

Das hemmende Umfeld von Ganglienzellen in der Netzhaut des Auges

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Nicolas Flores-Herr
aus München

Frankfurt am Main (2001)

vom Fachbereich Physik der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W. Mäntele

Gutachter: Prof. Dr. H. Klein

Prof. Dr. H. Wässle

Datum der Disputation:

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Flores-Herr, N. Protti, D.A., Wässle, H. (2001). "Synaptic Currents Generating the Inhibitory Surround of Ganglion Cells in the Mammalian Retina." *J Neurosci* **21**(13): 4852–4863.

Protti, D. A., Flores-Herr, N. und von Gersdorff, H. (2000). "Light evokes Ca^{2+} spikes in the axon terminal of a retinal bipolar cell." *Neuron* **25**(1): 215-27.

Protti, D. A., Flores-Herr, N. und Wässle, H. (2000). "Effect of glutamate receptor blockers on the center-surround organization of the receptive field of retinal ganglion cells." Society for Neuroscience, New Orleans, USA.

1.	Einleitung	1-1
1.1.	Zielsetzung der Arbeit	1-1
1.2.	Aufbau der Netzhaut.....	1-2
1.3.	Aufbau und Funktion einer Nervenzelle	1-3
1.4.	Signalübertragung in der Netzhaut.....	1-4
1.4.1.	Signalwege in der Netzhaut	1-6
1.5.	Rezeptive Felder retinaler Ganglienzellen	1-7
1.5.1.	Klassifizierung retinaler Ganglienzellen.....	1-11
1.5.2.	Mathematische Beschreibung des rezeptiven Feldes.....	1-14
1.5.3.	Zelluläre und synaptische Mechanismen der Umfeldhemmung	1-17
1.6.	Experimentelles Vorgehen	1-19
2.	Methoden.....	2-21
2.1.	Experimenteller Aufbau	2-21
2.2.	Der Lichtreiz.....	2-24
2.2.1.	Die Abbildungsgüte der Apparatur.....	2-24
2.2.2.	Visuelle Reizung retinaler Ganglienzellen	2-26
2.3.	Meßkammer.....	2-28
2.3.1.	Badapplikation von Pharmaka	2-29
2.4.	Präparation der Netzhaut	2-30
2.5.	Identifikation retinaler Ganglienzellen.....	2-31
2.6.	Histologie.....	2-32
2.6.1.	Die DAB-Reaktion.....	2-32
2.6.2.	Die Intensivierungsreaktion	2-32
2.7.	Lösungen und Substanzen	2-33
2.7.1.	Intrazellulärlösung	2-34
2.7.2.	Substanzen	2-37
2.8.	Elektrophysiologische Methoden	2-38
2.8.1.	Herstellung der Patch-Elektroden.....	2-38
2.8.2.	Ganzzelleableitung	2-38
2.8.3.	Spannungsklemme	2-38
2.8.4.	Stromklemme	2-40
2.8.5.	Gigaohmabdichtung ('gigaseal')	2-40

2.8.6.	Aufreißen der Zellmembran.....	2-41
2.8.7.	Messung des Ruhemembranpotentials V_r	2-44
2.8.8.	Weitere Fehlerquellen bei der Ganzzellstrommessung mit der Patch-Clamp-Technik	2-44
2.9.	Qualität von Patch-Clamp-Messungen bei Zellen mit verzweigten Dendritenbäumen („space-clamp-problem“)	2-45
2.10.	Methoden der Auswertung	2-47
2.10.1.	Auswertung lichtinduzierter Ströme	2-47
2.10.1.	Reizung mit kleinen Lichtpunkten.....	2-49
2.10.2.	Flächen-Variations-Messung	2-49
2.10.3.	Erstellen von Strom-Spannungskurven.....	2-50
3.	Ergebnisse	3-51
3.1.	Morphologie retinaler Ganglienzellen.....	3-52
3.2.	Reizung mit kleinen Lichtpunkten	3-54
3.3.	Flächen-Variations-Messungen	3-56
3.3.1.	ON-Zentrum-Ganglienzelle	3-57
3.3.2.	Auswertung der Flächen-Variations-Messung der ON-Zentrum-Ganglienzelle	3-58
3.3.3.	OFF-Zentrum-Ganglienzelle.....	3-59
3.3.4.	Auswertung der Flächen-Variations-Messung der OFF-Zentrum-Ganglienzelle.....	3-60
3.4.	Die Strom-Spannungskurven lichtinduzierter Ströme.....	3-61
3.5.	Intensitätsabhängigkeit der Reizantwort	3-65
3.5.1.	Intensitätsabhängigkeit des lichtinduzierten Stroms.....	3-65
3.5.2.	Unabhängigkeit des Umkehrpotentials lichtinduzierter Ströme von der absoluten Intensität.....	3-66
3.6.	Flächen-Variations-Messung bei E_{Cl} und $E_{Na/K}$	3-68
3.7.	Abhängigkeit der Reizantwort der Ganglienzelle von der intrazellulären Chloridionenkonzentration	3-71
3.8.	Pharmakologische Charakterisierung der lateralen Hemmung	3-74
3.8.1.	Pharmakologische Charakterisierung der direkten (postsynaptischen) lateralen Hemmung.....	3-74

3.8.2.	Pharmakologische Charakterisierung der indirekten (präsynaptischen) lateralen Hemmung.....	3-77
3.8.3.	Einfluß von Tetrodotoxin auf die laterale Hemmung retinaler Ganglienzellen	3-81
4.	Diskussion.....	4-84
4.1.	Direkte laterale Hemmung retinaler Ganglienzellen.....	4-84
4.1.1.	Abhängigkeit der direkten lateralen Hemmung von der intrazellulären Chloridionenkonzentration	4-85
4.1.2.	Pharmakologische Charakterisierung der direkten lateralen Hemmung.....	4-86
4.2.	Indirekte laterale Hemmung retinaler Ganglienzellen.....	4-88
4.2.1.	Innere plexiforme Schicht.....	4-88
4.2.2.	Äußere plexiforme Schicht	4-89
5.	Zusammenfassung.....	5-94
6.	Literaturverzeichnis.....	6-97
7.	Abkürzungsverzeichnis	7-115
8.	Lebenslauf.....	8-117
9.	Danksagung.....	9-118

1. Einleitung

1.1. Zielsetzung der Arbeit

Die Außenwelt wird durch die Optik des Auges (Hornhaut und Linse) auf die Netzhaut (Retina) abgebildet. Die Netzhaut ist, wie der Film im Photoapparat, die lichtempfindliche Schicht. In den Photorezeptoren, den Zapfen und Stäbchen, wird Licht in ein elektrisches Signal umgewandelt und an nachgeschaltete Nervenzellen über spezielle Kontaktstellen, sogenannte Synapsen, weitergeleitet. Ganglienzellen summieren die Signale der vorgeschalteten Nervenzellen und leiten sie an das Gehirn weiter.

Der Bereich der Netzhaut, aus dem eine Ganglienzelle Lichtsignale aufsummiert, wird rezeptives Feld genannt. Es umfaßt einen zentralen, erregenden Bereich, das rezeptive Feldzentrum, und einen peripheren, hemmenden Bereich, das Umfeld. Dieser antagonistische Aufbau aus erregendem Zentrum und hemmenden Umfeld verstärkt den Bildkontrast: gleichförmige Lichtreize werden abgeschwächt, Unterschiede werden verstärkt. Es ist bisher noch nicht bekannt, auf welcher Verarbeitungsebene der Netzhaut die Umfeld- oder laterale Hemmung eingespeist wird. Ganglienzellen können eine direkte Hemmung durch Amakrinzellen erfahren. Es ist aber auch möglich, daß die Bipolarzellen, welche die Lichtsignale von den Photorezeptoren auf die Ganglienzellen übertragen, gehemmt werden (indirekte Hemmung). In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden welches der beiden Hemmungsmodelle (direkt oder indirekt) vorliegt. Zu diesem Zweck werden die lichtinduzierten Membranströme der Ganglienzellen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik gemessen. Durch eine gezielte Veränderung des Membranpotentials („voltage clamp“) läßt sich unterscheiden, welcher Anteil der Umfeldhemmung direkt an der Ganglienzellmembran angreift und welcher Anteil im vorgeschalteten Netzwerk entsteht.

1.2. Aufbau der Netzhaut

Die Netzhaut ist ein Nervengewebe von etwa 0,2 mm Dicke und 25 mm Durchmesser. Die Netzhaut besteht aus fünf Typen von Nervenzellen (Neuronen): Photorezeptoren, Horizontalzellen, Bipolarzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen (Abbildung 1). Die Nervenzellen sind durch spezielle Kontaktstellen, die sogenannten Synapsen, miteinander verbunden. Man unterscheidet in der Netzhaut zwei synaptische Schichten, die äußere Synapsenschicht (,outer plexiform layer', OPL) und die innere Synapsenschicht (,inner plexiform layer', IPL).

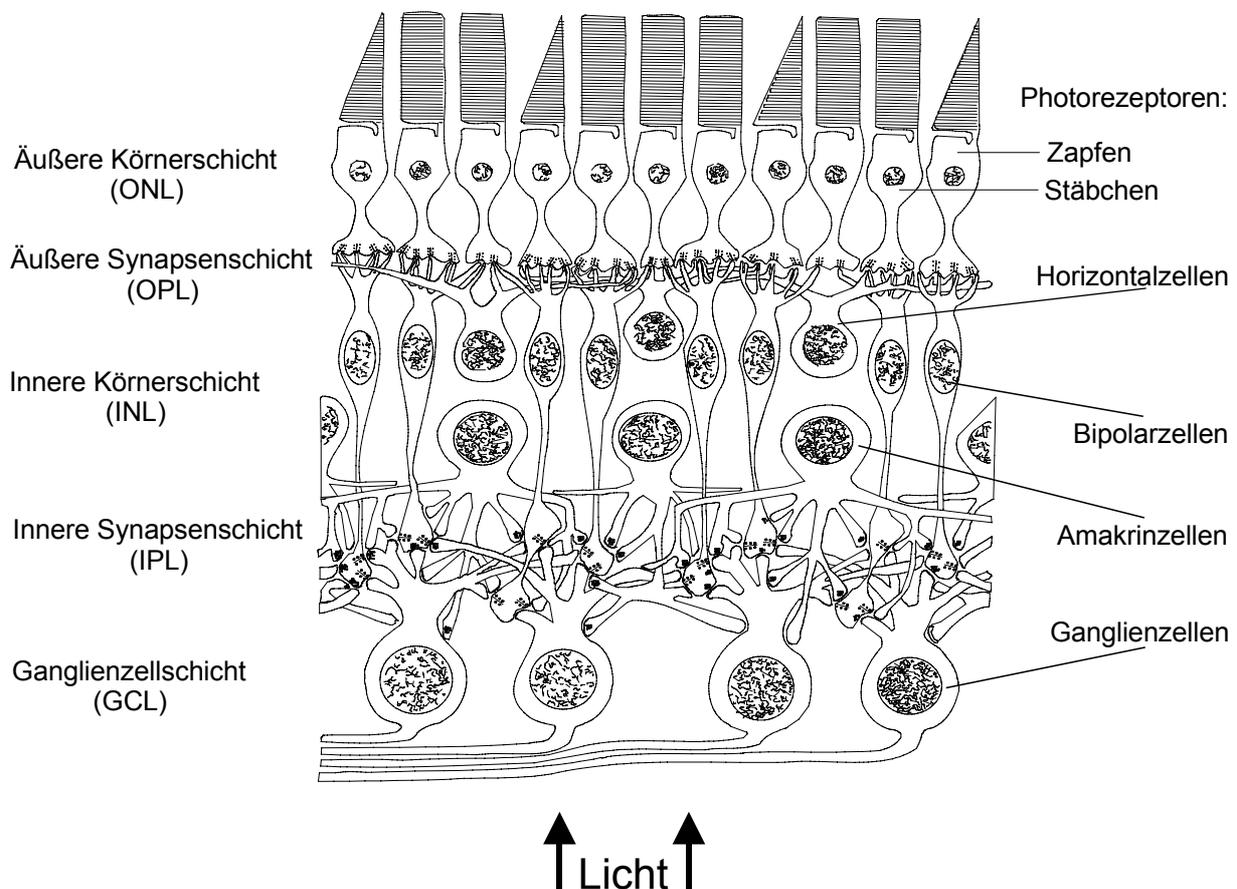


Abbildung 1: Ein vertikaler Schnitt durch die etwa 0,2 mm dicke Säuger-Netzhaut. Sie ist in fünf anatomische Schichten unterteilt: äußere Körnerschicht (ONL), äußere Synapsenschicht (OPL), innere Körnerschicht (INL), innere Synapsenschicht (IPL) und Ganglienzellschicht (GCL). Es gibt fünf Hauptklassen von Nervenzellen: Photorezeptoren (Zapfen und Stäbchen), Horizontalzellen, Bipolarzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen. Die Photorezeptoren liegen mit der lichtabgewandten Seite im Auge, so daß das einfallende Licht zunächst die gesamte Netzhaut durchdringen muß bevor es absorbiert werden kann.

1.3. Aufbau und Funktion einer Nervenzelle

Nervenzellen im Zentralnervensystem, zu dem auch die Netzhaut gehört, bestehen aus einem Zellkörper und zwei Arten von Fortsätzen: Dendriten und Axone. Über die Dendriten empfängt eine Nervenzelle Signale von vorgeschalteten Nervenzellen, über das Axon ist sie mit nachgeschalteten Nervenzellen in Kontakt. Die Zellkörper retinaler Nervenzellen besitzen Durchmesser zwischen 10 μm und 35 μm , der Durchmesser der Fortsätze liegt bei 1 μm bis 4 μm (Boycott und Wässle, 1974; Peichl *et al.*, 1987a). Zellkörper und Fortsätze der Nervenzellen sind von einer selektiv permeablen Membran umgeben. Infolge der unterschiedlichen Permeabilität dieser Membran für Kalium-, Natrium- und Chloridionen baut sich zwischen Intrazellulär- und Extrazellulärraum der Nervenzelle ein Konzentrationsgefälle dieser Ionenarten auf. Dies führt zu einer elektrischen Potentialdifferenz: der Intrazellulärraum ist etwa 75 mV negativ gegenüber dem Extrazellulärraum (Ruhemembranpotential der Zelle). An den Berührungspunkten der Fortsätze können Nervenzellen Synapsen bilden, an denen Signale auf andere Nervenzellen übertragen werden. Wird eine vorgeschaltete Nervenzelle (präsynaptische Nervenzelle) durch einen elektrischen Impuls erregt, so schüttet sie an der Synapse am Axonende einen Botenstoff (Neurotransmitter) aus. Der Neurotransmitter bindet an Rezeptoren auf den Dendriten einer nachgeschalteten Nervenzelle (postsynaptische Nervenzelle). Infolge dieser Bindung fließt ein Ionenstrom über die Membran (Membranstrom oder synaptischer Strom) der postsynaptischen Nervenzelle, welcher lokal das Membranpotential ändert. Diese lokale Potentialänderung breitet sich über die Membran der Zelle aus (Katz, 1985; Johnston und Wu, 1995; Kandell *et al.*, 1996). Je nach Art des Neurotransmitters und des Ionenstroms wird das Membranpotential in Richtung positiver Werte (Depolarisation) oder in Richtung negativer Werte (Hyperpolarisation) verändert (siehe auch Registrierungen in Abbildung 2). Ein synaptischer Strom, welcher die Membran depolarisiert wird als erregender Membranstrom bezeichnet. Erregende Membranströme sind Kationenströme, die sich hauptsächlich aus Natrium- und Kaliumionen zusammensetzen und bei etwa 0 mV die Richtung wechseln (Umkehrpotential; $E_{\text{Na/K}} = 0 \text{ mV}$). Ein synaptischer Strom, welcher die Membran hyperpolarisiert, heißt hemmender Membranstrom und besteht entweder aus Chloridionen ($E_{\text{Cl}} = -60 \text{ mV}$) oder Kaliumionen ($E_{\text{K}} = -90 \text{ mV}$).

1.4. Signalübertragung in der Netzhaut

Das Bild der Außenwelt wird von der Netzhaut in neuronale Signale (d.h. zeitliche Änderungen der Neurotransmitterkonzentration und des elektrischen Potentials) übersetzt. Photorezeptoren (Zapfen und Stäbchen) wandeln

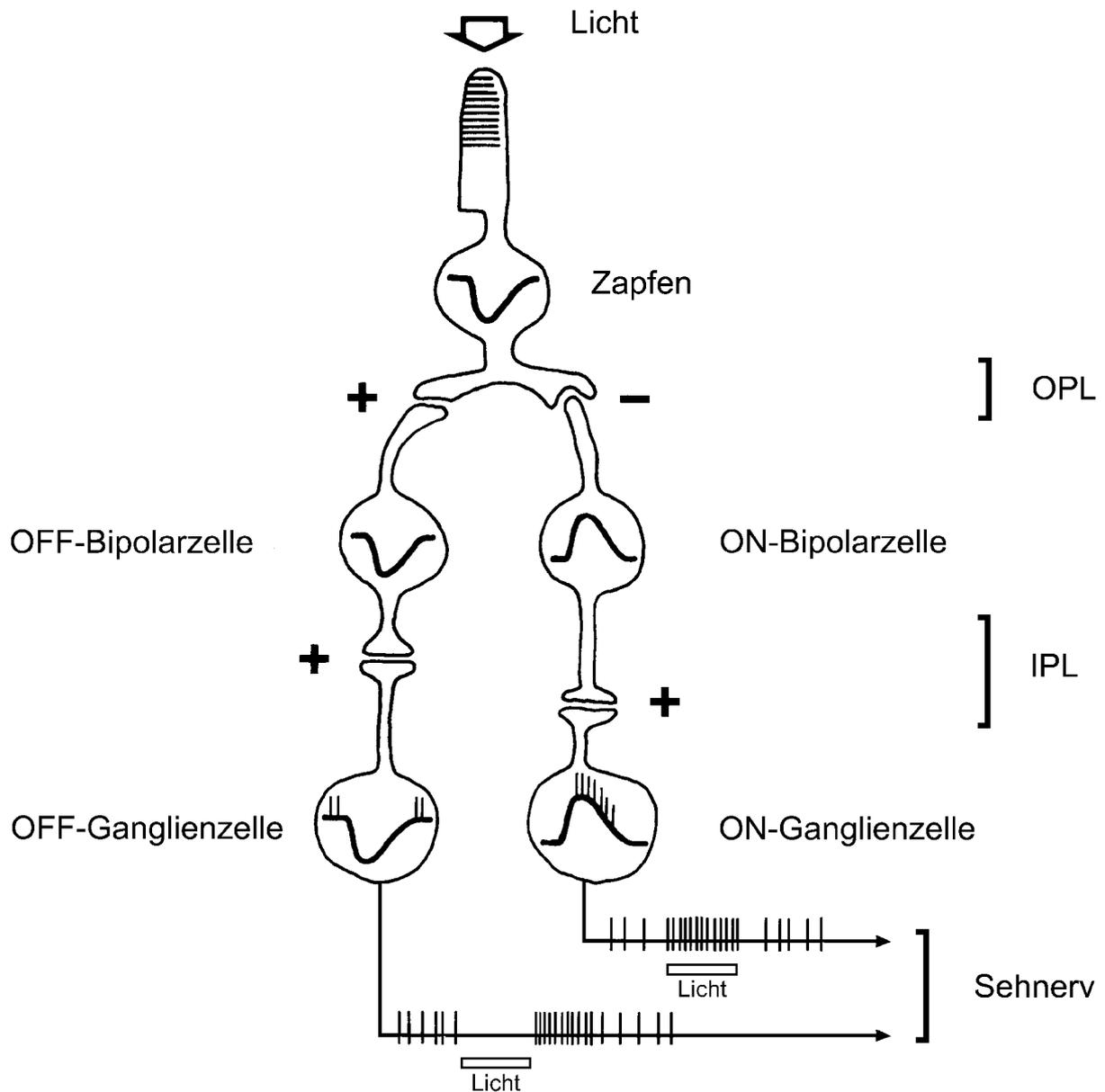


Abbildung 2: Vertikaler, erregender Signalweg der Netzhaut für das Tages-Sehen. Das Signal eines Zapfen-Photorezeptors wird über eine Synapse in der OPL auf ON- und OFF-Bipolarzellen übertragen. Die Bipolarzellen leiten das Signal über Synapsen in der IPL jeweils an eine ON- und an eine OFF-Ganglienzelle weiter. In den Zellkörpern sind schematisch die lichtinduzierten Potentialänderungen (Lichtantworten) eingezeichnet. Eine Depolarisation ist als eine Auslenkung der Registrierung nach oben, eine Hyperpolarisation als eine Auslenkung der Registrierung nach unten dargestellt. In den Ganglienzellen ist die Übersetzung der graduierten Potentialänderung (Analogsignal) in eine zeitliche Abfolge von Aktionspotentialen (Digitalsignal) gezeigt. Das Anschalten von Licht erhöht die Entladungsrate einer ON-Ganglienzelle und verringert die Entladungsrate einer OFF-Ganglienzelle. Ausschließlich die Aktionspotentiale werden im Sehnerv an das Gehirn weitergeleitet. Entnommen aus (Peichl, 1992).

Lichtreize über eine intrazelluläre, biochemische Signalkaskade in stufenlose (graduierte) elektrische Potentiale um. Stäbchen werden bereits durch schwaches Licht (Dämmerungssehen) aktiviert, während Zapfen auf hohe Leuchtdichten reagieren (Tagesehen). Die Axonenden der Photorezeptoren bilden mit den Dendriten der Bipolarzellen in der OPL synaptische Kontakte. An dieser ersten Synapse des Sehsystems wird das Signal der Photorezeptoren auf die Bipolarzellen übertragen. Zapfen kontaktieren zwei Typen von Zapfen-Bipolarzellen (Abbildung 2): ON-Bipolarzellen werden durch Belichtung depolarisiert, OFF-Bipolarzellen hyperpolarisiert. Bipolarzellen übertragen die lichtinduzierten Signale in die IPL und treten an ihren Axonenden mit den Dendriten der Ganglienzellen in synaptischen Kontakt. ON-Bipolarzellen übertragen das graduierte Signal jeweils auf ON-Ganglienzellen, und OFF-Bipolarzellen auf OFF-Ganglienzellen. ON-Ganglienzellen werden durch visuelle Reize erregt, die heller sind als der Hintergrund, OFF-Ganglienzellen durch Reize, die dunkler sind als der Hintergrund (im folgenden auch Dunkelreiz oder Dunkelpunkt genannt). Auf diese Weise werden durch die Netzhaut zwei Aspekte eines Lichtpunktes analysiert, nämlich ‚Wie hell ist der Lichtpunkt?‘ und ‚Wie dunkel ist der Lichtpunkt?‘. Die Qualitäten ‚hell‘ und ‚dunkel‘ bzw. ‚weiß‘ und ‚schwarz‘ werden in der Netzhaut wie auch im übrigen visuellen System in funktionell und räumlich getrennten ON- und OFF-Kanälen verarbeitet, wodurch das Signal-Rauschverhältnis der Information ‚Lichtintensität‘ verbessert wird.

Die Ganglienzellen wandeln das graduierte Signal (Analogsignal) der Bipolarzellen in Aktionspotentiale (Digitalsignal) um (siehe Registrierungen in Ganglienzellen in Abbildung 2). Ganglienzellen erzeugen Aktionspotentiale, wenn die Depolarisation des Membranpotentials eine Schwelle überschreitet (ungefähr -40 mV). Ein Aktionspotential besitzt eine Amplitude von etwa 110 mV und hat eine Länge von ungefähr einer Millisekunde. In retinalen Ganglienzellen werden Aktionspotentiale am Ursprung des Axons (Axonhügel) erzeugt und über die Axone im Sehnerv zum Gehirn weitergeleitet. Zielbereiche sind die visuellen Areale des Zwischenhirns (Thalamus) und des Mittelhirns. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Aktionspotentiale beträgt zwischen 2 und 40 m/s (Rodieck, 1973). An den Axonenden, den Synapsen zu nachgeschalteten Zellen im Gehirn, bewirken die Aktionspotentiale die Freisetzung von Neurotransmitter.

Eine Ganglienzelle ist umso stärker erregt, je mehr Aktionspotentiale pro Zeiteinheit (Entladungsrate) in ihr entstehen. Visuelle Information wird somit von Ganglienzellen in eine zeitliche Änderung der Entladungsrate übersetzt. Die Entladungsrate einer Ganglienzelle kann mit Hilfe einer Elektrode gemessen werden; entweder bei einem lebenden, anästhesierten

Tier, in der Netzhaut *in vivo* (Kuffler, 1953) oder an einer isolierten Netzhaut *in vitro* (Werblin und Dowling, 1969). In solchen Experimenten können Lichtreize auf die Netzhaut projiziert werden, deren Dauer, Abmessungen und Intensität festgelegt werden können. Da Ganglienzellen die ‚Ausgangsebene‘ der Netzhaut sind, ist die in ihren Lichtantworten enthaltene Information die Summe des Zusammenwirkens aller retinalen Nervenzellen.

1.4.1. Signalwege in der Netzhaut

Der Signalfluß von den Photorezeptoren über die Bipolarzellen zu den Ganglienzellen wird als vertikaler Signalweg der Netzhaut bezeichnet (Abbildung 2). An den Synapsen des vertikalen Signalwegs erfolgt die synaptische Übertragung durch den Neurotransmitter Glutamat (Brandstätter *et al.*, 1998; Brandstätter und Hack, 2001). Zusätzlich zum vertikalen erregenden Signalweg existieren in der äußeren Synapsenschicht (OPL) und inneren Synapsenschicht (IPL) horizontale (laterale), hemmende Signalwege (Werblin, 1973). Diese können Hemmung über eine Distanz von einigen zehn Mikrometern bis zu einigen Millimetern übertragen. In der OPL wird die Hemmung durch die Horizontalzellen über die Freisetzung des hemmenden Neurotransmitters GABA erzeugt (Schwartz, 1987). In der IPL wird durch die Amakrinzellen die Signalübertragung von den Bipolarzellen auf die Ganglienzellen gehemmt. Sie schütten die hemmenden Neurotransmitter GABA oder Glyzin aus. Solche hemmenden Einflüsse können unter anderem eine genaue Anpassung des Signalflusses an die mittlere Helligkeit des Lichtreizes bewirken. Es gibt in der Säuger-Netzhaut mehr als 10 verschiedene Typen von Ganglienzellen, die unterschiedliche Lichtantworten zeigen, d.h. selektiv verschiedene Aspekte eines Lichtreizes kodieren (siehe Kapitel 1.5.1) (Masland, 1986; Dowling, 1987; Wässle und Boycott, 1991). Diese Ganglienzelltypen sind auf spezifische Weise mit einer oder mit mehreren der über 20 verschiedenen Amakrinzellen verschaltet und erhalten dadurch ihre spezifischen Antworteigenschaften (Vaney, 1990; MacNeil und Masland, 1998).

1.5. Rezeptive Felder retinaler Ganglienzellen

Das rezeptive Feld einer Ganglienzelle ist der Ausschnitt des Gesichtsfeldes, innerhalb dessen Lichtreize die Entladungsrate der Zelle verändern (Hartline, 1938; Hartline, 1940). Das rezeptive Feld besteht aus zwei konzentrischen Bereichen (Abbildung 3): Ein Lichtpunkt der ins rezeptive Feldzentrum projiziert wird erhöht die Entladungsrate (siehe Stelle bzw. Registrierung 3), ein Lichtpunkt der ins Umfeld projiziert wird führt zu einer Verringerung der Entladungsrate (siehe Stellen bzw. Registrierungen 2 und 4). Lichtreize außerhalb des rezeptiven Feldes verändern die Entladungsrate der Ganglienzelle nicht (siehe Stellen bzw. Registrierungen 1 und 5).

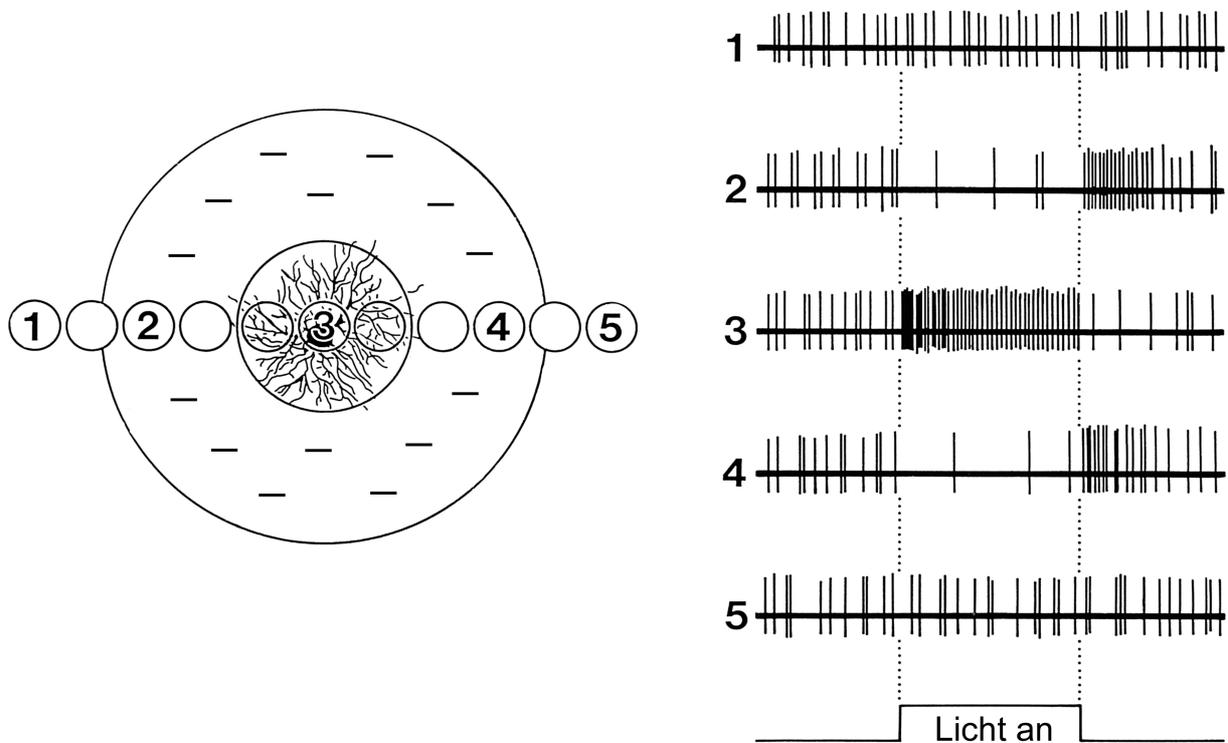


Abbildung 3: Dendritenbaum und konzentrisches rezeptives Feld einer ON-Zentrum-Ganglienzelle. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde mit kreisförmigen Lichtreizen an den Retinaorten (1-5) stimuliert und die Lichtantwort der Ganglienzelle mit einer Mikroelektrode gemessen. Die zu den jeweiligen Retinaorten (1-5) gehörenden Entladungsraten (1-5) wurden rechts aufgetragen. Der zeitliche Ablauf der Lichtreizung ist unten rechts gezeigt. Ein Lichtreiz an der Stelle 3 erhöht die Entladungsrate während des Einschaltens und verringert die Entladungsrate während des Ausschaltens. An den Stellen 2 und 4 wird die Entladungsrate während des Einschaltens verringert und während des Ausschaltens erhöht. Lichtreize an den Stellen 1 und 5 rufen keine meßbare Veränderung der Entladungsrate hervor. Das rezeptive Feld (großer Kreis) retinaler Ganglienzellen besteht aus einem erregendem Zentrum (kleiner Kreis) und einem hemmenden Umfeld (großer Kreis mit Minuszeichen gefüllt) auf. Lichtreize im Zentrum erhöhen die Entladungsrate, während Lichtreize im Umfeld die Entladungsrate verringern.

Zentrum und Umfeld werden im folgenden mit RFC („receptive field center“) und RFS („receptive field surround“) abgekürzt (Kuffler, 1953). Bei einem konzentrisch antagonistisch organisierten rezeptiven Feld (siehe Abbildung 3) ist das RFC kreisförmig und wird vom RFS ringförmig umschlossen (Rodieck und Stone, 1965a). Die Entladungsrate einer ON-Zentrum-Ganglienzelle wird durch das Anschalten ein Lichtreizes innerhalb RFCs erhöht. Das Anschalten eines Lichtreizes innerhalb des RFS verringert die Entladungsrate. OFF-Zentrum-Ganglienzellen werden durch das Anschalten eines Dunkelpunktes im RFC erregt, während sie im RFS durch Dunkelpunkte gehemmt werden (Enroth-Cugell und Robson, 1966; Creutzfeldt und Sakmann, 1969).

Das antagonistisch organisierte rezeptive Feld retinaler Ganglienzellen hebt örtliche Leuchtdichteunterschiede des Gesichtsfeldes hervor. Dies verbessert die Wahrnehmung von Kontrasten (Rodieck, 1965). Das optische Auflösungsvermögen der Netzhaut ist hauptsächlich von der Größe der rezeptiven Felder retinaler Ganglienzellen abhängig und entspricht etwa der Hälfte des rezeptiven Felddurchmessers. Das Auflösungsvermögen der Netzhaut wird durch die laterale Hemmung nur geringfügig verbessert (Wässle, 1971; Wässle und Creutzfeldt, 1973).

Durch anatomische und physiologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Ausdehnung des RFC dem Durchmesser des Dendritenbaums entspricht (Brown und Major, 1966; Creutzfeldt *et al.*, 1970). Die Durchmesser des Dendritenbaums und des rezeptiven Feldes einer Ganglienzelle sind von deren Abstand vom zentralen Bereich der Netzhaut abhängig (Exzentrizität). In zentralen Bereichen der Netzhaut, beispielsweise der Fovea (gelber Fleck) des Menschen, beträgt der Durchmesser des Dendritenbaums nur etwa 10 μm (dies entspricht einem Sehwinkel von etwa $0,04^\circ$), während er in peripheren Bereichen bis zu 600 μm (entsprechend einem Sehwinkel von $2,4^\circ$) betragen kann (Dacey und Petersen, 1992; Dacey, 1993; Rodieck, 1998). Die beschriebene Abhängigkeit gilt für alle Säugetiere (Hubel und Wiesel, 1960; Boycott und Wässle, 1974; Peichl und Wässle, 1979; Watanabe und Rodieck, 1989; Rodieck, 1998).

Das RFC wird durch den erregenden vertikalen Signalweg Photorezeptor-Bipolarzellen-Ganglienzellen erzeugt (Boycott und Dowling, 1969; Dowling und Werblin, 1969; Werblin und Dowling, 1969; Dowling und Werblin, 1971). Die Hemmung im Umfeld wird durch die beiden hemmenden, lateralen Signalwege die Horizontalzellen in der OPL und die Amakrinzellen in der IPL erzeugt (Werblin, 1972; Werblin, 1973; Werblin, 1974; Werblin und Copenhagen, 1974).

Die Fortschritte in der Meßtechnik, insbesondere bei Mikroelektrodenmessungen, ermöglichten rezeptive Felder sowie zelluläre und synaptische Verschaltungen, die bei der Umfeldhemmung eine Rolle spielen, zu erforschen. Die rezeptiven Felder von einzelnen retinalen Ganglienzellen wurden erstmals, allerdings noch ungenau, von Haldan Hartline und Ragnar Granit beschrieben (Hartline, 1938; Hartline, 1940; Granit, 1947). In den Experimenten von Hartline und Granit wurde die Entladungsrate der Ganglienzelle nicht direkt am Zellkörper, sondern an einer einzelnen Faser des optischen Nervs gemessen (siehe Registrierungen in Abbildung 2 unten). Die Lichtantworten wurden mit extrazellulären Elektroden in einer Augenbecherpräparation *in vitro* gemessen (Hartline, 1938; Hartline, 1940; Granit, 1950). Diese Methode hatte den Nachteil, daß es nur sehr selten gelang, die Aktivität einer einzelnen Nervenfasers zu messen.

Sehr viel genauer konnte das rezeptive Feld retinaler Ganglienzellen durch *in vivo* Experimente, welche erstmals von Stephen Kuffler durchgeführt wurden, charakterisiert werden (Kuffler, 1953). Dabei wurde eine extrazelluläre Mikroelektrode mit Hilfe eines Mikromanipulators in das Auge einer anästhesierten Katze eingeführt und zur Netzhaut vorgetrieben. Auf diese Weise konnte die Entladungsraten einer einzelnen Ganglienzelle direkt am Zellkörper gemessen werden (siehe Registrierungen in Abbildung 3). Die extrazelluläre Mikroelektrode bestand aus einem Platin-Iridiumdraht (oder aus einem gespitzen Wolframdraht) von etwa 10-15 µm Durchmesser (Levick, 1972). Um Einzelzellantworten zu messen, wurde der Draht bis auf wenige Mikrometer an seiner Spitze, welche auf dem Zellkörper auflag, elektrisch isoliert. Die Messung von Lichtantworten in der Retina *in vivo* besitzt den Vorteil, daß während eines Experiments relativ viele Einzelzellmessungen möglich sind und die Messung an einer Ganglienzelle in den meisten Fällen für einige Stunden stabil ist. Die extrazelluläre Messung der Entladungsrate besitzt allerdings den Nachteil, daß Membranpotentialänderungen, welche durch den synaptischen Eingang der Ganglienzelle erzeugt werden (Analogsignal), nicht gemessen werden können.

Durch die Verwendung von Glaselektroden mit lang ausgezogener Spitze und einem Widerstand von etwa 200-500 MΩ (entspricht einem Öffnungsdurchmesser von weniger als einem Mikrometer), sogenannten intrazellulären Elektroden, gelang es erstmals das Membranpotential retinaler Ganglienzellen zu messen (Werblin und Dowling, 1969). Diese Versuche wurden beim Salamander *Necturus Maculosus* durchgeführt, dessen retinale Neurone besonders große Zellkörper besitzen, was solche intrazellulären Messungen erst möglich macht. Lichtantworten, welche von Ganglienzellen mit intrazellulären Elektroden gemessen wurden, setzen sich aus graduierten Potentialen und Aktionspotentialen zusammen

(siehe Registrierung in Ganglienzellen in Abbildung 2). Die Elektroden sind mit einer leitfähigen Elektrolytlösung gefüllt und werden in die Ganglienzellen eingestochen. Aus technischen Gründen können Lichtantworten von Ganglienzellen mit intrazellulären Elektroden nur *in vitro*, entweder in einer Schnittpräparation (Werblin und Dowling, 1969) oder in einer Augenbecherpräparation (Kleinschmidt und Dowling, 1975; Dacheux und Miller, 1976), gemessen werden. Durch die Verwendung von intrazellulären Elektroden konnten erstmals auch Lichtantworten von anderen retinalen Zellklassen gemessen werden (Dowling und Werblin, 1969; Werblin und Dowling, 1969). Die Lichtantworten der anderen Nervenzellklassen bildeten die Grundlage für die zellulären Modelle lateraler Hemmung (siehe Kapitel 1.4.1) (Werblin, 1973; Werblin, 1974; Werblin und Copenhagen, 1974). Mit Hilfe der intrazellulären Elektrode konnte durch das Anlegen einer Spannung Strom in die Zelle geleitet werden und somit das Membranpotential der Ganglienzelle verändert werden. Auf diese Weise konnte das Potential, an denen der lichtinduzierte Membranstrom die Richtung wechselt, gemessen werden (im folgenden ‚Umkehrpotential des lichtinduzierten Membranstroms‘ genannt) (Belgum *et al.*, 1982b; Belgum *et al.*, 1982a; Belgum *et al.*, 1983; Freed und Nelson, 1994). Das Umkehrpotential des lichtinduzierten Membranstroms liefert Hinweise darüber, aus welchen Ionenarten der Membranstrom zusammengesetzt ist und somit welcher Neurotransmitter präsynaptisch ausgeschüttet wurde (siehe auch Kapitel 1.5.3). Die synaptischen Mechanismen der lateralen Hemmung retinaler Ganglienzellen wurden auf diese Weise, allerdings noch sehr ungenau, identifiziert (Freed und Nelson, 1994; Cook *et al.*, 1998; Cook und McReynolds, 1998). Ein Nachteil der intrazellulären Messungen ist, daß in vielen Fällen zwischen dem Elektrodenschaft und der Zellmembran Lecks entstehen und der Intrazellulärraum gegenüber dem Extrazellulärraum nicht mehr elektrisch isoliert ist. Aus diesem Grund weisen die Messungen oft hohes Rauschen auf. Das Messen des Umkehrpotentials von synaptischen Strömen wird durch den hohen Widerstand der Elektrodenspitze und das Leck das beim Einstechen der Elektrode in die Zelle entsteht, erheblich erschwert.

Infolge der Entwicklung der Patch-Clamp-Technik durch Erwin Neher und Bert Sakman war es möglich, mit einer Elektrode einen niederohmigen und leckfreien elektrischen Zugang zum Intrazellulärraum herzustellen (Neher und Sakmann, 1976; Hamill *et al.*, 1981; Neher, 1992b; Neher und Sakmann, 1992). Bei Patch-Clamp-Messungen werden Glaselektroden mit einem Widerstand von etwa 4-12 M Ω (entspricht einem Öffnungsdurchmesser von etwa einem Mikrometer) verwendet (siehe auch Kapitel 2.8.2). Durch die große Elektrodenöffnung diffundiert innerhalb weniger Minuten die Elektrodenlösung vollständig in die Zelle und

ersetzt das Cytosol. Auf diese Weise können die Ionenkonzentrationen der Ganglienzelle genau vorgegeben werden und intrazellulär Pharmaka appliziert werden. Weil die Netzhaut mit dem Herzschlag und der Atemfrequenz pulsiert, sind Patch-Clamp-Messungen von retinalen Ganglienzellen nur *in vitro*, entweder in der Schnittpräparation (Mittman *et al.*, 1990; Rorig und Grantyn, 1993) oder an der intakten, isolierten Netzhaut (Taylor, 1999), möglich. Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik kann in der Stromklemme (‘current clamp’) die Membranspannung sowie in der Spannungsklemme (‘voltage clamp’) der Membranstrom gemessen werden. Durch das unabhängige Messen von Membranspannung und Membranstrom in retinalen Ganglienzellen konnte erstmals die Größe der Entladungsrate in Beziehung zu dem lichtinduzierten synaptischen Membranstrom gesetzt werden (Diamond und Copenhagen, 1995). Weiterhin konnten in retinalen Ganglienzellen lichtinduzierte erregende oder hemmende synaptische Ströme (siehe auch Kapitel 1.3) unabhängig voneinander gemessen werden (Cohen, 1998; Roska und Werblin, 2001). Die Möglichkeit lichtinduzierte synaptische Ströme und Potentiale zu messen unterstreicht die herausragende Bedeutung der Patch-Clamp-Methode bei der Untersuchung der lateralen Hemmung von retinalen Ganglienzellen.

1.5.1. Klassifizierung retinaler Ganglienzellen

Retinale Ganglienzellen des Kaninchens können aufgrund ihrer Morphologie und ihres Reizantwortverhaltens in 15-20 Typen unterteilt werden (Levick, 1967; Vaney *et al.*, 1981; Amthor *et al.*, 1989a; Amthor *et al.*, 1989b; Roska und Werblin, 2001). Morphologisch können retinale Ganglienzellen anhand des Verzweigungsmusters ihrer Dendritenbäume sowie der Schicht in der IPL, in der sich die Dendriten verzweigen, unterschieden werden. Viele Typen retinaler Ganglienzellen kommen als ON- und OFF-Zelle vor (Enroth-Cugell und Robson, 1966). ON- und OFF-Ganglienzellen eines Typs können morphologisch anhand der Verzweigungsebene der Dendriten in der IPL unterschieden werden. Der äußere Teil der IPL ist hierbei die OFF-Schicht, weil dort OFF-Bipolarzellen Synapsen mit Ganglienzellen bilden. Der innere Teil der IPL ist die ON-Schicht, weil dort ON-Bipolarzellen synaptische Kontakte mit ON-Ganglienzellen bilden.

In der Regel spricht ein morphologischer Typ auf ein bestimmtes visuelles Reizmuster besonders gut an. Diese Struktur-Funktionsbeziehungen sind am besten für die Y/ α -Ganglienzellen und die X/ β -Ganglienzellen der Katze beschrieben worden (Enroth-Cugell und Robson, 1966; Cleland *et al.*, 1971; Cleland *et al.*, 1973; Fukuda und Stone, 1974; Stone und Fukuda, 1974; Fukuda und Stone, 1975; Peichl und Wässle, 1983; Fukuda *et al.*,

1984; Fukuda *et al.*, 1985; Wässle und Boycott, 1991). Beide Ganglienzelltypen besitzen ein konzentrisch organisiertes rezeptives Feld mit erregendem RFC und hemmendem RFS. Sie unterscheiden sich aber in ihrer Morphologie und in ihrem Reizantwortverhalten.

Y/ α -Ganglienzellen besitzen große, speichenartige dendritische Fortsätze, ein entsprechend großes rezeptives Feld und haben phasische Reizantworten, d.h. ein zeitlich konstanter Lichtreiz ruft nur für kurze Zeit (200-500 ms) eine Änderung der Entladungsrate hervor. Y/ α -Ganglienzellen sind deshalb besonders empfindlich für zeitlich veränderliche Reize, besitzen aber ein schlechtes örtliches Auflösungsvermögen; sie sind für die Bewegungswahrnehmung wichtig (Wässle, 1986; Peichl, 1992).

X/ β -Ganglienzellen besitzen kleine, stark verzweigte dendritische Fortsätze, ein entsprechend kleines rezeptives Feld und haben tonische Reizantworten, d.h. ein zeitlich konstanter Lichtreiz bewirkt eine zeitlich relativ konstante Veränderung der Entladungsrate. X/ β -Ganglienzellen sind deshalb besonders empfindlich für zeitlich konstante Reize und besitzen eine hohe Ortsauflösung; sie sind für die Wahrnehmung von räumlichen Details wichtig (Wässle, 1986; Peichl, 1992).

Außer Ganglienzellen des Y/ α - und X/ β -Typs mit konzentrischen rezeptiven Feldern gibt es Ganglienzellen, die auf wesentlich komplexere visuelle Muster im Gesichtsfeld reagieren. Aus der Kaninchennetzhaut sind einige dieser Ganglienzelltypen in Tabelle 1 aufgeführt (Rodieck, 1973). Jeder der in Tabelle 1 aufgeführten physiologischen Typen kann auch aufgrund einer Dendritenbaummorphologie und Verzweigungsebene der Dendriten in der IPL unterschieden werden. Dies gilt auch für die Kaninchennetzhaut (Amthor *et al.*, 1989a; Amthor *et al.*, 1989b; Pu und Amthor, 1990a; Pu und Amthor, 1990b; Roska und Werblin, 2001).

Physiologischer Typ	Reizmuster
ON-Zentrumzelle (Y/ α und X/ β)	Anschalten eines Lichtreizes
OFF-Zentrumzelle (Y/ α und X/ β)	Ausschalten eines Lichtreizes
Richtungsspezifische Ganglienzelle	Bewegung in eine Richtung
Orientierungsspezifische Ganglienzelle	Bewegung in einer Orientierung
„Local edge detector“	Kanten
„Uniformity detector“	Einheitlich ausgeleuchtete Flächen

Tabelle 1: Eine physiologische Klassifizierung einiger retinaler Ganglienzellen der Kaninchennetzhaut. Jeder physiologische Typ kann anhand seiner Morphologie unterschieden werden. Tabelle modifiziert nach (Rodieck, 1973).

Es wird angenommen, daß jeder Ganglienzelltyp überall in der Netzhaut vorkommt und mit seinen Dendritenbäumen die Netzhaut vollständig überdeckt (Peichl, 1978; Wässle und Riemann, 1978; Peichl und Wässle, 1979; Wässle *et al.*, 1981). Somit kann die Netzhaut unterschiedliche Komponenten einer visuellen Szene an jedem Retinaort parallel verarbeiten (Wässle *et al.*, 1983; Wässle, 1986; Wässle und Boycott, 1991; Peichl, 1992; Boycott und Wässle, 1999; Roska und Werblin, 2001; Werblin *et al.*, 2001).

Bisher konnten retinale Ganglienzellen von Säugetieren nicht einheitlich klassifiziert werden. Der Grund dafür sind einerseits artspezifische Unterschiede bei den retinalen Ganglienzellen, andererseits die Uneinigkeit der Forscher über die physiologischen und morphologischen Klassifizierungskriterien.

1.5.2. Mathematische Beschreibung des rezeptiven Feldes

Eine einfache mathematische Beschreibung des räumlichen Empfindlichkeitsprofils retinaler Ganglienzellen, ist das DOG-Modell („difference of gaussians model“) (Rodieck, 1965; Rodieck und Stone, 1965a). Das DOG-Modell geht davon aus, daß die räumlichen Profile von Erregung und Hemmung radial symmetrisch sind und jeweils durch eine Gaußfunktion beschrieben werden kann, welche um a von der Mitte des rezeptiven Feldes verschoben sind:

$$E(r) = E_0 \cdot \exp\left(-\frac{(r - a_e)^2}{r_e^2}\right) \quad \text{Formel 1: Räumliches Profil der Erregung}$$

$$I(r) = I_0 \cdot \exp\left(-\frac{(r - a_i)^2}{r_i^2}\right) \quad \text{Formel 2: Räumliches Profil der Hemmung}$$

Die Gaußfunktion für die Erregung besitzt ein große Amplitude E_0 und eine kleine Ortskonstante r_e , während die Gaußfunktion für die Hemmung ein kleine Amplitude I_0 und eine große Ortskonstante r_s besitzt. Es kann in guter Näherung angenommen werden, daß beide Gaußfunktionen nicht gegeneinander verschoben sind, also in der Mitte des rezeptiven Feldes Erregung und Hemmung am stärksten sind ($a_{e,i} = 0$). Für den Fall, daß erregende und hemmende Anteile der Reizantwort voneinander unabhängige lineare Systeme sind, kann das Empfindlichkeitsprofil durch Subtraktion der beiden Gaußfunktionen errechnet werden.

$$H(r) = E_0 \cdot \exp\left(-\frac{r^2}{r_e^2}\right) - I_0 \cdot \exp\left(-\frac{r^2}{r_i^2}\right)$$

Formel 3: Beschreibung des räumlichen Empfindlichkeitsprofils $H(r)$ einer retinalen Ganglienzelle durch das ‚difference of gaussians model‘ (DOG-Modell) für den Fall ($a_{e,i} = 0$).

Aus Experimenten ergeben sich für das Verhältnis r_i/r_e Werte von ungefähr drei und für das Verhältnis der Amplituden E_0/I_0 Werte von ungefähr zehn (Rodieck, 1965; Wässle, 1971; Peichl und Wässle, 1979).

Das DOG-Modell beschreibt sehr gut das experimentell gemessene Empfindlichkeitsprofil und besitzt weiterhin den Vorteil, daß es einfach integriert und fouriertransformiert werden kann (Rodieck, 1965; Rodieck und Stone, 1965b). Die Subtraktion der hemmenden Gaußfunktion von der erregenden Gaußfunktion verkleinert das erregende RFC gegenüber dem räumlichen Profil der Erregung. In der Peripherie des rezeptiven Feldes wird durch den kleinen Radius der erregenden Gaußfunktion die Empfindlichkeit negativ, was einer

Verringerung der Entladungsrate entspricht. Im DOG-Modell wird dem positiven Teil der Empfindlichkeitskurve $H(r)$ das RFC und dem negativen Teil das RFS zugeordnet.

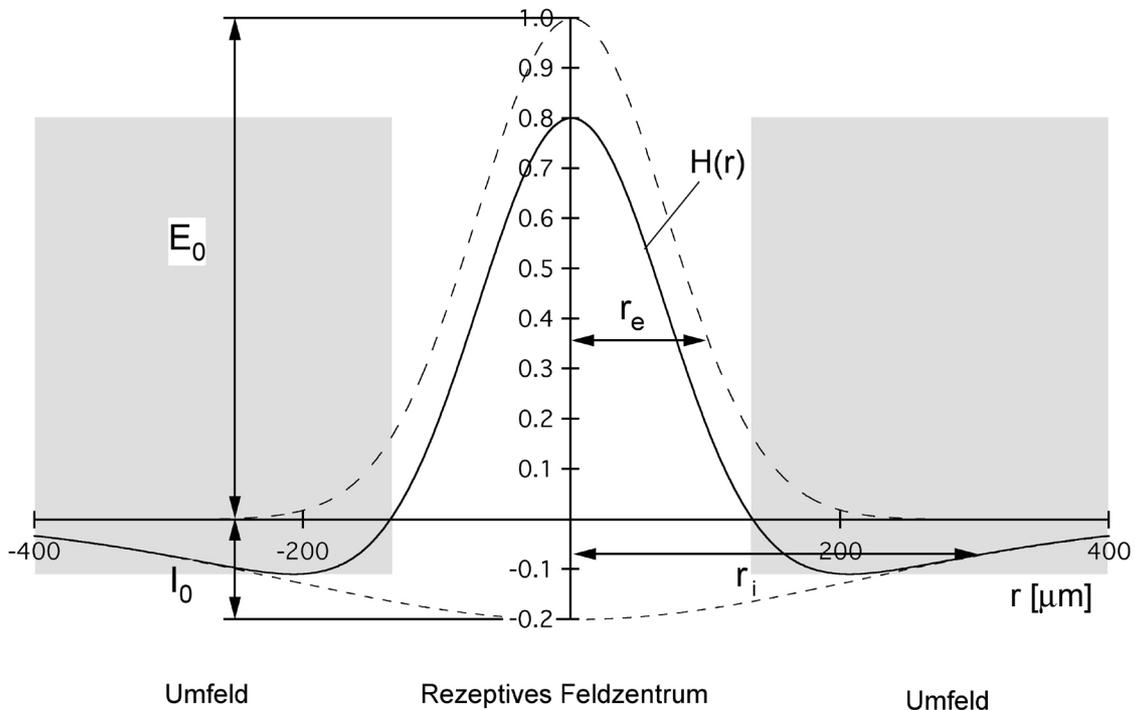


Abbildung 4: Das räumliche Empfindlichkeitsprofil einer retinalen Ganglienzelle $H(r)$ wird im DOG-Modell durch die Subtraktion einer negativen Gaußfunktion mit kleiner Amplitude I_0 und großem Radius r_i von einer erregenden Gaußfunktion mit großer Amplitude E_0 und kleinem Radius r_e dargestellt. Die positiven Bereiche (weiß) von $H(r)$ werden als RFC und die negativen Bereiche (grau) als RFS interpretiert. Durch das hemmende Umfeld wird die Halbwertsbreite des RFC kleiner gegenüber der Gaußfunktion für die Erregung. Für diese Abbildung wurden die Funktionen $E(r)$, $I(r)$ und $H(r)$ auf E_0 normiert (mit $a_{e,i} = 0$).

Das Empfindlichkeitsprofil retinaler Ganglienzellen kann durch Reizung mit kleinen Lichtpunkten, durch Flächen-Reaktionschwellen-Messung („area threshold method“) oder Flächen-Variations-Messung („area response method“) bestimmt werden (Barlow *et al.*, 1957; Rodieck, 1973; Peichl, 1978; Peichl und Wässle, 1979). Bei den beiden letztgenannten Methoden werden die retinalen Ganglienzellen durch kreisförmige Lichtreize mit verschiedenen Durchmessern stimuliert, die im RFC zentriert sind. Bei Kenntnis des Radius r der kreisförmigen Lichtreize, berechnet sich die Reizantwort der Ganglienzelle $A(r)$ nach dem DOG-Modell aus

$$A(r) = \int_0^r dr \cdot H(r).$$

Retinale Ganglienzellen sind die ‚Ausgangsebene‘ der Netzhaut. Somit kann bei Kenntnis von $H(r)$ die Lichtverteilung auf der Photorezeptorschicht (‚Eingangsbild‘) $b(r)$ in ein das ‚Ausgangsbild‘ $g(r)$ der Netzhaut umgewandelt werden. Mathematisch kann die ‚Verkopplung‘ der Eingangsebene und ‚Ausgangsebene‘ durch ein Faltungsintegral beschrieben werden (von Seelen, 1969).

$$g(r') = \int dr \cdot b(r) \cdot H(r' - r)$$

Wird das räumliche Empfindlichkeitsprofil der Ganglienzelle in den Fourierraum, übertragen, entspricht dies einem ‚räumlichen‘ Bandpassfilter (von Seelen, 1969). Der Frequenzbereich des Filters hängt von der Größe des RFC und des RFS ab.

1.5.3. Zelluläre und synaptische Mechanismen der Umfeldhemmung

Ganglienzellen in der Säugetiernetzhaut werden hauptsächlich durch glutamaterge Bipolarzellen erregt (Bloomfield und Dowling, 1985; Massey und Redburn, 1987; Massey und Miller, 1988) und durch zwei Gruppen von Amakrinzellen, GABAerge und glyzinerge, direkt gehemmt (Freed und Sterling, 1988; Vaney, 1990; Freed, 1992; MacNeil und Masland, 1998).

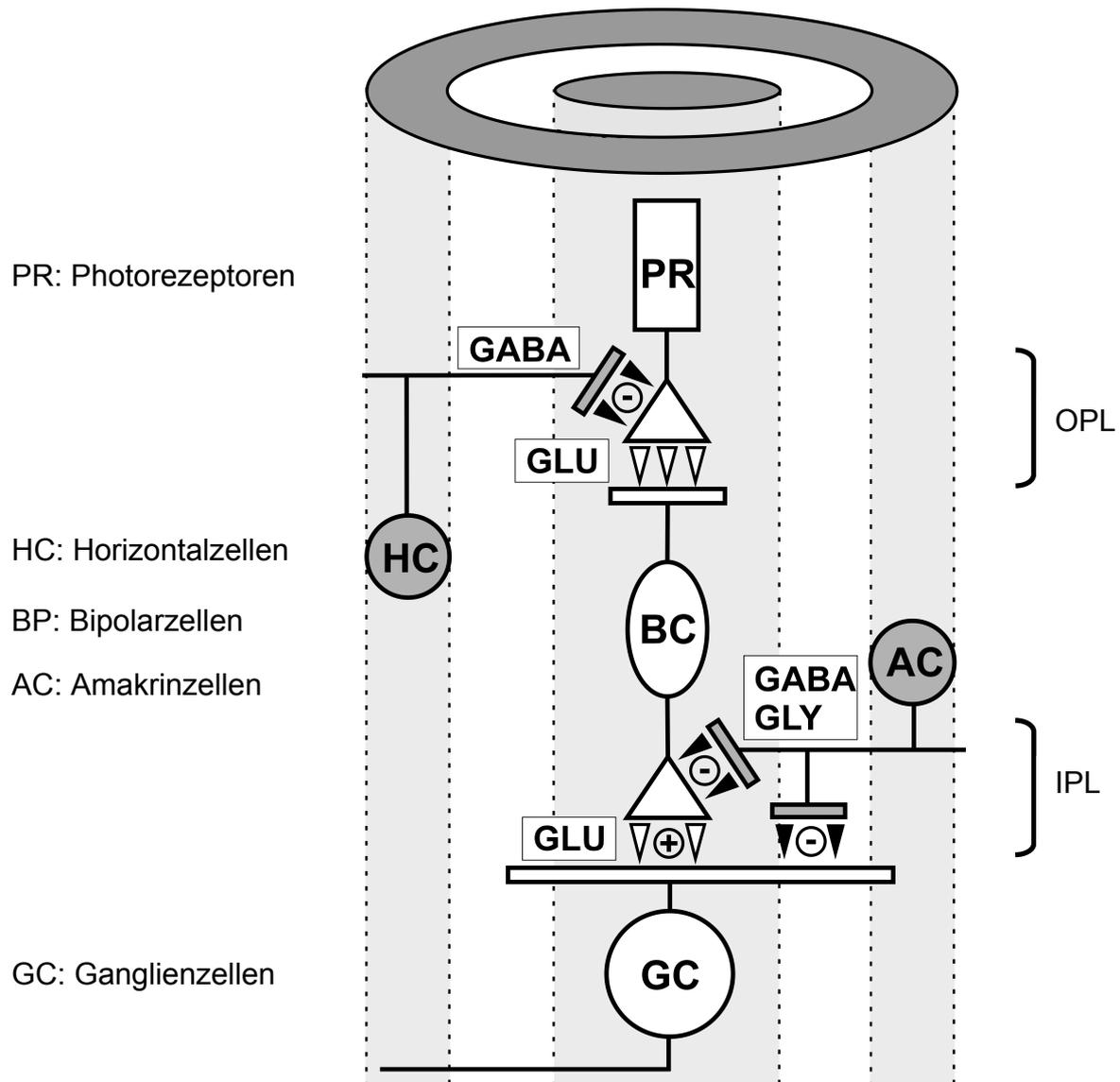


Abbildung 5: Schema der Zellen und der Schaltkreise die bei der Umfeldhemmung eine Rolle spielen. Die Umfeldhemmung kann in den beiden synaptischen Schichten erzeugt werden: In der OPL durch GABAerge Horizontalzellen und in der IPL durch GABAerge und/oder glyzinerge Amakrinzellen. Amakrinzellen können die Ganglienzellen entweder direkt hemmen (Vorwärtshemmung) oder indirekt durch Hemmung der Bipolarzellen (Rückwärtshemmung). Ganglienzellen werden hauptsächlich durch glutamaterge Bipolarzellen synaptisch erregt. (GLU=Glutamat, GLY=Glyzin, GABA= γ Aminobuttersäure)

In einer Vielzahl physiologischer Studien konnte gezeigt werden, daß Umfeldhemmung in der OPL (Mangel und Miller, 1987; Mangel, 1991; Werblin *et al.*, 2001) sowie in der IPL erzeugt wird (Freed und Nelson, 1994; Taylor, 1999). In der OPL an der Photorezeptor-Bipolarzellsynapse gibt es hemmende Synapsen von GABAergen Horizontalzellen auf Photorezeptoren (Piccolino, 1995; Sterling *et al.*, 1995). In der IPL bilden Amakrinzellen inhibitorische synaptische Kontakte mit den Axonenden der Bipolarzellen und mit den Dendriten der Ganglienzellen. Am Axonende von Bipolarzellen werden verschiedene GABA_A, GABA_C und Glyzinrezeptoren exprimiert (Koulen *et al.*, 1996; Lukasiewicz und Wong, 1997; Euler und Wässle, 1998; Euler und Masland, 2000). Ganglienzellendriten exprimieren GABA_A und Glyzinrezeptoren, aber keine GABA_C-Rezeptoren (Feigenspan und Bormann, 1998; Wässle *et al.*, 1998). Da es viele verschiedene Arten von Amakrinzellen gibt (MacNeil und Masland, 1998) und eine Vielzahl synaptischer Kontakte (Vaney, 1990) in der IPL, ist eine ‚Vorwärtshemmung‘ (direkte Hemmung) auf Ganglienzellen ebenso plausibel wie eine ‚Rückwärtshemmung‘ (indirekte Hemmung) auf Bipolarzellen.

Mit Hilfe einer intrazelluläre Elektrode konnte durch das Anlegen einer Spannung Strom in Horizontalzellen der Kaninchennetzhaut geleitet werden. Dies führte zu einer Verringerung der Umfeldhemmung von Ganglienzellen deren Entladungsrate gleichzeitig mit einer extrazellulären Elektrode gemessen wurde. Dadurch konnte gezeigt werden, daß Horizontalzellen eine Rolle bei der Erzeugung der Umfeldhemmung spielen (Mangel und Miller, 1987; Mangel, 1991).

Einige Amakrinzelltypen der Kaninchennetzhaut können Aktionspotentiale erzeugen, welche sich in den Fortsätzen über mehrere Millimeter ausbreiten (aktionspotentialerzeugende Amakrinzellen) (Bloomfield, 1992; Taylor, 1996). Dadurch kann laterale Hemmung über große Distanzen erfolgen (Bloomfield, 1992; Bloomfield, 1996). Dies konnte auch in Untersuchungen am Tigersalamender bestätigt werden (Cook und Werblin, 1994; Cook *et al.*, 1998; Cook und McReynolds, 1998).

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik konnte in einem Schnittpräparat der Rattennetzhaut gezeigt werden, daß Amakrinzellen über eine ‚Rückwärtshemmung‘ Bipolarzellen hemmen (Protti und Llano, 1998; Hartveit, 1999; Euler und Masland, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß aktionspotentialerzeugende Amakrinzellen Ganglienzellen lateral hemmen (Cook *et al.*, 1998; Cook und McReynolds, 1998; Demb *et al.*, 1999; Taylor, 1999).

Lichtinduzierte Erregung und Hemmung retinaler Ganglienzellen konnten sowohl mit intrazellulären Mikroelektroden (Freed und Nelson, 1994) und mit Hilfe der

Patch-Clamp-Technik (Rorig und Grantyn, 1993; Protti *et al.*, 1997; Cohen, 1998; Roska *et al.*, 2000; Roska und Werblin, 2001; Flores-Herr *et al.*, 2001) gemessen werden. Doch bisher ist das räumliche Empfindlichkeitsprofil von Erregung und Hemmung in retinalen Ganglienzellen nicht vermessen worden. Dies kann aus technischen Gründen am besten an einer isolierten, intakten Netzhaut mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik gemessen werden (Taylor und Wässle, 1995; Peters und Masland, 1996). Die Patch-Clamp-Technik ermöglicht es, lichtinduzierte erregende und hemmende synaptische Ströme unabhängig voneinander zu messen. Um erregende synaptische Ströme zu messen, kann das Membranpotential auf das Umkehrpotential von GABA- und glyzininduzierten Chloridionenströmen ($E_{Cl} \approx -55 \text{ mV}$) eingestellt werden (Miller und Dacheux, 1983). Um hemmende synaptische Ströme zu messen, wird dabei das Membranpotential auf das Umkehrpotential Glutamatinduzierter Kationenströme ($E_{Na/K} \approx 0 \text{ mV}$) eingestellt. Ein weiterer Vorteil der Patch-Clamp-Technik ist die Möglichkeit, die synaptischen Übertragung der jeweiligen Zelle zu modulieren. Durch die große Öffnung der Patch-Elektrode können die intrazellulären Ionenkonzentrationen eingestellt werden und intrazellulär wirkenden Pharmaka können eingebracht werden.

Obwohl der Aufbau des rezeptiven Feldes retinaler Ganglienzellen seit beinahe fünfzig Jahren erforscht wird, (Kuffler, 1953) sind die zugrunde liegenden zellulären und synaptischen Mechanismen wenig bekannt. Für Wirbeltiere gilt es als erwiesen, daß das hemmende Umfeld retinaler Ganglienzellen durch Horizontal- und Amakrinzellen erzeugt wird. Dennoch sind die zugrundeliegenden synaptischen Mechanismen bisher kaum bekannt. Wie stark ist der Einfluß von Amakrinzellen bzw. Horizontalzellen bei der Übertragung lateraler Hemmung? Werden Ganglienzellen direkt synaptisch oder indirekt gehemmt? Welche Neurotransmitter spielen eine Rolle? Welche postsynaptischen Neurotransmitterrezeptoren sind beteiligt?

1.6. Experimentelles Vorgehen

Um die synaptischen Mechanismen des rezeptiven Feldzentrum (RFS) zu charakterisieren, wird die direkte und die indirekte laterale Hemmung von Ganglienzellen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik *in vitro* untersucht.

Die lichtinduzierten, synaptischen Ströme von Ganglienzellen werden im Ganzzellmodus der Patch-Clamp-Technik gemessen. Das räumliche Empfindlichkeitsprofil der Zellen wird zuerst mit kleinen Lichtpunkten („small spot mapping“) bestimmt und anschließend durch Flächen-Variations-Messungen und ringförmige Lichtreize charakterisiert. Durch das Einstellen des Membranpotentials auf das Umkehrpotential von Chloridionen (E_{Cl}) wird das räumliche Profil des erregenden synaptischen Eingangs gemessen. Das räumliche Profil des

hemmenden synaptischen Eingangs wird beim am Umkehrpotential für unspezifische Kationenströme ($E_{Na/K}$) gemessen. Aus den gemessenen Strom-Spannungskurven wird das Umkehrpotential der lichtinduzierten synaptischen Ströme bestimmt. Dieses Umkehrpotential ist ein Maß für das Verhältnis von synaptischer Erregung und Hemmung der Zelle. Das Verhältnis von synaptischer Erregung und Hemmung kann Aufschluß darüber geben, ob die Entladungsrate der Ganglienzelle erhöht oder verringert wird. Weiterhin wird überprüft, ob die Stärke der direkten und der indirekten lateralen Hemmung von der absoluten Lichtintensität abhängt. Im Stromklemme-Modus der Patch-Clamp-Technik können lichtinduzierte Aktionspotentiale gemessen werden. Um die physiologische Relevanz der direkten lateralen Hemmung abzuschätzen, wird das Umfeld einer Ganglienzelle stimuliert und die Reizantwort einmal mit niedriger und einmal mit hoher Chloridionenkonzentration in der Elektrode gemessen. Wenn Ganglienzellen direkt lateral gehemmt werden, wird bei niedriger Chloridionenkonzentration die Umfeldhemmung deutlich meßbar sein. Unter hoher intrazellulärer Chloridionenkonzentration wird die Umfeldhemmung der Zelle abnehmen. Durch Zugabe von spezifischen Hemmstoffen zur Extrazellulärlösung, kann während des Experiments die synaptische Übertragung der Netzhaut moduliert werden. Durch die Badapplikation von Pharmaka, welche GABAerge oder glyzinerge Signalübertragung hemmen, können die Einflüsse von GABA oder Glyzinrezeptoren auf die Umfeldhemmung gemessen werden. Die Wirkung dieser Pharmaka auf die indirekte laterale Hemmung wird bei E_{Cl} , die Wirkung auf direkte laterale Hemmung bei $E_{Na/K}$ gemessen. Durch das Blocken von spannungsabhängigen Na^+ -Ionenkanälen wird der Einfluß aktionspotentialerzeugender Amakrinzellen auf direkte und indirekte laterale Hemmung untersucht.

2. Methoden

2.1. Experimenteller Aufbau

Die Lichtantworten von retinalen Ganglienzellen wurden mit dem folgenden Versuchsaufbau gemessen. Auf einem schwingungsgedämpften Tisch war ein aufrechtes Mikroskop (ACM, Zeiss, Oberkochen) montiert. Zwei Haltesäulen (Luigs und Neuman) waren auf beiden Seiten des Mikroskops im Abstand von 20 cm befestigt.

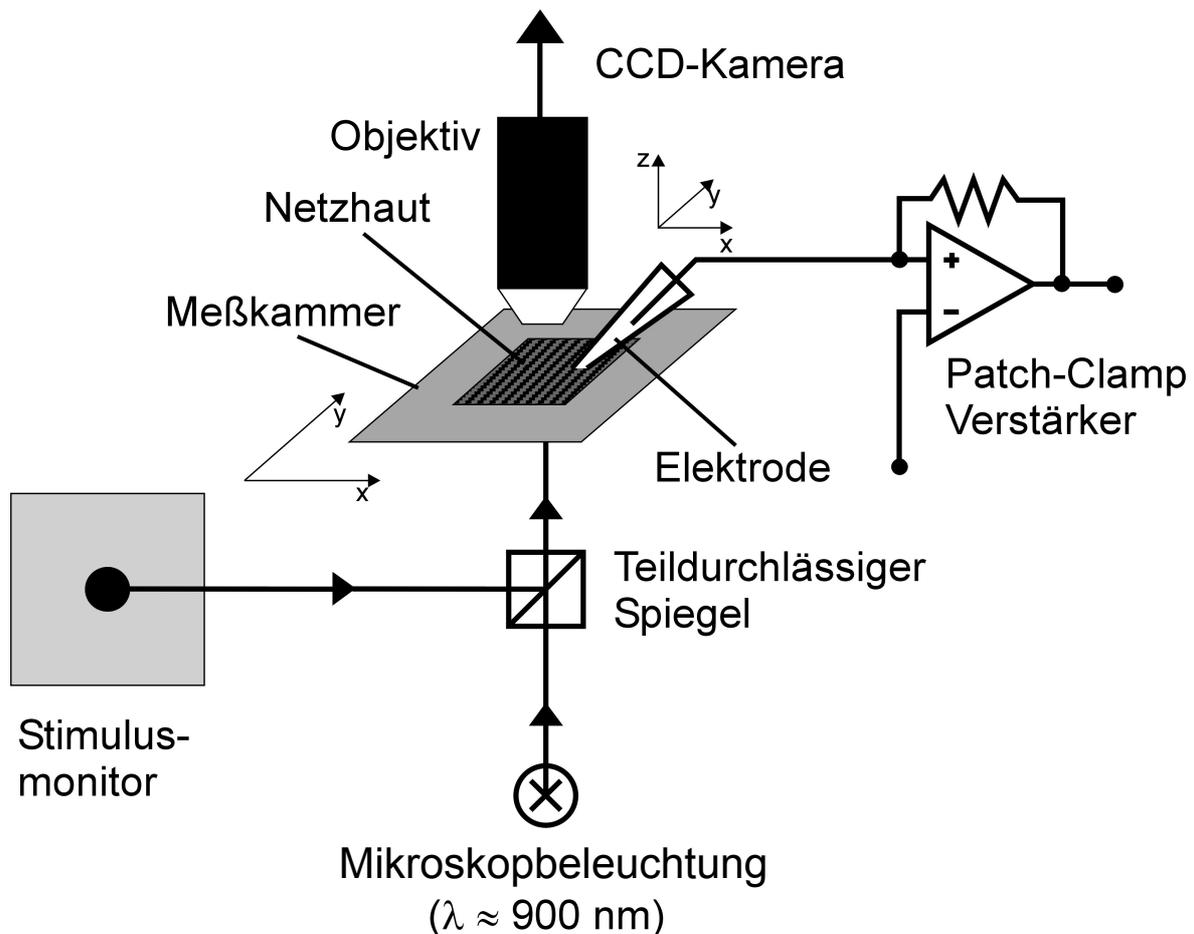


Abbildung 6: Schematische Zeichnung des experimentellen Aufbaus. Die Netzhaut befand sich während der Messung in einer Meßkammer auf dem Mikroskoptisch. Dieser konnte in der x-y-Ebene bewegt werden. Die Zellen wurden mit Hilfe der Infrarot-Differentialinterferenzkontrastmikroskopie sichtbar gemacht. Die Verwendung von Infrarotlicht verhindert das Ausbleichen der Photorezeptoren ($\lambda \approx 900 \text{ nm}$). Das Mikroskop war mit einer CCD-Kamera verbunden, welche das Mikroskopbild auf einem Bildschirm abbildete. Die Patchelektrode konnte mit Hilfe eines Mikromanipulators in x,y, und z-Richtung bewegt werden und war direkt mit dem Patch-Clamp-Vorverstärker verbunden. Die Lichtreize wurden auf einem Computerbildschirm erzeugt, durch einen teildurchlässigen Spiegel in den Mikroskopstrahlengang eingespiegelt und durch den Mikroskopkondensator auf den Boden der Meßkammer bzw. auf die Netzhaut abgebildet.

Die Meßkammer war auf dem Mikroskoptisch befestigt und konnte in der x-y-Ebene bewegt werden. Während der Messungen wurde die Netzhaut mit den Photorezeptoren nach unten in die Meßkammer gelegt, welche mit begaster Extrazellulärlösung gefüllt war. Das Annähern der Patch-Elektrode an die Ganglienzellen wurde im Mikroskop beobachtet, welches mit einer Infrarot-Differentialinterferenzkontrastoptik ausgestattet (Nomarski-Optik) war. Dabei wurde Licht durch einen Polarisationsstrahlteilerwürfel linear polarisiert und das polarisierte Licht in einem doppelbrechenden Prisma im Kondensor in zwei Teilstrahlen zerlegt. Die beiden Teilstrahlen waren um $\Delta x < \lambda$ räumlich gegeneinander versetzt, so daß sie das Präparat an unterschiedlichen Orten durchliefen. Die Phasen der Teilstrahlen wurden gegeneinander verschoben, wenn das Präparat im Abstand von Δx unterschiedliche optische Eigenschaften aufwies. Schließlich brachte ein zweites Prisma die beiden Teilstrahlen zur Interferenz, wodurch Gangunterschiede als Intensitätsunterschiede sichtbar gemacht werden konnten. Somit konnten für das Auge kleinste Höhenunterschiede von Oberflächen des Präparats hervorgehoben werden.

Die inaktiven Sehpigmente in den Photorezeptoren, welche durch die Absorption von Licht in eine aktive Form umgewandelt werden, werden in einer isolierten Netzhaut nicht in ihre Ausgangsform zurückverwandelt. Um die Aktivierung der Sehpigmente durch starke Lichteinstrahlung zu vermeiden (Ausbleichen der Photorezeptoren), hatte die Mikroskopbeleuchtung seine maximale Intensität im nahen Infrarotlicht ($\lambda \approx 900$ nm).

Das Objektiv, ein Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss, 40fach/0,75 W), wurde während des Versuchs in die Extrazellulärlösung eingetaucht. Um das Objektiv elektrisch gegen die Extrazellulärlösung zu isolieren und um die Korrosion der Metallteile zu vermeiden, war der vordere Teil mit einem Silikonkleber abgedichtet. Die Zellen der Netzhaut wurden über eine CCD Kamera (CF6; Kappa) auf einem Schwarzweißvideobildschirm (Panasonic, Modell WV-5410/G) abgebildet. Die CCD-Kamera, deren spektrale Empfindlichkeit im Infrarotbereich lag ($\lambda \approx 900$ nm), war in der Bildebene des Mikroskops angebracht.

Die Lichtreize wurden auf einem Computerbildschirm erzeugt und über den Strahlteiler in den Strahlengang des Mikroskops eingespiegelt. Über die Mikroskopkondenser wurde der Bildschirm auf den Boden der Meßkammer abgebildet.

Die Halterung für die Ableitelektrode war an einem Patch-Clamp-Vorverstärker (HEKA Electronics, Heidelberg) montiert. Dieser konnte mittels eines Mikromanipulators (Luigs und Neuman) in x, y und z-Richtung bewegt werden. Der Mikromanipulator wurde auf einer Säule auf dem schwingungsgedämpften Tisch montiert. Der Vorverstärker war mit einem EPC-9-Verstärker (HEKA Electronics, Heidelberg) verbunden, welcher die gemessenen

Signale digitalisierte (Abtastfrequenz 5 kHz) (FJ, 1995). Ein Computer (Macintosh Power PC 8000/100) mit Hilfe der entsprechenden Software (HEKA) steuerte den EPC-9-Verstärker (Sigworth *et al.*, 1995). Die Registrierungen wurden während des Experiments zur Kontrolle auf dem Computerbildschirm dargestellt und auf Festplatte gespeichert.

Um das Rauschen der Signale zu verringern, war der Meßstand innerhalb eines Faradaykäfigs angebracht. Alle Bildschirme und der Patch-Clamp-Verstärker befanden sich außerhalb des Faradaykäfigs.

2.2. Der Lichtreiz

2.2.1. Die Abbildungsgüte der Apparatur

Die Lichtreize wurden auf einem Bildschirm (13 Zoll RGB-Farbbildschirm, Macintosh) mit Hilfe eines Macintosh Quadra 650 erzeugt (Taylor und Wässle, 1995). Die Lichtreize waren schwarz oder weiß (unbunt) und konnten mit Hilfe der Software in einem Leuchtdichtenbereich von drei Zehnerpotenzen variiert werden. Die Intensität der Lichtreize auf dem Bildschirm wurden mit einem Leuchtdichtemeßgerät (Minolta Luminance Meter, Minolta) gemessen. Die maximale Leuchtdichte, die auf dem Bildschirm erzeugt werden konnte, betrug $\approx 70 \text{ cd/m}^2$. Durch Verluste im Strahlengang entsprach dieser Wert $0,7 \text{ cd/m}^2$ auf der Netzhaut. Durch Filter konnte die Leuchtdichte zusätzlich um bis zu vier Zehnerpotenzen abgesenkt werden ($0,7 \cdot 10^{-7} \text{ cd/m}^2$ bis $0,7 \text{ cd/m}^2$).

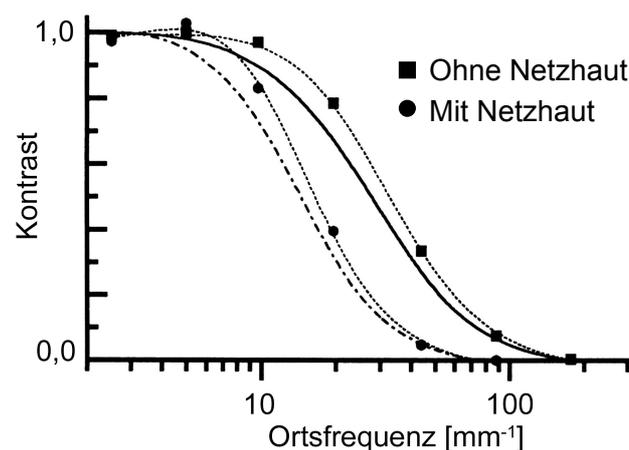


Abbildung 7: Messung der Übertragungsfunktion des Lichtreizungssystems. Auf dem Bildschirm wurden Rechteckgitter mit verschiedenen Ortsfrequenzen und maximalem Kontrast erzeugt. Der Kontrast M (siehe Formel 4) im Bild wurde mit Hilfe eines Schwarzweißfilms, welcher mit der Mikroskopkamera belichtet wurde, gemessen. Der Kontrast wurde normiert und als Funktion der Ortsfrequenz aufgetragen. Die geglätteten durchgezogenen (—) bzw. die gestrichelten (----) Linien sind die korrigierten Übertragungsfunktionen ohne Netzhaut (\leftarrow) und mit Netzhaut in der Messkammer (\Rightarrow). Der Kontrast nimmt bei wachsender Frequenz des Gitters mit Netzhaut schneller ab als ohne Netzhaut in der Messkammer. Entnommen aus (Taylor und Wässle, 1995).

Um die Güte des Lichtreizsystems abzuschätzen wurde die Übertragungsfunktion des gemessen. Die gemessene Übertragungsfunktion mit Netzhaut in der Messkammer war die untere Abschätzung der Güte, weil das Licht, vor der Absorption durch die Photorezeptoren, von deren äußeren Segmenten gestreut wurde. Beim Durchdringen der Netzhaut wurde das

Licht zusätzlich an den übrigen Zellen gestreut, weshalb die Messung der Übertragungsfunktion ohne Netzhaut die obere Abschätzung der Güte des Lichtreizsystems war (Abbildung 7).

$$M = \frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{\max} + L_{\min}}$$

Formel 4: Berechnung des Kontrasts M des Stimulussystems mit Hilfe des Bildes eines schwarzweißen Rechteckgitters. Dabei wurde die Intensität L_{\max} als das Maximum der weißen Rechtecke genommen und L_{\min} als das Minimum der schwarzen Rechtecke.

Für die Messung der Übertragungsfunktionen (Abbildung 7) wurde auf dem Bildschirm ein Rechteckgitter mit maximalem Kontrast bei verschiedenen Ortsfrequenzen erzeugt. Der Kontrast (M) wurde mit Hilfe eines Schwarzweißfilms, welcher mit der Mikroskopkamera belichtet wurde, ermittelt. Dabei wurde die maximale Helligkeit eines hellen Balkens (L_{\max}) und die maximale Helligkeit eines dunklen Balkens (L_{\min}) in Formel 4 eingesetzt (Coltman, 1954).

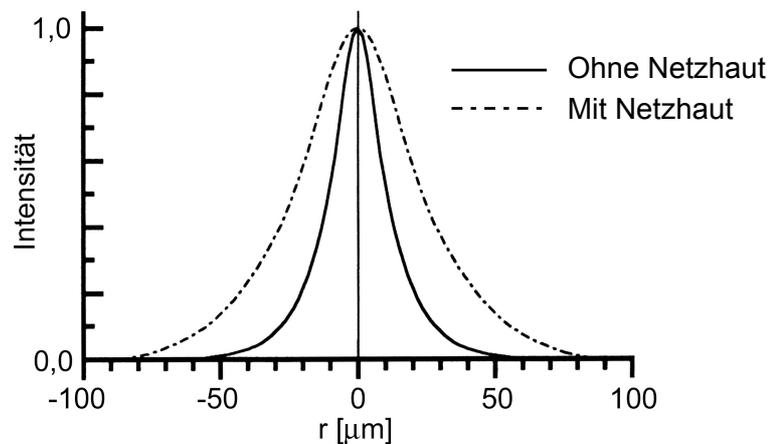


Abbildung 8: Die errechnete Intensitätsverteilung des Bildes eines idealen Punktes. Mit den Modulationsübertragungsfunktionen aus Abbildung 7 wurden die Verteilungen mit (—) und ohne (----) Netzhaut berechnet. Die Intensität wurde jeweils auf das Maximum normiert und als Funktion des Abstandes vom Zentrum der Lichtquelle aufgetragen. Die Halbwertsbreiten der Verteilungen betragen $47 \mu\text{m}$ mit Netzhaut und $21 \mu\text{m}$ ohne Netzhaut in der Messkammer. Entnommen aus (Taylor und Wässle, 1995).

Aus den gemessenen Übertragungsfunktionen wurde durch inverse Fouriertransformation die Intensitätsverteilung des Bildes eines idealen Punktes berechnet (Abbildung 8). Die Halbwertsbreiten der Verteilungen betragen hierbei $47 \mu\text{m}$ mit Netzhaut und $21 \mu\text{m}$ ohne Netzhaut in der Meßkammer. Aus der Übertragungsfunktion ohne Netzhaut wurde auch die Intensitätsverteilung des Bildes von kreisförmigen Lichtreizen verschiedener Durchmesser bei

gleicher Intensität errechnet (Abbildung 9). Bei kleinen Lichtreizdurchmessern war das Intensitätsmaximum verringert. Dies führte zu Verfälschungen der Messungen bei Lichtreizdurchmessern kleiner als 60 μm .

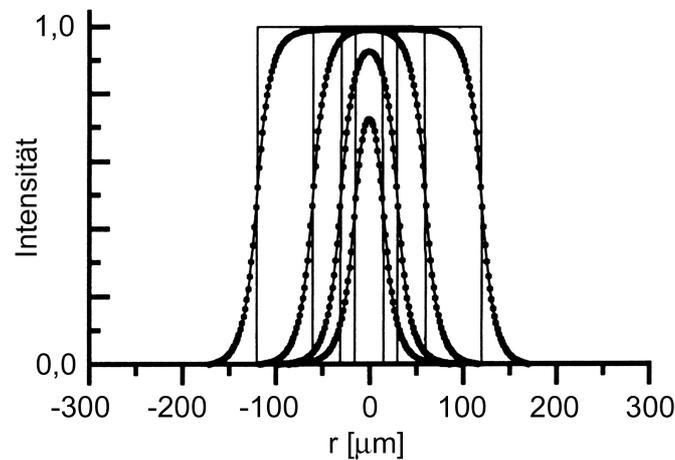


Abbildung 9: Intensitätsprofile der Bilder von kreisförmigen Lichtreizen gleicher Intensität gemessen ohne Netzhaut in der Meßkammer. Die Durchmesser der hier gezeigten Lichtpunkte betragen 30, 60, 120 und 240 μm . Die Intensität wurde auf den Maximalwert normiert und als Funktion des Abstandes vom Mittelpunkt des Bildes aufgetragen. Bei kleineren Durchmessern wurde die maximale Intensität des Bildes der Lichtpunkte durch die Streuung des Stimulussystems verringert. Entnommen aus (Taylor und Wässle, 1995).

2.2.2. Visuelle Reizung retinaler Ganglienzellen

Das rezeptive Feld retinaler Ganglienzellen wurde auf zwei Arten vermessen: über Flächen-Variations-Messungen („area response method“) und Reizung mit kleinen Lichtpunkten („small-spot-mapping“) (Rodieck, 1965; Rodieck und Stone, 1965a; Peichl und Wässle, 1979). Bei jeder Zelle wurde zu Beginn der Messung durch Reizung mit kleinen Lichtpunkten der Ort der maximalen Empfindlichkeit bestimmt, als Nullpunkt des Koordinatensystems festgelegt und alle folgenden Lichtreize auf den Ursprung des Koordinatensystems zentriert. Bei den folgenden Flächen-Variations-Messungen wurden die kreisförmigen Lichtreize sukzessive vergrößert (30, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 300, 400, 600, 800 und 1200 μm). Bei diesem Reizprotokoll nahm zunächst der lichtinduzierte Strom mit dem Durchmesser des Reizes zu, bis er bei größeren Durchmessern wieder kleiner wurde. Der Lichtreiz, der die maximale Reizantwort auslöste wurde als optimaler Stimulus festgesetzt. Üblicherweise betragen die Durchmesser der optimalen Lichtreize zwischen 100-400 μm und korrelierten sehr gut mit den Durchmesser der Dendritenbäume der Ganglienzellen (Brown und Major, 1966; Creutzfeldt *et al.*, 1970; Peichl und Wässle, 1983). Um das RFS optimal zu aktivieren wurde die Zelle mit ringförmigen Lichtreizen stimuliert. Der Innendurchmesser

entsprach üblicherweise dem Durchmesser des optimalen Stimulus. Der Außendurchmesser des ringförmigen Stimulus betrug 800-1200 μm , abhängig vom Durchmesser des Lichtstimulus bei dem die Reizantwort maximal gehemmt wurde. Weiterhin wurde bei verschiedenen Durchmessern des Lichtstimulus die Intensitätsabhängigkeit der Reizantwort untersucht. Hierbei wurden relative Intensitäten von 1, 5, 10, 50, 100, 500 und 1000 benutzt. Die Intensität der Lichtreize auf der Netzhaut betrug zwischen $0,7 \cdot 10^{-4} \text{ cd/m}^2$ und $0,7 \cdot 10^{-2} \text{ cd/m}^2$. Die Leuchtdichte der Lichtreize in der vorliegenden Arbeit lag somit in einem für die Netzhaut mittleren Leuchtdichtebereich (mesopischen Bereich) (Protti *et al.*, 2000a). In der Regel wurden kreisförmige Lichtreize mit einem Durchmesser $>100 \mu\text{m}$ gewählt, um die maximale Intensität auf der Netzhaut nicht durch Streuung im optischen System zu verringern (Abbildung 9). Der Kontrast der Lichtreize betrug zwischen 98 % und 100 % (Formel 4). Da die Reizantworten retinaler Ganglienzellen statistischen Schwankungen unterlagen, wurde bei schlechtem Signal-Rauschverhältnis über bis zu vier Messungen gemittelt.

2.3. Meßkammer

Die Meßkammer (6 cm x 3 cm x 0,5 cm) bestand aus grauem Kunststoff und einer Bodenplatte aus Glas (2 mm) unter dem Kunststoffteil befestigt wurde. In das Kunststoffteil war eine Aussparung gefräst, in welche die Netzhaut während der Messung gelegt wurde. Um die Netzhaut auf dem Glasboden zu fixieren, wurde ein hufeisenförmig gebogener Platindraht lose mit Fäden aus Zahnseide bespannt und vorsichtig auf die Netzhaut gelegt.

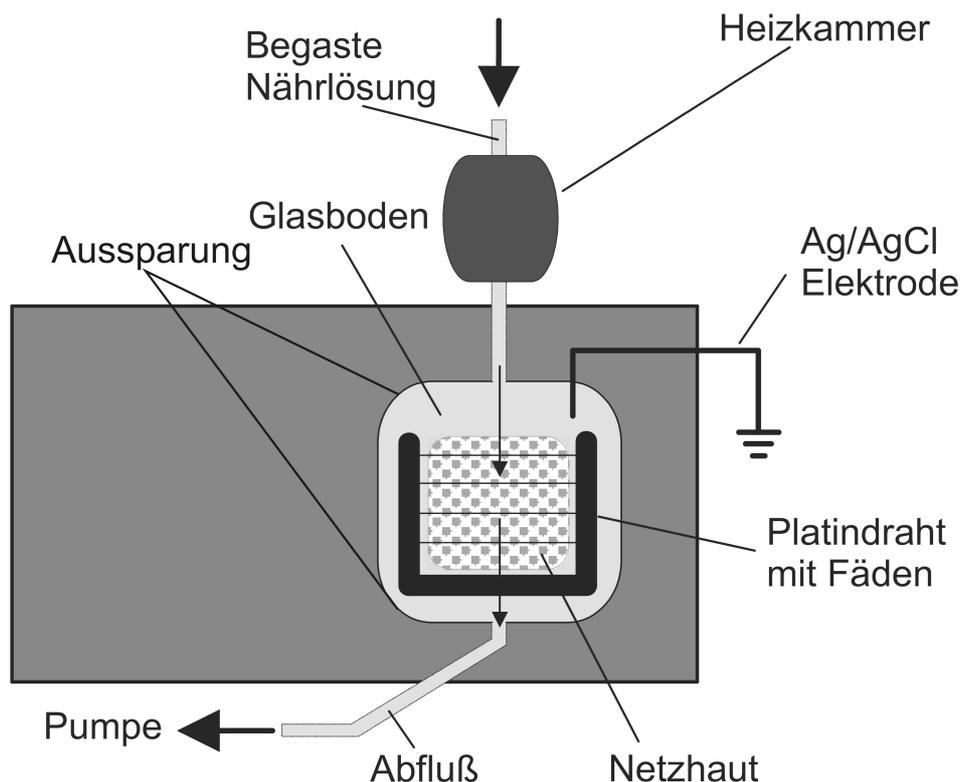


Abbildung 10: Die Meßkammer bestand aus einem Kunststoffteil (grau) mit einer Aussparung (hellgrauer Bereich) und einer Bodenplatte aus Glas. Die Netzhaut wurde in die Aussparung auf die Glasplatte gelegt und durch einen hufeisenförmigen, mit Fäden bespannten Platindraht am Kammerboden gehalten. Die begaste Extrazellulärlösung wurde in der Heizkammer auf 35°C geheizt, bevor sie in die Aussparung floß. In der Aussparung war eine Ag/AgCl-Erdungselektrode befestigt, die mit dem Patch-Clamp-Vorverstärker verbunden war. Überschüssige Extrazellulärlösung wurde durch eine Peristaltikpumpe abgesaugt.

Ein- bis zwei Liter Extrazellulärlösung (Ames-Medium) wurden während des gesamten Versuchs mit einer Mischung aus Sauerstoff 95 % und 5 % CO₂ begast (Karbogen) und in einem Wasserbad auf etwa 32-35°C erwärmt. Die Lösung wurde durch einen Tygon-Schlauch (Tygon) über einen Acht-Wege-Hahn (Hamilton, HVXD8-5) zur Meßkammer innerhalb des Faraday-Käfigs geleitet. Die begaste Extrazellulärlösung wurde in der Heizkammer auf eine Temperatur von 35°C gebracht. Um die Temperatur der Extrazellulärlösung in der Kammer

konstant zu halten, wurde die Temperatur ständig von zwei Thermistoren nahe der Aussparung gemessen. Diese waren zwischen Kunststoffteil und Glasboden befestigt und mit der Heizung (ATR-4, Quest Scientific) verbunden. Die Heizung steuerte die Wärmemenge der Heizkammer (siehe Abbildung 10) und einer Heizspule unterhalb der Aussparung der Messkammer. Die Ag/AgCl-Erdungselektrode (siehe Abbildung 10) des Patch-Clamp-Vorverstärkers hatte ständig leitenden Kontakt zu dem Ames-Medium. Der Ausfluß war mit einer Peristaltikpumpe (Minipuls 3, Abimed Gilson) verbunden, mit der überschüssige Extrazellulärlösung abgesaugt und in das Glasgefäß mit Ames-Medium zurückgeführt wurde. Pro Minute flossen etwa 3-5 ml Ames-Medium durch die Meßkammer. Das Ames-Medium wurde während des gesamten Experiments wiederverwendet.

2.3.1. Badapplikation von Pharmaka

Um die Wirkung verschiedener Pharmaka auf die synaptische Übertragung in der Netzhaut zu testen, wurden diese in Ames-Medium gelöst und über einen Acht-Wege-Hahn mit der Meßkammer verbunden. Auf diese Weise konnte jeweils eine bestimmte Lösung der Meßkammer zugeführt werden. Üblicherweise konnte die Wirkung der Pharmaka auf lichtinduzierte Ströme etwa 50-120 Sekunden nach dem Umschalten des Acht-Wege-Hahns gemessen werden. Die Zeit bis zum Einsetzen der Wirkung der Pharmaka war hauptsächlich auf das Totvolumen des Schlauches zwischen Acht-Wege-Hahn und Meßkammer zurückzuführen. Während der Badapplikation von Pharmaka wurde die Lösung nicht wiederverwendet.

2.4. Präparation der Netzhaut

Alle Messungen der vorliegenden Arbeit wurden an isolierten, intakten Netzhäuten durchgeführt (Crescitelli und Sickel, 1968; Ames und Nesbett, 1981).

Pigmentierte Kaninchen und Albinokaninchen (2,0-2,5 kg) wurden vor dem Einschlafen für 3-5 Stunden dunkeladaptiert. Um das Ausbleichen der Netzhaut zu vermeiden, wurden alle weiteren Präparationsschritte unter Infrarotbeleuchtung durchgeführt. Die Kaninchen wurden zunächst durch eine intra muskuläre Injektion von Ketamin und Rompun betäubt und dann durch eine intravenöse Injektion einer Überdosis Pentobarbital getötet. Die Tötung des Tieres geschah in Übereinstimmung mit den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes für das Töten von Kaninchen. Nach dem Tod des Tieres wurde das rechte Auge entnommen und vom Glaskörper befreit. Danach wurden in einer mit begastem Ames-Medium gefüllten Petrischale die Lederhaut, die Aderhaut und das Pigmentepithel abpräpariert. Für die Messung wurden vier Teile ($\approx 5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$) direkt unterhalb des Bandes myelinisierter Fasern („medullary rays“) aus der Netzhaut geschnitten. Jeweils eines der Netzhautteile wurde mit den Photorezeptoren nach unten in die Messkammer gelegt. Die übrigen Netzhautteile wurden bei Zimmertemperatur in einer abgedeckten Petrischale, welche mit begastem Ames-Medium gefüllt war, für spätere Messungen aufbewahrt. Von den isolierten, intakten Netzhautstücken konnten bis zu acht Stunden Lichtantworten gemessen werden. Um jeder Messung eine gefärbte Zelle zuordnen zu können, wurde in den meisten Fällen nur an einer Zelle pro Netzhautteil gemessen.

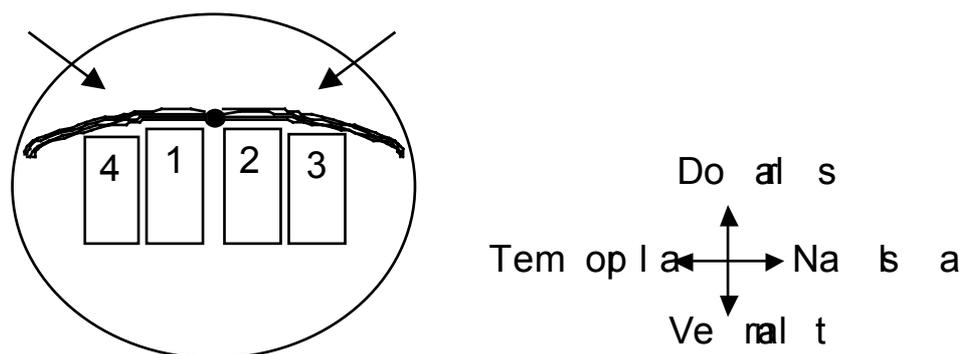


Abbildung 11: Schematische Darstellung einer isolierten, intakten Netzhaut in der Aufsicht. Der schwarze Punkt in der oberen Hälfte der Netzhaut ist der optische Nerv. Das Band myelinisierter Fasern ist angedeutet. Unterhalb dieses Bandes wurde die Netzhaut in vier Teile ($\approx 5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$) geschnitten und in einer Petrischale mit begastem Ames-Medium aufbewahrt.

2.5. Identifikation retinaler Ganglienzellen

Nach Aufreißen der inneren Grenzmembran waren die Zellkörper der Ganglienzellschicht im Mikroskop deutlich sichtbar und für die Patch-Elektrode zugänglich. Die Zellkörper in der Ganglienzellschicht hatten im zentralen Netzhautbereich Durchmesser zwischen 5 μm und 20 μm . Da in der Kaninchennetzhaut etwa 20% aller Zellen in der Ganglienzellschicht ektopische Amakrinzellen sind, war es wichtig, Ganglienzellen von diesen zu unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit wurden Ganglienzellen anhand von drei Kriterien identifiziert: großer Zellkörper, große spannungsaktivierte Na^+ -Ströme und ein deutlich sichtbares Axon der gefärbten Zelle (Taylor, 1999). Da viele Zellen mit kleinem Zellkörper ektopische Amakrinzellen sind, wurde vorwiegend an Zellen mit mittelgroßem bis großem Zellkörper gemessen ($d \geq 8 \mu\text{m}$). An Ganglienzellen mit großem Zellkörper wurde nicht gemessen, da diese oft einen geringen Eingangswiderstand und einen großen Dendritenbaumdurchmesser aufwiesen („space-clamp-problem“) (Velte und Miller, 1996). Es war aufgrund dieses Identifikationsverfahrens nicht auszuschließen, daß in der Gesamtheit der gemessenen Ganglienzellen solche mit mittlerem Zellkörper überrepräsentiert waren. Alle Ganglienzelltypen weisen große spannungsabhängige Na^+ -Ströme auf, welche sich von den kleinen spannungsabhängigen Na^+ -Strömen, die bei einigen ektopischen Amakrinzellen gefunden wurden deutlich unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit, wurde die gemessene Zelle als Ganglienzellen identifiziert, wenn die Amplitude spannungsabhängiger Na^+ -Ströme größer als 1,5 nA war. Um die gemessenen Zellen anzufärben wurden die Axone und Dendriten der Ganglienzellen durch die Patch-Elektrode mit Neurobiotin gefüllt. Im Anschluß an die Versuche wurden die gefüllten Zellen durch eine histochemische Reaktion sichtbar gemacht (Vaney, 1991). Diese Reaktion ist im folgenden Paragraphen beschrieben.

2.6. Histologie

Während der Patch-Clamp-Messung wurde die Zelle durch die Patch-Elektrode mit Neurobiotin gefüllt. Nach der Messung wurde die Elektrode vorsichtig vom Zellkörper weggezogen. In den meisten Fällen wurde dabei der Zellkörper nicht von der Zelle abgetrennt, so daß das Neurobiotin nicht aus den Dendriten herausfließen konnte. Die Netzhaut wurde über Nacht in 4 % Paraformaldehyd (0,1 M PB) fixiert. Während der Fixation wurde die Netzhaut mit den Photorezeptoren nach unten auf ein Stück Filterpapier gelegt, und so das Einrollen der Netzhaut vermieden. Die mit Neurobiotin gefüllte Zelle wurde mit der DAB-Reaktion sichtbar gemacht (Vaney, 1991).

2.6.1. Die DAB-Reaktion

Das Gewebe wurde nach der Fixation für 30 Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Dann wurde das Gewebe in 1 %iger Tritonlösung (in 0,1 M Phosphatpuffer, pH = 7,4) inkubiert und für 15 Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Im Anschluß daran wurde das Gewebe in 1:500 verdünnter Extravidin-Peroxidase für etwa zwei Stunden inkubiert und für 45 Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Bei dem DAB-Schritt wurde die Netzhaut in eine Lösung bestehend aus 950 µl 0,1 M Phosphatpuffer, 50 µl Diaminobenzidin (DAB) und 2 µl 3 %igem H₂O₂ gelegt. Nachdem sich das Gewebe braun gefärbt hatte, wurde die Netzhaut erneut in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Um die gefärbten Ganglienzellen unter dem Mikroskop zu betrachten, wurde die Netzhaut mit den Photorezeptoren nach unten auf einen Objektträger gelegt und in Glycerin eingedeckt.

2.6.2. Die Intensivierungsreaktion

Wenn die DAB-Färbung der Zelle zu schwach war, wurde durch eine Intensivierungsreaktion die Färbeintensität erhöht. Bei der Intensivierungsreaktion wurde die Netzhaut in 0,02 % Nitro-Tetrazoliumblau (0,1 M Tris, pH = 8,2) für etwa 30 Minuten inkubiert. Dann wurde die Netzhaut eingedeckt und auf einem Fluoreszenzmikroskop mit UV-Licht belichtet. Dadurch wurde die Färbung dunkler und deutlich mehr Fortsätze der Zelle wurden sichtbar. Im Anschluß an die Intensivierungsreaktion wurde das Gewebe zunächst in 0,1 M Tris-Puffer (pH = 8,2) und dann in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Die Zellen wurden bei 100facher Vergrößerung an einem Durchlichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit Hilfe eines Zeichentubus gezeichnet. Die Zeichnung wurde mit Tusche auf transparentes Papier übertragen und anschließend eingescannt.

2.7. Lösungen und Substanzen

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien zur Herstellung von Lösungen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Für die Messung von lichtinduzierten Signalen an retinalen Ganglienzellen wurde eine Extrazellulärlösung nach Ames und Nesbett verwendet (Ames und Nesbett, 1981). Sie wird im folgenden kurz ‚Ames-Medium‘ genannt und enthielt folgende Substanzen.

Kalziumchlorid·2 H ₂ O	L-Glutamin	L-Serin	Myo-Inositol
Magnesiumsulfat	L-Glutamatsäure·Na	Taurin	Niacinamid
Kaliumchlorid	Glycin	LThreonin	D-Pantothensäure
Kaliummonophosphat (Anhydrid)	L-Histidin·HCl·H ₂ O	L-Tryptophan	Pyridoxal·HCl
Natriumchlorid	L-Isoleucin	L-Tyrosin·2Na·2H ₂ O	Riboflavin
L-Alanin	L-Leucin	L-Valin	Thiamin·HCl
L-Arginin·HCl	L-Lysin·HCl	Ascorbinsäure·Na	Cytidin
L-Asparagin (Anhydrid)	L-Methionin	D-Biotin	D-Glucose
L-Aspartinsäure	L-Phenylalanin	Cholinchlorid	Hypoxanthin
Thymidin	Uridin	Natriumpyruvicsäure	Bicarbonat
L-Cystin·2 HCl	L-Prolin	Folicsäure	

Tabelle 2: Die Zusammensetzung des Ames-Medium, welches als Extrazellulärlösung für alle Experimente verwendet wurde.

Die Konzentrationen der wichtigsten Ionenarten im Ames-Medium sind in der untenstehenden Tabelle aufgeführt.

Na ⁺	143,0 mM
K ⁺	3,6 mM
Ca ²⁺	1,15 mM
Mg ²⁺	1,2 mM
Cl ⁻	125,4 mM
HCO ₃ ⁻	22,6 mM

Tabelle 3: Die Konzentrationen der wichtigsten Ionenarten, welche im Ames-Medium enthalten waren.

Das Ames-Medium wurde während des gesamten Experimentes mit Karbogen begast. Der pH-Wert des Ames-Mediums lag zwischen 7,4 und 7,8. Die Osmolarität der Ames-Lösung betrug ≈ 280 mOsm.

2.7.1. Intrazellulärlösung

Die Patch-Elektrode wurde für die Messung von Lichtantworten mit einer Intrazellulärlösung gefüllt. Damit Verunreinigungen den Elektrodenwiderstand nicht erhöhten, wurden alle Intrazellulärlösungen filtriert (0,42 μm Porengröße, Type HA; Millipore). Das Diffusionspotential an der Grenzfläche Pipette-Badlösung wurde mit dem Programm JPCalc (Neher, 1992a; Barry, 1994) berechnet und betrug für alle Intrazellulärlösungen $V_{LJ} \approx 15$ mV berechnet. Somit war das Haltepotential um 15 mV niedriger als das am EPC-9-Verstärker eingestellte Potential. Die Inhaltsstoffe der Intrazellulärlösung für die Messung lichtinduzierter Ströme in der Spannungsklemme sind in der untenstehenden Tabelle aufgeführt.

Substanz	Konzentration		Substanz	Konzentration
Cs-Gluconat	100 mM		TBA-Cl	5 mM
Mg-ATP	3 mM		Na-Hepes	10 mM
MgCl ₂	0,5 mM		CaCl ₂	0,5 mM
Na ₂ -GTP	0,5 mM		Neurobiotin-Cl	3-15 mM
EGTA	5 mM		QX-314	5 mM

Tabelle 4: Die Inhaltsstoffe der Cäsiumgluconatlösung, welche für die Messung lichtinduzierter Ströme in der Spannungsklemme verwendet wurde.

Die Konzentrationen der wichtigsten Ionenarten in der Cs-Gluconat-Lösung sind in der untenstehenden Tabelle aufgeführt.

Cäsiumgluconatlösung	
Cs ⁺	100 mM
Na ⁺	11 mM
Ca ²⁺	< 0,1 μM
Mg ²⁺	0,5 mM
Cl ⁻	12-22 mM
HCO ₃ ⁻	22,6 mM

Tabelle 5: Die Konzentrationen der wichtigsten Ionenarten, welche in der Cäsiumgluconatlösung enthalten waren.

Bei dieser Intrazellulärlösung wurde der pH-Wert bei 35 C° mit 1 M CsOH auf 7,25 eingestellt. Die Osmolarität der Intrazellulärlösung gemessen mit einem Osmometer (Osmomat, Gonotec) betrug 258 mOsm. Um spannungsabhängige K⁺-Kanäle zu blockieren, wurden Intrazellulärlösungen mit Cäsium statt Kalium als Kation verwendet. Um die Kaliumleitfähigkeit zusätzlich zu verringern, wurden der Intrazellulärlösung 5 mM Tetrabutylammoniumchlorid (TBA) hinzugefügt. Die Spannungsabhängigen Na⁺-Ionenkanäle wurden durch Zugabe von 5-10 mM QX-314 blockiert.

Die berechneten Umkehrpotentiale von reinen Chloridionenströmen und die Umkehrpotentiale von GABA- und glyzininduzierten Ionenströmen, die aus Chloridionen und Bicarbonationen bestehen, sind in der untenstehenden Tabelle aufgeführt (Bormann et al., 1987; Backus et al., 1998; Dallwig et al., 1999; Frech et al., 1999)

Strom	E _{rev} (mV) bei 22 mM Cl ⁻	E _{rev} (mV) bei 12 mM Cl ⁻
Cl ⁻	-46,4	-62,6
GABA	-44,3	-58,3
Glyzin	-45,1	-59,8

Tabelle 6: Die berechneten Umkehrpotentiale von reinen Chloridionenströmen und GABA- und glyzininduzierten Ionenströmen, welche aus Chloridionen und Bicarbonat bestehen.

Für die Messung von lichtinduzierten Aktionspotentialen in der Stromklemme wurde eine Kaliumchloridlösung (KCl) und eine Kaliumgluconatlösung (KGlu) verwendet.

Kaliumchloridlösung	
KCl	115 mM
Hepes	10 mM
NaCl	5 mM
EGTA	5 mM
MgCl ₂	4,6 mM
Na-ATP	4 mM
Na ₂ -GTP	0,5 mM

Tabelle 7: Die Inhaltsstoffe der Kaliumchloridlösung, welche für die Messung lichtinduzierter Aktionspotentiale in der Spannungsklemme verwendet wurde.

Der pH-Wert wurde bei dieser Lösung auf 7,2 bei 35°C mit KOH eingestellt. Die Osmolarität der Lösung betrug 280 mOsm.

Kaliumgluconatlösung	
K-Gluconat	115 mM
Hepes	10 mM
NaCl	5 mM
EGTA	5 mM
MgCl ₂	4,6 mM
Na-ATP	4 mM
Na ₂ -GTP	0,5 mM

Tabelle 8: Die Inhaltsstoffe der Kaliumgluconatlösung, welche für die Messung lichtinduzierter Aktionspotentiale in der Spannungsklemme verwendet wurde.

Der pH-Wert wurde bei dieser Lösung auf 7,2 bei 35°C mit KOH eingestellt. Die Osmolarität der Lösung betrug 274 mOsm.

2.7.2. Substanzen

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Substanzen verwendet

Substanz	Firma
Adenosin 5'-Triphosphat Magnesiumsalz (Magnesium-ATP)	Sigma
Ames-Medium mit L-Glutamin ohne Bicarbonat	Sigma
Aminopropyl(methyl)phosphorsäure (APMPA)	Sigma
Bicucullinmethiodid	Sigma
Caesiumhydroxid	Aldrich
Kalziumchlorid·2 H ₂ O	Merck
D-Gluconsäure	Sigma
D(+)-Gluconsäure	Aldrich
di-Natriumhydrogenphosphat	Riedel
Äthylenglycol-bis(beta-aminoethyläther)-N,N,N',N'-säure (EGTA)	Sigma
Extravidin Peroxidase	Sigma
Guanosin 5'-Triphosphat Natriumsalz (Natrium-GTP)	Sigma
Lidocain N-ethyl Bromid (QX-314)	Sigma
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-ethansulfonsäure Heminatriumsalz (Hepes Heminatriumsalz)	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat (Bicarbonat)	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natronlauge	J.T. Baker
Neurobiotin-Chlorid	Vector/Linaris
NitroBlueTetrazolium (NBT)	Sigma
Picrotoxinin	Sigma
Salzsäure	Merck
Tetrabutylammoniumchlorid (TBA-Cl)	Sigma
1,2,5,6-Tetrahydropyridin-4-ylmethylphosphorsäure (TPMPA)	Sigma
Tetrodotoxin (TTX)	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Trizma base)	Sigma
Tris(hydroxymethylaminomethan hydrochlorid (Trizma hydrochlorid)	Sigma

Tabelle 9: Liste aller in der vorliegenden Arbeit für das Ansetzen von Lösungen verwendeten Chemikalien mit Hersteller.

2.8. Elektrophysiologische Methoden

2.8.1. Herstellung der Patch-Elektroden

Die Patch-Elektroden bestanden aus Borsilikatglas (mit Innenfilament, Innendurchmesser 0,86 mm, Außendurchmesser 1,5 mm, ClarkMedical). Die Elektroden wurden mit einem Pipettenziehgerät (DMZ Universalpuller, Zeitz Instrumente Augsburg) in zwei Schritten gezogen. Dabei wurden die Glaskapillaren an beiden Enden zwischen zwei Kunststoffbacken in horizontaler Richtung eingespannt. Beim ersten Schritt wurde die Glaskapillare mittels eines Glühdrahtes erhitzt und in horizontaler Richtung etwa 0,7 cm bis 1,0 cm gedehnt. Dadurch wurde sie in der Mitte etwa 0,2 mm bis 0,4 mm dünn. Beim zweiten Schritt wurde die abgekühlte Pipette an ihrer dünnsten Stelle in die Mitte des Glühdrahtes gebracht, erneut erhitzt und auseinandergezogen. Die Glaskapillare riß in der Mitte entzwei und man erhielt zwei Patch-Elektroden mit einer glatten Öffnung von etwa einem Mikrometer.

Um die elektrische Aktivität der Zelle zu messen wurde die Elektrode mit einer Elektrolytlösung (Intrazellulärlösung) gefüllt. Je nach Öffnungsdurchmesser hatten die Elektroden, welche mit einer Cäsiumgluconatlösung gefüllt waren, einen Widerstand von $R_{pip} = 4 - 12 \text{ M}\Omega$.

2.8.2. Ganzzelleableitung

Bei der Ganzzelleableitung mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik wurde prinzipiell die gesamte elektrische Aktivität der Zelle erfaßt. Die Meßmethoden bei der Ganzzelleableitung sind die Spannungsklemme ('voltage-clamp') und die Stromklemme ('current-clamp').

2.8.3. Spannungsklemme

Bei der Spannungsklemme wird über eine elektronische Schaltung (Abbildung 12) der mit der Patch-Pipette gemessene Spannungsabfall (V_{pip}) über der Zellmembran mit dem Sollwert (V_h), dem Haltepotential, verglichen (FJ, 1995; Sigworth, 1995). Ein der Spannungsdifferenz proportionaler Kompensationsstrom I_{pip} umgekehrten Vorzeichens wird über die Elektrode in die Zelle geleitet, so daß die Differenz von Pipettenpotential (V_{pip}) und Haltepotential (V_h) verschwindet. Der Kompensationsstrom I_{pip} wurden von der Steuersoftware des EPC-9-Verstärkers auf einer Festplatte (Macintosh Power PC 8000/100) gespeichert (Abtastfrequenz = 5 kHz) (FJ, 1995).

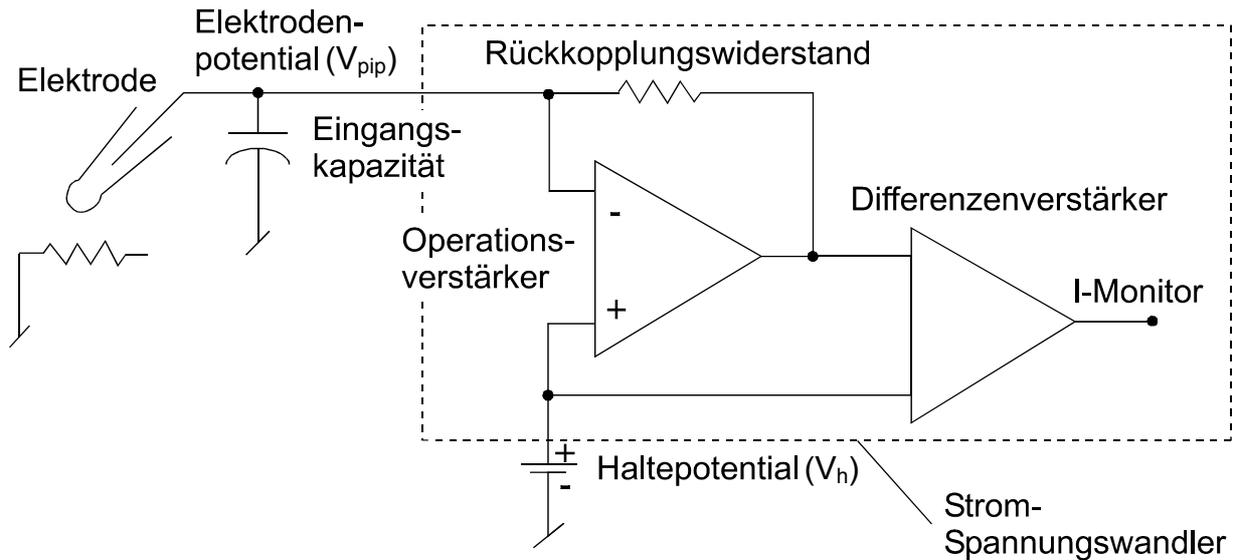


Abbildung 12: Vereinfachtes Schaltbild der Spannungsklemme. Der Operationsverstärker vergleicht an seinen Eingängen ständig das Pipettenpotential V_{pip} und das Sollpotential (Haltepotential) V_h . Eine Abweichung verursacht einen Spannungsabfall U_f über dem Rückkopplungswiderstand $R_f \approx 10 \text{ G}\Omega$. Der daraus resultierende Strom I_{pip} wird über die Elektrode in die Zelle geleitet, um die Abweichung von Haltepotential und Membranpotential zu minimieren. Der Operationsverstärker nimmt eine Strom-Spannungswandlung vor: Das Stromsignal an seinem Eingang wird in ein Spannungssignal umgewandelt. Die Potentialdifferenz zwischen Sollpotential und Ausgang des Operationsverstärkers wird von einem Differenzverstärker gemessen. Die Spannungen am Ausgang des Differenzverstärkers entsprechen Strömen durch die Pipette. Dieser Schaltkreis war nahe der Patch-Elektrode im Vorverstärker untergebracht.

Bei einer idealen Patch-Clamp-Messung ist V_m über die gesamte Zellmembran konstant und $V_h - V_m$ verschwindet zu jedem Zeitpunkt für jedes Haltepotential V_h .

Das Potential im Ruhezustand des Neurons, bei welchem der Membranstrom gleich Null ist, wird als das Ruhemembranpotential V_r der Zelle bezeichnet. Somit wird bei $V_h = V_r$ kein Strom in die Zelle geleitet. Der Strom, welcher in die Zelle geleitet werden muß, um das Haltepotential V_h einzustellen wird als Klemmstrom oder Haltestrom bezeichnet¹.

Ein spezifischer Lichtreiz löst bei zu Ganglienzellen präsynaptischen Zellen die Ausschüttung von Neurotransmitter aus. Der Neurotransmitter bindet an Rezeptoren in der Membran der Ganglienzellen. Durch die Bindung des Neurotransmitters an den Rezeptoren werden Ionenkanäle geöffnet. Einer der wesentlichen Annahmen der vorliegenden Arbeit war, daß die gemessenen lichtinduzierten Ströme, Ionenströme durch Ionenkanäle sind, deren

¹ In der Literatur wird oft zwischen Leckstrom und Haltestrom unterschieden. Hierbei ist der Klemmstrom der Pipettenstrom I_{pip} , welcher in die Pipette geleitet wird. Der Haltestrom wird als der Strom bezeichnet, welcher in die Zelle geleitet wird, um ein Haltepotential V_h , abweichend vom Ruhemembranpotential V_m einzustellen.

Offenwahrscheinlichkeit von der Neurotransmitterkonzentration an der Synapse abhängig ist. Für in der Spannungsklemme gemessenen lichtinduzierten Ionenströme I gilt bei $\Delta V = 0$ deshalb

$$I = \frac{(V_h - E_i)}{R_{in}}$$

wobei E_i das Umkehrpotential des gemessenen Ionenstroms und R_{in} der Widerstand der Zelle ist. Der Ganzzellstrom I ist proportional zu der Anzahl der Kanäle N , der Offenwahrscheinlichkeit p_{Offen} und der Einzelkanalstromstärke i (Hille, 1992).

$$I \propto N \cdot p_{Offen} \cdot i$$

2.8.4. Stromklemme

Bei der Stromklemme („current-clamp“) wird das „natürliche“ elektrische Verhalten der gesamten Zellmembran gemessen, welches aus zeitlichen Potentialänderungen besteht. Das Potential der Zelle resultiert aus dem Öffnen von Ionenkanälen (spannungs- und ligandengesteuerte), aus elektrochemischen Potentialen der Ionen und transmembranösen Transportprozessen. Das Messen in der Spannungsklemme war geeignet, Membranströme zu analysieren, aber nicht geeignet, Rückschlüsse auf das physiologische Erregungsmuster der Zelle zu ziehen. Die Ausschüttung von Neurotransmitter am Axonende von retinalen Ganglienzellen im Gehirn ist hauptsächlich von ihrer Entladungsrate abhängig. Die Entladungsrate der Zelle konnte nur sehr unzureichend aus den gemessenen synaptischen Strömen rekonstruiert werden. Daher war es sinnvoll, lichtinduzierte elektrische Aktivität von retinalen Ganglienzellen im Ganzzellmodus in der Stromklemmenanordnung zu messen. In der Stromklemme wird der Membranstrom fest vorgegeben und zeitliche Potentialänderungen der Zelle gemessen werden, insbesondere lichtinduzierte Aktionspotentiale. Um das Ruhemembranpotential (V_r) der Zelle zu bestimmen, muß der Membranstrom I verschwinden. Ob dieses gemessene Ruhemembranpotential dem physiologischen entspricht wird in Kapitel 2.8.7 diskutiert.

2.8.5. Gigaohmabdichtung („gigaseal“)

Während der Experimentator die Elektrode mit einem Mikromanipulator in Richtung Zelle bewegte, wurden periodisch Spannungspulse (Testpuls, 5 ms, 10 mV) angelegt und Kapazität und Elektrodenwiderstand gemessen. Der Elektrodenwiderstand R_{pip} lag zwischen 4 und 12 M Ω . Während des Vortriebs wurde durch einen Druckschlauch an der hinteren (weiten) Elektrodenöffnung ein leichter Überdruck angelegt, um das Verstopfen der Elektrodenspitze

zu verhindern. Wenn die Elektrodenspitze auf der Zellmembran aufsaß, wurde sie in über den Druckschlauch an der Membran festgesaugt. Durch dieses Ansaugen stieg der Elektrodenwiderstand auf 2 – 5 G Ω an, und der sogenannte ‚Gigaseal‘, die Abdichtung der Elektrodenspitze, war erzielt. Der Elektrodenwiderstand wurde als akustisches Signal hörbar gemacht, so daß der Experimentator den Vortrieb der Elektrode am Bildschirm beobachten konnte und gleichzeitig den Elektrodenwiderstand überwachen konnte.

2.8.6. Aufreißen der Zellmembran

Nach dem Erzielen eines ‚gigaseals‘ wurde der Membranfleck unter der Elektrodenspitze durch ein kurzes Ansaugen aufgerissen und ein leitender Kontakt zum Cytosol hergestellt (Abbildung 13).

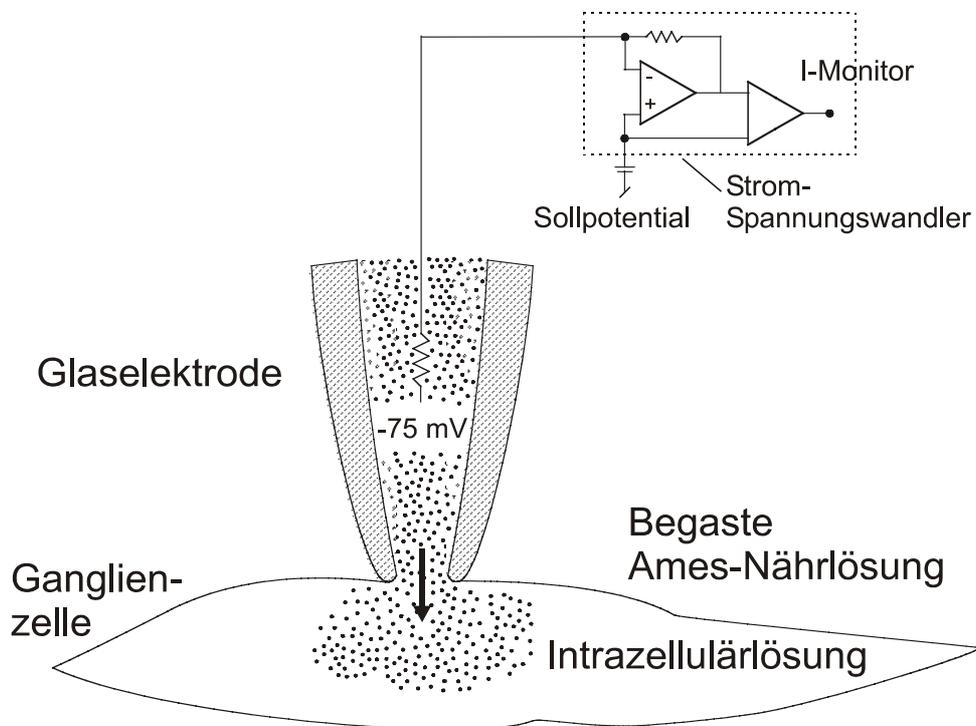


Abbildung 13: Darstellung einer Ganzzelleableitung im Spannungs-klemme-Modus. Die Ganglienzelle wurde von dem Patch-Clamp-Verstärker auf einem Potential von $V_h = -75 \text{ mV}$ gehalten. Das Eindiffundieren der Elektrodenlösung in die Zelle ist hier schematisch als kleine schwarze Punkte in Elektrode und Zelle dargestellt. Potentialänderungen zwischen Zellinnerem und Extrazellulärraum werden von dem Patch-Clamp-Verstärker kompensiert und in ein Stromsignal umgewandelt.

Dies führte zu einem Anstieg der kapazitiven Transienten (I_{max}) der Stromantwort auf den Testpuls (siehe auch Abbildung 15). Dieser Anstieg wird durch die Erhöhung der gemessenen Kapazität C und die Verringerung des gemessenen Widerstandes verursacht. Vor dem Aufreißen wurde lediglich die Elektrodenkapazität C_{pip} und der Abdichtwiderstand gemessen.

Nach Aufreißen der Membran trägt zur gemessenen Kapazität zusätzlich die Kapazität der Zelle C_{in} bei ($C = C_{in} + C_{pip}$). Der Gesamtwiderstand der Zelle ($R_{in} \leq 500 \text{ M}\Omega$) in Reihe mit dem Widerstand zwischen Elektrode und Zellinnerem ($R_s \approx 30 \text{ M}\Omega$) ist hingegen deutlich geringer als der Abdichtwiderstand. Der Widerstand zwischen Elektrode und Zellinnerem wird als Serienwiderstand bezeichnet (Abbildung 14) und war eine der Hauptfehlerquellen bei Patch-Clamp-Messungen der vorliegenden Arbeit (siehe Kapitel 2.8.8).

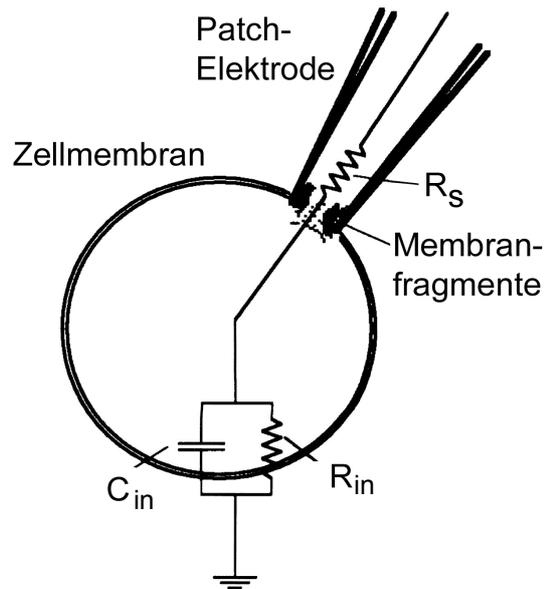


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Gesamtwiderstandes R_{in} , der Membrankapazität C_{in} und des Serienwiderstandes R_s bei der Ganzzelleableitung einer sphärischen Zelle. Je größer Serienwiderstand, umso größer ist der Anteil Spannung der über R_s statt über R_{in} abfällt (Spannungsteiler). Die Membranfragmente welche für den Serienwiderstand verantwortlich sind, bestehen hauptsächlich aus eingesaugter Zellmembran und Verunreinigungen der Zelloberfläche. (Aus Nuhmberger und Draguhn ‚Patch-Clamp-Technik‘ (Nuhmberger und Draguhn, 1996)).

Der Serienwiderstand R_s ist von R_{pip} und der Verunreinigung der Elektrodenöffnung durch Membranstücke abhängig. Im Idealfall ist R_s etwa doppelt so groß wie R_{pip} . Um ein Wiederverschließen der Membran zu verhindern, wurden intrazelluläre Kalziumionen mit 5 mM EGTA gepuffert. Die Intrazellulärlösung diffundierte innerhalb weniger Sekunden vollständig in die Zelle, und glich die Ionenkonzentration der Zelle der verwendeten Elektrodenlösung an.

Mit Hilfe der Stromantwort des Testpulses (Abbildung 15) in der Ganzzellkonfiguration wurden Haltestrom I_{offset} , Serienwiderstand R_s , Gesamtwiderstand R_{in} und Gesamtkapazität der Zelle C_{in} gemessen.

Der Haltestrom I_{offset} wird mit Hilfe der folgenden Formel berechnet

$$I_{offset} = V_o / (R_{in} + R_s)$$

Formel 5: Abschätzung des Haltestroms I_{offset} .

wobei V_o ist die Größe des Testpulses ist.

Durch die Messung von I_{offset} kann mit

$$R_{in} = V_o / I_{offset}$$

Formel 6: Abschätzung des Gesamtwiderstandes R_{in} der Zelle.

der Gesamtwiderstand R_{in} der Zelle abgeschätzt werden.

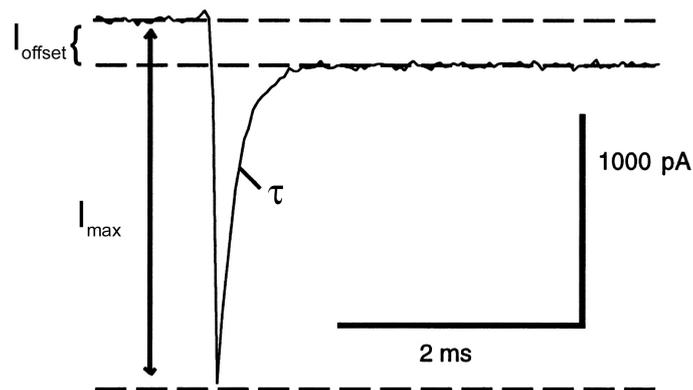


Abbildung 15: Stromantwort der Zelle auf einen Spannungssprung im Ganzzellmodus der Patch-Clamp-Technik. Der Spannungssprung verursacht einen kapazitiven Strom, welcher mit der Zeitkonstante $\tau = R_s \cdot C_{in}$ abfällt. Der Strom I_{offset} der ständig in die Zelle geleitet werden muß, um das eingestellte Haltepotential aufrechtzuhalten wird als Haltestrom bezeichnet. (Aus Nuhmberger und Draguhn ‚Patch-Clamp-Technik‘ (Nuhmberger und Draguhn, 1996)).

Zu Beginn des Spannungssprungs wird die Zelle zunächst aufgeladen und der gesamte Strom fließt nur über den Widerstand R_s . Deswegen kann durch die Messung der Amplitude der Stromantwort I_{max}

$$R_s \approx V_o / I_{max}$$

Formel 7: Abschätzung des Serienwiderstandes R_s

der Serienwiderstand R_s sowie die Gesamtkapazität C_{in} abgeschätzt werden

$$\begin{aligned}C_{in} &= I_{max} \cdot \tau / V_o \\ &= \tau / R_s.\end{aligned}$$

Formel 8: : Abschätzung Gesamtkapazität C_{in} .

Während der eigentlichen Messung wurde kein Testpuls gegeben und es wurde ein Haltepotential von $V_h = -75$ mV angelegt.

2.8.7. Messung des Ruhemembranpotentials V_r

Nach Definition verschwindet der Haltestrom (siehe auch Kapitel 2.8.3), wenn das Haltepotential V_h gleich dem Ruhemembranpotential V_r ist. Das Ruhemembranpotential einer Ganglienzelle liegt aufgrund der hohen Kaliumleitfähigkeit der Membran in der Nähe des Umkehrpotentials von Kalium zwischen -60 mV und -90 mV. Dieser Wert wurde bei den Patch-Clamp-Messungen der vorliegenden Arbeit nicht gemessen, weil durch das Einwaschen der Cäsiumgluconat-Intrazellulärlösung die Kaliumionenkanäle blockiert wurden. Aus diesem Grund lagen die gemessenen Ruhemembranpotentiale bei $V_r = -40$ mV bis -20 mV.

2.8.8. Weitere Fehlerquellen bei der Ganzzellstrommessung mit der Patch-Clamp-Technik

Die Genauigkeit der Strommessung ist durch das Rauschen von Zellmembran, Patch-Pipette und Meßelektronik begrenzt. Die Genauigkeit betrug je nach Messbedingungen 5 pA - 20 pA. Einige systematische Fehlerquellen bei 'patch-clamp'-Messungen (Hamill *et al.*, 1981) sind:

1. Die Kapazität (C_{fast}) der Pipette und des Halters ($< 0,1$ pF) und deren Ladeströme (einige Nanoampere) führen zu Dämpfungen oder Verzerrungen bei Spannungssprüngen. Diese wurde in der vorliegenden Arbeit nach dem Ausbilden des Gigaseals durch eine Rückkopplungsschaltung im EPC-9-Verstärker kompensiert.
2. Die Gesamtkapazität der Zelle (C_{slow} oder C_{in}) im Bereich von 20-40 μ F verursacht lange Ladezeiten bei Spannungssprüngen und vermindert somit die Zeitauflösung der Messungen. Im Falle einer nicht verzweigten ('elektrisch runden') Zelle kann diese Kapazität exakt kompensiert werden, weil dann die Stromantwort monoexponentiell abfällt (Abbildung 15). Im Falle einer verzweigten Zelle war der zeitliche Verlauf der Stromantwort die Summe mehrerer Exponentialfunktionen. Die Gesamtkapazität C_{slow} wurde wie in Kapitel 2.9 beschrieben abgeschätzt und durch eine Rückkopplungsschaltung im EPC-9-Verstärker kompensiert.

3. Der Serienwiderstand R_s verursacht drei wesentliche Fehlern:

- a) Bei der Messung des Membranpotentials V_m fällt ein Teil des Haltestroms I_{offset} über dem Serienwiderstand ab der andere über dem Membranwiderstand (Formel 5). Deshalb kann das Membranpotential, bei großem Serienwiderstand vom Haltepotential abweichen, ohne daß dies direkt gemessen werden kann
- b) Bei einem Spannungssprung fließt ein Ladestrom in die Zelle. Je größer der Serienwiderstand, desto länger benötigt der Verstärker, um die gewünschte Spannung einzustellen ($C_{in} \cdot R_s = \tau$).
- c) Durch den Serienwiderstand wird die Anstiegsphase synaptischer Ströme verlangsamt wiedergegeben und die Größe der synaptischen Ströme stark verzerrt.

Deshalb sollte im Idealfall $R_s \ll R_{in}$ sein. Der Serienwiderstand wurde in der vorliegenden Arbeit elektronisch mit dem EPC-9-Verstärker kompensiert (FJ, 1995; Sigworth, 1995).

2.9. Qualität von Patch-Clamp-Messungen bei Zellen mit verzweigten Dendritenbäumen („space-clamp-problem“)

Ein Hauptproblem bei Patch-Clamp-Messungen an Zellen mit verzweigten Dendritenbäumen bestand darin, die Spannungsklemme über die gesamte Membran des Dendritenbaumes konstant zu halten. Auch wenn $R_s \ll R_{in}$ ist, wirken die Dendriten wie ‚Nadelöhre‘ für den Haltestrom und verursachen einen zusätzlichen ‚dendritischen Serienwiderstand‘. Dadurch werden die peripheren Teile der Zelle nur unzureichend von der Spannungsklemme erfaßt („space-clamp-problem“). Durch die ‚dendritischen Kapazitäten‘ erhöht sich bei einem Spannungssprung oder einer Leitfähigkeitsänderung zusätzlich noch die Ladezeiten der Zelle. Eine Abschätzung des Problems wurde in der Arbeit von Velte behandelt (Velte und Miller, 1996). Dabei wurde die Zelle in Bereiche unterteilt, die jeweils durch Serienwiderstände getrennt sind und denen jeweils eine Kapazität zugeordnet wurde (Simulation einer Zelle durch eine Serie von RC-Gliedern, welche durch einen Widerstand getrennt sind). Durch die Kenntnis der Morphologie, von R_{in} und C_{in} sowie durch die Messung spannungsabhängiger Leitfähigkeiten der Ganglienzelle konnte mittels einer Simulation die Güte der Spannungsklemme abgeschätzt werden.

Eines der wesentlichen Ergebnisse der Arbeit zeigt die Abhängigkeit der Güte der Spannungsklemme im wesentlichen von zwei Faktoren abhängt:

1. Spannungsabhängige Ionenkanäle. Durch spontane postsynaptische Ströme werden spannungsabhängige Ionenkanäle in der Membran geöffnet, welche eine weitere Verringerung von R_{in} verursachen. Dabei kann der spezifische Membranwiderstand R_{in} so klein werden, daß $R_s \ll R_{in}$ nicht mehr gegeben ist.
2. Durchmesser und Verzweigung des Dendritenbaums. Wegen eines nicht vernachlässigbaren Innenwiderstandes der Dendriten sind Zellen, deren Dendritenbaum größer als 400 μm ist, ungünstig für PatchClampMessungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb bei der Messung lichtinduzierter Ströme alle spannungsabhängigen Ionenkanäle blockiert. Weiterhin wurden nur Daten von Zellen mit einem Dendritenbaumdurchmesser $< 400 \mu\text{m}$ ausgewertet.

Nur für den Fall, daß $R_{in} \gg R_s$ können mit der Hilfe von Formel 6 der Gesamtwiderstand der Zelle, mit Hilfe von Formel 7 der Serienwiderstand R_s und mit Hilfe von Formel 8 die Gesamtkapazität der Zelle C_{in} abgeschätzt werden. Die Abschätzung des Serienwiderstandes (Formel 6) ist unabhängig von der Zellgeometrie. Zellen mit einem Serienwiderstand größer als 40 $\text{M}\Omega$ wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Während der Messung wurde der Serienwiderstand kontinuierlich überprüft. Wenn der Serienwiderstand zu stark von dem Wert zu Beginn der Messung abwich, wurde die Messung an dieser Zelle abgebrochen. Als ein experimentelles Maß für die Güte der Spannungsklemme wurde das Umkehren erregender Ströme bei 0 mV und hemmender synaptischer Ströme bei E_{Cl} genommen.

2.10. Methoden der Auswertung

Versuchsparameter wie elektrische Signale, Membrankapazität, Pipettenkapazität, Serienwiderstand, Haltestrom, Haltepotential, Haltestrom, Temperatur der Meßkammer, Abtastfrequenz, Filter Cutoff-Frequenz, relative und absolute Zeiten, sowie die Anzahl der gemittelten Messungen wurden von dem EPC-9-Verstärker digitalisiert und gespeichert (Sigworth *et al.*, 1995). Die Lichtreize wurden vom Stimuluscomputer protokolliert. Dabei wurden Form des Lichtreizes (Kreis oder Ring), seine Abmessungen, Dauer und Zeitpunkt des Einschaltens, Intensität und Position in der x-y-Ebene abgespeichert. Die Registrierungen und Lichtreize wurden mit Hilfe des Programmes IgorPro (Wavemetrics) ausgewertet werden.

2.10.1. Auswertung lichtinduzierter Ströme

Die lichtinduzierten Ströme wurden in der vorliegenden Arbeit nach drei Methoden ausgewertet (Abbildung 16):

- 1.) Bestimmen der Ladungsmenge durch Integration der Stromantwort: Die Ladungsmenge wurde durch die Integration der Stromkurve über die Zeitachse bestimmt. Die Integration wurde durch Trapeze approximiert (implementierte Funktion von IgorPro). Als Null-Linie wurde der Mittelwert des Stroms vor der Lichtreizung genommen. Als Anfang des Integrationsintervalles wurde der Zeitpunkt gewählt, an dem die Lichtantwort einsetzt. Das Integrationsintervall entsprach der Dauer des Lichtreizes. Auf diese Weise konnte ausgeschlossen werden, daß über Stromantworten beim Ausschalten des Reizes (OFF-Antwort) integriert wurde (obere Registrierung in Abbildung 16, grauer Bereich).
- 2.) Messung der phasischen Stromantwort: Die phasische Stromantwort wurde als Mittelwert der Amplitude berechnet. Dabei wurde über einen kleinen Bereich an der Spitze der Stromantwort gemittelt (mittlere Registrierung in Abbildung 16, grauer Bereich, 20 ms).
- 3.) Messung der tonischen Stromantwort. Die tonische Stromantwort wurde als Mittelwert der Plateauphase der Amplitude berechnet (untere Registrierung in Abbildung 16, grauer Bereich, 175 ms).

Bei der Berechnung der phasischen als auch der tonische Stromantwort wird aufgrund der uneinheitlichen Lichtantworten der zu mittelnde Bereich willkürlich festgelegt (siehe auch Abbildung 24). Dies führte bei Strom-Spannungskurven zu einer Änderung der Steilheit,

nicht aber zu einer Verfälschung des Umkehrpotentials. Ein weiterer Nachteil beim Messen der phasischen und tonischen Stromantworten war, daß retinale Ganglienzellen bei geringen Leuchtdichten und kleinen Stimulusabmessungen selten ausgeprägt phasisch auf den Lichtreiz reagieren. Bei solchen Stimuli war es schwer, die phasische Stromantwort von der tonischen Stromantwort zu unterscheiden.

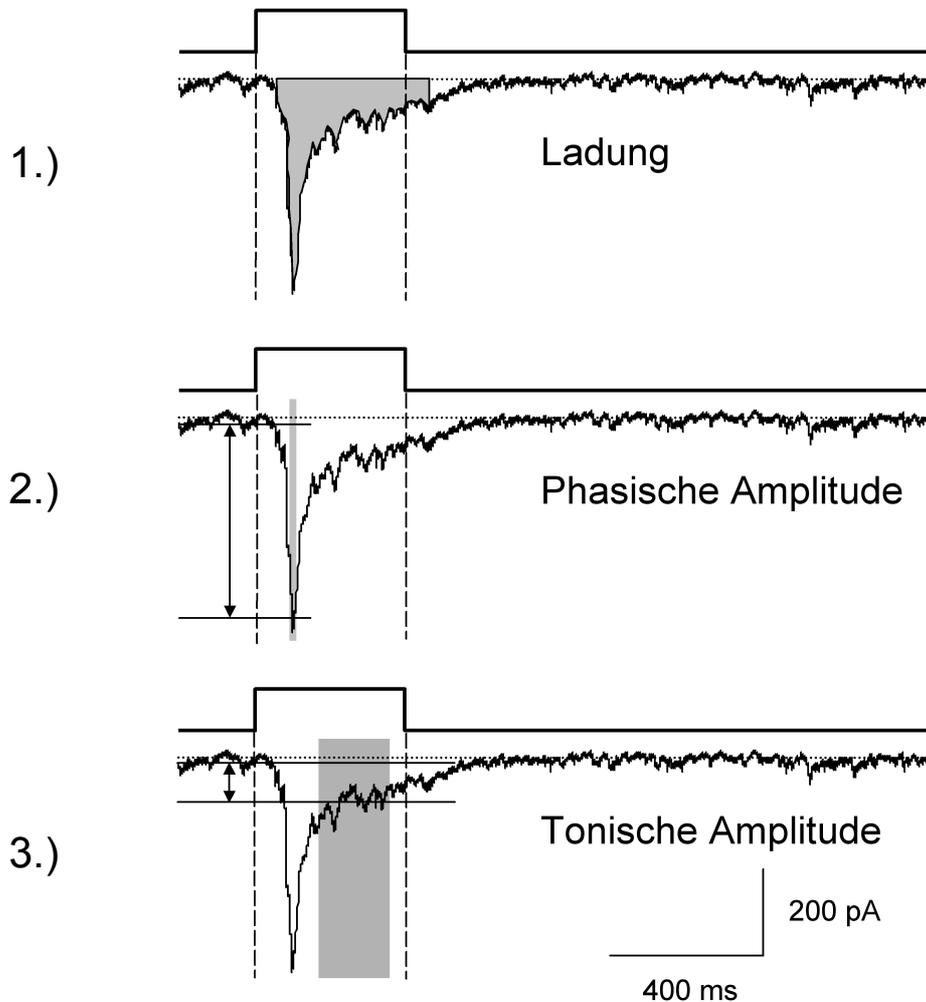


Abbildung 16: Drei Methoden zur Auswertung lichtinduzierter Ströme: Messung der Ladungsmenge, Messung der phasischen und der tonischen Amplitude. Der Verlauf des Lichtreizes ist über den Stromkurven eingezeichnet (Dauer 400 ms). Die Zelle zeigte eine phasische Reizantwort; noch während der Lichtreiz eingeschaltet war, sank die Amplitude auf etwa ein Fünftel des Maximalausschlags. Beim Messen der Ladungsmenge wurde über die Fläche, welche die Stromantwort mit der Null-Linie einschließt, integriert. Die linke Integrationsgrenze wurde als der Zeitpunkt festgelegt, an dem die Reizantwort der Zelle einsetzt. Die rechte Integrationsgrenze war um die Dauer des Lichtreizes (400 ms) gegenüber der linken Integrationsgrenze verschoben. Beim Messen der phasischen und der tonischen Amplituden wurde über die Spitzenantwort (20 ms) und über die Plateuphase (175 ms) gemittelt.

2.10.1. Reizung mit kleinen Lichtpunkten

Der Retinaort der maximalen Empfindlichkeit einer Ganglienzelle wurde durch die Methode ‚Reizung mit kleinen Lichtpunkten‘ ermittelt (Rodieck, 1965; Rodieck und Stone, 1965a; Peichl und Wässle, 1979; Taylor und Wässle, 1995). Dabei wurde die Ganglienzelle mit einem kleinen Lichtpunkt ($d = 50 \mu\text{m}$) an jeweils acht Stellen im rezeptiven Feld entlang einer naso-temporalen und einer dorso-ventralen Achse gereizt. Die lichtinduzierten Ströme wurden bei einem Haltepotential von $V_h = -75 \text{ mV}$ aufgezeichnet. Bei diesem Haltepotential werden erregende und hemmende Ströme summiert und als Einwärtsströme gemessen. Die Ladung der Stromantwort der Ganglienzelle wurde bestimmt und im ersten Schritt willkürlich als Funktion des Abstandes vom Zentrum des Bildschirms entlang den beiden Achsen aufgetragen. Die Daten wurden durch eine Gaußfunktion

$$R(x) = R_{\max} e^{-\left[\frac{(x-a)}{\sigma}\right]^2}$$

approximiert, wobei R_{\max} die maximale Zellantwort, a der Abstand des Empfindlichkeitsmaximas vom Zentrum des Bildschirms und σ die Halbwertsbreite ist (Taylor und Wässle, 1995).

Wenn die maximale Zellantwort an einem Retinaort gemessen wurde, der nicht mit dem Zentrum des Bildschirms überstimmte, wurde im zweiten Schritt der Nullpunkt des Lichtreizsystems entsprechend verschoben. Alle im weiteren Verlauf des Experiments verwendeten Lichtreize waren auf diesen neuen Nullpunkt des Lichtreizsystems zentriert.

2.10.2. Flächen-Variations-Messung

Mit Hilfe der Flächen-Variations-Messung wurde das rezeptive Feld der Ganglienzellen vermessen. Die Ganglienzellen wurden mit kreisförmigen Lichtreizen, deren Durchmesser von 30, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 300, 400, 600, 800 oder 1200 μm betrug, gereizt. Das Vermessen des rezeptiven Feldes mit der Flächen-Variations-Messung entspricht einer Integration über das räumliche Empfindlichkeitsprofil. Aufgrund der Erregung im rezeptiven Feldzentrum und der Hemmung im Umfeld ist zu erwarten, daß die Antwort der Zelle zunächst anwächst, ein Maximum erreicht und für große Durchmesser wieder abnimmt. Dem DOG-Modell zufolge sollte die Antwort der Ganglienzellen maximal sein, wenn der Durchmesser des Lichtpunktes gerade dem des rezeptiven Feldzentrums entspricht. Die Meßdaten wurden als Funktion des Durchmessers dargestellt.

Das räumliche Empfindlichkeitsprofil des erregenden synaptischen Eingangs der Ganglienzelle wurde am Umkehrpotential für Chloridionenströme gemessen (-45 mV oder

-55 mV). Das räumliche Empfindlichkeitsprofil des hemmenden synaptischen Eingangs der Ganglienzelle wurde am Umkehrpotential für unspezifische Kationenströme gemessen (0 mV oder +5 mV).

2.10.3. Erstellen von Strom-Spannungskurven

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen dem eingestellten Haltepotential (welches im Idealfall gleich dem Membranpotential der Ganglienzelle sein sollte) und der lichtinduzierten Stromantwort untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Ganglienzelle zuerst am Ruhemembranpotential von -75 mV geklemmt, anschließend erfolgte ein Spannungssprung und danach wurde der Lichtreiz gesetzt. Bei den Spannungssprüngen wurde für eine Dauer von zwei Sekunden das Haltepotential auf Werte zwischen -105 mV und +45 mV eingestellt. Der Spannungsbereich von -105 mV und +45 mV wurde durch 16 Spannungssprünge ($\Delta V = 10$ mV) abgedeckt. Um die intrazellulären Ionenkonzentrationen nicht zu verändern, wurde nach jedem Spannungssprung wieder das Ruhemembranpotential von -75 mV eingestellt. Sechshundert Millisekunden nach dem Spannungssprung wurde der Lichtreiz eingeschaltet (Dauer 400 ms) und die Stromantwort gemessen. Die Amplituden der Ströme wurden als Funktion des Haltepotentials aufgetragen und die Meßpunkte wurden zu einer durchgehenden Kurve verbunden (Strom-Spannungskurve). Der Schnittpunkt der Strom-Spannungskurve mit der x-Achse wurde als das Umkehrpotential des lichtinduzierten Stroms bezeichnet. Je größer die Steilheit der Strom-Spannungskurve, desto größer war die lichtinduzierte Leitfähigkeit der Ganglienzellmembran. Das Verhältnis von synaptischer Hemmung und Erregung bei einem Lichtreiz wurde anhand des Umkehrpotentials bestimmt. Je näher das Umkehrpotential des lichtinduzierten Stroms am Umkehrpotential für unspezifische Kationenströme liegt (0 mV), desto größer war der Anteil hemmender synaptischer Ströme an der Lichtantwort. Je näher das Umkehrpotential des lichtinduzierten Stroms am Umkehrpotential für Chloridionenströme liegt (-55 mV oder -45 mV), desto größer war der Anteil hemmender synaptischer Ströme an der Lichtantwort.

3. Ergebnisse

Es gibt in der Kaninchenretina 15-20 verschiedene Ganglienzelltypen, welche anhand ihres Reizantwortverhaltens unterschieden werden können. In der begrenzten Zeitspanne einer Patch-Clamp-Messung (im Schnitt 30-45 Minuten) ist es sehr schwierig, das Reizantwortverhalten der Zelle im Detail zu charakterisieren. Deshalb wurden die Messungen auf das folgende Basisprogramm beschränkt. Insgesamt wurde die lichtinduzierten Reizantworten von 105 retinalen Ganglienzellen untersucht. Zu Beginn der Messung wurden lichtinduzierte Ströme bei einem Haltepotential von -75 mV gemessen. Durch Reizung mit kleinen Lichtpunkten wurde der Retinaort der maximalen Empfindlichkeit der Ganglienzelle bestimmt (Kapitel 2.10.1). Dann wurde die Zelle mit einem kreisförmigen Lichtreiz und einem kreisförmigen Dunkelreiz ($d = 100 \mu\text{m}$) stimuliert. Anhand dieser Reizantwort wurden die Zellen in drei physiologische Gruppen eingeteilt: ON-Zentrum-Ganglienzellen, OFF-Zentrum-Ganglienzellen und ON/OFF-Zentrum-Ganglienzellen. Die Dauer zwischen dem Beginn des Lichtreizes und dem Einsetzen der Lichtantwort (Latenz) betrug bei den gewählten Leuchtdichte etwa 60-80 ms in guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten für die Säuger-Netzhaut (Bolz *et al.*, 1982).

Die Ganglienzellen wurden von ektopischen Amakrinzellen anhand der in Kapitel 2.5 erläuterten Kriterien unterscheiden. Um bei Patch-Clamp-Messungen im Ganzzellmodus den Meßfehler aufgrund eines schlechten ‚space-clamp‘ (Velte und Miller, 1996) zu reduzieren und die synaptischen Ströme von spannungsgesteuerten Ströme zu isolieren, wurde bei allen die spannungsaktivierten Na^+ -Ionenkanäle mit QX-314 (Connors und Prince, 1982) und die spannungsaktivierten K^+ -Ionenkanäle mit TBA (Tetrabutylammonium) (Cohen, 1998) blockiert. Um den Fehler zusätzlich zu begrenzen, wurde nur an Zellen in der Nähe des Streifens höchster Ganglienzelldichte gemessen. Die Zellen hatten typischerweise einen Dendritenbaumdurchmesser von weniger als $400 \mu\text{m}$.

3.1. Morphologie retinaler Ganglienzellen

Einige der Ganglienzellen, von denen in den folgenden Abschnitten Ergebnisse gezeigt wurden sind in Abbildung 17 abgebildet. Die Zellen wurden während der Messung mit Neurobiotin gefüllt und die Axone und Dendriten mit Hilfe einer DAB-Reaktion sichtbar gemacht (Kapitel 2.6.1). Etwa 50 % aller gemessenen Zellen konnten auf diese Weise morphologisch identifiziert werden. Durch direkte Messung am Mikroskop wurde die Ebene bestimmt, in der sich die Dendriten dieser Zellen verzweigen (Stratifizierungsebene).

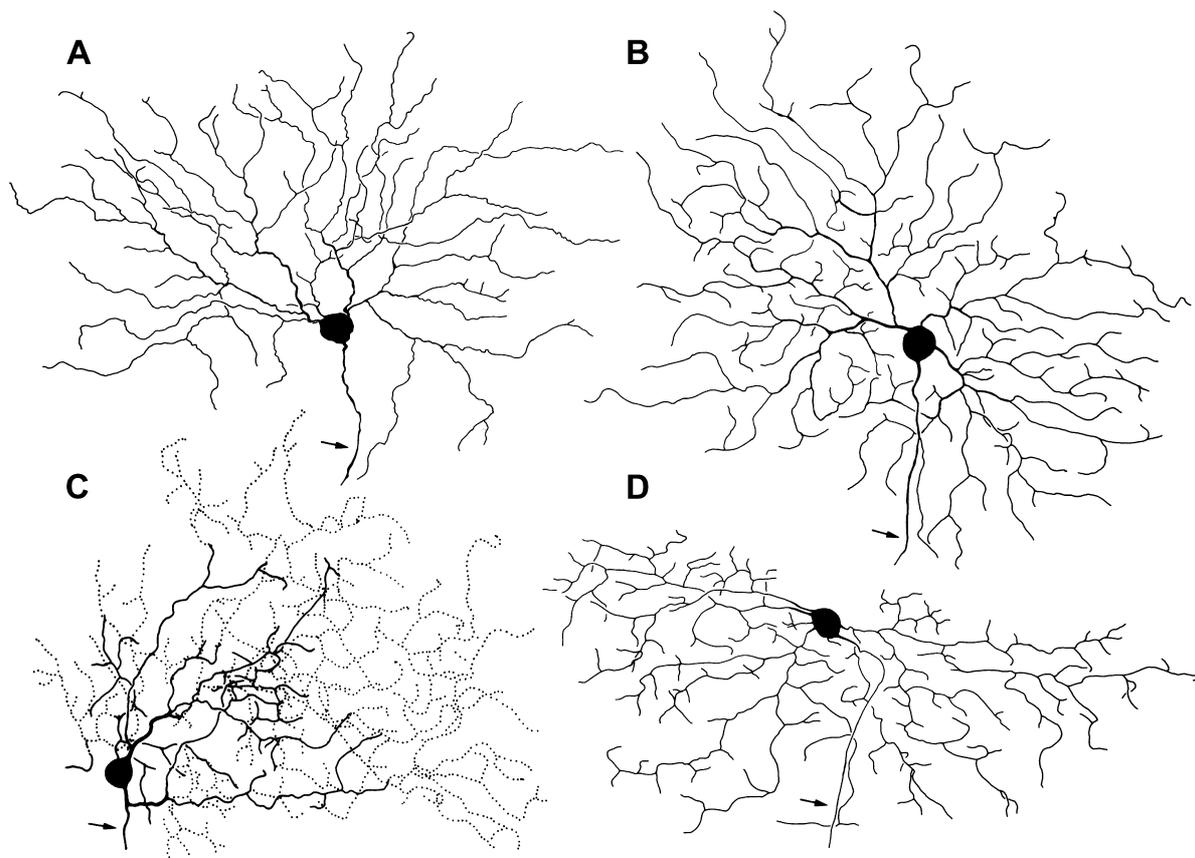


Abbildung 17: Zeichnungen von vier verschiedenen Ganglienzellen einer isolierten, intakten Kaninchennetzhaut in der Aufsicht. Während der Messung wurden die Zellen mit Neurobiotin gefüllt und konnten mittels einer DAB-Reaktion sichtbar gemacht werden. Die Axone sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Horizontale Achse der Abbildung ist parallel zum Streifen höchster Ganglienzelldichte. **A**, ON- α -Ganglienzelle aus dem Bereich höchster Ganglienzelldichte. Messungen an dieser Zelle sind in Abbildung 31 gezeigt. **B**, Ganglienzelle, welche große Ähnlichkeit mit der Delta-Ganglienzelle der Katze aufweist. Der Abstand dieser Zelle vom Bereich höchster Ganglienzelldichte (Exzentrizität) betrug 800 μm . Messungen an dieser Zelle sind in Abbildung 34 gezeigt. **C**, Bistratifizierte richtungsspezifische ON/OFF-Ganglienzelle. Die durchgezogen gezeichneten Dendriten dieser Zelle verzweigten sich in der inneren IPL, die gestrichelt gezeichneten Dendriten verzweigten sich 9 μm weiter außen. Die Zelle besaß eine Exzentrizität von 200 μm . Messungen an dieser Zelle sind in Abbildung 24 gezeigt. **D**, ‚Sluggish concentric‘-Ganglienzelle mit einer Exzentrizität von 1,2 mm. Messungen an dieser Zelle sind in Abbildung 20 gezeigt. Balken: 100 μm .

Die Ganglienzelle in Abbildung 17A lag im Streifen höchster Ganglienzelldichte und konnte physiologisch als ON-Zentrum-Ganglienzelle identifiziert werden. Die Zelle konnte anhand ihrer Dendritenbaummorphologie dem α -Ganglienzelltyp zugeordnet werden (Peichl *et al.*, 1987a; Peichl *et al.*, 1987b; Amthor *et al.*, 1989a; Amthor *et al.*, 1989b) und verzweigte in der inneren IPL. Die Ganglienzelle in Abbildung 17B besaß einen Delta-Ganglienzellartigen Dendritenbaum (Pu und Amthor, 1990a; Wässle und Boycott, 1991) und verzweigte in der äußeren IPL. Die Zelle wurde physiologisch als OFF-Zentrum-Ganglienzelle identifiziert und besaß eine Exzentrizität von 800 μm (Abstand vom Streifen höchster Ganglienzelldichte).

Die Ganglienzelle in Abbildung 17C besaß einen Dendritenbaum, der sich in zwei Ebenen verzweigte, und konnte morphologisch als richtungsspezifische ON/OFF-Ganglienzelle (Amthor *et al.*, 1989a; Vaney, 1994) identifiziert werden. Die Zelle besaß eine Exzentrizität von 200 μm und wurde physiologisch als ON/OFF-Ganglienzelle klassifiziert. Die durchgezogen gezeichneten Dendriten dieser Zelle verzweigten sich in der inneren IPL, die gestrichelt gezeichneten Dendriten verzweigten sich 9 μm weiter außen. Die Zelle in Abbildung 17D ist vergleichbar mit Ganglienzellen, welche von Amthor und Mitarbeitern (1989a) als ‚sluggish concentric cells‘ bezeichnet wurden. Die Zelle wurde physiologisch als ON-Zentrum-Ganglienzelle identifiziert, lag in der unteren Retina (Exzentrizität 1,2 mm) und die Dendriten verzweigten sich in der inneren IPL.

3.2. Reizung mit kleinen Lichtpunkten

Zu Beginn der Messung wurde der Nullpunkt des Lichtreizsystems auf den Zellkörper zentriert.

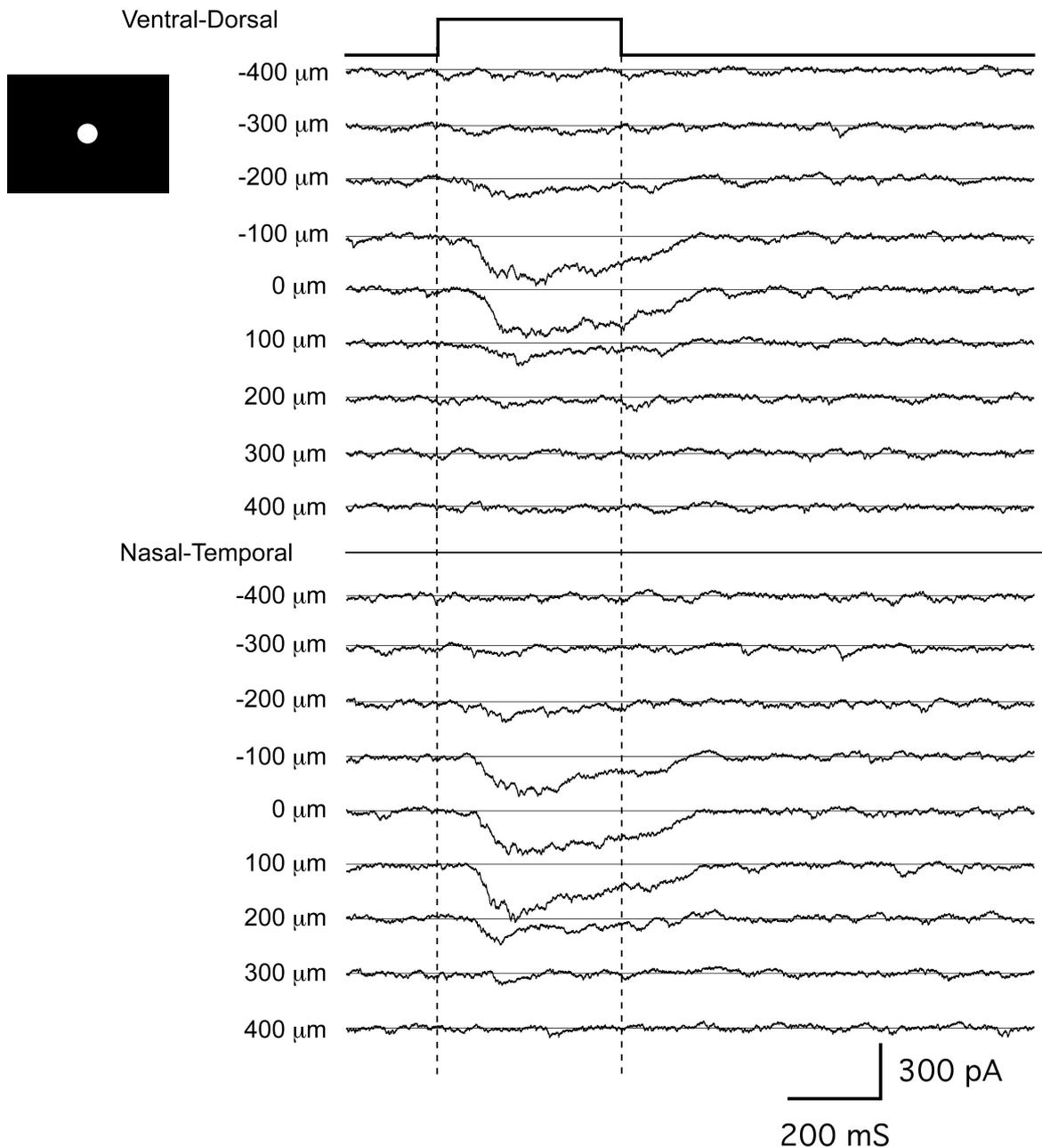


Abbildung 18: Lichtinduzierte Ströme einer retinalen Ganglienzelle, welche mit einem kleinen kreisförmigen Lichtreiz ($d=100\mu\text{m}$) an verschiedenen Retinaorten gereizt wurde. Der zeitliche Ablauf der Lichtreizung ist oberhalb der Registrierungen gezeigt (Dauer 400 ms). Auf der linken Seite sind die Abstände des Lichtreizes vom Zentrum des Bildschirms in ventro-dorsaler und in naso-temporaler Richtung aufgetragen. In ventro-dorsaler Richtung war die Lichtantwort der Zelle im Nullpunkt am größten, in naso-temporaler Richtung bei $100\mu\text{m}$ Entfernung vom Nullpunkt (in temporaler Richtung). $V_h = -75\text{ mV}$

Durch die Reizung mit kleinen Lichtpunkte („small spot mapping“) wurde untersucht, ob der Mittelpunkt des Bildschirms (Nullpunkt des Stimulussystems) mit dem Ort der maximalen Empfindlichkeit der Ganglienzelle übereinstimmt.

In Abbildung 18 sind die lichtinduzierten Ströme einer Ganglienzelle, welche mit einem kreisförmigen Lichtreiz ($d = 100 \mu\text{m}$) stimuliert wurde, gezeigt. Der Kurve, welche den Verlauf des Lichtreizes angibt, befindet sich oberhalb der Registrierungen (Dauer 400 ms). Während der Messung wurde die Zelle auf ein Haltepotential von $V_h = -75 \text{ mV}$ geklemmt. Das E_{Cl} betrug bei dieser Messung -55 mV . Die gezeigten Einwärtsströme waren somit eine Überlagerung von erregenden und hemmenden synaptischen Strömen. Links sind die Abstände des Lichtreizes von der Bildschirmmitte in ventro-dorsaler und in naso-temporaler Richtung angegeben. In ventro-dorsaler Richtung ist der lichtinduzierte Strom im Nullpunkt am größten. Die Antwortstärke ist nicht symmetrisch zum Nullpunkt. Bei einer Reizung der Zelle $100 \mu\text{m}$ in dorsaler Richtung war die Antwort deutlich geringer als für $100 \mu\text{m}$ in ventraler Richtung. In naso-temporaler Richtung war der lichtinduzierte Strom bei einer Entfernung von $100 \mu\text{m}$ in temporaler Richtung am größten. Der lichtinduzierte Strom der Zelle war jedoch für den Nullpunkt größer als für einen Abstand von $200 \mu\text{m}$ in temporaler Richtung.

Die übertragenen Ladungen der lichtinduzierten Ströme aus Abbildung 18 wurden wie in Kapitel 2.10.1 beschrieben gemessen. In Abbildung 19 sind die Meßwerte auf die maximale Antwort normiert und für jede Richtung in Abhängigkeit vom Abstand zum Nullpunkt dargestellt. Durch die Meßpunkte wurden zwei Gaußfunktionen gelegt. Die Gaußfunktion durch die Meßpunkte in ventro-dorsaler Richtung ist durch eine durchgezogene Kurve dargestellt. Die Gaußfunktion durch die Meßpunkte in naso-temporaler Richtung ist durch eine gestrichelte Kurve dargestellt. Die gepunkteten, vertikalen Linien gehen durch die Maxima der Gaußfunktionen. Das Maximum in dorso-ventraler Richtung ist $-41 \mu\text{m}$ vom Nullpunkt entfernt. Der für die übertragenen Ladungen gemessene Maximalwert in dorso-ventraler Richtung betrug etwa 90 % des mit errechneten Maximalwertes (Kapitel 2.10.1). Die charakteristische Breite betrug $120 \mu\text{m}$. Das Maximum in naso-temporaler Richtung war $28 \mu\text{m}$ vom Nullpunkt entfernt. Der für die übertragenen Ladungen gemessene Maximalwert betrug etwa 95 % des errechneten Maximalwertes. Die charakteristische Breite betrug $168 \mu\text{m}$.

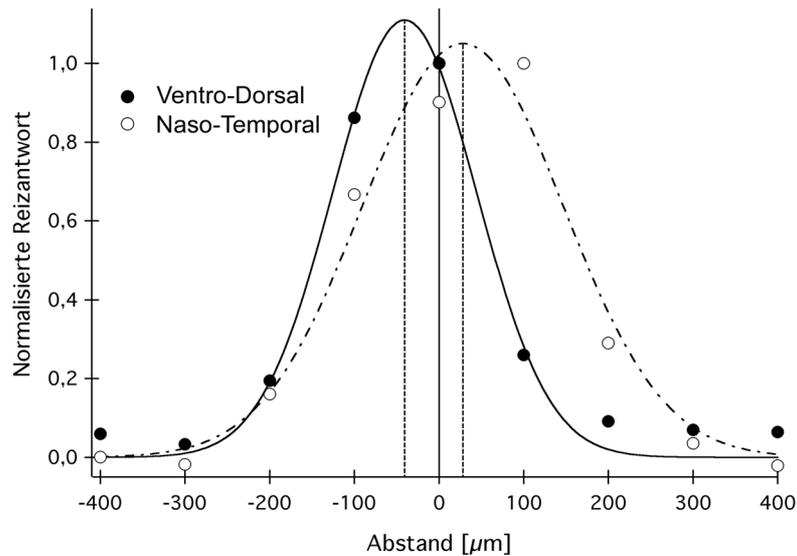


Abbildung 19: Die Reizung mit kleinen Lichtpunkten. Die übertragenen Ladungen der lichtinduzierten Ströme aus Abbildung 18 wurden für jede Richtung gemessen. Die Meßwerte in ventro-dorsaler Richtung (●) und naso-temporaler (○) Richtung wurden auf das Maximum normiert und in Abhängigkeit des Abstandes vom Nullpunkt dargestellt. Die durchgezogene Kurve (—) stellt die Gaußfunktion, welche durch die Meßpunkte in ventro-dorsaler Richtung gelegt wurde, dar. Die gestrichelte Kurve (----) stellt die Gaußfunktion, welche durch die Meßpunkte in naso-temporaler Richtung gelegt wurde, dar. Die gestrichelten Linien sind die Symmetrieachsen der Gaußfunktionen und gehen durch die Maxima. $V_h = -75 \text{ mV}$.

Das rezeptive Feld der Zelle ist somit nicht exakt rund sondern ellipsoid. Weil das Maximum der Gaußfunktionen nicht bei Null lag wurde der Nullpunkt des Stimulussystems neu eingestellt. Alle im weiteren Verlauf des Experiments verwendeten Lichtreize waren auf den neuen Nullpunkt zentriert.

3.3. Flächen-Variations-Messungen

Ein einfaches Reizprotokoll um das rezeptive Feld retinaler Ganglienzellen zu charakterisieren ist die Flächen-Variations-Messung (Kapitel 2.10.2). Dabei wird die Zelle durch kreisförmige Licht- oder Dunkelreize unterschiedlicher Durchmesser stimuliert. Die übertragene Ladung, die phasische und die tonische Amplitude des lichtinduzierten Stroms wurde gemessen und in Abhängigkeit vom Lichtreizdurchmesser aufgetragen. Der zeitliche Verlauf der lichtinduzierten hemmenden und erregenden Ströme wurde in der vorliegenden Arbeit nicht ausgewertet. Dadurch werden einige Eigenschaften der lateralen Hemmung der Ganglienzelle nicht berücksichtigt, was aber nicht entscheidend ist, denn Merwine und Mitarbeiter zeigten, daß trotz der großen Vielfalt der Ganglienzellen, die Mechanismen der Umfeldhemmung in der Kaninchennetzhaut qualitativ gleich sind (Merwine *et al.*, 1995).

3.3.1. ON-Zentrum-Ganglienzelle

In Abbildung 20 ist die Flächen-Variations-Messung einer ON-Zentrum-Ganglienzelle gezeigt (gleiche Zelle wie Abbildung 17 D). Die lichtinduzierten Ströme wurden bei einem Haltepotential von -75 mV gemessen. Bei einem Haltepotential von $V_h = -75$ mV war der gemessene, einwärts gerichtete Strom eine Überlagerung aus erregendem und hemmendem Strom.

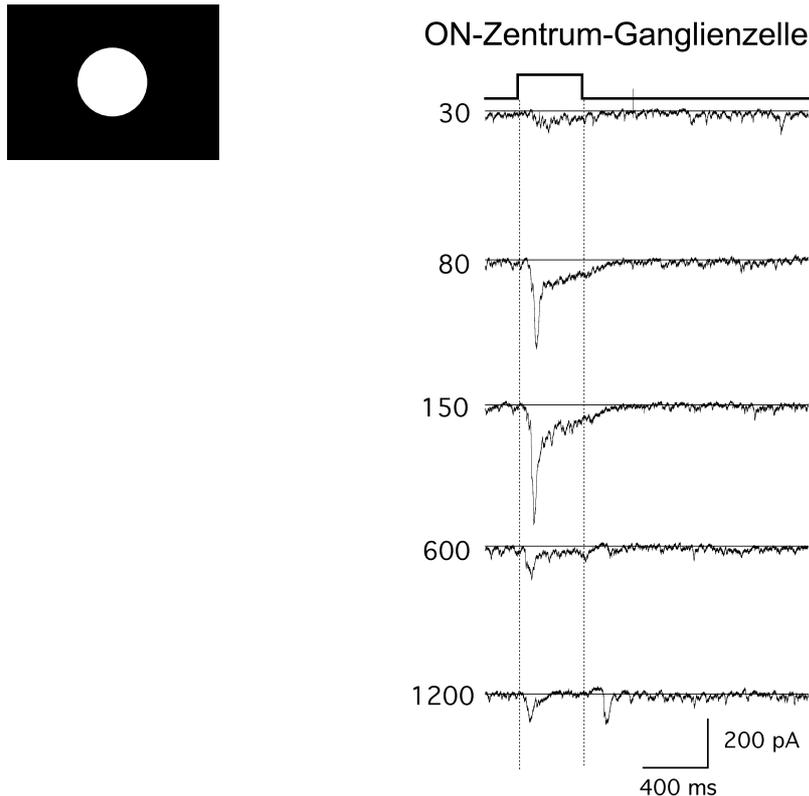


Abbildung 20: Flächen-Variations-Messung. Die lichtinduzierten Ströme einer phasischen ON-Zentrum-Ganglienzelle wurden bei einem Haltepotential von -75 mV gemessen. Die Zelle wurde durch kreisförmige Lichtreize für jeweils 400 ms stimuliert. Der zeitliche Ablauf der Lichtreizung ist oberhalb der Registrierungen gezeigt. Auf der linken Seite der jeweiligen Registrierung sind die Durchmesser der kreisförmigen Lichtreize angegeben (in μm). Zunächst nahmen die phasische und die tonische Amplitude stetig mit Durchmesser des Lichtreizes zu (hier bis 150 μm). Bei größeren Lichtreizdurchmessern nahm die Amplitude der lichtinduzierten Ströme wieder ab. Bei kleinen Durchmessern war der Zeitverlauf des lichtinduzierten Stroms tonisch. Aus diesem Grund war sehr schwer, für kleine Durchmesser die phasischen und die tonischen Amplituden getrennt zu messen. Bei größeren Durchmessern wurde zusätzlich ein einwärts gerichteter Strom beim Ausschalten des Lichtreizes gemessen (OFF-Antwort).

Die Lichtreize wurde alle 2 Sekunden auf den Retinaort der maximalen Empfindlichkeit der Zelle projiziert. Bei kleinen Lichtreizdurchmessern war der Zeitverlauf des lichtinduzierten Stroms tonisch, für große Lichtreizdurchmesser phasisch. Dadurch war es bei kleinen

Lichtreizdurchmessern schwierig, die phasische und die tonische Amplitude unabhängig voneinander zu messen. Bei größeren Durchmessern konnten phasische und tonische Amplitude unabhängig voneinander gemessen werden. Bei Lichtreizdurchmessern, größer als $600\ \mu\text{m}$, wurde ein einwärts gerichteter Strom beim Ausschalten des Lichtreizes gemessen. Die Amplitude des lichtinduzierten Stroms beim Einschalten des Lichtreizes wuchs zunächst stetig mit dem Lichtreizdurchmesser an, hatte ein Maximum bei etwa $150\text{-}200\ \mu\text{m}$ und nahm bei größeren Durchmesser wieder ab. Diese Abnahme wird durch laterale Hemmung in der Netzhaut verursacht.

3.3.2. Auswertung der Flächen-Variations-Messung der ON-Zentrum-Ganglienzelle

Die lichtinduzierten Ströme aus Abbildung 20 wurden, wie in Kapitel 2.10.1 beschrieben, ausgewertet. In Abbildung 21 sind die übertragene Ladung, phasische Amplitude und tonische Amplitude in Abhängigkeit vom Lichtreizdurchmesser aufgetragen. Um die Flächen-Variations-Kurven besser vergleichen zu können, wurden sie jeweils auf den Maximalwert normiert.

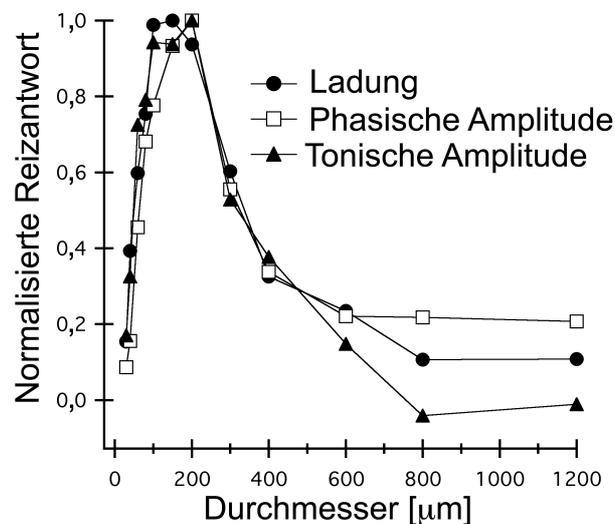


Abbildung 21: Die Flächen-Variations-Kurve. In dem Diagramm sind die Reizantwortstärken einer phasischen ON-Zentrum-Ganglienzelle in Abhängigkeit vom Lichtreizdurchmesser aufgetragen. Die übertragene Ladung, die phasische und die tonischen Amplituden der lichtinduzierten Ströme aus Abbildung 20 wurden gemessen und jeweils auf den Maximalwert normiert. Die phasische und die tonische Amplitude besaßen ein Maximum bei einem Lichtreizdurchmesser von $200\ \mu\text{m}$, die übertragene Ladung bei $150\ \mu\text{m}$. Die Flächen-Reizantwort-Kurve nahm bei größeren Lichtreizdurchmessern ab. $V_h = -75\ \text{mV}$.

Die Reizantwortstärke wuchs zunächst stetig mit dem Lichtreizdurchmesser an, hatte ein Maximum bei etwa $150\ \mu\text{m}\text{-}200\ \mu\text{m}$ und nahm bei größeren Durchmesser wieder ab. Die

Verringerung der Flächen-Variations-Kurve für große Durchmesser wird durch laterale Hemmung in der Netzhaut verursacht. Ohne laterale Hemmung würden die Antworten dem Ricco'schen Gesetz folgen (Hurvich und Jameson, 1966). Aus Abbildung 21 geht hervor, daß die phasische Amplitude weniger stark durch laterale Hemmung verringert wird als die tonische Amplitude. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die laterale Hemmung gegenüber der Erregung verzögert einsetzt.

3.3.3. OFF-Zentrum-Ganglienzelle

In Abbildung 22 ist die Flächen-Variationskurve einer OFF-Ganglienzelle gezeigt.

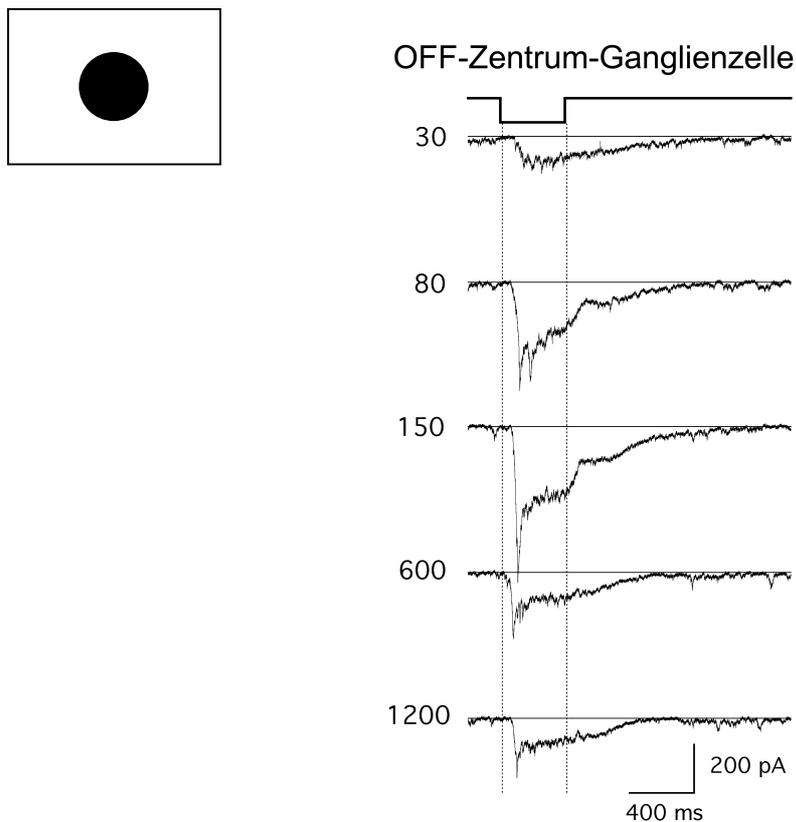


Abbildung 22: Flächen-Variations-Messung. Die durch einen Dunkelreiz induzierten Ströme einer tonischen OFF-Zentrum-Ganglienzelle wurden bei einem Haltepotential von -75 mV gemessen. Die Zelle wurde durch kreisförmige Dunkelreize für jeweils 400 ms stimuliert. Der zeitliche Ablauf der Dunkelreizung ist oberhalb der Registrierungen gezeigt. Auf der linken Seite der jeweiligen Registrierung sind die Dunkelreizdurchmesser angegeben (in μm). Zunächst nahmen die phasische und die tonische Amplitude stetig mit Lichtreizdurchmesser zu (hier bis 150 μm). Bei größeren Dunkelreizdurchmessern nahm die Amplitude wieder ab. Der zeitliche Verlauf des Stroms war bei allen Dunkelreizdurchmessern phasisch/tonisch. Bei allen Durchmessern wurde ein einwärts gerichteter Strom beim Ausschalten des Dunkelreizes gemessen (OFF-Antwort).

Die durch einen Dunkelreiz induzierten Ströme wurden bei einem Haltepotential von $V_h = -75$ mV gemessen. Bei $V_h = -75$ mV war der gemessene, einwärts gerichtete Strom eine

Überlagerung aus erregendem und hemmendem Strom. Bei allen Dunkelreizdurchmessern war der zeitliche Verlauf des durch einen Dunkelreiz induzierten Stroms phasisch/tonisch. Beim Ausschalten des Dunkelreizes wurde bei allen Durchmessern ein einwärts gerichteter Strom gemessen. Die Amplitude beim Einschalten des Dunkelreizes wuchs zunächst stetig mit dem Dunkelreizdurchmesser an, hatte ein Maximum bei etwa $150\ \mu\text{m}$ und nahm bei größeren Durchmessern wieder ab. Bei kleinen Dunkelreizdurchmessern war es schwierig, die phasische und die tonische Amplitude unabhängig voneinander zu messen.

3.3.4. Auswertung der Flächen-Variations-Messung der OFF-Zentrum-Ganglienzelle

In Abbildung 23 sind die übertragene Ladung, sowie die phasische und die tonische Amplitude in Abhängigkeit vom Dunkelreizdurchmesser aufgetragen.

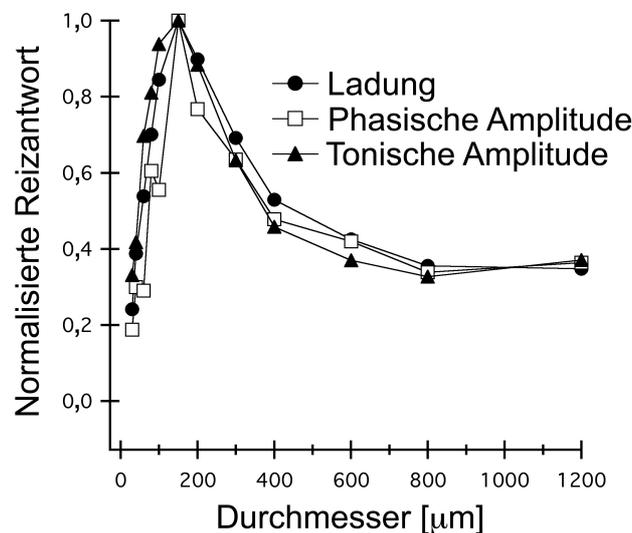


Abbildung 23 Die Flächen-Variations-Kurve. In dem Diagramm sind die Reizantwortstärken einer phasisch/tonischen OFF-Zentrum-Ganglienzelle in Abhängigkeit vom Dunkelreizdurchmesser aufgetragen. Die übertragene Ladung sowie die phasischen und die tonischen Amplituden der durch einen Dunkelreiz induzierten Ströme aus Abbildung 22 wurden gemessen und jeweils auf den Maximalwert normiert. Die phasische und tonische Amplitude sowie die übertragene Ladung besitzen ihr Maximum bei einem Dunkelreizdurchmesser von $150\ \mu\text{m}$. Die Flächen-Reizantwort-Kurve nimmt bei größeren Dunkelreizdurchmessern ab. $V_h = -75\ \text{mV}$.

Um die Flächen-Variations-Kurven besser vergleichen zu können, wurden sie jeweils auf den Maximalwert normiert. Die Abhängigkeit der Reizantwortstärke vom Dunkelreizdurchmesser ist für die phasische und die tonische Amplitude sowie für die übertragene Ladung ähnlich. Die Reizantwortstärke wuchs zunächst stetig mit dem Dunkelreizdurchmesser an, hatte ein Maximum bei etwa $150\ \mu\text{m}$ und nahm bei größeren Durchmessern wieder ab. Bei dieser Zelle nahmen die phasischen und die tonischen Amplituden um den gleichen Anteil ab. Dies ist ein

Hinweis darauf, daß Erregung und Hemmung gleichzeitig einsetzen. Die Flächen-Variations-Kurven von retinalen Ganglienzellen konnten im Ganzzellmodus der Patch-Clamp-Technik bei einem Haltepotential von -75 mV gemessen werden. Dabei wurden der phasische und der tonische Anteil der Amplitude sowie die übertragene Ladung der lichtinduzierten Ströme gemessen und in Abhängigkeit vom Stimulusdurchmesser dargestellt. Charakteristisch für die Flächen-Variations-Kurven retinaler Ganglienzellen ist die positive Steigung für kleine Durchmesser, ein schmales Maximum sowie eine negative Steigung bei großen Durchmessern. Der Verlauf der gezeigten Flächen-Variations-Kurven ist repräsentativ für alle 105 Ganglienzellen. Das Maximum der Flächen-Variations-Kurven der gemessenen Zellen lag zwischen 100 μm und 400 μm .

Die Abnahme der Flächen-Variations-Kurve von Ganglienzellen wird durch laterale Hemmung in der Netzhaut verursacht. Aus der Messung der Flächen-Reizantwort-Kurve geht allerdings nicht hervor, ob die Zelle durch laterale Hemmung direkt oder indirekt gehemmt wird.

3.4. Die Strom-Spannungskurven lichtinduzierter Ströme

Um festzustellen, ob laterale Hemmung die Ganglienzelle direkt hemmt, wurde untersucht, ob hemmende synaptische Ströme mit dem Lichtreizdurchmesser zunehmen. Ein Maß für das Verhältnis von synaptischer Erregung und Hemmung ist das Umkehrpotential des lichtinduzierten Stroms. Mit Hilfe von Strom-Spannungskurven (Kapitel 2.10.3) konnte das Umkehrpotential von lichtinduzierten Strömen bei verschiedenen Lichtreizdurchmessern gemessen werden.

In Abbildung 24 sind die lichtinduzierten Ströme einer richtungsspezifischen ON/OFF-Ganglienzelle bei verschiedenen Haltepotentialen (-105, -75, -55, -5, +25 mV) gezeigt. Die Morphologie der Zelle ist in Abbildung 17C abgebildet. Die Zelle wurde mit kreisförmigen Lichtreizen (Durchmesser 50, 200, 1000 μm) bzw. mit einem ringförmigen Lichtreiz (200 μm Innendurchmesser, 1000 μm Außendurchmesser) stimuliert. Die phasischen Amplituden wurde durch Mittelung in dem Bereich der Registrierung, welcher durch die vertikalen durchgezogenen Linien begrenzt ist, errechnet, die tonischen Amplituden durch Mittelung in dem Bereich der Registrierung, welcher durch die gestrichelten Linien begrenzt ist. Der zeitliche Verlauf der lichtinduzierten Ströme der richtungsspezifischen ON/OFF-Ganglienzelle war deutlich verschieden von dem der ON-Zentrum-Ganglienzelle in Abbildung 20 und dem der OFF-Zentrum-Ganglienzelle in Abbildung 22. Bereits für kleine Lichtreizdurchmesser bei einem Haltepotential von -75 mV, zeigte die Zelle in Abbildung 24

einen Einwärtstrom beim Ein- und Ausschalten des Lichtreizes. Dies ist die typische Lichtantwort von ON/OFF-Ganglienzellen. Dadurch, daß ihr Dendritenbaum in zwei Ebenen der IPL verzweigt ist, erhalten sie erregende Synapsen von ON- und OFF-Bipolarzellen. Die Ganglienzelle wurde nicht mit bewegten Lichtreizen stimuliert, weshalb die bevorzugte Bewegungsrichtung der Ganglienzelle nicht bestimmt werden konnte.

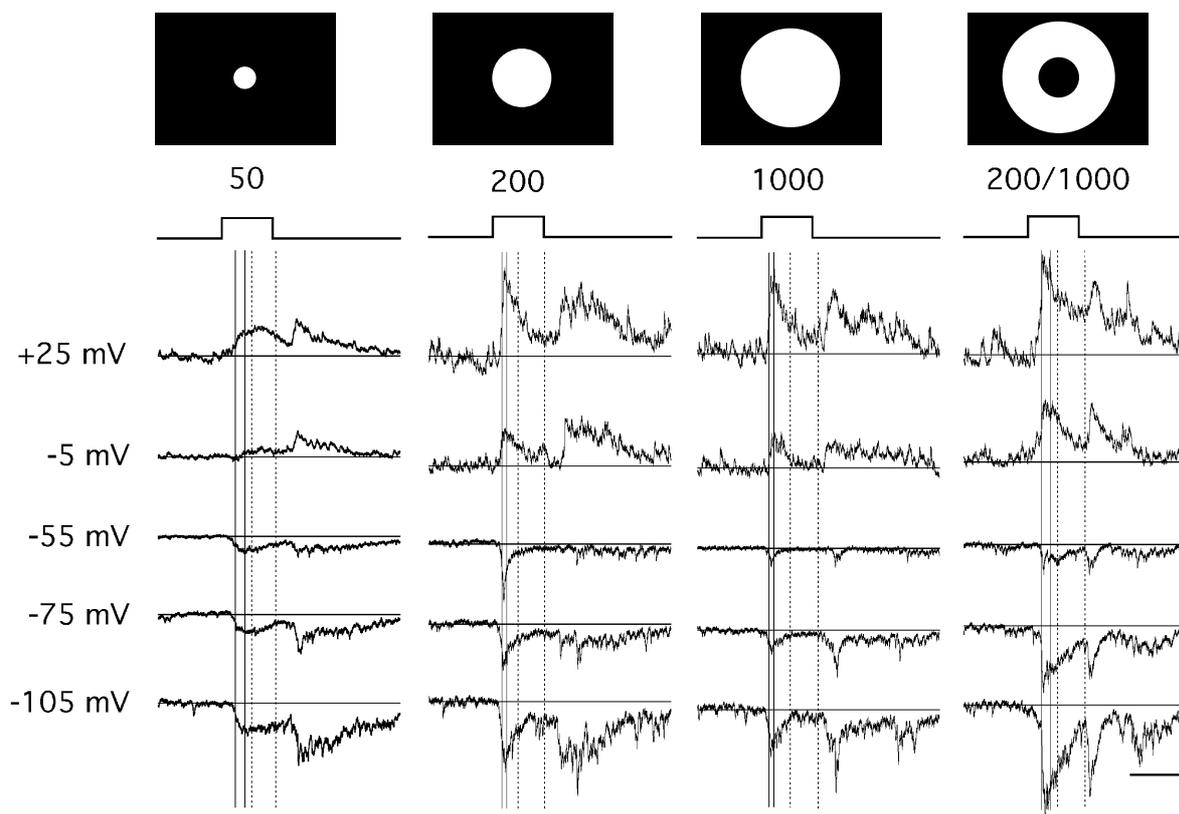


Abbildung 24: Lichtinduzierte Ströme einer richtungsspezifischen ON/OFF-Ganglienzelle bei verschiedenen Haltepotentialen. Die Zelle wurde durch kreisförmige Lichtreize ($d = 50, 200, 1000 \mu\text{m}$) und einem ringförmigen Lichtreiz ($200 \mu\text{m}$ Innendurchmesser/ $1000 \mu\text{m}$ Außendurchmesser) für jeweils 400 ms stimuliert. Der zeitliche Ablauf der Lichtreizung ist oberhalb der Registrierungen gezeigt. Auf der linken Seite sind die eingestellten Haltepotentiale angegeben. Die phasischen Amplituden wurden durch Mittelung in dem Bereich der Registrierung, welcher durch die vertikalen durchgezogenen Linien begrenzt ist, errechnet, die tonischen Amplituden durch Mittelung in dem Bereich der Registrierung, welcher durch die gestrichelten Linien begrenzt ist.

Für jeden Lichtreiz wurde der lichtinduzierte Strom der Zelle bei sechzehn Haltepotentialen ($\Delta V = 10 \text{ mV}$) zwischen -105 mV und $+45 \text{ mV}$ gemessen. In Abbildung 25 sind jeweils die phasischen und tonischen Amplituden der Ströme in Abhängigkeit vom Haltepotential aufgetragen (Strom-Spannungskurve). Für jeden Lichtreiz wurde die Strom-Spannungskurve gemessen und das Umkehrpotential bestimmt. Bei kleinen Lichtreizdurchmessern ($50 \mu\text{m}$)

betrug das Umkehrpotential der phasischen Amplitude 0 mV. Mit zunehmenden Lichtreizdurchmessern (200 μm und 1000 μm) wurde das Umkehrpotential negativer (-25 mV und -37 mV). Das Umkehrpotential eines ringförmiger Lichtreizes (200 μm Innendurchmesser/1000 μm Außendurchmesser) war noch negativer (-46 mV). Die Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativen Werten konnte auch für die tonische Amplitude gemessen werden. Bei kleinen Lichtreizdurchmessern war das Umkehrpotential der tonischen Amplitude jedoch negativer als das Umkehrpotential der phasischen Amplitude.

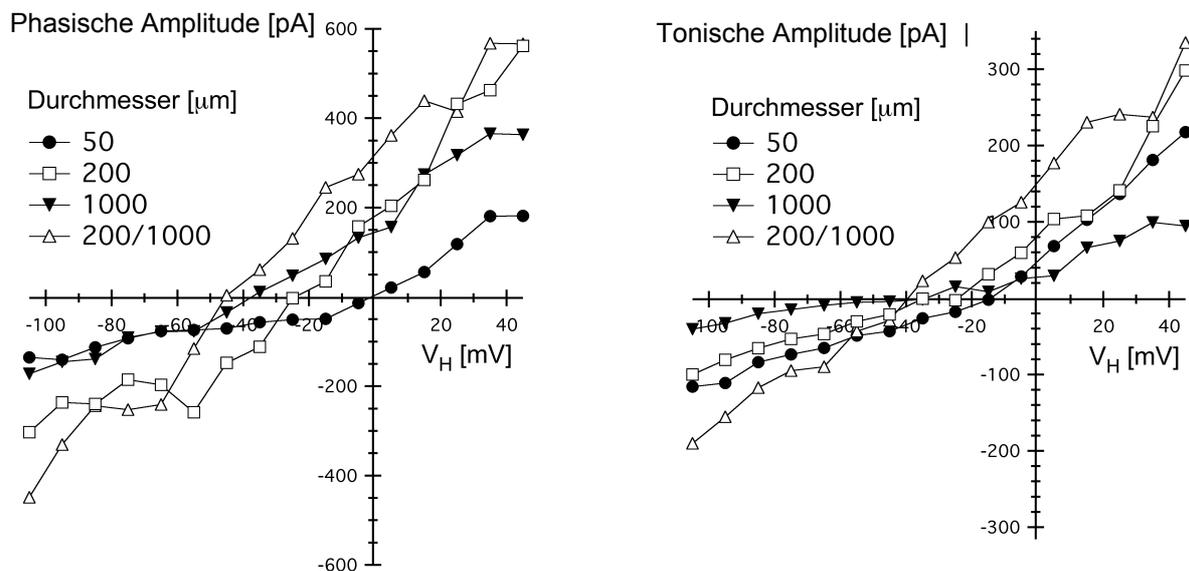


Abbildung 25: Strom-Spannungskurven lichtinduzierter Ströme einer richtungsspezifischen ON/OFF-Ganglienzelle. Die Zelle wurde mit kreisförmigen Lichtreizen (Durchmesser 50, 200, 1000 μm) bzw. mit einem ringförmigen Lichtreiz (200 μm Innendurchmesser, 1000 μm Außendurchmesser) stimuliert. Links wurden die phasischen Amplituden und rechts die tonischen Amplituden der lichtinduzierten Ströme in Abhängigkeit vom Haltepotential aufgetragen. Sowohl bei den phasischen als auch bei den tonischen Amplituden wurde das Umkehrpotential mit wachsendem Durchmesser negativer. Die Registrierungen der ringförmigen Lichtreize waren am weitesten in den negativen Bereich verschoben.

Bei kleinen Lichtreizdurchmessern war das Umkehrpotential sehr nahe bei 0 mV, dem Umkehrpotential unspezifischer Kationenströme. Mit wachsendem Lichtreizdurchmesser wurde der Beitrag hemmender Chloridionenströme zum lichtinduzierten Strom größer und das Umkehrpotential wurde negativer. Die Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativen Werten deutet auf eine Änderung des Verhältnisses von synaptischer Erregung und Hemmung hin. Eine solche Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativen Werten mit wachsendem Durchmesser wurde bei 55 von 65 Zellen gefunden.

Dieser Versuch zeigt, daß große Lichtreize die Ganglienzelle direkt synaptisch hemmen. Das Verhältnis von erregendem und hemmendem synaptischen Strom ist vom Lichtreizdurchmesser abhängig. Das mehr negative Umkehrpotential der tonischen Amplitude für kleine Lichtreizdurchmesser ist ein Hinweis auf das verzögerte Einsetzen direkter lateraler Hemmung.

Die Verschiebung des Umkehrpotentials bei Reizung mit wachsenden Lichtpunkten zu negativen Werten könnte eventuell auch durch eine Sättigung mit wachsendem Licht, und damit Verminderung, des erregenden synaptischen Eingangs erklärt werden. Um abzusichern, daß die Verschiebung des Umkehrpotentials nicht durch die höhere Gesamtlichtmenge bei großen Lichtreizdurchmessern hervorgerufen wird, wurde die Intensitätsabhängigkeit des Umkehrpotentials untersucht.

3.5. Intensitätsabhängigkeit der Reizantwort

3.5.1. Intensitätsabhängigkeit des lichtinduzierten Stroms

Um festzustellen, ob die Intensität der verwendeten Lichtreize zu einer Sättigung der Ganglienzellantworten führt, wurde die Intensitätsabhängigkeit lichtinduzierter Ströme gemessen.

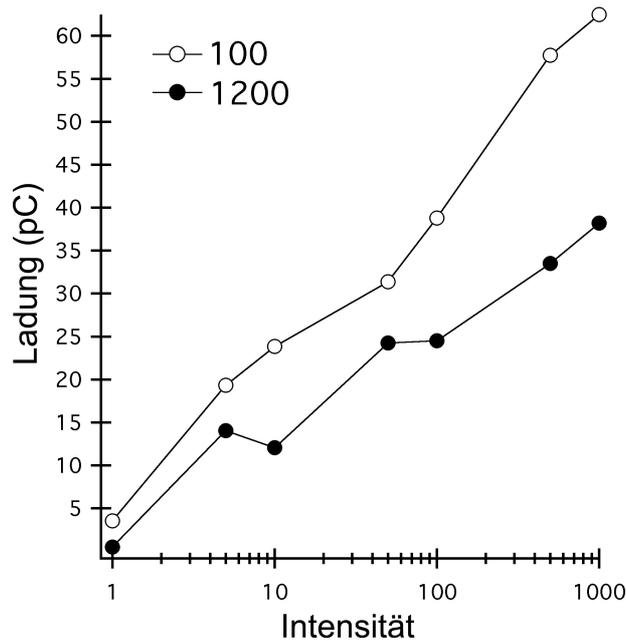
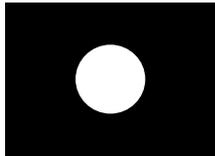


Abbildung 26: Die Intensitätsabhängigkeit der lichtinduzierten Ströme einer ON-Zentrum-Ganglienzelle. Die Zelle wurde mit kreisförmigen Lichtreizen ($d = 100 \mu\text{m}$, $1200 \mu\text{m}$) innerhalb eines Intensitätsbereiches von drei Zehnerpotenzen stimuliert. Die Dauer des Reizes betrug 400 ms. Die Intensitäten sind auf der Abszisse als relative Einheiten aufgeführt. Ein Intensitätswert von 1000 entsprach einer Leuchtdichte von $0,7 \text{ cd/m}^2$. Die übertragene Ladung des lichtinduzierten Stroms wurde gemessen und in Abhängigkeit von der Intensität in einer einfach logarithmischen Darstellung aufgetragen. Die übertragene Ladung nahm bei beiden Lichtreizdurchmessern mit wachsender Intensität gleichmäßig zu. Bei allen Intensitäten war die übertragene Ladung bei einem Lichtreizdurchmesser von $100 \mu\text{m}$ größer als bei einem Durchmesser von $1200 \mu\text{m}$. $V_h = -75 \text{ mV}$.

Dabei wurde eine ON-Zentrum-Ganglienzelle mit einem kreisförmigen Lichtreiz ($100 \mu\text{m}$ und $1200 \mu\text{m}$) innerhalb eines Intensitätsbereiches von drei Zehnerpotenzen stimuliert. Die Dauer des Lichtreizes betrug 400 ms. Die Intensitäten sind in Abbildung 26 auf der Abszisse als relative Einheiten aufgeführt. Ein Intensitätswert von 1000 entsprach einer Leuchtdichte von $0,7 \text{ cd/m}^2$. Die lichtinduzierten Ströme wurden bei einem Haltepotential von $V_h = -75 \text{ mV}$ gemessen. Bei $V_h = -75 \text{ mV}$ ist der einwärts gerichtete Strom eine Überlagerung aus

hemmenden und erregenden synaptischen Strömen. Die übertragene Ladung der lichtinduzierten Ströme wurde gemessen und in Abhängigkeit von der Intensität in einer einfach logarithmischen Darstellung aufgetragen (Abbildung 26). Die übertragene Ladung nahm bei beiden Lichtreizdurchmessern mit wachsender Intensität gleichmäßig zu. Das Intensitätsprofil der Ganglienzelle zeigte keine Sättigung oder Solarisation (Abnahme der Zellantwort bei einer Erhöhung der Lichtreizintensität). Um sicherzugehen, daß die Lichtreize die Zellen nicht in die Sättigung treiben, wurde für die meisten Experimente eine mittlere Leuchtdichte gewählt. Bei allen Intensitäten war die übertragene Ladung für Lichtreizdurchmesser von 100 μm größer als für Lichtreizdurchmesser von 1200 μm . Dies ist ein klares Indiz für die Unabhängigkeit der lateralen Hemmung von der absoluten Leuchtdichte (Merwine *et al.*, 1995).

3.5.2. Unabhängigkeit des Umkehrpotentials lichtinduzierter Ströme von der absoluten Intensität

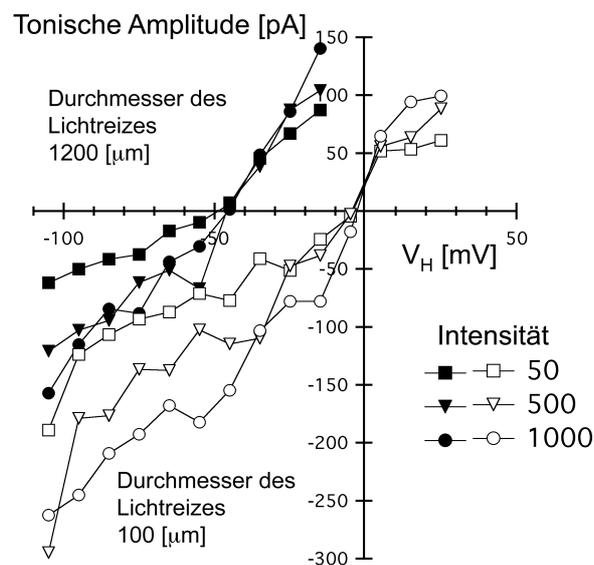
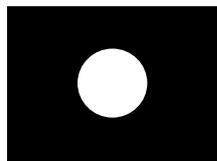


Abbildung 27: Unabhängigkeit des Umkehrpotentials lichtinduzierter Ströme von der absoluten Intensität. Eine ON-Zentrum-Ganglienzelle wurde mit kreisförmigen Lichtreizen ($d = 100 \mu\text{m}$, $1200 \mu\text{m}$) von 400 ms Dauer stimuliert. Die Strom-Spannungskurven wurden bei jedem Lichtreizdurchmesser mit drei verschiedenen Intensitäten (50, 500, 1000) gemessen. Die tonische Amplitude des lichtinduzierten Stroms wurde in Abhängigkeit vom Haltepotential aufgetragen. Das Umkehrpotential bei einem Lichtreizdurchmesser von 100 μm betrug etwa -5 mV. Bei einem Lichtreizdurchmesser von 1200 μm betrug es etwa -45 mV. Bei gegebenem Lichtreizdurchmesser wuchs mit der Intensität lediglich die Steigung der Strom-Spannungskurve. Änderungen des Umkehrpotentials der Stromantwort bei Änderungen der Intensität blieben unter 5 mV.

Es ist nicht auszuschließen, daß der erregende synaptische Eingang der Ganglienzelle ein anderes Intensitätsprofil besitzt als der hemmende Eingang. Um zu überprüfen, ob das Umkehrpotential von lichtinduzierten Strömen intensitätsunabhängig ist, wurden Strom-Spannungskurven bei verschiedenen Lichtreizintensitäten gemessen. Dabei wurden lichtinduzierte Ströme einer ON-Zentrum-Ganglienzelle (Kapitel 3.5.1) auf einen kreisförmigen Lichtreiz (100 μm und 1200 μm) bei relativen Intensitäten von (50, 500, 1000) gemessen. Die Dauer des Lichtreizes betrug 400 ms. Die tonische Amplitude des lichtinduzierten Stroms wurde gemessen und in Abhängigkeit vom Haltepotential aufgetragen (Abbildung 27). Bei einem Lichtreizdurchmesser von 100 μm beträgt das Umkehrpotential etwa -5 mV und änderte sich kaum ($\Delta V < 5$ mV) bei Erhöhung der Intensität. In Übereinstimmung mit Kapitel 3.4 besteht die Registrierung für kleine Lichtreize hauptsächlich aus unspezifischen Kationenströmen. Bei einem Lichtreizdurchmesser von 1200 μm hatte das Umkehrpotential einen Wert von etwa -45 mV. Eine Erhöhung der Intensität änderte das Umkehrpotential nur geringfügig ($\Delta V < 5$ mV). Durch Zunahme der Intensität wurde lediglich die Steilheit der Strom-Spannungskurve erhöht. Eine Zunahme der Steigung bedeutet, daß die Amplitude des lichtinduzierten Stroms insgesamt größer geworden ist. Die Unabhängigkeit des Umkehrpotentials von der Lichtintensität wurde in sieben von sieben Zellen gemessen.

Das Experiment zeigt, daß das Verhältnis von synaptischer Erregung und Hemmung unabhängig von der Reizintensität ist und ausschließlich vom Lichtreizdurchmesser bestimmt wird.

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß retinale Ganglienzellen durch Umfeldreize direkt gehemmt werden. Bisher wurde nicht untersucht ob bereits der erregende synaptische Eingang durch laterale Hemmung verringert wird. Dies bedeutet, daß die Zelle zusätzlich zur direkten Hemmung, durch präsynaptische Hemmung lateral gehemmt wird. Durch Flächen-Variationskurven des erregenden und hemmenden synaptischen Eingangs wurde dies in der vorliegenden Arbeit untersucht.

3.6. Flächen-Variations-Messung bei E_{Cl} und $E_{Na/K}$

Durch das Einstellen des Haltepotentials auf $V_h = -55 \text{ mV} = E_{Cl}$ und $V_h = 0 \text{ mV} = E_{Na/K}$ wurde versucht erregene und hemmende Ströme isoliert zu messen. In Abbildung 28 sind die lichtinduzierten Ströme einer ON-Zentrum-Ganglienzelle (gleiche Zelle wie Abbildung 20, Morphologie siehe Abbildung 17D) dargestellt. Die Zelle wurde bei Haltepotentialen von -75 mV , $-55 \text{ mV} = E_{Cl}$ und $0 \text{ mV} = E_{Na/K}$ durch einen kreisförmigen Lichtreiz ($d = 200 \mu\text{m}$) für die Dauer von jeweils 400 ms stimuliert. Die obere Registrierung in Abbildung 28 zeigt den hemmenden synaptischen Strom, welcher hauptsächlich durch GABAerge oder glyzinerge Amakrinzellen hervorgerufen wird. Die mittlere Registrierung in Abbildung 28 zeigt den erregenden synaptischen Strom, der hauptsächlich durch Bipolarzellen hervorgerufen wird (Massey und Miller, 1988). Die untere Registrierung ist eine Überlagerung aus erregendem und hemmendem synaptischen Strom. Bei -75 mV und -55 mV verursacht der Lichtreiz phasische Einwärtsströme, während der gleiche Lichtreiz bei 0 mV tonische Auswärtsströme hervorruft.

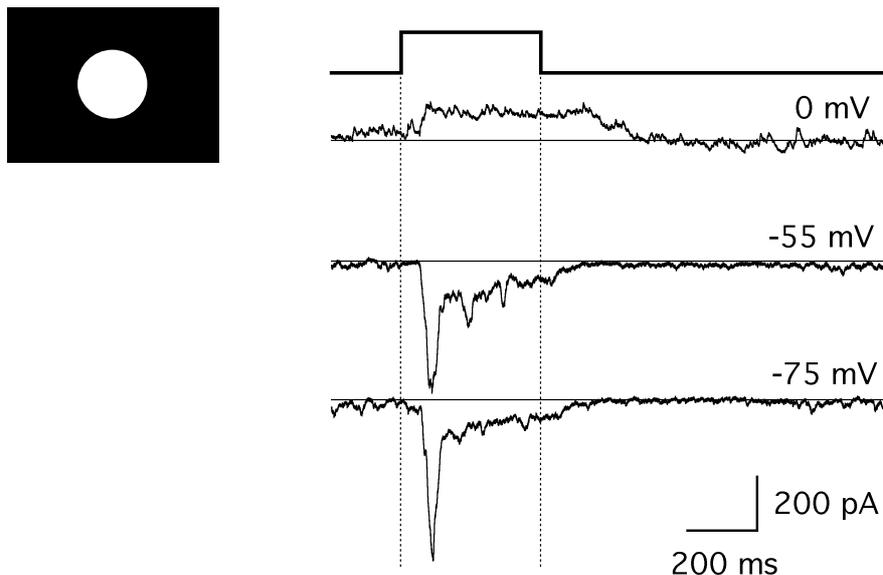


Abbildung 28: Lichtinduzierte Ströme einer ON-Zentrum-Ganglienzelle (Abbildung 17A) bei verschiedenen Haltepotentialen. Die Zelle wurde durch einen kreisförmigen Lichtreiz ($d = 200 \mu\text{m}$) für die Dauer von 400 ms stimuliert. Der zeitliche Ablauf der Lichtreizung ist oberhalb der Registrierungen gezeigt. Auf der rechten Seite der jeweiligen Registrierung sind die eingestellten Haltepotentiale angegeben. Das Haltepotential von 0 mV entspricht $E_{Na/K}$, -55 mV entspricht E_{Cl} . Die mittlere Registrierung zeigt somit den erregenden synaptischen Strom und die obere Registrierung den hemmenden. Die untere Registrierung ($V_h = -75 \text{ mV}$) ist eine Überlagerung aus erregendem und hemmendem synaptischen Strom.

Bei derselben ON-Zentrum-Ganglienzelle wurde die Flächen-Variations gemessen. Die übertragene Ladung des lichtinduzierten Stroms wurde bei Haltepotentialen von -55 mV und 0 mV gemessen und in Abhängigkeit vom Durchmesser aufgetragen. Die Messwerte wurden jeweils auf die Maximalantwort normiert. Bei -55 mV wurde die Flächen-Variations-Kurve des erregenden synaptischen Eingangs gemessen. Bei 0 mV wurde die Flächen-Variations-Kurve des hemmenden synaptischen Eingangs der Ganglienzelle gemessen. Die Flächen-Variations-Kurve des erregenden Stroms besaß ein Maximum bei 150 μm und fiel bei größeren Lichtreizdurchmessern kontinuierlich auf 20 % des Maximalwertes ab.

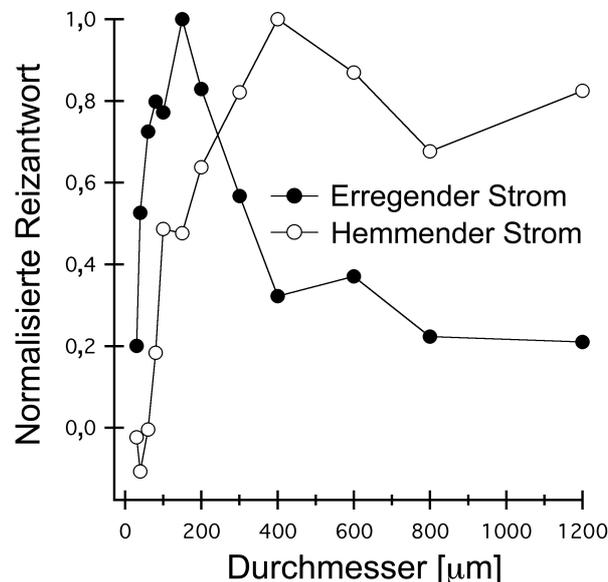
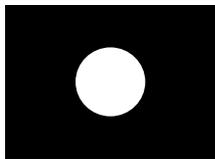


Abbildung 29: Flächen-Variations-Kurve des erregenden und des hemmenden synaptischen Stroms. In dem Diagramm sind die Reizantworten einer phasischen ON-Zentrum-Ganglienzelle in Abhängigkeit vom Lichtreizdurchmesser aufgetragen. Die übertragene Ladung der Registrierungen wurden bei $V_h = E_{Cl}$ (erregender Strom) und $V_h = E_{Na/K}$ (hemmender Strom) gemessen und jeweils auf den Maximalwert normiert. Die Flächen-Variations-Kurve des erregenden synaptischen Stroms besaß ein Maximum bei 150 μm und fiel bei Reizung mit größeren Lichtreizdurchmessern auf etwa 20 % des Maximalwertes ab. Die Flächen-Variations-Kurve des hemmenden synaptischen Stroms besaß ein Maximum bei 400 μm und fiel bei größeren Lichtreizdurchmessern nur auf etwa 80 % des Maximalwertes ab.

Der erregende synaptische Eingang der Zelle wurde bei Reizung mit großen Durchmessern deutlich verringert. Die Flächen-Variations-Kurve des hemmenden Stroms besaß ein Maximum bei 400 μm und fiel bei größeren Lichtreizdurchmesser nur auf 80 % des Maximalwertes ab. Der hemmende synaptische Eingang der Zelle wird durch große

Lichtreizdurchmesser kaum verringert. Bei 87 der 105 gemessenen Zellen konnten die lichtinduzierten Ströme, wie oben beschrieben, biophysikalisch charakterisiert werden (ON-Ganglienzellen: $N = 42$, OFF-Ganglienzellen: $N = 26$, ON/OFF-Ganglienzellen: $N = 19$).

Das Experiment zeigt, daß Zellen, welche die Ganglienzelle synaptisch erregen (z.B. Bipolarzellen), selbst durch laterale Verknüpfungen in der Netzhaut gehemmt werden (präsynaptische oder indirekte Hemmung). Das Experiment zeigt auch, daß der optimale Durchmesser der Flächen-Variations-Kurve des hemmenden Stroms deutlich kleiner ist als der des erregenden Stroms. Dies ist ein Indiz dafür, daß die Dendritenbäume der Amakrinzellen, welche die Ganglienzelle direkt hemmen, größer sind als der Dendritenbaum der Ganglienzelle. Der geringere Abfall der Kurve zeigt, daß bei den verwendeten Lichtreizdurchmessern der hemmender Amakrinzelleingang selber nur schwach lateral gehemmt wird. Die Verlässlichkeit der in Kapitel 3.4 bis Kapitel 3.6 gezeigten Daten ist im großen Maß von der Güte des ‚space-clamp‘ abhängig. Je schlechter der ‚space-clamp‘, umso schwieriger gestaltete sich die Trennung von erregenden und hemmenden Strömen. Bei großen Lichtreizdurchmessern wurde der bei einem Haltepotential $V_H = 0$ mV gemessene hemmende Strom unterschätzt, denn der gleichzeitig aktivierte erregende Strom verringert den Widerstand der Dendritenmembran und macht sie löchrig wodurch die Amplitude des hemmenden Stroms reduziert wird. Umgekehrt wurde bei einem Haltepotential $V_H = -55$ mV die gemessene Verminderung des erregenden Stroms für große Lichtreizdurchmesser überschätzt. Der gleichzeitig aktivierte hemmende Strom macht wiederum die Dendritenmembran löchrig und reduziert deshalb die Amplitude des erregenden Stroms. Die gemessene Abnahme der Flächen-Variations-Kurve für erregende Ströme war aus diesem Grund überschätzt.

3.7. Abhängigkeit der Reizantwort der Ganglienzelle von der intrazellulären Chloridionenkonzentration

In den vorangegangenen Kapiteln 3.4 und 3.6 wurde gezeigt, daß laterale Hemmung retinaler Ganglienzellen durch direkte (postsynaptische Hemmung) und indirekte (präsynaptische Hemmung) Verknüpfungen erzeugt wird. Die Ganglienzelle übermittelt Information an die visuellen Zentren des Gehirns durch eine zeitliche Änderung der Entladungsrate. In dem folgenden Experiment wurde deshalb der Einfluß der direkten Hemmung auf die Entladungsrate untersucht. Die Entladungsrate der Ganglienzellen wurde im Stromklemmemodus der Patch-Clamp-Technik gemessen. Dabei wurde ausgenutzt, daß bei Patch-Clamp-Messungen im Ganzzellmodus das Cytosol mit der Elektrodenlösung ausgetauscht wird. Auf diese Weise konnten lichtinduzierte Aktionspotentiale bei niedriger und hoher Chloridionenkonzentration gemessen. Zunächst wurde eine Intrazellulärlösung mit niedriger, physiologischer Chloridionenkonzentration verwendet (KGlu-Lösung siehe 2.7.1). Durch laterale Hemmung ausgelöste GABAerge oder glyinerge Chloridionenströme sollten bei niedriger Chloridionenkonzentration die Entladungsrate der Zelle verringern. Dann wurden die Messungen an derselben Zelle mit einer neuen Elektrode, welche mit einer Intrazellulärlösung mit hoher Chloridionenkonzentration (KCl-Lösung siehe 2.7.1) gefüllt war, wiederholt. Das Öffnen von GABA- oder glyzinaktivierten Chloridionenkanälen führt bei hoher intrazellulärer Chloridionenkonzentration zur Depolarisation der Zelle, weil das Ruhemembranpotential der Zelle negativer als $E_{Cl} \approx 0$ mV ist. Durch laterale Hemmung ausgelöste Chloridionenströme erhöhen in diesem Fall die Entladungsrate der Zelle.

In Abbildung 30 sind die lichtinduzierten Aktionspotentiale einer ON-Zentrum-Ganglienzelle gezeigt. Die Zelle wurde mit einem ringförmigen Lichtreiz (Innendurchmesser 300 µm/Außendurchmesser 1200 µm) stimuliert und die Aktionspotentiale im Stromklemmemodus der Patch-Clamp-Technik gemessen. Die obere Registrierung wurde mit einer KGlu-Lösung (niedrige Chloridionenkonzentration) in der Elektrode gemessen. Durch den ringförmigen Lichtreiz wurde die Zelle hyperpolarisiert. Dann wurde die Elektrode vorsichtig vom Soma weggezogen, so daß sich die Öffnung in der Zellmembran wieder verschließen konnte. Die Antwort auf denselben Reiz wurde im Anschluß mit einer KCl-Lösung (hohe Chloridionenkonzentration) in der Elektrode gemessen. Wenige Sekunden nachdem die Membran aufgerissen wurde, löst der Lichtreiz erneut eine Hyperpolarisation aus (mittlere Registrierung).

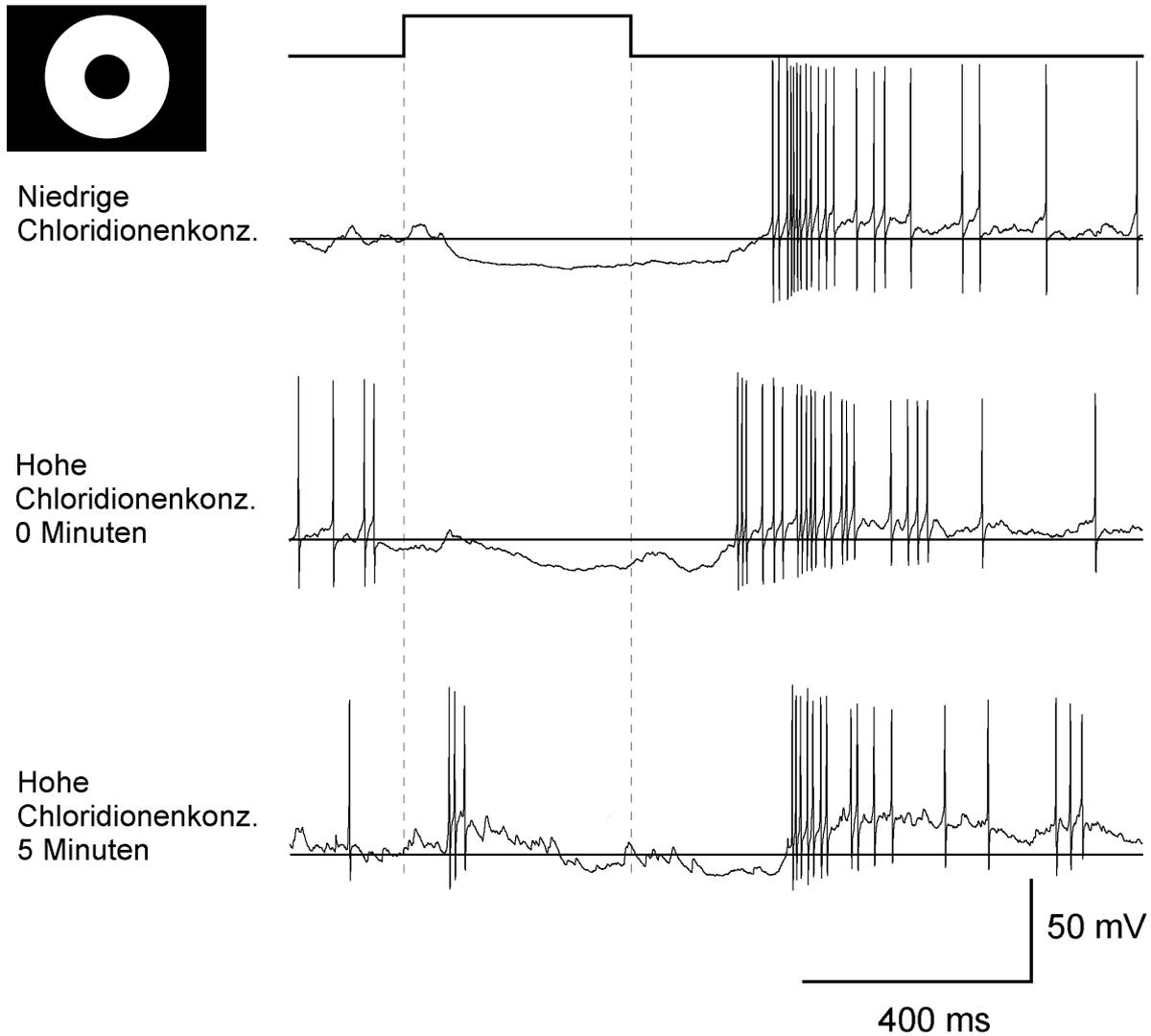


Abbildung 30: Lichtinduzierte Aktionspotentiale einer ON-Zentrum-Ganglienzelle bei verschiedenen intrazellulären Chloridionenkonzentrationen. Die Zelle wurde mit einem ringförmigen Lichtreiz (Innendurchmesser 300 μm /Außendurchmesser 1200 μm) stimuliert und die Aktionspotentiale im Stromklemmemodus der Patch-Clamp-Technik gemessen. Die obere Reizantwort wurde bei niedriger intrazellulärer Chloridionenkonzentration gemessen. Durch das Einschalten des Stimulus wird die Zelle deutlich hyperpolarisiert. Die mittlere und die untere Reizantwort wurden von derselben Zelle bei hoher intrazellulärer Chloridionenkonzentration gemessen. Die Hyperpolarisation war zu Beginn immer noch deutlich meßbar. Nach fünf Minuten zeigte die Zelle auf einen Umfeldreiz eine depolarisierende Antwort.

Fünf Minuten später war die vorherige, niedrige Chloridionenkonzentration aus der Zelle ausgewaschen und gegen die hohe Chloridionenkonzentration der Elektrode ausgetauscht. Als Folge davon wurde die Zelle jetzt durch den Lichtreiz depolarisiert und erzeugte beim Ausschalten des Lichtreizes Aktionspotentiale (untere Registrierung). Das Umwandeln einer Hyperpolarisation in eine Depolarisation durch Erhöhung der intrazellulären

Chloridionenkonzentration zeigt, daß die Hyperpolarisation durch Chloridionenströme verursacht wurden.

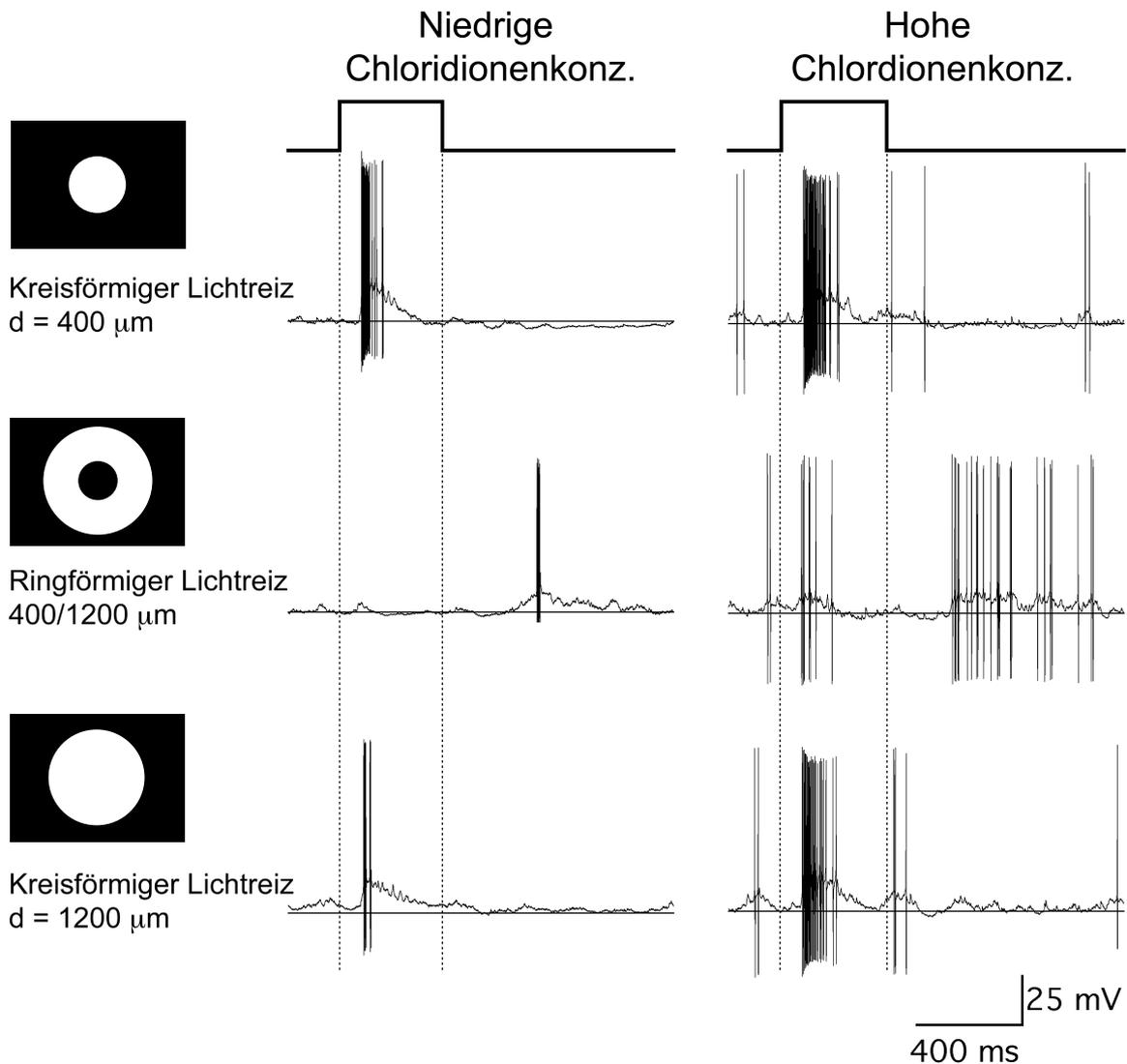


Abbildung 31: Lichtinduzierte Aktionspotentiale einer ON- α -Ganglienzelle, gemessen im Stromklemmemodus der Patch-Clamp-Technik. Für die Messungen auf der rechten und der linken Seite wurden identische Reize verwendet. Auf der linken Seite sind die Reizantworten der Zelle bei niedriger intrazellulärer Chloridionenkonzentration gezeigt. Die Zelle besaß die für α -Ganglienzellen typischen phasischen Reizantworten. Die laterale Hemmung verringerte die Entladungsrate der Zelle bei großen Lichtreizdurchmessern. Ein Umfeldreiz verursachte keine Erhöhung der Entladungsrate beim Einschalten des Lichtreizes. Auf der rechten Seite sind die Reizantworten derselben Zelle bei hoher intrazellulärer Chloridionenkonzentration gezeigt. Die Zellantwort auf kreisförmige Lichtreize war tonisch und die Verringerung der Entladungsrate für große Lichtreizdurchmesser war nicht so stark ausgeprägt. Beim Einschalten des Umfeldreizes wurde die Entladungsrate erhöht im Gegensatz zur linken Seite.

In Abbildung 31 sind die Reizantworten einer weiteren ON- α -Ganglienzelle bei einem Zentrumsreiz ($d = 400 \mu\text{m}$), einem Umfeldreiz ($400 \mu\text{m}$ Innendurchmesser, $1200 \mu\text{m}$ Außendurchmesser) und einem Ganzfeldreiz ($d = 1200 \mu\text{m}$) gezeigt. Die Reizantworten wurden beim Ruhemembranpotential der Zelle gemessen. Die Morphologie der Zelle ist in Abbildung 17 A gezeigt. Auf der linken Seite in Abbildung 31 sind die Reizantworten bei niedriger, intrazellulärer Chloridionenkonzentration (KGlu-Lösung) gezeigt. Die Zelle besaß den für α -Ganglienzellen typischen phasischen Reizantwortverlauf: noch während der Lichtreiz (Dauer 400 ms) angeschaltet war, verringerte sich die Entladungsrate der Zelle. Wenn die Zelle durch einen ringförmigen Lichtreiz stimuliert wurde, zeigte die Zelle nur beim Ausschalten des Reizes eine Erhöhung der Entladungsrate. Das Einschalten eines Ganzfeldreizes verursachte nur wenige Aktionspotentiale. Die laterale Hemmung verringerte also deutlich die Entladungsrate der Zelle im Falle der niedrigen intrazellulären Chloridionenkonzentration. Auf der rechten Seite von Abbildung 31 sind die Reizantworten derselben Zelle bei hoher, intrazellulärer Chloridionenkonzentration gezeigt. Die Zellantwort bei hoher intrazellulärer Chloridionenkonzentration auf kreisförmige Lichtreize war deutlich tonisch und die Entladungsrate war höher als bei niedriger Chloridionenkonzentration. Die hohe Chloridionenkonzentration bewirkte außerdem, daß ein ringförmiger Lichtreiz die Entladungsrate der Zelle beim An- und Ausschalten erhöhte. Besonders hervorzuheben ist, daß die Verringerung der Entladungsrate der Zelle für große Lichtreizdurchmesser nicht so ausgeprägt war (Abbildung 31 rechts oben und rechts unten). Daß die intrazelluläre Chloridionenkonzentration die Reizantwort der Zelle beeinflusst, wurde bei allen drei Zellen, die erfolgreich untersucht werden konnten, bestätigt.

Das Experiment zeigt, daß die Stärke der direkten Hemmung von der intrazellulären Chloridionenkonzentration abhängt. Direkte laterale Hemmung induziert Chloridionenströme in retinalen Ganglienzellen und reduziert die Entladungsrate retinaler Ganglienzellen.

3.8. Pharmakologische Charakterisierung der lateralen Hemmung

3.8.1. Pharmakologische Charakterisierung der direkten (postsynaptischen) lateralen Hemmung

Retinale Ganglienzellen können durch GABAerge oder glyzinerge Amakrinzellen gehemmt werden. In den bisherigen Experimenten wurde nicht untersucht, ob die hemmenden Chloridionenströme durch synaptische GABAerge Eingänge oder von glyzinerge Amakrinzellen ausgelöst werden. Ganglienzellendriten exprimieren verschiedene GABA_A-, und Glyzinrezeptoren, aber keine GABA_C-Rezeptoren (Feigenspan *et al.*, 1993; Enz *et al.*,

1996; Koulen *et al.*, 1996; Wässle *et al.*, 1998). Mit Hilfe von spezifischen Antagonisten für GABA_A- oder Glyzinrezeptoren können GABA- und glyzininduzierte Chloridionenströme getrennt werden. Bicucullin und Picrotoxinin sind spezifische Antagonisten bei GABAergen Synapsen, während Strychnin glyzinerge Synapsen blockiert. Um einen möglichst großen lichtinduzierten hemmenden Strom zu messen, wurden die Zellen bei 0 mV mit ringförmigen Lichtreizen stimuliert. Die Wirkungen der spezifischen kompetitiven Antagonisten Bicucullin und Strychnin auf den hemmenden lichtinduzierten Strom wurden untersucht. Die Antagonisten (10 μM Bicucullin und 0,5 μM Strychnin) wurden der Ames-Nährlösung zugeben und mittels Badapplikation verabreicht.

In Abbildung 32 sind die lichtinduzierten Ströme einer ON/OFF-Ganglienzelle gezeigt (Morphologie Abbildung 17C). Die hemmenden Ströme wurden bei einem Haltepotential von $V_h = 0$ mV als Auswärtsströme gemessen.

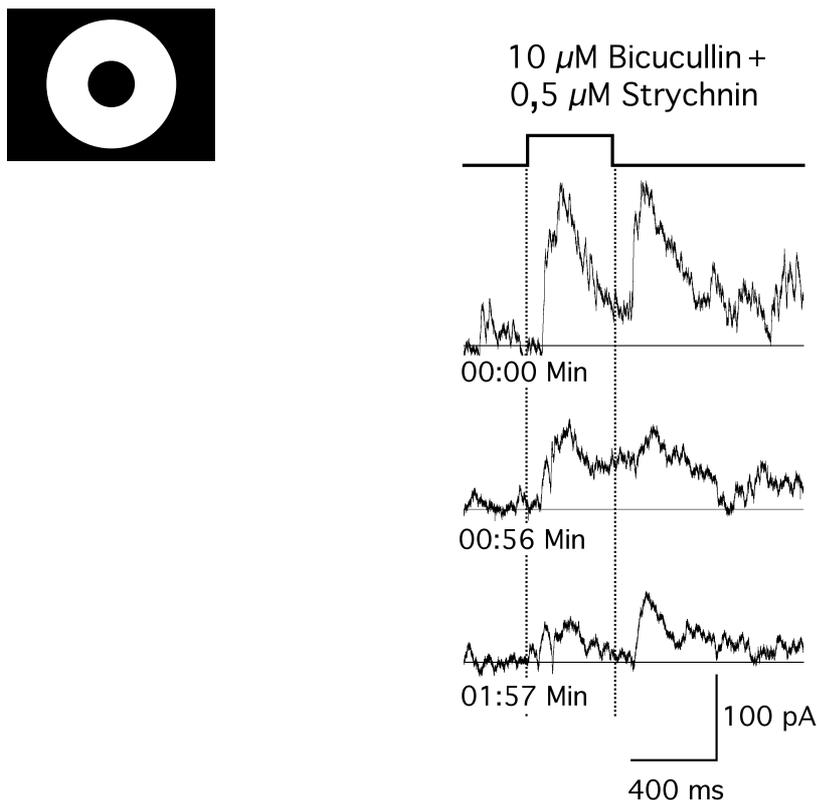


Abbildung 32: Der Einfluß von 10 μM Bicucullin und 0,5 μM Strychnin auf lichtinduzierte hemmende Ströme einer ON/OFF-Ganglienzelle. Die Zelle wurde durch einen ringförmigen Lichtreiz (Innendurchmesser 200 μm , Außendurchmesser 1000 μm) für jeweils 400 ms stimuliert. Der zeitliche Ablauf der Lichtreizung ist oberhalb der Registrierungen gezeigt. Die Zeiten bezeichnen den Beginn der Applikation von 10 μM Bicucullin und 0,5 μM Strychnin in die Meßkammer. Ein hemmender Strom konnte jeweils beim Ein- und Ausschalten des Lichtreizes gemessen werden. Durch die Badapplikation von 10 μM Bicucullin und 0,5 μM Strychnin wurde der hemmende Strom deutlich verringert. $V_h = -0$ mV.

Die Zelle reagierte unter Kontrollbedingungen auf das Ein- und Ausschalten eines ringförmigen Lichtreizes (200 μm Innendurchmesser, 1000 μm Aussendurchmesser) mit einem Auswärtsstrom (Abbildung 32 obere Registrierung). Das Einwaschen von 10 μM Bicucullin und 0,5 μM Strychnin verursachte eine deutliche Reduktion des hemmenden Stroms (mittlere und untere Registrierung), ein Indiz dafür, daß die direkte laterale Hemmung GABAerg und/oder glyzinerig ist. Der Einfluß von Strychnin und Bicucullin auf hemmende Stromantworten wurde auch getrennt untersucht. Strychnin wurde bei 14 Ganglienzellen appliziert und konnte in nur drei Fällen lichtinduzierte Chloridionenströme verringern (ON: 2; OFF: 1; ON/OFF: 0). Bicucullin wurde bei 17 Ganglienzellen appliziert und konnte in 14 Fällen lichtinduzierte Chloridionenströme reduzieren (ON: 10; OFF: 4; ON/OFF: 2). Picrotoxinin (PTX) ist in der Säugetiernetzhaut ein Kanalblocker von GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren.

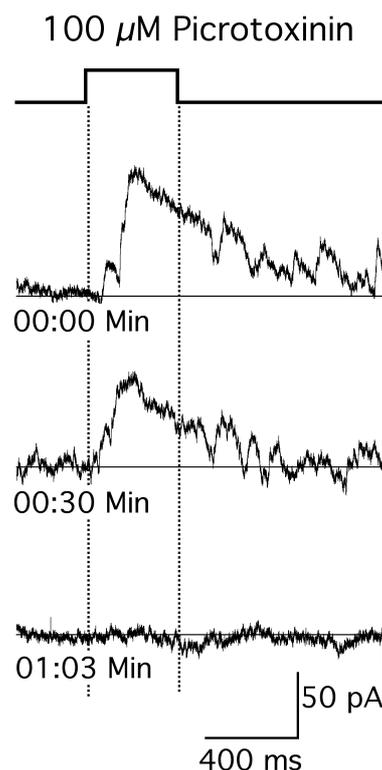
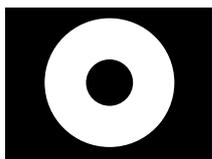


Abbildung 33: Der Einfluß von 100 μM PTX auf lichtinduzierte hemmende Ströme einer ON-Zentrum-Ganglienzelle. Die Zelle wurde durch einen kreisförmigen Lichtreiz für jeweils 400 ms stimuliert. Der zeitliche Ablauf der Lichtreizung ist oberhalb der Registrierungen gezeigt. Die Zeiten bezeichnen den Beginn der Applikation von 100 μM PTX in die Meßkammer. Ein hemmender Strom wurde beim Einschalten des Lichtreizes gemessen. Durch 100 μM PTX wurde dieser hemmende Strom vollständig blockiert. $V_h = 0 \text{ mV}$.

Eine Konzentration von 100 μM PTX blockiert GABA-induzierte Ströme vollständig ohne glyzininduzierte Ströme zu verringern (Pribilla *et al.*, 1992; Pribilla *et al.*, 1994; Handford *et al.*, 1996; Schofield *et al.*, 1996). Der Einfluß von PTX auf die hemmenden, durch einen Umfeldreiz induzierten, Ströme wurde im folgenden Abschnitt untersucht.

In Abbildung 33 ist der Einfluß einer Überströmung mit 100 μM PTX auf lichtinduzierte hemmende Ströme bei einer ON-Zentrum-Ganglienzelle gezeigt. Die Zelle wurde auf ein Haltepotential von $V_h = 0$ mV geklemmt und mit einem ringförmigen Lichtreiz stimuliert (Dauer 400 ms). Unter Kontrollbedingungen (obere Registrierung) reagiert die Zelle mit einem großen hemmenden Strom beim Einschalten und mit einem kleineren hemmenden Strom bei Ausschalten des Stimulus. Der lichtinduzierte hemmende Strom wurde in dieser Zelle durch PTX vollständig blockiert. Der Wirkung von 100 μM PTX auf durch Umfeldreize induzierte hemmende Ströme wurde bei 12 Zellen gemessen (ON: 6; OFF: 3; ON/OFF: 3), und übereinstimmend wurde der hemmende Strom bei allen 12 Zellen unterdrückt.

3.8.2. Pharmakologische Charakterisierung der indirekten (präsynaptischen) lateralen Hemmung

Retinale Ganglienzellen werden hauptsächlich durch glutamaterge Bipolarzellen synaptisch erregt. Es gibt im wesentlichen drei Mechanismen, durch welche Bipolarzellen lateral gehemmt werden können.

- 1) Bipolarzellen werden in der IPL durch GABAerge Amakrinzellen an der Axonendigung gehemmt. Dort werden von den Bipolarzellen verschiedene Subtypen von GABA_A-Rezeptoren und GABA_C-Rezeptoren (Pan und Lipton, 1995; Fletcher *et al.*, 1998; Koulen *et al.*, 1998a; Wässle *et al.*, 1998), sowie Glyzinrezeptoren exprimiert (Sasso-Pognetto *et al.*, 1994).
- 2) Auf den Dendriten der Bipolarzellen in der OPL wurden sowohl GABA_A- als auch GABA_C-Rezeptoren beschrieben. GABA, von den Horizontalzellen freigesetzt, kann an die Rezeptoren binden und zur Hemmung der Bipolarzellen führen (Greferath *et al.*, 1994; Vardi und Sterling, 1994; Haverkamp *et al.*, 2000; Vardi *et al.*, 2000).
- 3) Ebenso wurden GABA-Rezeptoren an den Photorezeptorsynapsen nachgewiesen. Auch hier kann GABA, das von den Horizontalzellen freigesetzt wird, hemmend wirken.

Diese indirekte bzw. präsynaptische Hemmung von Ganglienzellen wurde in der vorliegenden Arbeit am Umkehrpotential für Chlorid (E_{Cl}) gemessen, wodurch die erregenden Ströme isoliert wurden. Mit verschiedenen Antagonisten wurde versucht, die indirekte Hemmung der

Zelle zu verringern. Die Einflüsse des GABA_A-Rezeptor Antagonisten Bicucullin, der GABA_C-Rezeptor Antagonisten TPMPA (Ragozzino *et al.*, 1996) und APMPA (Woodward *et al.*, 1993) sowie des Glyzinrezeptorantagonisten Strychnin wurden untersucht. Keine dieser getesteten Substanzen konnte die indirekte laterale Hemmung vollständig blockieren.

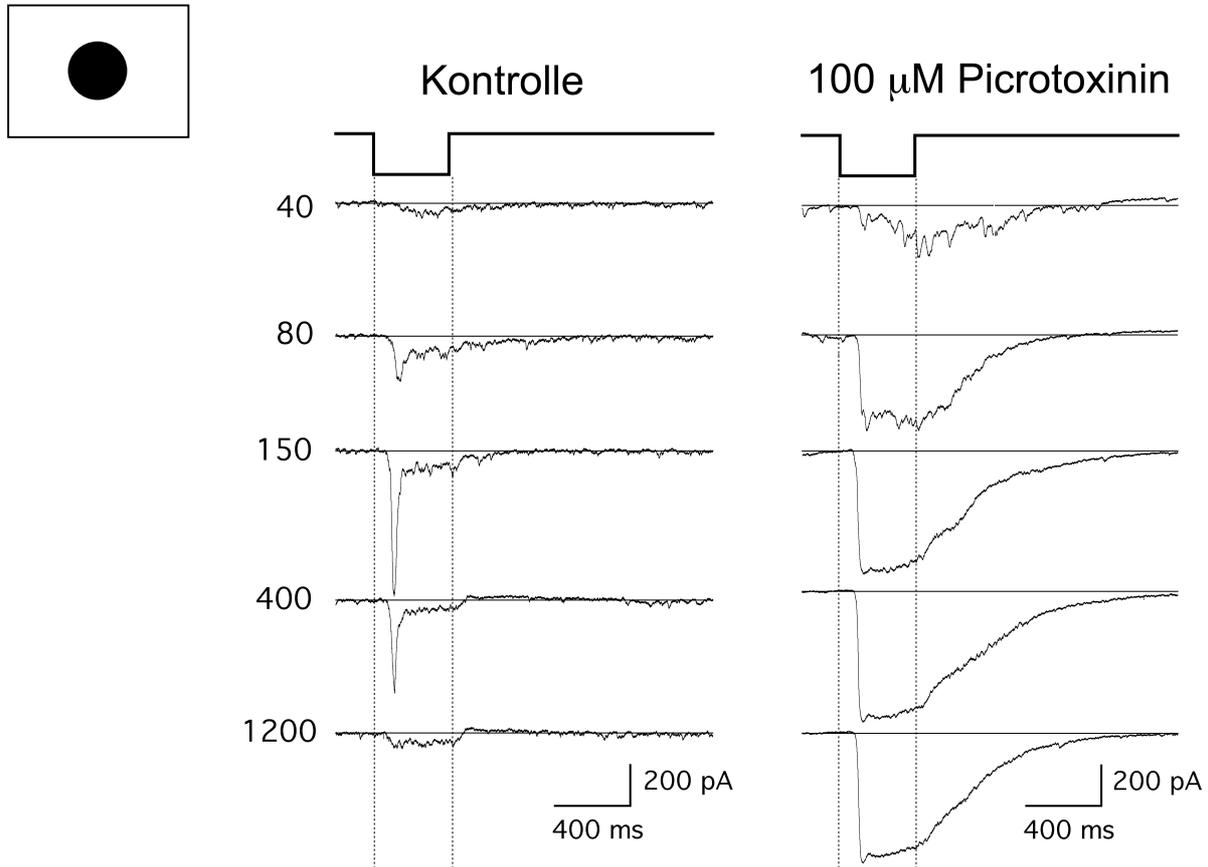


Abbildung 34: Der Einfluß von 100 μM PTX auf die Flächen-Variations erregender Ströme. Durch einen Dunkelreiz induzierte erregende Ströme einer phasischen OFF-Zentrum-Ganglienzelle wurden bei einem Haltepotential von $V_h = E_{Cl} = -45 \text{ mV}$ gemessen. Die Zelle wurde durch kreisförmige Dunkelreize für jeweils 400 ms stimuliert. Der zeitliche Ablauf der Dunkelreizung ist oberhalb der Registrierungen gezeigt. Auf der linken Seite der jeweiligen Registrierung sind die Durchmesser der kreisförmigen Dunkelreize angegeben (in μm). In dem Kontrolllexperiment (linke Seite) nahm die Amplitude des Stroms zunächst stetig mit dem Dunkelreizdurchmesser zu (bis 150-200 μm), bei größeren Dunkelreizdurchmessern nahm die Amplitude wieder ab. Unter 100 μM PTX (rechte Seite) war die Zellantwort im Gegensatz zum Kontrolllexperiment tonisch. Die Amplitude nahm zunächst stetig mit dem Dunkelreizdurchmesser zu (bis 200-300 μm), blieb bei größeren Dunkelreizdurchmessern aber ungefähr gleich groß. Die Verminderung der Reizantwort bei großen Dunkelreizdurchmessern wurde durch 100 μM PTX blockiert.

Die GABA_C-Rezeptor Antagonisten waren nicht spezifisch und verhielten sich in einige Fällen wie GABA_A-Rezeptor Agonisten. Im Gegensatz dazu konnte die indirekte laterale

Hemmung durch Zugabe von Picrotoxinin (PTX) unterdrückt werden, denn PTX ist ein wirkungsvoller Antagonist aller GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren der Säugernetzhaut (Zhang *et al.*, 1995).

In Abbildung 34 sind diese Ergebnisse exemplarisch bei der Flächen-Variations-Messung einer phasischen OFF-Zentrum-Ganglienzelle (Morphologie Abbildung 17B) dargestellt. Die durch einen Dunkelreiz induzierten Ströme wurden bei einem Haltepotential von -45 mV gemessen. Bei dem Haltepotential von $V_h = -45$ mV (dem Cl⁻-Umkehrpotential) war der gemessene, einwärts gerichtete Strom ausschließlich der erregende synaptische Strom. Der Strom war phasisch und die Amplitude wuchs zunächst stetig mit dem Dunkelreizdurchmesser an, hatte ein Maximum bei etwa 150-200 μm und nahm bei größeren Durchmessern wieder ab. Durch die Applikation von 100 μM PTX wurde der Zeitverlauf der Reizantwort tonisch, im Gegensatz zum Kontrollexperiment. Die Amplitude wurde während der PTX-Applikation, beginnend bei einem Dunkelreizdurchmesser von 80 μm , deutlich größer und ging bei größeren Durchmessern in die Sättigung. Die Reduktion der Amplitude bei großen Dunkelreizdurchmessern (Kontrollmessung) wurde durch 100 μM PTX aufgehoben. Diese Ergebnisse wurden auch quantitativ ausgewertet, und in Abbildung 35 sind die entsprechenden Ergebnisse als Flächen-Variationskurven dargestellt.

Auf der linken Seite von Abbildung 35 wurde die übertragene Ladung berechnet. Unter 100 μM PTX war, beginnend bei einem Dunkelreizdurchmesser von 80 μm , die übertragene Ladungsmenge deutlich größer als unter Kontrollbedingungen. Bei einem Durchmesser von 300 μm war die Ladungsmenge unter 100 μM PTX fünfmal größer als unter Kontrollbedingungen. Um die Verminderung der Zellantwort bei großen Dunkelreizdurchmessern besser vergleichen zu können, wurden auf der rechten Seite von Abbildung 35 die Flächen-Variationskurven relativ und auf ihren Maximalwert normiert aufgetragen.

Unter Kontrollbedingungen wurde die Reizantwort bei maximalem Dunkelreizdurchmesser auf 30 % ihres Maximalwertes reduziert. Durch die Applikation von 100 μM PTX wurde diese Abnahme fast vollständig aufgehoben und die Reizantwort sank nur noch auf 95 % ihres Maximalwertes. Die Wirkung von 100 μM PTX wurde bei insgesamt 15 Ganglienzellen getestet. Unter Kontrollbedingungen wurde die Reizantwort durch einen maximalen Stimulusdurchmesser im Mittel auf 33 ± 18 % ihres Maximalwertes reduziert.

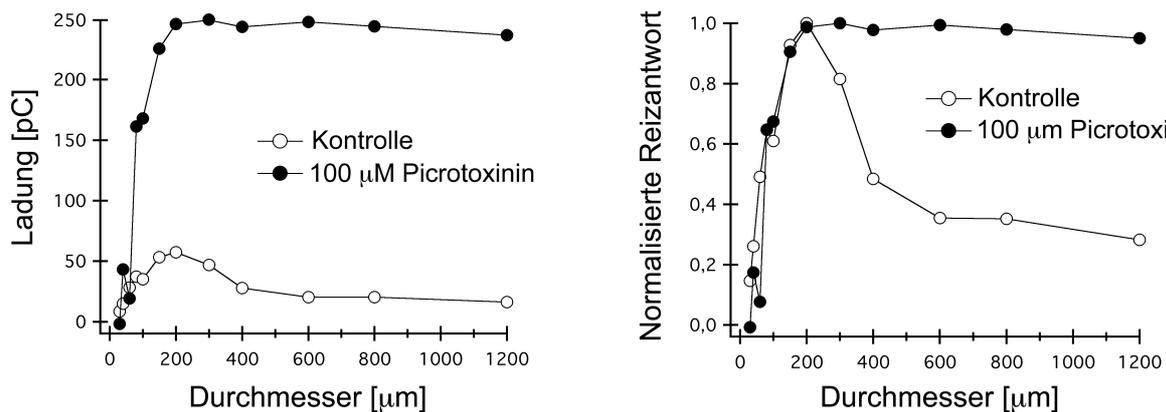


Abbildung 35. Der Einfluß von 100 μM PTX auf die Flächen-Variationskurven erregender synaptischer Ströme. Auf der linken Seite sind die übertragenen Ladungen unter Kontrollbedingungen und unter 100 μM PTX als Absolutwerte aufgetragen. Auf der rechten Seite sind die Flächen-Variationskurven relativ und auf den Maximalwert normiert aufgetragen. Unter Kontrollbedingungen besaß die Flächen-Variationskurve ein Maximum bei einem Durchmesser von 200 μm und war bei einem Durchmesser von 1200 μm auf 30 % des Maximalwertes abgefallen. Bei Applikation von 100 μM PTX nahm die Flächen-Variationskurve bei 300 μm ein flaches Maximum ein und sank bei größeren Durchmessern nur geringfügig auf 95 % des Maximalwertes ab. Durch Zugabe von 100 μM PTX wurde deutlich mehr Ladung übertragen. $V_h = -45 \text{ mV}$.

Mit 100 μM PTX in der Nährlösung wurde die Reizantwort nur auf $83 \pm 12 \%$ ihres Maximalwertes reduziert. In fünf der 15 Zellen war die Abnahme der Zellantwort bei großen Durchmessern vergleichbar zu Abbildung 35; die laterale Hemmung war vollständig blockiert. In den Fällen, in denen PTX die indirekte laterale Hemmung nicht vollständig blockieren konnte, könnte ein Teil der Hemmung auf glyzinerger Synapsen beruhen, die nicht durch PTX blockiert werden.

Die eben beschriebenen Ergebnisse sind ein deutliches Indiz dafür, daß Bipolarzellen durch GABAerge Zellen lateral gehemmt werden; sowohl über GABA_A - als auch über GABA_C -Rezeptoren. Allerdings konnte das Experiment nicht zeigen, ob dabei die Bipolarzellen direkt gehemmt werden oder bereits präsynaptisch Photorezeptoren durch Horizontalzellen gehemmt werden. Weiterhin liefert das Experiment keinen Hinweis darauf, ob Bipolarzellen in der IPL durch Amakrinzellen oder in der OPL durch Horizontalzellen gehemmt werden. Eine weitere Frage ist, ob Amakrinzellen oder Horizontalzellen im gleichen Maße an der Erzeugung lateraler Hemmung von Ganglienzellen beteiligt sind. In den folgenden beiden Experimenten wird gezeigt, daß Amakrinzellen bei der Umfeldhemmung eine wichtige Rolle spielen. Im Gegensatz zu Horizontalzellen besitzen viele Amakrinzellen spannungsabhängige Na^+ -Ionenkanäle und kommunizieren somit über Aktionspotentiale.

Diese lassen sich durch Tetrodotoxin (TTX) selektiv blocken und damit lassen sich auch Amakrinzeleinflüsse getrennt von Horizontalzeleinflüssen nachweisen.

3.8.3. Einfluß von Tetrodotoxin auf die laterale Hemmung retinaler Ganglienzellen

1.) Direkte Hemmung der Ganglienzellen

In der Säugetiernetzhaut gehören GABAerge Amakrinzellen hauptsächlich zu der Gruppe von Amakrinzellen mit großem Dendritenbaumdurchmesser (,wide field amacrine cells‘) (Vaney, 1990; MacNeil *et al.*, 1999; Masland und Raviola, 2000).

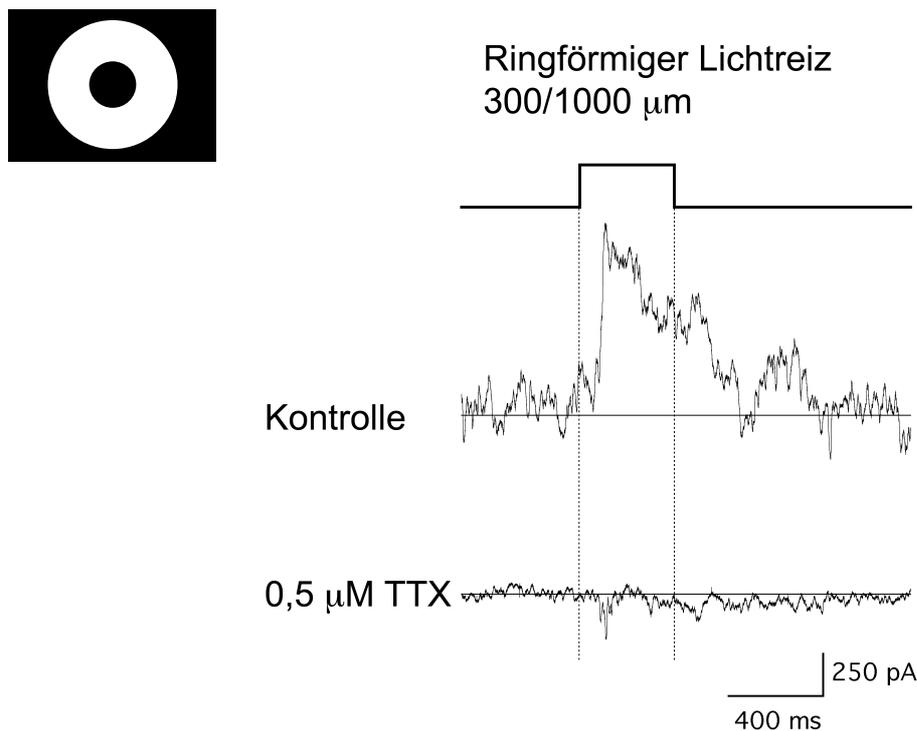


Abbildung 36: Der Einfluß von 0,5 µM TTX auf lichtinduzierte hemmende Ströme einer ON-Ganglienzelle. Die Zelle war beim Umkehrpotential für unspezifische Kationenströme ($E_{Na/K}$) geklemmt (gezeigt sind also nur die hemmenden Ströme) und wurde durch einen kreisförmigen Lichtreiz (Innendurchmesser 300 µm, Außendurchmesser 1000 µm) für jeweils 400 ms stimuliert. Der zeitliche Ablauf der Lichtreizung ist oberhalb der Registrierungen gezeigt. Unter Kontrollbedingungen wurde ein hemmender Strom beim Ein- und Ausschalten des Lichtreizes gemessen. Durch die Applikation von 0,5 µM TTX wurde der hemmende Strom vollständig blockiert. $V_h = -0$ mV.

Diese Zelle übertragen Signale lateral über große Distanzen durch Aktionspotentiale in ihren Fortsätzen. Diese Aktionspotentiale können durch die Zugabe von Tetrodotoxin blockiert werden. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, daß die laterale Hemmung von Ganglienzellen durch die Zugabe von TTX verringert werden kann (Cook *et al.*, 1998; Cook und McReynolds, 1998; Demb *et al.*, 1999; Taylor, 1999). Es konnte bisher nicht gezeigt

werden, daß direkte laterale Hemmung von Ganglienzellen durch Zugabe von TTX beeinflusst wird.

In Abbildung 36 ist der Einfluß von $0,5 \mu\text{M}$ TTX auf lichtinduzierte hemmende Ströme einer ON-Zentrum-Ganglienzelle gezeigt. Die Zelle wurde auf ein Haltepotential von $V_h = 0 \text{ mV}$ geklemmt und mit einem ringförmigen Lichtreiz ($300 \mu\text{m}$ Innendurchmesser, $1000 \mu\text{m}$ Außendurchmesser) stimuliert (Dauer 400 ms). Unter Kontrollbedingungen (obere Registrierung) konnte ein großer hemmenden Strom beim Einschalten und ein kleiner hemmenden Strom bei Ausschalten des Stimulus gemessen werden. Durch die Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ TTX wurde der hemmende Strom vollständig blockiert. Der Einfluß von $0,5 \mu\text{M}$ TTX auf hemmende Ströme wurde in 12 Zellen getestet. In sieben der 12 getesteten Zellen konnte der hemmende Strom deutlich vermindert werden.

Das Experiment zeigt, daß direkte Hemmung retinaler Ganglienzellen in den meisten Fällen durch aktionspotentialerzeugende Amakrinzellen verursacht wird.

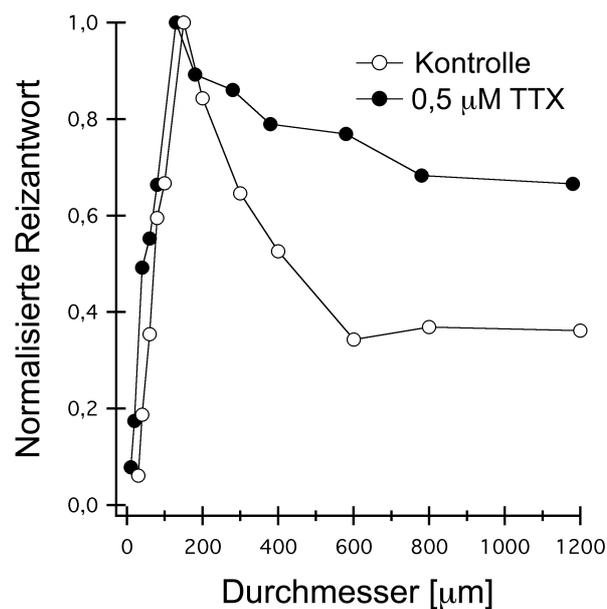
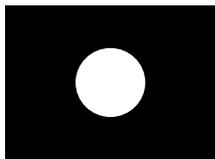


Abbildung 37: Der Einfluß von $0,5 \mu\text{M}$ TTX auf die Flächen-Variationskurve erregender synaptischer Ströme einer ON-Zentrum-Ganglienzelle. Die Zelle war beim Cl^- -Umkehrpotential geklemmt, so daß nur erregende Ströme gemessen wurden. In dem Diagramm ist die übertragene Ladung in Abhängigkeit des Lichtreizdurchmessers aufgetragen. Die Reizantworten wurden jeweils auf den Maximalwert normiert. Unter Kontrollbedingungen besaß die Flächen-Variationskurve ein Maximum bei einem Durchmesser von $150 \mu\text{m}$ und wurde bei einem Durchmesser von $1200 \mu\text{m}$ auf 36 % des Maximalwertes reduziert. Durch die Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ TTX blieb der optimale Durchmesser gleich. Die Reizantwort bei einem Durchmesser von $1200 \mu\text{m}$ betrug nur noch 67 % des Maximalwertes. $V_h = -45 \text{ mV}$.

2.) Indirekte (präsynaptische) Umfeldhemmung

In dem folgenden Experiment wurde der Einfluß von TTX auf die Flächen-Variationskurven erregender synaptischer Ströme untersucht. Aus dem Ergebnis kann man ersehen, welchen Anteil der Hemmung von Bipolarzellen auf Aktionspotentialen beruht. In Abbildung 37 ist die Flächen-Variationskurve einer ON-Zentrum-Ganglienzelle dargestellt, die auf ein Potential von $V_h = -45$ mV geklemmt wurde. Bei diesem Haltepotential sind die gemessenen Ströme erregende synaptische Ströme. Die Zelle wurde durch kreisförmige Lichtreize stimuliert, sowie die übertragene Ladung der erregenden Ströme gemessen und auf den Maximalwert normiert. Unter Kontrollbedingungen wuchs die übertragene Ladung zunächst stetig mit dem Durchmesser an, erreichte ein Maximum bei etwa $150 \mu\text{m}$ und nahm bei größeren Durchmessern wieder ab. Bei einem Durchmesser von $1200 \mu\text{m}$ wurde die Reizantwort unter Kontrollbedingungen auf 36 % des Maximalwertes reduziert. Während der Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ TTX wurden die Reizantworten nur noch auf 67 % des Maximalwertes reduziert; der optimale Lichtreizdurchmesser wurde nicht verändert. Der Einfluß von TTX auf die Flächen-Variationskurven wurde bei 17 Ganglienzellen getestet. Unter Kontrollbedingungen wurde bei großen Lichtreizdurchmessern die Reizantwort im Mittel auf 32 ± 20 % des Maximalwertes reduziert. Durch die Applikation von $0,5$ TTX fiel die Reizantwort nur noch auf 62 ± 25 % des Maximums ab.

Die Annahme, daß GABAerge ‚wide field‘-Amakrinzellen durch Aktionspotentiale laterale Hemmung auf Bipolarzellen und Ganglienzellen übertragen, wird durch dieses Experiment bestätigt. Der Einfluß von TTX auf die indirekte laterale Hemmung war nicht so stark wie der von PTX. Indirekte Hemmung wird somit etwa zur Hälfte durch aktionspotentialerzeugende Amakrinzellen erzeugt, die andere Hälfte wird von Amakrinzellen beigetragen, die über graduierte Potentiale kommunizieren.

4. Diskussion

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik war es möglich an Ganglienzellen der isolierten, intakten Netzhaut des Kaninchens lichtinduzierte Ströme zu messen. Durch die Anwendung der Spannungsklemme konnte bei E_{Cl} das räumliche Profil erregender synaptischer Ströme und bei $E_{Na/K}$ das räumliche Profil synaptischer Hemmung bestimmt werden, und das Verhältnis von synaptischer Erregung und Hemmung bei verschiedenen Lichtreizdurchmessern gemessen werden. Durch gezielte Blockade der beteiligten Neurotransmitter und Neurotransmitterrezeptoren konnten prä- und postsynaptische Mechanismen getrennt werden.

4.1. Direkte laterale Hemmung retinaler Ganglienzellen

Taylor und Mitarbeiter (2000) haben in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit gezeigt, daß im Falle der richtungsspezifischen Ganglienzellen durch direkte Hemmung der Ganglienzellendriten richtungsspezifische Lichtantworten erzeugt werden (Taylor *et al.*, 2000). Wenn ein Lichtreiz in Nullrichtung der richtungsspezifischen Ganglienzelle bewegt wird, verhindern hemmende synaptische Ströme das Ausbilden von Aktionspotentialen. Die hemmenden Ströme werden in der IPL durch hemmende Synapsen von Amakrinzellen auf Ganglienzellen erzeugt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß diese direkte Hemmung der Lichtantworten nicht nur bei richtungsspezifischen Zellen auftritt, sondern daß direkte Hemmung bei der Erzeugung des hemmenden Umfelds (RFS) bei allen Ganglienzelltypen eine wichtige Rolle spielt.

Hemmende lichtinduzierte Ströme wurden gemessen, indem das Membranpotential auf das Umkehrpotential unspezifischer Kationenströme geklemmt wurde. Die unabhängige Messung von lichtinduzierten hemmenden und erregenden Strömen in Ganglienzellen ist stark von der Qualität des ‚space-clamp‘ abhängig (Velte und Miller, 1996). Die erregenden und hemmenden Synapsen sind bei retinalen Ganglienzellen gleichmäßig auf der Oberfläche der Dendriten verteilt (Freed und Sterling, 1988; Koulen *et al.*, 1996; Grünert, 2000; Macri *et al.*, 2000). Um erregende und hemmende synaptische Ströme unabhängig voneinander messen zu können, muß entlang der Dendriten das elektrische Potential den gleichen Wert haben. Die Computersimulationen von Velte und Miller zeigen, daß der Fehler durch schlechten ‚space-clamp‘ vernachlässigbar ist, wenn der Durchmesser des Dendritenbaums kleiner als 300 μm ist. Voraussetzung dafür ist, daß alle spannungsaktivierten Ionenkanäle blockiert werden. Durch die Blockade von spannungsaktivierten Ionenkanälen wird beim Ruhemembranpotential der Eingangswiderstand der Zelle erhöht und für alle eingestellten

Potentiale konstant gehalten. Auf diese Weise wird die Qualität des ‚space-clamp‘ deutlich verbessert. Trotz dieser Maßnahme werden durch Ganzfeldstimuli Ionenkanäle entlang der Ganglienzellendriten geöffnet, die wiederum den Eingangswiderstand der Zelle herabsetzen. Dieser systematische Fehler verringert die Amplitude erregender und hemmender Ströme aus den peripheren Bereichen des Dendritenbaums (Taylor *et al.*, 1996). Durch ringförmige Lichtreize kann beim Messen hemmender Ströme dieser Fehler minimiert werden, weil durch ‚reine‘ Umfeldreize nur wenige erregende Ströme in Ganglienzellen induziert werden. Bei Flächen-Variations-Messungen führt das ‚space-clamp-problem‘ sicherlich zu Verzerrungen der Meßergebnisse. Einerseits wird die Amplitude erregender Ströme bei großen Lichtreizdurchmessern durch große hemmende Ströme verringert. Andererseits wird die Amplitude der hemmenden Ströme bei allen Lichtreizdurchmessern verringert. Dies führt zu einer Überschätzung der indirekten Hemmung beim Messen der Flächen-Variationskurve erregender Ströme und zu einer Unterschätzung der Amplitude von hemmenden Strömen.

Durch das Messen des räumlichen Profils des hemmenden synaptischen Eingangs der Ganglienzelle konnte gezeigt werden, daß das RFS einen deutlich größeren Radius besitzt als das RFC. In Übereinstimmung mit älteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß der Durchmesser des RFC etwa dem Durchmesser des Dendritenbaums entspricht (Brown und Major, 1966; Creutzfeldt *et al.*, 1970; Peichl und Wässle, 1979; Peichl und Wässle, 1981; Peichl und Wässle, 1983; Amthor *et al.*, 1984; Amthor *et al.*, 1989a; Amthor *et al.*, 1989b; Yang und Masland, 1994). Hemmende Ströme konnten bevorzugt durch ringförmige Lichtreize, deren Innendurchmesser größer als der Dendritenbaum bzw. RFC-Durchmesser waren und durch große (1200 µm), kreisförmige Lichtreize gemessen werden. Dies bedeutet, daß Amakrinzellen mit relativ großen Dendritenbäumen die direkte, laterale Hemmung erzeugen (Bloomfield, 1992; Xin und Bloomfield, 1997). Es bleibt zu erwähnen, daß hemmende Ströme auch durch Stimulation mit kleinen Lichtreizdurchmessern gemessen wurden. Dies bestätigt das DOG-Modell von Rodieck (Rodieck, 1965), welches das RFC mit einer Gaußfunktion mit schmaler Halbwertsbreite und das RFS mit einer Gaußfunktion mit großer Halbwertsbreite beschreibt.

4.1.1. Abhängigkeit der direkten lateralen Hemmung von der intrazellulären Chloridionenkonzentration

Bei Anwendung der Stromklemme konnten lichtinduzierte Aktionspotentiale gemessen werden. Die Chloridionenkonzentration der dabei verwendeten KGlu-Intrazellulärlösung entspricht weitestgehend der natürlichen Chloridionenkonzentration im Cytosol der

Ganglienzelle (Miller und Dacheux, 1976c; Miller und Dacheux, 1976b; Miller *et al.*, 1981; Miller und Dacheux, 1983). Unter diesen Bedingungen konnte die Umfeldhemmung retinaler Ganglienzellen unter physiologischen Bedingungen gemessen werden. Die gemessenen Reizantworten entsprachen im wesentlichen den Reizantworten, welche *in vivo* oder mit scharfen Elektroden in der Augenbecherpräparation an retinalen Ganglienzellen gemessen wurden. Messungen an derselben Zelle mit einer hohen intrazellulären Chloridionenkonzentration zeigten, daß die Umfeldhemmung für große Lichtreizdurchmesser abnahm und in eine Umfeldregung umgewandelt werden konnte. Dies ist der Beweis dafür, daß direkte laterale Hemmung Chloridionenströme in der Zelle auslöst, welche die Entstehung von Aktionspotentialen verhindern.

4.1.2. Pharmakologische Charakterisierung der direkten lateralen Hemmung

In zahlreichen früheren Arbeiten wurden die Wirkung von Strychnin, Bicucullin und Picrotoxinin auf die Lichtantworten von Ganglienzellen in der Kaninchennetzhaut untersucht (Caldwell und Daw, 1978; Caldwell *et al.*, 1978; Daw und Ariel, 1981; Ariel und Daw, 1982; Jensen, 1989; Massey *et al.*, 1997; Roska und Werblin, 2001). Bisher wurde aber noch nicht die Wirkung dieser Pharmaka auf durch laterale Hemmung induzierte Chloridionenströme gemessen. Durch Badapplikation von Bicucullin, Strychnin und Picrotoxinin konnten die durch Umfeldreize induzierten hemmenden Ströme verringert oder vollständig geblockt werden. Dies zeigt, daß direkte laterale Hemmung durch GABA und glyzininduzierte Chloridionenströme erzeugt wird. Die Applikation von Bicucullin oder Picrotoxinin beeinflußt die Chloridionenströme in deutlich mehr Zellen als die Applikation von Strychnin. Dies zeigt, daß die direkte laterale Hemmung in Ganglienzellen der Kaninchennetzhaut durch GABA_A-Rezeptoren erzeugt wird und nicht durch Glyzinrezeptoren (Koulen *et al.*, 1998b; Demb *et al.*, 1999). Die Umfeldreize, kreisförmige Stimuli mit großem Durchmesser und ringförmige Stimuli, scheinen bevorzugt ‚wide field‘ Amakrinzellen zu reizen.

Daß in nur wenigen Ganglienzellen die hemmenden Ströme durch Strychnin beeinflußt wurden, ist überraschend, denn 50 % aller Amakrinzellen in der Säugetiernetzhaut sind glyzinerg (Pourcho und Goebel, 1985; Wässle *et al.*, 1986; Koontz *et al.*, 1993). Allerdings besitzen die meisten von ihnen nur kleine bis mittlere Dendritenbäume und sind deshalb nicht geeignet für die Übertragung von Hemmung über große Distanzen (Pourcho und Goebel, 1985; MacNeil und Masland, 1998; Menger *et al.*, 1998).

In Übereinstimmung mit anderen Studien wurde gezeigt, daß Tetrodotoxin in den meisten Fällen laterale Hemmung in der IPL verringert (Bloomfield, 1996; Cook *et al.*, 1998; Cook

und McReynolds, 1998; Demb *et al.*, 1999; Taylor, 1999). Einige der Subtypen von ‚wide-field‘ Amakrinzellen erzeugen in ihren Dendriten Aktionspotentiale und können dadurch Signale über mehrere hundert Mikrometer übertragen (Kaninchen-Netzhaut: (Bloomfield, 1992; Bloomfield, 1996; Taylor, 1996) andere Wirbeltiere: (Miller und Dacheux, 1976a; Barnes und Werblin, 1986; Eliasof *et al.*, 1987; Ammermüller und Weiler, 1988; Cook und Werblin, 1994; Stafford und Dacey, 1997; Feigenspan *et al.*, 1998)). Ein Lichtreiz in der rezeptiven Feldperipherie der Ganglienzelle erzeugt an diesem Retinaort Aktionspotentiale in einer hemmenden ‚wide field‘ Amakrinzelle. Die Aktionspotentiale breiteten sich entlang der Fortsätze der Amakrinzelle aus. An einer Amakrinzell-Ganglienzellsynapse wird durch das Aktionspotential hemmender Neurotransmitter von der Amakrinzelle freigesetzt. Die Reduktion hemmender Chloridionenströme durch Tetrodotoxin ist auf die Blockade aktionspotentialabhängiger hemmender Signale in ‚wide field‘ Amakrinzellen zurückzuführen.

Die direkte laterale Hemmung von retinalen Ganglienzellen konnte in beinahe allen Zellen der vorliegenden Arbeit gemessen werden. Direkte laterale Hemmung induziert Chloridionenströme in der Ganglienzellmembran, welche die Entladungsraten der Ganglienzellen maßgeblich beeinflusst. Der Chloridionenstrom wird hauptsächlich durch die Ausschüttung von GABA durch aktionspotentialerzeugende ‚wide field‘ Amakrinzellen erzeugt. An den hemmenden Synapsen mit den Amakrinzellen, welche für die direkte laterale Hemmung verantwortlich sind, exprimieren Ganglienzellen hauptsächlich GABA_A-Rezeptoren. Der Aufbau des rezeptiven Feldes von Ganglienzellen der Kaninchennetzhaut wird somit, zumindest teilweise, postsynaptisch in den Ganglienzellendriten ‚berechnet‘.

4.2. Indirekte laterale Hemmung retinaler Ganglienzellen

4.2.1. Innere plexiforme Schicht

Eine Vielzahl von Amakrinzellen bilden synaptische Kontakte mit dem Axonende von Bipolarzellen in der IPL der Kaninchennetzhaut (Ehinger und Holmgren, 1979; Ehinger, 1983; Raviola und Dacheux, 1987; Chun und Wässle, 1989; Pourcho und Owczarzak, 1989; Sandell *et al.*, 1989; Koontz und Hendrickson, 1990; Strettoi *et al.*, 1990; Pourcho und Owczarzak, 1991b; Pourcho und Owczarzak, 1991a; Massey *et al.*, 1992; Grünert und Wässle, 1993). Bipolarzellen exprimieren an diesen Synapsen verschiedene Isoformen des GABA_A-Rezeptors, GABA_C-Rezeptoren und Glyzinrezeptoren (Sassoe-Pognetto *et al.*, 1994; Fletcher *et al.*, 1998; Fletcher und Wässle, 1999; Grünert, 2000).

Patch-Clamp-Messungen an dissoziierten Bipolarzellen zeigten, daß Chloridionenströme durch lokale Applikation von GABA und Glyzin am Axonende induziert werden können (Karschin und Wässle, 1990; Suzuki *et al.*, 1990; Pan und Lipton, 1995). Durch Applikation von GABA induzierte Chloridionenströme in Bipolarzellen konnten auch in der Schnittpräparation der Netzhaut gemessen werden (Lukasiewicz und Wong, 1997; Euler und Wässle, 1998; Lukasiewicz und Shields, 1998; Hartveit, 1999; McGillem *et al.*, 2000). Chloridionenströme hyperpolarisieren das Axonende der Bipolarzellen und verringern auf diese Weise die Offenwahrscheinlichkeit der spannungsaktivierten Kalziumionenkanäle (Heidelberger und Matthews, 1991; Heidelberger und Matthews, 1992). Dadurch wird der Kalziumioneneinstrom in das Axonende verhindert und die Ausschüttung von Glutamat gestoppt (Heidelberger *et al.*, 1994; Protti und Llano, 1998; Hartveit, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde die Hemmung der Bipolarzelle durch die Isolierung des erregenden Stroms in Ganglienzellen nachgewiesen. Der Rückgang des erregenden synaptischen Stroms in Ganglienzellen kann auf eine Abnahme der Konzentration von Glutamat in der Bipolarzell-Ganglienzellsynapse zurückgeführt werden (Bloomfield und Dowling, 1985; Massey und Redburn, 1987; Massey und Miller, 1988). Der Abfall der Flächen-Variationskurve erregender Ströme für große Stimulusdurchmesser zeigt, daß Bipolarzellen lateral gehemmt werden. Durch Applikation von Tetrodotoxin konnte der in den Kontrollexperimenten gemessene Abfall der Flächen-Variationskurve deutlich verringert werden. Dies zeigt, daß die indirekte laterale Hemmung von Ganglienzellen in der IPL auch durch aktionspotentialerzeugende ‚wide field‘ Amakrinzellen erzeugt wird.

4.2.2. Äußere plexiforme Schicht

Es gibt mehrere Möglichkeiten wie Horizontalzellen in der äußeren plexiformen Schicht Lichtsignale in Bipolarzellen hemmen können. Im folgenden werden vier solche Mechanismen diskutiert:

1.) Stäbchen- und Zapfenphotorezeptoren der Säugetiernetzhaut exprimieren $GABA_A$ und $GABA_C$ -Rezeptoren (Picaud *et al.*, 1998; Pattnaik *et al.*, 2000). Die Freisetzung von GABA durch Horizontalzellen kann deswegen Photorezeptoren hemmen (Murakami *et al.*, 1982; Yazulla und Kleinschmidt, 1983; Tachibana und Kaneko, 1984; Kaneko und Tachibana, 1986a; Kaneko und Tachibana, 1986b; Schwartz, 1987; Cammack und Schwartz, 1993; Schwartz, 1999). Durch diese Rückwärtshemmung wird die Ausschüttung von Glutamat an der Photorezeptor-Bipolarzellsynapse moduliert.

2.) Ein alternatives elektrisches Modell für die Rückwärtshemmung von Photorezeptoren durch Horizontalzellen (ohne die Beteiligung von GABA) wurde erstmals von Byzov und Shura-Bura vorgeschlagen (Byzov und Shura-Bura, 1986). Durch Änderung des Membranpotentials von Horizontalzellen wird das Potential des Extrazellulärraumes im ‚cone pedicle‘ beeinflusst (Verweij *et al.*, 1996; Kraaij *et al.*, 1998; Kamermans und Spekreijse, 1999). Dadurch kann die Aktivierungskurve spannungsabhängiger Kalziumionenkanäle beeinflusst werden (Fahrenfort *et al.*, 1999), welche im ‚cone pedicle‘ lokalisiert sind (Krizaj und Copenhagen, 1998; Morgans *et al.*, 1998; Taylor und Morgans, 1998). Die Änderung in der Aktivierungskurve für spannungsabhängige Kalziumionenkanäle beeinflusst die Freisetzung von Glutamat in der ‚cone pedicle‘-Synapse (Fahrenfort *et al.*, 1999; Kamermans und Spekreijse, 1999; Kraaij *et al.*, 2000; Kamermans *et al.*, 2001).

3.) Durch Antikörperfärbungen in der Säugetiernetzhaut konnte nachgewiesen werden, daß Bipolarzeldendriten in der OPL $GABA_A$ -Rezeptoren (Greferath *et al.*, 1994; Vardi und Sterling, 1994) und $GABA_C$ -Rezeptoren exprimieren (Enz *et al.*, 1996; Haverkamp *et al.*, 2000). Die lichtinduzierte Freisetzung von GABA durch Horizontalzellen (Schwartz, 1987; Schwartz, 1999) könnte die Dendriten der Bipolarzellen lateral hemmen. Für dieses Modell der Vorwärtshemmung muß allerdings postuliert werden, daß in den Dendriten von OFF-Bipolarzellen eine niedrige und in den Dendriten von ON-Bipolarzellen eine hohe Chloridionenkonzentration vorhanden sind. In diesem Fall werden OFF-Bipolarzellen durch Erhöhung der GABA-Konzentration und ON-Bipolarzellen durch die Verringerung der GABA-Konzentration gehemmt. Ein Dunkelreiz verursacht die Freisetzung von GABA und könnte so OFF-Bipolarzellen hemmen. Licht induziert die Aufnahme von GABA durch

Horizontalzellen (Schwartz, 1987; Schwartz, 1999). Durch die Abnahme der Konzentration von GABA an den Dendriten könnten ON-Bipolarzellen gehemmt werden. In einer neueren Arbeit von Vardi und Mitarbeitern (2000) konnte gezeigt werden, daß Vorwärtshemmung auf Bipolarzeldendriten von ON- und OFF-Bipolarzellen tatsächlich möglich ist (Vardi *et al.*, 2000). Durch Antikörperfärbungen konnte der Chloridionentransporter KCC2 (Russell, 2000) im Axonende von ON- und OFF-Bipolarzellen sowie in den Dendriten von OFF-Bipolarzellen lokalisiert werden. Dieser Chloridionentransporter hält höchstwahrscheinlich die Chloridionenkonzentration in den Dendriten und im Axonende niedrig. In den Dendriten von ON-Bipolarzellen wurde ein anderer Chloridionentransporter gefunden (NKCC). Dieser erzeugt mit großer Wahrscheinlichkeit lokal eine hohe Chloridionenkonzentration in den Dendriten.

4.) Auch interplexiforme Zellen besitzen GABAerge synaptische Kontakte mit Bipolarzeldendriten (Chun und Wässle, 1989) und erzeugen Na⁺-abhängige Aktionspotentiale (Maguire *et al.*, 1990; Gustincich *et al.*, 1997). Durch Applikation von Tetrodotoxin könnte die Ausschüttung von GABA durch interplexiforme Zellen blockiert werden. Der beobachtete Rückgang der direkten Hemmung in Ganglienzellen unter Tetrodotoxin ließe sich damit allerdings nicht erklären. Die interplexiformen Zellen in der Kaninchennetzhaut sind sehr selten und überdecken mit ihren Dendriten höchstwahrscheinlich nicht die gesamte Netzhaut (Boycott *et al.*, 1975; Oyster und Takahashi, 1977). Deshalb ist sehr unwahrscheinlich, daß sie eine Rolle bei indirekter Hemmung von Ganglienzellen spielen (Taylor, 1999).

Obwohl der genaue Mechanismus lateraler Hemmung in der OPL noch nicht bekannt ist, wurde in eleganten physiologischen Experimenten von Mangel gezeigt, daß im Kaninchen Horizontalzellen eine große Rolle bei der lateralen Hemmung von Ganglienzellen spielen (Mangel und Miller, 1987; Mangel, 1991). In der Augenbecherpräparation der injizierte er Ströme in Horizontalzellen und maß gleichzeitig mit extrazellulären Elektroden die Entladungsrate der Ganglienzellen. Durch Hyperpolarisation der Horizontalzellen konnten Umfeldantworten in den Ganglienzellen erzeugt werden. Da Horizontalzellen nicht in synaptischem Kontakt mit Ganglienzellen stehen, kann dieser Befund nur durch laterale Hemmung in der OPL erklärt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte in einigen Ganglienzellen die laterale Hemmung vollständig durch Picrotoxinin unterdrückt werden. Picrotoxinin blockt im Kaninchen GABA_A, GABA_C und einige glyzingesteuerten Chloridionenkanäle. Dieser experimentelle Befund schließt aus, daß eine Rückwärtshemmung

durch ‚electrical feedback‘ (das 2. Modell, welches vorher diskutiert wurde) eine Rolle bei der lateralen Hemmung von Ganglienzellen im Kaninchen spielt (Kammerman und Spekreijse, 1999).

Durch laterale Hemmung wurde unter Kontrollbedingungen in Ganglienzellen die Reizantwort auf 32 ± 20 % des Maximalwertes reduziert. Durch das Blockieren aller GABA_A, GABA_C und einiger Glyzinrezeptoren in der Netzhaut durch Picrotoxinin wurde die Hemmung signifikant auf 83 ± 12 % reduziert. Durch Tetrodotoxin wurde die indirekte laterale Hemmung nur auf 62 ± 25 % reduziert. Anhand dieser Befunde würde etwa die Hälfte der gesamten indirekten Hemmung in der OPL erzeugt.

Alle in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse scheinen für alle Klassen von Ganglienzellen in der Kaninchennetzhaut zu gelten. Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, daß von einigen Ganglienzelltypen nur wenige Messungen vorgenommen wurden und daß andere Ganglienzellen nicht in der Stichprobe enthalten waren. Dafür gibt es verschiedene Gründe:

1. In den Experimenten wurde versucht, an Zellen mit einem mittelgroßen Soma zu messen. Zellen mit sehr großem Soma wiesen oft einen schlechten ‚space-clamp‘ auf. Zellen mit einem kleinen Soma waren mit großer Wahrscheinlichkeit ektopische Amakrinezellen (Vaney, 1980).
2. Nur etwa 50 % der gemessenen Ganglienzellen konnten morphologisch identifiziert werden. Aus diesem Grund besteht keine Gewißheit darüber, ob unter den 105 gemessenen Ganglienzellen jeder Ganglienzelltyp mindestens einmal vorkommt.
3. Einige Zellen besitzen, unabhängig von ihrer Exzentrizität, einen großen stark verzweigten Dendritenbaum. Es ist möglich, daß der ‚space-clamp‘ in diesen Zellen zu schlecht ist, um aussagekräftige Patch-Clamp-Messungen an ihnen vorzunehmen (Koch, 1984; Velte und Miller, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß laterale Hemmung in Ganglienzellen durch direkte und indirekte Hemmung der Ganglienzelle erzeugt wird. Direkte Hemmung der Ganglienzelle wird in etwa der Hälfte aller Fälle durch aktionspotentialerzeugende GABAerge ‚wide field‘ Amakrinzellen verursacht. Indirekte Hemmung wird in der IPL ebenfalls durch aktionspotentialerzeugende GABAerge ‚wide field‘ Amakrinzellen erzeugt, die das Axonende der Bipolarzellen hemmen. In der OPL wird laterale Hemmung durch

GABAerge Horizontalzellen übertragen. Es konnte nicht geklärt werden, ob Horizontalzellen Photorezeptoren (Rückwärtshemmung) oder Bipolarzellendendriten hemmen (Vorwärtshemmung). Außerdem wird durch schlechten ‚space-clamp‘ sicherlich die Stärke der indirekten Hemmung überschätzt. Experimente mit DNDS (4,4'-dinitro stilbene-2,2'-disulfonate), einem intrazellulären Chloridionenkanalblocker, in der Patch-Elektrode könnten klären, wieviel von der gemessenen indirekten Hemmung durch schlechten ‚space-clamp‘ verursacht wird (Frohlich, 1982; DeBin *et al.*, 1994).

Wie groß ist der Einfluß der direkten, wie groß ist der Einfluß der indirekten lateralen Hemmung auf die Entladungsrate? Dies könnte durch Messen der Entladungsrate im Stromklemmemodus der Patch-Clamp-Technik mit und ohne DNDS in der Elektrode herausgefunden werden. Eine weitere Methode, dies herauszufinden wäre zunächst die Entladungsrate mit einer extrazellulären Elektrode zu messen (Roska und Werblin, 2001). Anschließend müßte mit einer Patch-Elektrode die Flächen-Variationskurve des hemmenden Eingangs der Zelle gemessen werden. Mit einer neuen, mit DNDS gefüllten Elektrode müßte im Anschluß an derselben Zelle die Flächen-Variationskurve des erregenden Stroms gemessen werden. Auf diese Weise könnte der gemessene lichtinduzierte synaptische Strom mit der Entladungsrate in Beziehung gesetzt werden (Diamond und Copenhagen, 1995).

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte nicht bestimmt werden, ob sich die Ortskonstanten der Hemmung in der OPL oder der IPL unterscheiden. Es könnte sein, daß die durch das DOG-Modell postulierte Gaußfunktion für das RFS eine Überlagerung aus zwei unterschiedlichen Gaußfunktionen mit negativem Vorzeichen ist. Die Hemmung in der OPL und in der IPL könnte sich zusätzlich in ihrem zeitlichen Verhalten unterscheiden. Um dies zu überprüfen, müßte die Möglichkeit bestehen die laterale Hemmung durch Horizontal- oder Amakrinzellen selektiv pharmakologisch zu trennen. Durch die kompetitive Hemmung von AMPA/Kainat-Rezeptoren mit Quinoxalin (NBQX) konnte die laterale Hemmung in Ganglienzellen reduziert werden (Protti *et al.*, 2000b). Um jedoch die Einflüsse von Horizontal- und Amakrinzellen im Detail zu entschlüsseln, ist zu wenig über die Isoformen von Glutamatrezeptoren bei Amakrinzellen und Horizontalzellen bekannt und außerdem können Glutamatrezeptoren in nur wenigen Ausnahmen isoformspezifisch gehemmt werden (Bleakman, 1999; Gates *et al.*, 2001; Miu *et al.*, 2001). Cohen konnte zeigen, daß ein Typ von Horizontalzellen bevorzugt durch das Quinoxalin (DNQX) gehemmt wird (Cohen und Miller, 1999; Cohen, 2000). Allerdings ist aufgrund der Vielzahl von Amakrinzellen nicht auszuschließen, daß auch Amakrinzellen, welche Ganglienzellen lateral hemmen, durch DNQX gehemmt werden.

Die Reizantworten von Ganglienzellen in der Kaninchennetzhaut zeigen große Unterschiede in ihrem zeitlichen Verlauf (Amthor *et al.*, 1989a; Amthor *et al.*, 1989b; Roska und Werblin, 2001). Es ist denkbar, daß jeder Ganglienzelltyp durch die vorgestellten Mechanismen gehemmt wird, daß aber zu verschiedenen Zeitpunkten der Lichtantwort der eine oder der andere hemmende Mechanismus überwiegt. In diesem Sinne könnten Horizontalzellen eine tonische, lang andauernde Hemmung einspeisen, während Amakrinzellen bei Belichtungsänderungen ein schnelles, phasisches hemmendes Signal beitragen könnten.

5. Zusammenfassung

Der Bereich auf der Netzhaut, aus dem Ganglienzellen Lichtsignale erhalten, wird rezeptives Feld genannt. Er umfaßt einen erregenden, zentralen Teil, das rezeptive Feldzentrum, und einen hemmenden, peripheren Teil, das Umfeld. Die antagonistische Organisation (erregendes Zentrum/hemmendes Umfeld) des rezeptiven Feldes verbessert die Signalverarbeitung, indem Kontraste verstärkt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mechanismen der Umfeldhemmung an der isolierten, intakten Kaninchennetzhaut zu untersuchen.

Das rezeptive Feldzentrum wird durch den erregenden Kontakt zwischen Photorezeptor \Rightarrow Bipolarzelle \Rightarrow Ganglienzelle erzeugt. Visuelle Stimulation des rezeptiven Feldzentrums erhöht die Entladungsrate (Anzahl der Aktionspotentiale pro Zeiteinheit) der Ganglienzelle. Die Erhöhung der Entladungsrate wird durch die Freisetzung des erregenden Transmitters Glutamat aus präsynaptischen Bipolarzellen bewirkt.

Eine Belichtung des Umfeldes hat den entgegengesetzten Effekt: die Entladungsrate der Ganglienzelle wird verringert. Die Umfeldantwort der Ganglienzelle wird durch die laterale Hemmung in der OPL (äußere Synapsenschicht) und der IPL (innere Synapsenschicht) erzeugt. In der OPL wird die Signalübertragung von GABAergen Horizontalzellen moduliert, indem sie Photorezeptoren und/oder Bipolarzellen hemmen. In der IPL modulieren Amakrinzellen, die entweder GABAerg oder glyzinerg sein können, die Signalübertragung, indem sie Bipolarzellen und/oder Ganglienzellen hemmen. Die Entladungsrate von retinalen Ganglienzellen wird bei Belichtung des Umfeldes somit auf zwei Arten verringert: entweder werden präsynaptische Zellen (Photorezeptoren, Bipolarzellen) gehemmt oder die Ganglienzelle wird direkt durch Amakrinzellen gehemmt. Im ersten Fall schütten Bipolarzellen weniger Glutamat aus (indirekte laterale Hemmung), im zweiten Fall wird durch hemmende Neurotransmitter (GABA oder Glyzin) ein Einstrom von Chloridionen in die Dendriten der Ganglienzellen hervorgerufen (direkte laterale Hemmung).

Es ist bisher noch unklar, zu welchem Anteil direkte und indirekte laterale Hemmung an der Umfeldantwort beteiligt sind. Weiterhin ist nicht bekannt, welche Neurotransmitterrezeptoren bei der Erzeugung des hemmenden Umfeldes eine Rolle spielen.

Um dies zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit lichtinduzierte, synaptische Ströme von retinalen Ganglienzellen an der isolierten, intakten Kaninchenetzhaut gemessen. Dabei wurde die Netzhaut von vorher eingeschlaferten Kaninchen freipräpariert und anschließend in einer mit Sauerstoff angereicherten Extrazellulärlösung aufbewahrt. An diesem isolierten, intakten Netzhaut-Präparat (*in vitro* Retina) konnten bis zu acht Stunden Lichtantworten gemessen werden. Die lichtinduzierten Ströme wurden in der

Ganzzellkonfiguration der Patch-Clamp-Technik in der Spannungsklemme gemessen. Die Meßkammer mit der flach ausgebreiteten Netzhaut befand sich auf einem Mikroskoptisch. Das Mikroskop war mit einer Infrarot-Differentialinterferenz-Optik (Nomarski-Optik) ausgestattet und die Mikroelektroden konnten unter Sichtkontrolle mit Hilfe eines Mikromanipulators an die Zellkörper herangefahren werden. Kreisförmige und ringförmige Lichtmuster mit verschiedenen Durchmessern, wurden auf einem Computerbildschirm erzeugt und durch den Mikroskopkondensator auf den Boden der Meßkammer projiziert.

Erregende Ströme retinaler Ganglienzellen konnten isoliert werden, indem das Membranpotential der Zelle auf das Umkehrpotential für Chloridionen eingestellt wurde. Die erregenden Ströme wurden durch Belichtung des Umfeldes stark verringert. Dies wird durch die verminderte Freisetzung von Glutamat durch Bipolarzellen verursacht und ist ein Hinweis auf eine indirekte, laterale Hemmung der Ganglienzelle. Durch die Zugabe des GABA-Rezeptorblockers Picrotoxinin in die Nährlösung (Badapplikation) konnte die Umfeldhemmung der meisten Ganglienzellen nahezu vollständig aufgehoben werden. Dieses Ergebnis zeigt, daß präsynaptische GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Umfeldhemmung spielen.

Direkte hemmende Chloridionenströme konnten isoliert werden, indem das Membranpotential der Zelle auf das Umkehrpotential für erregende Ströme eingestellt wurde. Durch Beleuchtung des Umfeldes wurden Chloridionenströme in Ganglienzellen ausgelöst. Dies ist ein Hinweis auf eine direkte, laterale Hemmung der Ganglienzelle durch Amakrinzellen, die zusätzlich zur indirekten Hemmung erfolgt. Bei Anwendung der Stromklemme der Patch-Clamp-Technik konnte nachgewiesen werden, daß Chloridionenströme die Entladungsrate der Zelle beeinflussen. Durch die Badapplikation von Picrotoxinin und durch die Überströmung mit dem GABA_A-Rezeptorhemmer Bicucullin wurden die Chloridionenströme deutlich verringert. Durch den Glyzinrezeptorblocker Strychnin konnten die hemmenden Ströme nur bei wenigen Zellen verringert werden. Dies ist ein Hinweis auf eine direkte Hemmung der Ganglienzelle über GABA_A-Rezeptoren. In den meisten Ganglienzellen konnten direkte und indirekte Hemmung durch die Badapplikation von Tetrodotoxin verringert werden. Tetrodotoxin hemmt das Entstehen von Aktionspotentialen und das Ergebnis zeigt, daß ‚wide-field‘ Amakrinzellen, die über Aktionspotentiale kommunizieren zur Umfeldhemmung beitragen.

Bisherige Modelle gingen davon aus, daß Interaktionen zwischen Horizontalzellen, Photorezeptoren und Bipolarzellen in der OPL die Hauptursache für die Umfeldhemmung

sind. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß Interaktionen zwischen Amakrinzellen, Bipolarzellen und Ganglienzellen wesentlich zur Umfeldhemmung beitragen.

In der Netzhaut gibt es zwischen 12 und 15 Ganglienzelltypen, die auf unterschiedliche Mustermerkmale wie z. B. Farbe, Kontrast oder Bewegung reagieren. Alle bisher untersuchten Ganglienzelltypen verringern bei einer Reizung des Umfeldes ihre Entladungsrate. Ist bei allen Ganglienzelltypen der Beitrag von Horizontal- und Amakrinzellen zur Umfeldhemmung sowie der Anteil von direkter und indirekter lateraler Hemmung gleich? Oder gibt es für jeden Ganglienzelltyp aufgrund seiner physiologischen und morphologischen Ausprägung verschiedene Mechanismen der lateralen Hemmung? Diese Fragen könnten durch die Entwicklung von Pharmaka, welche selektiv Horizontalzellen bzw. Amakrinzellen hemmen, untersucht werden. Die Anwendung dieser Substanzen könnte den Beitrag dieser Zellen zur Umfeldhemmung eines bestimmten Ganglienzelltyps nachweisen. Gleichzeitig könnte die indirekte Hemmung von retinalen Ganglienzellen durch intrazelluläre Applikation von Chloridionenkanalblockern viel genauer als bisher gemessen werden, da auf diese Weise erregende synaptische Ströme besser isoliert werden können. Durch die Kombination dieser beiden Methoden könnte für jeden Ganglienzelltyp der Netzhaut die zellulären und synaptischen Mechanismen der Umfeldhemmung detailliert beschrieben werden.

6. Literaturverzeichnis

- Ames, A., 3rd und Nesbett, F. B. (1981). "In vitro retina as an experimental model of the central nervous system." *J Neurochem* **37**(4): 867-77.
- Ammermüller, J. und Weiler, R. (1988). "Physiological and morphological characterization of OFF-center amacrine cells in the turtle retina." *J Comp Neurol* **273**(2): 137-48.
- Amthor, F. R., Oyster, C. W. und Takahashi, E. S. (1984). "Morphology of on-off direction-selective ganglion cells in the rabbit retina." *Brain Res* **298**(1): 187-90.
- Amthor, F. R., Takahashi, E. S. und Oyster, C. W. (1989a). "Morphologies of rabbit retinal ganglion cells with complex receptive fields." *J Comp Neurol* **280**(1): 97-121.
- Amthor, F. R., Takahashi, E. S. und Oyster, C. W. (1989b). "Morphologies of rabbit retinal ganglion cells with concentric receptive fields." *J Comp Neurol* **280**(1): 72-96.
- Ariel, M. und Daw, N. W. (1982). "Pharmacological analysis of directionally sensitive rabbit retinal ganglion cells." *J Physiol* **324**: 161-85.
- Backus, K. H., Deitmer, J. W. und Friauf, E. (1998). "Glycine-activated currents are changed by coincident membrane depolarization in developing rat auditory brainstem neurones." *J Physiol* **507**(Pt 3): 783-94.
- Barlow, H. B., Fitzhugh, R. und Kuffler, S. W. (1957). "Change of organisation in the receptive fields of cat's retina during dark adaptation." *J Physiol* **200**: 338-354.
- Barnes, S. und Werblin, F. (1986). "Gated currents generate single spike activity in amacrine cells of the tiger salamander retina." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(5): 1509-12.
- Barry, P. H. (1994). "JPCalc, a software package for calculating liquid junction potential corrections in patch-clamp, intracellular, epithelial and bilayer measurements and for correcting junction potential measurements." *J Neurosci Methods* **51**(1): 107-16.
- Belgum, J. H., Dvorak, D. R. und McReynolds, J. S. (1982a). "Light-evoked sustained inhibition in mudpuppy retinal ganglion cells." *Vision Res* **22**(2): 257-60.
- Belgum, J. H., Dvorak, D. R. und McReynolds, J. S. (1982b). "Sustained synaptic input to ganglion cells of mudpuppy retina." *J Physiol* **326**: 91-108.
- Belgum, J. H., Dvorak, D. R. und McReynolds, J. S. (1983). "Sustained and transient synaptic inputs to on-off ganglion cells in the mudpuppy retina." *J Physiol* **340**: 599-610.

- Bleakman, D. (1999). "Kainate receptor pharmacology and physiology." *Cell Mol Life Sci* **56**(7-8): 558-66.
- Bloomfield, S. A. (1992). "Relationship between receptive and dendritic field size of amacrine cells in the rabbit retina." *J Neurophysiol* **68**(3): 711-25.
- Bloomfield, S. A. (1996). "Effect of spike blockade on the receptive-field size of amacrine and ganglion cells in the rabbit retina." *J Neurophysiol* **75**(5): 1878-93.
- Bloomfield, S. A. und Dowling, J. E. (1985). "Roles of aspartate and glutamate in synaptic transmission in rabbit retina. II. Inner plexiform layer." *J Neurophysiol* **53**(3): 714-25.
- Bolz, J., Rosner, G. und Wässle, H. (1982). "Response latency of brisk-sustained (X) and brisk-transient (Y) cells in the cat retina." *J Physiol (Lond)* **328**: 171-90.
- Bormann, J., Hamill, O. P. und Sakmann, B. (1987). "Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones." *J Physiol* **385**: 243-86.
- Boycott, B. und Dowling, J. E. (1969). "Organisation of the primate retina: Light microscopy." *Phil Trans Roy Soc London B* **255**: 109-176.
- Boycott, B. und Wässle, H. (1999). "Parallel processing in the mammalian retina: the Proctor Lecture." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**(7): 1313-27.
- Boycott, B. B., Dowling, J. E., Fisher, S. K., Kolb, H. und Laties, A. M. (1975). "Interplexiform cells of the mammalian retina and their comparison with catecholamine-containing retinal cells." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **191**(1104): 353-68.
- Boycott, B. B. und Wässle, H. (1974). "The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina." *J Physiol (Lond)* **240**(2): 397-419.
- Brandstätter, J. H. und Hack, I. (2001). "Localization of glutamate receptors at a complex synapse. The mammalian photoreceptor synapse." *Cell Tissue Res* **303**(1): 1-14.
- Brandstätter, J. H., Koulen, P. und Wässle, H. (1998). "Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina." *Vision Res* **38**(10): 1385-97.
- Brown, J. E. und Major, D. (1966). "Cat retinal ganglion cell dendritic fields." *Exp Neurol* **15**(1): 70-8.

- Byzov, A. L. und Shura-Bura, T. M. (1986). "Electrical feedback mechanism in the processing of signals in the outer plexiform layer of the retina." *Vision Res* **26**(1): 33-44.
- Caldwell, J. H. und Daw, N. W. (1978). "Effects of picrotoxin and strychnine on rabbit retinal ganglion cells: changes in centre surround receptive fields." *J Physiol* **276**: 299-310.
- Caldwell, J. H., Daw, N. W. und Wyatt, H. J. (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.
- Cammack, J. N. und Schwartz, E. A. (1993). "Ions required for the electrogenic transport of GABA by horizontal cells of the catfish retina." *J Physiol* **472**: 81-102.
- Chun, M. H. und Wässle, H. (1989). "GABA-like immunoreactivity in the cat retina: electron microscopy." *J Comp Neurol* **279**(1): 55-67.
- Cleland, B. G., Dubin, M. W. und Levick, W. R. (1971). "Sustained and transient neurones in the cat's retina and lateral geniculate nucleus." *J Physiol (Lond)* **217**(2): 473-96.
- Cleland, B. G., Levick, W. R. und Sanderson, K. J. (1973). "Properties of sustained and transient ganglion cells in the cat retina." *J Physiol (Lond)* **228**(3): 649-80.
- Cohen, E. D. (1998). "Interactions of inhibition and excitation in the light-evoked currents of X type retinal ganglion cells." *J Neurophysiol* **80**(6): 2975-90.
- Cohen, E. D. (2000). "Light-evoked excitatory synaptic currents of X-type retinal ganglion cells." *J Neurophysiol* **83**(6): 3217-29.
- Cohen, E. D. und Miller, R. F. (1999). "The network-selective actions of quinoxalines on the neurocircuitry operations of the rabbit retina." *Brain Res* **831**(1-2): 206-28.
- Coltman, J. W. (1954). "The specification of imaging properties by response to a sine wave input." *J Opt Soc Am A* **44**: 468-471.
- Connors, B. W. und Prince, D. A. (1982). "Effects of local anesthetic QX-314 on the membrane properties of hippocampal pyramidal neurons." *J Pharmacol Exp Ther* **220**(3): 476-81.
- Cook, P. B., Lukasiewicz, P. D. und McReynolds, J. S. (1998). "Action potentials are required for the lateral transmission of glycinergic transient inhibition in the amphibian retina." *J Neurosci* **18**(6): 2301-8.

- Cook, P. B. und McReynolds, J. S. (1998). "Lateral inhibition in the inner retina is important for spatial tuning of ganglion cells." *Nat Neurosci* **1**(8): 714-9.
- Cook, P. B. und Werblin, F. S. (1994). "Spike initiation and propagation in wide field transient amacrine cells of the salamander retina." *J Neurosci* **14**(6): 3852-61.
- Crescitelli, F. und Sickel, E. (1968). "Delayed off-responses recorded from the isolated frog retina." *Vision Res* **8**(7): 801-16.
- Creutzfeldt, O. und Sakmann, B. (1969). "Neurophysiology of vision." *Annu Rev Physiol* **31**: 499-544.
- Creutzfeldt, O. D., Sakmann, B., Scheich, H. und Korn, A. (1970). "Sensitivity distribution and spatial summation within receptive-field center of retinal on-center ganglion cells and transfer function of the retina." *J Neurophysiol* **33**(5): 654-71.
- Dacey, D. M. (1993). "The mosaic of midget ganglion cells in the human retina." *J Neurosci* **13**(12): 5334-55.
- Dacey, D. M. und Petersen, M. R. (1992). "Dendritic field size and morphology of midget and parasol ganglion cells of the human retina." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(20): 9666-70.
- Dacheux, R. F. und Miller, R. F. (1976). "Photoreceptor-bipolar cell transmission in the perfused retina eyecup of the mudpuppy." *Science* **191**(4230): 963-4.
- Dallwig, R., Deitmer, J. W. und Backus, K. H. (1999). "On the mechanism of GABA-induced currents in cultured rat cortical neurons." *Pflugers Arch* **437**(2): 289-97.
- Daw, N. W. und Ariel, M. (1981). "Effect of synaptic transmitter drugs on receptive fields of rabbit retinal ganglion cells." *Vision Res* **21**(11): 1643-7.
- DeBin, J. A., Wood, M. R., Pfenninger, K. H. und Strichartz, G. R. (1994). "A chloride channel reconstituted from fetal rat brain growth cones." *J Membr Biol* **141**(1): 7-19.
- Demb, J. B., Haarsma, L., Freed, M. A. und Sterling, P. (1999). "Functional circuitry of the retinal ganglion cell's nonlinear receptive field." *J Neurosci* **19**(22): 9756-67.
- Diamond, J. S. und Copenhagen, D. R. (1995). "The relationship between light-evoked synaptic excitation and spiking behaviour of salamander retinal ganglion cells." *J Physiol* **487**(Pt 3): 711-25.
- Dowling, J. E. (1987). "The Retina." Belknap Press of Harvard University Press.

- Dowling, J. E. und Werblin, F. S. (1969). "Organization of retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. I. Synaptic structure." *J Neurophysiol* **32**(3): 315-38.
- Dowling, J. E. und Werblin, F. S. (1971). "Synaptic organization of the vertebrate retina." *Vision Res Suppl*(3): 1-15.
- Ehinger, B. (1983). "Connexions between retinal neurons with identified neurotransmitters." *Vision Res* **23**(11): 1281-91.
- Ehinger, B. und Holmgren, I. (1979). "Electron microscopy of the indoleamine-accumulating neurons in the retina of the rabbit." *Cell Tissue Res* **197**(2): 175-94.
- Eliasof, S., Barnes, S. und Werblin, F. (1987). "The interaction of ionic currents mediating single spike activity in retinal amacrine cells of the tiger salamander." *J Neurosci* **7**(11): 3512-24.
- Enroth-Cugell, C. und Robson, J. G. (1966). "The contrast sensitivity of retinal ganglion cells of the cat." *J. Physiol. (London)* **187**: 517-552.
- Enz, R., Brandstätter, J. H., Wässle, H. und Bormann, J. (1996). "Immunocytochemical localization of the GABA_A receptor rho subunits in the mammalian retina." *J Neurosci* **16**(14): 4479-90.
- Euler, T. und Masland, R. H. (2000). "Light-evoked responses of bipolar cells in a mammalian retina." *J Neurophysiol* **83**(4): 1817-29.
- Euler, T. und Wässle, H. (1998). "Different contributions of GABA_A and GABA_C receptors to rod and cone bipolar cells in a rat retinal slice preparation." *J Neurophysiol* **79**(3): 1384-95.
- Fahrenfort, I., Habets, R. L., Spekreijse, H. und Kamermans, M. (1999). "Intrinsic cone adaptation modulates feedback efficiency from horizontal cells to cones." *J Gen Physiol* **114**(4): 511-24.
- Feigenspan, A. und Bormann, J. (1998). "GABA-gated Cl⁻ channels in the rat retina." *Prog Retin Eye Res* **17**(1): 99-126.
- Feigenspan, A., Gustinich, S., Bean, B. P. und Raviola, E. (1998). "Spontaneous activity of solitary dopaminergic cells of the retina." *J Neurosci* **18**(17): 6776-89.
- Feigenspan, A., Wässle, H. und Bormann, J. (1993). "Pharmacology of GABA receptor Cl⁻ channels in rat retinal bipolar cells." *Nature* **361**(6408): 159-62.

- FJ, S. I. (1995). "Design of the EPC-9, a computer-controlled patch-clamp amplifier. 1. Hardware." *J Neurosci Methods* **56**(2): ES/*ME2.
- Fletcher, E. L., Koulen, P. und Wässle, H. (1998). "GABAA and GABAC receptors on mammalian rod bipolar cells." *J Comp Neurol* **396**(3): 351-65.
- Fletcher, E. L. und Wässle, H. (1999). "Indoleamine-accumulating amacrine cells are presynaptic to rod bipolar cells through GABA(C) receptors." *J Comp Neurol* **413**(1): 155-67.
- Flores-Herr, N. Protti, D.A., Wässle, H. (2001). "Synaptic Currents Generating the Inhibitory Surround of Ganglion Cells in the Mammalian Retina." *J Neurosci* **21**(13): 4852–4863.
- Frech, M. J., Deitmer, J. W. und Backus, K. H. (1999). "Intracellular chloride and calcium transients evoked by gamma- aminobutyric acid and glycine in neurons of the rat inferior colliculus." *J Neurobiol* **40**(3): 386-96.
- Freed, M. A. (1992). "GABAergic circuits in the mammalian retina." *Prog Brain Res* **90**: 107-31.
- Freed, M. A. und Nelson, R. (1994). "Conductances evoked by light in the ON-beta ganglion cell of cat retina." *Vis Neurosci* **11**(2): 261-9.
- Freed, M. A. und Sterling, P. (1988). "The ON-alpha ganglion cell of the cat retina and its presynaptic cell types." *J Neurosci* **8**(7): 2303-20.
- Frohlich, O. (1982). "The external anion binding site of the human erythrocyte anion transporter: DNDS binding and competition with chloride." *J Membr Biol* **65**(1-2): 111-23.
- Fukuda, Y., Hsiao, C. F. und Watanabe, M. (1985). "Morphological correlates of Y, X and W type ganglion cells in the cat's retina." *Vision Res* **25**(3): 319-27.
- Fukuda, Y., Hsiao, C. F., Watanabe, M. und Ito, H. (1984). "Morphological correlates of physiologically identified Y-, X-, and W- cells in cat retina." *J Neurophysiol* **52**(6): 999-1013.
- Fukuda, Y. und Stone, J. (1974). "Retinal distribution and central projections of Y-, X-, and W-cells of the cat's retina." *J Neurophysiol* **37**(4): 749-72.
- Fukuda, Y. und Stone, J. (1975). "Direct identification of the cell bodies of Y-, X- and W-cells in the cat's retina." *Vision Res* **15**: 1034-6.

- Gates, M., Ogden, A. und Bleakman, D. (2001). "Pharmacological effects of AMPA receptor potentiators LY392098 and LY404187 on rat neuronal AMPA receptors in vitro." *Neuropharmacology* **40**(8): 984-91.
- Granit, R. (1947). "Sensory Mechanisms of the Retina." *London*, Oxford Universtiy Press.
- Granit, R. (1950). "The organization of the vertebrate retinal elements." *Ergebn. Physiol.* **46**: 31-70.
- Greferath, U., Grünert, U., Müller, F. und Wässle, H. (1994). "Localization of GABAA receptors in the rabbit retina." *Cell Tissue Res* **276**(2): 295-307.
- Grünert, U. (2000). "Distribution of GABA and glycine receptors on bipolar and ganglion cells in the mammalian retina." *Microsc Res Tech* **50**(2): 130-40.
- Grünert, U. und Wässle, H. (1993). "Immunocytochemical localization of glycine receptors in the mammalian retina." *J Comp Neurol* **335**(4): 523-37.
- Gustincich, S., Feigenspan, A., Wu, D. K., Koopman, L. J. und Raviola, E. (1997). "Control of dopamine release in the retina: a transgenic approach to neural networks." *Neuron* **18**(5): 723-36.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. und Sigworth, F. J. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflugers Arch* **391**(2): 85-100.
- Handford, C. A., Lynch, J. W., Baker, E., Webb, G. C., Ford, J. H., Sutherland, G. R. und Schofield, P. R. (1996). "The human glycine receptor beta subunit: primary structure, functional characterisation and chromosomal localisation of the human and murine genes." *Brain Res Mol Brain Res* **35**(1-2): 211-9.
- Hartline (1940). "The receptive fields of optic nerve fibres." *Am. J. Physiol.* **242**: 99-118.
- Hartline, H. K. (1938). "The response of single optic nerve fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina." *Am. J. Physiol.* **121**: 400-415.
- Hartveit, E. (1999). "Reciprocal synaptic interactions between rod bipolar cells and amacrine cells in the rat retina." *J Neurophysiol* **81**(6): 2923-36.
- Haverkamp, S., Grünert, U. und Wässle, H. (2000). "The cone pedicle, a complex synapse in the retina." *Neuron* **27**(1): 85-95.

- Heidelberger, R., Heinemann, C., Neher, E. und Matthews, G. (1994). "Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal." *Nature* **371**(6497): 513-5.
- Heidelberger, R. und Matthews, G. (1991). "Inhibition of calcium influx and calcium current by gamma-aminobutyric acid in single synaptic terminals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(16): 7135-9.
- Heidelberger, R. und Matthews, G. (1992). "Calcium influx and calcium current in single synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons." *J Physiol* **447**: 235-56.
- Hille, B. (1992). "Ionic channels of excitable membranes." *Sunderland, Massachusetts*, University of Washington, Sinauer Associates Inc.
- Hubel, D. H. und Wiesel, T. N. (1960). "Receptive fields of optic nerve fibres in the spider monkey." *J Physiol* **154**: 572-580.
- Jensen, R. J. (1989). "Mechanism and site of action of a dopamine D1 antagonist in the rabbit retina." *Vis Neurosci* **3**(6): 573-85.
- Johnston, D. und Wu, S. M. (1995). "Foundations of cellular neurophysiology." *Cambridge, Massachusetts*, The MIT Press.
- Kamermans, M., Fahrenfort, I., Schultz, K., Janssen-Bienhold, U., Sjoerdsma, T. und Weiler, R. (2001). "Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina." *Science* **292**(5519): 1178-80.
- Kamermans, M. und Spekreijse, H. (1999). "The feedback pathway from horizontal cells to cones. A mini review with a look ahead." *Vision Res* **39**(15): 2449-68.
- Kandell, E., Schwartz, J. und Jessel, T. (1996). "Grundlagen der Neurowissenschaft." *Heidelberg*, Spektrum Verlag.
- Kaneko, A. und Tachibana, M. (1986a). "Blocking effects of cobalt and related ions on the gamma-aminobutyric acid-induced current in turtle retinal cones." *J Physiol* **373**: 463-79.
- Kaneko, A. und Tachibana, M. (1986b). "Effects of gamma-aminobutyric acid on isolated cone photoreceptors of the turtle retina." *J Physiol* **373**: 443-61.
- Karschin, A. und Wässle, H. (1990). "Voltage- and transmitter-gated currents in isolated rod bipolar cells of rat retina." *J Neurophysiol* **63**(4): 860-76.
- Katz, B. (1985). "Nerv, Muskel und Synapse." *Stuttgart*, Georg Thieme Verlag.

- Kleinschmidt, J. und Dowling, J. E. (1975). "Intracellular recordings from gecko photoreceptors during light and dark adaptation." *J Gen Physiol* **66**(5): 617-48.
- Koch, C. (1984). "Cable theory in neurons with active, linearized membranes." *Biol Cybern* **50**(1): 15-33.
- Koontz, M. A. und Hendrickson, A. E. (1990). "Distribution of GABA-immunoreactive amacrine cell synapses in the inner plexiform layer of macaque monkey retina." *Vis Neurosci* **5**(1): 17-28.
- Koontz, M. A., Hendrickson, L. E., Brace, S. T. und Hendrickson, A. E. (1993). "Immunocytochemical localization of GABA and glycine in amacrine and displaced amacrine cells of macaque monkey retina." *Vision Res* **33**(18): 2617-28.
- Koulen, P., Brandstätter, J. H., Enz, R., Bormann, J. und Wässle, H. (1998a). "Synaptic clustering of GABA(C) receptor rho-subunits in the rat retina." *Eur J Neurosci* **10**(1): 115-27.
- Koulen, P., Malitschek, B., Kuhn, R., Bettler, B., Wässle, H. und Brandstätter, J. H. (1998b). "Presynaptic and postsynaptic localization of GABA(B) receptors in neurons of the rat retina." *Eur J Neurosci* **10**(4): 1446-56.
- Koulen, P., Sassoe-Pognetto, M., Grünert, U. und Wässle, H. (1996). "Selective clustering of GABA(A) and glycine receptors in the mammalian retina." *J Neurosci* **16**(6): 2127-40.
- Kraaij, D. A., Kamermans, M. und Spekreijse, H. (1998). "Spectral sensitivity of the feedback signal from horizontal cells to cones in goldfish retina." *Vis Neurosci* **15**(5): 799-808.
- Kraaij, D. A., Spekreijse, H. und Kamermans, M. (2000). "The nature of surround-induced depolarizing responses in goldfish cones." *J Gen Physiol* **115**(1): 3-16.
- Krizaj, D. und Copenhagen, D. R. (1998). "Compartmentalization of calcium extrusion mechanisms in the outer and inner segments of photoreceptors." *Neuron* **21**(1): 249-56.
- Kuffler, S. (1953). "Discharge patterns and functional organisation of mammalian retina." *J. Neurophysiol.* **16**: 37-68.
- Levick, W. R. (1967). "Receptive fields and trigger features of ganglion cells in the visual streak of the rabbits retina." *J Physiol* **188**(3): 285-307.
- Levick, W. R. (1972). "Another tungsten microelectrode." *Med Biol Eng* **10**(4): 510-5.

- Lukasiewicz, P. D. und Shields, C. R. (1998). "Different combinations of GABAA and GABAC receptors confer distinct temporal properties to retinal synaptic responses." *J Neurophysiol* **79**(6): 3157-67.
- Lukasiewicz, P. D. und Wong, R. O. (1997). "GABAC receptors on ferret retinal bipolar cells: a diversity of subtypes in mammals?" *Vis Neurosci* **14**(5): 989-94.
- MacNeil, M. A., Heussy, J. K., Dacheux, R. F., Raviola, E. und Masland, R. H. (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**(2): 305-26.
- MacNeil, M. A. und Masland, R. H. (1998). "Extreme diversity among amacrine cells: implications for function." *Neuron* **20**(5): 971-82.
- Macri, J., Martin, P. R. und Grünert, U. (2000). "Distribution of the alpha1 subunit of the GABA(A) receptor on midget and parasol ganglion cells in the retina of the common marmoset *Callithrix jacchus*." *Vis Neurosci* **17**(3): 437-48.
- Maguire, G., Lukasiewicz, P. und Werblin, F. (1990). "Synaptic and voltage-gated currents in interplexiform cells of the tiger salamander retina." *J Gen Physiol* **95**(4): 755-70.
- Mangel, S. C. (1991). "Analysis of the horizontal cell contribution to the receptive field surround of ganglion cells in the rabbit retina." *J Physiol* **442**: 211-34.
- Mangel, S. C. und Miller, R. F. (1987). "Horizontal cells contribute to the receptive field surround of ganglion cells in the rabbit retina." *Brain Res* **414**(1): 182-6.
- Masland, R. H. (1986). "The functional architecture of the retina." *Sci Am* **255**(6): 102-11.
- Masland, R. H. und Raviola, E. (2000). "Confronting complexity: strategies for understanding the microcircuitry of the retina." *Annu Rev Neurosci* **23**: 249-84.
- Massey, S. C., Linn, D. M., Kittila, C. A. und Mirza, W. (1997). "Contributions of GABAA receptors and GABAC receptors to acetylcholine release and directional selectivity in the rabbit retina." *Vis Neurosci* **14**(5): 939-48.
- Massey, S. C. und Miller, R. F. (1988). "Glutamate receptors of ganglion cells in the rabbit retina: evidence for glutamate as a bipolar cell transmitter." *J Physiol (Lond)* **405**: 635-55.
- Massey, S. C., Mills, S. L. und Marc, R. E. (1992). "All indoleamine-accumulating cells in the rabbit retina contain GABA." *J Comp Neurol* **322**(2): 275-91.

- Massey, S. C. und Redburn, D. A. (1987). "Transmitter circuits in the vertebrate retina." *Prog Neurobiol* **28**(1): 55-96.
- McGille, G. S., Rotolo, T. C. und Dacheux, R. F. (2000). "GABA responses of rod bipolar cells in rabbit retinal slices." *Vis Neurosci* **17**(3): 381-9.
- Menger, N., Pow, D. V. und Wässle, H. (1998). "Glycinergic amacrine cells of the rat retina." *J Comp Neurol* **401**(1): 34-46.
- Merwine, D. K., Amthor, F. R. und Grzywacz, N. M. (1995). "Interaction between center and surround in rabbit retinal ganglion cells." *J Neurophysiol* **73**(4): 1547-67.
- Miller, R. F. und Dacheux, R. F. (1976a). "Synaptic organization and ionic basis of on and off channels in mudpuppy retina. I. Intracellular analysis of chloride-sensitive electrogenic properties of receptors, horizontal cells, bipolar cells, and amacrine cells." *J Gen Physiol* **67**(6): 639-59.
- Miller, R. F. und Dacheux, R. F. (1976b). "Synaptic organization and ionic basis of on and off channels in mudpuppy retina. II. Chloride-dependent ganglion cell mechanisms." *J Gen Physiol* **67**(6): 661-78.
- Miller, R. F. und Dacheux, R. F. (1976c). "Synaptic organization and ionic basis of on and off channels in mudpuppy retina. III. A model of ganglion cell receptive field organization based on chloride-free experiments." *J Gen Physiol* **67**(6): 671-90.
- Miller, R. F. und Dacheux, R. F. (1983). "Intracellular chloride in retinal neurons: measurement and meaning." *Vision Res* **23**(4): 399-411.
- Miller, R. F., Frumkes, T. E., Slaughter, M. und Dacheux, R. F. (1981). "Physiological and pharmacological basis of GABA and glycine action on neurons of mudpuppy retina. II. Amacrine and ganglion cells." *J Neurophysiol* **45**(4): 764-82.
- Mittman, S., Taylor, W. R. und Copenhagen, D. R. (1990). "Concomitant activation of two types of glutamate receptor mediates excitation of salamander retinal ganglion cells." *J Physiol (Lond)* **428**: 175-97.
- Miu, P., Jarvie, K. R., Radhakrishnan, V., Gates, M. R., Ogden, A., Ornstein, P. L., Zarrinmayeh, H., Ho, K., Peters, D., Grabell, J., Gupta, A., Zimmerman, D. M. und Bleakman, D. (2001). "Novel AMPA receptor potentiators LY392098 and LY404187: effects on recombinant human AMPA receptors in vitro." *Neuropharmacology* **40**(8): 976-83.

- Morgans, C. W., El Far, O., Berntson, A., Wässle, H. und Taylor, W. R. (1998). "Calcium extrusion from mammalian photoreceptor terminals." *J Neurosci* **18**(7): 2467-74.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E. und Watanabe, S. (1982). "GABA-mediated negative feedback from horizontal cells to cones in carp retina." *Jpn J Physiol* **32**(6): 911-26.
- Neher, E. (1992a). "Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments." *Methods Enzymol* **207**: 123-31.
- Neher, E. (1992b). "Nobel lecture. Ion channels for communication between and within cells." *Neuron* **8**(4): 605-12.
- Neher, E. und Sakmann, B. (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." *Nature* **260**(5554): 799-802.
- Neher, E. und Sakmann, B. (1992). "The patch clamp technique." *Sci Am* **266**(3): 28-35.
- Nuhmberger, M. und Draguhn, A. (1996). "Patch-Clamp-Technik." *Heidelberg*, Spektrum Verlag.
- Oyster, C. W. und Takahashi, E. S. (1977). "Interplexiform cells in rabbit retina." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **197**(1129): 477-84.
- Pan, Z. H. und Lipton, S. A. (1995). "Multiple GABA receptor subtypes mediate inhibition of calcium influx at rat retinal bipolar cell terminals." *J Neurosci* **15**(4): 2668-79.
- Pattnaik, B., Jellali, A., Sahel, J., Dreyfus, H. und Picaud, S. (2000). "GABAC receptors are localized with microtubule-associated protein 1B in mammalian cone photoreceptors." *J Neurosci* **20**(18): 6789-96.
- Peichl, L. (1978). "Rezeptive Felder und Parallelverarbeitung der visuellen Information in retinalen Ganglienzellen der Katze." Dissertation, Physiologische Psychologie, Universität Konstanz, Konstanz.
- Peichl, L. (1992). "Prinzipien der Bildverarbeitung in der Retina der Säugetiere." *Biologie in unserer Zeit* **22**: 45-53.
- Peichl, L., Buhl, E. H. und Boycott, B. B. (1987a). "Alpha ganglion cells in the rabbit retina." *J Comp Neurol* **263**(1): 25-41.
- Peichl, L., Ott, H. und Boycott, B. B. (1987b). "Alpha ganglion cells in mammalian retinae." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **231**(1263): 169-97.

- Peichl, L. und Wässle, H. (1979). "Size, scatter and coverage of ganglion cell receptive field centres in the cat retina." *J Physiol* **291**: 117-41.
- Peichl, L. und Wässle, H. (1981). "Morphological identification of on- and off-centre brisk transient (Y) cells in the cat retina." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **212**(1187): 139-53.
- Peichl, L. und Wässle, H. (1983). "The structural correlate of the receptive field centre of alpha ganglion cells in the cat retina." *J Physiol (Lond)* **341**: 309-24.
- Peters, B. N. und Masland, R. H. (1996). "Responses to light of starburst amacrine cells." *J Neurophysiol* **75**(1): 469-80.
- Picaud, S., Pattnaik, B., Hicks, D., Forster, V., Fontaine, V., Sahel, J. und Dreyfus, H. (1998). "GABAA and GABAC receptors in adult porcine cones: evidence from a photoreceptor-glia co-culture model." *J Physiol* **513**(Pt 1): 33-42.
- Piccolino, M. (1995). Cross-talk between cones and horizontal cells through the feedback circuit. In: Neurobiology and clinical aspects of the outer retina. M. B. A. Djamgoz, S. N. Archer and S. Vallergera. *Oxford, Chapman&Hall*: 221-248.
- Pourcho, R. G. und Goebel, D. J. (1985). "A combined Golgi and autoradiographic study of (3H)glycine-accumulating amacrine cells in the cat retina." *J Comp Neurol* **233**(4): 473-80.
- Pourcho, R. G. und Owczarzak, M. T. (1989). "Distribution of GABA immunoreactivity in the cat retina: a light- and electron-microscopic study." *Vis Neurosci* **2**(5): 425-35.
- Pourcho, R. G. und Owczarzak, M. T. (1991a). "Connectivity of glycine immunoreactive amacrine cells in the cat retina." *J Comp Neurol* **307**(4): 549-61.
- Pourcho, R. G. und Owczarzak, M. T. (1991b). "Glycine receptor immunoreactivity is localized at amacrine synapses in cat retina." *Vis Neurosci* **7**(6): 611-8.
- Pribilla, I., Takagi, T., Langosch, D., Bormann, J. und Betz, H. (1992). "The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels." *Embo J* **11**(12): 4305-11.
- Pribilla, I., Takagi, T., Langosch, D., Bormann, J. und Betz, H. (1994). "The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels." *Embo J* **13**(6): 1493.
- Protti, D. A., Flores-Herr, N. und von Gersdorff, H. (2000a). "Light evokes Ca²⁺ spikes in the axon terminal of a retinal bipolar cell." *Neuron* **25**(1): 215-27.

- Protti, D. A., Flores-Herr, N. und Wässle, H. (2000b). "Effect of glutamate receptor blockers on the center-surround organization of the receptive field of retinal ganglion cells." Society for Neuroscience, New Orleans, USA.
- Protti, D. A., Gerschenfeld, H. M. und Llano, I. (1997). "GABAergic and glycinergic IPSCs in ganglion cells of rat retinal slices." *J Neurosci* **17**(16): 6075-85.
- Protti, D. A. und Llano, I. (1998). "Calcium currents and calcium signaling in rod bipolar cells of rat retinal slices." *J Neurosci* **18**(10): 3715-24.
- Pu, M. L. und Amthor, F. R. (1990a). "Dendritic morphologies of retinal ganglion cells projecting to the lateral geniculate nucleus in the rabbit." *J Comp Neurol* **302**(3): 675-93.
- Pu, M. L. und Amthor, F. R. (1990b). "Dendritic morphologies of retinal ganglion cells projecting to the nucleus of the optic tract in the rabbit." *J Comp Neurol* **302**(3): 657-74.
- Ragozzino, D., Woodward, R. M., Murata, Y., Eusebi, F., Overman, L. E. und Miledi, R. (1996). "Design and in vitro pharmacology of a selective gamma-aminobutyric acidC receptor antagonist." *Mol Pharmacol* **50**(4): 1024-30.
- Raviola, E. und Dacheux, R. F. (1987). "Excitatory dyad synapse in rabbit retina." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(20): 7324-8.
- Rodieck, R. W. (1965). "Quantitative analysis of cat retinal ganglion cell response to visual stimuli." *Vision Res* **5**(11): 583-601.
- Rodieck, R. W. (1973). "The vertebrate Retina." San Francisco, W.H. Freeman and Company.
- Rodieck, R. W. (1998). "The first steps in seeing." Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.
- Rodieck, R. W. und Stone, J. (1965a). "Analysis of receptive fields of cat retinal ganglion cells." *J Neurophysiol* **28**(5): 832-49.
- Rodieck, R. W. und Stone, J. (1965b). "Response of cat retinal ganglion cells to moving visual patterns." *J Neurophysiol* **28**(5): 819-32.
- Rorig, B. und Grantyn, R. (1993). "Glutamatergic and GABAergic synaptic currents in ganglion cells from isolated retinæ of pigmented rats during postnatal development." *Brain Res Dev Brain Res* **74**(1): 98-110.

- Roska, B., Nemeth, E., Orzo, L. und Werblin, F. S. (2000). "Three levels of lateral inhibition: A space-time study of the retina of the tiger salamander." *J Neurosci* **20**(5): 1941-51.
- Roska, B. und Werblin, F. (2001). "Vertical interactions across ten parallel, stacked representations in the mammalian retina." *Nature* **410**(6828): 583-7.
- Russell, J. M. (2000). "Sodium-potassium-chloride cotransport." *Physiol Rev* **80**(1): 211-76.
- Sandell, J. H., Masland, R. H., Raviola, E. und Dacheux, R. F. (1989). "Connections of indoleamine-accumulating cells in the rabbit retina." *J Comp Neurol* **283**(2): 303-13.
- Sassoe-Pognetto, M., Wässle, H. und 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**(8): 5131-46.
- Schofield, P. R., Lynch, J. W., Rajendra, S., Pierce, K. D., Handford, C. A. und Barry, P. H. (1996). "Molecular and genetic insights into ligand binding and signal transduction at the inhibitory glycine receptor." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **61**: 333-42.
- Schwartz, E. A. (1987). "Depolarization without calcium can release gamma-aminobutyric acid from a retinal neuron." *Science* **238**(4825): 350-5.
- Schwartz, E. A. (1999). A transporter mediates the releases of GABA from horizontal cells. In: The retinal basis of vision. T. J.I. *New York*, Elsevier.
- Sigworth, F. J. (1995). "Electronic design of the patch-clamp." *New York and London*, Plenum Press.
- Sigworth, F. J., Affolter, H. und Neher, E. (1995). "Design of the EPC-9, a computer-controlled patch-clamp amplifier. 2. Software." *J Neurosci Methods* **56**(2): 203-15.
- Stafford, D. K. und Dacey, D. M. (1997). "Physiology of the A1 amacrine: a spiking, axon-bearing interneuron of the macaque monkey retina." *Vis Neurosci* **14**(3): 507-22.
- Sterling, P., Smith, R. G. und Vardi, N. (1995). Cross-talk between cones and horizontal cells through the feedback circuit. In: Neurobiology and clinical aspects of the outer retina. M. B. A. Djamgoz, S. N. Archer and S. Vallergera. *Oxford*, Chapman&Hall: 325-348.
- Stone, J. und Fukuda, Y. (1974). "Properties of cat retinal ganglion cells: a comparison of W-cells with X- and Y-cells." *J Neurophysiol* **37**(4): 722-48.
- Strettoi, E., Dacheux, R. F. und Raviola, E. (1990). "Synaptic connections of rod bipolar cells in the inner plexiform layer of the rabbit retina." *J Comp Neurol* **295**(3): 449-66.

- Suzuki, S., Tachibana, M. und Kaneko, A. (1990). "Effects of glycine and GABA on isolated bipolar cells of the mouse retina." *J Physiol* **421**: 645-62.
- Tachibana, M. und Kaneko, A. (1984). "gamma-Aminobutyric acid acts at axon terminals of turtle photoreceptors: difference in sensitivity among cell types." *Proc Natl Acad Sci USA* **81**(24): 7961-4.
- Taylor, W. R. (1996). "Response properties of long-range axon-bearing amacrine cells in the dark-adapted rabbit retina." *Vis Neurosci* **13**(4): 599-604.
- Taylor, W. R. (1999). "TTX attenuates surround inhibition in rabbit retinal ganglion cells." *Vis Neurosci* **16**(2): 285-90.
- Taylor, W. R., He, S., Levick, W. R. und Vaney, D. I. (2000). "Dendritic computation of direction selectivity by retinal ganglion cells." *Science* **289**(5488): 2347-50.
- Taylor, W. R., Mittman, S. und Copenhagen, D. R. (1996). "Passive electrical cable properties and synaptic excitation of tiger salamander retinal ganglion cells." *Vis Neurosci* **13**(5): 979-90.
- Taylor, W. R. und Morgans, C. (1998). "Localization and properties of voltage-gated calcium channels in cone photoreceptors of *Tupaia belangeri*." *Vis Neurosci* **15**(3): 541-52.
- Taylor, W. R. und Wässle, H. (1995). "Receptive field properties of starburst cholinergic amacrine cells in the rabbit retina." *Eur J Neurosci* **7**(11): 2308-21.
- Vaney, D. I. (1980). "A quantitative comparison between the ganglion cell populations and axonal outflows of the visual streak and periphery of the rabbit retina." *J Comp Neurol* **189**(2): 215-33.
- Vaney, D. I. (1990). The mosaic of amacrine cells in the mammalian retina. In: Progress in Retinal Research. J. J. Osborne and G. Chader. Oxford, UK, Pergamon. **9**: 49-100.
- Vaney, D. I. (1991). "Many diverse types of retinal neurons show tracer coupling when injected with biocytin or Neurobiotin." *Neurosci Lett* **125**(2): 187-90.
- Vaney, D. I. (1994). "Territorial organization of direction-selective ganglion cells in rabbit retina." *J Neurosci* **14**(11 Pt 1): 6301-16.
- Vaney, D. I., Levick, W. R. und Thibos, L. N. (1981). "Rabbit retinal ganglion cells. Receptive field classification and axonal conduction properties." *Exp Brain Res* **44**(1): 27-33.

- Vardi, N. und Sterling, P. (1994). "Subcellular localization of GABAA receptor on bipolar cells in macaque and human retina." *Vision Res* **34**(10): 1235-46.
- Vardi, N., Zhang, L. L., Payne, J. A. und Sterling, P. (2000). "Evidence that different cation chloride cotransporters in retinal neurons allow opposite responses to GABA." *J Neurosci* **20**(20): 7657-63.
- Velte, T. J. und Miller, R. F. (1996). "Computer simulations of voltage clamping retinal ganglion cells through whole-cell electrodes in the soma." *J Neurophysiol* **75**(5): 2129-43.
- Verweij, J., Kamermans, M. und Spekreijse, H. (1996). "Horizontal cells feed back to cones by shifting the cone calcium- current activation range." *Vision Res* **36**(24): 3943-53.
- von Seelen, W. (1969). "Zur Informationsverarbeitung im visuellen System der Wirbeltiere." *Kybernetik* **7**: 43-60.
- Wässle, H. (1971). "Untersuchungen zur Physiologie der Sehschärfe." Dissertation, Fakultät der Physik, Ludwigs-Maximilians-Universität, München.
- Wässle, H. (1986). "Auge und Gehirn: Informationsverarbeitung im visuellen System der Säugetiere." *Umschau* **5**: 290-296.
- Wässle, H. und Boycott, B. B. (1991). "Functional architecture of the mammalian retina." *Physiol Rev* **71**(2): 447-80.
- Wässle, H. und Creutzfeldt, O. D. (1973). "Spatial resolution in visual system: a theoretical and experimental study on single units in the cat's lateral geniculate body." *J Neurophysiol* **36**(1): 13-27.
- Wässle, H., Koulen, P., Brandstätter, J. H., Fletcher, E. L. und Becker, C. M. (1998). "Glycine and GABA receptors in the mammalian retina." *Vision Res* **38**(10): 1411-30.
- Wässle, H., Peichl, L. und Boycott, B. B. (1981). "Dendritic territories of cat retinal ganglion cells." *Nature* **292**(5821): 344-5.
- Wässle, H., Peichl, L. und Boycott, B. B. (1983). "Mosaics and territories of cat retinal ganglion cells." *Prog Brain Res* **58**: 183-90.
- Wässle, H. und Riemann, H. J. (1978). "The mosaic of nerve cells in the mammalian retina." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **200**(1141): 441-61.

- Wässle, H., Schafer-Trenkler, I. und Voigt, T. (1986). "Analysis of a glycinergic inhibitory pathway in the cat retina." *J Neurosci* **6**(2): 594-604.
- Watanabe, M. und Rodieck, R. W. (1989). "Parasol and midget ganglion cells of the primate retina." *J Comp Neurol* **289**(3): 434-54.
- Werblin, F., Roska, B. und Balya, D. (2001). "Parallel processing in the mammalian retina: lateral and vertical interactions across stacked representations." *Prog Brain Res* **131**: 229-38.
- Werblin, F. S. (1972). "Lateral interactions at inner plexiform layer of vertebrate retina: antagonistic responses to change." *Science* **175**(25): 1008-10.
- Werblin, F. S. (1973). "The control of sensitivity in the retina." *Sci Am* **228**(1): 70-9.
- Werblin, F. S. (1974). "Control of retinal sensitivity. II. Lateral interactions at the outer plexiform layer." *J Gen Physiol* **63**(1): 62-87.
- Werblin, F. S. und Copenhagen, D. R. (1974). "Control of retinal sensitivity. III. Lateral interactions at the inner plexiform layer." *J Gen Physiol* **63**(1): 88-110.
- Werblin, F. S. und Dowling, J. E. (1969). "Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording." *J Neurophysiol* **32**(3): 339-55.
- Woodward, R. M., Polenzani, L. und Miledi, R. (1993). "Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (rho-like) gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. II. Pharmacology of gamma-aminobutyric acidA and gamma-aminobutyric acidB receptor agonists and antagonists." *Mol Pharmacol* **43**(4): 609-25.
- Xin, D. und Bloomfield, S. A. (1997). "Tracer coupling pattern of amacrine and ganglion cells in the rabbit retina." *J Comp Neurol* **383**(4): 512-28.
- Yang, G. und Masland, R. H. (1994). "Receptive fields and dendritic structure of directionally selective retinal ganglion cells." *J Neurosci* **14**(9): 5267-80.
- Yazulla, S. und Kleinschmidt, J. (1983). "Carrier-mediated release of GABA from retinal horizontal cells." *Brain Res* **263**(1): 63-75.
- Zhang, D., Pan, Z. H., Zhang, X., Brideau, A. D. und Lipton, S. A. (1995). "Cloning of a gamma-aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(25): 11756-60.

7. Abkürzungsverzeichnis

AMPA	(±)- α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure
APMPA	Aminopropyl(methyl)phosphorsäure
C_{in}	Gesamtkapazität der Zelle
C_{pip}	Pipettenkapazität
DAB	Diaminobenzidin
DNDS	4,4'-dinitrostilbene-2,2'-disulfonsäure
DNQX	6,7-Dinitroquinoxalin-2,3(1H,4H)-dion
DOG	„Difference of gaussians model“
E_{Cl}	Umkehrpotential für Chloridionen
EGTA	Ethylenglycol-bis(beta-aminoethylether)-N,N,N',N'-säure
$E_{Na/K}$	Umkehrpotential von unspezifischen Kationenströmen
GABA	γ -Aminobuttersäure (Aminosäure)
GLU	Glutamat
Glyzin	Aminosäure
GCL	Ganglienzellschicht („ganglion cell layer“)
IPL	Innere Synapsenschicht („inner plexiform layer“)
I_{pip}	Pipettenstrom
I_{offset}	Haltestrom
INL	Innere Körnerschicht („inner nuclear layer“)
KGlu	Kaliumgluconat-Intrazellulärlösung
KCl	Kaliumchlorid-Intrazellulärlösung
NBQX	1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxalin-7-sulfonamid
NBT	NitroBlueTetrazolium
NKCC	Chloridionentransporter
ONL	Äußere Körnerschicht („outer nuclear layer“)
OPL	Äußere Synapsenschicht („outer plexiform layer“)
PB	Phosphatpuffer
PTX	Picrotoxinin
QX-314	Lidocain N-ethyl Bromid
RFC	Rezeptives Feldzentrum („receptive field center“)
RFS	Umfeld oder rezeptive Feldperipherie („receptive field surround“)
R_{in}	Gesamtwiderstand der Zelle

R_{pip}	Pipettenwiderstand
R_s	Serienwiderstand
TBA	Tetrabutylammonium
TPMPA	1,2,5,6-Tetrahydropyridin-4-methylphosphorsäure
TTX	Tetrodotoxin
V_h	Haltepotential
V_{LJ}	Diffusionspotential
V_m	Membranpotential
V_{pip}	Pipettenpotential
V_r	Ruhemembranpotential

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Nicolas Flores-Herr
Adresse: Koselstrasse 37
60318 Frankfurt
Geburtsdatum: 11.02.1973
Geburtsort: München
Eltern: Sigrid Herr de Flores, geb. Herr
Gonzalo Flores
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1979-1983 Grundschule in Burgsinn
1983-1992 Bettina-Gymnasium in Frankfurt/Main
1992 Abitur

Hochschulbildung:

10/92-10/97 Studium der Physik an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt
11/95-10/97 Diplomarbeit im Fachbereich Physik der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Max-Planck-Institut für Hirnforschung. Thema: **„Die Modulation der glyzinaktivierten Ströme durch Proteinkinase A“**
Seit 10/97 Doktorand am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in der neuroanatomischen Abteilung von Prof. Dr. H. Wässle unter Betreuung von Prof. Dr. H. Wässle, Prof. Dr. H. Klein und Dr. D. A. Protti mit dem Thema **„Das hemmende Umfeld von Ganglienzellen in der Netzhaut des Auges“**

Akademische Lehrer:

Priv. Doz. Dr. J. Bormann, Dr. Rowland Taylor,
Prof. Dr. H. Wässle, Prof. Dr. H. Klein und Dr. D. A. Protti

9. Danksagung

Die Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in der neuroanatomischen Abteilung unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Heinz Wässle und Herrn Dr. Dario Protti durchgeführt. Beiden bin ich für die Schaffung optimaler Arbeitsbedingungen und eines freundlichen Arbeitsklimas sehr dankbar. Weiterhin danke ich für die Betreuung Herrn Prof. Dr. Horst Klein vom Institut für angewandte Physik der Johann Wolfgang Goethe-Universität. Vor allem danke ich ihm für sein kontinuierliches Interesse an meiner Forschung und die freundliche und entspannte Zusammenarbeit. Allen Betreuern danke ich für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für die praktische Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein herzliches Dankeschön gilt Brigitte Sinke für ihre stetige Hilfsbereitschaft und für die Schaffung idealer Laborbedingungen. Insbesondere danke ich ihr für das sehr angenehme Arbeitsklima.

Privatdozent Dr. Leo Peichl, Dr. Ansgar Jakob und Monika Altwein danke ich für das kritische Durchlesen der Arbeit und für die vielen hilfreichen Ratschläge.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Neuroanatomie danke ich für die ständige Gesprächs- und Hilfsbereitschaft und für die angeregte und harmonische Zusammenarbeit, insbesondere Christopher Habermann, Dr. Nicole Menger, Klaus Stiefel, Dr. Maik Annies, Karsten Benzing, Dr. Iris Hack, Moritz Frech und alle ‚Mitdoktoranden‘ im Kinderzimmer II.

Allen Organisatoren, insbesondere Herrn Privatdozent Dr. Horst Deitinghoff und Herrn Professor Dr. Horst Klein, sowie den Teilnehmern des Winterseminars des Instituts für angewandte Physik danke für die schöne Zeit in Riezlern.

Den Herren Dr. Rowland Taylor, Dr. Brendan O‘Brien und Privatdozent Dr. Helmut Brandstätter, die durch praktische Hinweise und fachliche Ratschläge mir sehr halfen.

Anke Hackemesser danke ich für ihre Unterstützung und Liebe.

Jan Biermann, Florian Aeppli, Johannes Aeppli und Sepp‘l Niemeyer danke ich für die Entspannung mit guter Musik.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern: Sigrid Herr de Flores und Gonzalo Flores Ochoa sowie Barbara Flores Ochoa, die mich immer sehr unterstützen.