

**Adaptation von Stäbchenzellen der Froschretina an Hintergrundlicht  
verschiedener Intensitäten und Einfluss  
von Stickstoffmonoxid auf die Rückstellphase der Lichtantwort**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

**vorgelegt von Aikaterini Patrona**

**aus Siatista/Griechenland**

**Giessen, 2005**

Aus dem Physiologischen Institut  
Direktor: Prof. Dr. Dr. H.-M. Piper  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: apl. Prof. Dr. Gottfried N. Nöll  
Gutachter: apl. Prof. Dr. Thomas Krzizok

Tag der Disputation: 14.09.2005

“...Der Sehende fasst das ganze Leben der Natur um sich her durch Licht und Farbe, das Auge ist unser Weltsinn.”

**J. F. Fries**  
**(Jenaer Philosoph und Physiker, 1773-1843)**

Meinen Eltern

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Poster in der 30. Jahrestagung für Neurobiologie vom 17-20 Februar in Göttingen unter folgendem Titel präsentiert:

A. Patrona and G.N. Nöll, Giessen

Influence of Nitric Oxide on the recovery kinetics of flash responses of isolated frog rods

contributed to visual systems of vertebrates: periphery

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1 Fragestellung	7
1.2 Stand der Forschung	11
1.2.1 Detektion, Wandlung und Verstärkung des Lichtsignals in der Stäbchenzelle	11
1.2.2 Deaktivierungsmechanismen; die Rückstellphase der Lichtantwort	21
1.2.3 Modulierende Vorgänge und Botenstoffe	28
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>40</b>
2.1 Tiere und Präparation	40
2.2 Versuchsaufbau; Elektroden, Medien und Elektronik	42
2.3 Ablauf der Messungen	56
2.4 Statistische Auswertung	59
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>64</b>
3.1 Versuchsreihe unter Standardbedingungen: Standard-Extrazellulärlösung und definierte Lichtreize, Konfiguration der Lichtantwort	64
3.2 Versuchsreihe mit Hintergrundlicht: Standardlichtreize bei Hintergrundlicht ansteigender Intensität	69
3.3 Versuchsreihe mit Nitroprussidnatrium	77

<b>4 DISKUSSION</b>	<b>87</b>
4.1 Elektrophysiologie der Lichtantworten	87
4.2 Hintergrundsadaptation und mögliche molekulare Mechanismen	96
4.3 Rolle von Stickstoffmonoxid?	102
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>104</b>
<b>6 SUMMARY</b>	<b>107</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>110</b>
<b>8 ANHANG</b>	<b>133</b>
Referenztablelle der statistischen Auswertung	133
Danksagung	134
Lebenslauf	135

## **1. EINLEITUNG**

---

### **1.1 Fragestellung**

Sinneszellen als biologische Sensoren antworten auf spezifische Reize mit einer Membranpotentialänderung. Dieser Vorgang der Übersetzung eines Reizes in eine Änderung des Membranpotentials mit resultierender Änderung in der Transmitterausschüttung der Zelle, bekannt als Transduktion, stellt ein einheitliches elektrochemisches Prinzip in der Informationsverarbeitung durch Nervenzellen dar.

Die meisten Sensorpotentiale sind abgestufte Antworten, d.h. die Amplitude der Antwort nimmt proportional mit der Reizintensität zu. Das Verhältnis zwischen Intensität des Reizes und Amplitude der Antwort variiert je nach mittlerem Reizniveau der Umgebung, biologische Sensoren sind somit in der Lage, ihre Empfindlichkeit innerhalb eines bestimmten Arbeitsbereiches einem veränderten Reizniveau anzupassen. Diese Anpassung wurde bereits 1834 von Weber für alle damals bekannten Sinnessysteme propagiert (Weber Gesetz) und durch experimentelle Daten nach und nach untermauert (Loewenstein, Handbook of sensory physiology, Springer Verlag 1971).

Die Stäbchenzellen, die als Sensoren in der Retina der Vertebraten auf die Detektion von Lichtreizen in der Dämmerung spezialisiert sind, sind ein gut zugängliches und daher umfangreich untersuchtes Modell für zelluläre Signalverarbeitung. Die Empfindlichkeit dieser Zellen ist sehr hoch: wie Pionierarbeiten aus den 40ern bereits andeuteten (Hecht et al. 1942) reicht ein einzelnes Photon aus um eine elektrische Antwort zu provozieren (Baylor, Lamb und Yau 1979).

Bei gleichförmiger Hintergrundbeleuchtung, die als Einzelreiz initial in einer dunkeladaptierten Zelle eine maximale Antwort provozieren würde, wird dennoch die Transduktionsempfindlichkeit rapide herabgesetzt, so dass keine Sättigung eintritt und die Zelle auf zusätzliche Veränderungen der Lichtintensität auf diesem neuem Niveau reagieren kann („background adaptation“, Fain et al. 2001).

Der Adaptationsprozess erhält durch diesen Shift den Empfindlichkeitsbereich der Transduktion innerhalb eines physiologisch brauchbaren Bereichs von Lichtintensitäten.

Die grundlegenden Mechanismen der Phototransduktion wurden anhand zahlreicher biochemischer and elektrophysiologischer Untersuchungen

weitgehend aufgedeckt. Wie sich Photorezeptoren hingegen an die unterschiedlichen Hintergrundlichtverhältnisse anpassen und welchen Kontrollmechanismen diese Anpassung unterliegt ist nicht hinreichend bekannt. Es wird angenommen, dass die Modulation von Schlüsselschritten der Transduktionskaskade die Regulierung des Empfindlichkeitsbereichs der Zelle zur Folge hat und damit das Phänomen der Background-Adaptation hervorruft (Fain 1976, Fain et al. 1993, Detwiler und Gray-Keller 1996, Pugh et al. 1999). Anhand der bekannten Daten und Informationen aus mehreren experimentellen Arbeiten ist die Regulation der Empfindlichkeit der Transduktionskaskade auf verschiedenen Ebenen der einzelnen biochemischen Schritte möglich (Reviews von Fain et al. 2001, Hurley 2002, Trudeau und Zagotta 2003). Die Bedeutung einer isolierten biochemischen Modifikation für die Lichtantwort eines Photorezeptors kann durch elektrophysiologische Untersuchungen erfasst werden.

Stäbchenzellen sind relativ einfach zu isolieren und können in einem geeigneten Inkubationsmedium ihre Homöostase soweit aufrechterhalten, dass sie für begrenzte Zeit funktionstüchtig bleiben und auf Lichtreize mit

Stromveränderungen entlang der Zellmembran reagieren, die mit elektrophysiologischen Methoden registriert werden (Baylor et al. 1979, Matthews et al. 1988, Schmidt et al. 1994). Durch die Adaptation eines Photorezeptors ändert sich sowohl die Amplitude als auch die Kinetik dieser elektrischen Lichtantworten; auf einen Reiz derselben Intensität reagiert die adaptierte Zelle mit einer kleineren Amplitude und einer schnelleren Rückbildung (Fain 1976, Baylor et al. 1979, Rieke und Baylor 1998, Nikonov et al. 1998). So können mögliche modulierende Substanzen im komplexen Gefüge der intakten Zelle gezielt untersucht werden und die dadurch hervorgerufene Beeinflussung der Transduktion wird in Veränderungen der registrierten Lichtantwort manifest.

In der vorliegenden Arbeit wurden Analysen der Amplitude und Kinetik der Rückbildung der Lichtantwort von Stäbchenzellen durchgeführt anhand von Messungen von Membranströmen, die mit Saugelektroden abgeleitet wurden („pipette suction technique“, Baylor et al. 1979).

Ziel war die Anpassung der Lichtantwort an verschiedene Lichtverhältnisse, bzw. bei Lichtreizen auf unterschiedlichem Hintergrundlichtniveau zu untersuchen und eine mögliche Rolle von

Stickstoffmonoxid als modulierendes Molekül in diesem Prozess zu überprüfen.

## **1.2 Stand der Forschung**

Für die Aufdeckung von möglichen Adaptationsgrundlagen ist die Transduktionskaskade von fundamentaler Bedeutung. In den folgenden Kapiteln werden die Komponenten dieses Vorgangs in der Stäbchenzelle beschrieben und bekannte Daten und Informationen zu Regulationsmechanismen aufsummiert.

### **1.2.1 Detektion, Wandlung und Verstärkung des Lichtsignals in der Stäbchenzelle**

Die Funktion der Stäbchenzellen ist eng mit ihrer Morphologie verbunden. Das Außensegment ist zylinderförmig und enthält einen Stapel von 600-1000 flachen Scheiben, die den Sehfärbstoff Rhodopsin beherbergen. Diese Disks, die aus gefalteten Lipiddoppelschicht-membranen bestehen, werden stets an der Basis des Außensegments neu gebildet. Die Lipoproteine und

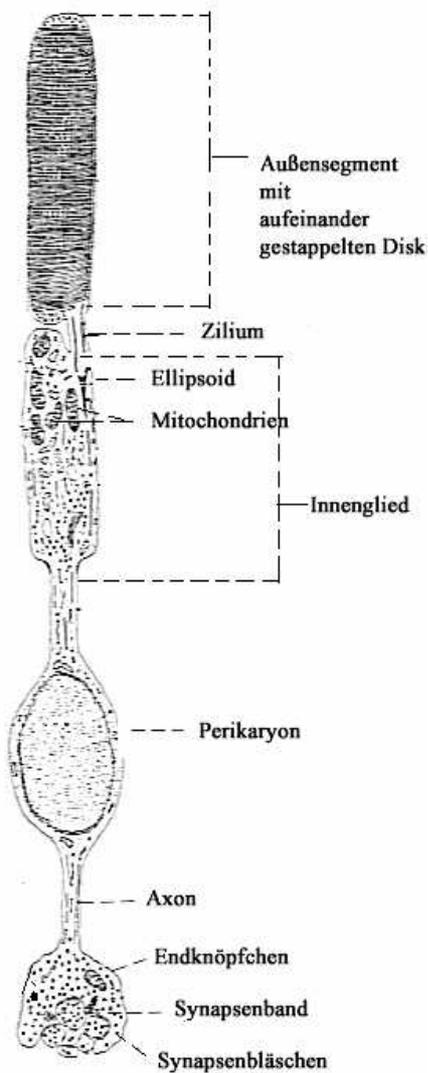
das Photopigment dafür werden im Innensegment synthetisiert und dann ständig nach oben verlagert. Das äußere Drittel des Außensegmentes wird in der Retina umgeben

von den Mikrovilli der Pigmentepithelzellen, die die alten, abgestoßenen Scheiben phagozytieren. Der Abbau erfolgt möglicherweise kontinuierlich und ist für die Funktion unerlässlich (Baumann 1972). Auch ein Teil der an der Phototransduktion beteiligten Enzyme ist an den Diskmembranen gebunden, während andere gelöst im Zytoplasma zwischen den Disks vorliegen.

Über eine Art Zilium als Verbindungsstück geht das Außensegment in das Innenglied über, welches aus einem azidophilen Bereich oder Ellipsoid, der von Mitochondrien ausgefüllt ist, und einem basophilen Bereich besteht, der glattes endoplasmatisches Retikulum, freie Ribosomen und Anteile des Golgi- Apparates enthält. Es folgen der Zellkern und das Axon mit dem synaptischen Fortsatz für die Verbindung zu den nachgeschalteten Bipolar- und Horizontalzellen (Benninghoff Anatomie, Band 2, Urban und Schwarzenberg 1994).

**Abb. 1:** Schema der Ultrastruktur von Stäbchen

(nach Geneser, Histologie, Deutscher Ärzte Verlag Köln 1990, leicht modifiziert).



Die Plasmamembran des Außensegments enthält Ionenkanäle, deren Leitfähigkeit lichtgesteuert ist; im Dunkeln sind diese Kanäle zum Teil offen, so dass ein ständiger Einstrom von Kationen, hauptsächlich  $\text{Na}^+$ , stattfindet, der das ansonsten negativ elektrische Potential des Inneren verringert. Licht führt über eine Kaskade von Reaktionen, die im Außensegment stattfinden, zur Schließung dieser Kanäle und damit zu einer Verstärkung der negativen Ladung im Zellinneren ("Hyperpolarisation"). Das Ergebnis ist ein elektrisches Signal im Außensegment, das über das Innenglied und das kurze Axon bis zur Synapse passiv fortgeleitet wird, wo es zu einer Verringerung der Transmitterausschüttung führt (Schnapf und Baylor 1987).

Die Detektion des Lichtsignals beginnt mit der Absorption eines Photons durch das Sehpigment Rhodopsin. Rhodopsin gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ist als solcher in hoher Dichte in der Lipiddoppelschicht der Disks integriert (Schertler und Hargrave 1995, Unger et al. 1997). Jedes Molekül besteht aus einem Proteinanteil, dem Opsin, das sieben  $\alpha$ -helikale Transmembran-Domänen aufweist. In seiner inaktiven Form, d.h. in Abwesenheit von Licht, ist Opsin in einer terminaler NH<sub>2</sub>-Gruppe eines Lysins mit einem kleinen Chromophor, dem 11- cis Retinal, via einer protonierten Schiff'schen Base kovalent gebunden. Durch die Protonierung und Wechselwirkungen mit Opsin wird das Absorptionsspektrum des Chromophors von 380 nm (freies Retinal) in den sichtbaren Bereich ( $\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$ ) verschoben (Dratz und Hargrave 1983).

Die Absorption eines Photons verursacht die Isomerisierung des Chromophors in all-trans Retinal. Die veränderte Konfiguration des Retinals versetzt durch Konformationsänderungen der Polypeptidkette das gesamte Rhodopsin in einen angeregten Zustand, der kurzlebig ist und in eine Reihe von Zwischenstufen zerfällt. Eine dieser Zwischenstufen, das

sog. Metarhodopsin II oder kurz  $R^*$ , ist die Form des Sehpigments, die die Transduktionskaskade triggert, dadurch dass Gruppen von Aminosäuren in der zytoplasmatischen Seite des Moleküls exponiert werden, die von einem heterotrimeren G-Protein, dem Transducin als spezifische Bindungsstellen erkannt werden (Emeis 1982, Kühn et al. 1982). Diese Bindung erleichtert den Austausch von GDP durch GTP in der  $\alpha$ - Untereinheit des Transducins (Baehr et al. 1982, Vuong et al. 1984, Hamm und Gilchrist 1996).

G-Proteine sind eine große Gruppe intrazellulärer Proteine, die sich in Form und Funktion sehr ähneln und bei der Übersetzung externer Reize in intrazelluläre Signale eine Schlüsselrolle spielen, zum Beispiel auch bei der Wirkung von Substanzen wie Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, aber auch einiger Pharmaka wie Opiode auf ihre Zielzellen.

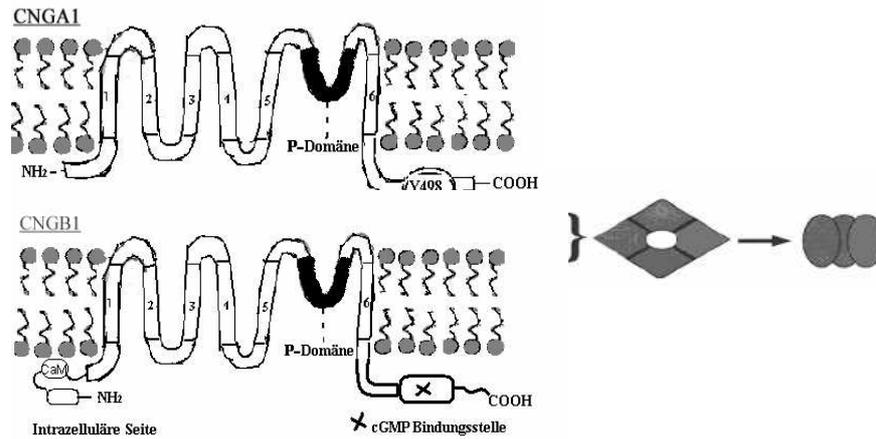
Transducin setzt sich, wie viele andere G-Proteine, aus drei Untereinheiten  $T\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  zusammen. Die  $\alpha$ -Untereinheit enthält eine Bindungsstelle für ein Guanosin-Nucleotid. Inaktives Transducin ist membrangebunden, nach dem Austausch von GDP durch GTP lockert sich die Membranbindung der  $T\alpha$ -GTP Untereinheit, die dadurch ins Zytoplasma zwischen benachbarte Disks diffundieren kann (Kühn 1980, Baehr, Morita et al. 1982).

Die lichtaktivierte Enzymkaskade wird mit der Aktivierung eines weiteren Enzyms durch die  $T\alpha$ -GTP Untereinheit fortgesetzt, einer Phosphodiesterase, kurz PDE. Die PDE ist ebenfalls ein membranassoziiertes Enzymsystem der Disks, das photorezeptorspezifisch aus vier Untereinheiten besteht, zwei katalytischen,  $\alpha$  und  $\beta$  benannt, und in Stäbchenzellen zwei identischen inhibitorischen  $\gamma$ -Untereinheiten (Yamazaki et al. 1990, Beavo 1995, Farber 1995), die im inaktiven Zustand des Enzyms hemmend auf die katalytischen wirken. Zusätzlich gibt es eine  $\delta$ - Untereinheit bislang nur in Stäbchen-Außensegmenten isoliert, die den PDE- Komplex  $\alpha\beta\gamma_2$  löslich machen kann. Die Rolle dieser Untereinheit ist nicht bekannt, es ist denkbar, dass sie die PDE-Aktivität reguliert (Florio et al. 1996).

Die  $T\alpha$ -GTP-Untereinheit bindet an den inhibitorischen Untereinheiten der PDE und hebt ihre hemmende Wirkung auf: die so aktivierte PDE hydrolysiert mit hoher Geschwindigkeit (ca. 2000 pro Sekunde) freie cGMP Moleküle (Kühn 1984, Deterre et al. 1988).

Freies cGMP kann durch Bindung an Kationen- Kanälen der Zellmembran im Außensegment ihre Öffnungswahrscheinlichkeit und Leitfähigkeit

erhöhen (Fesenko et al. 1985, Yau und Baylor 1989). Seit ihrer Entdeckung (Fesenko et al. 1985) wurden molekulare Struktur und Funktion dieser Kanäle vielfältig untersucht; zum Verständnis haben molekulargenetische Untersuchungen und vergleichende Daten aus Analysen der cAMP-kontrollierten Kanäle der Riechzellen beigetragen, die an Struktur und Funktion den kationischen Kanälen der Photorezeptoren sehr ähneln, so dass die Kanalbezeichnung auf zyklische- Nukleotid -kontrollierte Kanäle in der gegenwärtigen Literatur erweitert wurde („cyclic nucleotid gated channels“, abgekürzt CNG-Kanäle, Zimmermann 1995, Finn et al. 1996, Zagotta und Siegelbaum 1996, Fain et al. 2001). Diese Kanäle sind potential-unempfindlich und unspezifisch für eine Reihe von monovalenten Kationen, Na<sup>+</sup> und auch K<sup>+</sup> und Li<sup>+</sup>, aber auch für einige bivalente Kationen wie Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> durchlässig (Yau und Nakatani 1984, Hodgkin et al. 1985, Karpen et al. 1993).



**Abb. 2:** Zeichnung der Modell- Struktur des cGMP- Kanals bei Stäbchen;

es wird davon ausgegangen, dass native Kanäle der Stäbchen Heteromultimere sind mit vier Untereinheiten, drei A1 Untereinheiten und einer B1, die gemeinsam mit ihren P- Domänen eine Pore in der Membran des Außensegments formen (Kaupp et al.1989, Dhallan et al.1990, Goulding et al. 1992, Liman and Buck 1994, Korschen et al.1995, Gerstner et al. 2000). Besetzung der Bindungsstellen durch cGMP bewirkt durch Umorganisation der Untereinheiten und allosterische Wechselwirkungen die Öffnung der Kanalpore (Richards et al. 2000, Flynn et al. 2003). Es bestehen viele Parallelen zu den Kanälen der Membran von Riechzellen (Kramer und Molokanova 2001). Der B1-Untereinheit werden modulatorische Eigenschaften zugesprochen, vor allem über eine Ca/Calmodulin Bindungsstelle (CaM), der modulatorische Effekt und dessen Bedeutung sind dennoch bei Stäbchen, anders als bei Riechzellen, umstritten (Fain et al. 2001, Trudeau und Zagotta 2003).

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass die höchste Leitfähigkeit erreicht wird, wenn alle Bindungsstellen für cGMP besetzt werden, jedoch auch partiell besetzte Untereinheiten eines Kanals interagieren miteinander, so dass eine Leitfähigkeit für Kationen auf niedrigerem Niveau ermöglicht wird (Varnum und Zagotta 1997, Ruiz und Karpen 1997).

Bei vollständiger Dunkeladaptation strömt ständig ein Einwärtsstrom von ca. 40 pA ins Innere des Außensegments der Zelle (Dunkelstrom, Baylor et al. 1979). In Stäbchenzellen von Fröschen liegt der Anteil des  $\text{Ca}^{2+}$  - Einwärtsstroms mit ca.  $10^7$  Ionen pro Außensegment pro Sekunde bei 10-15% des gesamten zirkulierenden Einwärtsstroms im Dunkeln, der Rest wird hauptsächlich von  $\text{Na}^+$  bestritten, wobei die Kanäle unter experimentellen Bedingungen unselektiv permeabel sind für eine weitere Reihe mono- und bivalenter Ionen wie  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  und  $\text{Mg}^{2+}$  (Hodgkin et al. 1985, Nakatani und Yau 1988, Karpen et al. 1993).

Die Abnahme des cGMP- Spiegels im Zytoplasma des Außensegments durch Licht führt durch Herabsetzung der Leitfähigkeit der Kationenkanäle zur Abnahme des Einwärtsstroms, das Zellinnere wird negativer (Hyperpolarisation der Zellmembran, Yau und Nakatani 1985, Baylor

1987). Der  $\text{Ca}^{2+}$  -Anteil am Einwärtsstrom ist ein wichtiger Aspekt der Transduktion;  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und -Ausstrom durch elektrogene  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - $\text{K}^+$  -Transporter der Außenmembran befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht, welches die freie zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Außensegment eines Photorezeptors bestimmt (Yau und Nakatani 1985, Miller und Korenbrot 1987, Lagnado et al. 1992). Die lichtinduzierte Reduktion des Einwärtsstroms resultiert in einer Abnahme der freien  $\text{Ca}^{2+}$  -Konzentration und das soll mehrere Komponenten der Transduktionskaskade als negatives Feedback-Signal regulieren (Gray-Keller et al. 1994, siehe auch Kapitel II c).

Die chemischen Reaktionen vom Aktivieren des Rhodopsins durch Licht bis zum elektrischen Signal sind durch einen erheblichen Verstärkungseffekt charakterisiert; ein aktiviertes  $\text{R}^*$  Molekül ist in der Lage, mehrere Hunderte von Transducin Molekülen hintereinander durch GDP/GTP Austausch zu aktivieren. Die durch  $\text{T}\alpha$ -GTP aktivierte PDE hydrolysiert freies cGMP mit hoher Geschwindigkeit, so dass am Ende der Transduktionskaskade  $10^5$ - $10^6$  cGMP Moleküle durch die Initialaktivierung eines einzigen  $\text{R}^*$  Moleküls abgebaut werden (Review Fain et al. 2001).

### **1.2.2 Deaktivierungsmechanismen; die Rückstellphase der**

#### **Lichtantwort**

Die Aktivierung der Enzymkaskade durch Licht erfolgt sehr effizient; für die Photoisomerisation eines Rhodopsinmoleküls genügt bereits die Absorption eines einzelnen Photons, die dadurch in Gang gesetzte Enzymkaskade und der damit verbundene Verstärkungseffekt verhindern durch Reduktion der freien cGMP Konzentration und Abnahme der Leitfähigkeit der Kationenkanäle der Membran des Außensegments den Einstrom von über einer Million elementaren elektrischen Ladungen in die Zelle (Baylor et al. 1984).

Die Effizienz der Zelle als Lichtsensor insgesamt basiert jedoch auf der Reproduzierbarkeit der Lichtantwort, was für die Enzymkaskade Deaktivierung und Wiederherstellung der ursprünglichen Verhältnisse bedeutet (Rieke und Baylor 1998).

Am Anfang der Phototransduktion steht das lichtaktivierte Rhodopsin. Aktiviertes Rhodopsin kann durch zwei sequenzielle Prozesse inaktiviert werden; durch Phosphorylierung durch die sog. Rhodopsin-Kinase des Außensegments und anschließend Bindung eines Außensegmentproteins,

des Arrestins, am phosphorylierten Photopigment (Review Fain et al. 2001). Erste Arbeiten zur Phosphorylierung als möglichen Mechanismus der Deaktivierung des Rhodopsins stammen von den Arbeitsgruppen um Kühn und Bownds 1972, die zeigten, dass die Phosphorylierung eines R\* Moleküls in vitro an mehreren Stellen (Serin und Threonin) im COOH-Terminus möglich ist und dadurch die katalytische Aktivität von R\* reduziert wird. In vivo reicht die Phosphorylierung möglicherweise an einer oder zwei Stellen aus, am Serin 334 oder Serin 338 (Kühn 1974, Chen et al. 1995, Ohguro et al. 1995). Kontrollen mit entsprechenden transgenen Mäusen durch die beiden letzten Arbeitsgruppen zeigten eine deutliche Verlängerung der Lichtantwort.

Die Terminierung der katalytischen Aktivität von R\* geschieht nach Dissoziation der Kinase und Bindung des Arrestins am phosphorylierten Molekül (Kühn et al. 1984, Xu et al. 1997). Ein Spleißprodukt des Arrestins, P44, das membranassoziiert im Außensegment zu finden ist, bindet ebenfalls präferenziell am phosphorylierten R\* und inaktiviert es (Smith et al. 1994). Als Mechanismus der Ausschaltung werden sterische Veränderungen am Molekül postuliert, die die Bindung des Transducins

unmöglich machen sollen (Kühn et al. 1984, Krupnick et al. 1997, Pulvermuller et al. 1997). Ob die Inaktivierung des ersten Schritts der Transduktionskaskade auch ein Schlüsselereignis als zeitlimitierender Faktor für die Rückstellphase der Lichtantwort ist, ist nicht klar. Es gibt experimentelle Daten von Pepperberg und Mitarbeitern 1992 und Rieke und Baylor 1998, die das für Salamander Stäbchen postulieren; weitere Arbeiten von Corson et al. 1994, Sagoo und Lagnado 1997 und Nikonov et al. 1998 implizieren, dass die Zeitspanne eines aktiven R\* Moleküls die Gesamtdauer der Lichtantwort nicht beeinflusst.

Die Regeneration des inaktivierten, gebleichten Photopigments ist ein Prozess, der mehrere biochemische Schritte und die Beteiligung des retinalen Pigmentepithels erfordert (Nöll 1984, Crouch et al. 1996). Für das Recycling des Rhodopsins ist die Reduktion des Chromophors zu all-trans Retinol durch eine Retinol-Dehydrogenase von essenzieller Bedeutung, nur dann kann Arrestin wieder dissoziieren und alle weiteren Schritte, wie Abtransport und Regeneration des Chromophors und Dephosphorylierung der Opsinkette, eingeleitet werden (Hofmann et al. 1992). Der reduzierte Chromophor gelangt über ungeklärte Translokationsmechanismen der

Interrezeptormatrix in die Pigmentepithelzellen und nach Oxidierung und Isomerisation als 11-cis-Retinal zurück in die Stäbchenzelle (Liu et al. 1982, Nöll und Yoshikami 1978).

Bei schwachen Lichtverhältnissen werden physiologischerweise einige wenige Rhodopsinmoleküle aktiviert und gebleicht. Stäbchenzellen verfügen über eine große Reserve an Photopigment, so dass dessen Recycling eher von langfristiger Bedeutung für den visuellen Zyklus ist (Kühn 1984, Review Fain et al. 2001).

Für das aktive Transducin wird angenommen, dass es nach einiger Zeit sein gebundenes GTP-Molekül in GDP und anorganisches Phosphat spaltet und sich dadurch selbst und folglich auch die PDE inaktiviert (Kühn 1980, Arshavsky et al. 1987, Vuong und Chabre 1990).

In vitro dauert die Hydrolyse mehrere Sekunden, in vivo deutet vieles daraufhin hin, dass sie kürzer als 5 Sekunden ist und sogar den Zeitverlauf der Lichtantwort bestimmen könnte (Sagoo and Lagnado 1997). Wie einige Arbeiten zeigten, wird die Hydrolyserate in vivo durch membranassoziierte Proteine der Disks des Außensegments, sog. GAP's (GTPase Accelerating Proteins), beschleunigt (Angleon und Wensel 1993, Nekrasova et al.

1997, He et al. 1998), zu denen auch die Gamma-Untereinheiten der PDE im Sinne eines Feedbackregulationsmechanismus gerechnet werden (Tsang et al. 1998).

Alternativmechanismen der Inaktivierung der PDE, unabhängig von der GTP- Hydrolyse am aktiven Transducin, wurden ebenfalls vorgeschlagen, zum einen durch Überangebot an der inhibitorischen  $\gamma$ -Untereinheit der PDE (Erikson et al. 1992) und zum anderen über die Phosphorylierung der inhibitorischen Untereinheit durch eine spezifische Kinase (Tsuboi et al. 1994). Die Bedeutung dieser Mechanismen in der Beendigung der physiologischen Lichtantwort der Stäbchen ist unklar.

Die gesamte cGMP Konzentration in einem Froschstäbchen beträgt ca. 30-40  $\mu\text{M}$  (Woodruff und Bownds 1979), der größte Teil davon ist dennoch an verschiedenen Proteinen im Außensegment gebunden (z. B. an nicht katalytischen Seiten der PDE). Die freie cGMP Konzentration, die im dynamischen Gleichgewicht der dunkeladaptierten Zelle entscheidend für die Öffnung der Kationenkanäle der Außenmembran ist, beträgt ca. 6  $\mu\text{M}$  (Nakatani und Yau 1988). Durch die lichtaktivierungsbedingte Hydrolyse durch die PDE sinkt die freie cGMP Konzentration rapide ab, für die Wiederherstellung des ursprünglichen Membranpotentials ist die Synthese des Moleküls essentiell.

Enzyme, die das bewerkstelligen, sind die sog. Guanylat-Zyklasen. In Photorezeptoren wurden zwei Formen identifiziert und kloniert, GC-E oder retGC-1 und GC-F oder retGC-2 (Shyjan et al. 1992, Lowe et al. 1995, Yang et al. 1995). Beide Formen sind membrangebunden und können beide im Außensegment gleichzeitig exprimiert werden (Yang et al. 1997). Charakteristisch für diese Photorezeptor-spezifische Subklasse der Zyklasen ist die Regulation ihrer Aktivität durch drei kleine  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine, die Veränderungen in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytoplasma des

Außensegments registrieren und die Guanylat-Zyklen aktivieren, wenn diese unter dem Wert von 500-600 nM der dunkeladaptierten Zelle abfällt (Review von Koch et al. 2002).

Die mögliche Existenz einer anderen nicht-membrangebundenen, sog. löslichen Form der Guanylat-Zyklase in Photorezeptoren, wie sie von anderen Zellen, z.B. glatten Muskelzellen, bekannt ist, wurde in einigen Arbeiten ebenfalls beschrieben (Margulis et al. 1992, Yoshida et al. 1995, Schmidt und Nöll 1995, Haberecht et al. 1998). Die Aktivität dieser im Zytosol des Außensegments vorliegenden eher kleinen Enzymfraktion kann durch Stickstoffmonoxid um ein Vielfaches gesteigert werden (Margulis et al. 1992).

Alle aufgeführten Inaktivierungsmechanismen sind plausibel, welche, unter welchen Bedingungen und ob nur einer oder mehrere für den zeitlichen Ablauf der Terminierung der Lichtantwort entscheidend sind, ist nicht abschließend geklärt. Die Gründe hierfür liegen hauptsächlich an der Komplexität der biochemischen Inaktivierungsvorgänge und der mehreren modulierenden Faktoren, die in situ coexistieren. (Nikonov et al. 1998, Fain et al. 2001).

### 1.2.3 Modulierende Vorgänge und Botenstoffe

Lichtaktivierung und Deaktivierung der Enzymkaskade im Außensegment eines Stäbchens manifestieren sich an Änderungen der freien Konzentration zweier Substanzen im Zytosol des Außensegments, die als sog. second Messenger fungieren: cGMP und  $\text{Ca}^{2+}$ .

Nach einheitlicher Meinung im gegenwärtigen Phototransduktionsmodell handelt es sich bei den beiden Molekülen um gekoppelte Botenstoffe, deren freie Konzentration im Zytosol sich in einem dynamischen Gleichgewicht befindet, das sich gegenseitig beeinflusst (Gray- Keller et al. 1999, Koutalos 1999, Fain et al. 2001, Calvert et al. 2002). Im Dunkeln fließt  $\text{Ca}^{2+}$  durch die cGMP- kontrollierten Kanäle ins Außensegment hinein und wird über  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$  Transporter der Außenmembran kontinuierlich hinaus transportiert, so dass eine konstante freie  $\text{Ca}^{2+}$  - Konzentration von 220-550 nM im Zytosol herrscht (Yau und Nakatani 1984, Cervetto et al. 1989, Kim et al. 1998, Matthews und Fain 2003). Licht bewirkt durch Abnahme der freien cGMP Konzentration und resultierender Schließung der Kationenkanäle, während der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$  Transport unbeeinflusst bleibt, auch Abnahme der freien  $\text{Ca}^{2+}$  -

Konzentration im Zytosol des Außensegments (Yau und Nakatani 1985, McNaughton et al. 1986, Lagnado et al. 1992). Das fungiert als negatives Feedback-Signal für mehrere Stufen in der Enzymkaskade, welche die Homöostase von cGMP regulieren (Gray- Keller und Detwiller 1994, Matthews 1997).

Die Abnahme der freien  $\text{Ca}^{2+}$  -Konzentration bewirkt Zunahme der Syntheserate von cGMP (Koch und Stryer 1988), der Effekt wird über die drei  $\text{Ca}^{2+}$  -bindenden Proteine, GCAP's, im Außensegment vermittelt, die die membrangebundenen Guanylat-Zyklasten aktivieren (Review Koch et al. 2002).

$\text{Ca}^{2+}$  kann als Komplex mit einem weiteren Protein, Calmodulin, durch Bindung an die  $\beta$ - Untereinheit der cGMP-Kanäle der Stäbchen, deren Affinität für cGMP herabsetzen (Hsu und Molday 1993, Chen et al. 1994). Die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  /Calmodulin verändert außerdem die Interaktion zwischen den N- und C-Termini der Kanaluntereinheiten, was möglicherweise auch die Leitfähigkeit der Kanäle direkt beeinflusst (Gordon et al. 1995, Varnum und Zagotta 1997). Die physiologische Bedeutung einer  $\text{Ca}^{2+}$  /Calmodulin Modulation der Kanalleitfähigkeit ist

umstritten, da unter anderem ein Effekt auf die cGMP Affinität erst in Kalziumkonzentrationen unter 50nM in vitro eintritt, die in vivo nur bei extremer Lichteinwirkung vorkommen (Fain et al. 2001, Trudeau und Zagotta 2003).

Ein weiteres  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein im Außensegment, Recoverin, soll einen Komplex mit der Rhodopsin-Kinase formen und so die Phosphorylierung des Rhodopsins verhindern; der licht-induzierte Abfall der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bewirkt Dissoziation dieses Komplexes und Erhöhung der Phosphorylierungsrate mit möglicherweise schnellerer Inaktivierung des Rhodopsins (Kawamura et al. 1993).

Zusätzlich wurde für den Abfall der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auch ein direkter Effekt auf die katalytische Aktivität des lichtaktivierten Rhodopsins postuliert, die dadurch reduziert wird, mit dem Ergebnis einer Herabsetzung der Amplifikationspotenz der Transduktionskaskade (Lagnado und Baylor 1994, Matthews 1997).

Auch für cGMP wurden modulierende Eigenschaften auf die Enzymkaskade propagiert. Lichtaktives Transducin zeigt intrinsisch hydrolytische Aktivität als GTPase und inaktiviert sich im Verlauf der

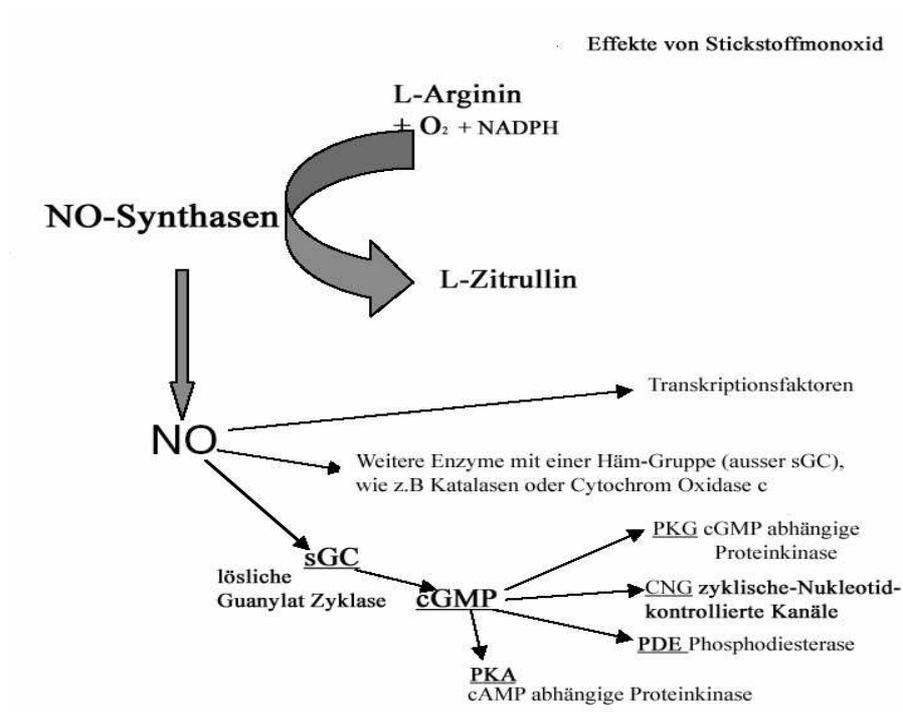
Phototransduktion selbst. Bindung von cGMP an nicht katalytischen Seiten der Phosphodiesterase reguliert retrograd diese Inaktivierungsreaktion im Sinne eines negativen Feedback-Signals, solange genug cGMP vorhanden ist wird die Reaktion gehemmt (Arshavsky und Bownds 1992, Cote et al. 1994). Die Inaktivierung des Transducins setzt die allosterische Interaktion des Moleküls mit seinem Ziel-Enzym PDE, genauer mit den Gamma-Untereinheiten der PDE, voraus, die Abnahme des cGMP Spiegels soll die Einleitung dieser Interaktion und dem zufolge auch die Einleitung der Rückbildungsphase der Lichtantwort bewirken (Cote et al. 1994, Tsang et al. 1998).

Protein-Protein Interaktionen zwischen den beteiligten Enzymen und weiteren Proteinen im Außensegment sind bekannt, aber ihre Rolle in der Phototransduktion ist nicht eindeutig; die einzelnen biochemischen Vorgänge sollen komplementäre Feinregulationsmechanismen darstellen, allerdings wird deren physiologische Bedeutung für die Lichtantwort in vivo kontrovers diskutiert (Hurley 2002). Zusätzliche biochemische Vorgänge wie Phosphorylierungen oder Ribosylierungen von assoziierten Proteinen wie z. B. den GTPase beschleunigenden Proteinen (Hu et al.

2001) oder den inhibitorischen Untereinheiten der PDE (Hayashi et al. 2000) sind ebenfalls nicht zugeordnet. In diese Kategorie gehören auch die in Fülle berichteten biochemischen Modifikationen und Modulationsmöglichkeiten der cGMP-Kanäle, die hierbei nicht im Einzelnen aufgeführt werden (Review Kramer und Molokanova 2000).

Ein weiteres Molekül, Stickstoffmonoxid (NO), hat sich, neben Effekten im kardiovaskulären und Immunsystem, in den letzten Jahren mehr und mehr als Neuromodulator im ZNS etabliert mit wichtigen Funktionen an der langfristigen Modulation synaptischer Transmission. Diese Wirkung soll durch die Interaktion dieses kleinen gasförmigen Moleküls mit der Hämgruppe der löslichen Guanylat-Zyklasten und die dadurch hervorgerufene Aktivierung dieser Enzymgruppe resultieren; Folge ist die Erhöhung der intrazellulären cGMP Konzentration in der Zielzelle (Reviews Hanafy et al. 2001, Pepicelli et al. 2004). Lösliche Guanylat-Zyklasten katalysieren die Synthese von cGMP mit GTP als Substrat und sind präsent im Zytosol vieler Zellenarten, so auch in der Retina (Sitaramayya 2002).

NO wird endogen in vielen Gewebearten durch NO Synthasen produziert, die in drei Isoformen aufgeteilt wurden: NOS I (neuronale Form), II (induzierbare Form) und III (endotheliale Form). Die Aktivität dieser Enzyme wird in der Regel über  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin reguliert (Hanafy et al. 2001). NO und seine Wirkungswege sind in nachfolgender Abbildung schematisch zusammen- gefasst:



**Abb. 3:** Allgemeines Schema über Synthese und Wirkungswege von NO in Anlehnung an Forth's Pharmakologie, Spektrum Verlag 1996 und an einer Review- Arbeit von Hanafy et al. 2001

Mehrere biochemische Arbeiten haben NO Synthase Aktivität sowohl in der Retina von Amphibien als auch bei Mammalienretinae nachgewiesen (Yoshida et al. 1995, Kurenni et al. 1995, Blute et al. 1997). Durch immunozytochemische und histochemische Methoden lassen sich die Zellen, in denen sie am meisten vorkommt, als Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) amakrine Zellen und einige Subpopulationen von Ganglienzellen identifizieren. NO soll in Stäbchenaußensegmenten durch Enzyme synthetisiert werden, die sowohl membranassoziiert als auch im Zytosol lokalisierbar waren, wobei die membranassoziierte Form unabhängig von  $Ca^{2+}$ /Calmodulin zu sein schien (Yoshida et al. 1995, Haberecht et al. 1998). Andere Arbeiten lokalisierten NO Synthase Aktivität und das Zielenzym lösliche Guanylat Synthase hauptsächlich im Innensegment im Bereich des Ellipsoids und brachten das in Verbindung mit Modulation der synaptischen Transmission der Photorezeptoren (Koch et al. 1994, Kurenni et al. 1995).

Die breite Distribution des NO/cGMP Systems in mehreren Schichten in der Retina führte zu der Vermutung, dass NO möglicherweise an der

visuellen Modulation auf mehreren Ebenen beteiligt ist (Blute et al. 1998, Sitaramayya 2002).

Elektrophysiologische Ableitungen mit der Patch-Clamp Methode zeigten durch intrazelluläre Applikation von Nitroprussid oder Komponenten des NO Syntheseweges, wie L-Arginin oder NADPH, Veränderungen des Dunkelstroms sowie der Konfiguration und Rückbildungs-geschwindigkeit der Lichtantworten in Amphibienstäbchen (Schmidt et al. 1991, Tsuyama et al. 1992), die auf eine modulierende Rolle von Stickstoffmonoxid bereits auf Photorezeptorebene hinweisen.

Die Anpassung der Sensitivität der Photorezeptoren an unterschiedliches Hintergrundlicht wird auf Mechanismen zurückgeführt, die Schlüsselkomponenten der Enzymkaskade beeinflussen, so dass die Amplitude abnimmt und der zeitliche Verlauf der Lichtantwort beschleunigt wird (Pugh und Lamb 1990, Calvert et al. 1998, Pugh et al. 1999, Fain et al. 2001). Sowohl Stäbchen als auch Zapfen sollen durch Feedbackreaktionen auf das jeweilige Level des vorhandenen Umgebungslichts adaptieren, die entweder die katalytische Aktivität oder

die Lebenszeitspanne der aktiven Form von Schlüsselenzymen in der Transduktionskaskade regulieren (Calvert et al. 2002). Dabei kann man eine schnelle Phase, die innerhalb 1 bis 2 s eintritt, und eine langsamere Phase unterscheiden, die mehrerer Sekunden bis Minuten bedarf und erst bei höheren Intensitäten eintritt, die mehr als die Hälfte des gesamten Rhodopsins ausbleichen (Calvert et al. 1999). Die schnelle Phase der Anpassung beginnt bei Stäbchen bereits bei sehr geringem Lichtlevel, der Größenordnung von 2-5 aktivierten Rhodopsinmolekülen pro Sekunde, und ist kein lokales Phänomen (Fain et al. 2001), so dass angenommen wird, dass sie durch einen internen löslichen Botenstoff hervorgerufen werden muss, während für die langsame Phase eher biochemische Veränderungen, die langsamer verlaufen, als Ursache vermutet werden (Fain et al. 2001, Calvert et al. 2002, Hurley 2002).

Es ist mittlerweile etabliert, dass Kalzium aufgrund der Rückkopplungseffekte auf die Enzymkaskade für die akute Anpassung eine sehr wichtige Rolle spielt, es soll sogar als alleiniger Botenstoff das Phänomen der schnellen Adaptation hervorrufen (Fain et al. 2001). Zusätzliche Modulation wird nicht ausgeschlossen (Koutalos 1999, Gray-

Keller et al. 1999, Hurley 2002) und Stickstoffmonoxid ist aufgrund des Wirkungsmechanismus über die lösliche Form der Guanylat-Zyklase ein potenzieller Modulator (Schmidt und Nöll 1995, Haberecht et al. 1998).

Eine Zusammenfassung von Aktivierung und Inaktivierung der Transduktionskaskade wird schematisch in der nächsten Abbildung dargestellt.

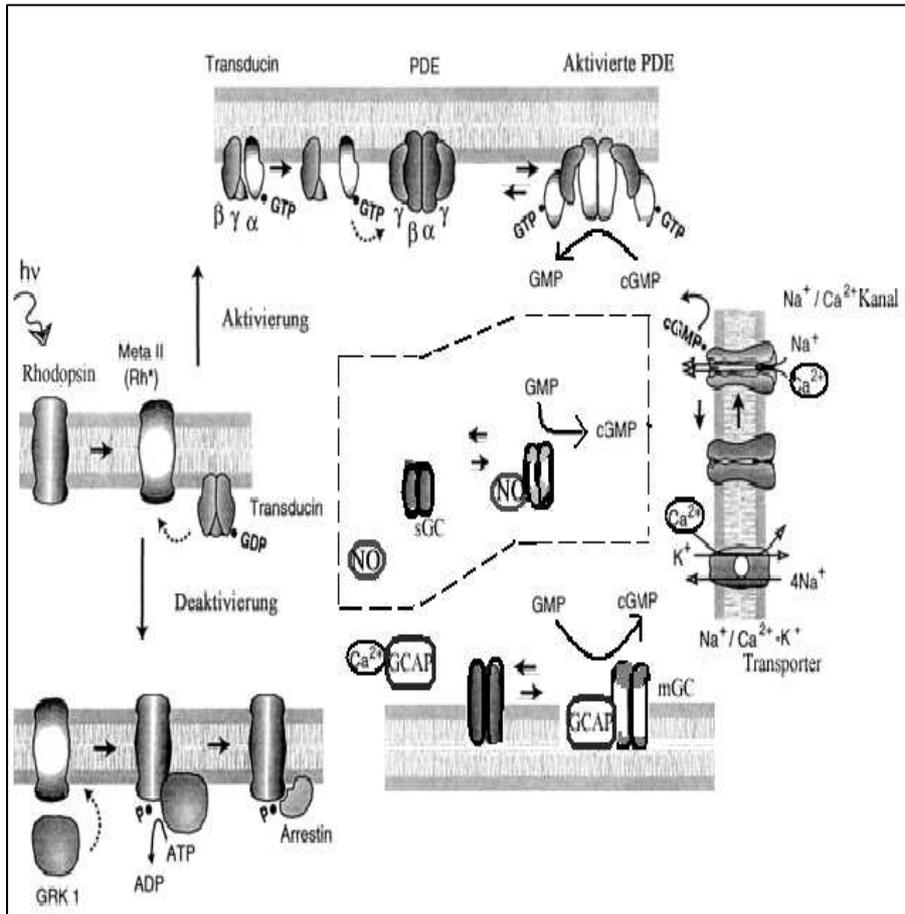


Abb. 4: Zusammenfassung der Aktivierung und Inaktivierung der Transduktionskaskade mit Einzeichnung beider Guanylat- Zyklasen, der membrangebundenen mGC, und der löslichen sGC, die möglicherweise bei der Erhaltung der Homöostase von cGMP additiv wirken.

GCAP: Guanylate Cyclase Activating Proteins,

GRK 1: G-protein-coupled Receptor Kinase 1, PDE: Phosphodiesterase

Da es mehrere Hinweise für die Existenz eines NO/cGMP Signalweges in Photorezeptoren gibt, aber keine Evaluierung des Einflusses von Stickstoffmonoxid auf das elektrische Gesamtverhalten eines intakten Photorezeptors mit einer elektrophysiologischen Methode, die das erfasst, wurde diese Arbeit mit dem Ziel konzipiert, einen möglichen Einfluss von NO auf die elektrischen Lichtantworten intakter Stäbchen zu erfassen und die eventuell hervorgerufenen Veränderungen mit den Veränderungen die bei gleichen Lichtreizen unter Hintergrundsbeleuchtung auftreten, zu vergleichen.

Wenn NO im Stäbchenaußensegment, wie in anderen Zellen, die cGMP Konzentration ansteigen lässt, ist bei Lichtreizung unter NO- Einfluss zu erwarten, dass die Lichtantwort schneller beendet wird und möglicherweise dass, da mehrere Kanäle offen bleiben oder schneller wiedergeöffnet werden, auch die Amplitude des registrierten elektrischen Signals kleiner ausfällt.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.1 Tiere und Präparation

Für alle Experimente wurden adulte Frösche der Spezies *Rana temporaria*, bekannt als „common european brown frog“, aus artgerechter Tierzucht für Forschungszwecke von der Frog Farm McCarthy in Irland bezogen. Die durchschnittliche Körperlänge betrug ca. 10 cm. Vor dem jeweiligen Versuch wurde das ausgewählte Tier über Nacht und mindestens für 12 Stunden bei Zimmertemperatur dunkeladaptiert.

Die Präparation und die direkt im Anschluss erfolgten Registrierungen fanden jeweils im Dunkeln unter nahem Infrarotlicht (Wellenlänge  $> 0,8 \mu\text{m}$ ) statt. Nach Dekapitation wurden die Bulbi enukleiert, in eisgekühlter Extrazellular-Lösung gespült und anschließend mit Hilfe eines Makrotoms äquatorial eröffnet. Die Retina wurde weiter in eisgekühlter Extrazellular-Lösung in einer auf Eis gestellten Petrischale unter dem Stereo-Mikroskop bei Infrarot mit zwei Feinpinzetten von Sklera, Chorioidea und Pigmentepithel abpräpariert. In Anbetracht dessen, dass die Registrierungen gleich im Anschluss bei Zimmertemperatur in einer

Messkammer in etwa 150  $\mu$ l Lösung bei einer Meniskushöhe von 1,3 mm erfolgten, in der die Sauerstoffversorgung per Diffusionem stattfand, war Ziel der Präparation, eine kleine Zahl intakter Stäbchen mit möglichst wenig Zelldebris zu erhalten. Somit wurde die Retina nach der Abpräparation vorsichtig in vier Teile zersetzt und nur eins davon wurde in der Messkammer weiter feinpräpariert, indem es mit den Feinpinzetten in immer kleinere Bruchstücke zerzupft wurde. Dabei lösten sich aus dem Zellverband einzelne Stäbchen, die langsam zu Boden sanken. Die noch zu sehenden Gewebsteile wurden unter dem Stereomikroskop mit einer Pasteur Pipette vorsichtig von der Oberfläche abgesaugt.

Intakte Stäbchen waren unter dem Mikroskop ab 400xfacher Vergrößerung anhand ihrer Bleistiftform leicht zu identifizieren. Das dreieckige Innensegment mit einer Länge von ca. 15 $\mu$ m geht über ein dünnes kurzes Verbindungsstück, das Zilium, in das zylindrische Außensegment über, dessen Länge ca. 45  $\mu$ m beträgt. Der Durchmesser des Außensegments betrug im Mittel 4,5  $\mu$ m. Der Innendurchmesser der polierten Saugelektroden wurde darauf abgestimmt.

Die Ausbeute an intakten Stäbchen betrug im Mittel ca. 25 Zellen, mit ca.

10-mal soviel angefallenen abgetrennten Außensegmenten, die für die Versuche nicht verwendet wurden.

Eine Enzymbehandlung zur Gewinnung der Stäbchen war nicht erforderlich und fand nicht statt, zumal Untersuchungen zur Wirkung von Enzymen auf die elektrische Aktivität der Stäbchen Veränderungen durch teilweise erhebliche Schädigung der Membranoberfläche aufzeigten (Schmidt, 1986).

Die Experimentierzeit, die nach Dekapitation des Frosches zur Verfügung stand, variierte je nach Präparation zwischen 2 und maximal 4 Stunden, wobei erfahrungsgemäß eine geringere Zahl an Stäbchen in der Messkammer mit der längeren Experimentierzeit korrelierte.

## **2.2 Versuchsaufbau, Elektroden, Medien und Elektronik**

Das prinzipielle Ziel in jedem Experiment war, eine intakte Zelle in der Messkammer zu suchen, von der Seite des Innensegments an sie mit der Glaspipette nahe genug zu kommen ohne sie zu berühren und unter leichtem Unterdruck sie in die Pipette hineinzusaugen, so dass sie intakt

und mit dem Innensegment während der gesamten Experimentierzeit in der Pipette bleibt. Eine optische Kontrollmöglichkeit ist hierfür sehr wichtig. Die Bedingung, dass während der Experimente kein Licht außer den geplanten Lichtreizen die Stäbchen erreicht, musste ebenfalls erfüllt werden, so fanden alle Schritte bis zum Ende jedes Versuchs im Dunkeln und wo nötig mit Hilfe kleiner Infrarotleuchten statt. Die Messkammer, deren Boden aus Kristallglas bestand und in die die indifferente Elektrode etwa 1mm hineinragte, wurde auf dem Messplatz in ein invertiertes Zeiss Mikroskop platziert, dessen Objektiv (Zeiss, Plan 40/0,60) über einen langen Arbeitsabstand verfügte.

Die Wellenlänge der Mikroskopbeleuchtung wurde durch einen Filter (Schott RG 1000) auf  $\lambda > 800$  nm beschränkt. Über eine angeschlossene Infrarotkamera konnten die Stäbchen auf dem Boden der Kammer auf einem Monitor mit rot getönter Mattscheibe in 700-facher Vergrößerung sichtbar gemacht werden.

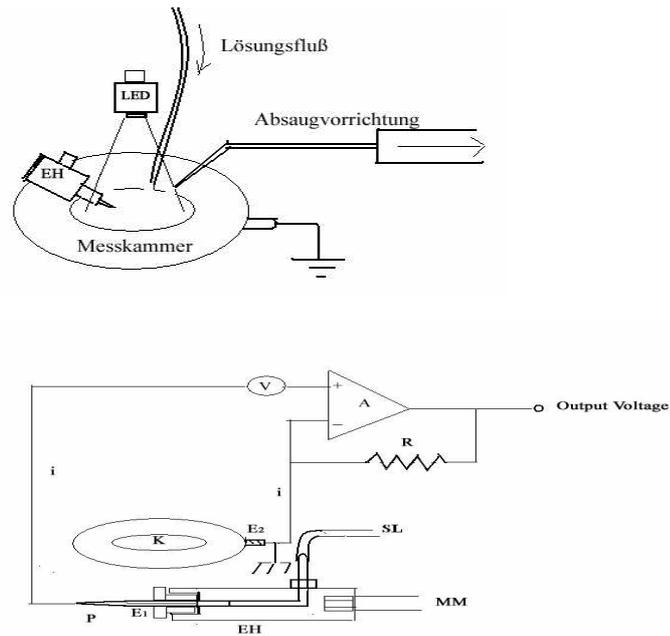
Rechts der Mikroskopsäule befand sich, grob vertikal verstellbar an einer Säule befestigt, der Messarm, der aus Mikromanipulator (Piezo-Element) und Messkopf (Vorverstärker und chlorierte Silberelektrode) bestand. Die

mit Standard-Extrazellulärlösung gefüllte Glaspipette wurde an dem Messkopf befestigt. Über eine angeschlossene Silikon-Öl-Leitung in Gas-Chromatographie-Spritzen (1ml, 100 und 10  $\mu$ l) konnte dosiert in  $\mu$ l-Schritten Unter- oder Überdruck an der Pipettenspitze erzeugt werden. Eine kleine Luftblase in der Leitung trennte das Öl von der Ringer Lösung im Pipettenhalter, so dass ein Ölübertritt in die Pipette vermieden wurde. Die Luftblase erbrachte außerdem durch einen gewissen Kompressibilitätsgrad eine feinere Kontrolle des Saugvorgangs der Zelle. Die Silberelektrode wurde regelmäßig zur Minimierung und Stabilisierung des galvanischen Potentials durch Anlegen positiver Spannung in 1M HCl chloriert. Chloriert wurde aus demselben Grund auch die Referenzelektrode, die in die Messkammer hineinragte und zur Erdung der die Zellen umgebenden Lösung diente. Die Chlorierung erfolgte regelmäßig nach 3-4 Experimenten. In einem fixen Abstand von ca. 1 cm über der Kammer wurde eine von der Elektronik gesteuerte grüne Leuchtdiode angebracht, die die festgelegten Lichtstimuli in Form monochromatischer Lichtblitze und auch das Hintergrundlicht erzeugte.

Die Perfusionslösung in der Messkammer konnte während eines Versuches komplett ausgetauscht werden: mittels einer von links angebrachten Saugvorrichtung konnte über eine Pumpe ohne Turbulenzen die vorhandene Lösung abgesaugt werden, während gleichzeitig über zwei 50 ml Spritzen, die oben links befestigt waren, und ein angeschlossenes Infusionssystem neue Lösung, je nach Phase des Versuchs über einen Dreiwegehahn NO- haltige oder Standard-Extrazellulärlösung, getrieben durch die Schwerkraft in die Kammer fließen konnte.

Die beiden Vorrichtungen und die Pumpleistung wurden in einer Testreihe auf einander so abgestimmt, dass auf einfache Weise ohne Störungen während einer Messung die extrazelluläre Lösung kontinuierlich ausgetauscht werden konnte. Die dafür benötigte Zeit wurde gemessen (Mittelwert 37 s) und in die Versuchsplanung einkalkuliert. Eine Zeichnung der Registrierungsanordnung ist in Abbildung 5 dargestellt.

**Abb. 5:**



A: Verstärker („amplifier“), EH: Elektrodenhalter, E1 und E2 : Ag/AgCl<sub>2</sub> jeweils  
differente und indifferente Elektrode, i: zirkulierender Strom zwischen E1 und E2,  
K: Kammer, LED: grüne Leuchtdiode, MM: Anschluss zum  
Mikromanipulatorsystem, P: Pipette, R: Feedback Widerstand, SL: angeschlossene  
Silikon-Öl-Leitung,  
V: variable Potentialquelle des Verstärkers für Kompensationszwecke und  
Messung des Pipetten-Widerstands.

Für die Registrierungen wurde ein Patch-Clamp Messplatz und die dazu gehörende Elektronik entsprechend modifiziert, gleichzeitige Ableitungen mit der Patch-Clamp Methode erfolgten nicht.

Um fremde elektrische und mechanische Störeinflüsse zu minimieren, stand der Messplatz auf einer gedämpft fixierten schweren Platte. Über links und rechts angebrachte schwarze Vorhänge konnte er zusätzlich abgedunkelt werden. Die angeschlossene Elektronik mit Monitor, Oszillograph, Verstärker (EPC 5 und EPC 9 mit integriertem Interface von HEKA) und Computer (Macintosh, Quadra 950 von Apple) sowie die beiden Pumpen befanden sich außerhalb. Alle Monitore waren während der Versuche mit rot getönten Mattscheiben bedeckt.

Grundlage der Versuche war die Saugelektroden-Technik (Baylor et al. 1979), nach der ein intaktes einzelnes Stäbchen durch Unterdruck in eine Glaspipette hineingesaugt und festgehalten wird, während die Pipettenstromsignale kontinuierlich von der angeschlossenen Elektronik registriert werden. Intakte frei schwimmende Stäbchen wurden durch leichten Unterdruck mit dem Innensegment bis etwas über den Übergang

zum Außensegment in die polierte, mit Ringer gefüllte Glaselektrode gesaugt. Auf ähnliche Weise erhaltene Registrierungen durch die Arbeitsgruppe von Cobbs und Pugh, 1987, die mit Patch-Clamp Ableitungen in Whole-Cell-Modus kombiniert wurden zeigten, dass damit ca. zwei Drittel des gesamtzirkulierenden Stroms durch die Saugelektrode erfasst werden kann.

Die Saugmethode wurde unter festgelegten Standardbedingungen in einer ersten Versuchsreihe getestet, damit Aussagen über Konfiguration, Amplitude und Dauer der auf diese Weise registrierten Lichtantwort und deren Reproduzierbarkeit gemacht werden können. In den nachfolgenden Serien wurde dann überprüft, in welcher Hinsicht sich die Lichtantwort und insbesondere die Rückstellphase änderte, a) wenn die Lichtreize auf einem bestimmten Hintergrundniveau auftrafen und b) wenn das Inkubationsmedium der Stäbchen gegen ein anderes, sich lediglich durch den Zusatz von Nitroprussidnatrium als NO-Donator unterscheidendes Medium, während der Registrierung ausgetauscht wurde.

Die verwendeten Glaselektroden wurden eigens vor dem jeweiligen Experiment aus Borosilikat-Glaskapillaren (1,5mm Außendurchmesser x

0,86mm Innendurchmesser, Standard wall ohne Filament, Firma Clark in Reading/England) in einem Ziehgerät (DMZ-Universal Puller von Zeitz Instrumente GmbH, München) hergestellt.

Die Herstellung erfolgte nach Einspannung der Kapillare, zentriert in die mittige Heizwendel und in die Haltevorrichtungen, durch das Gerät in drei Schritten; zunächst wurde die eingespannte Kapillare durch hohe Temperatur und langsamen Zug ausgedünnt. Der zweite Zug riss nach Vorheizen mit geringerer Hitze und definierter Zugkraft die Kapillare in zwei Pipetten auseinander. Es erfolgte automatisch die erneute Zentrierung der Pipetten in die Heizwendel und die kurze Polierung der Spitze.

Das Gerät erlaubt dank der internen Prozesssteuerung die Programmierung und Speicherung aller relevanten Parameter, wodurch eine hohe Wiederholgenauigkeit erreicht werden kann.

Der Innendurchmesser der Pipettenöffnung wurde unter dem Mikroskop mittels im Okular eingebauter Skalierung in Skalenteilen beurteilt, die mit in einer Testmessreihe aus "leeren" Versuchen ermittelten Widerständen beim Eintauchen der Pipette in die extrazelluläre Lösung korreliert wurden. Ein Skalenteil entsprach 2,3  $\mu\text{m}$ . Benutzt wurden dann Pipetten, die einen

Widerstand von ca. 2, 5 (2,2-2,7) M $\Omega$  aufwiesen, der wiederum mit einer Öffnung von ca. 2 Skt. im Mittel korrelierte (1,8-2,2). Es wurden vor jedem Experiment ca. 5 Pipetten gezogen und zur Vermeidung von Verschmutzungen der Spitze in einen geschlossenen Glasbehälter bis zum Experimentende aufbewahrt.

Die jeweils ausgesuchte Pipette wurde mit gefilterter (steriler Filter 0,2  $\mu$ m) extrazellulärer Standard-Lösung über eine dünne Kanüle gefüllt und über die chlorierte Silberelektrode auf den Messkopf montiert.

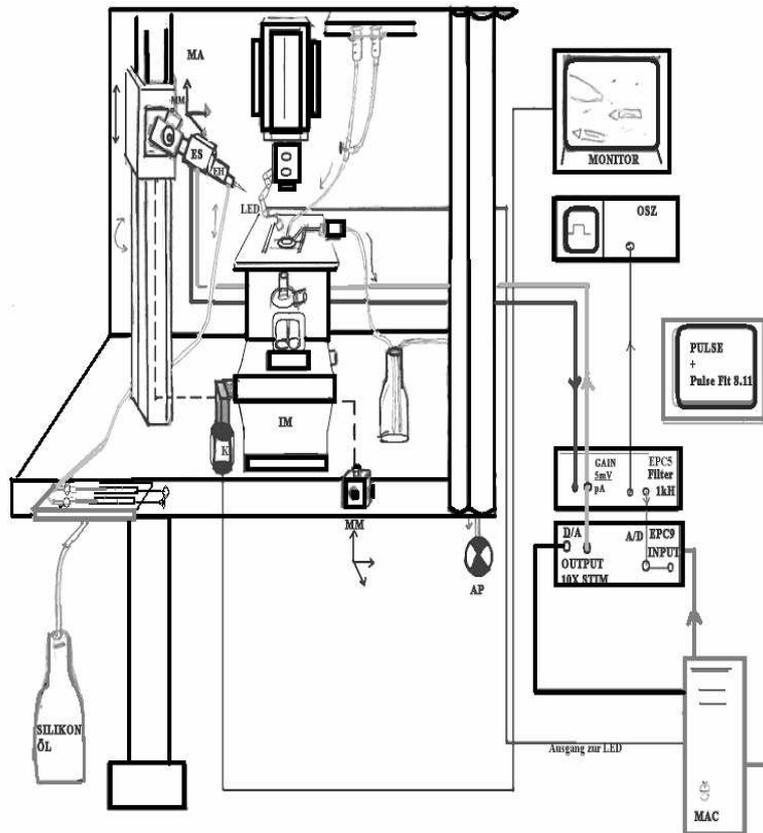
Die Basislösung setzte sich wie folgt zusammen:

<b>NaCl 100mM, KCl 2,7mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5mM, HEPES 10mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM</b>
--

Der gebrauchten Lösungsmenge wurde vor Versuchsbeginn **Glucose 5 mM** zugefügt (Abgleich auf **pH 7,8 mit NaOH**).

Aus dieser Standard-Extrazellularlösung wurden während des jeweiligen Versuchs 50 ml NO-haltiger Lösung hergestellt durch Zugabe von **Nitroprussidnatrium** in der Konzentration von **0,3 mM**.

**Abb. 6 :** Zeichnung des Versuchsaufbaus für die durchgeführten Experimente



AP: Absaugpumpe, EH: Elektrodenhalterung, ES: Eingangsstufe der Verstärkers, EPC 5 und EPC9: seriell verschaltete Verstärker, IM: Invertiertes Mikroskop, K: Kamera (Infrarot), LED: Leuchtdiode, MA: Messarm, MAC: Macintosh Computer Modell Quadra 950 von Apple, MM: Mikromanipulator, OSZ: Oszillograph, Pulse + Pulse fit Version 8.11: Software zu Pulsgeneration, Data-Akquisition, -Speicherung und -Analyse von HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland

Die während eines Versuchs durch Licht hervorgerufenen Stromveränderungen über die Zellmembran des Außensegments wurden dem ersten Verstärker (EPC 5, älteres Verstärker-Model von HEKA) zugeführt und über 1 kHz Filter mit einer Verstärkung von 5 mV/ pA in Potentialveränderungen umgewandelt.

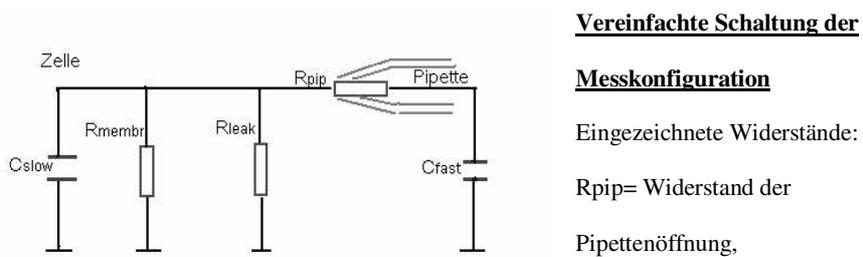
Störende Widerstände und Kapazitäten (vgl. Abb. 7), die bei schnellen Spannungsänderungen zu einem kapazitiven Strom durch die Badlösung führen, wurden durch Kompensations-Schaltungen zum Teil abgeglichen. Über den 2. Verstärker, EPC 9, mit integriertem ITC-16 Interface, wurde das Signal über ein 10 kHz 3-Pole Besselfilter mit einer Abtastrate von 250 Hz digitalisiert.

Mit Hilfe der Software Pulse+ Pulse fit 8.11 von Heka wurde jedes Signal in dem digitalen Oszilloskop online dargestellt und zur weiteren Analyse in der dem jeweiligen Experiment zugeordneten Datei gespeichert. Über einen Ausgang vom EPC 5 direkt zum Oszillographen wurde das Signal gleichzeitig auf dem Oszillographen-Schirm dargestellt.

Der EPC 9 Verstärker ist voll Computer-gesteuert, durch ihn wurden auch die zur Bestimmung der Elektroden-Widerstände und Unterhaltung eines

stabilen Nulllinienpotentials von der Software durch einen Pulsgenerator erzeugten Impulse 10- fach verstärkt über den EPC 5 in die Elektrode vermittelt.

**Abb. 7:** Zeichnung der Messkonfiguration



$R_{membr}$  = Widerstand der Zellmembran,  $R_{leak}$  = Widerstand zwischen Pipetteninhalt und Extrazellulärraum durch den Leckstrom bei Ankopplung der Zelle. Eingezeichnete Kapazitäten:  $C_{fast}$  = Kapazität zwischen Pipetteninhalt und Extrazellulärlösung,  $C_{slow}$  = Kapazität der Zellmembran zwischen Intra- und Extrazellulärraum.

Die Erzeugung der Lichtstimuli während der Experimente wurde ebenfalls von der Software durch Modifikationen des Pulsgenerators vermittelt und bei Bedarf initiiert in Form einer Serie von vorprogrammierten Lichtstimuli von 30 ms Dauer und einer Wellenlänge von  $\lambda=550\text{nm}$ . Es wurden Sequenzen von Lichtblitzen unterschiedlicher Intensitäten allein oder auf unterschiedlich starkem Hintergrundlicht programmiert und in einer festgelegten Reihenfolge abgespeichert, so dass die Lichtreize während eines Versuchs nach Plan über die über der Kammer fixierten LED appliziert werden konnten.

Die Intensität der Reizblitze wurde über die applizierte Voltzahl an der LED definiert; bei den einfachen Blitzen waren 125, 250, 500 und 1000 mV Lichtreize programmiert, bei der applizierten Hintergrundbeleuchtung 12, 15, 18 und 21 mV. Die Lichtblitze der einfachen Reihe wurden jeweils 3,960 s nach Beginn der Registrierung und Stabilisierung der Nulllinie appliziert.

In der Hintergrundlichtreihe wurde die Hintergrundbeleuchtung für 20 s jeweils 1,960 s nach Registrierungsbeginn initiiert, der darauf applizierte Lichtblitz erfolgte 4,040 s nach Beginn der Hintergrundbeleuchtung.

Anhand von Messungen der Vorgängerarbeitsgruppe (Schmidt et al.), die den Messplatz für Patch-Clamp Registrierungen an Stäbchen benutzte, entspricht ein 1000 mV Reiz ca. 2000 Photonen pro Quadratmikrometer pro Sekunde und ruft eine sättigende Antwort hervor.

Mittels eines Streufilters wurde das Licht diffus auf die Stäbchen verteilt. Baylor et al. stellten 1979 bereits fest, dass Zellantworten auf lokale Belichtung eines Außensegments praktisch identisch mit Antworten auf diffuses Licht der gleichen Intensität waren. Insofern kann davon ausgegangen werden, dass herumliegende ebenfalls angeregte Stäbchen zum registrierten Signal kaum etwas beitragen (Baylor et al. 1979).

### **2.3 Ablauf der Messungen**

Vor Beginn eines Experimentes wurde die Elektronik zu automatischer interner Kalibrierung der Verstärker und Erreichen der Arbeitstemperatur mindestens 15 Minuten eingeschaltet. Die in der Zwischenzeit vorbereitete Pipette wurde auf dem Messkopf montiert, wichtig dabei war jedes mal die eigene Erdung, da das Input-Terminal gegen statische Elektrizität sehr empfindlich ist.

Die Pipette wurde in die Messkammer, die Standard-Extrazellulärlösung enthielt, eingetaucht und der Widerstand der leeren Öffnung wurde gemessen. Je nach Ergebnis wurde sie ausgetauscht oder weiter verwendet. Die Spitze der Pipette blieb in einer Ersatzkammer eingetaucht, während die Messkammer für die Präparation verwendet wurde.

Nach Platzierung und Erdung der Messkammer mit den präparierten Stäbchen wurde eine geeignete intakte Zelle mit Hilfe der Infrarot-Kamera gesucht. Das erneute Eintauchen der Pipette erfolgte, um die Verlegung der Spitze durch Zelldebris zu vermeiden, unter leicht positivem Druck, erzeugt über die angeschlossene Silikonöl-Leitung. Bei Annäherung an die Zelle wurde kurzzeitig leichter Unterdruck erzeugt, so dass das

Innensegment in die Spitze hineingesaugt wurde. Die Stabilisierung der Zelle in dieser Position konnte durch die Halbierung des im Oszillographen angezeigten Potentials verfolgt werden.

In der ersten Messserie wurden vorprogrammierte Lichtblitze von 30 ms Dauer und unterschiedlicher Intensität in fester Reihenfolge mit einem Intervall von jeweils 50 s appliziert, registriert wurde für jeweils 30 s. In den weiteren Experimenten der ersten Phase wurden, nach Ankopplung der Zelle und Registrierung der Lichtantworten bei Applikation der festgelegten Lichtblitze, erneut die gleichen Lichtblitze bei Hintergrundlicht unterschiedlicher ansteigender Intensität verwendet.

Die Registrierungen der Lichtantworten durch Veränderungen der Ionenströme an der Membran der Zelle bei Lichtstimuli ohne und mit Hintergrundbeleuchtung zunehmender Intensität wurden in der Datenbank der Software zur späteren Analyse und Auswertung gespeichert.

In der 2. Phase erfolgte die Messreihe mit Austausch der Perfusionslösung; nach Ankopplung der Zelle und Registrierung der Signale bei Applikation

der Standard-Lichtblitzserie erfolgte das Absaugen der Extrazellulärlösung während gleichzeitig neue kürzlich zuvor hergestellte Natriumnitroprussid-haltige Extrazellulärlösung über das Infusionssystem in die Kammer tropfte.

Nach 1 Minute als Sicherheitsabstand wurde das Kammervolumen mehrfach komplett durch die neue NO-haltige Lösung ersetzt. Nun wurden die Standardlichtblitze erneut auf dieselbe Zelle bei dem veränderten Extrazellulärmilieu appliziert. Wässrige Lösungen von Natriumnitroprussid sind unter Lichtabschluss einige Stunden stabil, die NO-Freisetzung aus dem Komplex erfolgt nicht enzymatisch durch Licht oder bei Kontakt mit Zellmembranen, wahrscheinlich über Thiole auf der Zelloberfläche.

NO als kleines Gas-Molekül kann über die Zellmembran durchdiffundieren (Forth et al. 1996).

Bei den Versuchen mit Natriumnitroprussid wurde davon ausgegangen, dass das freigesetzte NO durch Diffusion über die von der Natriumnitroprussid-haltige Extrazellulärlösung umspülte Außensegmentmembran in die Zelle gelangte.

## 2.4 Auswertung und Statistik

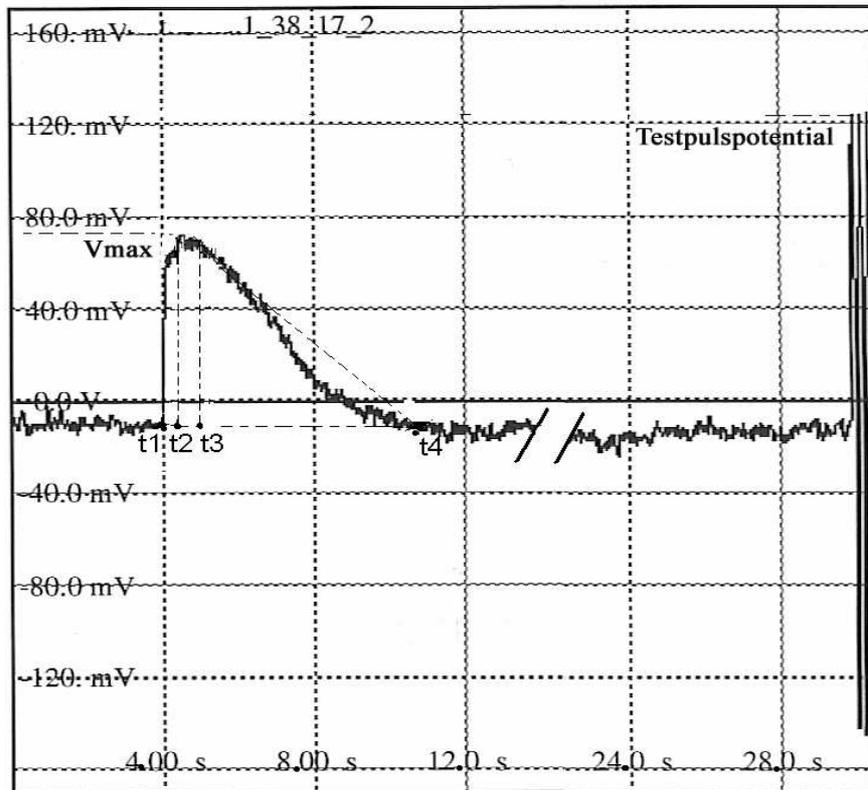
Die lichtinduzierten Stromveränderungen entlang der Membran des Außensegments wurden über die Strom /Potential Konversion der Verstärker als Potentialänderungen von einer von der Elektronik gehaltenen Nulllinie durch Kompensation des Dunkelstroms registriert, wobei positive Ausschläge mit Auswärtsströmen korrespondierten (EPC 9 Manual). Die registrierten Signale wurden hinsichtlich Dauer in s und maximal erreichte Amplitude in mV einzeln analysiert.

Die Konfiguration einer Lichtantwort wurde durch die Parameter maximale Amplitude und Dauer der Phasen des Signals vom Peak (maximal erreichter Amplitude) bis zur Nulllinie charakterisiert wie beispielhaft an der Originalregistrierung einer Lichtantwort in folgender Abbildung gezeigt wird.

Für die Datenanalyse wurden die Signale über die Bearbeitungssoftware digital mit 10 Herz gefiltert und dadurch geglättet. Mit Hilfe der Software wurden die ausgewählten Bereiche mit einer höheren Auflösung dargestellt und den festgelegten Punkten genaue Werte zugeordnet;  $V_{max}$  wurde als maximal erreichte Amplitude in der Anstiegsphase von der Nulllinie aus

definiert und anhand eines Testpulses am Ende jeder Registrierung, an dem sich der Leck-Strom widerspiegelt, korrigiert, indem es mit einem Korrekturfaktor  $315/\text{Testpulspotential}$  multipliziert wurde; die 315 mV wurden als Maßstab für das registrierte Testpulspotential willkürlich festgelegt. In dem zeitlichen Verlauf wurde differenziert zwischen t1 als Zeitpunkt des Beginns der Anstiegsphase, t2 als Punkt des Erreichens der maximalen Amplitude, t3 als Zeitpunkt des Beginns des Potentialabfalls und t4 als Zeitpunkt beim Erreichen der Nulllinie.

**Abb.8** : Originalaufzeichnung mit nachgezeichneten Punkten, wie sie in der Auswertung verwendet wurden



Konfiguration einer Standard-Lichtantwort bei einem Lichtblitz der Gruppe C1000 (gerade sättigende Blitz-Intensität von ca.  $2000 \mu\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Photonen ohne Hintergrundlicht).

Es wurden als Messpunkte für die Auswertung  $V_{\text{max}}$  als höchster Punkt des erreichten Potentials in der Anstiegsphase,  $t_1$  als Startzeit und  $t_4$  als Endzeit festgelegt, die Dauer der Rückbildungsphase der Lichtantwort wurde als  $\Delta t$ , als Differenz zwischen  $t_4$  und  $t_2$ , definiert. Das Nulllinienpotential wurde durch die Software bestimmt und angeglichen.

Die Versuche wurden so angelegt, dass ein Unterschied zwischen dem Standard-Lichtsignal und der Antwort unter Hintergrundlicht in der ersten Versuchsreihe sowie dem Standard-Lichtsignal und der Antwort in Anwesenheit von NO in der zweiten Versuchsreihe erfasst wird.

In der statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden verglichen

1. die korrigierten Werte für die Maximalamplituden und
2. die Werte für die Dauer der Phase  $t_4 - t_2$ , die als Rückbildungsdauer definiert wurde.

Es wurde ein verteilungsfreier Test ausgesucht, der geeignet für paarweise angeordnete Beobachtungen ist, da das Ziel war, einen Unterschied in der elektrischen Antwort derselben Zelle auf einen Reiz vor und nach einer Veränderung der äußeren Bedingungen zu ermitteln. Angewandt wurde der Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon: die Paardifferenzen wurden auf dem 1%- und 5%-Signifikanzniveau geprüft mit Nullhypothese „kein Unterschied“ und Arbeitshypothesen Verminderung der Amplitude und Beschleunigung der Rückbildungsphase der Lichtantwort unter Hintergrundlicht bzw. in Anwesenheit von NO.

Für den Vergleich zwischen Hintergrundlichtreihe und NO-Reihe wurden, soweit vorhanden, die prozentualen Unterschiede in Amplitude und Dauer der Rückbildungsphase der zwei Messreihen auf Ähnlichkeit hin verglichen.

### **3. ERGEBNISSE**

---

#### **3.1 Versuchsreihe unter Standardbedingungen:**

##### **Standard-Extrazellulärlösung und definierte Lichtreize, Konfiguration der Lichtantwort**

Einzelne intakte Stäbchen in Standard-Extrazellulärringer wurden in eine ebenfalls mit Ringer gefüllte Glaspipette mit dem Innensegment eingesaugt. Lichtblitze unterschiedlicher Intensität riefen transiente Auswärtsströme hervor, die über die Strom/Potential Konversion der Elektronik als Potentialänderungen registriert wurden. Die maximal erreichte Amplitude korrelierte mit der Intensität des applizierten Lichtblitzes.

Da die Höhe des maximal erreichten Potentials auch von anderen Faktoren abhängig ist, wie Mikrobewegungen, unterschiedliche Ankopplung, Zellfunktionalität, Rauschen, Unterschiede in der tatsächlichen Photonenzahl, die jede Zelle erreichte, war die Streuung bei Messungen an verschiedenen Zellen relativ breit.

Mit Hilfe eines Korrekturfaktors wurde der unterschiedliche Leckstrom angeglichen, die anderen Faktoren können mit der Methode nicht normiert werden. Diese Unterschiede sollten in der statistischen Analyse ausgeschaltet werden, deshalb war in der weiteren Versuchsplanung jede Zelle als ihre eigene Kontrolle vorgesehen.

Die gemittelten korrigierten Amplitudenwerte (aus jeweils 2 Lichtblitzen pro Intensität pro Zelle) für 6 verschiedene Zellen in der Tabelle 1 demonstrieren die Streuung zwischen den Zellen, der Mittelwert soll der Orientierung dienen.

**Tabelle 1:**

<b>Intensität*</b> <b>des</b> <b>applizierten</b> <b>Lichtblitzes</b>	<b>Amplitude</b> <b>in mV</b> <b>Zelle_1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Mittelwert</b> <b>der</b> <b>Amplituden</b>
<b>250*</b>	88,74	103,92	120,44	76,34	135,66	47,34	95,41
<b>500*</b>	120,19	117,46	157,54	92,89	140,37	74,86	117,22
<b>1000*</b>	121,17	156,21	189,91	112,39	162,37	86,51	138,09
<b>2000*</b>	130,26	174,23	204,61	176,56	192,79	93,21	161,94

\*Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Die Dauer der Rückbildungsphase und die Gesamtdauer der Antwort variierten ebenfalls von Zelle zu Zelle und in Abhängigkeit von der Blitzintensität. Tabelle 2 zeigt die korrespondierenden Zeitwerte zu den Amplituden der Tabelle 1:

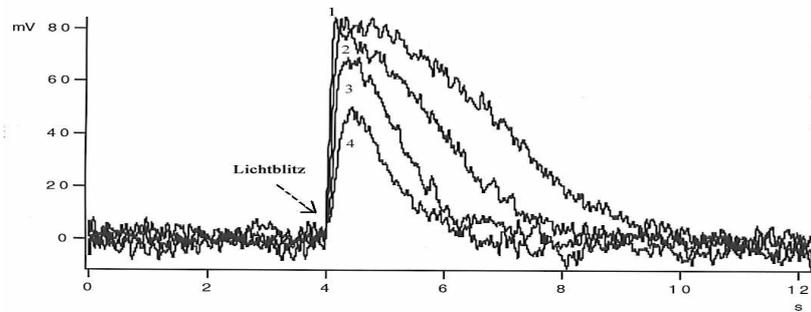
**Tabelle 2**

<b>Intensität* des appl. Lichtblitzes</b>	<b>Rückbildung/ Gesamtdauer in sec Zelle 1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Mittelwert (s)</b>
<b>250*</b>	1,58/1,99	0,82/1,29	1,69/2,13	0,97/1,36	2,53/2,92	0,85/1,36	1,41/1,84
<b>500*</b>	3,35/3,75	1,73/2,10	2,02/2,35	1,50/1,74	4,78/5,03	1,65/2,10	2,50/2,84
<b>1000*</b>	4,67/4,97	3,03/3,38	3,88/4,14	3,16/3,37	5,48/5,70	2,02/2,39	3,71/3,99
<b>2000*</b>	5,33/5,52	4,75/5,08	5,52/5,70	4,59/4,77	7,10/7,29	4,29/4,56	5,26/5,49

\*Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Die Kinetik und Konfiguration der Lichtantwort derselben Zelle auf Blitze absteigender Intensität folgten bei allen Registrierungen einem einheitlichen, gut reproduzierbaren Muster wie repräsentativ in Abbildung 9 zu sehen.

**Abb.9:** Übereinander projizierte Signale, die von derselben Zelle abgeleitet wurden, unter Standardbedingungen bei absteigender Intensität der Lichtblitze 1-4 jeweils bei 2000, 1000, 500 und 250 Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .



Die Amplitude der Antwort ist kleiner und der zeitliche Verlauf, vor allem die Dauer der Rückbildungsphase, ist kürzer bei den Blitzen der niedrigen Intensitäten 3 und 4. Eine eindeutig längere Plateau-Phase zeigt sich nur bei Blitzen sättigender Intensität (Kurve 1; 2000 Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Aufgrund der Streuung der Ergebnisse in den Registrierungen an verschiedenen Zellen, aber der guten Reproduzierbarkeit der Lichtantworten derselben Zelle, wurden die nächsten Versuchsreihen mit Hintergrundbeleuchtung und NO so angelegt, dass jede Zelle auch ihre

eigene Kontrolle war. Verglichen wurden die Parameter Amplitude  $V^*_{max}$  und Dauer der Rückbildungsphase bei derselben Zelle vor und nach entsprechender Veränderung der Außenverhältnisse, bei gleicher Blitzintensität. Der Vergleich ist genauer, weil die Streuung, die aus den oben erwähnten Gründen zwischen verschiedenen Zellen besteht, ausgeschaltet ist.

### **3.2 Versuchsreihe mit Hintergrundlicht: Standardlichtreize bei Hintergrundlicht ansteigender Intensität**

Jede Zelle bekam auf dem Hintergrund von jeweils 24, 30, 36 und 42\* Lichtblitze der Intensität 250\* und 500. Die Kontrolle erfolgte jeweils direkt im Anschluss, d.h. nach jedem Blitz auf einem bestimmten Hintergrund wurde derselbe Blitz ohne die Hintergrundsbeleuchtung appliziert. Verglichen wurden die Parameter Amplitude und Rückbildungsdauer des jeweiligen Signals. Die Ergebnisse stammen aus Registrierungen von 7 Stäbchen aus 7 verschiedenen Präparationen. Die statistische Aufarbeitung erfolgte mit dem Wilcoxon- Paardifferenzen-Test.

### **Tabelle 8: Korrigierte Amplitudenwerte**

Hintergrund versus Standardkontrolle für Blitzintensität von 250\* und 500\* und jeweils 24, 30\* als Hintergrundbeleuchtung.

<b>Zelle Nr.</b>	<b>B24;C250* (mV)</b>	<b>C250</b>	<b>B30;C250</b>	<b>C250</b>	<b>B24;C500</b>	<b>C500</b>	<b>B30;C500</b>	<b>C500</b>
1	63,01	57,20	64,46	56,98	69,91	70,19	78,99	81,17
2	131,93	120,99	95,39	126,65	195,35	163,04	159,69	146,41
3	47,24	54,40	47,24	37,23	70,53	55,45	80,53	74,10
4	54,66	51,07	58,88	62,62	66,30	63,31	61,50	67,28
5	99,99	90,84	86,59	94,32	117,02	115,8	130,51	127,12
6	97,18	91,99	87,11	89,65	103,95	110,05	104,50	94,48
7	93,44	115,57	93,26	113,39	100,46	106,32	122,06	118,79

\*Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

**Tabelle 9: Korrespondierende Rückbildungszeiten zu Tabelle 8**

<b>Zelle Nr.</b>	<b>B24;C250 (s)</b>	<b>C250</b>	<b>B30;C250</b>	<b>C250</b>	<b>B24;C500</b>	<b>C500</b>	<b>B30;C500</b>	<b>C500</b>
<b>1</b>	1,58	1,66	1,54	1,95	2,39	2,24	2,50	3,60
<b>2</b>	1,66	1,75	1,38	2,90	2,16	2,58	2,53	3,68
<b>3</b>	1,10	1,60	1,24	1,56	1,98	2,35	1,89	2,16
<b>4</b>	1,89	1,98	1,70	2,85	3,03	3,17	2,30	3,54
<b>5</b>	1,66	1,70	1,75	2,53	2,35	2,85	2,30	2,13
<b>6</b>	2,20	2,53	1,55	2,67	2,76	3,96	3,13	4,23
<b>7</b>	2,80	3,17	1,66	2,67	2,52	3,22	2,58	2,67

\*Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

**Tabelle 10: Korrigierte Amplitudenwerte**

Hintergrund versus Standardkontrolle für Blitzintensität von 250\* und 500\* und

jeweils 36, 42\* als Hintergrundbeleuchtung.

<b>Zelle Nr.</b>	<b>B36;C250 (mV)</b>	<b>C250</b>	<b>B42;C250</b>	<b>C250</b>	<b>B36;C500</b>	<b>C500</b>	<b>B42;C500</b>	<b>C500</b>
<b>1</b>	54,79	60,66	31,50	62,98	65,86	69,85	57,66	92,83
<b>2</b>	103,45	120,65	40,51	78,96	141,21	150,65	72,41	101,80
<b>3</b>	42,94	47,86	29,60	44,33	59,36	64,53	41,76	54,95
<b>4</b>	48,53	59,60	36,61	60,82	68,5	71,71	46,00	69,04
<b>5</b>	76,95	92,46	64,73	112,45	119,13	139,00	99,80	134,15
<b>6</b>	77,22	102,59	37,52	85,45	97,52	110,21	54,20	104,39
<b>7</b>	87,83	97,05	62,17	90,77	104,88	115,10	69,37	95,58

\*Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

**Tabelle 11: Korrespondierende Rückbildungszeiten zu Tabelle 10**

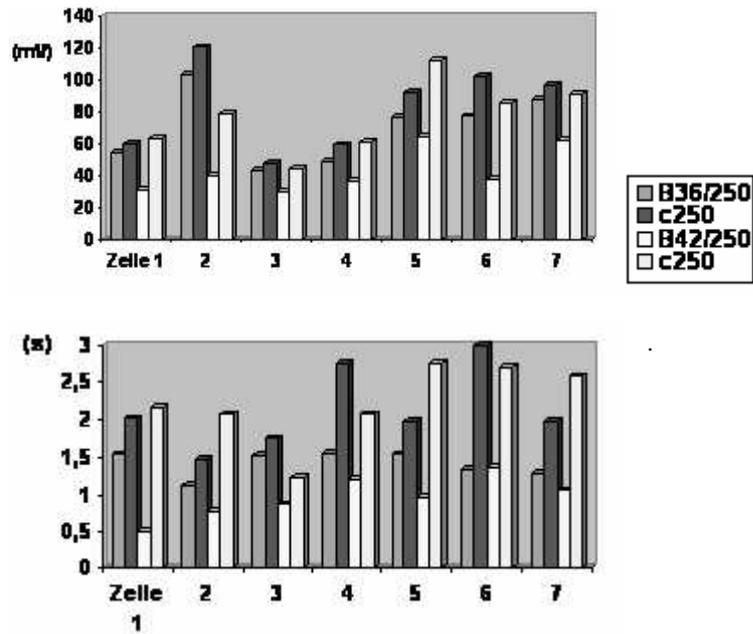
<b>Zelle Nr.</b>	<b>B36;C250* (s)</b>	<b>C250</b>	<b>B42;c250</b>	<b>C250</b>	<b>B36;c500</b>	<b>C500</b>	<b>B42;c500</b>	<b>C500</b>
<b>1</b>	1,54	2,02	0,51	2,17	2,43	2,98	1,47	2,83
<b>2</b>	1,13	1,47	0,78	2,07	2,52	2,81	1,43	2,90
<b>3</b>	1,52	1,75	0,87	1,24	1,29	2,99	1,47	2,12
<b>4</b>	1,56	2,76	1,20	2,07	2,07	3,13	1,29	2,85
<b>5</b>	1,54	1,98	0,97	2,76	1,98	2,53	1,70	3,13
<b>6</b>	1,34	2,99	1,36	2,71	2,76	4,14	2,16	3,86
<b>7</b>	1,29	1,98	1,06	2,58	1,33	2,25	1,75	3,54

\*Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Für die Hintergrundbeleuchtung von 24 und 30 Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  konnte statistisch kein eindeutiger Unterschied in der Amplitude der Antwort weder in der einen noch in der anderen Richtung nachgewiesen werden. Die Rückbildungszeiten dieser Signale waren jedoch signifikant kürzer bei den gleichen Lichtblitzen unter der Hintergrundbeleuchtung. Möglicherweise ist ein Effekt der niedrigen Hintergrundbeleuchtung auf die Amplitude methodisch nicht zu erfassen oder die Kürzung der

Rückbildungszeit ist das erste „elektrische“ Anpassungszeichen und erst bei höherem Hintergrundniveau wirken sich Adaptationsvorgänge auf die Amplitude aus.

Unter dem Hintergrundlicht der Intensitäten 36 und 42 Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  waren sowohl Amplituden als auch Rückbildungszeiten bei allen Zellen eindeutig kleiner und kürzer als bei den gleichen Reizen ohne dem Hintergrundlicht. Diese Ergebnisse sind kongruent mit der erwarteten Reaktion von Stäbchenzellen unter Hintergrundbeleuchtung aus der Literatur und sind als Zeichen von Adaptationsmechanismen innerhalb der Zelle zu deuten (Baylor et al. 1979, Fain et al. 2001).



**Abb. 9:** Balkendiagramme für die Amplitudenwerte und die Rückbildungszeiten bei Lichtblitzen der Intensität 250 jeweils mit und ohne Hintergrundbeleuchtung von 36 und 42 Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Die Amplitudenwerte werden, wie anhand der Balkendiagramme der Abbildung 9 anschaulicher dargestellt, bei ansteigender Hintergrundbeleuchtung prozentual kleiner und die Rückbildungszeit des Signals wird kürzer.

Statistisch überprüft (Wilcoxon Test wie in der nachfolgenden Nitroprussid-Reihe) sind die Unterschiede zwischen den Antworten unter Hintergrundbeleuchtung und der Standardkontrolle hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) für die beiden letzten hohen Hintergrundintensitäten, während für die beiden ersten eine statistisch hochsignifikante Verkürzung der Rückbildungszeiten ( $p < 0,01$ ) ohne begleitende Veränderung der entsprechenden Amplitudenwerte festgestellt wurde.

### **3.3 Versuchsreihe mit Natriumnitroprussid**

Es wurde in jedem Versuch initial eine Reihe von Lichtblitzen jeweils mit 2000, 1000, 500 und 250 Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  appliziert bei Standard-Extrazellulärmilieu und erneut die gleiche Reihe von Lichtblitzen auf dasselbe eingesaugt gebliebene Stäbchen nach dem Lösungswechsel in der neuen Nitroprussid-haltigen Extrazellulärlösung. Es wurde die Applikation der Reize in absteigender Reihenfolge der Intensität gewählt, da die Initialantwort auf einen Reiz hoher gerade sättigender Intensität auch als Indikator des funktionalen Zustands des Stäbchens diene.

Die Parameter, die verglichen wurden, waren die Maximalamplitude (korrigiert) und die Dauer der Rückbildungsphase  $\Delta t$ , als Differenz zwischen  $t_4$  und  $t_2$  (vgl. Abb. 8). Die Ergebnisse und deren statistische Auswertung werden tabellarisch aufgestellt.

**Tabelle 3: Werte der Maximalamplituden bei der Blitzintensität**

250 Photonen· $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Zelle Nr.	1	2	3	4	5	6	7
<b>A=Standard</b> (mV)	46,66	60,54	76,32	100,92	101,54	137,55	159,26
<b>B= unter NO</b>	43,25	25,33	41,79	83,49	88,24	86,78	142,63
<b>A-B=di</b>	3,41	35,21	34,53	17,43	13,30	50,77	16,63
<b>Rangzahl</b> für  di	1	6	5	4	2	7	3
<b> R <sub>pos</sub>=28</b>	(+)1	(+)6	(+)5	(+)4	(+)2	(+)7	(+)3
<b> R <sub>neg</sub>=0</b>							

Kontrolle :  $R_{\text{pos}}+R_{\text{neg}} = n(n+1)/2$  für  $n=7$ :  $7(7+1)/2=28$

Da  $|R_{\text{nl}}|=0 < 3$ : ( $7 - 0,05$ ) kann die Nullhypothese auf dem 5% Signifikanzniveau verworfen werden<sup>1</sup>. Für die einseitige Fragestellung (Amplitudenwert unter NO kleiner) sind die Ergebnisse sogar auf dem 1% Niveau signifikant.

<sup>1</sup> Siehe Anhang: Tabelle Kritische Werte für den Wilcoxon- Paardifferenzen-Test, auszugsweise entnommen aus Sachs L, **Angewandte Statistik**, 5. Auflage, Springer Verlag, 1978

**Tabelle 4: Werte der Maximalamplituden bei der Blitzintensität**

**500 Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$**

Zelle Nr.	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>A= Standard (mV)</b>	57,91	77,36	92,9	109,86	119,15	149,11	164,23
<b>B= unter NO</b>	55,66	45,64	44,95	107,41	108,97	164,15	147,06
<b>A-B=di</b>	2,25	31,72	47,95	2,45	10,18	-15,04	17,17
<b>Rangzahl für  di </b>	1	5	7	2	3	6	4
<b> R <sub>pos</sub>=22</b>	<b>(+)1</b>	<b>(+)5</b>	<b>(+)7</b>	<b>(+)2</b>	<b>(+)3</b>		<b>(+)4</b>
<b> R <sub>neg</sub>=6</b>						<b>(-)6</b>	
Da $ R _{\text{neg}} = 6 > 3$ bei $R(7; 0,05)$ , kann die Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Kontrolle $R_{\text{pos}} + R_{\text{neg}} = 28$							

**Tabelle 5: Werte der Maximalamplituden bei der Blitzintensität**

1000 Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}$

Zelle Nr.	1	2	3	4	5	6
<b>A= Standard</b> (mV)	61,78	83,68	97,47	115,47	132,39	154,43
<b>B= unter NO</b>	56,93	54,03	114,39	222,28	70,48	144,06
<b>A-B=di</b>	4,85	29,65	- 16,92	-106,81	61,91	10,37
<b>Rangzahl</b> für  dil	1	4	3	6	5	2
<b> R pos=12</b>	(+1)	(+4)			(+5)	(+2)
<b> R neg=9</b>			(-3)	(-6)		
Da $ R _{\text{neg}}=9 > 3: R(6; 0,05)$ , kann auch hier die Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Kontrolle für $n=6, R_{\text{pos}}+R_{\text{neg}}= n(n+1)/2= 21$						

Fazit: Die Amplitude der Lichtantwort derselben Zelle ist signifikant kleiner unter NO bei der niedrigen Blitzintensität von  $250 \text{ Photonen } \mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .  
Bei den höheren Intensitäten findet sich dieser Effekt nicht wieder.

Die korrespondierenden Werte der Dauer der Rückbildungsphase werden in den folgenden Tabellen 6-8 dargestellt, die statistische Auswertung erbringt ein vergleichbares Ergebnis: die Dauer der Rückbildungsphase ist signifikant kleiner unter NO im niedrigen Intensitätsbereich, die Signifikanz geht mit höherer Blitzintensität verloren.

**Tabelle 6: Korrespondierende Werte der Rückbildungsdauer bei der Blitzintensität  $250 \mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$**

Zelle Nr.	1	2	3	4	5	6	7
<b>A= Standard</b> (s)	0,97	1,10	2,47	2,53	1,52	2,46	1,66
<b>B= unter NO</b> (s)	0,71	0,46	2,35	2,16	1,48	2,22	1,74
<b>A-B=di</b>	0,26	0,64	0,12	0,37	0,04	0,24	0,08
<b>Rangzahl für</b> <b>ldil</b>	5	7	3	6	1	4	2
<b> Rlpos=26</b>	(+)5	(+)7	(+)3	(+)6	(+)1	(+)4	
<b> Rlneg=2</b>							(-)2
Kontrolle: $R_{\text{pos}}+R_{\text{neg}}=n(n+1)/2$ für $n=7$ : $7(7+1)/2=28$ Da $ R_{\text{lneg}}=2 < 3$ : (7; 0,05) kann die Nullhypothese auf dem 5% Signifikanzniveau verworfen werden.							

**Tabelle 7: Korrespondierende Werte der Rückbildungsdauer bei der  
Blitzintensität  $500 \mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$**

Zelle Nr.	1	2	3	4	5	6	7
<b>A= Standard (mV)</b>	1,50	1,68	2,81	4,77	2,65	3,48	2,81
<b>B= unter NO</b>	1,31	3,37	2,87	4,38	2,27	3,56	1,79
<b>A-B=di</b>	0,19	-1,69	-0,06	0,39	0,38	-0,08	1,02
<b>Rangzahl für  di </b>	3	7	1	5	4		6
<b> R <sub>pos</sub>=18</b>	(+)3			(+)5	(+)4		(+)6
<b> R <sub>neg</sub>=10</b>		(-)7	(-)1			(-)2	
<p>Da <math> R _{\text{neg}}=10 &gt; 0</math>: <math>R(7; 0,05)</math>, kann hier die Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Kontrolle für <math>n=7</math>, <math>R_{\text{pos}}+R_{\text{neg}}= n(n+1)/2= 21</math></p>							

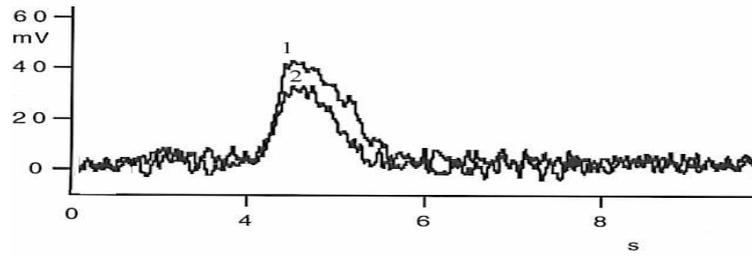
**Tabelle 8: Korrespondierende Werte der Rückbildungsdauer bei der  
Blitzintensität 1000 Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$**

Zelle Nr.	1	2	3	4	5	6
<b>A= Standard (mV)</b>	4,43	5,32	2,64	4,44	3,68	3,16
<b>B= unter NO</b>	3,84	5,16	3,41	4,74	3,27	2,61
<b>A-B=di</b>	0,59	0,16	-0,77	-0,30	0,41	0,55
<b>Rangzahl für ldil</b>	5	1	-6	-2	3	4
<b> Rlpos=13</b>	(+)5	(+)1			(+)3	(+)4
<b> Rlneg=8</b>			(-)6	(-)2		
Da $ Rlneg =8 > 0: R(6; 0,05)$ , kann auch hier die Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Kontrolle für $n=6$ , $Rpos+Rneg= n(n+1)/2= 21$						

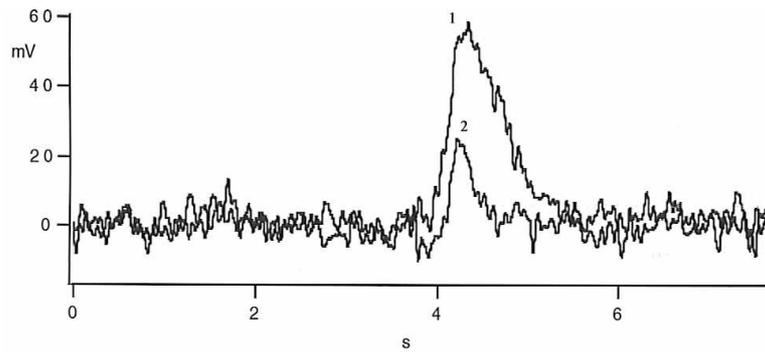
**Abb.10:**

Übereinander projizierte Lichtantworten, die jeweils von derselben Zelle abgeleitet wurden; Blitzintensität  $250 \text{ Photonen } \mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Signal 1 jeweils unter Standardbedingungen, 2 in Nitroprussid-Lösung.

**Zelle 1**



**Zelle 2**



Kumulativ für die Ergebnisse bei allen 7 Zellen für Lichtblitze der Intensitätsgruppe 250 ist der Effekt von NO auf die Amplitude des Signals mit einer Reduktion im Mittel von 27% etwas größer als auf die Rückbildungszeit (Reduktion im Mittel von 17%). Bei höherer Blitzintensität zeigt NO insgesamt keine statistisch signifikante Wirkung weder auf die Amplitude noch auf die Rückbildungsdauer.

Für einen Vergleich zwischen den beiden Messreihen Natriumnitroprussid und Hintergrundlicht wurden die vorhandenen prozentualen Unterschiede in Amplitude und Rückbildungsdauer bei Lichtblitzen von 250 Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  unter NO und Kontrolle und unter Hintergrundbeleuchtung der Intensität 36 und 42 Photonen  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und der jeweiligen Kontrolle ermittelt, verglichen wurden dann die jeweiligen Mittelwerte davon:

$$(\Delta t_K - \Delta t_N) / \Delta t_K \text{ und } (V^*K - V^*N) / V^*K \text{ bzw. } (\Delta t_K - \Delta t_H) / \Delta t_K \text{ und } (V^*K - V^*H) / V^*K$$

*$\Delta t$ : Rückbildungsdauer*

*$V^*$ : Maximalamplitude der Lichtantwort*

*$K$ : Kontrollmessung unter Standardbedingungen*

*$H$ : Messung bei Hintergrundbeleuchtung*

*$N$ : Messung nach Applikation von Natriumnitroprussid*

Unter NO wurde die Rückbildungsphase im Mittel um 17% verkürzt während unter dem Hintergrundlicht die Kürzung jeweils 31% und 55% betrug. Die Amplitudenverkleinerung betrug im Mittel unter NO 27%, unter der Hintergrundsbeleuchtung betrug sie jeweils 15% und 42%. Die Amplitudenveränderung unter NO bewegt sich irgendwo zwischen den Effekten der beiden Hintergrundsintensitäten, während die Verkürzung der Rückbildungsdauer kleiner ausfällt. Für die Veränderungen der Lichtantwort unter Hintergrundsbeleuchtung kann somit eine mögliche endogene NO-Freisetzung als alleiniger Mechanismus nicht in Frage kommen.

Dennoch, anhand dieser Ergebnisse, beeinflusst NO Amplitude und Rückbildungsdauer der Lichtantwort bei Reizen niedriger Intensität in gleicher Richtung, wenn auch in einem anderen Ausmaß wie eine vorhandene Hintergrundsbeleuchtung und könnte unter Umständen einen additiven modulierenden Effekt bei der Adaptation von Photorezeptoren ausüben.

## 4 DISKUSSION

---

### 4.1 Elektrophysiologie der Lichtantworten retinaler Stäbchen

Die Saugelektroden- Technik ist eine in den 70er Jahren entwickelte (Baylor et al. 1979, Yau et al. 1981, Hodgkin et al. 1985, Mc Naughton et al. 1986) und seitdem mehrfach angewandte (Matthews et al. 1988, Lyubarski et al. 1996, Nikonov et al. 1998, Calvert et al. 1998) einfache Methode, mit der der Einfluss von Lichtveränderungen oder einzelnen biochemischen Faktoren auf das elektrische Verhalten einer intakten funktionsfähigen Zelle in seinem Ausmaß direkt erfasst werden kann.

Der zirkulierende Strom, der durch Einsaugen des Innensegments der Stäbchenzelle registriert wird, wurde in einigen Arbeiten bereits hinsichtlich des theoretischen Hintergrunds (Baylor und Nunn 1986, Cobbs und Pugh 1987, Lyubarski et al. 1996) charakterisiert und mittels mathematischer Modelle mit biochemischen Schritten der Transduktionskaskade in Verbindung gebracht. Ein zentraler Schritt in der Phototransduktion ist die Regulierung der Homöostase der freien cGMP

Konzentration,  $cG$ , im Stäbchenaußensegment, die mathematisch mit folgender Gleichung ausgedrückt werden kann:

$$dcG/dt = \alpha - \beta cG \quad (1)$$

In Gleichung 1 ist  $\alpha$  die Syntheserate durch die Guanylat- Zyklasten und  $\beta$  ist die Rate der cGMP Hydrolyse durch die lichtaktivierte PDE. Die Beziehung zwischen  $cG$  und in jeder Zeit  $t$  zirkulierender Stromfraktion  $F(t)$  kann mit der Gleichung 2 annähernd wiedergegeben werden:

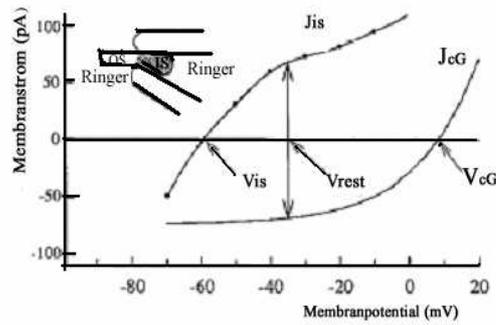
$$F(t) = J(t)/J_d = (cG(t)/cG_d)^n \quad (2)$$

In Gleichung 2 ist  $J(t)$  der (lichtinduzierte) zirkulierende Strom zu jedem Zeitpunkt  $t$ ,  $J_d$  ist der Dunkelstrom,  $cG_d$  ist die freie cGMP Konzentration im Dunkeln und  $n$  ist der Hill Koeffizient der cGMP aktivierten Kanalleitfähigkeit.

Die Forderungen, die der Gleichung 2 unterliegen, wurden durch Baylor und Nunn 1986 festgelegt und treffen für elektrische Signale im normalen Membranspannungsarbeitsbereich eines Amphibienstäbchens in Standard-Ringerlösung zu:

1. Kapazitive Ströme und Strom durch elektrogene Austauscher bilden eine sehr kleine konstante Stromfraktion, die im Vergleich zum cGMP induzierten Strom ignoriert werden kann (Cobbs und Pugh 1987).
2. Veränderungen der freien cGMP Konzentration widerspiegeln sich in Leitfähigkeits-veränderungen der cGMP-abhängigen Kanäle innerhalb einer Millisekunde (Karpen et al. 1988).

Die Beziehung zwischen dem registrierten Strom im Innensegment und dem cGMP induzierten Strom kann unter diesen Bedingungen in Relation zum jeweiligen Membranpotential im folgenden Diagramm in Abbildung 10 dargestellt werden.



**Abb. 10:** Aus Lyubarski et al.1996: JcG ist der cGMP aktivierte Strom, der durch die Außensegmentmembran fließt, Jis ist der registrierte Strom des Innensegments, Vrest ist

das Gleichgewichtsmembranpotential, bei dem  $J_{is} = -J_{cG}$  ist, und soll ca. -35 mV betragen. Während einer Lichtantwort wird das Membranpotential von Vrest in Richtung Vis verschoben, während der cGMP- bedingte Strom abnimmt. Unter Registrierungs-bedingungen kann annähernd gelten  $J_{is} = -J_{cG}$ .

Somit ist der zirkulierende Strom, der mit der Methode registriert wurde, ein Surrogat für den cGMP induzierten zirkulierenden Strom des Außensegments und widerspiegelt unter den Registrierungsbedingungen ebenfalls genauso empfindlich Veränderungen in der freien cGMP-Konzentration im Außensegment zu jedem gegebenen Registrierungszeitpunkt. Durch die Strom- Spannungs- Konversion der

Elektronik wurde der Strom in Spannung umgewandelt und da in dieser Arbeit nicht die absoluten Werte, sondern die Erfassung von Unterschieden von Bedeutung waren, wurden die Signale in der statistischen Auswertung als Spannungswerte belassen.

In der Umrechnung unter Standardbedingungen schwankte der maximal registrierte Strom zwischen 19 und 32 pA, 90% der maximal erreichten Amplitude wurden innerhalb 200- 400 ms nach Lichtreiz registriert. Amplitude und zeitlicher Verlauf der Signale entsprechen in etwa den in der Literatur (Lyubarski et al. 1996) gemachten Angaben, mit dem Vorbehalt möglicher Spezies- abhängigen kleinerer Abweichungen.

Registrierungen mit dieser Methode zeigen ein Hintergrundrauschen, das teilweise in der Analyse herausgefiltert wurde, das aber im Vergleich zur Signalgröße gering ist und außer Acht belassen werden kann. Die Störanfälligkeit ist ebenfalls verhältnismäßig, verglichen mit anderen elektrophysiologischen Methoden wie der Patch-Clamp-Technik, eher gering.

Membranströme von Photorezeptoren wurden bisher mit verschiedenen anderen Ableitungstechniken gemessen. Vor Etablierung der Patch-Clamp-Technik durch Neher und Sakmann, die rasch breite Anwendung auch in der Elektrophysiologie der Photorezeptoren fand (Gray et al., Matthews et al., Baylor et al., Schmidt et al.), wurden Ableitungen unter sog. Voltage-Clamp-Bedingungen mit konventionellen, sehr hochohmigen Glasmikroelektroden durchgeführt (Bader et al. 1979), außerdem wurden extrazelluläre Membranströme mit feuerpolierten Elektroden registriert, in die einzelne Photorezeptoren mit dem Außensegment eingesaugt wurden (Baylor et al. 1979). Die unter den verschiedenen Methoden registrierten Signale unterscheiden sich je nach Modus und festgelegten Bedingungen hinsichtlich der Konfiguration, der Amplitude und des zeitlichen Verlaufs. Bei Voltage-Clamp Messungen wird das Membranpotential auf einem vorgegebenen Wert festgehalten, registriert wird mit intrazellulären Elektroden ein Einwärtsstrom nach Lichtreizen, der abhängig vom jeweiligen konstantgehaltenen Membranpotential ist.

Bei der Patch-Clamp-Methode wird der Strom durch eine sehr kleine, wenige  $\mu\text{m}^2$  große Fläche (Patch) der Membran gemessen, an die eine

vorgegebene Spannung angelegt wird (clamp). In dem Patch, dem Membranstückchen, sind nur wenige Kanäle, z.B. ein einziger. Betrachtet man den Verlauf des Stromes, so sieht man Sprünge zwischen verschiedenen Niveaus: der Kanal öffnet und schließt sich. Der gemessene Strom liegt bei Photorezeptoren in der Größenordnung von einigen Femtoampere (fA) und zu dessen Messung ist daher ein sehr empfindlicher Messverstärker notwendig (Schmidt et al. 1992).

Durch die feineren Elektroden, kleinere Fläche und dem Gigaseal können in der Konfiguration durch die günstigeren Widerstandsverhältnisse extrem rauscharme Stromregistrierungen ermöglicht werden und das elektrische Verhalten von Einzelkanälen der Außenmembran kann viel genauer analysiert werden. Der cGMP generierte Strom im Dunkeln kann in Relation zum jeweiligen Membranpotential gemessen werden, wird aber auch dabei elektrisch manipuliert.

Ein weiterer Vorteil ist die Erfassung des sich unmittelbar darunter befindenden intrazellulären Milieus in der sog. Whole- Cell Konfiguration, wenn durch Überdruck die kleine eingesaugte Membranfläche in ihrer Kontinuität unterbrochen wird. Direkte Applikation von Substanzen

intrazellulär ist dann auch möglich. Die elektrischen Eigenschaften von Kanälen können unter verschiedenen kontrolliert manipulierten Bedingungen des Intrazellulärmilieus damit am besten studiert werden; um das elektrische Gesamtverhalten der Zelle in unterschiedlichen äußeren Bedingungen zu erfassen, ist die Patch-Clamp-Technik nicht geeignet, da zu störanfällig.

Durch das Saugen des Außensegments entstehen Registrierungen, die sich in Konfiguration und Kinetik ebenfalls von den „Innensegmentantworten“ unterscheiden, vor allem der initiale Zeitverlauf der Stromkurve ist mit etwas über 1 s deutlich länger.

Da mit dieser Methode die Ströme, die über den eingesaugten Teil der Außensegmentmembran fließen, registriert werden, fehlt eine initiale rasche Spitze, die durch die in der Innensegmentmembran lokalisierten spannungsabhängigen Kanäle hervorgerufen wird (Baylor, Matthews und Nunn 1984). Ansonsten unterscheiden sich beide Methoden von der Handhabung und dem Grundprinzip kaum von einander.

Zwischen den verschiedenen Ableitungstechniken bestehen aber auch Ähnlichkeiten: alle elektrophysiologischen Methoden demonstrieren eine

Abhängigkeit der Konfiguration der „Lichtantwort“ von der Reizintensität, vergleichbare Sättigungszeichen wie bei gerade sättigenden Reizen eine maximale Amplitude mit Beginn eines Plateaus, wobei eine Erhöhung der Reizintensität darüber hinaus lediglich eine zeitliche Verlängerung des Signals verursacht, sowie Beschleunigung der Rückbildungsphase und kleinere Amplitude bei Hintergrundlicht als elektrisches Zeichen adaptiver Mechanismen (Baylor et al. 1979, Schmidt et al. 1992, Calvert et al. 1998, Fain et al. 2001).

## **4.2 Hintergrundsadaptation und mögliche molekulare**

### **Mechanismen**

Versuche, die „elektrischen“ Zeichen der Rückbildungsphase der Lichtantwort mit der Biochemie der Inaktivierungsmöglichkeiten der Phototransduktionskaskade in Einklang zu bringen, beinhalten mehrere Probleme: die verschiedenen in vitro einzeln festgestellten Reaktionen sind zwar theoretisch möglich, aber im Ausmaß ihrer Bedeutung für das in vivo komplexe Gleichgewicht und Endergebnis schwer abzuschätzen.

Viele Inaktivierungsprozesse laufen in der Stäbchenzelle in situ parallel ab und beeinflussen sich außerdem gegenseitig, so dass ihre Einzelkontribution zu der Gesamtkinetik schwierig zu erfassen ist.

Einige postulierte Vorgänge, die in biochemischen Arbeiten einen wichtigen Beitrag zur Inaktivierung der Phototransduktion erwarten ließen, haben sich mit elektrophysiologischen Messungen für die Gesamtrückbildungskinetik als viel weniger oder gar von keinerlei Bedeutung erwiesen.

Beispiel hierfür ist der durch rein biochemische Identifizierung postulierte Inositol-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) Signalweg (Peng et al. 1997), der sich in mit biochemischen Bestimmungsverfahren kombinierten elektrophysiologischen Messungen für Photorezeptoren nicht bestätigt hat (Fain et al. 2001). Die zusätzliche Abhängigkeit vieler Vorgänge von der freien Kalzium- Konzentration im Außensegment macht das Gesamtsystem noch komplexer.

Diese Arbeit beansprucht nicht, diese Probleme und das Puzzle der molekularen Vorgänge der Hintergrundsadaptation gelöst zu haben.

Es wurde versucht, durch Standardisierung der Registrierungsbedingungen die durch Hintergrundlicht oder Natriumnitroprussid hervorgerufenen Veränderungen zu erfassen und zu vergleichen, die Zelle selber wurde als Blackbox behandelt und die Komplexität der intrazellulären Biochemie wurde als gegeben betrachtet.

Die molekularen Grundlagen der Anpassung von Photorezeptoren an Hintergrundsbeleuchtung sind anhand der Daten mehrerer Studien in den Schlüsselkomponenten der Transduktionskaskade zu suchen (Calvert et al. 1998, Fain et al. 2001)

Das Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau von freiem cGMP und die daran beteiligten Enzymsysteme stellen dabei eine der wichtigsten Modulationsebenen dar.

Die mit elektrophysiologischen Methoden erfassten Adaptationszeichen, Verkleinerung der Amplitude und Beschleunigung der Lichtantwort, können durch eine Verschiebung der cGMP- Homöostase in Richtung Synthese und dadurch, trotz lichtbedingter Hydrolyse durch die Phosphodiesterase, Erhöhung der cGMP Konzentration im Außensegment erklärt werden (Cobbs und Pugh 1987, Lyubarski et al. 1996, Fain et al. 2001).

Es gibt kaum Arbeiten, die eine mögliche Rolle von Stickstoffmonoxid in der Phototransduktion anhand elektrophysiologischer Methoden überprüfen, mit Ausnahme von Patch-Clamp Registrierungen durch Schmidt, Nöll et al., die durch Applikation von Natriumnitroprussid und in weiteren Versuchen von Komponenten des NO Syntheseweges wie L-Arginine und NADPH, Effekte auf das Dunkelpotential zeigten, die ähnlich waren und als Stimulationseffekte einer löslichen Guanylat-Zyklase gedeutet wurden.

Obwohl es mehrere biochemische Hinweise für die Existenz eines NO/cGMP Signalweges in der Retina und auch in den Photorezeptoren gibt (Kurenni et al. 1995, Blute et al. 1997, Sitaramayya 2002) gibt es in der Literatur bisher keine vergleichbare Arbeit, die über positive oder negative Ergebnisse über eine Modulation des elektrischen Gesamtverhaltens eines Photorezeptors durch NO berichtet.

Nach der Review-Arbeit von Fain et al. (2001) sollte der lichtinduzierte Abfall der freien Kalziumkonzentration ausreichen, um die Anpassungsvorgänge innerhalb der Zelle zu erklären, argumentiert wird mit vielen experimentellen Arbeiten, die belegen, dass der Hauptmechanismus, der durch das Hintergrundlicht direkt angekurbelt wird, die Hydrolyserate des freien cGMP durch die Phosphodiesterase ist. Die dadurch induzierte Abnahme auch des freien Kalziums aktiviert die membrangebundene Guanylat-Zyklase, die dagegen steuert und damit die Sensitivitätsherabsetzung der Zelle hervorruft.

Die Kalziumabhängigkeit der membrangebundenen Guanylat-Zyklase über Guanylat-Zyklase aktivierende Proteine, die sensitive Kalziumsensoren sind und bei Abnahme des freien Kalziums die Guanylat-Zyklase

unmittelbar aktivieren, ist ohne Zweifel vielfältig durch kombinierte elektrophysiologische und biochemische Verfahren belegt (Nakatani und Yau 1988, Matthews et al. 1988, Koutalos et al. 1995, Calvert et al. 1998).

Gray- Keller und Detwiler (1996) haben versucht, vergleichbare Kalziumveränderungen auf elektrische Effekte hin zu überprüfen und stellten fest, dass die Beschleunigung der Rückbildungsphase der Lichtantwort, die durch Hintergrundlicht hervorgerufen wird, bei einer vergleichbaren herbeigeführten intrazellulären Kalziumreduktion fehlte. Andere zusätzliche Adaptationsmechanismen wurden als Erklärung postuliert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass unter bestimmten Voraussetzungen freigesetztes Stickstoffmonoxid Effekte zeigt, die sich mit einer zusätzlichen Aktivierung einer löslichen Guanylat-Zyklase decken, dennoch schwindet dieser Einfluss je näher die Lichtreize in den sättigenden Bereich herankommen, es zeigt sich sogar die Tendenz, dass NO Gegenteiliges bewirkt, die hier nicht weiter verfolgt wurde. Eine Erklärung dafür kann sich nur im Bereich von Spekulationen bewegen, da

es keine ausreichenden weiteren Daten über den Einfluss von NO auf das Photorezeptorverhalten gibt.

Im Hinblick auf die Hintergrundsadaptation kann NO, wenn davon ausgegangen werden kann, dass methodisch bedingte Gründe nicht vorliegen, vergleichbare Veränderungen wie das Hintergrundlicht nicht induzieren. Im subsättigenden Intensitätsbereich von Reizen zeigt NO dennoch einen modulierenden Effekt auf die Amplitude und die Rückbildungsdauer der Lichtantworten in derselben Richtung.

### **4.3 Rolle von Stickstoffmonoxid?**

Die genaue physiologische Bedeutung von Stickstoffmonoxid in der Modulation der Signaltransduktion von Photorezeptoren oder überhaupt in der Retina ist unklar, wenn auch mittlerweile anhand mehrerer Daten der Nachweis einer endogenen NO Synthese in der Retina von Mammalien und Amphibien vieler Spezies belegt wurde (Haverkamp et al. 1998, Haberecht et al. 1998, Kim et al. 2000).

Koch et al. (1994) lokalisierten eine endogene NO Synthese im Innensegment und in der Ellipsoid-Region in beiden Photorezeptorarten, Stäbchen und Zapfen, in der Mammalienretina und postulierten eine funktionelle Kopplung von NO mit einer löslichen Guanylat- Zyklase hauptsächlich im Innensegment und dadurch eine Modulation der synaptischen Transmission des Lichtsignals. Auch Blute et al. 1997 postulierten eine ähnliche modulatorische Rolle von NO. Eine Arbeit von Rieke et al. 1994 zeigte eine cGMP Abhängigkeit der Exozytose in Zapfen, darauf aufbauend demonstrierten Savchenko et al. 1997, dass endogenes Stickstoffmonoxid cGMP- abhängige Kanäle in Zapfen aktiviert und

dadurch eine Erhöhung der Transmitterfreisetzung in den synaptischen Terminalen der Zapfen triggert.

Außerdem soll dadurch retrograde synaptische Modulation der Transmitterfreisetzung der Photorezeptoren durch nachgeschaltete Zellen, wie z.B. Horizontalzellen ebenfalls möglich sein.

Weitere Untersuchungen mit kombinierten biochemischen und elektrophysiologischen Verfahren sind notwendig, um Klärung der vielfältigen Möglichkeiten der Stickstoffmonoxideinflüsse in der Lichtsignalverarbeitung im erweiterten Sinne zu bringen.

Anhand der hier ermittelten Daten kann Stickstoffmonoxid die elektrische Lichtantwort in der ersten Station der Lichtsignalverarbeitung ebenfalls modulieren. Es kann davon ausgegangen werden, dass endogen freigesetztes Stickstoffmonoxid, sei es in den Photorezeptoren selbst oder in nachgeschalteten Zellen produziert, retrograd die Sensitivität der Stäbchenzellen verändern kann. Welchen Kontrollmechanismen so ein Signalweg in der Retina unterliegt und unter welchen physiologischen Bedingungen eine Stickstoffmodulation der Photorezeptoren eintritt, bleibt eine interessante offene Frage.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

---

In dieser Arbeit wurde versucht, durch ein elektrophysiologisches Verfahren einen wichtigen Aspekt der Phototransduktion, nämlich die Anpassung von Photorezeptoren an Hintergrundsbeleuchtung unterschiedlicher Intensität anhand von Veränderungen in den registrierten elektrischen Signalen zu erfassen und in Verbindung mit Veränderungen, hervorgerufen durch einen extrazellulär applizierten NO-Donator (Nitroprussidnatrium), zu bringen.

Als Grundlage diente die Annahme der Existenz eines endogenen NO/cGMP Signalweges als zusätzlichen Regulierungsmechanismus der Homöostase der freien cGMP Konzentration im Photorezeptoraußensegment.

Frei präparierte und in Ringer-Lösung inkubierte intakte Stäbchenzellen des Grasfrosches *Rana temporaria* wurden für die Registrierungen mit dem Innensegment in eine Glaselektrode gesaugt. Die mit dieser Methode registrierten Lichtantworten zeigten eine charakteristische Verlaufskurve mit einer raschen initialen Spitze, über 90% der Maximalantwort wurde

innerhalb der ersten 200- 400 ms erreicht, sowie intensitätsabhängig unterschiedlich langem Plateau mit S-förmigem Ausklingen der Lichtantwort. Die Streuung sowohl in der Amplitude als auch in dem zeitlichen Verlauf der Rückbildungsphase war in den Registrierungen an verschiedenen Zellen, teilweise auch methodisch bedingt, relativ breit. Um derartige Einflüsse zu eliminieren wurden zwei Strategien verwendet:

1. Wenn die äußeren Bedingungen konstant gehalten werden und nur eine Variable verändert wird, sei es Licht oder eine Substanz im extrazellulären Milieu , sollten alle unmittelbaren Veränderungen des registrierten Signals derselben Zelle darauf zurückzuführen sein

2. In der statistischen Analyse der Ergebnisse sollten Fehler aufgrund der Streuung zwischen den verschiedenen Zellen durch die Versuchsplanung und Wahl eines geeigneten Tests ausgeschaltet werden.

Die Applikation von Hintergrundlicht ansteigender Intensität verursachte Beschleunigung der Rückbildungszeit der Lichtantwort, gefolgt von Amplitudenverkleinerung bei höheren Intensitäten als Zeichen von Adaptationsmechanismen in der Zelle.

Extrazelluläre Applikation von Natriumnitroprussid als NO Donator zeigte

im niedrigen Intensitätsbereich der applizierten Lichtreize einen statistisch signifikanten Effekt auf Amplitude und Rückbildungszeit, der kongruent mit einer Aktivierung einer löslichen Guanylat-Zyklase ist und durch eine Verschiebung des cGMP Gleichgewichts Richtung Synthese erklärt werden kann. Diese Veränderungen waren in der Richtung aber nicht in dem Ausmaß vergleichbar mit den Veränderungen durch das Hintergrundlicht. Im subsättigenden Intensitätsbereich ist eine endogene Modulation der Phototransduktion durch NO im Sinne eines additiven Adaptationsmechanismus dadurch sehr plausibel.

Warum die Effekte von Stickstoffmonoxid auf die elektrische Lichtantwort der Stäbchen gerade bei höheren Intensitäten in den Sättigungsbereich hinein schwinden, ist nicht klar. Es ist gut möglich, dass weitere endogene Mechanismen die Wirkung von NO aufheben.

Die physiologische Bedeutung und die Regulationsmöglichkeiten des NO/cGMP Signalweges auf der ersten Ebene der Signalverarbeitung in der Retina sind möglicherweise komplexer als die derzeitige Datenlage erfasst und erklären kann, aber umso faszinierender.

## 6 SUMMARY

---

Flash response recovery of photoreceptors is the result of several biochemical reactions that end up with restoring the cGMP-concentration in the photoreceptor outer segment to preillumination levels.

Nitric Oxide (NO) is known to increase the formation of cGMP in several tissues through the activation of soluble guanylate cyclases. Since rod outer segments were reported to contain guanylate cyclase activity in the cytosol which was highly activated by sodiumnitroprusside, a nitric oxide generating agent, it is thinkable that NO could enhance the termination of the light response via such activation and therefore play a modulatory role in the phototransduction process.

The main aim of the present study was to investigate the effect of extracellularly applied sodium nitroprusside on the amplitude and recovery time of rod flash responses in order to test the hypothesis that NO can act as an additional retrograde second messenger in visual transduction.

The method that was used is known as the pipette suction technique, all registrations were obtained from the inner segments of single intact rods of

dark adapted frogs (*Rana temporaria*) through a computer-controlled current-to voltage converter system. The parameters amplitude and time course of the recovery of the light responses of every tested cell respectively before and during background light in the first series and before and during perfusion with sodium- nitroprusside in the second series were statistically analyzed with the Wilcoxon Signed-Rank Test. The results of both series were also compared with each other.

As expected there was a significant decrease of the maximal amplitude of the light response under background illumination and an acceleration of the recovery phase of the rods as signs of adaptation.

There was also a significant decrease of the maximal amplitude ( $p < 0.01$ ) and acceleration ( $p < 0.05$ ) of the recovery at the same light flashes of low intensity under nitroprusside influence, even though not as strong as those under the background light. No significant changes in both parameters were seen at the higher light intensities under NO; on the contrary there was a tendency of increase of the amplitude and prolongation of the recovery of the light response at light flashes towards saturating levels (1000- 2000 photons  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Nitric Oxide enhances response termination at non-saturating low light flashes and reduces the photosensitivity of the rods probably through early activation of cGMP synthesis and could therefore act as an additional modulating factor in adaptation. Why these effects attenuate by increasing the intensity of the applied flashes needs further investigation.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

---

Angleson JK and Wensel TG

**A GTPase-accelerating factor for transducin, distinct from its effector cGMP**

**phosphodiesterase, in rod outer segment membranes**

*Neuron* 11: 939–949, 1993

Arshavsky VY, Antoch MP, and Philippov PP

**On the role of transducin GTPase in the quenching of a phosphodiesterase cascade of vision**

*FEBS Lett* 224: 19–22, 1987

Arshavsky V and Bownds MD

**Regulation of deactivation of photoreceptor G protein by its target enzyme and cGMP**

*Nature* 357: 416–417, 1992

Bader D R, MacLeish PR, and Schwartz EA

**A voltage-clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander**

*J Physiol (Lond)* 296: 1-26, 1979

Baehr W, Morita EA, Swanson RJ, and Applebury ML

**Characterization of bovine rod outer segment G-protein**

*J Biol Chem* 257: 6452–60, 1982

Bastian BL, and Fain GL

**Light adaptation in toad rods: requirement for an internal messenger which is not calcium**

*J Physiol* 297 (1): 493-520, 1979

Baumann C

**The regeneration and renewal of visual pigments in vertebrates**

*In: Dartnall HJ(Hrsg.), Handbook of sensory physiology, Band 7/1, Springer Verlag:395-416,1972*

Baylor DA, Lamb TD, and Yau KW

**The membrane current of single rod outer segments**

*J Physiol (Lond) 288: 589-611, 1979*

Baylor DA, Lamb TD, and Yau KW

**Responses of retinal rods to single photons**

*J Physiol (Lond) 288: 613-634, 1979*

Baylor DA, Nunn BJ, and Schnapf JL

**The photocurrent, noise and spectral sensitivity of rods of the monkey  
Macaca fascicularis**

*J Physiol (Lond) 357: 575–607, 1984*

Baylor DA, Nunn BJ

**Electrical properties of the light- sensitive conductance of rods of the  
salamander *Ambystoma tigrinum***

*J Physiol (Lond) 371: 115-145, 1986*

Beavo JA

**Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of  
multiple isoforms**

*Physiol Rev 75: 725–748, 1995*

Benningoff Anatomie

Kap 16.24 **Auge**

Band 2, 15 Auflage, Urban & Schwarzenberg, 1994

Blute TA, Mayer B, Eldred WD

**Immunocytochemical and histochemical localization of nitric oxide  
synthase in the turtle retina**

*Vis Neurosci 14(4): 717-729, 1997*

Blute TA, Velasco P, Eldred WD

**Functional localization of soluble guanylate cyclase in turtle retina: modulation of cGMP by nitric oxide donors**

*Vis Neurosci* 15(3): 485-498, 1998

Bownds MD and Arshavsky VY

**What are the mechanisms of photoreceptor adaptation?**

*Behav Brain Sci* 18: 415-424, 1995

Calvert PD, Ho TW, LeFebvre YM, and Arshavsky VY

**Onset of feedback reactions underlying vertebrate rod photoreceptor light adaptation**

*J Gen Physiol* 111: 39-51, 1998

Calvert PD, Govardovskii VI, Arshavsky VY, and Makino CL

**Two Temporal Phases of Light Adaptation in Retinal Rods**

*J Gen Physiol* 119: 129-146, 2002

Cervetto, L, Lagnado L, Perry RJ, Robinson DW, and McNaughton PA

**Extrusion of calcium from rod outer segments is driven by both sodium and potassium gradients**

*Nature* 337: 740-743, 1989

Chen TY, Illing M, Molday L, Hsu YT, Yau KW, and Molday RS

**Subunit 2 (or beta) of retinal rod cGMP-gated cation channel is a component of the 240-kDa channel-associated protein and mediates Ca<sup>2+</sup>-calmodulin modulation**

*Proc Natl Acad Sci (USA)* 91: 11757-61, 1994

Chen J, Makino CL, Peachey NS, Baylor DA, and Simon IMI

**Mechanisms of rhodopsin inactivation in vivo as revealed by a COOH terminal truncation mutant**

*Science* 267: 374-377, 1995

Cobbs WH and Pugh EN Jr

**Kinetics and components of the flash photocurrent of isolated retinal rods of the larval salamander *Ambystoma tigrinum***

*J Physiol (Lond)* 394: 529-572, 1987

Cote RH, Bownds MD and Arshavsky VY

**cGMP binding sites on photoreceptor phosphodiesterase: role in feedback regulation of visual transduction**

*Proc Natl Acad Sci (USA)* 91: 4845-49, 1994

Crouch RK, Chader GJ, Wiggert B, and Pepperberg DR

**Retinoids and the visual process**

*Photochem Photobiol* 64: 613-621, 1996

Deterre P, Bigay J, Forquet F, Robert M and Chabre M

**cGMP phosphodiesterase of retinal rods is regulated by two inhibitory subunits**

*Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2424-28, 1988

Detwiler PB, Gray-Keller MP

**The mechanisms of vertebrate light adaptation: speeded recovery versus slowed activation**

*Curr Opin Neurobiol* 6: 440-444, 1996

Dhallan RS, Yau KW, Schrader K, and Reed R

**Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons**

*Nature* 347: 184-187, 1990

Djamgoz MB, Sekaran S, Angotzi AR, Haamedi S, Vallerga S, Hirano J, Yamada M

**Light-adaptive role of nitric oxide in the outer retina of lower vertebrates: a brief review**

*Biol Sci Philos Trans R Soc (Lond)* 355(1401): 199-203, 2000

Dratz EA, Hargrave PA  
**The structure of rhodopsin and the rod outer segment disk membrane**  
*TIBS* 128 ff, 1983

Emeis D, Kuhn H, Reichert J, and Hofmann KP  
**Complex formation between metarhodopsin II and GTP-binding protein in bovine photoreceptor membranes leads to a shift of the photoproduct equilibrium**  
*FEBS Lett* 143: 29–34, 1982

Erickson MA, Robinson P, and Lisman J  
**Deactivation of visual transduction without guanosine triphosphate hydrolysis by G protein**  
*Science* 257: 1255-58, 1992

Fain GL, Matthews HR, Cornwall MC, Koutalos Y  
**Adaptation in Vertebrate Photoreceptors**  
*Physiol Rev* 81: 117-151, 2001

Fain GL  
**Sensitivity of toad rods: dependence on wave-length and background illumination**  
*J Physiol (Lond)* 261: 71–101, 1976

Farber DB  
**From mice to men: the cyclic GMP phosphodiesterase gene in vision and disease**  
*Invest Ophthalmol Visual Sci* 36: 263–275, 1995

Fesenko EE, Kolesnikov SS and Lyubarsky AL  
**Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment**  
*Nature* 313: 310–313, 1985

Finn JT, Grunwald ME and Yau KW  
**Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions**  
*Annu Rev Physiol* 58: 395–426, 1996

Florio SK, Prusti RK, and Beavo JA  
**Solubilization of membrane bound rod phosphodiesterase by the rod phosphodiesterase recombinant delta subunit**  
*J Biol Chem* 271: 24036–47, 1999

Flynn GE, Zagotta WN  
**A cysteine scan of the inner vestibule of cyclic nucleotide-gated channels reveals architecture and rearrangement of the pore**  
*J Gen Physiol* 121(6): 563-582, 2003

Geneser F  
**Histologie**  
Deutscher Ärzteverlag, Köln1990

Gerstner A, Zong X, Hofmann F, and Biel M  
**Molecular cloning and functional characterization of a new modulatory cyclic nucleotide-gated channel subunit from mouse retina**  
*J Neurosci* 20: 1324–32, 2000

Gotzes S, de Vente J, Muller F  
**Nitric oxide modulates cGMP levels in neurons of the inner and outer retina in opposite ways**  
*Vis Neurosci* 15(5): 945-955, 1998

Gordon SE, Downing-Park J, and Zimmerman AL  
**Modulation of the cGMP-gated ion channel in frog rods by calmodulin and an endogenous inhibitory faktor**  
*J Physiol (Lond)* 486: 533-546, 1995

Goulding EH, Ngai J, Kramer RH, Colicos S, Siegelbaum SA, Axel R, and Chess A

**Molecular cloning and single channel properties of a cyclic nucleotide-gated cation channel from catfish olfactory receptor neurons**

*Neuron* 8: 45-58, 1992

Gray-Keller MP and Detwiler PB

**The calcium feedback signal in the phototransduction cascade of vertebrate rods**

*Neuron* 13: 849-861, 1994

Gray-Keller MP, Detwiler PB

**Ca<sup>2+</sup> dependence of dark- and light-adapted flash responses in rod photoreceptors**

*Neuron* 17(2): 323-331, 1996

Gray-Keller M, Denk W, Shraiman B, and Detwiler PB

**Longitudinal spread of second messenger signals in isolated rod outer segments of lizards**

*J Physiol (Lond)* 519: 679-692, 1999

Haberecht MF, Schmidt HH, Mills SL, Massey SC, Nakane M, Redburn-Johnson DA

**Localization of nitric oxide synthase, NADPH diaphorase and soluble guanylyl cyclase in adult rabbit retina**

*Vis Neurosci* 15(5): 881-890, 1998

Hamm HE and Gilchrist A

**Heterotrimeric G proteins**

*Curr Opin Cell Biol* 8: 189-196, 1996

Hanafy KA, Krumenacker JS, and Murad F

**NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction**

*Med Sci Monit* 7(4): 801-819, 2001

Hargrave PA

**Future directions for rhodopsin structure and function studies**

*Behav Brain Sci* 18: 403–414, 1995

Haverkamp S, Eldred WD

**Localization of nNOS in photoreceptor, bipolar and horizontal cells in turtle and rat retinas**

*Neuroreport* 9(10): 2231-35, 1998

Hayashi F, Matsuura I, Kachi S, Maeda T, Yamamoto M, Fujii Y, Liu H, Yamazaki M, Usukura J, and Yamazaki A

**Phosphorylation by cyclin-dependent protein kinase 5 of the regulatory subunit of retinal cGMP phosphodiesterase. II. Its role in the turnoff of phosphodiesterase in vivo**

*J Biol Chem* 275(32): 958–965, 2000

He F, Mao M, and Wensel TG

**Enhancement of Phototransduction G Protein-Effector Interactions by Phosphoinositides**

*J Biol Chem* 279(10): 8986 –90, 2004

He W, Cowan CW and Wensel TG

**RGS9, a GTPase accelerator for phototransduction**

*Neuron* 20: 95–102, 1998

Hecht S, Schlaer S, and Pirenne MH

**Energy, Quanta, and vision**

*J Gen Physiol* 25: 819–840, 1942

Hemila S and Reuter T

**Longitudinal spread of adaptation in the rods of the frog's retina**

*J Physiol (Lond)* 310: 501–528, 1981

Hodgkin AL, McNaughton PA, and Nunn BJ  
**The ionic selectivity and calcium dependence of the light-sensitive pathway in toad rods**  
*J Physiol (Lond)* 358: 447–468, 1985

Hodgkin AL, McNaughton PA, and Nunn BJ  
**Measurement of sodium-calcium exchange in salamander rods**  
*J Physiol (Lond)* 391: 347–370, 1987

Hodgkin AL and Nunn BJ  
**Control of light-sensitive current in salamander rods**  
*J Physiol (Lond)* 403: 439–471, 1988

Hofmann KP, Pulvermuller A, Buczylo J, Van Hooser P, and Palczewski K  
**The role of arrestin and retinoids in the regeneration pathway of rhodopsin**  
*J Biol Chem* 267: 15701–06, 1992

Hsu YT and Molday RS  
**Modulation of the cGMP-gated channel of rod photoreceptor cells by calmodulin**  
*Nature* 361: 76–79, 1993

Hu G, Jang GF, Cowan CW, Wensel TG, and Palczewski K  
**Phosphorylation of RGS9-1 by an endogenous protein kinase in rod outer segments**  
*J Biol Chem* 276: 22287–95, 2001

Hurley J B  
**Shedding Light on Adaptation**  
*J Gen Physiol* 119: 125–128, 2002

Jones GJ

**Light adaptation and the rising phase of the flash photocurrent of salamander retinal rods**

*J Physiol* 487: 441 – 451, 1995

Karpen JW, Brown RL, Stryer L, and Baylor DA

**Interactions between divalent cations and the gating machinery of cyclic GMP-activated channels in salamander retinal rods**

*J Gen Physiol* 101: 1–25, 1993

Kaupp BU, Niidome T, Tanabe T, Terada S, Bonigk W, Stuhmer W, Cook NJ, Kangawa K, Matsuo H, Hirode T, Miyata T, and Numa S

**Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cGMP-gated channel**

*Nature* 342: 762–766, 1989

Kawamura S

**Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclic cGMP phosphodiesterase regulation by S-modulin**

*Nature* 362: 855–857, 1993

Kim TS, Reid DM, and Molday RS

**Structure-function relationships and localization of the Na/Ca-K exchanger in rod photoreceptors**

*J Biol Chem* 273: 16561–67, 1998

**Kim IB, Oh SJ, Chun MH**

**Neuronal nitric oxide synthase immunoreactive neurons in the mammalian retina**

*Microsc Res Tech* 50(2): 112–123, 2000

Koch KW and Stryer L

**Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions**

*Nature* 334: 64–66, 1988

Koch KW, Lambrecht HG, Haberecht M, Redburn D, Schmidt HH  
**Functional coupling of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent nitric oxide synthase and a soluble guanylyl cyclase in vertebrate photoreceptor cells**

*EMBO J* 13(14): 3312-20, 1994

Koch KW, Duda T, Sharma RK  
**Photoreceptor specific guanylate cyclases in vertebrate phototransduction**

*Mol Cell Biochem* 230(1-2): 97-106, 2002

Korschen HG, Illing M, Seifert R, Sesti F, Williams A, Gotzes S, Colville C, Muller F, Dose A, Godde M, Molday L, Kaupp UB, and Molday RS  
**A 240 kDa protein represents the complete betasubunit of the cyclic nucleotide-gated channel from rod photoreceptor**

*Neuron* 15: 627-636, 1995

Koutalos Y, Nakatani K, and Yau KW  
**The cGMP-phosphodiesterase and its contribution to sensitivity regulation in retinal rods**

*J Gen Physiol* 106: 891-921, 1995

Koutalos Y  
**Intracellular spreading of second messengers**

*J Physiol (Lond)* 519: 629, 1999

Kramer RH and Molokanova E  
**Modulation of cyclic-nucleotide-gated channels and regulation of vertebrate phototransduction**

*J Exp Biol* 204: 2921-31 (2001)

Krupnick JG, Gurevich VV and Benovic JL  
**Mechanism of quenching of phototransduction**

*J Biol Chem* 272: 18125-31, 1997

Kühn H

**Light-dependent phosphorylation of rhodopsin in living frogs**

*Nature* 250: 588–590, 1974

Kühn H, McDowell JH, Leser KH, and Bader S

**Phosphorylation of rhodopsin as a possible mechanism of adaptation**

*Biophys Struct Mech* 3: 175–180, 1977

Kühn H

**Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes**

*Biochem* 17: 4389–95, 1978

Kühn H

**Light- and GTP-regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes**

*Nature* 283: 587–589, 1980

Kühn H, Hall SW, and Wilden U

**Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin**

*FEBS Lett* 176: 473–478, 1984

Kühn H

**Interactions between photoexcited rhodopsin and light -activated enzymes in rods**

*Progr Ret Res* 3: 123-156, 1984

Kurenni DE, Thurlow GA, Turner RW, Moroz LL, Sharkey KA, Barnes S

**Nitric oxide synthase in tiger salamander retina**

*J Comp Neurol* 361(3): 525-536, 1995

Lagnado L, Cervetto L, and McNaughton PA

**Calcium homeostasis in the outer segments of retinal rods from the tiger Salamander**

*J Physiol (Lond)* 455: 111-142, 1992

Lagnado L and Baylor DA

**Calcium controls light-triggered formation of catalytically active rhodopsin**

*Nature* 367: 273-277, 1994

Li N, Fariss RN, Zhang K, Otto-Bruc A, Haeseleer F, Bronson D, Qin N, Yamazaki A, Subbaraya I, Milam AH, Palczewski K, and Baehr W

**Guanylate-cyclase-inhibitory protein is a frog retinal Ca<sup>2+</sup>-binding protein related to mammalian guanylate-cyclase-activating proteins**

*Eur J Biochem* 252: 591-599, 1998

Liman ER and Buck LB

**A second subunit of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel confers high sensitivity to cyclic AMP**

*Neuron* 13: 611-621, 1994

Liu GI, Bridges CDB and Fong S-L

**Vitamin A transport between retina and pigment epithelium-an interphotoreceptor matrix protein carrying endogenous retinol (IRBP)**

*Invest Ophthal Vis Sci* 22: 65, 1982

Loewenstein WR

**Handbook of sensory physiology**

Vol 1, Springer Verlag 1971

Lyubarsky A, Nikonov S, Pugh EN Jr

**The kinetics of inactivation of the rod phototransduction cascade with constant Ca<sup>2+</sup>**

*J Gen Physiol.* 107(1): 19-34, 1996

Lowe DG, Dizhoor AM, Liu K, Gu Q, Spencer M, Laura R, Lu L, and Hurley JB

**Cloning and expression of a second photoreceptor specific membrane retina guanylyl cyclase (RetGC), RetGC-2**

*Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5535-5539, 1995

- Margulis A, Sharma RK, Sitaramayya A  
**Nitroprusside-sensitive and insensitive guanylate cyclases in retinal rod outer segments**  
*Biochem Biophys Res Commun* 185(3): 909-914, 1992
- Matthews HR, Murphy RL, Fain GL, and Lamb TD  
**Photoreceptor light adaptation is mediated by cytoplasmic calcium concentration**  
*Nature* 334: 67-69, 1988
- Matthews HR  
**Actions of  $Ca^{2+}$  on an Early Stage in Phototransduction Revealed by the Dynamic fall in  $Ca^{2+}$  Concentration during the Bright Flash Response**  
*J Gen Physiol* 109: 141 – 146, 1997
- Matthews HR, Fain GL  
**The effect of light on outer segment calcium in salamander rods**  
*J Physiol* 552:763-776, 2003
- McNaughton PA, Cervetto L, and Nunn BJ  
**Measurement of the intracellular free calcium concentration in salamander rods**  
*Nature* 322: 261-263, 1986
- Miller JA, Brodie AE, and Bownds MD  
**Light-activated rhodopsin phosphorylation may control light sensitivity in isolated rod outer segments**  
*FEBS Lett* 59: 20–23, 1975
- Miller DL and Korenbrot JI  
**Kinetics of light-dependent Ca fluxes across the plasma membrane of rod outer segments: a dynamic model of the regulation of the cytoplasmic Ca concentration**  
*J Gen Physiol* 90: 397-425, 1987

Moriondo A, Rispoli G

**A step-by-step model of phototransduction cascade shows that Ca<sup>2+</sup> regulation of guanylate cyclase accounts only for short-term changes of photoresponse**

*Photochem Photobiol Sci* 2(12): 2-8, 2003

Nakatani K and Yau KW

**Calcium and light adaptation in retinal rods and cones**

*Nature* 334: 69 – 71, 1988

Nakatani K and Yau KW

**Calcium and magnesium fluxes across the plasma membrane of the toad rod outer segment**

*J Physiol (Lond)* 395: 695–729, 1988

Nakatani K and Yau KW

**Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate activated conductance studied in a truncated rod outer segment of the toad**

*J Physiol (Lond)* 395: 731–753, 1988

Nekrasova ER, Berman DM, Rustandi RR, Hamm HE, Gilman AG, and Arshavsky VY

**Activation of transducin guanosine triphosphatase by two proteins of the RGS family** *Biochem* 36: 7638–43, 1997

Nikonov S, Engheta N, Pugh EN Jr

**Kinetics of recovery of the dark-adapted salamander rod photoresponse**

*J Gen Physiol* 111(1): 7-37, 1998

Nöll GN and Yoshikami S

**Mammalian retina regenerates rhodopsin with 11-cis retinal coming from the pigment epithelium**

*Pflügers Arch* 377: R58, 1978

Nöll GN

**Solubility of retinol, retinal and retinyl palmitate for the regeneration of bleached rhodopsin in the isolated frog retina**  
*Vision Res* 24, 11:1615-22, 1984

Nöll GN, Billek M, Pietruck C, Schmidt KF

**Inhibition of Nitric Oxide Synthase alters light Responses and dark voltage of amphibian photoreceptors**  
*Neuropharmacology* 33, 11: 1407-12, 1994

Ohguro H, Van Hooser JP, Milam AH and Palczewski K

**Rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation in vivo**  
*J Biol Chem* 270: 14259–62, 1995

Palczewski K and Saari JC

**Activation and inactivation steps in the visual transduction pathway**  
*Curr Opin Neurobiol* 7: 500–504, 1997

Peng YW, Rhee SG, Yu WP, Ho YK, Schoen T, Chader GJ, and Yau KW

**Identification of components of a phosphoinositide signaling pathway in retinal rod outer segments**  
*Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1995-2000, 1997

Pepicelli O, Raiteri M, Fedele E

**The NOS/sGC pathway in the rat central nervous system: a microdialysis overview**  
*Neurochem Int* 45(6): 787-797, 2004

Pepperberg DR, Cornwall MC, Kahlert M, Hofmann KP, Jin J, Jones GJ, and Ripps H

**Light-dependent delay in the falling phase of the retinal rod photoresponse**  
*Vis Neurosci* 8: 9–18, 1992

Pozdnyakov N, Lloyd A, Reddy V N, and Sitaramayya A  
**Nitric Oxide-Regulated Endogenous ADP-Ribosylation of Rod Outer Segment Proteins**  
*Biochem Biophys Res Commun* 192, 2: 610-615, 1993

Pugh EN Jr., and Lamb TD  
**Cyclic GMP and calcium: the internal messengers of excitation and adaptation in vertebrate Photoreceptors**  
*Vis Res* 30: 1923-48, 1990

Pugh EN Jr., Duda T, Sitaramayya A, and Sharma RK  
**Photoreceptor guanylate cyclases: a review**  
*Biosci Rep* 1997

Pugh, EN Jr, Nikonov S, and Lamb TD  
**Molecular mechanisms of vertebrate photoreceptor light adaptation**  
*Curr Opin Neurobiol* 9: 410-418, 1999

Pulvermuller A, Maretzki D, Rudnicka-Nawrot M, Smith WC, Palczewski K, and Hofmann KP  
**Functional differences in the interaction of arrestin and its splice variant, p44, with rhodopsin**  
*Biochem* 36: 9253-9260, 1997

Rao VR and Oprian DD  
**Activating mutations of rhodopsin and other G protein-coupled receptors**  
*Annu Rev Biophys Biomol Struct* 25, 253: 287-314, 1996

Richards MJ and Gordon SE  
**Cooperativity and cooperation in cyclic nucleotide-gated ion channels**  
*Biochem* 39(46): 14003-11, 2000

Rieke F, Schwartz EA  
**A cGMP-gated current can control exocytosis at cone synapses.**  
*Neuron* 13(4): 863-73, 1994

Rieke F and Baylor DA

**Origin of reproducibility in the responses of retinal rods to single photons**

*Biophys J* 75: 1836–57, 1998

Ruiz ML and Karpen JW

**Single cyclic nucleotide-gated channels locked in different ligand-bound states**

*Nature*: 389–392, 1997

Sagoo MS and Lagnado L

**The action of cytoplasmic calcium on the cGMP-activated channel in salamander rod photoreceptors**

*J Physiol (Lond)* 497: 309-319, 1996

Sagoo MS and Lagnado L

**G-protein deactivation is rate-limiting for shut-off of the phototransduction cascade**

*Nature* 389: 392-395, 1997

Sachs L

**Angewandte Statistik**

Springer Verlag, 5. Auflage, 1978

Schertler GF and Hargrave PA

**Projection structure of frog rhodopsin in two crystal forms**

*Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11578–82, 1995

Savchenko A, Barnes S, Kramer RH

**Cyclic-nucleotide-gated channels mediate synaptic feedback by nitric oxide**

*Nature* 390(6661): 694-698, 1997

Schmachtenberg O, Bicker G  
**Nitric oxide and cyclic GMP modulate photoreceptor cell responses in the visual system of the locust**  
*J Exp Biol* 202(1): 13-20, 1999

Schmidt KF  
**Untersuchungen zum Transduktionsprozeß in den retinalen Stäbchen von *Rana esculenta***  
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Giessen im Fachbereich Biologie, 1986

Schmidt KF, Nöll GN, Yamamoto Y  
**Sodium nitroprusside alters dark voltage and light responses in isolated retinal rods during whole cell recording**  
*Visual Neurosc* 9: 205-209, 1992

Schmidt KF, Nöll GN  
**Nitric oxide in amphibian photoreceptors**  
Biochemical, Pharmacological, and Clinical aspects of Nitric Oxide, Plenum Press, NY 1995

Schmidt RF (Hrsg)  
**Neuro- und Sinnesphysiologie**  
Springer Verlag 1993

Schnapf JL and Baylor DA  
**How photoreceptor cells respond to light**  
*Scientific American* 256: 32-39, 1987

Shyjan AW, De Sauvage FJ, Gillett NA, Goeddel DV, and Lowe DG  
**Molecular cloning of a retina-specific membrane guanylyl cyclase**  
*Neuron* 9: 727-737, 1992

Sitaramayya A

**Soluble guanylate cyclases in the retina**

*Mol Cell Biochem* 230 (1-2): 177-186, 2002

Smith WC, Milam AH, Dugger D, Arendt A, Hargrave PA, and Palczewski K

**A splice variant of arrestin. Molecular cloning and localization in bovine retina**

*J Biol Chem* 269: 15407-10, 1994

Trudeau MC and Zagotta WN

**Calcium/Calmodulin Modulation of Olfactory and Rod Cyclic Nucleotide-gated Ion Channels, Minireview**

*J Biol Chem* 278 (21, 23): 18705-08, 2003

Tsang SH, Burns ME, Calvert PD, Gouras P, Baylor DA, Goff SP, and Arshavsky VY

**Role for the target enzyme in deactivation of photoreceptor G protein in vivo**

*Science* 282: 117-121, 1998

Tsuboi S, Matsumoto H, and Yamazaki A

**Phosphorylation of an inhibitory subunit of cGMP phosphodiesterase in *Rana catesbeiana* rod photoreceptors. II. A possible mechanism for the turnoff of cGMP phosphodiesterase without GTP hydrolysis**

*J Biol Chem* 269: 15016-23, 1994

Tsuyama Y, Nöll GN, and Schmidt KF

**L-Arginine and nicotinamide adenine dinucleotide Phosphate alter dark voltage and accelerate light Response recovery in isolated retinal rods of the frog (*Rana temporaria*)**

*Neurosci Lett* 149: 95-98, 1993

Unger VM, Hargrave PA, Baldwin JM, and Schertler GF

**Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices**

*Nature* 389: 203-206, 1997

Varnum MD and Zagotta WN

**Interdomain interactions underlying activation of cyclic nucleotide-gated channels**

*Science* 278: 110–113, 1997

Vuong TM, Chabre M, Stryer L

**Millisecond activation of transducin in the cyclic nucleotide cascade of vision**

*Nature* 311(5987): 659-661, 1984

Vuong TM and Chabre M

**Subsecond deactivation of transducin by endogenous GTP hydrolysis**

*Nature* 346: 71–74, 1990

Weber EH

**De pulsu, resorptione, auditu et tactu annotationes anatomicae et physiologicae**

Leipzig, Germany, Koehler, 1834

Wieland T, Chen CK, and Simon MI

**The retinal specific protein RGS-r competes with the gamma subunit of cGMP phosphodiesterase for the alpha subunit of transducin and facilitates signal termination**

*J Biol Chem* 272: 8853–56, 1997

Wilden U and Kühn H

**Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: number of phosphorylation sites**

*Biochemistry* 21: 3014–22, 1982

Woodruff ML and Bownds MD

**Amplitude, kinetics, and reversibility of a light-induced decrease in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate in frog photoreceptor membranes**

*J Gen Physiol* 73: 629–653, 1979

Xu J, Dodd RL, Makino CL, Simon MI, Baylor DA, and Chen J  
**Prolonged photoresponses in transgenic mouse rods lacking arrestin**  
*Nature* 389: 505–509, 1997

Yamazaki A, Hayashi F, Tatsumi M, Bitensky MW, George JS  
**Interactions between the subunits of transducin and cyclic GMP phosphodiesterase in *Rana catesbiana* rod photoreceptors**  
*J Biol Chem* 115: 39-48, 1990

Yamazaki A, Bondarenko VA, Dua S, Yamazaki M, Usukura J, and Hayashi F  
**Possible stimulation of retinal rod recovery to dark state by cGMP release from a cGMP phosphodiesterase noncatalytic site**  
*J Biol Chem* 271(32): 495- 498, 1996

Yang RB, Foster DC, Garbers DL, and Fulle HJ  
**Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye**  
*Proc Natl Acad Sci USA* 92: 602–606, 1995

Yang RB and Garbers DL  
**Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers**  
*J Biol Chem* 272 (13): 738–742, 1997

Yau KW, McNaughton PA, and Hodgkin AL  
**Effect of ions on the light-sensitive current in retinal rods**  
*Nature* 292: 502–505, 1981

Yau KW and Nakatani K  
**Electrogenic Na-Ca exchange in retinal rod outer segment**  
*Nature* 311: 661-663, 1984

Yau KW and Nakatani K  
**Cation selectivity of light-sensitive conductance in retinal rods**  
*Nature* 309: 352–354, 1984

Yau KW and Nakatani K

**Light-induced reduction of cytoplasmic free calcium in retinal rod outer Segment**

*Nature* 313: 579-582, 1985

Yau KW and Baylor DA

**Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells**

*Annu Rev Neurosci* 12: 289-327, 1989

Yoshida A, Pozdnyakov N, Dang L, Orselli SM, Reddy VN, Sitaramayya A

**Nitric oxide synthesis in retinal photoreceptor cells**

*Vis Neurosci* 12(3): 493-500, 1995

Zagotta WN and Siegelbaum SA

**Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels**

*Annu Rev Neurosci* 19: 235-263, 1996

Zimmermann AL

**Cyclic nucleotide gated channels**

*Curr Opin Neurobiol* 5: 296-303, 1995

Zoche M, Koch KW

**Purified retinal nitric oxide synthase enhances ADP-ribosylation of rod outer segment proteins**

*FEBS Lett* 357(2): 82-178, 1995

## 8 ANHANG

### Tabelle

Sachs L, Angewandte Statistik, S.245, Springer Verlag, 5. Auflage, 1978

Kritische Werte für den Wilcoxon-Paardifferenzen-Test:

Test	zweiseitig			einseitig		Test	zweiseitig			einseitig		
	n	5 %	1 %	0,1 %	5 %		1 %	n	5 %	1 %	0,1 %	5 %
6	0				2		36	208	171	130	227	185
7	2				3	0	37	221	182	140	241	198
8	3	0			5	1	38	235	194	150	256	211
9	5	1			8	3	39	249	207	161	271	224
10	8	3			10	5	40	264	220	172	286	238
11	10	5	0		13	7	41	279	233	183	302	252
12	13	7	1		17	9	42	294	247	195	319	266
13	17	9	2		21	12	43	310	261	207	336	281
14	21	12	4		25	15	44	327	276	220	353	296
15	25	15	6		30	19	45	343	291	233	371	312
16	29	19	8		35	23	46	361	307	246	389	328
17	34	23	11		41	27	47	378	322	260	407	345
18	40	27	14		47	32	48	396	339	274	426	362
19	46	32	18		53	37	49	415	355	289	446	379
20	52	37	21		60	43	50	434	373	304	466	397
21	58	42	25		67	49	51	453	390	319	486	416
22	65	48	30		75	55	52	473	408	335	507	434
23	73	54	35		83	62	53	494	427	351	529	454
24	81	61	40		91	69	54	514	445	368	550	473
25	89	68	45		100	76	55	536	465	385	573	493
26	98	75	51		110	84	56	557	484	402	595	514
27	107	83	57		119	92	57	579	504	420	618	535
28	116	91	64		130	101	58	602	525	438	642	556
29	126	100	71		140	110	59	625	546	457	666	578
30	137	109	78		151	120	60	648	567	476	690	600
31	147	118	86		163	130	61	672	589	495	715	623
32	159	128	94		175	140	62	697	611	515	741	646
33	170	138	102		187	151	63	721	634	535	767	669
34	182	148	111		200	162	64	747	657	556	793	693
35	195	159	120		213	173	65	772	681	577	820	718

### **Danksagung**

Für die Überlassung des Arbeitsthemas, die Einarbeitung, die unermüdliche Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Gottfried Nöll bedanken. Er ermöglichte mir das Erlernen der Methode von Grund auf und das selbstständige wissenschaftliche Denken und Arbeiten. Ohne seine Anregungen und konstruktive Kritik wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Herrn Priv.- Doz. Dr. K.-F. Schmidt danke ich für den fruchtbaren Gedankenaustausch.

Bei Frau C. Seidler bedanke ich mich für das freundliche Arbeitsklima.

Den Mitarbeitern der Werkstatt, insbes. Herrn Becker, gilt mein besonderer Dank für die technische Hilfe.

Herrn Prof. Dr. C. Baumann, seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. Piper und allen Mitarbeitern des physiologischen Instituts danke ich für die nette Atmosphäre und freundliche Unterstützung.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Aikaterini Patrona, geb. am 18.02.1975 in Kozani/  
Griechenland  
Griechischer Staatsangehörigkeit, ledig



---

### Schulbildung

- |              |  |
|--------------|--|
| 09/81- 06/93 | Griechische Schulbildung in Siatista, Griechenland<br>Erwerben der Hochschulreife im allgemeinen Lyzeum<br>von Siatista mit naturwissenschaftlichem Abitur in<br>den Fächern Physik Chemie und Humanbiologie |
| 07/93-09/93  | Vorbereitung und Informationskurse für ein<br>Auslandsstudium  |
| 10/93-02/95  | Sprach- und Studienaufenthalt in<br>München/Deutschland,   |
| 11/94        | Test für medizinische Studiengänge und Zuteilung<br>eines Studienplatzes für das Sommersemester 95',<br>Gasthörererin für Vorlesungen Vorklinik in München   |

### Medizinische Ausbildung

- |             |  |
|-------------|--|
| 03/95-03/97 | Vorklinisches Studium an der humanmedizinischen<br>Fakultät der Justus- Liebig- Universität in Giessen |
| 03/97       | Ärztliche Vorprüfung mit "sehr gut "   |
| 03/97-04/00 | Klinisches Studium der Humanmedizin an der Justus-<br>Liebig-Universität in Giessen                    |
- Famulaturen in Neurologie, Kardiologie, chirurgische Orthopädie und  
medizinischer Mikrobiologie
- |             |   |
|-------------|---|
| 05/00-04/01 | Praktisches Jahr in der Universitätsklinik in Giessen<br>in Onkologie, Allgemein- und Unfallchirurgie und<br>Wahlabteilung Neurochirurgie |
|-------------|---|

06/01                   Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und  
Abschluss mit der Gesamtnote 1,83

Während des Studiums Tätigkeit als Tutorin und Präparatorin in den Kursen makroskopischer und mikroskopischer Anatomie sowie Tutorin in Physiologie-Praktika

### **Weiterbildung, berufliche Erfahrungen und Tätigkeiten**

09/01-03/04           Ärztin im Praktikum und nachfolgend Assistenzärztin  
in der Klinik für Neurochirurgie  
der Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main

Notdienstseminar und Kurs in Fachkunde Rettungsdienst 2003

Einwöchiger Mikrochirurgie- Kurs im Sommer 03´ in der neurochirurgischen  
Universitätsklinik in Wien

Regelmäßige Teilnahme an fachrelevanten Kongressen und  
Fortbildungsveranstaltungen der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie

Seit 2003 Mitglied der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, regelmäßiger  
Besuch von Methoden-Kursen und Vorträgen in den Neurowissenschaften.

Präsentation der Ergebnisse der Promotionsarbeit als Poster in dem Neurobiologie-  
Kongress der Gesellschaft im Februar 2005 in Göttingen.

### **Sonstiges**

TOEFL (Test of English as a Foreign Language) am 14.01.2005: 290 Punkte von  
300

Vorbereitung auf das amerikanische Staatsexamen.

Derzeit tätig als Assistenzärztin in der neurochirurgischen Abteilung der  
Paracelsus Klinik in Osnabrück.