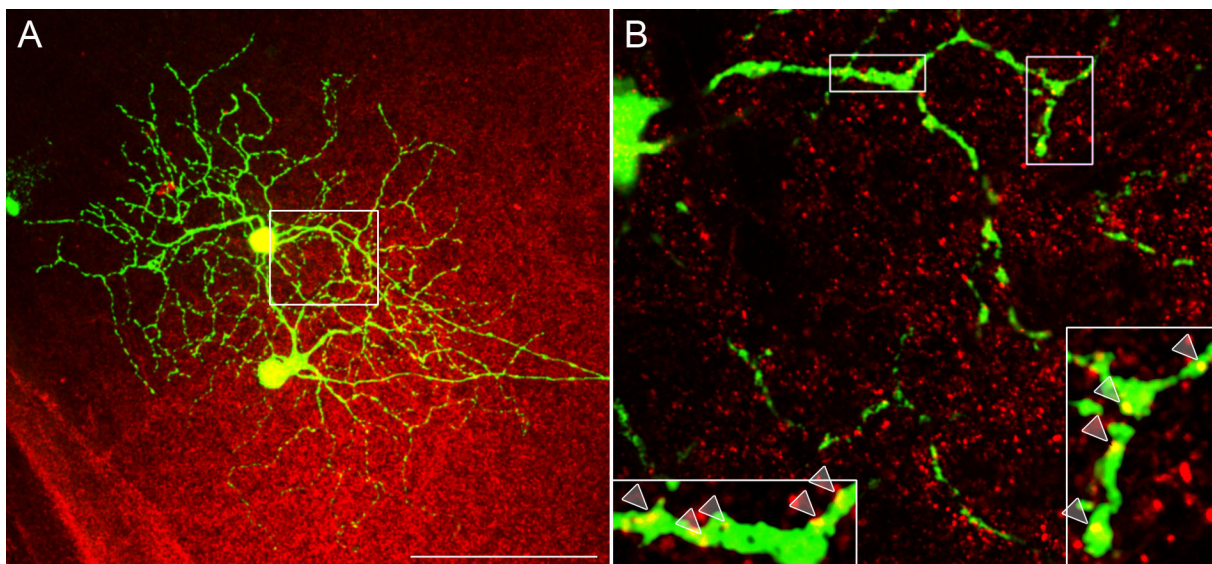
nie wirklich vergleichbar sind. Deshalb wurde pro Zelltyp nur eine Beispielizele ausgewertet und die Aussagekraft ist demzufolge begrenzt.

Im Falle der Ganglienzelltypen C2<sub>inner</sub>, C4 und C6 sprechen elektrophysiologische Experimente (Sriparna Majumdar, unveröffentlichte Daten) für eine tatsächlich funktionell relevante Expression von GlyR $\alpha$ 1.

Für den D1-Zelltyp wurden aufgrund seines seltenen Auftretens zu wenige Ergebnisse erhalten.

### 3.3.2) Glyzinrezeptoruntereinheit $\alpha$ 2 (GlyR $\alpha$ 2)

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob Ganglienzellen glyzinerge Synapsen erhalten, bei denen die  $\alpha$ 2-Untereinheit aggregiert ist. Hierbei konnte bei den Zelltypen B3<sub>inner</sub> und B3<sub>outer</sub> (siehe Abbildung 3.13 C) Kolokalisation festgestellt werden. Diese fiel jedoch keineswegs so prominent aus wie im Falle von GlyR $\alpha$ 1. Dies gilt mit Einschränkungen auch für die Zelltypen C3 (siehe Abbildung 3.14 C), B2 und B4 (siehe Abbildungen 3.13 B bzw. 3.13 D). Für den B2-Zelltyp ist der Datenumfang nicht groß genug, da er in der GFP-O-Maus sehr selten GFP-markiert vorkommt, und der B4-Typ scheint nur geringe Mengen an GlyR $\alpha$ 2 zu exprimieren. Die Kolokalisation der B3-Zellen sei am Beispiel des Subtyps B3<sub>inner</sub> in Abbildung 3.21 illustriert, dabei weisen einige Pfeilspitzen beispielhaft auf GlyR $\alpha$ 2-Punkte hin, die auf den Dendriten der Ganglienzelle liegen.



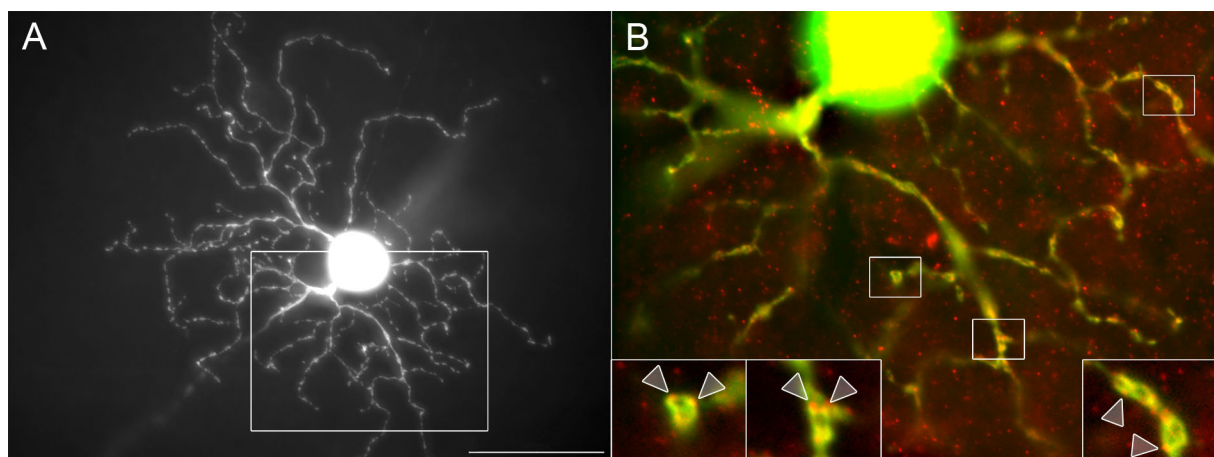
**Abbildung 3.21: Kolokalisation einer B3<sub>inner</sub>-Ganglienzelle mit GlyR $\alpha$ 2**

**A:** z-Achsen-Projektion des konfokalen Bilderstapels zweier benachbarter Ganglienzellen im Aufsichtpräparat, die obere gehört dem Typ B3<sub>inner</sub> an; Balkenlänge 100  $\mu$ m; **B:** Einzelaufnahme eines Ausschnittes der in A gezeigten Zelle (grün) mit GlyR $\alpha$ 2 (rot) bei höherer Vergrößerung, die Pfeile weisen auf GlyR $\alpha$ 2-Punkte hin, die mit den Dendriten der Ganglienzelle kolokalisiert sind

### 3.3.3) Glyzinrezeptoruntereinheit $\alpha 3$ (GlyR $\alpha 3$ )

Wie die analog zu 3.3.1 und 3.3.2 durchgeführten Studien für GlyR $\alpha 3$  zeigen, wird diese Glyzinrezeptoruntereinheit bevorzugt von den Ganglienzelltypen B3<sub>inner</sub>, B4 (siehe Abbildung 3.13 C bzw. D), und D2 (siehe Abbildung 3.15 E und F) exprimiert. Auch die Zelltypen C4 (siehe Abbildung 3.14 D) und D1 (siehe Abbildung 3.15 A-D) scheinen GlyR $\alpha 3$  zu exprimieren, es gelten jedoch die gleichen Einschränkungen wie in 3.3.2. Der Zelltyp D1 wurde sehr selten gesehen, folglich ist der Datenumfang sehr gering. Für C4-Ganglienzellen gilt, wie für alle C-Zellen, daß die geringe Anzahl der von ihnen exprimierten Glyzinrezeptoren immunhistochemisch nicht überzeugend sichtbar gemacht werden kann.

Auch für GlyR $\alpha 3$  ist zu sagen, daß die Datenlage insgesamt nicht an die Klarheit der GlyR $\alpha 1$ -Untersuchung heranreicht. Im folgenden (Abbildung 3.22) sei dennoch die Kolokalisation am Beispiel des Zelltyps B3<sub>inner</sub> demonstriert.



**Abbildung 3.22: Kolokalisation einer B3<sub>inner</sub>-Ganglienzelle mit GlyR $\alpha 3$**

**A:** Fluoreszenzaufnahme einer B3<sub>inner</sub>-Ganglienzelle im Aufsichtspräparat; **B:** Aufnahme des in A markierten Bereiches der gezeigten Zelle (grün) mit GlyR $\alpha 3$  (rot) mit höherer Vergrößerung, einzelne Details sind höher vergrößert dargestellt und die Pfeilspitzen markieren GlyR $\alpha 3$ -Punkte, die mit den Dendriten der Ganglienzelle kolokalisiert sind; Balkenlänge 50  $\mu\text{m}$

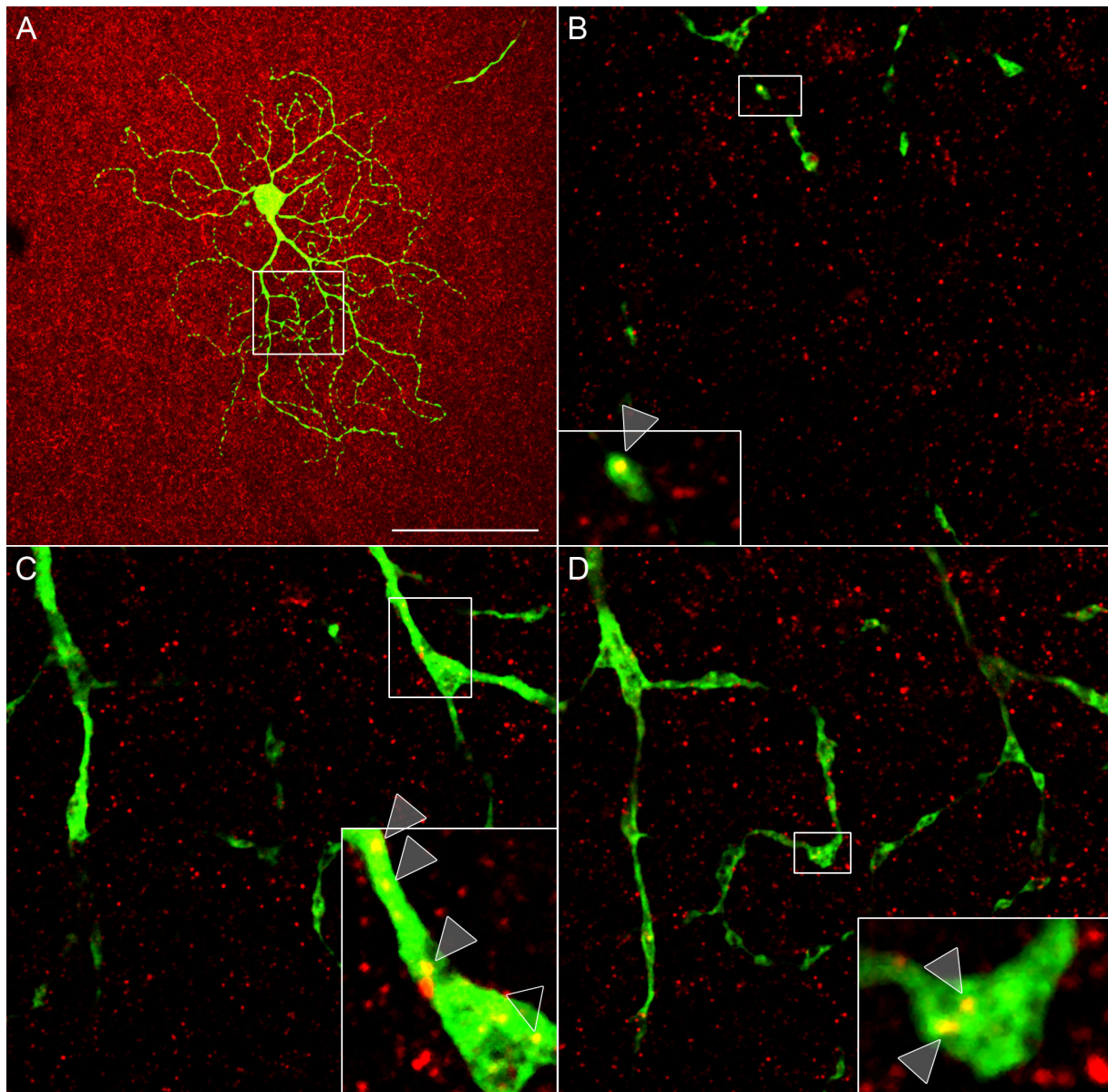
### 3.3.4) Glyzinrezeptoruntereinheit $\alpha 4$ (GlyR $\alpha 4$ )

GlyR $\alpha 4$  zeigte sehr geringe bis mäßige Kolokalisation mit den verschiedenen Ganglienzelltypen, wiederum war sie für keinen Zelltyp so prominent wie im Falle von GlyR $\alpha 1$  bei den A-Typ-Ganglienzellen.

Die Zelltypen A1, A2<sub>inner</sub> (siehe Abbildung 3.12 A bis E) und B3<sub>inner</sub> (siehe Abbildung 3.13 C) waren mäßig, die Typen A2<sub>outer</sub> (siehe Abbildung 3.12 F), B3<sub>outer</sub>, B4 (siehe Abbildung 3.13 C und D), C2<sub>inner</sub>, C3, C4, C5 (siehe Abbildung 3.14 B bis E) und D2 (siehe Abbildung 3.15 E und F) wenig mit GlyR $\alpha 4$  assoziiert. So

gut wie überhaupt keine Kolo­kalisierung fand sich bei den Zelltypen B1 (siehe Abbildung 3.13 A), C1, C2<sub>outer</sub> (Abbildung 3.14 A und B) und D1 (Abbildung 3.15 A bis D). Aufgrund ihres seltenen Vorkommens liegen für die Typen B2 (Abbildung 3.13 B) und C6 (Abbildung 3.14 F) mit GlyR $\alpha$ 4 keine Daten vor.

Abbildung 3.23 illustriert die mäßige Kolo­kalisierung des B3<sub>inner</sub>-Ganglienzelltyps mit GlyR $\alpha$ 4.



**Abbildung 3.23: Kolo­kalisierung einer B3<sub>inner</sub>-Ganglienzelle mit GlyR $\alpha$ 4**

**A:** z-Achsen Projektion eines konfokalen Bilderstapels einer B3<sub>inner</sub>-Ganglienzelle (grün) mit GlyR $\alpha$ 4 (rot) im Aufsichtpräparat; **B bis D:** Einzelbilder eines konfokalen Bilderstapels aus der in A umrahmten Region bei höherer Vergrößerung, einzelne Details vergrößert dargestellt; Balkenlänge 50 µm

Zusammenfassend ist zu sagen, daß eine deutliche Spezifität nur für die Ganglienzelltypen A1, A2<sub>inner</sub>, A2<sub>outer</sub> und B1 gezeigt werden konnte, die klar GlyR $\alpha$ 1

exprimieren. Gleichzeitig besitzen diese Zelltypen, wenn überhaupt, nur geringe Mengen an GlyR $\alpha$ 2 und GlyR $\alpha$ 3. Die A-Ganglienzellen exprimieren zusätzlich GlyR $\alpha$ 4, dies allerdings deutlich weniger prominent als GlyR $\alpha$ 1. Der B1-Typ hingegen scheint seinen glyzinergeren Eingang ausschließlich über GlyR $\alpha$ 1 zu erhalten.

Ganz im Gegensatz dazu verfügen beispielsweise B3<sub>inner</sub>-Ganglienzellen über ein gemischtes Glyzinrezeptorreperoire, das alle 4  $\alpha$ -Untereinheiten umfaßt.

### 3.4) Amakrinzelltypen der GFP-O-Maus

Die Amakrinzellen der Maus wurden bislang noch nicht morphologisch klassifiziert. Auch für die anderen Säuger sind vielfach keine umfassenden Beschreibungen der unterschiedlichen Amakrinzellen publiziert (Ratte: Menger et al. 1998, Perry und Walker 1980; Kaninchen: MacNeil et al. 1999; Erdhörnchen: Linberg et al. 1996; Katze: Kolb et al. 1981; Affe: Polyak 1941, Boycott und Dowling 1969; Mensch: Kolb et al. 1992). In der Netzhaut der GFP-O-Maus waren sporadisch Amakrinzellen angefärbt, wobei es sich durchweg um Zellen mit kleinen Dendritenbäumen handelte. Sie wurden in der vorliegenden Arbeit klassifiziert, und es wurde gezeigt, daß es sich um glyzinerge Zellen handelt. Die Zellen können wie folgt beschrieben werden:

Die in 3.24 A gezeigte Zelle stratifiziert in S1 und S2/3, also hauptsächlich in der OFF-Sublamina der IPL, ähnlich dem „Typ 2“ der Ratte (Menger et al. 1998), der „A1“ bzw. „A2“ in der Katze (Kolb et al. 1981) und dem „Flag A“ Typ im Kaninchen MacNeil et al. 1999). Morphologische Entsprechungen finden sich auch in allen anderen oben genannten Spezies. Sie sei in der Maus als A<sub>s</sub>1-2/3 bezeichnet (**A** – Amakrinzelle; <sub>s</sub> – small; **1-2/3** – Stratifizierung innerhalb der IPL).

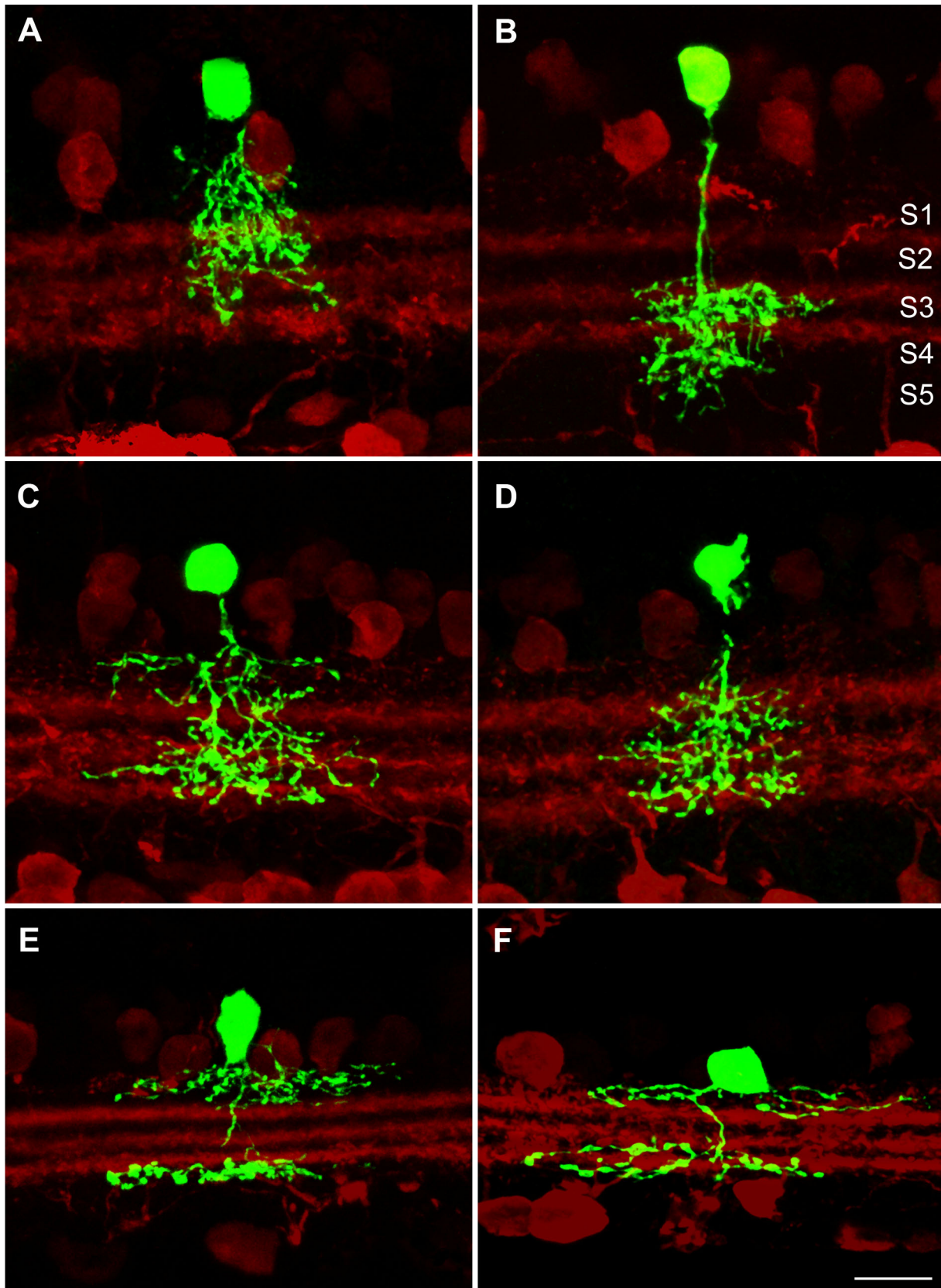
Das Gegenstück dazu scheint die Zelle in B (A<sub>s</sub>3-4/5) zu bilden – ihre Dendriten befinden sich in der ON-Sublamina der IPL (S3 und S4/5). Sie besitzt kein exaktes Pendant in der Ratte – am ehesten könnte sie dem „Typ 4“ entsprechen - und scheint der „Flag B“ Zelle im Kaninchen sowie der „A5/A6“-Zelle in der Katze, dem „knotty type 3“ (Polyak 1941) bzw. „stratified diffuse“ (Boycott und Dowling 1969) im Affen äquivalent zu sein.

Die in 3.24 C abgebildete Zelle (A<sub>s</sub>1-3/4) stratifiziert diffus – ihre Dendriten erstrecken sich von S1 bis S3/4, sie findet keine offensichtliche Entsprechung in der Ratte, ähnelt aber der „narrow diffuse“ Zelle im Kaninchen, welche MacNeil et al. als



Äquivalent zu Mengers „Typ 5“ ansehen. Beide stratifizieren aber von S1 bis S5, somit sind sie lediglich näherungsweise mit dem hier vorgestellten Typ vergleichbar. Auch für die Zelle in D konnten keine exakten Äquivalente in Ratte und Kaninchen identifiziert werden. Sie stratifiziert hauptsächlich in S2 und S3, und kommt am ehesten Mengers „Typ 3“ nahe, im Kaninchen entspräche dies der „AB diffuse 1“ und der „A3“ in der Katze.

Der Zelltyp in 3.24 E wurde zuerst in der Katze beschrieben (Kolb 1981) und ist in der Literatur allgemein als „A8“ bekannt. Er ist bistratifiziert und besitzt sowohl in S1 als auch in S4 je einen Dendritenbaum ( $A_s1+4$ ). Die Übergänge zu der in F gezeigten Zelle sind fließend, möglicherweise handelt es sich sogar um den gleichen Typ. In ihrer jeweils extremen Ausprägung werden jedoch Unterschiede offenbar. So sind bei der A8 Amakrinzelle klassischerweise die Dendriten in der ON-Sublamina der IPL deutlich dicker und knotiger als die in der OFF-Sublamina, was auf die Zelle in F ganz offensichtlich nicht zutrifft. Hier wirken beide Dendritenbäume morphologisch sehr ähnlich. Darüber hinaus erstreckt sich ihr ON-Dendritenbaum mit in S3 ( $A_s1+3/4$ ), im Gegensatz zur A8, bei der dieser ausschließlich S4 okkupiert.



**Abbildung 3.24: small-field Amakrinzelltypen im Vertikalschnitt der Retina als z-Achsenprojektionen konfokaler Bildserien**

**A:** Amakrinzelle, stratifiziert in S1-S2/3; **B:** Amakrinzelle, stratifiziert in S3-S4/5; **C:** Amakrinzelle, stratifiziert in S1-S3/4; **D:** Amakrinzelle, stratifiziert in S2-S3; **E:** Amakrinzelle, stratifiziert in S1 und S4; **F:** Amakrinzelle, stratifiziert in S1 und S3/4; Balkenlänge 10  $\mu\text{m}$

### **3.5) Verteilung der Glyzinrezeptoruntereinheiten auf verschiedenen Typen von small-field Amakrinzellen**

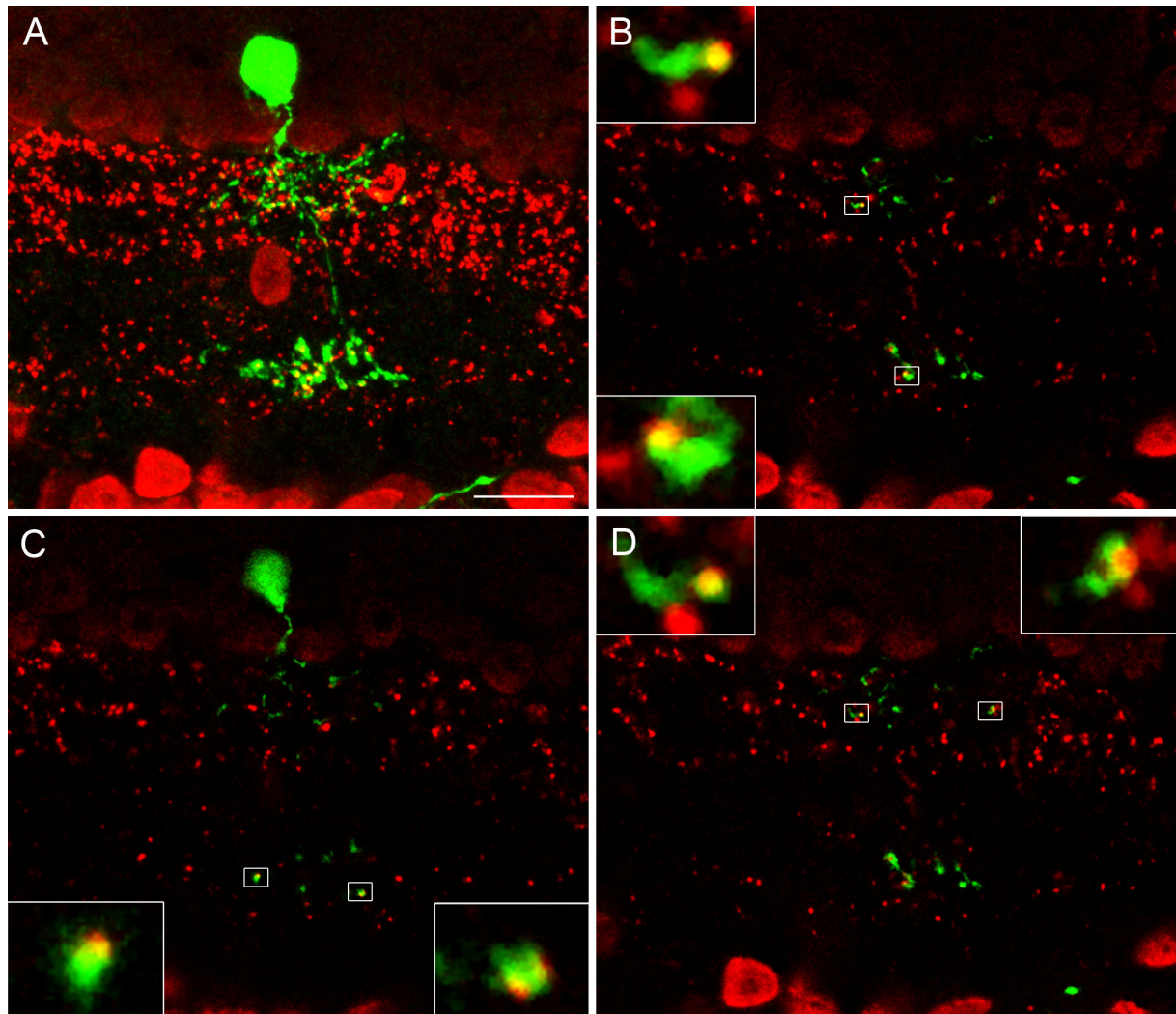
Alle in der Retina der GFP-O-Maus sporadisch markiert auftretenden Typen von Amakrinzellen besitzen kleine dendritische Felder und sind glyzinerg. Sie kommen also als präsynaptische Elemente an glyzineren Synapsen vor, und physiologische Untersuchungen zeigen, daß sie auch selbst Glyzinrezeptoren exprimieren (Frech et al. 2001). Zu möglicherweise vorliegenden Subtyp-Spezifitäten verschiedener Typen glyzinerger Amakrinzellen liegen bislang keine Daten vor. In dieser Arbeit wurde systematisch untersucht, welcher Typ von Amakrinzelle mit welcher GlyR-Untereinheit assoziiert ist. Dazu wurden vertikale Dickschnitte von GFP-O-Maus-Retinae angefertigt und wiederum Doppelfärbungen gegen die 4 GlyR $\alpha$ -Untereinheiten und GFP durchgeführt. Einschränkend ist zu sagen, daß mit Hilfe der Lichtmikroskopie, selbst konfokal, nicht eindeutig zwischen prä- und postsynaptischer Assoziation unterschieden werden kann. In Falle der unvollständigen Überlappung der Rezeptorfärbung mit den Dendriten der Amakrinzellen wird eine postsynaptische Lokalisation des Rezeptors als wahrscheinlicher betrachtet. Bei vollständiger Überlagerung hingegen erscheinen beide Möglichkeiten gleich wahrscheinlich.

#### **3.5.1) Glyzinrezeptoruntereinheit $\alpha 1$ (GlyR $\alpha 1$ )**

Von allen untersuchten Amakrinzelltypen war lediglich die A8-Amakrinzelle mit GlyR $\alpha 1$  assoziiert (Abbildung 3.25). Diese Kolo-kalisation fand sich innerhalb beider Dendritenbäume. Dabei läßt sich nicht eindeutig sagen, ob GlyR $\alpha 1$  von ihr exprimiert wird oder auf dem postsynaptischen Neuron lokalisiert ist. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß beide Varianten vorkommen, die Überlappung der Rezeptorcluster mit den Dendriten der A8-Amakrinzelle ist aber nur selten vollständig, so daß in der Mehrzahl der Fälle von einer postsynaptischen Lokalisation des Rezeptors auszugehen ist. Zweifelsfrei abklären läßt sich dies allerdings nur mit Hilfe der Elektronenmikroskopie.

Die A8- ist also nach der AII-Amakrinzelle (Sassoé-Pognetto et al. 1994) die zweite glyzinerge Amakrinzelle, für die eine Assoziation mit GlyR $\alpha 1$  anatomisch gezeigt werden konnte. Die Tatsache, daß alle anderen in dieser Arbeit beschriebenen glyzineren Amakrinzellen nicht mit GlyR $\alpha 1$  assoziiert waren, weist darauf hin, daß

sie nicht synaptisch mit Bipolarzellen verschaltet sind. Diese erhielten dann ihren glyzineren Eingang ausschließlich von AII- und A8-Amakrinzellen.



**Abbildung 3.25: A8-Amakrinzelle (grün) mit GlyR $\alpha$ 1 (rot) im Vertikalschnitt**

**A:** A8-Amakrinzelle als z-Achsenprojektion eines konfokalen Bilderstapels, Balkenlänge 10  $\mu$ m;

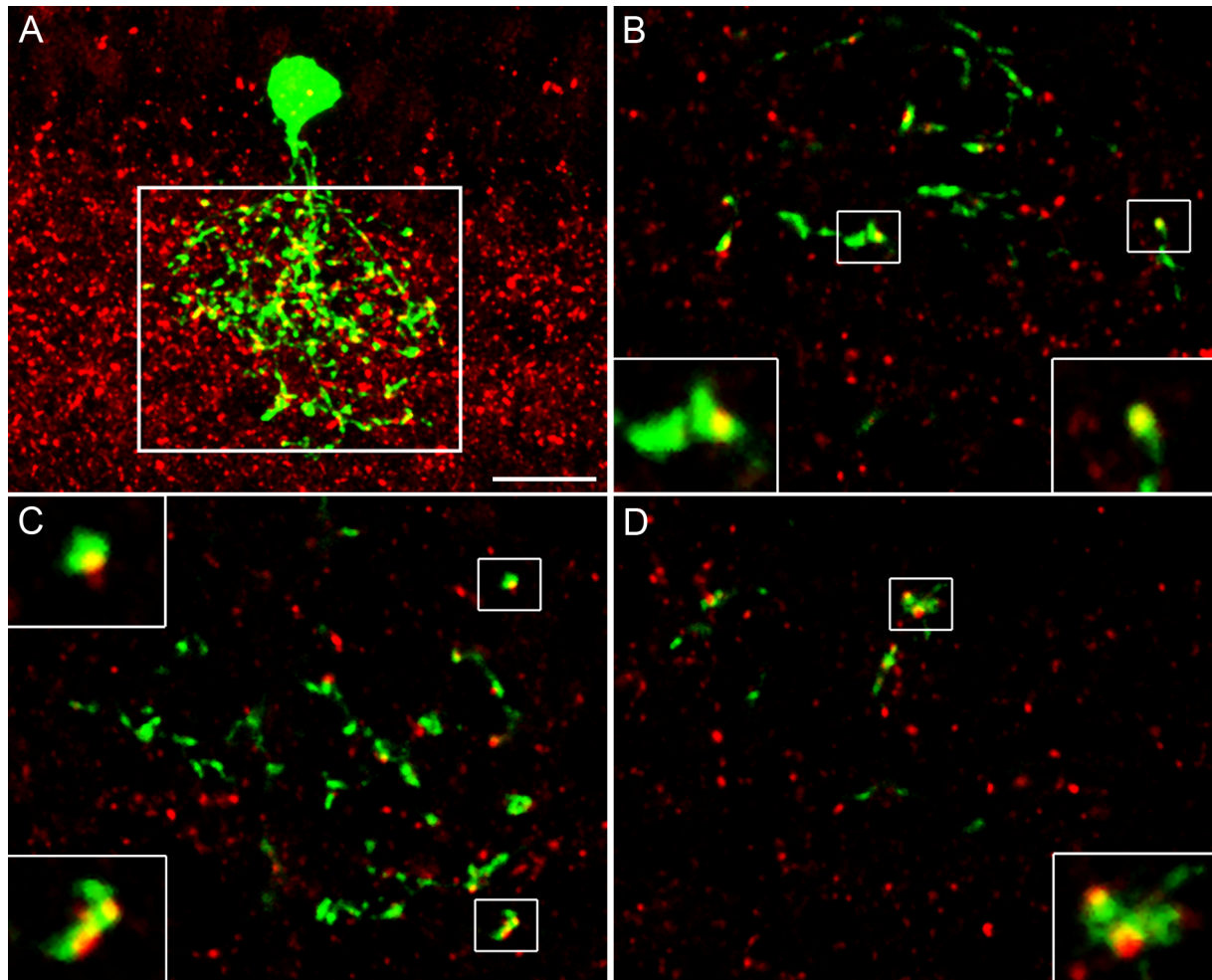
**B-D:** ausgewählte Einzelbilder dieses Stapels, einzelne Details sind vergrößert dargestellt, sie zeigen Beispiele für die Assoziation von GlyR $\alpha$ 1 mit den Dendriten der A8-Amakrinzelle, die Überlappung der Punkte mit den Dendriten ist meist nicht vollständig, was auf eine postsynaptische Lokalisation des Rezeptors hindeutet

### 3.5.2) Glyzinrezeptoruntereinheit $\alpha$ 2 (GlyR $\alpha$ 2)

Völlig anders stellt sich die Lage bei GlyR $\alpha$ 2 dar. Diese Untereinheit ist mit allen in der GFP-O-Maus gefundenen Amakrinzelltypen assoziiert.

Dies sei am Beispiel des Zelltyps A<sub>s</sub>1-3/4 demonstriert (Abbildung 3.26). Die Bilder zeigen sowohl scheinbar postsynaptisch assoziierte Rezeptorcluster als auch möglicherweise direkt auf der Zelle exprimierte Rezeptorcluster (zum Beispiel Abbildung 3.26 B unten rechts). Wie schon mehrfach einschränkend erwähnt, kann

die Lichtmikroskopie die Frage nach der genauen Lokalisation des Rezeptors allerdings nicht zweifelsfrei beantworten.



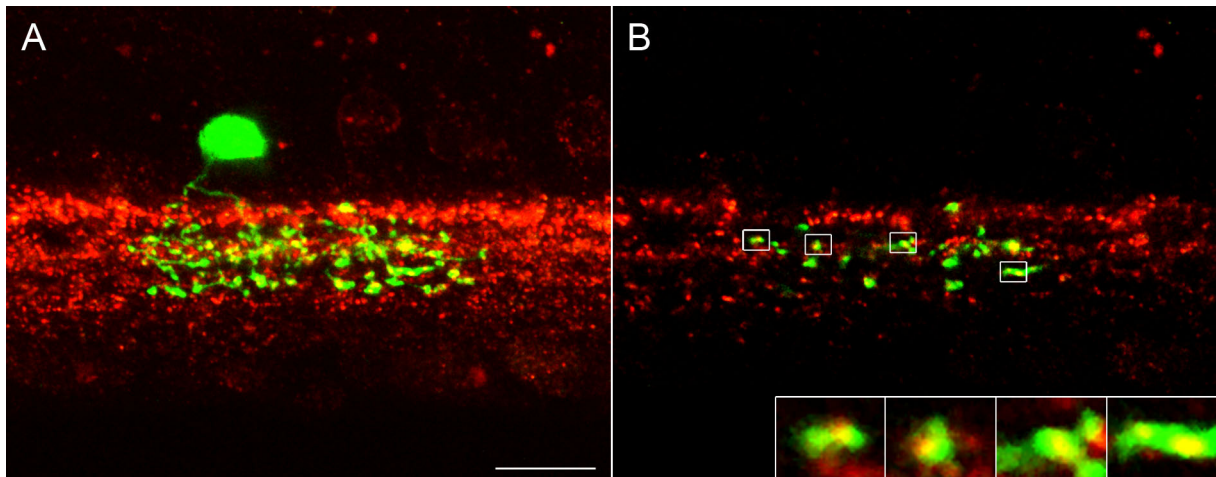
**Abbildung 3.26: A<sub>s</sub>1-3/4 (grün) mit GlyRa2 (rot) im Vertikalschnitt**

**A:** A<sub>s</sub>1-3/4 als z-Achsenprojektion eines konfokalen Bilderstapels, Balkenlänge 10 µm; **B-D:** Ausschnitte ausgewählter Einzelbilder dieses Stapels, einzelne Details sind vergrößert dargestellt, sie zeigen die sowohl partielle (C und D) als auch vollständige (B) Überlappung von GlyRa2-Punkten mit den Dendriten der Amakrinzelle

### 3.5.3) Glyzinrezeptoruntereinheit α3 (GlyRa3)

Ähnliches wie für GlyRa2 gilt für GlyRa3 – alle beschriebenen Amakrinzellen mit Ausnahme des Typs A<sub>s</sub>3-4/5 sind mit GlyRa3 assoziiert. Hinsichtlich der prä- bzw. postsynaptischen Lokalisation bestehen die gleichen Unklarheiten wie in 3.5.2.

Allein lichtmikroskopisch beurteilt, scheinen die GlyRa3-Cluster sowohl auf der Zelle exprimiert als auch postsynaptisch zu ihr vorzukommen, da sowohl völlige als auch nur teilweise Überlappung des Rezeptors mit der Zelle zu beobachten ist (Abbildung 3.27). Beispielhaft sei die Kolokalisation einer A<sub>s</sub>2-3 mit GlyRa3 gezeigt.



**Abbildung 3.27: A<sub>s</sub>2-3 (grün) mit GlyRα3 (rot)**

**A:** A<sub>s</sub>1-3/4-Amakrinzelle als z-Achsenprojektion eines konfokalen Bilderstapels, Balkenlänge 10 μm;

**B:** ausgewähltes Einzelbild dieses Stapels, die einzelnen unten vergrößert dargestellten Details zeigen die sowohl völlige als auch partielle Überlappung von GlyRα3-Punkten mit der Zelle

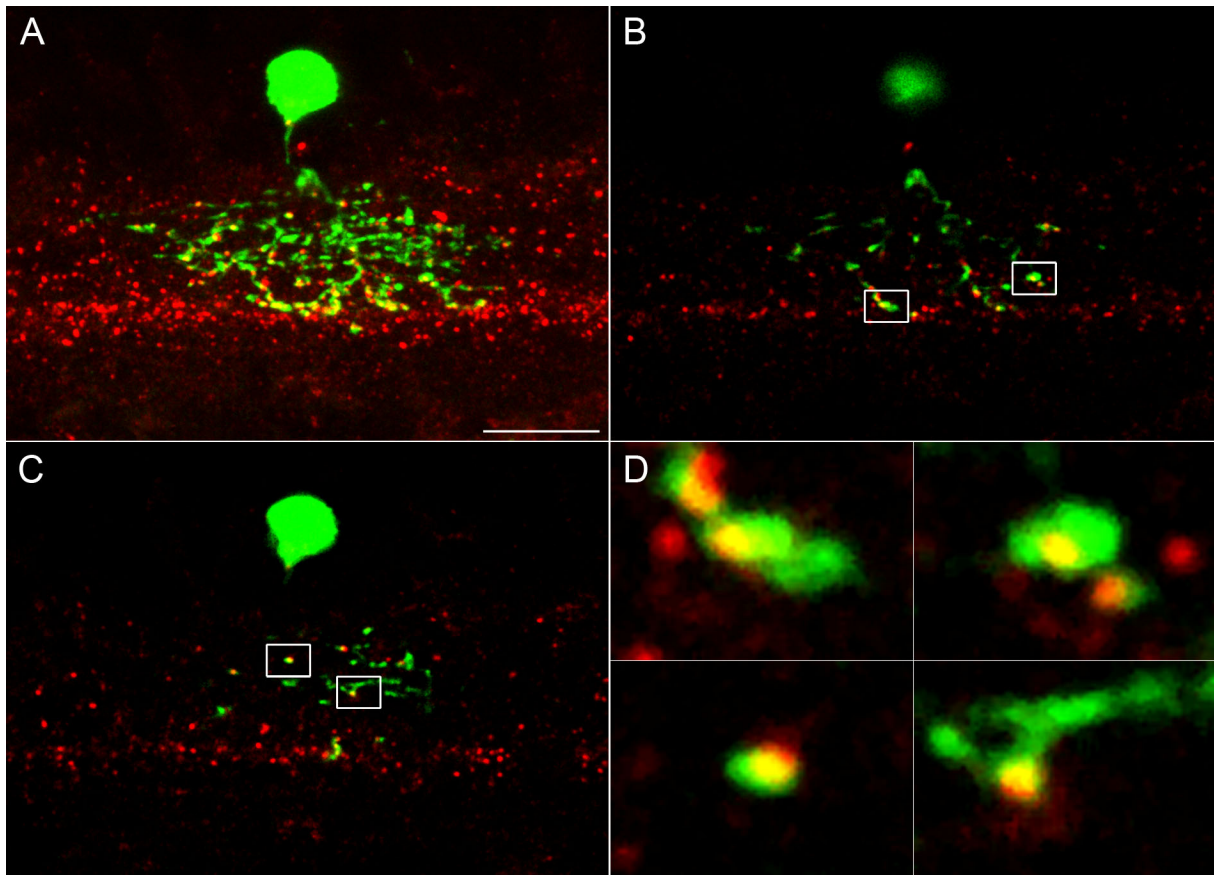
### 3.5.4) Glyzinrezeptoruntereinheit α4 (GlyRα4)

GlyRα4 ist - wie GlyRα2 – mit allen in Abbildung 3.24 gezeigten glyzinergen Amakrinzelltypen assoziiert. Wiederum ist lichtmikroskopisch nicht eindeutig aufzulösen, ob die Rezeptorcluster auf der Zelle exprimiert oder postsynaptisch zu ihr lokalisiert sind.

Abbildung 3.28 zeigt das Beispiel einer A<sub>s</sub>2-3 mit GlyRα4, deren Dendriten sowohl komplett (siehe Abbildung 3.28 D oben rechts) als auch nur partiell mit den GlyRα4-Punkten überlappen.

Die Untersuchung der Verteilung der verschiedenen GlyR-Untereinheiten auf glyzinergen Amakrinzellen lieferte zusammengefaßt das folgende Ergebnis: ausschließlich die A8-Amakrinzelle war mit GlyRα1 assoziiert und ist neben der All-Amakrinzelle die einzige bisher beschriebene Zelle, die präsynaptisch zu Bipolarzellen beschrieben wurde.

Im Gegensatz dazu waren alle hier beschriebenen Amakrinzelltypen mit GlyRα2 und GlyRα4 assoziiert. Ähnlich verhielt es sich bei GlyRα3. Hier bildete allerdings der Zelltyp A<sub>s</sub>3-4/5 eine Ausnahme, der keine Assoziation mit dieser Untereinheit zeigte.



**Abbildung 3.28: As2-3 (grün) mit GlyRα4 (rot)**

**A:** A<sub>s</sub>2-3 als z-Achsenprojektion eines konfokalen Bilderstapels; Balkenlänge 10 µm; **B** und **C:** ausgewählte Einzelbilder dieses Stapels, **D:** Details aus B und C vergrößert dargestellt, sie zeigen Beispiele für komplette (oben rechts) und teilweise Überlappung der Rezeptorfärbung mit den Dendriten der Amakrinzelle

### **3.6) Verteilung der Glyzinrezeptoruntereinheiten auf dopaminergen, cholinergen und den vesikulären Glutamattransporter 3 exprimierenden Amakrinzellen**

Neben den in der GFP-O-Maus markiert vorliegenden Typen von glyzinerger Amakrinzellen gibt es weitere Amakrinzelltypen, deren Populationen mit Antikörpern gegen spezifisch von ihnen exprimierte Proteine angefärbt werden können und so der Analyse ihres Glyzinrezeptorbesatzes zugänglich sind. Sowohl dopaminerge als auch cholinerge Amakrinzellen lassen sich mit Antikörpern gegen Enzyme markieren, die für die Synthese ihrer Neurotransmitter benötigt werden. Beide Zelltypen enthalten zusätzlich zu Dopamin bzw. Acetylcholin auch GABA als Neurotransmitter (Brecha et al. 1988, Vaney und Young 1988, Wässle und Chun 1988). Der dritte Amakrinzelltyp, der in dieser Arbeit mit Hilfe eines Zellmarkers auf

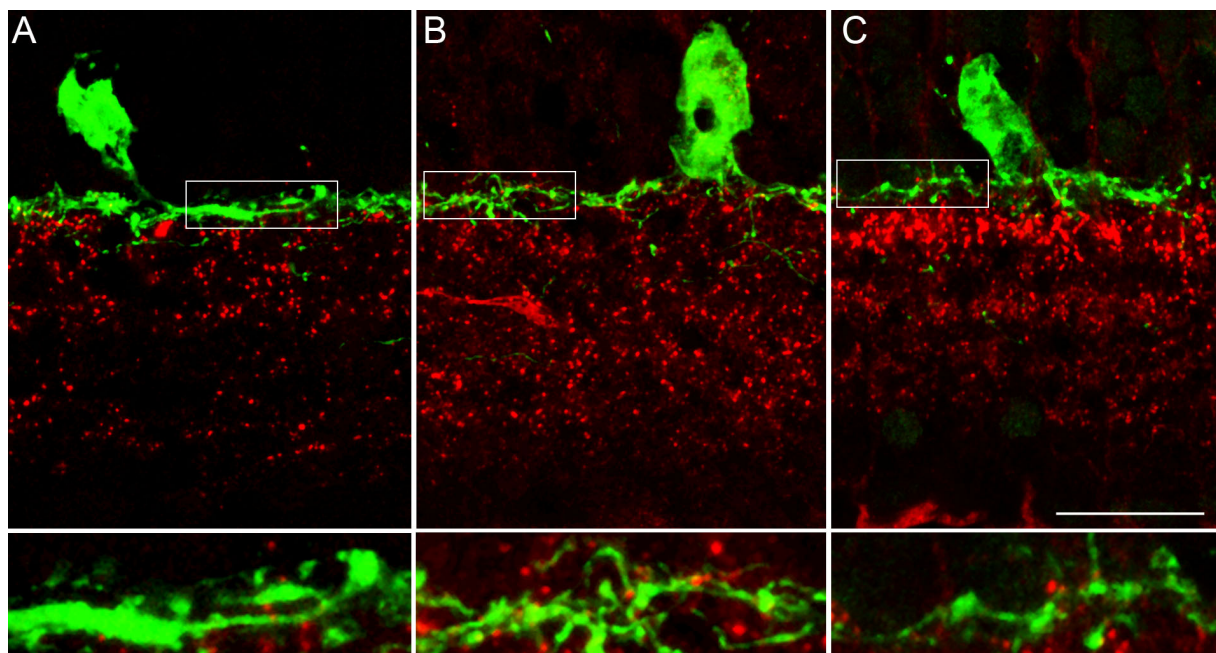
seine Assoziation mit Glyzinrezeptoren untersucht wurde, enthält den vesikulären Glutamattransporter 3 und ist glyzinerg.

### 3.6.1) Dopaminerge Amakrinzellen

Dopaminerge Amakrinzellen lassen sich spezifisch mit Antikörpern gegen das für die Biosynthese ihres Neurotransmitters benötigte Enzym **Tyrosinhydroxylase (TH)** markieren. TH katalysiert die Hydroxylierung der Aminosäure Tyrosin zu L-Dopa, welches im nächsten Schritt durch das Enzym Dopa-Decarboxylase zu Dopamin umgesetzt wird.

Dopaminerge Amakrinzellen stratifizieren in der OFF-Sublamina der IPL (S1), besitzen eine charakteristische Morphologie und spielen eine wichtige Rolle bei Lichtadaptationsvorgängen innerhalb des Stäbchenweges (Witkovsky 2004). Ihre Transmitterfreisetzung wird sowohl durch GABA als auch durch Glyzin moduliert (Gustincich et al. 1997).

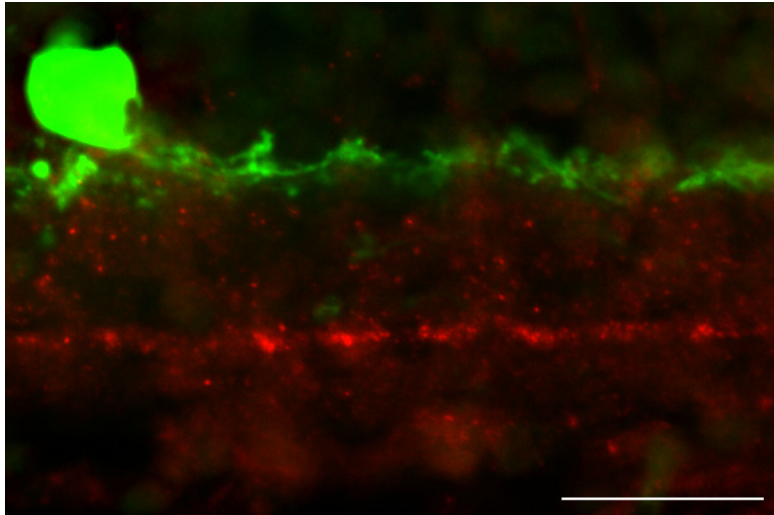
In der vorliegenden Arbeit wurde anatomisch allerdings mit keiner der 4 GlyR $\alpha$ -Untereinheiten eine Kolokalisation gesehen (Abbildungen 3.29 und 3.30).



**Abbildung 3.29: TH mit GlyR $\alpha$ -Untereinheiten im Vertikalschnitt als z-Achsenprojektionen konfokaler Bilderstapel**

**A:** TH (grün) mit GlyR $\alpha$ 1 (rot); **B:** TH (grün) mit GlyR $\alpha$ 2 (rot); **C:** TH (grün) mit GlyR $\alpha$ 3 (rot); vergrößerte Ausschnitte aus A-C jeweils darunter, es wird deutlich, daß die Dendriten der dopaminergen Amakrinzellen in keiner Weise mit GlyR $\alpha$ 1, GlyR $\alpha$ 2 und GlyR $\alpha$ 3 assoziiert sind; Balkenlänge für A-C 20  $\mu$ m





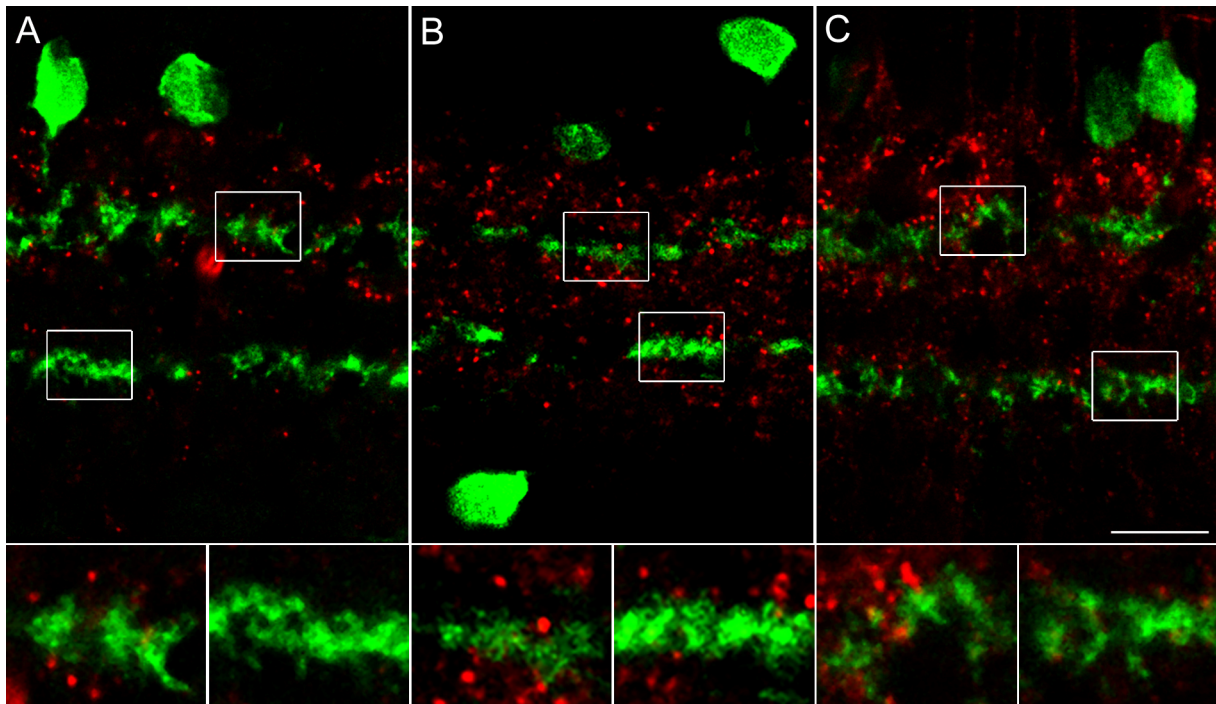
**Abbildung 3.30: TH mit GlyR $\alpha$ 4 im Vertikalschnitt als z-Achsenprojektion eines fluoreszenzmikroskopisch aufgenommenen Bilderstapels**  
 TH (grün) mit GlyR $\alpha$ 4 (rot); die Dendriten der dopaminergen Amakrinzelle sind eindeutig nicht mit GlyR $\alpha$ 4 kolokalisiert.  
 Balkenlänge 20  $\mu$ m

Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß die von Gustincich und Kollegen beschriebenen durch Glyzin verursachten Effekte über extrasynaptische Glyzinrezeptoren vermittelt werden, die die Immunhistochemie nicht abzubilden vermag.

### **3.6.2) Cholinerge Amakrinzellen („Starburst“ Amakrinzellen)**

Analog zu den dopaminergen Amakrinzellen lassen sich die cholinergen Amakrinzellen über die Detektion eines für die Synthese ihres Neurotransmitters Acetylcholin benötigten Enzyms darstellen. Dies geschieht mit Antikörpern gegen **Cholinacetyltransferase (ChAT)**, die, wie ihr Name schon andeutet einen Acetylrest auf Cholin überträgt. Eine andere in der Literatur übliche Bezeichnung, die mehr auf die Morphologie dieser Zellen abhebt, lautet „*starburst*“-Amakrinzellen. Sie kommen als spiegelsymmetrische Paare vor und stratifizieren bei etwa 20 % (OFF-Zellen) bzw. 60 % (ON-Zellen) der IPL. Dabei befinden sich die Zellkörper der OFF-cholinergen Amakrinzellen in der INL, wohingegen die des ON-Typs ektopisch in der Ganglienzellschicht liegen. Die cholinergen Amakrinzellen sind wichtiger Bestandteil des Netzwerkes, das Richtungsselektivität vermittelt (Vaney und Taylor 2002). Dieses wurde bisher nicht mit dem glyzineren System in Verbindung gebracht. In der vorliegenden Arbeit sollte näher untersucht werden, ob die cholinergen Amakrinzellen dennoch Glyzinrezeptoren exprimieren und wenn ja, welche Untereinheit dabei involviert ist.

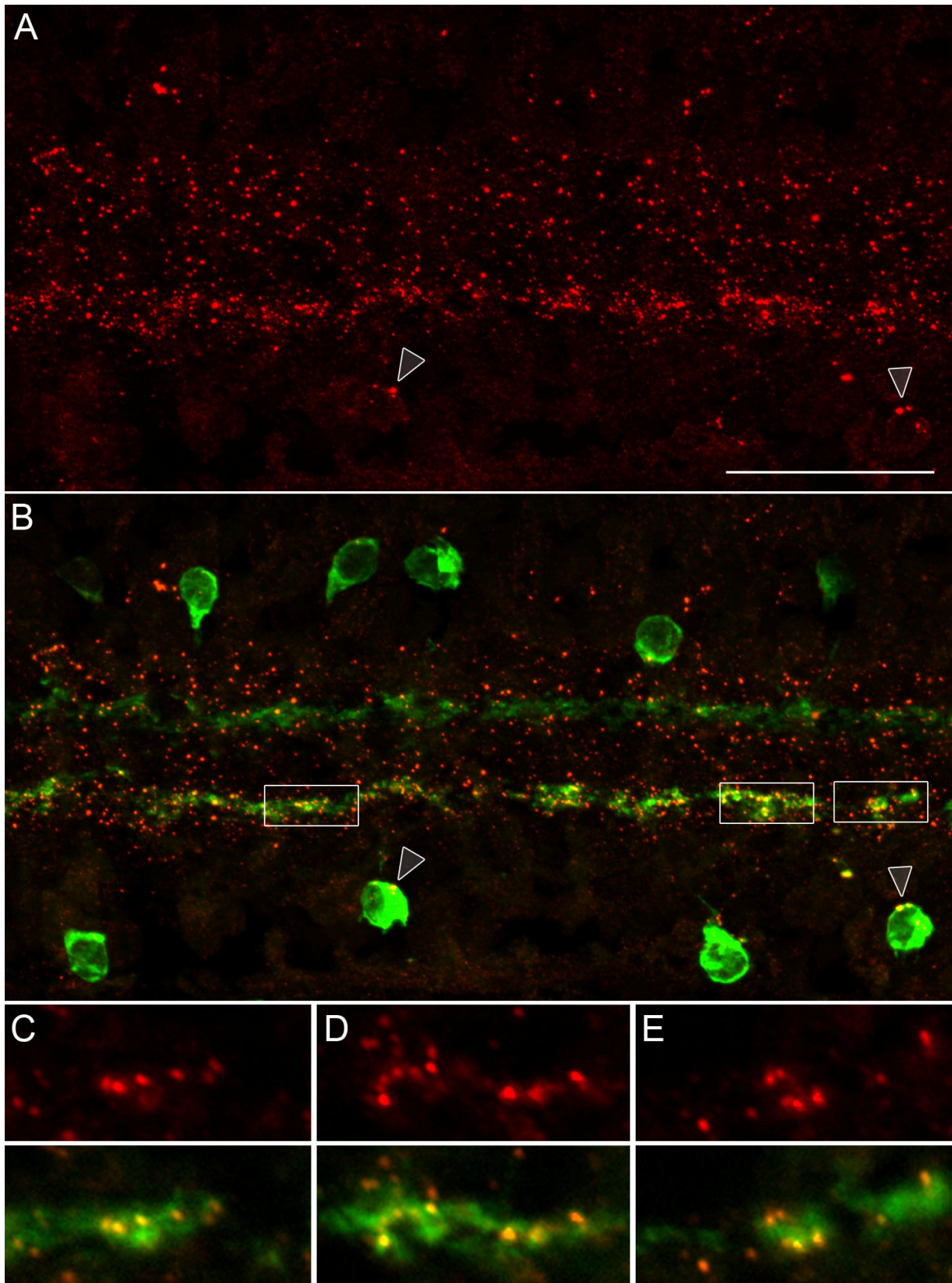
Diese Untersuchungen haben ergeben, daß die cholinergen Amakrinzellen weder GlyR $\alpha$ 1, noch GlyR $\alpha$ 2 oder GlyR $\alpha$ 3 exprimieren (Abbildung 3.31).



**Abbildung 3.31: ChAT mit GlyR $\alpha$ -Untereinheiten im Vertikalschnitt als konfokale Aufnahmen**  
**A:** ChAT (grün) mit GlyR $\alpha$ 1 (rot); **B:** ChAT (grün) mit GlyR $\alpha$ 2 (rot); **C:** ChAT (grün) mit GlyR $\alpha$ 3 (rot);  
 Balkenlänge für A-C 10  $\mu$ m; vergrößerte Ausschnitte aus A-C jeweils darunter

Im Gegensatz dazu ist GlyR $\alpha$ 4 deutlich mit den cholinergen Amakrinzellen assoziiert (Abbildung 3.32), und da sie selbst nicht glyzinerg sind, ist von einer post-synaptischen Lokalisation auszugehen, d. h. sie erhalten synaptischen Eingang von glyzinergen Amakrinzellen. Auffällig ist, daß lediglich die ON-cholinergen Amakrinzellen diese Untereinheit zu exprimieren scheinen. Das prominente Band, das GlyR $\alpha$ 4 an der Grenze zwischen S3 und S4 ausbildet, fällt komplett mit den Dendriten des ON-Typs der cholinergen Amakrinzellen zusammen, während der OFF-Typ keine Kolo-kalisation mit dieser Glyzinrezeptoruntereinheit zeigt. Der OFF-Typ scheint generell keinerlei glyzinergen Eingang zu bekommen, da auch mit GlyR $\alpha$ 1, GlyR $\alpha$ 2 und GlyR $\alpha$ 3 keine Assoziation gesehen wurde.

Abbildung 3.31 zeigt außerdem, daß auch die in der Ganglienzellschicht gelegenen Zellkörper der ON-cholinergen Amakrinzellen synaptischen Eingang über GlyR $\alpha$ 4 erhalten (Pfeile).



**Abbildung 3.32: ChAT (grün) mit GlyRα4 (rot) im Vertikalschnitt**

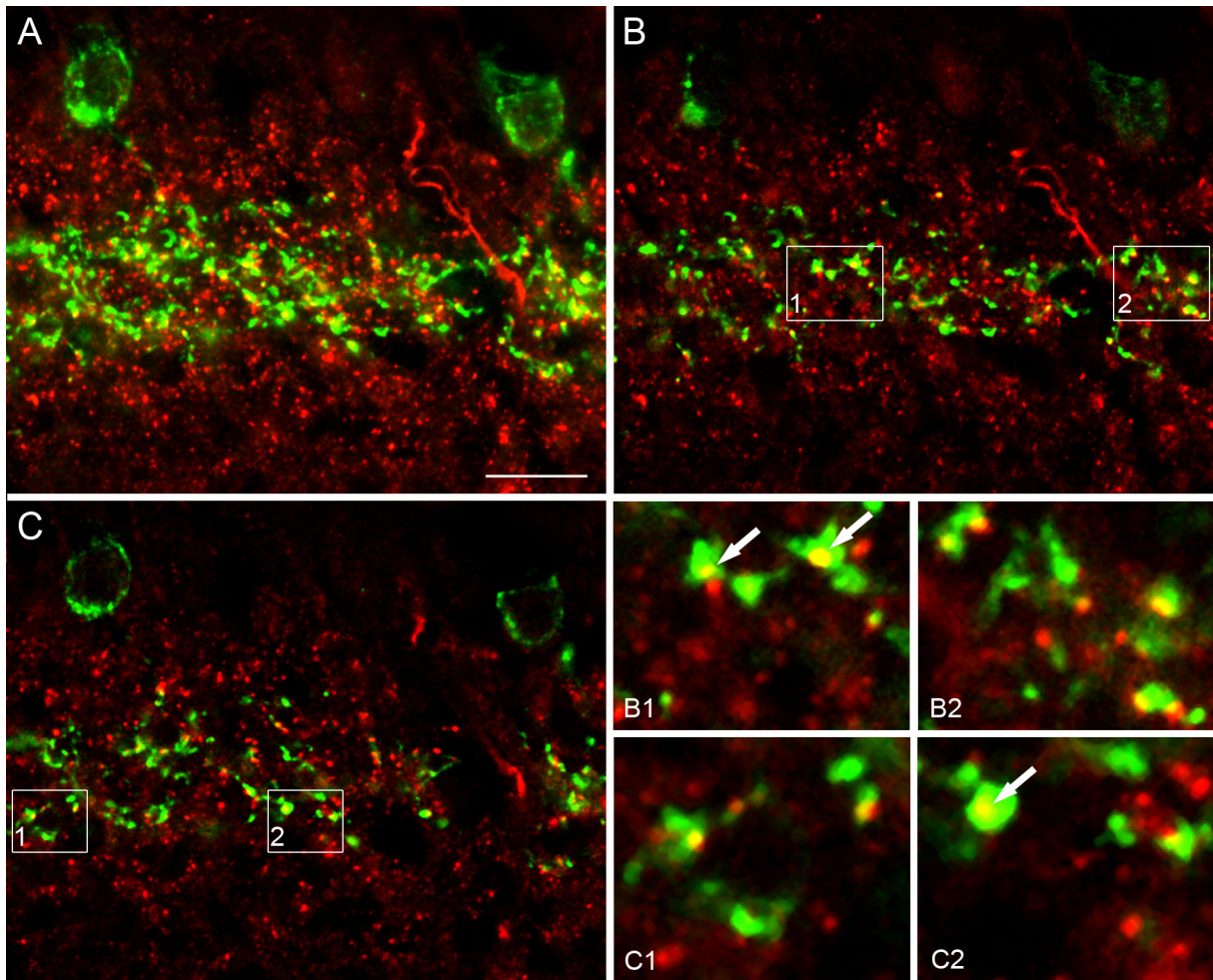
**A:** GlyRα4; z-Achsenprojektion eines Bilderstapels von Fluoreszenzaufnahmen; Balkenlänge 50 μm;  
**B:** ChAT (grün) mit GlyRα4 (rot) als z-Achsenprojektion eines Bilderstapels von Fluoreszenzaufnahmen; **C-E:** umrahmte Details aus einem Einzelbild des in A und B projizierten Bilderstapels vergrößert dargestellt, sie zeigen deutlich, daß viele der GlyRα4-Punkte mit den Dendriten der ON-cholinergen Amakrinzellen zusammenfallen, roter Kanal und Überlagerung sind separat dargestellt

### **3.6.3) Amakrinzellen die den vesikulären Glutamattransporter 3 exprimieren**

Dieser Zelltyp wurde aufgrund seiner Immunreaktivität für den vesikulären **Glutamattransporter 3** (vGluT3) entdeckt, und lässt sich folglich mit Antikörpern gegen diesen Transporter spezifisch markieren (Fremeau et. al. 2002, Haverkamp und Wässle 2004, Johnson et. al. 2004). Seine Dendriten verzweigen sich in zwei Bändern in der Mitte der IPL und enthalten Glyzin als Neurotransmitter. Ob diese Amakrinzellen auch Glutamat ausschütten, wie sich in Anbetracht Expression des vesikulären Glutamattransporters vermuten lässt, ist bislang unklar. vGluT3-exprimierende Amakrinzellen sind mit GlyR $\alpha$ 2 assoziiert (Abbildung 3.33, Haverkamp und Wässle 2004) und vermutlich auf dem postsynaptischen Neuron exprimiert. Da es sich bei den vGluT3-positiven Amakrinzellen um glyzinerge Neurone handelt, ist diese postsynaptische Assoziation durchaus plausibel. Abbildung 3.33 zeigt allerdings auch Beispiele (weiße Pfeile in B1 und C2), in denen die Rezeptorfärbung mit den markierten Dendriten völlig überlappt und eine Expression dieser GlyR-Untereinheit durch die vGluT3-Zellen nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Aufklärung der konkreten Lokalisation ist wiederum, wenn überhaupt, nur mit elektronenmikroskopischen Doppelmarkierungen möglich.

Mit GlyR $\alpha$ 1, GlyR $\alpha$ 3 und GlyR $\alpha$ 4 konnte keine Kolokalisation festgestellt werden (nicht gezeigt).



**Abbildung 3.33: vGluT3 mit GlyRα2 im Vertikalschnitt**

**A:** vGluT3 (grün) mit GlyRα2 (rot) als Projektion eines konfokalen Bilderstapels; **B** und **C:** Einzelbilder aus diesem Stapel; **B1-C2:** die vergrößerten Bildausschnitte aus B und C zeigen die teilweise und manchmal auch völlige (Pfeile) Überlappung der GlyRα2-Punkte mit den Dendriten der Amakrinzellen; Balkenlänge für A-C 10  $\mu\text{m}$

### 3.7) Quantifizierung der Dichte der GlyR $\alpha$ -Untereinheiten in den Mauslinien *Gla1<sup>spd-ot</sup>* (*Oszillator*), *Gla2<sup>-/-</sup>* und *Gla3<sup>-/-</sup>*

Bei einer molekularen Vielfalt von 4 verschiedenen Genen für GlyR $\alpha$ -Untereinheiten stellt sich die Frage, welche Auswirkungen es hat, wenn eine dieser Untereinheiten genetisch ausgeschaltet wird. Werden die anderen Untereinheiten diesen Verlust kompensieren?

Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Retinae verschiedener GlyR-*knockout*-Mauslinien untersucht.

### 7.1) *Oszillator*-Maus

Die *Oszillator*-Maus ist eine natürlich vorkommende Mutante, deren GlyR $\alpha$ 1-Untereinheit aufgrund einer Rastermutation [engl. *frameshift*: Genmutation mit Verschiebung des Ableserasters der DNA] auf Proteinebene praktisch nicht mehr vorhanden ist (Kling et al. 1997). Diese Maus stirbt zwischen dem postnatalen Tag 16 (P16) und P21 (Buckwalter et al. 1994), dem Zeitraum, in dem die glyzineren Synapsen im Rückenmark von GlyR $\alpha$ 2 auf GlyR $\alpha$ 1 umgestellt werden und der Defekt in der GlyR $\alpha$ 1-Untereinheit folglich zutage tritt (Becker et al. 1988).

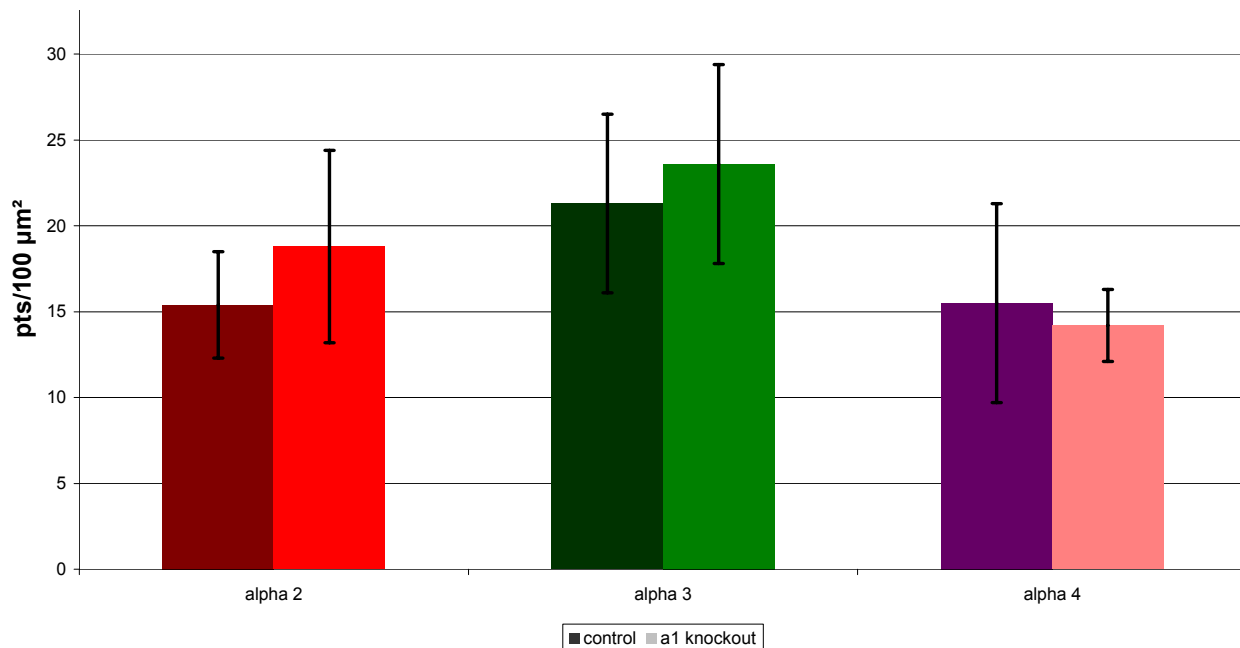
Aus diesem Befund wird bereits deutlich, daß der Verlust von GlyR $\alpha$ 1 im Rückenmark der Maus offenbar nicht ausreichend kompensiert werden kann.

Die hier beschriebenen Untersuchungen wurden an den Retinae juveniler *Oszillator*-Mäuse (P16 – P19) durchgeführt, und die Daten wurden mit den Ergebnissen von Kontrolltieren (Wildtyp C57/B6) des gleichen Alters verglichen.

In den *Oszillator*-Mäusen war im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung der Dichte der synaptischen GlyR $\alpha$ 2-Punkte um 23,2 % zu beobachten, während sich die Anzahl der GlyR $\alpha$ 3- und GlyR $\alpha$ 4-Punkte quantitativ nicht signifikant vom Wildtyp unterschieden. Die Daten hierzu sind in Tabelle 3.3 genauer angegeben und in Abbildung 3.34 zusammengefaßt.

	Kontrolle	Mutante	Differenz	p	n
<b>GlyR<math>\alpha</math>2</b>	16,5 +/- 3,1	20,3 +/- 5,6	23,2 %	<b>0,03</b>	16
<b>GlyR<math>\alpha</math>3</b>	21,3 +/- 5,2	23,6 +/- 5,8	10,9 %	0,24	16
<b>GlyR<math>\alpha</math>4</b>	15,5 +/- 5,8	14,2 +/- 4,1	-8,6 %	0,46	16

**Tabelle 3.3: Quantifizierung der GlyR $\alpha$ -Untereinheiten in der *Oszillator*-Maus; p: Signifikanzgrad erhalten aus einem t-Test nach Student; n: Anzahl der Stichproben**



**Abbildung 3.34: graphische Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabelle 3.3**

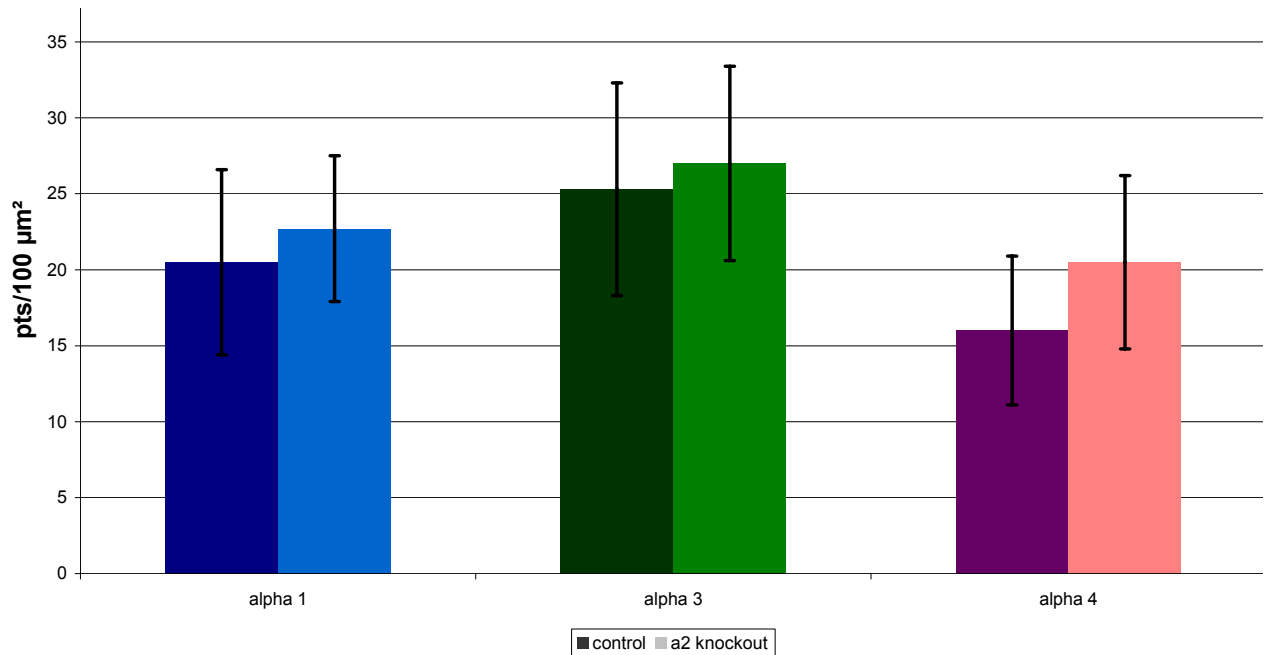
**y-Achse:** Anzahl von Rezeptorclustern (Punkte pro 100 μm<sup>2</sup>); Quantifizierung der Glyzinrezeptorfärbungen für GlyRa2 (rot), GlyRa3 (grün) und GlyRa4 (violett), der jeweils dunklere Farbton symbolisiert den Wildtyp, der hellere Farbton *Glr1<sup>spd/lot</sup>*

## 7.2) *Glr2<sup>-/-</sup>*-Maus

Die Deletion dieser Untereinheit erfolgte gentechnisch (Gregory O'Sullivan, Publikation in Vorbereitung). Diese Mäuse basierten genetisch nicht auf dem Stamm C57/B6, so daß für alle Versuche ausschließlich wildtypische Geschwistertiere aus dem gleichen Wurf als Kontrollen verwendet wurden. Generell wurden alle Daten an adulten Tieren erhoben. Sie sind in Tabelle 3.4 wiedergegeben. Die plastische Untereinheit war hier GlyRa4, die signifikant um 28 % hochreguliert war. Für GlyRa1 und GlyRa3 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Abbildung 3.35 faßt diese Ergebnisse zusammen.

	Kontrolle	Mutante	Differenz	p	n
<b>GlyRa1</b>	20,5 +/- 6,1	22,7 +/- 4,8	10,9 %	0,26	16
<b>GlyRa3</b>	25,3 +/- 7	27 +/- 6,4	6,7 %	0,48	16
<b>GlyRa4</b>	16 +/- 4,9	20,5 +/- 5,7	28 %	<b>0,02</b>	16

**Tabelle 3.4: Quantifizierung der GlyRa-Untereinheiten in der *Glr2<sup>-/-</sup>*-Maus; p: Signifikanzgrad erhalten aus einem t-Test nach Student; n: Anzahl der Stichproben**



**Abbildung 3.35: graphische Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabelle 3.4**

**y-Achse:** Anzahl von Rezeptorclustern (Punkte pro 100 μm<sup>2</sup>); Quantifizierung der Glyzinrezeptorfärbungen für GlyRa1 (blau), GlyRa3 (grün) und GlyRa4 (violett), der jeweils dunklere Farbton symbolisiert den Wildtyp, der hellere Farbton *Gla2*<sup>-/-</sup>

### 7.3) *Gla3*<sup>-/-</sup>-Maus

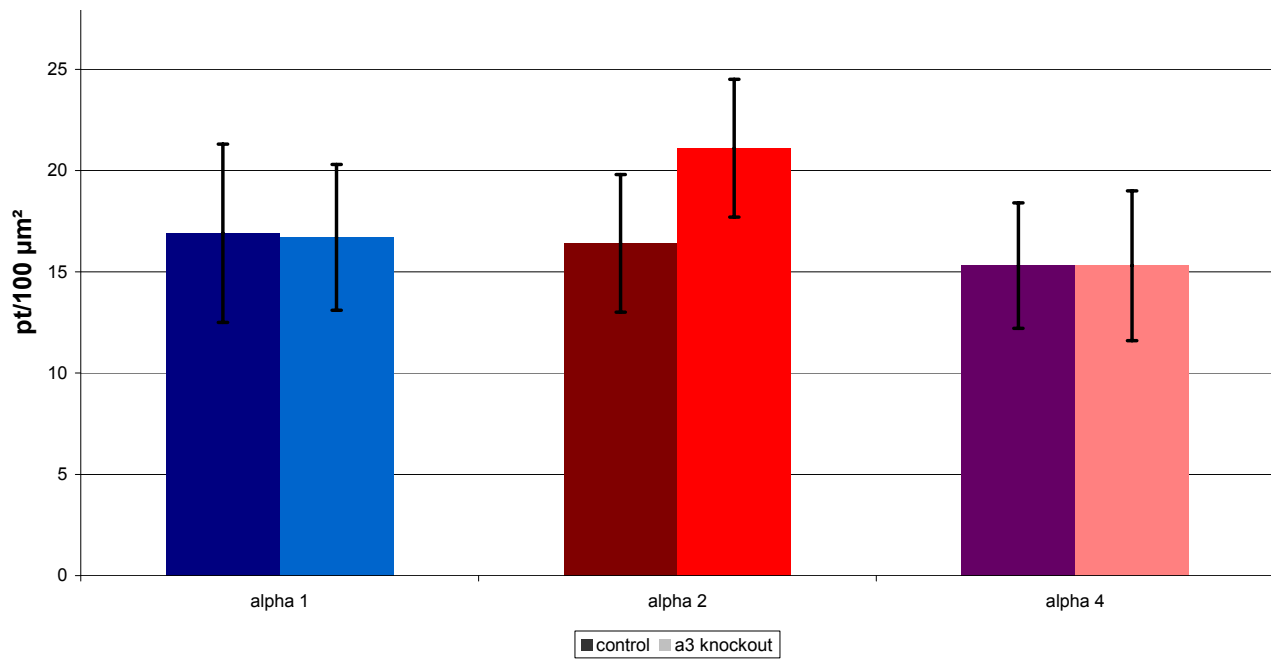
Die *Gla3*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden durch homologe Rekombination und anschließende CRE-vermittelter Deletion generiert (Harvey et. al. 2004). Die Untersuchung wurde an adulten Tiere durchgeführt, als Kontrollen dienen gleichaltrige Tiere des Stammes C57/B6, auf dem die *Gla3*<sup>-/-</sup>-Mäuse genetisch basieren.

Wie bei der *Oszillator*-Maus wurde hier eine signifikante Hochregulation von GlyRa2 gesehen, während GlyRa1 und GlyRa4 unverändert blieben (siehe Tabelle 3.5 und Abbildung 3.36).

	Kontrolle	Mutante	Differenz	p	n
<b>GlyRa1</b>	16,9 +/- 4,4	16,7 +/- 3,6	1,3 %	0,87	16
<b>GlyRa2</b>	16,1 +/- 3,4	20,7 +/- 3,4	28,3 %	<b>0,0007</b>	16
<b>GlyRa4</b>	15,3 +/- 3,1	15,3 +/- 3,7	0,6 %	0,93	16

**Tabelle 3.5: Quantifizierung der GlyRa-Untereinheiten in der *Gla3*<sup>-/-</sup>-Maus; p:** Signifikanzgrad erhalten aus einem t-Test nach Student; **n:** Anzahl der Stichproben





**Abbildung 3.36: graphische Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabelle 3.5**

**y-Achse:** Anzahl von Rezeptorclustern (Punkte pro  $100 \mu\text{m}^2$ ); Quantifizierung der Glyzinrezeptorfärbungen für GlyR $\alpha$ 1 (blau), GlyR $\alpha$ 2 (rot) und GlyR $\alpha$ 4 (violett), der jeweils dunklere Farbton symbolisiert den Wildtyp, der hellere Farbton *Glr3*<sup>-/-</sup>

In den Oszillator- und den *Glr3*<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte sich eine signifikante Hochregulation der GlyR $\alpha$ 2-Untereinheit um 23,2 bzw. 28,3 %. In der *Glr2*<sup>-/-</sup>-Maus hingegen war GlyR $\alpha$ 4 signifikant um 28 % erhöht. Diese Ergebnisse zeigen, daß eine Kompensation prinzipiell stattfindet und daß GlyR $\alpha$ 2 und GlyR $\alpha$ 4 dabei die plastischen Untereinheiten sind.

## 4) Diskussion

### 4.1) GlyR $\alpha$ 4

In der vorliegenden Arbeit wurde die  $\alpha$ 4-Untereinheit des Glyzinrezeptors erstmals mit Hilfe eines Antikörpers nachgewiesen. Harvey und Kollegen (2000) konnten in der adulten Mausretina mittels *in-situ*-Hybridisierung keine für diese Untereinheit kodierende RNA detektieren. Umso überraschender war der positive Befund auf Proteinebene, der letztendlich den Anlass gab, die *in situ*-Hybridisierungen zu wiederholen, die dieses Mal erfolgreich durchgeführt werden konnten. Sowohl in der INL als auch in der GCL konnte die entsprechende RNA detektiert werden, was sich mit der Verteilung des daraus translatierten Proteins deckt. Der gegen den C-Terminus des GlyR $\alpha$ 4-Proteins gerichtete polyklonale Antikörper erkennt, wie in dieser Arbeit gezeigt, spezifisch sein Antigen, ohne mit anderen GlyR $\alpha$ -Untereinheiten kreuzzureagieren. Die synaptische Lokalisation des durch ihn markierten Antigens kann durch Kolokalisation mit Gephyrin und Bassoon sowie die im Elektronenmikroskop gesehene Membranassoziation als gegeben betrachtet werden. Damit ist die Beschreibung der verschiedenen auf Genebene identifizierten Glyzinrezeptoruntereinheiten in der Retina komplett und die lange bestehende Unklarheit bezüglich der generellen Existenz einer vierten  $\alpha$ -Untereinheit geklärt. Das menschliche *Gira4*-Gen enthält nachweislich ein Stopcodon (Simon et al. 2004) und wird folglich nicht transkribiert. Aus diesem Grund gilt es allgemein als Pseudogen. In der Maus jedoch wird es offensichtlich transkribiert. Dieser Umstand wirft die Frage auf, warum Zebrafisch (Imboden et al. 2001), Maus und Ratte (Matzenbach et al. 1994) eine Glyzinrezeptoruntereinheit mehr besitzen als beispielsweise der Mensch. *Gira4* entstand wahrscheinlich durch Genduplikation aus *Gira2* und vermutlich auch bereits in einem gemeinsamen Vorfahren von Mensch und Maus (Matzenbach et al. 1994), während die Entwicklung bei den Teleosten<sup>5</sup> unabhängig von den Säugetieren verlief (Imboden 2001). Dies spricht dafür, daß *Gira4* beim Menschen nachträglich deaktiviert wurde. Damit ist aber nicht beantwortet, warum es nicht benötigt wird. Zur Klärung dieser Frage wäre die Kenntnis der genauen Funktion und Lokalisation von GlyR $\alpha$ 4 im gesamten ZNS vonnöten. Weiteren Aufschluss könnte auch die Generierung einer *Gira4-knockout*-Maus geben.

In dieser Arbeit wurde die Kolokalisation von GlyR $\alpha$ 4 mit anderen GlyR $\alpha$ -Untereinheiten untersucht und eine etwa 32 %ige Kolokalisation mit GlyR $\alpha$ 2 gezeigt.

---

<sup>5</sup> Knochenfische

Dies war die deutlichste Assoziation, die bei verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten des Glyzinrezeptors gesehen wurde (Haverkamp et al. 2003, 2004). Möglicherweise spielt dabei die oben angesprochene Genduplikation eine Rolle. Zum Teil hat GlyR $\alpha$ 4 andere Funktionen übernommen als GlyR $\alpha$ 2 ehemals hatte. Der an gemeinsamen Synapsen exprimierte Teil könnte allerdings ein Relikt aus der Zeit der Genverdoppelung sein.

Um die synaptische Lokalisation von GlyR $\alpha$ 4 zu belegen, wurden Doppelfärbungen gegen GlyR $\alpha$ 4 und dem, gegen alle GlyR-Untereinheiten gerichteten, mAb4a durchgeführt. Es zeigte sich jedoch kaum Kolokalisation, was darauf hinweist, daß GlyR $\alpha$ 4 von mAb4a nur sehr schwach erkannt wird. Dies deutete sich bereits im Westernblot an, wo die von mAb4a erkannte GlyR $\alpha$ 4-Bande nur bei höheren Belichtungszeiten zutage trat. Bereits in einer früheren Arbeit von Haverkamp und Kollegen (2003) wurde deutlich, daß mAb4a offenbar nicht alle Glyzinrezeptoren erkennt, da die Anzahl der mit ihm markierten Synapsen geringer war als die Summe der Synapsen, die GlyR $\alpha$ 1 und GlyR $\alpha$ 3 enthielten. Aus diesem Grund war mAb4a zur Untersuchung der synaptischen Lokalisation von GlyR $\alpha$ 4 untauglich und als Alternativen wurden Gephyrin und Bassoon herangezogen. Gephyrin wurde an Glyzin- (Kirsch und Betz 1995) und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Sassoé-Pognetto und Wässle 1997) nachgewiesen und aus diesem Grund als postsynaptischer Marker gewählt. Auffällig war, daß weniger als 50 % der GlyR $\alpha$ 4-Cluster Kolokalisation mit Gephyrin zeigten. Dies läßt sich vermutlich darauf zurückführen, daß der verwendete Antikörper (mAb7a) nicht alle Splice-Varianten des Gephyrinproteins erkennt, wie sich bereits an glyzinerigen Synapsen auf Bipolarzellen zeigte (Sassoé-Pognetto et al. 1994). Man geht davon aus, daß an jenen glyzinerigen Synapsen, an denen keine Gephyrin-Färbung detektierbar war, Gephyrin dennoch exprimiert ist. Denn wie aus Studien an Gephyrin *knockout*-Mäusen hervorgeht, ist Gephyrin für die synaptische Ansammlung und Fixierung der Glyzinrezeptoren unabdingbar (Fischer et al. 2000). Darüberhinaus repräsentieren nicht alle in der Immunfärbung erscheinenden Punkte synaptisch lokalisiertes Gephyrin, sondern manche von ihnen auch innerhalb von Dendriten gelegene Transportvesikel (Maas et al. 2006).

Analog dazu wurde die Kolokalisation von GlyR $\alpha$ 4 mit Bassoon untersucht. Bassoon ist ein präsynaptisches Zytomatrixprotein (tom Dieck et al. 1998), das sowohl an exzitatorischen als auch an inhibitorischen Synapsen im Zentralnervensystem inklusive der Retina (Brandstätter et al. 1999, Dick et al. 2001) exprimiert wird. Aus

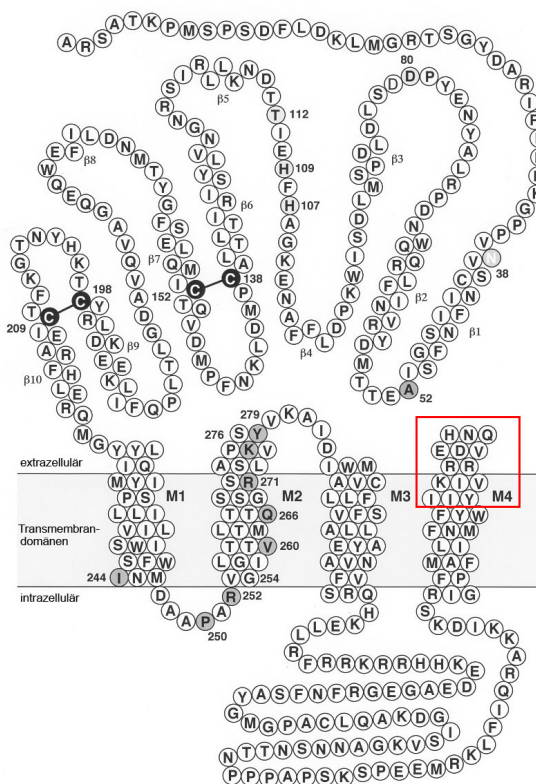
diesem Grund wurde es hier als präsynaptischer Marker eingesetzt. Etwa die Hälfte der GlyR $\alpha$ 4-Cluster fielen mit Bassoon zusammen, was für die synaptische Lokalisation von GlyR $\alpha$ 4 spricht. Eine 100 %ige Kolo-kalisation ist nicht zu erwarten, da Bassoon zwar an vielen, aber nicht an allen Synapsen vorkommt. Dick und Kollegen (2001) fanden für glyzinerge Synapsen<sup>6</sup> und Bassoon eine Koinzidenzrate von 73 %. Im Falle von GlyR $\alpha$ 4 mag sie deshalb niedriger liegen, weil die Punktedichte von Bassoon im Bereich der Dendriten der cholinergen Amakrinzellen erniedrigt ist (Brandstätter et al. 1999) und GlyR $\alpha$ 4 in der ON-Sublamina der IPL exakt mit den Dendriten der cholinergen Amakrinzellen zusammenfällt.

Cholinerge Amakrinzellen treten als spiegelbildliche Paare in der ON- und OFF-Sublamina der IPL auf und schütten neben Acetylcholin (Masland et al. 1984) auch GABA als Neurotransmitter aus (O'Malley et al. 1992, Zheng et al. 2004). Sie sind mit den richtungsselektiven Ganglienzellen verschaltet und unverzichtbarer Bestandteil des Netzwerkes, das Richtungsselektivität vermittelt (Vaney und Taylor 2002). Es gilt bislang als gesichert, daß das glyzinerge System der Retina nicht mit der Generation von Richtungsselektivität in Zusammenhang steht, da die Applikation von Strychnin, einem selektiven Glyzinrezeptorantagonisten, keinen messbaren Effekt auf die Richtungsselektivität der Lichtantworten richtungsselektiver Ganglienzellen hatte (Wyatt und Daw 1976). In den ON-cholinergen Amakrinzellen jedoch ruft die Applikation von Glyzin Chloridionenströme hervor (Sriparna Majumdar, persönliche Mitteilung), was sich mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten deckt. Die ON-cholinergen Amakrinzellen exprimieren GlyR $\alpha$ 4, ihre Pendanten in der OFF-Sublamina hingegen nicht. Diese Asymmetrie zwischen ON- und OFF-Verschaltungswegen ist in der Retina jedoch nichts Außergewöhnliches. Experimente von Taylor und Vaney (2002) zeigten, daß sich die ON- und OFF-Komponente der Lichtantworten richtungsselektiver Ganglienzellen unterscheiden. Ob diese Unterschiede aus der differentiellen Glyzinrezeptorexpression innerhalb der cholinergen Amakrinzellen resultieren, müßte näher untersucht werden. Es wäre auch durchaus möglich, daß zwischen der Glyzinrezeptorexpression dieser Neurone und der Richtungsselektivität des Netzwerkes kein Zusammenhang besteht. Zur Aufklärung der Rolle der Glyzinrezeptoren auf den cholinergen Amakrinzellen sind weiterführende elektrophysiologische Untersuchungen an Wildtyp- und glyzinrezeptordefizienten Mäusen unverzichtbar. Besonders bedauerlich sind in

---

<sup>6</sup> markiert mit einem Antikörper gegen alle Glyzinrezeptoruntereinheiten (mAb4a)

diesem Zusammenhang auch die nicht überzeugenden Ergebnisse der Elektronenmikroskopie. Weder mit der Pre- noch mit der Postembedding Methode ließ sich auf der Ebene der Ultrastruktur zeigen, von welchen Neuronenklassen konkret GlyR $\alpha$ 4 exprimiert wird. Das Hemmnis ist möglicherweise die Lage des Epitops, gegen das pAb GlyR $\alpha$ 4 gerichtet ist. Dieses umfaßt die letzten 14 Aminosäuren des C-Terminus, der nur wenig aus der Zellmembran herausragt. Abbildung 4.1 zeigt die Struktur von GlyR $\alpha$ 1, und da sich die  $\alpha$ -Untereinheiten des Glyzinrezeptors in ihrer Grundstruktur nur geringfügig unterscheiden, ist davon auszugehen, daß sich auch bei GlyR $\alpha$ 4 die letzten Aminosäuren des C-Terminus in unmittelbarer Membrannähe befinden, wenn nicht sogar einige von ihnen Bestandteil der 4. Transmembrandomäne sind. Damit ließe sich in jedem Falle erklären, warum Färbungen mit pAb GlyR $\alpha$ 4 nur unter Zusatz relativ hoher Detergenzkonzentrationen und bei kurzer Fixierung gute Ergebnisse liefern. Genau diese Detergenzzusätze und kurze Fixierung sind bei der Herstellung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie grundsätzlich kontraindiziert, da die Ultrastruktur des Gewebes, die bei kurzer Fixierung an sich bereits schlecht erhalten ist, durch Tenside zerstört wird.



**Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Glyzinrezeptoruntereinheit  $\alpha$ 1 (mit freundlicher Genehmigung von Bodo Laube, Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt am Main)**

Die Struktur der GlyR $\alpha$ -Untereinheiten ist hoch konserviert, deshalb wird diese Darstellung verwendet, obwohl sie GlyR $\alpha$ 1 und nicht GlyR $\alpha$ 4 zeigt. pAb GlyR $\alpha$ 4 ist gegen das rot eingrahmte Epitop gerichtet, das die 14 C-terminalen Aminosäuren beinhaltet. Im Falle von GlyR $\alpha$ 1 gehören Teile dieses Epitops zur 4. Transmembrandomäne und sind für einen Antikörper schwer zugänglich. Ein so genaues Modell existiert für GlyR $\alpha$ 4 nicht. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß der C-Terminus nicht viel weiter aus der Membran ragt als bei GlyR $\alpha$ 1, und sich das von pAb GlyR $\alpha$ 4 erkannte Epitop in unmittelbarer Membrannähe befindet.

Ein weiterer ungeklärter Punkt in Bezug auf das GlyR $\alpha$ 4-Protein ist sein auf dem Western Blot gefundenes Molekulargewicht von etwa 60 kDa. GlyR $\alpha$ 4 sollte seiner Aminosäuresequenz entsprechend bei einer Laufhöhe von ungefähr 52,5 kDa zu finden sein. Unter Berücksichtigung einer allgemeinen methodisch bedingten Ungenauigkeit der SDS-Gelelektrophorese von etwa 10 %, dem möglichen Auftreten von Migrationsanomalien (durch die Bindung geringerer Mengen SDS) und der Tatsache, daß Molekulargewichtsmarker nie absolute Werte liefern, erscheint die hier gesehene Abweichung vom theoretisch zu erwartenden Wert noch vertretbar. Dennoch muß man sich fragen, warum die anderen  $\alpha$ -Untereinheiten des Glyzinrezeptors in der Gelelektrophorese keine derartigen Anomalien zeigen. Zwar enthält der N-Terminus des GlyR $\alpha$ 4-Proteins mögliche N-Glykosylierungsstellen, es ist aber unwahrscheinlich, daß ein etwaiger N-Glykosidrest der Behandlung mit PNGase F entgangen wäre, auch wenn diese Möglichkeit, zum Beispiel aufgrund sterischer Hinderung des Enzyms, nicht völlig ausgeschlossen ist. Es bestünde ferner die Möglichkeit einer O-Glykosylierung, die nur mit erheblich größerem Aufwand nachgewiesen werden kann. Dazu wären mehrere enzymatische Schritte oder alternativ eine chemische Abspaltung des Glykosidrestes nötig, und diese Prozeduren würden das temperaturempfindliche GlyR $\alpha$ 4-Protein zerstören.<sup>7</sup> Ebenso schwer abzuklären ist die eventuelle Verknüpfung mit Lipidankern (Geranyl- oder Farnesylresten), die bei Membranproteinen durchaus nicht abwegig erscheint. Letztlich bleiben verschiedene Phosphorylierungszustände anzuführen. Auch sie können das Migrationsverhalten von Proteinen im Gel beeinflussen. Um endgültig zu beweisen, daß die im Western Blot bei etwa 60 kDa auftretende Bande dem GlyR $\alpha$ 4-Protein entspricht, müßten beispielsweise HEK-Zellen transfiziert und anschließend im Western Blot analysiert werden. Wenn die aus dieser Proteinfraction detektierte Bande die gleiche Laufhöhe zeigte wie die Bande aus der Proteinfraction der Retina, könnte als gesichert gelten, daß es sich dabei um GlyR $\alpha$ 4 handelt, auch ohne daß die Gründe für das zu hoch liegende Molekulargewicht geklärt sind.

#### **4.2) Zelltypen der GFP-O-Maus**

In den Retinae adulter GFP-O-Mäuse exprimieren einige wenige Amakrin- und Ganglienzellen GFP. Diese Zellen sind in allen morphologischen Details

---

<sup>7</sup>Bereits die 40-minütige Inkubation mit PNGase F bei 37°C resultierte in einer erheblichen Degradation des Proteins.

hervorragend markiert. Es konnten alle bisher in der Mausretina systematisch beschriebenen Typen von Ganglienzellen identifiziert werden, und viele dieser Ganglienzelltypen scheinen in den Retinae der meisten Vertebraten vorzukommen (Sun et al. 2002).

Im Falle der GFP-markierten Amakrinzellen wurden 5 Typen gefunden, und das entspricht ungefähr der Hälfte der bislang bekannten glyzinerger Amakrinzellen. Es liegt bisher keine Klassifizierung der Amakrinzellen in der Retina der Maus vor, aber auch zu den in dieser Arbeit beschriebenen Amakrinzelltypen scheint es Pendantes in den meisten diesbezüglich besser untersuchten Spezies zu geben. Ganz eindeutige Zuordnungen werden allerdings dadurch erschwert, daß frühere Publikationen die Stratifizierung der Dendriten in der IPL noch nicht genau bestimmt haben.

Über die Gründe dafür, daß in der Retina der GFP-O-Maus nur einige wenige Amakrin- und Ganglienzellen markiert sind, kann nur spekuliert werden. Da es sich bei dieser Mauslinie nicht um eine durch homologe Rekombination erzeugte *knock-in*- sondern um eine transgene Linie handelt, ist die genaue Lokalisation des *thy1*-GFP-Gens innerhalb des Genoms, von der das Expressionsmuster maßgeblich abhängt, nicht bekannt. Allein aus der Identität des Promotors *thy1* läßt sich das gefundene Expressionsmuster jedenfalls nicht erklären. In jedem Falle war die GFP-O-Mauslinie für die Bearbeitung der in dieser Arbeit zu klärenden Fragen ein sehr nützliches Werkzeug und wird künftig für weitere Untersuchungen sowohl im Bereich von Rezeptorexpressionen, der Aufklärung neuronaler Verschaltungswege und auch in der Elektrophysiologie noch an Bedeutung gewinnen. So machten sich beispielsweise Lin und Masland (2005) eine ähnliche transgene Maus zunutze (GFP-M-Linie, Feng et al. 2000), um die synaptischen Kontakte zwischen bestimmten Ganglien- und Bipolarzelltypen zu studieren, und Tian und Copenhagen (2003) benutzten für ihre Untersuchungen zur Entwicklung der Ganglienzellen die YFP-H-Mauslinie (Feng et al. 2000). In einer aktuellen Arbeit von Kim und Jeon (2006) wurde in einem aufwendigen Versuchsansatz bestimmt, welche Ganglienzelltypen das calciumbindende Protein Parvalbumin exprimieren. Dabei wurde die Retina mit einem Antikörper gegen Parvalbumin vormarkiert und anschließend einzelne der so markierten Zellen durch Mikroinjektion eines Farbstoffes sichtbar gemacht. Diese sehr zeitaufwendige Vorgehensweise hätte durch die Verwendung der GFP-O-Maus vereinfacht werden können. Mit diesem Werkzeug hätte eine schlichte Doppelfärbung von Parvalbumin mit GFP genügt.

#### **4.3) Analyse der Kollokalisierung von Glyzinrezeptoren mit einzelnen Neuronen**

Die Kollokalisierung von Glyzinrezeptorclustern mit einzelnen Neuronen der GFP-O-Maus wurde überwiegend qualitativ und nicht quantitativ untersucht. Wie die quantitative Auswertung der Kollokalisierung von Ganglienzellen mit GlyR $\alpha$ 1 deutlich zeigte, konnte durch die Quantifizierung keine zusätzliche Information gewonnen werden (Kapitel 3.3.1). Diejenigen Zellen, bei denen die Kollokalisierung mit dem bloßen Augen offensichtlich war, lieferten signifikante Werte. Bei den weniger eindeutigen Fällen wurde wegen der hohen Dichte der GlyR-Aggregate kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen korrekter und zufälliger Superposition gefunden. Gemessen an den resultierenden p-Werten exprimierte keine dieser Zellen GlyR $\alpha$ 1. Dies erscheint jedoch fragwürdig, wenn man bedenkt, daß sich bereits eine sehr geringe Zahl exprimierter Rezeptoren in physiologischen Untersuchungen bemerkbar macht. Bei den Amakrinzellen kommt erschwerend hinzu, daß noch nicht einmal bezüglich der prä- bzw. postsynaptischen Lokalisation Klarheit besteht. Folglich wurde eine rein qualitative Analyse vorgezogen, die als sorgfältige Beobachtung und Verfolgung einzelner Punkte durch den z-Stapel aller Einzelaufnahmen ausgeführt wurde. Dabei wurde ein Punkt als mit einem Dendriten assoziiert betrachtet, wenn ein Überlagerung über mindestens drei z-Ebenen<sup>8</sup> hinweg gegeben war. Endgültige Aussagen wurden ausschließlich unter Berücksichtigung der bekannten elektrophysiologischen Ergebnisse getroffen, so daß die angelegten Kriterien insgesamt als ausreichend streng zu bewerten sind.

#### **4.4) Lokalisation von GlyR $\alpha$ 1**

Die hier durchgeführten Kollokalisationsuntersuchungen offenbarten eine spezifische Expression von GlyR $\alpha$ 1 durch A1-, A2- und B1-Ganglienzellen. Außerdem zeigte sich eine Assoziation der A8-Amakrinzelle mit dieser Untereinheit. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Grünert und Ghosh (1999), die am Primaten die Kollokalisierung der P- und M-Ganglienzellen<sup>9</sup> mit GlyR $\alpha$ 1 dokumentiert haben, und den physiologischen Arbeiten zur Charakterisierung der inhibitorischen postsynaptischen Potentiale von Ganglienzellen der Mausretina (Majumdar et al., Publikation in Vorbereitung). Diese Arbeiten zeigen in A-Typ-Ganglienzellen die

---

<sup>8</sup>das entspricht einer Gesamtdistanz von etwa 1  $\mu$ m.

<sup>9</sup> P: Parasol [engl. für Sonnenschirm] -Ganglienzellen entsprechen den großen Alpha-Ganglienzellen in der Katze und im Kaninchen sowie den A-Typ-Ganglienzellen in der Maus; M: *Midget* [engl. für Zwerg] -Ganglienzellen entsprechen den kleinen Beta-Zellen der Katze, die für das hochauflösende Sehen verantwortlich sind und auch einer der B-Typ-Zellen in der Maus.



Existenz von Glyzinrezeptoren mit schneller Deaktivierung. Diese Eigenschaft wird im allgemeinen heteropentameren Glyzinrezeptoren aus  $\alpha$ 1- und  $\beta$ -Untereinheiten zugeschrieben (Takahashi et al. 1992, Bormann et al. 1993, Ivanova et al. 2006).

Etwas komplizierter ist die Situation bei Amakrinzellen, da sie sowohl post- als auch präsynaptische Partner von glyzinergeren Synapsen sind. Daraus ergibt sich das Problem einer genauen Zuordnung, das mit den Mitteln der Lichtmikroskopie nicht zu lösen ist. So kann auch im Falle der A8-Amakrinzelle mit hinreichender Zuverlässigkeit auf der Basis der hier vorliegenden Daten lediglich von einer „Assoziation“ mit GlyR $\alpha$ 1 gesprochen werden – ob sie diese Untereinheit auch tatsächlich exprimiert, bleibt offen. Es liegen aber elektronenmikroskopische Daten zu diesem Zelltyp vor. Kolb und Nelson (1996) haben die A8-Amakrinzelle der Katze im Detail rekonstruiert und ihre Eingangs- und Ausgangssynapsen beschrieben: Ihren hauptsächlich synaptischen Eingang erhält die A8-Amakrinzelle von OFF-Zapfenbipolarzellen über Glutamatrezeptoren, ihren hauptsächlich synaptischen Ausgang liefert sie über Glyzinrezeptoren an OFF-Beta-Ganglienzellen. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß die homologe Zelle der Maus in der die A8-Amakrinzelle exzitatorischen Eingang von OFF-Zapfen-Bipolarzellen erhält und ihrerseits OFF-Beta-Ganglienzellen inhibiert. Die hier vorliegenden Daten aus der Maus belegen, daß die B1-Ganglienzelle GlyR $\alpha$ 1 exprimiert und die A8-Amakrinzelle ebenfalls mit dieser Untereinheit assoziiert ist. Dazu kommt eine in der OFF-Sublamina der IPL überlappende Stratifizierung der beiden Neurone, die einen synaptischen Kontakt wahrscheinlich macht. Wenn also die B1-Ganglienzelle wie die Beta-Zelle in der Katze glyzinergeren Eingang von der A8-Amakrinzelle erhält, dann offenbar über  $\alpha$ 1 $\beta$ -heteropentamere Glyzinrezeptoren.

Es wurde eindeutig gezeigt, daß die All-Amakrinzelle sowohl mit Alpha- als auch mit Beta-Ganglienzellen synaptische Kontakte ausbildet (Kolb und Nelson 1993) und daß an diesen Synapsen GlyR $\alpha$ 1 exprimiert ist (Sassoé-Pognetto et al. 1994). Deshalb ist zu vermuten, daß ein Teil des glyzinergeren Eingangs der A- und B1-Ganglienzellen in der Mausretina auch von All-Amakrinzellen stammt.

Es bleibt eine Aufgabe für die Zukunft, die funktionellen Implikationen dieser spezifischen Glyzinrezeptorexpression zu untersuchen. In Abhängigkeit von der Art der exprimierten Glutamatrezeptoren und ihrer Kinetik sowie den zu integrierenden modulatorischen Einflüssen, muß die Kinetik der glyzinergeren Inhibition offenbar hochspezifisch angepaßt werden.

#### **4.5) Kolokalisation von Ganglienzellen mit GlyR $\alpha$ 2, GlyR $\alpha$ 3 und GlyR $\alpha$ 4**

Ganz im Gegensatz zu der bei GlyR $\alpha$ 1 gesehenen Spezifität für bestimmte Verschaltungswege und die involvierten Neurone, scheinen GlyR $\alpha$ 2, GlyR $\alpha$ 3 und GlyR $\alpha$ 4 unter den Ganglienzelltypen eher diffus exprimiert zu werden. Die meisten Zelltypen exprimieren in geringem Umfang mehrere  $\alpha$ -Untereinheiten.

Bei den C-Zellen sind die Glyzinantworten generell sehr gering (Sriparna Majumdar, unveröffentlichte Daten), was möglicherweise auf eine geringe Anzahl von Glyzinrezeptoren, die auch nicht unbedingt synaptisch vorliegen müssen, zurückzuführen ist. Einzelkanalableitungen an Glyzinrezeptoren legen nahe, daß die gemessenen Ströme von etwa 30 pA durch lediglich 5 bis 10 Kanäle hervorgerufen werden könnten. Bormann et. al. (1993) finden für in HEK293-Zellen exprimierten heterooligomeren  $\alpha$ 1 $\beta$ -Kanälen Einzelkanalleitfähigkeiten von 41 pS, was unter diesen experimentellen Umständen einem Strom von etwa 4 pA entspricht. Bei einer Ganglienzelle mit einem glyzininduzierten Strom von 30 pA sind also kaum mehr als 10 Kanäle zu erwarten. Derartig geringe Rezeptormengen sind mit immunhistochemischen Methoden im Grunde nicht abzubilden.

Die funktionelle Relevanz dieser Art von Verteilungsmuster kann die Anatomie nicht klären. Elektrophysiologische Untersuchungen an Wildtyp-Mäusen sowie an entsprechenden glyzinrezeptordefizienten Mäusen werden notwendig sein, um aufzuklären, warum einige Ganglienzellen die schnelle GlyR $\alpha$ 1-Untereinheit, die meisten anderen Ganglienzellen aber die langsameren Untereinheiten GlyR $\alpha$ 2, GlyR $\alpha$ 3 und GlyR $\alpha$ 4 exprimieren.

#### **4.6) Kolokalisation von Amakrinzellen mit GlyR $\alpha$ 2, GlyR $\alpha$ 3 und GlyR $\alpha$ 4**

Vier der 6 in dieser Arbeit gezeigten glyzinerger Amakrinzelltypen sind mit GlyR $\alpha$ 2, GlyR $\alpha$ 3 und GlyR $\alpha$ 4 assoziiert. Die A8-Amakrinzelle ist zusätzlich mit GlyR $\alpha$ 1 assoziiert, der Zelltyp A<sub>s</sub>3-4/5 hingegen liegt ausschließlich mit GlyR $\alpha$ 2 und GlyR $\alpha$ 4 assoziiert vor. Dies deutet auf eine große Vielfalt bezüglich des Expressionsmusters von Glyzinrezeptoren hin. Diese Situation spiegelt sich teilweise in den Ergebnissen der Elektrophysiologie wider (Jan Weiss, persönliche Mitteilung).

Es ist bekannt, daß die AII-Amakrinzelle über  $\alpha$ 1 $\beta$ -heteropentamere Glyzinrezeptoren OFF-Bipolarzellen hemmt (Sassoé-Pognetto et al. 1994). Elektrophysiologische Untersuchungen am Rückenmark haben ferner ergeben, daß dieser Subtyp von Rezeptor schnelle Deaktivierung zeigt (Twyman und Macdonald 1991, Krupp et al.

1994). Die Kinetik der anderen  $\alpha$ -Untereinheiten wurde bisher fast ausschließlich in heterologen Expressionssystemen studiert, in denen ausschließlich  $\alpha$ -homopentamere Glyzinrezeptoren betrachtet werden konnten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß GlyR $\alpha$ 2 und GlyR $\alpha$ 3 deutlich langsamer deaktiviert werden als GlyR $\alpha$ 1 (Bormann et al. 1993). GlyR $\alpha$ 4 soll sich ähnlich verhalten wie GlyR $\alpha$ 1 (Harvey et al. 2000). *In vivo* treten synaptische Glyzinrezeptoren jedoch ausschließlich als  $\alpha\beta$ -Heteropentamere auf. Es kommt außerdem hinzu, daß es beispielsweise von GlyR $\alpha$ 3 zwei Splicevarianten gibt, die sich in ihrer Kinetik und Pharmakologie deutlich unterscheiden (Sobetzko et al. 2001, Meier et al. 2005). Um die Bedeutung und Funktion dieser Glyzinrezeptorvielfalt näher zu beleuchten, müssen elektrophysiologische Untersuchungen an Wildtyp- und glyzinrezeptordefizienten Mäusen durchgeführt werden.

#### **4.7) Quantifizierung von GlyR $\alpha$ 1 bis GlyR $\alpha$ 4 in den glyzinrezeptordefizienten Mauslinien *Gla1<sup>spd/ot</sup>* (*Oszillator*), *Gla2<sup>-/-</sup>* und *Gla3<sup>-/-</sup>***

Die Dichte der synaptischen Glyzinrezeptoraggregate wurde in drei Mauslinien untersucht, bei denen jeweils eine Untereinheit ausgeschaltet war (*Gla1<sup>spd/ot</sup>*, *Gla2<sup>-/-</sup>* und *Gla3<sup>-/-</sup>*). Es zeigte sich, daß der Verlust einer Untereinheit in der moderaten Hochregulation (23,2 % bis 28,3 %) einer anderen Untereinheit resultiert. Diese Ergebnisse belegen, daß der Organismus grundsätzlich bemüht ist, ein gegebenes Defizit zu kompensieren. In den *Gla1<sup>spd/ot</sup>*- und *Gla3<sup>-/-</sup>*-Mäusen wird GlyR $\alpha$ 2 verstärkt exprimiert, in der *Gla2<sup>-/-</sup>*-Maus hingegen GlyR $\alpha$ 4. Letzteres erscheint folgerichtig, da *Gla4* vermutlich durch Genduplikation aus *Gla2* hervorgegangen ist und GlyR $\alpha$ 2 und GlyR $\alpha$ 4 fast an einem Drittel der Synapsen<sup>10</sup> kolokalisiert sind. Die Kompensation ist jedoch nicht vollständig, was daran zu erkennen ist, daß *Oszillator*-Mäuse vor Erreichen des Erwachsenenalters sterben und die OFF-Bipolarzellen ihrer Retinae keinerlei Glyzinrezeptoren mehr besitzen (Ivanova et al. 2006). GlyR $\alpha$ 1 kann also, zumindestens im Rückenmark und in den Bipolarzellen der Retina durch keine andere Untereinheit ersetzt werden. Das erklärt sich möglicherweise dadurch, daß die Zellen, die GlyR $\alpha$ 1 gewöhnlich exprimieren und den nicht zu ersetzenden Verlust erleiden, in diesem Beispiel also die Motoneurone des Rückenmarks und die Bipolarzellen der Retina, unter normalen Umständen ausschließlich GlyR $\alpha$ 1 exprimieren und so nicht über die zur Transkription alternativer Untereinheiten

---

<sup>10</sup> bezogen auf GlyR $\alpha$ 4

benötigten Faktoren verfügen. Zellen hingegen, die zusätzlich zu GlyR $\alpha$ 1 regulär über weitere Untereinheiten verfügen, sind in der Lage, den Verlust einer Untereinheit durch verstärkte Expression einer anderen abzufangen. Es ist also von nachrangiger Bedeutung, ob zwei verschiedene Untereinheiten an der gleichen Synapse vorkommen. Wichtig ist, daß sie von der gleichen Zelle exprimiert werden. Diese These wird von Untersuchungen an Mäusen gestützt, bei denen die  $\alpha$ 1-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors (GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1) ausgeschaltet wurde. Kralic und Kollegen (2006) zeigen, daß im Gehirn dieser Mäuse andere GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten hochreguliert werden, aber daß dies nur dort geschieht, wo die jeweils hochregulierte Untereinheit auch regulär vorkommt. Dagegen gehen die Synapsen der Zellen, die gewöhnlich die GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1-Untereinheit exprimieren, ersatzlos zugrunde. Die Kompensation erfolgt also nicht notwendigerweise nur auf zellulärer Ebene, sondern auch auf der des Netzwerkes. So kann erklärt werden, daß eine Maus, der 60 % der GABA<sub>A</sub>ergen Synapsen fehlen, dennoch überlebensfähig ist. Diese mögliche Kompensation auf Netzwerkebene hat mit Sicherheit funktionelle Konsequenzen, die sich auch in physiologischen Experimenten an den Retinae der drei beschriebenen GlyR-*knockout*-Mäuse niederschlagen. Leider sind die Neurone, die für die oben beschriebenen Kompensationen dadurch in Frage kommen, daß sie zu der jeweils ausgelöschten Untereinheit mindestens eine weitere exprimieren, und ihre Verschaltungen nicht identifiziert. Der einzige Verschaltungsweg, der im Detail bekannt ist, ist der Stäbchenweg (siehe 1.2). Ausgerechnet hier kann aber keine Kompensation greifen, da in diesem Verschaltungsweg, was die involvierten glyzineren Synapsen und Neurone betrifft, ausschließlich GlyR $\alpha$ 1 eine Rolle spielt.

#### **4.8) Ausblick**

Die vorliegende und vorangegangenen Arbeiten (Grünert und Wässle 1993, Greferath et al. 1994, Haverkamp et al. 2003 und 2004) haben gezeigt, daß es in der Retina des Nagers vier verschiedene GlyR $\alpha$ -Untereinheiten gibt und daß die Mehrheit der glyzineren Synapsen nur eine dieser Untereinheiten enthält. Die Vielfalt der Kombinationsmöglichkeiten wird also nicht ausgeschöpft, vielmehr scheinen die Untereinheiten überwiegend Bestandteile separater Verschaltungswege zu sein.

Für GlyR $\alpha$ 1 konnten Zelltypspezifitäten gezeigt werden: OFF-Bipolarzellen (Ivanova et al. 2006), A-Typ-Ganglienzellen und B1-Ganglienzellen exprimieren diese

Untereinheit; die AII- (Sassoé-Pognetto et al. 1994) und die A8-Amakrinzelle sind mit ihr assoziiert. Bei den anderen Untereinheiten war diese Art von Spezifität nicht zu beobachten. Möglicherweise ist sie vorhanden, jedoch ohne detaillierte Kenntnis des zugrundeliegenden Netzwerkes nicht zu erkennen. Ähnlich verhält es sich mit dem Verständnis für die Kompensationsmechanismen in glyzinrezeptordefizienten Mäusen. Es ist klar, daß eine gewisse Kompensation stattfindet, Unklarheit besteht jedoch darüber, welche Zellen konkret diese Kompensation vermitteln.

Selbst die Elektrophysiologie kann diese Wissenslücken wahrscheinlich nicht endgültig schließen, da keine GlyR-subtypspezifischen Agonisten und Antagonisten zu Verfügung stehen. Aus diesem Grund ist die Differenzierung derzeit nur durch Experimente an den verschiedenen GlyR-*knockout*-Mäusen möglich, wobei Netzwerkeffekte bei diesen Tieren zu falschen Schlüssen führen können. Zur Klärung der Frage, welche Neurone konkret mehrere verschiedene GlyR $\alpha$ -Untereinheiten exprimieren, könnte die *single-cell-RT-PCR*<sup>11</sup> hilfreich sein, sofern es gelingt, bestimmte Zelltypen vorab zuverlässig zu markieren. Die gezielte Auswahl von Zellen war bisher lediglich bei AII-Amakrinzellen erfolgreich. Aus diesem Grund gehört sie auch zu den am besten untersuchten Zellen der Retina.

Womöglich könnte die Generierung von konditionierten *knockout*- und Doppel- bzw. Triple-*knockout*-Mäusen noch weitere Einsichten beschieren. Im Falle der *Glr2*<sup>-/-</sup>- und *Glr3*<sup>-/-</sup>-Mäuse kann das leicht durch Kreuzung geschehen. Eine *Glr4*<sup>-/-</sup>-Maus existiert bislang leider nicht.

Um schließlich der Frage weiter nachzugehen, ob die wenigen kolokalisierten Rezeptoren lediglich in der gleichen Synapse oder aber im gleichen Kanal vorkommen, wäre die Immunpräzipitation die Methode der Wahl.

---

<sup>11</sup> Einzelzell-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion; bei dieser Methode wird die in einer einzelnen Zelle vorhandene RNA in DNA umgeschrieben und amplifiziert

## 5) Zusammenfassung

Glyzin ist neben GABA der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS und vermittelt seine vielfältigen Effekte hauptsächlich über Glyzinrezeptoren. Dies sind pentamere ligandengesteuerte Chloridionenkanäle aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten im stöchiometrischen Verhältnis von 2:3. Die Bindung des Liganden erfolgt durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten jeweils an den Grenzflächen zwischen zwei benachbarten Untereinheiten. Die Verankerung des Rezeptors in der postsynaptischen Membran wird über spezielle intrazellulär gelegene Bindungsstellen der  $\beta$ -Untereinheiten für das Gerüstprotein Gephyrin realisiert, das den Rezeptorkomplex am Zytoskelett verankert. Derzeit sind 4 Gene, die für  $\alpha$ -Untereinheiten kodieren und ein Gen, das für die  $\beta$ -Untereinheit kodiert, bekannt. Es sind also theoretisch 10 verschiedene Rezeptorkompositionen denkbar, die sich in ihren pharmakologischen und kinetischen Eigenschaften unterscheiden. Es wurde analysiert, ob erstens alle diese Kombinationsmöglichkeiten ausgeschöpft werden und ob zweitens auf prä- und postsynaptischer Seite zelltypspezifisch bestimmte Rezeptorsubtypen bevorzugt exprimiert werden. Ferner wurde untersucht, ob im Falle des Verlustes einer  $\alpha$ -Untereinheit bei den verbleibenden Untereinheiten Kompensationsmechanismen zu beobachten sind.

Diese Fragestellungen wurden in der Mausretina untersucht, wo Glyzinrezeptoren an Synapsen zwischen Amakrin- und anderen Amakrinzellen, Amakrin- und Bipolarzellen sowie Amakrin- und Ganglienzellen exprimiert werden. Da die hier aufgeworfenen Fragen für die Bipolarzellen bereits beantwortet sind – sie exprimieren als einzige  $\alpha$ -Untereinheit GlyR $\alpha$ 1 -, konzentrierte sich die vorliegende Arbeit auf Amakrin- und Ganglienzellen. Zur Analyse der verschiedenen Typen von Amakrin- und Ganglienzellen stand eine transgene Mauslinie zur Verfügung, bei der einige wenige Zellen unter der Kontrolle des *thy1*-Promotors das grün fluoreszierende Protein exprimieren (GFP-O-Linie). Die Unterscheidung der Zelltypen erfolgte anhand ihrer Morphologie, und die Markierung der verschiedenen Glyzinrezeptorsubtypen wurde durch den Einsatz spezifischer Antikörper ermöglicht: durch einen monoklonalen Antikörper gegen GlyR $\alpha$ 1, einen polyklonalen Antikörper gegen GlyR $\alpha$ 2 sowie einen polyklonalen Antikörper gegen GlyR $\alpha$ 3. Die Charakterisierung des polyklonalen Antikörpers gegen GlyR $\alpha$ 4 war Bestandteil dieser Arbeit. Zur Untersuchung möglicher kompensatorischer Mechanismen innerhalb der GlyR $\alpha$ -Untereinheiten wurden die folgenden glyzinrezeptordefizienten Mäuse

herangezogen: die *Oszillator*-Maus, eine natürlich vorkommende Mutante mit defekter GlyR $\alpha$ 1-Untereinheit, sowie die Linien *Glr $\alpha$ 2*<sup>-/-</sup>- und *Glr $\alpha$ 3*<sup>-/-</sup>.

Die Charakterisierung des pAb GlyR $\alpha$ 4 mittels HEK-Zell-Transfektion, *in-situ*-Hybridisierung, Western Blot und Immunzytochemie zeigte, daß der Antikörper das GlyR $\alpha$ 4-Protein spezifisch zu erkennen scheint und nicht mit anderen Glyzinrezeptoruntereinheiten kreuzreagiert. Er wurde deshalb für die nachfolgenden Untersuchungen mit verwendet.

Die vier  $\alpha$ -Untereinheiten sind durch deutlich voneinander abweichende Verteilungsmuster gekennzeichnet. Nur an wenigen Synapsen liegen zwei dieser Untereinheiten gemeinsam vor. Diese moderate Kolo-kalisation war bei GlyR $\alpha$ 2 und GlyR $\alpha$ 4 am deutlichsten ausgeprägt. Die meisten glyziner-genen Synapsen scheinen jedoch nur eine  $\alpha$ -Untereinheit zu enthalten und die einzelnen Untereinheiten somit Bestandteile unterschiedlicher Signalwege zu sein.

Die Kolo-kalisationsstudien ergaben eine spezifische Expression von GlyR $\alpha$ 1 durch die Ganglienzelltypen A1, A2<sub>i</sub>, A2<sub>o</sub> und B1 sowie eine Assoziation mit der A8 Amakrinzelle. Für GlyR $\alpha$ 2, GlyR $\alpha$ 3 und GlyR $\alpha$ 4 waren spezifische Expressionsmuster nicht zu erkennen. Viele Ganglienzellen scheinen in geringem Umfang mehrere Untereinheiten zu exprimieren.

Vier der 6 hier beschriebenen Amakrinzelltypen waren mit GlyR $\alpha$ 2, GlyR $\alpha$ 3 und GlyR $\alpha$ 4 assoziiert. Ein Typ war zusätzlich mit GlyR $\alpha$ 1 und ein weiterer nur mit GlyR $\alpha$ 2 und GlyR $\alpha$ 4 assoziiert. Dabei konnte nicht sicher zwischen prä- und postsynaptischer Lokalisation unterschieden werden.

Die Quantifizierung der vier GlyR $\alpha$ -Untereinheiten in den drei glyzinrezeptor-defizienten Mauslinien zeigte eine moderate aber signifikante Hochregulation von GlyR $\alpha$ 2 in *Oszillator*- und *Glr $\alpha$ 3*<sup>-/-</sup>-Mäusen sowie von GlyR $\alpha$ 4 in *Glr $\alpha$ 2*<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Diese Ergebnisse belegen, daß der Verlust einer GlyR $\alpha$ -Untereinheit begrenzt kompensiert wird und daß GlyR $\alpha$ 2 und GlyR $\alpha$ 4 die plastischen Untereinheiten sind. Die vier GlyR $\alpha$ -Untereinheiten sind überwiegend an verschiedenen Synapsen lokalisiert und dort vermutlich Bestandteil separater Verschaltungswege. Dies wird bei GlyR $\alpha$ 1 besonders deutlich, im Falle der anderen Untereinheiten ist die eventuell vorliegende Spezifität durch anatomische Untersuchungen allein nicht abzubilden, und weitere vor allem physiologische Untersuchungen werden erforderlich sein, um die Rolle der verschiedenen Glyzinrezeptorsubtypen in neuronalen Netzwerken zu ergründen.

## 6) Literaturverzeichnis

- Ahmadi S, Lippross S, Neuhuber WL, Zeilhofer HU. 2002. PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci* 5:34-40
- Amthor FR, Oyster CW, Takahashi ES. 1984. Morphology of on-off direction-selective ganglion cells in the rabbit retina. *Brain Res.* 298:187-90
- Amthor FR, Takahashi ES, Oyster CW. 1989. Morphologies of rabbit retinal ganglion cells with complex receptive fields. *J Comp Neurol.* 280:97-121
- Awatramani GB, Slaughter MM. 2000. Origin of transient and sustained responses in ganglion cells of the retina. *J Neurosci.* 20:7087-95
- Barlow HB, Levick WR. 1965. The mechanism of directionally selective units in rabbit's retina. *J Physiol.* 178:477-504
- Becker CM, Hoch W, Betz H. 1988. Glycine receptor heterogeneity in rat spinal cord during postnatal development. *EMBO J.* 7:3717-26
- Belenky MA, Smeraski CA, Provencio I, Sollars PJ, Pickard GE. 2003. Melanopsin retinal ganglion cells receive bipolar and amacrine cell synapses. *J Comp Neurol.* 460:380-93
- Berson DM, Isayama T, Pu M. 1999. The Eta ganglion cell type of cat retina. *J Comp Neurol.* 408:204-19
- Berson DM, Pu M, Famiglietti EV. 1998. The zeta cell: a new ganglion cell type in cat retina. *J Comp Neurol.* ;399:269-88
- Betz H, Laube B. 2006. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem* 97:1600-10
- Betz H, Laube B. 2006. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem.* 97:1600-10
- Bloomfield SA, Dacheux RF. 2001. Rod vision: pathways and processing in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res.* 20:351-84
- Bloomfield SA. 1994. Orientation-sensitive amacrine and ganglion cells in the rabbit retina. *J Neurophysiol.* 71:1672-91
- Borg-Graham LJ. 2001. The computation of directional selectivity in the retina occurs presynaptic to the ganglion cell. *Nat Neurosci.* 4:119-20.
- Bormann J, Rundstrom N, Betz H, Langosch D. 1993. Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *EMBO J.* 12:3729-37
- Boycott BB, Dowling JE. 1969. Organization of the primate retina: light microscopy. *Phil Trans R Soc Lond Biol.* 255:109-184
- Boycott BB, Wässle H. 1974. The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J Physiol.* 240:397-419
- Boycott BB, Wässle H. 1991. Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina. *Eur J Neurosci.* 3:1069-1088



- Brandstätter JH, Fletcher EL, Garner CC, Gundelfinger ED, Wässle H. 1999. Differential expression of the presynaptic cytomatrix protein bassoon among ribbon synapses in the mammalian retina. *Eur J Neurosci.* 11:3683-93
- Brandstätter JH, Koulen P, Wässle H. 1998. Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Res.* 38:1385-97
- Brecha N, Hendrickson A, Floren I, Karten HJ. 1982. Localization of substance P-like immunoreactivity within the monkey retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 23:147-53
- Brecha N, Johnson D, Peichl L, Wässle H. 1988. Cholinergic amacrine cells of the rabbit retina contain glutamate decarboxylase and gamma-aminobutyrate immunoreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:6187-91
- Brecha NC, Oyster CW, Takahashi ES. 1984. Identification and characterization of tyrosine hydroxylase immunoreactive amacrine cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 25:66-70
- Brunken WJ, Daw NW. 1988. The effects of serotonin agonists and antagonists on the response properties of complex ganglion cells in the rabbit's retina. *Vis Neurosci.* 1:181-8
- Buckwalter MS, Cook SA, Davisson MT, White WF, Camper SA. 1994. A frameshift mutation in the mouse alpha 1 glycine receptor gene (*Glr1*) results in progressive neurological symptoms and juvenile death. *Hum Mol Genet.* 3:2025-30
- Cajal SR (1893) La rétine des vertébrés. *La Cellule* 9:119-257
- Caldwell JH, Daw NW, Wyatt HJ. 1978. Effects of picrotoxin and strychnine on rabbit retinal ganglion cells: lateral interactions for cells with more complex receptive fields. *J Physiol.* 276:277-98
- Chai CK. 1961. Hereditary spasticity in mice. *J Hered.* 52:241-43
- Coombs J, van der List D, Wang GY, Chalupa LM. 2006. Morphological properties of mouse retinal ganglion cells. *Neuroscience.* 140:123-36
- Dacey DM, Liao HW, Peterson BB, Robinson FR, Smith VC, Pokorny J, Yau KW, Gamlin PD. 2005. Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature.* 433:749-54
- Dacey DM, Packer OS. 2003. Colour coding in the primate retina: diverse cell types and cone-specific circuitry. *Curr Opin Neurobiol.* 13:421-7
- Dacheux RF, Raviola E. 1986. The rod pathway in the rabbit retina: a depolarizing bipolar and amacrine cell. *J Neurosci* 6:331-345
- Dann JF, Buhl EH. 1987. Retinal ganglion cells projecting to the accessory optic system in the rat. *J Comp Neurol.* 262:141-58
- DeVries SH. 2000. Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron.* 28:847-56
- Dick O, Hack I, Altrock WD, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH. 2001. Localization of the presynaptic cytomatrix protein Piccolo at ribbon and conventional synapses in the rat retina: comparison with Bassoon. *J Comp Neurol.* 439:224-34

- Dreher B, Sefton AJ, Ni SY, Nisbett G. 1985. The morphology, number, distribution and central projections of Class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats. *Brain Behav Evol.* 26:10-48
- Dumitrescu ON, Protti DA, Majumdar S, Zeilhofer HU, Wässle H. 2006. Ionotropic glutamate receptors of amacrine cells of the mouse retina. *Vis Neurosci.* 23:79-90
- Euler T, Schneider H, Wässle H. 1996. Glutamate responses of bipolar cells in a slice preparation of the rat retina. *J Neurosci.* 16:2934-44
- Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR. 2000. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron.* 28:41-51
- Fischer F, Kneussel M, Tintrup H, Haverkamp S, Rauen T, Betz H, Wässle H. 2000. Reduced synaptic clustering of GABA and glycine receptors in the retina of the gephyrin null mutant mouse. *J Comp Neurol.* 427:634-48
- Frech MJ, Perez-Leon J, Wässle H, Backus KH. 2001. Characterization of the spontaneous synaptic activity of amacrine cells in the mouse retina. *J Neurophysiol.* 86:1632-43
- Freed MA. 2000. Parallel cone bipolar pathways to a ganglion cell use different rates and amplitudes of quantal excitation. *J Neurosci* 20:3956-3963
- Freneau RT Jr, Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH. 2002. The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:14488-93
- Fried SI, Munch TA, Werblin FS. 2002. Mechanisms and circuitry underlying directional selectivity in the retina. *Nature.* 420:411-4
- Ghavanini AA, Mathers DA, Kim HS, Puil E. 2006. Distinctive glycinergic currents with fast and slow kinetics in thalamus. *J Neurophysiol.* 95:3438-48
- Ghavanini AA, Mathers DA, Kim HS, Puil E. 2006. Distinctive glycinergic currents with fast and slow kinetics in thalamus. *J Neurophysiol.* 95:3438-48
- Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, Feigenspan A, Wässle H. 2004. Types of bipolar cells in the mouse retina. *J Comp Neurol.* 469:70-82
- Greferath U, Brandstätter JH, Wässle H, Kirsch J, Kuhse J, Grünert U. 1994. Differential expression of glycine receptor subunits in the retina of the rat: a study using immunohistochemistry and in situ hybridization. *Vis Neurosci.* 11:721-9
- Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, Laube B. 2005. The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron.* 45:727-39
- Grünert U, Ghosh KK. 1999. Midget and parasol ganglion cells of the primate retina express the alpha1 subunit of the glycine receptor. *Vis Neurosci.* 16:957-66
- Grünert U, Wässle H. 1993. Immunocytochemical localization of glycine receptors in the mammalian retina. *J Comp Neurol.* 335:523-37

- Grünert U. 2000. Distribution of GABA and glycine receptors on bipolar and ganglion cells in the mammalian retina. *Microsc Res Tech.* 50:130-40
- Gustincich S, Feigenspan A, Wu DK, Koopman LJ, Raviola E. 1997. Control of dopamine release in the retina: a transgenic approach to neural networks. *Neuron.* 18:723-36
- Hannibal J, Fahrenkrug J. 2004. Melanopsin containing retinal ganglion cells are light responsive from birth. *Neuroreport.* 15:2317-20
- Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schutz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Muller U. 2004. GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304:884-7
- Harvey RJ, Schmieden V, Von Holst A, Laube B, Rohrer H, Betz H. 2000. Glycine receptors containing the alpha4 subunit in the embryonic sympathetic nervous system, spinal cord and male genital ridge. *Eur J Neurosci.* 12:994-1001
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. 2002. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science.* 295:1065-70
- Haverkamp S, Muller U, Harvey K, Harvey RJ, Betz H, Wässle H. 2003. Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha3 subunit. *J Comp Neurol.* 465:524-39
- Haverkamp S, Muller U, Zeilhofer HU, Harvey RJ, Wässle H. 2004. Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha2 subunit. *J Comp Neurol.* 477:399-411
- Haverkamp S, Wässle H. 2004. Characterization of an amacrine cell type of the mammalian retina Immunoreactive for vesicular glutamate transporter 3. *J Comp Neurol.* 468:251-63
- He S, Masland RH. 1998. ON direction-selective ganglion cells in the rabbit retina: dendritic morphology and pattern of fasciculation. *Vis Neurosci.* 15:369-75
- Hirasawa H, Kaneko A. 2003. pH changes in the invaginating synaptic cleft mediate feedback from horizontal cells to cone photoreceptors by modulating Ca<sup>2+</sup> channels. *J Gen Physiol.* 122:657-71
- Hubel DH. 1988. *Eye, Brain and Vision.* New York: Scientific American Library, No 22
- Huxlin KR, Goodchild AK. 1997. Retinal ganglion cells in the albino rat: revised morphological classification. *J Comp Neurol.* 385:309-23
- Imboden M, Devignot V, Goblet C. 2001. Phylogenetic relationships and chromosomal location of five distinct glycine receptor subunit genes in the teleost *Danio rerio*. *Dev Genes Evol.* 211:415-22
- Ivanova E, Muller U, Wässle H. 2006. Characterization of the glycinergic input to bipolar cells of the mouse retina. *Eur J Neurosci.* 23:350-64
- Johnson J, Sherry DM, Liu X, Fremeau RT Jr, Seal RP, Edwards RH, Copenhagen DR. 2004. Vesicular glutamate transporter 3 expression identifies glutamatergic amacrine cells in the rodent retina. *J Comp Neurol.* 477:386-98
- Kamermans M, Fahrenfort I, Schultz K, Janssen-Bienhold U, Sjoerdsma T, Weiler R. 2001. Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. *Science.* 292:1178-80

- Karten HJ, Brecha N. 1983. Localization of neuroactive substances in the vertebrate retina: evidence for lamination in the inner plexiform layer. *Vision Res.* 23:1197-205
- Kim TJ, Jeon CJ. 2006. Morphological classification of parvalbumin-containing retinal ganglion cells in mouse: single-cell injection after immunocytochemistry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:2757-64
- Kirsch J, Betz H. 1995. The postsynaptic localization of the glycine receptor-associated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton. *J Neurosci.* 15:4148-56
- Kling C, Koch M, Saul B, Becker CM. 1997. The frameshift mutation oscillator (Glr1(sp1-ot)) produces a complete loss of glycine receptor alpha1-polypeptide in mouse central nervous system. *Neuroscience.* 78:411-7
- Kolb H, Famiglietti EV. 1974. Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of cat retina. *Science.* 186:47-9
- Kolb H, Linberg KA, Fisher SK. 1992. Neurons of the human retina: a Golgi study. *J Comp Neurol.* 318:147-87
- Kolb H, Nelson R, Mariani A. 1981. Amacrine cells, bipolar cells and ganglion cells of the cat retina: a Golgi study. *Vision Res.* 21:1081-1114
- Kolb H, Nelson R. 1993. OFF-alpha and OFF-beta ganglion cells in cat retina: II. Neural circuitry as revealed by electron microscopy of HRP stains. *J Comp Neurol.* 329:85-110
- Kolb H, Nelson R. 1996. Hyperpolarizing, small-field, amacrine cells in cone pathways of cat retina. *J Comp Neurol.* 371:415-36
- Koulen P, Sassoe-Pognetto M, Grünert U, Wässle H. 1996. Selective clustering of GABA(A) and glycine receptors in the mammalian retina. *J Neurosci.* 1996 Mar 15;16:2127-40
- Kralic JE, Sidler C, Parpan F, Homanics GE, Morrow AL, Fritschy JM. 2006. Compensatory alteration of inhibitory synaptic circuits in cerebellum and thalamus of gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha1 subunit knockout mice. *J Comp Neurol.* 495:408-21
- Krupp J, Larmet Y, Feltz P. 1994. Postnatal change of glycinergic IPSC decay in sympathetic preganglionic neurons. *Neuroreport.* 5:2437-40
- Kuffler SW. 1953. Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J Neurophysiol.* 16:37-68
- Kuhse J, Betz H, Kirsch J. 1995. The inhibitory glycine receptor: architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. *Curr Opin Neurobiol.* 5:318-23
- Kuhse J, Kuryatov A, Maulet Y, Malosio ML, Schmieden V, Betz H. 1991. Alternative splicing generates two isoforms of the alpha 2 subunit of the inhibitory glycine receptor. *FEBS Lett.* 283:73-7
- Kuhse J, Schmieden V, Betz H. 1990. A single amino acid exchange alters the pharmacology of neonatal rat glycine receptor subunit. *Neuron.* 5:867-73
- Laube B, Maksay G, Schemm R, Betz H. 2002. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol Sci.* 23:519-27

- Leventhal AG, Keens J, Tork I. 1980. The afferent ganglion cells and cortical projections of the retinal recipient zone (RRZ) of the cat's pulvinar complex'. *J Comp Neurol.* 194:535-54
- Levick WR. 1967. Receptive fields and trigger features of ganglion cells in the visual streak of the rabbits retina. *J Physiol.* 188:285-307
- Lin B, Martin PR, Solomon SG, Grünert U. 2000. Distribution of glycine receptor subunits on primate retinal ganglion cells: a quantitative analysis. *Eur J Neurosci.* 12:4155-70
- Lin B, Masland RH. 2005. Synaptic contacts between an identified type of ON cone bipolar cell and ganglion cells in the mouse retina. *Eur J Neurosci.* 21:1257-70
- Linberg KA, Suemune S, Fisher SK. 1996. Retinal neurons of the California ground squirrel, *Spermophilus beecheyi*: a Golgi study. *J Comp Neurol.* 365:173-216
- Lynch JW. 2004. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev.* 84:1051-95
- Maas C, Tagnaouti N, Loeblich S, Behrend B, Lappe-Siefke C, Kneussel M. 2006. Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin. *J Cell Biol.* 2006 Jan 30;172:441-51
- MacNeil MA, Heussy JK, Dacheux RF, Raviola E, Masland RH. 1999. The shapes and numbers of amacrine cells: matching of photofilled with Golgi-stained cells in the rabbit retina and comparison with other mammalian species. *J Comp Neurol.* 413:305-26
- MacNeil MA, Heussy JK, Dacheux RF, Raviola E, Masland RH. 2004. The population of bipolar cells in the rabbit retina. *J Comp Neurol.* 472:73-86
- Martin PR, Lee BB, White AJ, Solomon SG, Rüttiger L. 2001. Chromatic sensitivity of ganglion cells in the peripheral primate retina. *Nature.* 410:933-6
- Martin PR. 1986. The projection of different retinal ganglion cell classes to the dorsal lateral geniculate nucleus in the hooded rat. *Exp Brain Res.* 62:77-88.
- Martin PR. 1998. Colour processing in the primate retina: recent progress. *J Physiol.* 513:631-8
- Masland RH, Mills JW, Cassidy C. 1984. The functions of acetylcholine in the rabbit retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 223:121-39
- Masland RH. 2001. Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol.* 11:431-6
- Masland RH. 2005. The many roles of starburst amacrine cells. *Trends Neurosci.* 28:395-6
- Matzenbach B, Maulet Y, Sefton L, Courtier B, Avner P, Guenet JL, Betz H. 1994. Structural analysis of mouse glycine receptor alpha subunit genes. Identification and chromosomal localization of a novel variant. *J Biol Chem.* 269:2607-12
- McGilllem GS, Dacheux RF. 2001. Rabbit cone bipolar cells: correlation of their morphologies with whole-cell recordings. *Vis Neurosci.* 2001 18:675-85
- Meier J, Vannier C, Serge A, Triller A, Choquet D. 2001. Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nat Neurosci.* 4:253-60

- Meier JC, Henneberger C, Melnick I, Racca C, Harvey RJ, Heinemann U, Schmieden V, Grantyn R. 2005. RNA editing produces glycine receptor alpha3(P185L), resulting in high agonist potency. *Nat Neurosci.* 8:736-44
- Menger N, Pow DV, Wässle H. 1998. Glycinergic amacrine cells of the rat retina. *J Comp Neurol.* 401:34-46
- Meyer G, Kirsch J, Betz H, Langosch D. 1995. Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron.* 1995 15:563-72
- O'Malley DM, Sandell JH, Masland RH. 1992. Co-release of acetylcholine and GABA by the starburst amacrine cells. *J Neurosci.* 12:1394-408
- Peichl L. 1989. Alpha and delta ganglion cells in the rat retina. *J Comp Neurol.* 286:120-39
- Pellegrino FA, Vanzella W, Torre V. 2004. Edge detection revisited. *IEEE Trans Syst Man Cybern B Cybern.* 34:1500-18
- Perry VH, Walker M. 1980. Amacrine cells, displaced amacrine cells and interplexiform cells in the retina of the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 208:415-31
- Perry VH. 1979. The ganglion cell layer of the retina of the rat: a Golgi study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 204:363-75
- Pignatelli V, Strettoi E. 2004. Bipolar cells of the mouse retina: a gene gun, morphological study. *J Comp Neurol.* 476:254-66
- Polyak SL. 1941. *The retina.* Chicago: The University of Chicago Press
- Pow DV, Hendrickson AE. 1999. Distribution of the glycine transporter glyt-1 in mammalian and nonmammalian retinæ. *Vis Neurosci.* 16:231-9
- Protti DA, Gerschenfeld HM, Llano I. 1997. GABAergic and glycinergic IPSCs in ganglion cells of rat retinal slices. *J Neurosci.* 17:6075-85
- Rockhill RL, Daly FJ, MacNeil MA, Brown SP, Masland RH. 2002. The diversity of ganglion cells in a mammalian retina. *J Neurosci.* 22:3831-43
- Rotolo TC, Dacheux RF. 2003. Evidence for glycine, GABAA, and GABAB receptors on rabbit OFF-alpha ganglion cells. *Vis Neurosci.* 20:285-96
- Sassoe-Pognetto M, Wässle H, Grünert U. 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.* 14:5131-46
- Sassoe-Pognetto M, Wässle H. 1997. Synaptogenesis in the rat retina: subcellular localization of glycine receptors, GABA(A) receptors, and the anchoring protein gephyrin. *J Comp Neurol.* 381:158-74
- Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, Barnard EA. 2004. Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *J Biol Chem.* 279:41422-35
- Sobetzko D, Sander T, Becker CM. 2001. Genetic variation of the human glycine receptor subunit genes GLRA3 and GLRB and susceptibility to idiopathic generalized epilepsies. *Am J Med Genet.* 105:534-8

- Sun W, Li N, He S. 2002. Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells. *J Comp Neurol.* 451:115-26
- Takahashi T, Momiyama A, Hirai K, Hishinuma F, Akagi H. 1992. Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels. *Neuron.* 9:1155-61
- Tauchi M, Morigiwa K, Fukuda Y. 1992. Morphological comparisons between outer and inner ramifying alpha cells of the albino rat retina. *Exp Brain Res.* 88:67-77
- Taylor WR, Vaney DI. 2002. Diverse synaptic mechanisms generate direction selectivity in the rabbit retina. *J Neurosci.* 22:7712-20
- Tian N, Copenhagen DR. 2003. Visual stimulation is required for refinement of ON and OFF pathways in postnatal retina. *Neuron.* 39:85-96
- Tian N, Hwang TN, Copenhagen DR. 1998. Analysis of excitatory and inhibitory spontaneous synaptic activity in mouse retinal ganglion cells. *J Neurophysiol.* 80:1327-40
- tom Dieck S, Sanmarti-Vila L, Langnaese K, Richter K, Kindler S, Soyke A, Wex H, Smalla KH, Kampf U, Franzer JT, Stumm M, Garner CC, Gundelfinger ED. 1998. Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol.* 142:499-509
- Twyman RE, Macdonald RL. 1991. Kinetic properties of the glycine receptor main- and sub-conductance states of mouse spinal cord neurones in culture. *J Physiol.* 435:303-31
- Vaney DI, Taylor WR. 2002. Direction selectivity in the retina. *Curr Opin Neurobiol.* 12:405-10
- Vaney DI, Young HM. 1988. GABA-like immunoreactivity in cholinergic amacrine cells of the rabbit retina. *Brain Res.* 1988 Jan 12;438:369-73
- Wässle H, Chun MH. 1988 Dopaminergic and indoleamine-accumulating amacrine cells express GABA-like immunoreactivity in the cat retina. *J Neurosci.* 8:3383-94
- Wässle H, Koulen P, Brandstätter JH, Fletcher EL, Becker C-M. 1998. Glycine and GABA receptors in the mammalian retina. *Vision Res* 38:1411-1430.
- Wässle H, Peichl L, Boycott BB. 1981. Dendritic territories of cat retinal ganglion cells. *Nature.* 1981 Jul 23;292(5821):344-5
- Wässle H. 2004. Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci.* 5:747-57
- Weng S, Sun W, He S. 2005. Identification of ON-OFF direction-selective ganglion cells in the mouse retina. *J Physiol.* 562:915-23
- Witkovsky P. 2004. Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol.* 108:17-40
- Wyatt HJ, Day NW. 1976. Specific effects of neurotransmitter antagonists on ganglion cells in rabbit retina. *Science.* 191:204-5
- Zeck GM, Xiao Q, Masland RH. 2005. The spatial filtering properties of local edge detectors and brisk-sustained retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci.* 2005 Oct;22:2016-26

Zheng JJ, Lee S, Zhou ZJ. 2004. A developmental switch in the excitability and function of the starburst network in the mammalian retina. *Neuron*. 44:851-64



## Anhang

### 1) Kolokalisation von Glyzinrezeptoren mit verschiedenen Ganglienzelltypen

Bildausschnitt / Ganglienzelltyp	kolokalisierte Punkte pro Bildausschnitt - Original				kolokalisierte Punkte pro Bildausschnitt – Flip			
	A1	A2 <sub>i</sub>	A2 <sub>o</sub>	B1	A1	A2 <sub>i</sub>	A2 <sub>o</sub>	B1
1	5	7	1	5	0	0	0	0
2	2	11	7	8	0	0	1	2
3	1	3	5	9	1	0	5	2
4	8	4	4	10	1	0	2	2
5	9	12	3	7	2	5	0	0
6	10	16	6	6	6	1	1	1
7	8	11	4	6	4	2	0	1
8	4	1	10	2	1	0	3	1
9	2	0	3	6	0	0	1	1
10	9	27	2	6	1	2	0	3
<x <sub>O</sub> >; <x <sub>F</sub> >	5,8	6,8	4,5	6,5	1,6	0,8	1,3	1,3
p	0,00059	0,00282	0,00149	0,00002	0,00059	0,00282	0,00149	0,00002

**Tabelle A.1: Übersicht zur statistischen Auswertung der Kolokalisation der Glyzinrezeptoruntereinheit  $\alpha 1$  mit den Ganglienzelltypen A1, A2<sub>inner</sub>, A2<sub>outer</sub> und B1**

<x<sub>O</sub>>: Mittelwert aus den Stichproben der Bildausschnitte im Originalbild; <x<sub>F</sub>>: Mittelwert aus den Stichproben der Bildausschnitte im inversen Bild (Flip); p: Wahrscheinlichkeit, mit der die beiden Stichprobenpopulationen aus der gleichen Grundgesamtheit stammen, d.h. daß die Punkte rein zufällig mit den Zellen kolokalisiert sind (Beispiel: p = 0,01 besagt, daß diese Wahrscheinlichkeit bei 1% liegt), erhalten aus einem gepaarten, zweiseitigen t-Test nach Student

Bildausschnitt / Ganglienzelltyp	kolokalisierte Punkte pro Bildausschnitt - Original				kolokalisierte Punkte pro Bildausschnitt – Flip			
	<b>B2</b>	<b>B3<sub>i</sub></b>	<b>B3<sub>o</sub></b>	<b>B4</b>	<b>B2</b>	<b>B3<sub>i</sub></b>	<b>B3<sub>o</sub></b>	<b>B4</b>
<b>1</b>	1	2	0	1	1	1	1	1
<b>2</b>	0	1	11	2	0	2	2	0
<b>3</b>	1	2	2	1	1	0	1	1
<b>4</b>	1	1	4	0	0	0	5	0
<b>5</b>	2	2	4	3	1	1	2	2
<b>6</b>	1	1	3	1	2	0	2	0
<b>7</b>	0	0	7	2	0	1	1	0
<b>8</b>	1	1	7	1	2	0	0	0
<b>9</b>	0	2	1	1	1	0	2	0
<b>10</b>	0	1	0	0	1	1	1	3
<b>&lt;x<sub>O</sub>&gt;; &lt;x<sub>F</sub>&gt;</b>	0,7	1,3	3,9	1,2	0,9	0,6	1,7	0,7
<b>P</b>	0,44333	0,06623	0,09772	0,29872	0,44333	0,06623	0,09772	0,29872

**Tabelle A.2: Übersicht zur statistischen Auswertung der Kolokalisation der Glyzinrezeptoruntereinheit  $\alpha 1$  mit den Ganglienzelltypen B2, B3<sub>inner</sub>, B3<sub>outer</sub> und B4**

<x<sub>O</sub>>: Mittelwert aus den Stichproben der Bildausschnitte im Originalbild; <x<sub>F</sub>>: Mittelwert aus den Stichproben der Bildausschnitte im inversen Bild (Flip); **p**: Wahrscheinlichkeit, mit der die beiden Stichprobenpopulationen aus der gleichen Grundgesamtheit stammen, erhalten aus einem gepaarten, zweiseitigen t-Test nach Student

Bildausschnitt / Ganglienzelltyp	kolokalisierte Punkte pro Bildausschnitt - Original				kolokalisierte Punkte pro Bildausschnitt – Flip			
	<b>C1</b>	<b>C2<sub>i</sub></b>	<b>C2<sub>o</sub></b>	<b>C3</b>	<b>C1</b>	<b>C2<sub>i</sub></b>	<b>C2<sub>o</sub></b>	<b>C3</b>
<b>1</b>	4	1	1	1	1	0	0	0
<b>2</b>	2	2	2	0	1	1	2	0
<b>3</b>	2	1	0	0	1	1	1	0
<b>4</b>	1	1	1	0	1	0	2	0
<b>5</b>	3	4	0	0	1	0	0	0
<b>6</b>	2	1	1	0	0	1	0	1
<b>7</b>	3	1	1	0	2	2	2	1
<b>8</b>	2	3	1	0	0	4	1	0
<b>9</b>	0	0	1	0	5	1	1	0
<b>10</b>	1	4	1	1	0	2	3	0
<b>&lt;x<sub>O</sub>&gt;; &lt;x<sub>F</sub>&gt;</b>	2	1,8	0,9	0,2	1,2	1,2	1,2	0,2
<b>P</b>	0,28002	0,25979	0,34344	1	0,28002	0,25979	0,34344	1

**Tabelle A.3: Übersicht zur statistischen Auswertung der Kolo­kalisierung der Glyzinrezeptor­untereinheit  $\alpha 1$  mit den Ganglienzelltypen C1, C2<sub>inner</sub>, C2<sub>outer</sub> und C3**

**<x<sub>O</sub>>**: Mittelwert aus den Stichproben der Bildausschnitte im Originalbild; **<x<sub>F</sub>>**: Mittelwert aus den Stichproben der Bildausschnitte im inversen Bild (Flip); **p**: Wahrscheinlichkeit, mit der die beiden Stichprobenpopulationen aus der gleichen Grundgesamtheit stammen, erhalten aus einem gepaarten, zweiseitigen t-Test nach Student; **C2<sub>i</sub>**: C2<sub>inner</sub>; **C2<sub>o</sub>**: C2<sub>outer</sub>

Bildausschnitt / Ganglienzelltyp	kolokalisierte Punkte pro Bildausschnitt - Original					kolokalisierte Punkte pro Bildausschnitt – Flip				
	C4	C5	C6	D2 <sub>i</sub>	D2 <sub>o</sub>	C4	C5	C6	D2 <sub>i</sub>	D2 <sub>o</sub>
<b>1</b>	1	1	4	0	0	0	1	3	0	0
<b>2</b>	0	2	5	0	2	1	0	1	0	1
<b>3</b>	4	1	2	1	1	1	1	1	1	1
<b>4</b>	1	0	2	1	0	2	0	0	1	0
<b>5</b>	1	2	1	0	1	1	0	1	1	2
<b>6</b>	3	1	0	1	3	1	2	2	1	2
<b>7</b>	0	0	2	1	0	1	1	2	0	1
<b>8</b>	4	0	1	1	4	1	0	1	0	1
<b>9</b>	0	0	2	0	0	0	0	1	0	1
<b>10</b>	0	1	1	0	1	1	2	1	0	0
<b>&lt;x<sub>O</sub>&gt;; &lt;x<sub>F</sub>&gt;</b>	1,4	0,8	2	0,5	1,2	0,9	0,9	1,3	0,4	0,9
<b>P</b>	0,3629	0,78035	0,19140	0,59105	0,46787	0,3629	0,78035	0,19140	0,59105	0,46787

**Tabelle A.4: Übersicht zur statistischen Auswertung der Kolokalisation der Glyzinrezeptoruntereinheit  $\alpha 1$  mit den Ganglienzelltypen C4, C5, C6 und D2**

$\langle x_o \rangle$ : Mittelwert aus den Stichproben der Bildausschnitte im Originalbild;  $\langle x_f \rangle$ : Mittelwert aus den Stichproben der Bildausschnitte im inversen Bild (Flip); **p**: Wahrscheinlichkeit, mit der die beiden Stichprobenpopulationen aus der gleichen Grundgesamtheit stammen, erhalten aus einem gepaarten, zweiseitigen t-Test nach Student; **D2<sub>i</sub> bzw. D2<sub>o</sub>**: D2 – innerer bzw. äußerer Dendritenbaum

## 2) Gensequenzen der verschiedenen Glyzinrezeptoruntereinheiten

Angegeben sind jeweils ausschließlich die tatsächlich transkribierten Bereiche.

### ***Gla1*, murin**

```
AGCCTTGCTGCTTCCAAAGAGGCTGAAGCCGCCCGCTCCGCACCCAAGCCTATGTCACCCTCGG
ACTTCCTGGATAAGCTCATGGGGAGGACTTCTGGGTATGACGCCAGGATCAGGCCCAACTTTAAA
GGTCCTCCTGTGAATGTAAGTTGCAACATCTTCATCAACAGTTTTCGGTTCCATCGCTGAGACAAC
CATGGACTATAGGGTCAACATCTTCTGAGGCAGCAGTGAACGACCCCGTCTGGCCTACAAT
GAATACCCTGATGACTCTCTGGACCTTGACCCATCTATGTTGGATTCCATCTGGAAGCCTGACTT
GTTCTTTGCCAATGAGAAGGGGGCCCACTTCCACGAAATCACCACGGACAACAACTGCTAAGAA
TCTCCCGGAATGGCAATGTCCTCTACAGCATCAGAATCACCTGACGCTGGCCTGCCCATGGA
CCTGAAGAATTTCCCGATGGATGTACAGACGTGTATCATGCAACTCGAAAGCTTTGGATATACCAT
```

GAACGACCTCATCTTTGAGTGGCAGGAGCAAGGAGCTGTGCAGGTGGCAGACGGACTGACCCT  
GCCTCAGTTTATTCTGAAGGAAGAGAAAGACCTGAGATACTGCACCAAGCACTACAACACAGGTA  
AATTCACCTGCATCGAGGCCCGATTCCACCTGGAGCGGCAGATGGGCTACTACCTGATCCAGAT  
GTACATCCCCAGCCTGCTCATCGTCATCCTGTCTGGATCTCCTTCTGGATCAACATGGATGCTG  
CACCAGCTCGTGTGGGGCTGGGCATCACCACAGTGCTCACCATGACCACACAGAGCTCTGGCTC  
CCGAGCCTCCCTACCCAAGGTGTCCTACGTGAAAGCTATTGACATTTGGATGGCTGTTTGCCTGC  
TCTTCGTGTTCTCTGCCCTGCTGGAGTACGCCGCGTCAACTTTGTGTCTCGGCAACACAAGGAA  
CTGCTTCGATTTAGGAGGAAGAGGCGACATCACAAGAGCCCCATGCTAAATCTGTTTCAGGATGA  
TGAGGGTGGAGAAGGCCGCTTCAACTTCTCTGCCTATGGGATGGGCCAGCCTGTCTGCAGGCC  
AAGGATGGCATCTCTGTCAAGGGTGCCAACAACAACAACACCACTAACCCGCCTCCTGCGCCAT  
CCAAGTCCCCGGAGGAGATGCGGAAACTCTTCATCCAGAGAGCCAAGAAGATCGACAAGATATC  
TCGCATCGGTTTCCCCTGGCCTTCTCATCTTCAACATGTTCTACTGGATCATCTATAAGATCGT  
CCGGAGAGAGGATGTCCACAACAAGTGA

### ***Glra2*, murin**

GGAAACTAGATTCTGCCAGATTTTGGAGTCTGGACAATAAATAGGCACTTTGTCTAGTCTCCTTT  
CTGGAATCATTTCGGGATATTTTCCACAACCATCACAGAAACAGGAATGTACCGGCAGCTAGTGA  
ACATTTTGACAGCCTTGTTTGCATTTTTCTTAGGGACAAACCACTTCAGGGAAGCTTTCTGCAAAG  
ACCATGACTCCAGGTCTGGAAAACATCCCTCGCAGACCCTATCTCCTTCAGATTTCTTGGATAAAT  
TAATGGGAAGAACATCAGGATATGATGCAAGAATCAGGCCAAATTTAAAGGTCTCCAGTAAAC  
GTTACTTGCAATATTTTTATCAACAGTTTTGGATCAGTCACAGAAACCACCATGGACTACCGAGTG  
AACATTTTTCTGAGACAGCAGTGGAATGATTCACGGCTGGCATAACAGTGAGTACCCAGATGATTC  
CCTGGATTTGGATCCCTCAATGTTGGATTGATTTGGAAACCGGATTTGTTCTTTGCCAATGAAAA  
GGGTGCCAATTTCCATGATGTCACCACTGACAACAAGTTGTTGCGGATTTCCAAAATGGCAAAG  
TGCTCTACAGTATTAGACTCACCTTGACTTTATCTTGTCCAATGGACCTGAAGAACTTTCCAATGG  
ATGTCCAGACCTGTACAATGCAGCTGGAGAGTTTTGGGTACACCATGAATGACCTGATATTTGAG  
TGGTTAAGTGATGGTCCAGTACAAGTTGCTGAAGGACTCACCTTGCCCCAGTTTATTTTGAAGAA  
GAGAAGGAGCTTGTTATTGCACAAAGCATTACAACACTGGTAAGTTTACCTGCATTGAGGTCAA  
GTTTCACCTGGAGCGCCAGATGGGCTACTATTTGATCCAGATGTACATCCCCAGCCTGTTGATAG  
TCATTTTGTCTGGGTCTCCTTTTGGATAAACATGGATGCAGCCCCTGCCAGGGTTGCCCTGGGC  
ATCACAACAGTCCTGACAATGACTACACAGAGTTCCAGGTTCCAGGGCATCTCTGCCAAAGGTCTC  
CTATGTGAAAGCAATTGACATCTGGATGGCGGTATGCCTTCTCTTTGTGTTTGTCTTACTGGA  
ATATGCAGCAGTGAACTTTGTCTCCAGGCAACATAAGGAGTTCCTTCGTCTCCGGAGACGACAGA  
AGAGGCAGAATAAGGAAGAAGATGTTACTCGTGAAAGTCGTTTTAACTTCAGTGGCTATGGGATG  
GGTCACTGCCTCCAAATGAAAGATGGCACAGCTGTCAAGGCTACACCTGCCAACCCACTTCCACA  
ACCCCCAAAGATGCAGATGCTATCAAGAAGAAGTTTGTGGATCGGGCAAAAAGAATTGACACCA  
TATCTCGAGCTGCCTTCCCCTGACCCTTCTCATTTTTCAACATCTTTTACTGGATCACATAAAGA  
TCATTCCGCATGAAGATGTCCACAAGAAATAGATGTACCCTGTTGACCCTGGACCTTCTTGCCTA  
AGTGTGTGCTTGTAATAACACAGTAATAGTGTCTTTATATCGCTTCAACAGAGAAGAACATTGAG  
GGTGGGGGGAGGGAAATCACGAGGGTGGGGTTTCTGGCACCTATATGACAAAAGACAGGTTCTA  
TGGGAAATTAAGAAAACACTGCACAAAATTAAGGTGTTGCAGAATCACATGAGCATAACTCCCATCCA  
TAGTCTATAGCATTGTTCTTTCAGATGATGCATCGCTCAGACATGATGTGCAAGGTCAAGTTCTCA  
ATGGATGATTAATTTATGGTTTACTTTGATGAGATTTGGTTCTGAAAGTTTGTGTTAATGCGCGCG  
AGTACGCGCGTGCCTGCGCGCACACACACACACACACACACACACACACTGAAAAT  
GCTTACCATCTGACAATAGTACTAGTCTATAGTAAATAATTGAGGACCAAACTTTTTCAGGAAAA  
TGCTGCCTCGTTTTTAAAACAAGCCTCCTGAGCTATGACATTTACAATGTCTGTAATTAGTGTTC

CCCAAGAAATCCTTCTGTGGGTTGTAAATTCTTTCTATGTACCAGAAAACAAGATAAACACAAATG  
ACAAAGAACAGATTTCTACTCTACTGTCTGTAGGTGCCACTTTGATATTATTTTTCTTTCTAGAT  
GTAAATTGGGGGTTTATTGTGTGTTGCGTAATTGATTTACTGGTATATCCTCTTAAAACAAATGCTC  
ATTTTATTTTAGATCAAGTTAGCATACTATGTATATTTTTTTCACTTTGGCTATATTTACGTGTGACT  
TTAAGTGCCCAAGTGTAACTTAGCTATTGCTGTGCGCTAAGCCACAGTATTTATGGAGATGGTGTGT  
TGTGACCGGTGTAGCTCAGATTAGCTCAAACCTCCATTCTGCCCTCATTGTAGCTGTAACACT  
AGTCCTAATGTTGACTGACCAGTAATTTGTACTTTCAATCCAAGTGAATATCGTTTTAAATATCCTT  
GACTAACTTAAAACTTTAAACTGTACTGTGATTTTCATAACCCGTTGCCTTTTTGGTACCAGAGC  
TACGTGGTTTGAATCCTGGCTACATGTTTTAAGTAAGAAAAAAAATGTATTTTTGCTTACTCAAAA  
GACAACCTGTAAAAATATATGGAAATAATTACATTTTACATGTGCTGTGAAAGGGATTATTTAAAA  
AAGCATTGTTCAGTTTCAATAAAGATAAGTGTGCCACTAA

### ***Gira3*, murin**

GGATCTCTTTCCGTATCATGGCCCACGTGAGACACTTTCCGACACTAGTTTCTGGATTTTACTTCT  
GGGAAGCCGCACTGTTACTGAGTTTGGTGGCCACAAAGGAAACAAACAGTGCGCGATCTCGAAG  
TGCTCCAATGTCACCTTCTGATTTTCTGGACAACTAATGGGGAGGACATCGGGGTATGATGCAA  
GAATCAGACCCAACCTCAAAGGTCCTCCAGTTAATGTCACATGCAACATATTCATAAACAGCTTTG  
GCTCCATTGCAGAGACGACTATGGATTACAGAGTAAACATTTTTCTTCGTCAGAAGTGAATGATC  
CTCGTCTTGCATACAGTGAATATCCTGACGATTCATTAGACCTTGACCCGTCTATGTTGGATTCCA  
TTTGAAACCTGACTTGTTCTTTGCTAATGAGAAGGGGGCTAACTTCCACGAAGTCACCACAGAT  
AACAAGCTGCTAAGAATTTCAAAAATGGAAATGTCCTTTATTCAATAAGGTTGACATTAACACTCT  
CCTGTCCAATGGATCTCAAGAATTTCCCAATGGATGTACAAACATGCATAATGCAACTTGAAAGCT  
TTGGGTACACAATGAATGATCTCATTGTTGAATGGCAAGATGAAGCCCCAGTACAAGTGGCTGAA  
GACTCACTTTGCCTCAATTTCTGTTGAAAGAAGAAAAGGACTTGCGGTACTGACTAAACACTAC  
AATACAGGAAAGTTTACATGCATAGAAGTGCATTCCATCTTGAGCGTCAGATGGGCTATTACTTG  
ATCCAGATGTACATCCCAGCCTCCTGATCGTTATTCTATCCTGGGTCTCATTCTGGATTAACATG  
GATGCAGCCCCAGCTAGAGTAGCTTTGGGCATCACCCTGTACTTACTATGACCACACAGAGTTC  
TGGATCCCGGGCCTCCTTACCAAGGTGTCATACGTCAAGGCTATTGACATTTGGATGGCGGTGT  
GCCTCCTTTTTGTGTTCTCAGCACTTCTGGAGTATGCAGCCGTGAATTTGTCTCAAGGCAACACA  
AGGAGCTGTTGAGGTTTCGGCGAAAGAGAAAGAATAAGACGGAAGCTTTTGCCTGGAGAAGTTT  
TACCGTTTCTCAGACACGGATGATGAGGTGAGGGAGAGTCGATTCAGCTTCACTGCCTATGGAAT  
GGGGCCCTGTCTGCAAGCCAAGGATGGTGTGGTTCCAAAAGGCCCAACCACGCTGTCCAGGT  
CATGCCAAAGAGCCCTGATGAAATGAGGAAGGTCTTCATCGACAGGGCTAAGAAGATTGACACC  
ATCTCCCGAGCCTGCTTTCCGCTAGCATTCTGATTTTTAACATTTTCTACTGGGTTATCTATAAAA  
TCCTTAGGCATGAAGACATTCATCAGCAGCAAGACTAAGTCTCTGAAGGCATACAGA

### ***Gira4*, murin**

CTCCAAGGTCCCTGCAGAATGACAACCTTGTTCAGCAAGCCTCTTCCTTCTTCTCTGGACCTT  
GCCAGGGAAGGTCCTGCTCAGTGTGGCTTTGGCAAAAGAGGATGTCAAATCTGGACTCAAAGGA  
TCCCAGCCTATGTCCCCTCTGATTTCTTGGACAAGCTTATGGGACGAACATCTGGATATGATGC  
TAGGATTAGGCCCAATTTCAAAGGTCCACCTGTGAATGTGACCTGCAACATCTTCATCAACAGTTT  
TGGCTCCGTCACTGAGACCACCATGGACTACCGGGTAAATGTCTTCTTGCGGCAGCAGTGGAAT  
GACCCACGTCTGGCCTACCGAGAATATCCAGATGACTCTCTCGACCTAGACCCATCCATGCTCGA  
CTCTATCTGGAAACCAGACCTCTTCTTTGCCAATGAGAAAGGGGCCAACTTCCATGAGGTGACCA

CAGACAACAAGTTACTGCGCATCTTCAAGAATGGAAATGTTCTCTACAGCATCAGATTGACCCTCA  
TTTTGTCCTGCCAATGGACCTCAAGAACTTCCAATGGACATACAGACCTGTACAATGCAGCTG  
GAAAGCTTTGGCTACACCATGAATGACCTCATGTTTGAGTGGCTAGAAGATGCTCCTGCTGTCCA  
AGTGGCTGAGGGGTTGACTCTACCCCAATTTATTTTGCGGGATGAGAAGGATCTAGGGTATTGTA  
CCAAGCACTACAATACAGGAAAATTCACCTTGATTGAGGTAAAGTTTCACCTGGAGCGGCAGATG  
GGCTACTATCTGATTCAAATGTACATCCCCAGCCTACTCATCGTCATCCTGTCCTGGGTCTCCTTC  
TGGATCAACATGGATGCGGCCCTGCTCGTGTAGGCCTTGGCATCACCACAGTCCTCACCATGA  
CAACTCAGAGCTCTGGATCCAGGGCCTCTTTGCCTAAGGTGTCCTACGTAAAGGCAATTGACATC  
TGGATGGCTGTATGCCTGCTCTTTGTATTTGCTGCCTTGCTTGAGTATGCTGCAGTCAATTTTGT  
TCTCGTCAGCATAAGGAATTTATGAGACTTCGTAGAAGGCAGAGACGTCAGCGTATGGAAGAAGA  
CATCATAAGAGAGAGCCGCTTCTATTTTCGTGGCTATGGCCTAGGACACTGCTTACAAGCAAGGG  
ATGGAGGTCCAATGGAAGGTTCCAGCATTTATAGTCCCCAACCTCCAACCCCTCTTCTAAAGGAA  
GGAGAAACCATGAGGAAACTCTATGTGGACCGAGCCAAGAGAATTGACACCATCTCCAGGGCTG  
TCTTCCCTTTTACTTTTCTTGTCTTCAATATCTTCTATTGGGTTGTCTATAAAGTACTAAGGTCAGAA  
GATATCCACCAGGCACTGTGAACAGGGTGGAGGCTATAGTGTA

## Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Professor Theo Dingermann für die Begutachtung dieser extern angefertigten Doktorarbeit und seine freundliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Heinz Wässle für die Aufnahme in seine Abteilung, die Bereitstellung des Dissertationsthemas sowie die sehr gute und vor allem stets zeitnahe Betreuung vor Ort.

Ich danke Dr. Silke Haverkamp, die mich als direkte Betreuerin in ihrer unkomplizierten Art immer großartig unterstützt hat.

Die unschätzbare Hilfe von Brigitte Marshallsay hat das Zustandekommen dieser Arbeit unheuer erleichtert, darüberhinaus möchte ich mich auch für die allumfassende Fürsorge bedanken, die Du uns Bewohnern des Kinderzimmers (und oft auch dem Rest der Welt) hast angeeignet lassen!

Ein Dankeschön auch an alle, die mich anderweitig technisch oder administrativ unterstützt haben: Driss Benzaid, Felicitas Boij, Ursula Arbogast, Elena Zurkowski, Wencke Armsen, Manfred Kilb, Birgit Ott und ganz besonders an Gong-Sun Nam und Walter Hofer in der Elektronenmikroskopie, an Dieter Engelkamp für die Hilfe bei der *in-situ*-Hybridisierung, an das befreundete Nachbarlabor (Hanna und Dana unter der Leitung von Susu) für der Einführung in die Biochemie, an Gregory O'Sullivan für die Gespräche und die konkrete praktische Hilfe beim GlyR $\alpha$ 4-Projekt, an Sriparna Majumdar und Jan Weiss für ihre Geduld mit meinen elektrophysiologischen und allgemein-philosophischen Fragen und an Christian Puller dafür, daß er mir in allen Belangen ein guter und lieber direktester aller Kollegen war. Ganz spezieller Dank geht an Christopher, ohne den ich meinen Computer im allgemeinen und eine bestimmte (sicherheitshalber nicht namentlich erwähnte) Software im speziellen gewiß niemals ertragen hätte, und von dem ich ungeheuer viel gelernt habe.

Zuletzt möchte ich mich für die gute Stimmung innerhalb der Abteilung und die allgemein hohe Bereitschaft zur gegenseitigen Hilfestellung bedanken. Ohne liebe Doktoranden- und andere Kollegen, zu nennen sind hier besonders Brigitte, Sabine und Christopher als unverzichtbare Zimmergenossen, Susu, Steffi, Dana, Hanna und früher Anja als Insassen des befreundeten Nachbarkinderzimmers, Jan, Christian, Anika, Zsuzsa, Peer und ehemals aber nicht zuletzt Olivia, wäre die Zeit am Institut nicht halb so schön gewesen.

Schließlich danke ich meiner Familie, vor allem meiner Mutter, Holger, Karl-Friedrich und meinem Vater für ihre multidisziplinäre Unterstützung und Liebe, ohne die ich so weit nicht gekommen wäre.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Liane Heinze, daß ich diese Doktorarbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Frankfurt am Main, den 01.09. 2006

Liane Heinze

# Liane Heinze – Curriculum Vitae

## Persönliche Daten

Vorname Liane  
Nachname Heinze  
Geburtsdatum 12.10.1977  
Geburtsort Leipzig  
Familienstand ledig  
Nationalität deutsch  
Adresse Emanuel-Geibel-Str. 15  
65185 Wiesbaden  
Telefon ++49 611 3412682  
Mobil ++49 177 2678912  
E-Mail lianeheinze@gmx.de



## Ausbildung

09/2003 bis 11/2006 Promotion am Max-Planck-Institut für Hirnforschung Frankfurt zur differentiellen Verteilung von Glyzinrezeptoren in der Retina  
06/2003 Drittes Pharmazeutisches Staatsexamen  
11/2002 bis 05/2003 Pharmaziepraktikantin in der Eichwaldapotheke in Frankfurt  
05/2002 bis 11/2002 Erasmus-Stipendiatin in den Departments of Neuroendocrinology and Psychopharmacology am King's College London, Mitarbeit an einer Studie zur Wirkung von Gingko-Extrakt auf die kognitiven Fähigkeiten postmenopausaler Frauen  
10/1997 bis 02/2002 Studium der Pharmazie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt, zweites Pharmazeutisches Staatsexamen  
11/1989 bis 06/1997 Besuch des Helmholtzgymnasiums in Frankfurt Main, Abitur  
09/1984 - 10/1989 Besuch der POS 5 Erfurt Süd

## Publikationen

Effects on cognition and mood in postmenopausal women of 1-week treatment with Ginkgo biloba  
D. E. Hartley, L. Heinze, S. Elsabagh, and S. E. File  
Pharmacology Biochemistry and Behaviour, June 2003;75(3):711-20  
  
Diversity of Glycine Receptors in the Retina: The Alpha 4 Subunit  
L. Heinze, R. J. Harvey, S. Haverkamp, and H. Wässle  
Journal of Comparative Neurology 2006, im Druck

## Referenzen

Prof. Dr. Heinz Wässle  
Max-Planck-Institut für Hirnforschung  
Abteilung Neuroanatomie  
Deutschordenstraße 46  
60528 Frankfurt am Main  
Tel. +49 69 96769-219  
E-Mail: waessle@mpih-frankfurt.mpg.de

Dr. Silke Haverkamp  
Max-Planck-Institut für Hirnforschung  
Abteilung Neuroanatomie  
Deutschordenstraße 46  
60528 Frankfurt am Main  
Tel. +49 69 96769-236  
E-Mail: haverkamp@mpih-frankfurt.mpg.de

## Sonstige Fähigkeiten

- Sprachen
  - Englisch fließend in Wort und Schrift
  - Französisch gut
  - Latein kleines Latinum
  - Italienisch Grundkenntnisse
  - Russisch Schulkenntnisse
- Computer
  - Bild- und Textverarbeitung (Microsoft Office, Photoshop, Corel Draw), mikroskopische Bildaufnahme (Axiovision, Gatan Digital Micrograph, LSM Pascal)

## Nebentätigkeiten und ehrenamtliche Tätigkeiten

- 1992 bis 1997 Nachhilfelehrerin in verschiedenen Fächern
- 1995 bis 1997 Volleyballjugendtrainerin bei Eintracht Frankfurt e.V.
- August 2000 Urlaubsvertretung in der Abteilung Qualitätssicherung bei der Firma LQS in Eschborn
- August 2001 Hilfswissenschaftlerin im Fachbereich Didaktik der Chemie an der Universität Frankfurt
- 2004 bis 2006 Nacht- und Notdienste in der Eichwaldapotheke

## Hobbies

- klassische Konzertgitarre, Volleyball, Gleitschirmfliegen