

Kurzfassung

Die Arbeit untersucht die Expression und die funktionellen Eigenschaften von HCN-Kanälen (hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated) in Photorezeptoren und Bipolarzellen der Mäuseretina. Die Verteilung der HCN-Isoformen 1-4 wurde immunhistochemisch mit isoformspezifischen Antikörpern an Schnitten der Retina untersucht. Die Färbungen wurden mit dem Konfokalen Laserscanning Mikroskop ausgewertet.

In der Mäuseretina ist HCN1 die am stärksten exprimierte Isoform. HCN1 konnte in Stäbchen und Zapfen sowie in Stäbchenbipolarzellen, Typ5 und Typ7 Bipolarzellen nachgewiesen werden. HCN2, HCN3 und HCN4 werden in der Mäuseretina nicht so häufig exprimiert. HCN4 wird in Typ3 Bipolarzellen exprimiert. HCN2 und HCN3 konnten in Photorezeptoren und Bipolarzellen nicht nachgewiesen werden. Diese Isoformen werden besonders in Amakrin- und Ganglienzellen exprimiert.

In retinalen Gewebsschnitten wurden Photorezeptoren und Bipolarzellen elektrophysiologisch im Ganzzellmodus der Patch-clamp Technik abgeleitet und die Aktivierungskinetik und die Strom-Spannungsbeziehung der HCN-Kanäle untersucht. Während der Ableitung wurden die Zellen mit einem Farbstoff gefüllt und anschließend morphologisch identifiziert. Die Eigenschaften der retinalen HCN1-Kanäle unterscheiden sich z.T. von denen heterolog exprimierter HCN1-Kanäle. Die Eigenschaften der HCN1-Kanäle unterscheiden sich auch zwischen verschiedenen retinalen Zelltypen. Dies könnte bedeuten, dass HCN1-Kanäle in der Retina moduliert werden.

Für die Messung retinaler Lichtantworten stand eine transgene Mauslinie zur Verfügung, in der das Gen für die HCN1-Isoform ausgeschaltet worden war – ein „HCN1-Knockout“. Lichtantworten wurden in Form von Elektroretinogrammen (ERG) in vitro von Retinae von Wildtypmäusen und von HCN1-Knockoutmäusen abgeleitet. In HCN1-Knockoutretinae ist die B-Welle des ERGs leicht verlängert. Dies könnte auf eine Verlängerung der Lichtantwort in Photorezeptoren hinweisen. Im skotopischen Flimmer-ERG ist die Frequenzübertragung in der Knockoutretina leicht verschlechtert. Applikation des HCN-Kanalblockers ZD7288 zur Wildtypretina führt ebenfalls zur leichten Verschlechterung der Frequenzübertragung.

Die Untersuchungen liefern erste Erkenntnisse über die Rolle von HCN1-Kanälen an der Ausbildung retinaler Lichtantworten.

Abstract

The aim of this study was to examine the expression and the functional properties of HCN-channels (hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated) in photoreceptors and bipolar cells of the mouse retina. The expression pattern of the four HCN channel isoforms HCN1 - 4 was studied in retinal sections using immunocytochemistry with isoform-specific antibodies. The stainings were analysed using confocal laser scanning microscopy.

In the mouse retina HCN1 is the predominantly expressed isoform. HCN1 could be detected in rods and cones as well as in type5 and type7 bipolar cells. HCN2, HCN3 and HCN4 are not abundantly expressed in the mouse retina. HCN4 was expressed in type 3 bipolar cells. HCN2 and HCN3 could not be found in photoreceptors and bipolar cells. These isoforms were mainly expressed in amacrine and ganglion cells.

In retinal slices photoreceptors and bipolar cells were recorded electrophysiologically in the whole-cell mode of the patch-clamp technique to study the activation kinetics and the mid-point potential of activation of HCN channels. During the recording the cells were filled with dyes and were subsequently morphologically identified. The properties of the retinal HCN1 channels differ to some extent from those of heterologously expressed HCN1 channels. The properties of the HCN1 channels also vary between different cell types. This could mean, that HCN1 channels are modulated in the retina.

To record retinal light-responses, a genetically modified mouse strain was used in which the gene coding for HCN1 has been deleted - "HCN1 knockout". Electroretinogramms (ERG) were recorded in vitro from wildtype retinae and HCN1 knockout retinae. In HCN1 knockout retinae the B-wave of the ERG was slightly elongated. This could reflect extended light-responses of the photoreceptors. In the scotopic flicker-ERG the frequency transfer is slightly reduced in knockout retinae. Application of the HCN channel blocker ZD7288 also slightly reduced the frequency transfer in wildtype retinae.

The study provides first insights into the role of HCN1 channels in the generation of light-responses.