Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften retinaler Ganglienzellen in der degenerierten Rattennetzhaut

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation vorgelegt von

Stephan Hesse, Diplom-Biologe

aus Göttingen

Berichter*: Universitätsprofessor Dr. med. Peter Walter*
Universitätsprofessor i. R. Dr. rer nat. Hermann Wagner
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Frank Müller

Tag der mündlichen Prüfung*: 28.05.2021*

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 1

Zusammenfassung 4

Summary 5

1 Einleitung 6

1.1 Anatomie und Physiologie des Säugerauges 6

1.2 Aufbau der Säugernetzhaut 7

1.3 Signalverarbeitung und Weiterleitung in der Retina 9

1.4 Retinale Ganglienzellen 12

1.5 Pharmakologische Modifikation der retinalen Signalverarbeitung 13

1.5.1 D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5) und 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) 13

1.5.2 Bicucullin 13

1.6 „Retinal remodeling“ 14

1.7 Tiermodelle mit einer genetisch induzierten Photorezeptordegeneration 15

1.8 Elektrische Stimulation und retinale Implantate 16

1.9 Ziel der Arbeit 17

2 Material und Methoden 19

2.1 Material 19

2.1.1 Tiere 19

2.1.2 Chemikalien, Medium und pharmakologische Stoffe 19

2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Instrumente 20

2.1.4 Software 20

2.1.5 Geräte 21

2.2 Methoden 22

2.2.1 Ansetzen des Mediums 22

2.2.1.1 Ames 22

2.2.1.2 Pharmakologische Lösungen 22

2.2.2 Enukleation und Präparation der Retina 23

2.2.3 Vorbereitung des MEA-Setups und des MEA2100 System 23

2.2.4 Vorbereitung des Multielektrodenarrays 24

2.2.5 Aufnahme der elektrophysiologischen Aktivität 26
2.2.5.1 Elektrische Stimulation 26
2.2.5.2 Stimulationsreihe 27
2.2.5.3 Pharmakologische Behandlung 27
2.2.6 Datenanalyse 28
2.2.6.1 Filtern der Rohdaten 28
2.2.6.2 Spikesorting 28
2.2.6.3 Peristimulus time histogram (PSTH) 29
2.2.6.4 Frequenzanalyse mittels Power Spectral Densities (PSD) 30
2.2.6.5 Statistische Auswertung 30
3 Ergebnisse 31
3.1 Einfluss der Photorezeptordegeneration auf die Spikefrequenz 32
3.1.1 Abhängigkeit zwischen Spikeaktiviät und Degenerationsstadium 32
3.1.2 Analyse des Spikeverhaltens – Burstaktivität 35
3.1.3 Altersbedingte morphologische Veränderung des Auges in der RCS Ratte 37
3.2 Oszillatorische Anteile in der degenerierten RCS Retina 37
3.2.1 Vergleich von Wildtyp und RCS Retina 37
3.2.2 Einfluss von CNQX und D-AP5 auf die Spontanaktivität 39
3.2.3 Einfluss von Bicucullin auf die slow wave Komponente 42
3.2.4 Behandlung mit Mix aus CNQX, D-AP5 und Bicucullin 43
3.3 Epiretinale Stimulation der Retina 45
3.3.1 Vorversuch zur Stimulierbarkeit von retinalen Ganglienzellen 45
3.3.2 Epiretinale Stimulation von GZ evoziert drei Antwortmuster in der degenerierten RCS Ratten Retina 47
3.3.3 Hemmung der exzitatorischen Signalwege 49
3.3.4 Hemmung des GABAergen-Signalweges vermindert die OFF- und Delayed-Antwort 51
3.3.4.1 Einfluss von CNQX und D-AP5 bei gleichzeitiger Blockade der inhibitorischen Signalwege 55
4 Diskussion 57
4.1 Im Verlauf der Degeneration nimmt die Spikeaktivität in der RCS Ratte ab 57
4.2 Oszillationen in der degenerierten RCS Retina 59

4.3 Stimulationsfähigkeit der RGZ 63
4.4 Stimulationsmuster und Wege der Signalweiterleitung nach epiretinaler Stimulation 65
Zusammenfassung und Ausblick 71
Anhang 73
Literatur 78
Abbildungsverzeichnis 85
Curriculum Vitae 87
Veröffentlichungen 89
Danksagung 90
Author's Contributions 91
Eidesstattliche Erklärung 92

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µM	Mikromol
µV	Mikrovolt
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ARVO	The Association for Research in Vision and Ophthalmology
AZ	Amakrinezelle
BZ	Bipolarzelle
Bzw.	Beziehungsweise
Ca^{2+}	Calcium
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Cl^-	Chlor
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CO_2	Kohlenstoffdioxid
D-AP5	D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid
EAATs	excitatory amino acid transporter family
ELM	Äußere limitierende Membran (external or outer limiting membran)
EM Algorithmus	*Expectation-Maximization*-Algorithmus
Et al.	*Et alteri*
FELASA	Federation of Laboratory Animal Science Associations
GABA	gamma-aminobutyric acid
GCL	Ganglienzellschicht (ganglion cell layer)
Glu	Glutamat
GMP	Guanosinmonophosphat
GZ	Ganglienzelle
HZ	Hertz
HZ	Horizontalzelle
iGluR	ionotroper Glutamatrezeptor
ILM	Innere limitierende Membran (inner limiting membran)
INL	Innere Körnerzellschicht (inner nuclear layer)
IPL	Inner plexiforme Schicht (inner plexiform layer)

K^+	Kalium
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LFP	Lokale Feldpotenziale (local field potentials)
mA	Milliamper
MEA	Multielektrodenarray
mg	Milligramm
mGluR	metabotroper Glutamtrezeptor
min	Minute
mL	Milliliter
Na^+	Natrium
Na^+-Kanal	Natriumkanal
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NFL	Nervenfaserschicht (nerve fiber layer)
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
O_2	Sauerstoff
OCT	Optical coherence tomography
ONL	Äußere Körnerzellschicht (outer nuclear layer)
OPL	Äußere plexiforme Schicht (outer plexiform layer)
p	p-Wert, Signifikanzwert
Pa	Pascal
PDE	Phospodiesterase
PND (W, M)	*Post natal* Day(Week months; Tag, Woche oder Monat nach Geburt)
PR	Photorezeptor
PR	Photorezeptor
PSD	Leistungsdichtespektrum (Power-Spectral-Density)
PSTH	Peristimulus time histogram
RCS	Royal Colleges of Surgeons
RGZ	Retinale Ganglienzellen
rd	Retinal degeneration
RP	*Retinitis Pigmentosa*
RMP	Membranruhepotenzial
RPE	Retinales Pigmentepithel

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SED	Standardfehler (Standard Error of the Mean)
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio)
sog.	Sogenannt
vgl.	vergleiche
Wo.	Woche
Wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt den Einfluss der Photorezeptordegeneration auf die Signalweiterleitung in der degenerierten Retina. Die folgenden Ergebnisse stellen sowohl ein stark verändertes spontanes Spikeverhalten als auch lokale Feldpotenziale in den retinalen Ganglienzellen der degenerierten Royal Colleges of Surgeons (RCS) Ratten Retina dar. Die beschriebenen Experimente untersuchen, ob die Neuverschaltung in der äußeren Retina in Kombination mit spontaner Aktivität des inneren Netzwerks, ausgehend von AII Amakrinzellen, die Hauptakteure für die Induktion des veränderten spontanen Spikeverhaltens sowie der lokalen Feldpotenziale sind. Mit Hilfe pharmakologischer Blocker wird analysiert, ob Glutamat, $GABA_A$ und Gap Junctions vermittelte Signale eine Schlüsselrolle einnehmen.

Zusätzlich wird untersucht, ob es morphologische Veränderungen gibt. Wie die Ergebnisse zeigen, hat die Degeneration der Retina in der RCS Ratte entscheidenden Einfluss sowohl auf die Entwicklung des Glaskörpers als auch der versorgenden Blutgefäße. Die Folge sind Abschnürungen von Axonbündeln, wodurch es zu einer massiven Abnahme der neuronalen Spontanaktivität kommt. Dieser Prozess wird als Neovaskulisation bezeichnet.

Als weiterer Punkt wird die Stimulationsfähigkeit der degenerierten RCS-Rattenretina im Vergleich zur Stimulationsfähigkeit der gesunden Wistar-Rattenretina diskutiert. Dafür werden mittels epiretinaler Stimulation in der RCS Ratte drei Arten von Antwortmustern in den retinalen Ganglienzellen evoziert. Ich bezeichne diese Typen als direct-, delayed- und OFF-Antworten. Die direct- und delayed-Antwort-Typen sind unterteilt in Einzelspike, Einzelburst- und Bursty-Antworten. Mit Hilfe von pharmakologischen Blockern wird die Beteiligung der möglichen Signalvermittler identifiziert. Es zeigt sich, dass in Anwesenheit von Bicucullin weder OFF- noch delayed-Antworten messbar sind. Folglich haben GABAerge Signale, welche vorwiegend durch Amakrinzellen vermittelt werden, einen hohen Einfluss auf die Antwortmuster. Derartige Muster sind nicht in der Netzhaut gesunder Wistar-Ratten zu beobachten. Dies zeigt, dass das induzierte Retinal Remodeling einen starken Effekt auf die Signalverarbeitung in der inneren plexiformen Schicht hat und eventuell auch eine Änderung des Axons-Ruhemembranpotenzials hervorruft.

Summary

The present paper examines the influence of photoreceptor degeneration on signal transduction in a degenerated retina. The results reveal severe changes in spontaneous spike activity and local field potentials in the retinal ganglion cells of a degenerated retina of a Royal College of Surgeons (RCS) rat. The experiments describe whether the remodeling in the outer retina and the change in the spontaneous activity of the inner network emanating from AII amacrine cells are the main actors causing the changes in the spontaneous spike activity and local field potentials seen in the retinal ganglion cells. With the use of pharmacological blockers it is analyzed whether glutamate, $GABA_A$ and gap junction-mediated signals are involved.

Morphological changes are also observed. The results reveal that the degeneration of the retina of the RCS rat has a decisive influence on the development of both the vitreous body and the supplying blood vessels. It results in constrictions of axon bundles that lead to a massive decrease in neuronal spontaneous activity. This process is called neovasculation.

A further subject that is discussed is the ability of the degenerated retina of an RCS rat to be stimulated in comparison to that of a healthy retina of a Wistar rat. In the experiments on this subject, three response patterns are evoked in the retinal ganglion cells by means of epiretinal stimulation in the RCS rat. We refer to them as direct, delayed and OFF response patterns. The direct and delayed responses are divided into single spike, single burst and bursty responses. Pharmacological blockers were used to identify the signaling pathway involved. It was found that neither delayed nor OFF responses are measured in the presence of bicuculline. Consequently, GABAergic signals, which are primarily mediated by amacrine cells, have a high impact on these response patterns. These patterns are not observed in the retina of a healthy Wistar rat. This indicates that induced retinal remodeling has a strong effect on signal processing in the inner plexiform layer and may also cause a change in the axonal resting potential.

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie des Säugerauges

Das Auge (lat. oculus), auch Augapfel (Bulbus) genannt, ist ein paariges Sinnesorgan, das auf die Wahrnehmung von Lichtreizen spezialisiert ist. Es kann in der Augenhöhle (Orbita) über vier gerade und drei oder zwei schräge Augenmuskeln bewegt werden. Die Wand des Auges besteht aus drei Schichten (Abbildung 1). Die äußerste Gewebsschicht ist die feste Lederhaut (Sklera), welche von einer Epithelschicht (Konjunktiva, Bindehaut) ummantelt ist. Im Vorderabschnitt des Auges wird die Sklera zur transparenten, gefäßfreien Hornhaut (Cornea).

Die Hornhaut ist somit die äußerste Schicht des Augenvorderabschnitts, zu dem noch die Linse und die Regenbogenhaut (Iris) mit Pupille gehören. Die Pupillenweite bestimmt wie viel Licht auf die Netzhaut eintrifft. Sie wird geregelt durch ein Muskelpaar in der Iris, den M. sphincter pupillae und den M. dilatator pup. Bei heller Umgebung und somit viel einfallendem Licht verkleinert die Iris die Pupille und verhindert, dass man geblendet wird. Im umgekehrten Fall, also bei Dunkelheit, ist die Pupille maximal geöffnet. Anatomisch teilt die Iris den Vorderabschnitt in zwei Kammern: die vor der Iris liegende vordere Augenkammer und die dahinter liegende hintere Augenkammer. Beide Augenkammern sind mit Kammerwasser gefüllt, das vom Ziliarkörper abgeben wird.

Der Ziliarkörper ist über die sogenannten Zonulafasern mit der Linse verbunden und dient ihrer Aufhängung. Mit Hilfe der Linse können Gegenstände in unterschiedlichem Abstand fokussiert werden. Ihre Brechkraft wird durch Verformung angepasst wodurch das Nah- und Fernsehen ermöglicht wird.

Die äußerste Schicht des hinteren Augenabschnitts bildet die Sklera, welche die mit Blutgefäßen durchzogene Aderhaut (Choroidea) bedeckt. Die innerste Gewebsschicht der Augenhülle ist die lichtempfindliche Netzhaut (Retina), welche im nicht lichtempfindlichen Bereich (Ora serrata) mit der Choroidea verbunden ist. Der Innenraum des hinteren Augenabschnitts wird von einer gelartigen, viskösen Substanz, dem Glaskörper, ausgefüllt [10, 32].

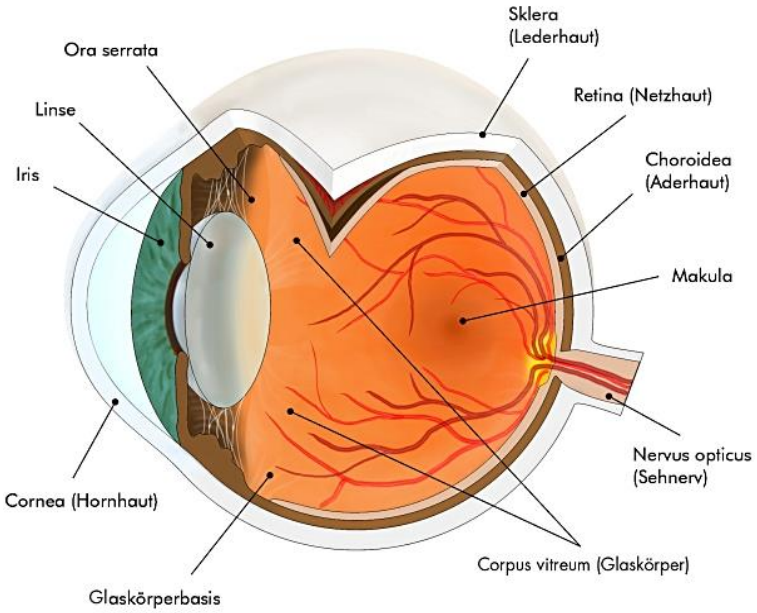

Abbildung 1: Anatomie des menschlichen Auges. Der hintere Teil des Auges wird von der Sklera ummantelt. Unter ihr liegt die Choroidea und im Augeninneren die Retina. Die Photorezeptoren der Retina sind für die Wahrnehmung des eintreffenden Lichts verantwortlich. Der Bereich mit der höchsten Dichte an Zapfen-Photorezeptoren ist die Makula (Erläuterung zum Aufbau siehe Text). Die Retina beginnt anterior mit der Ora serrata. Der Nervus opticus verbindet die Retina mit dem Gehirn. Der Vorderabschnitt des Auges wird von der Cornea umhüllt. Iris, Pupille und Linse gehören ebenfalls zum Vorderabschnitt. Bis auf den mit Kammerwasser gefüllten Vorderabschnitt ist das Auge mit dem durchsichtigen viskösen Glaskörper gefüllt. (Quelle: http://ocunet.de/patienten/auge.html).

1.2 Aufbau der Säugernetzhaut

Die Retina dient der Aufnahme, Verarbeitung und Weiterleitung von Lichtinformationen zu den höheren Verarbeitungszentren des Gehirns. Sie grenzt innen an den Glaskörper und außen an das retinale Pigmentepithel (RPE). Die Zellen des RPE bilden die Blut-Retina-Schranke und sind essentiell für die Regeneration des Sehpigments. Die Zellen des RPE umschließen mit feinen Zellfortsätzen, den Mikrovilli, die Photorezeptorzellen (PR), welche die äußerste Zellschicht der Netzhaut bilden und mit Hilfe ihres Sehpigments Lichtquanten detektieren können. Man unterscheidet zwei Typen von Photorezeptorzellen, die Stäbchen, die für das skotopische Sehen verantwortlich sind, und die für das photopische Sehen zuständigen Zapfen. Beide können aufgrund ihrer Morphologie in ein äußeres Segment mit den lichtempfindlichen Sehpigmenten (Rhodopsin oder Stäbchen-Opsine für Stäbchen und Photopsine oder Zapfen-Opsine für Zapfen) und in das innere Segment, welches die Mitochondrien und den Zellkern enthält, unterteilt werden (siehe Abbildung 2:

Schematischer Aufbau eines Stäbchens (Rod) und Zapfen (Cone). Zwischen den beiden Segmenten liegt die äußere limitierende Membran (external limiting membrane, ELM). Die Kerne der Photorezeptoren bilden die äußere Körnerschicht (outer nuclear layer, ONL) [54].

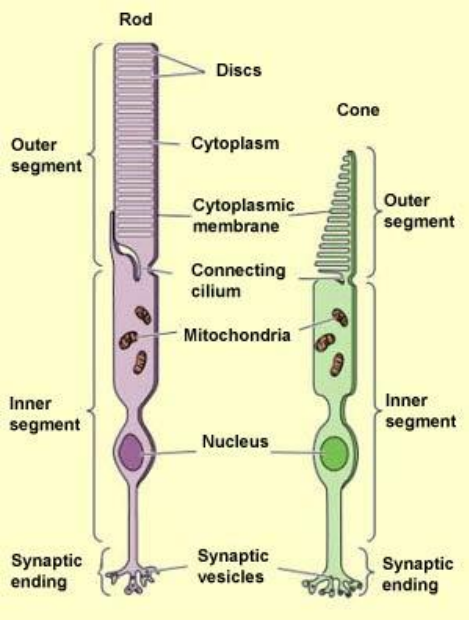

Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Stäbchens (Rod) und Zapfen (Cone). Beide Zellen besitzen ein Außensegment (outer segment), in deren Membran (cytoplasmic membrane) bzw. Discs bei Stäbchen sich die lichtabsorbierenden Stäbchen- bzw. Zapfen-Opsine befinden. Im Innensegment (inner segment) sitzen die Mitochondrien und der Zellkern (Nucleus). Die Nuclei der Photorezporen bilden die äußere Kernschicht (outer nuclear layer) der Retina. In den synaptischen Enden der Photorezeptoren (synaptic ending) befinden sich die mit Neurotransmittern beladenen synaptischen Vesikel (synaptic vesicles) (Quelle: http://thebrain.mcgill.ca/flash/d/d_02/d_02_m/d_02_m_vis/d_02_m_vis.html).

Die synaptischen Enden der Lichtsinneszellen befinden sich in der äußeren Plexiformenschicht (outer plexiform layer, OPL; siehe Abbildung 3). Hier werden die Lichtsignale in einem ersten Schritt verarbeitet und die Signale an die Dendriten der angrenzenden Bipolar- (bipolar cells, BC) und Horizontalzellen (horizontal cells, HC) weitergegeben (Erläuterungen zur Signalverarbeitung siehe Abschnitt 1.3). Der Bereich, in dem die Kerne der Bipolar- und Horizontalzellen zu finden sind, wird als innere Körnerschicht (inner nuclear layer, INL) bezeichnet. Auch die Zellkerne der Müllerzellen und der Amakrinen Zellen (amacrine cells, AC) befinden sich in der inneren Körnerschicht. Die Müller Zellen fungieren als Stütz- und Versorgungszellen und durchziehen die gesamte Retina. Die Synapsen zwischen Bipolar-, Amakrinen- und Ganglienzellen (ganglion cells, GC) bilden die innere Plexiformenschicht (inner plexiform layer, IPL). Die Somata der Ganglienzellen liegen in der Ganglienzellschicht (ganglion cell layer, GCL). Ihre Axone bilden die retinalen Nervenfaseren, welche in der Nervenfaserschicht (nerve fiber layer, NFL) zur Papille verlaufen (Blinder Fleck, Discus nervi optici) und sich dort zum Sehnerv bündelt. Der Sehnerv ist die neuronale Verbindung zwischen Auge und Gehirn. Die Retina wird vom Glaskörperraum abgegrenzt durch die innere limitierende Membran (inner limiting

membran, ILM) , die von den lateral verknüpften Müllerzellendfüßen und assoziierten Basalkomponenten gebildet wird [55, 56].

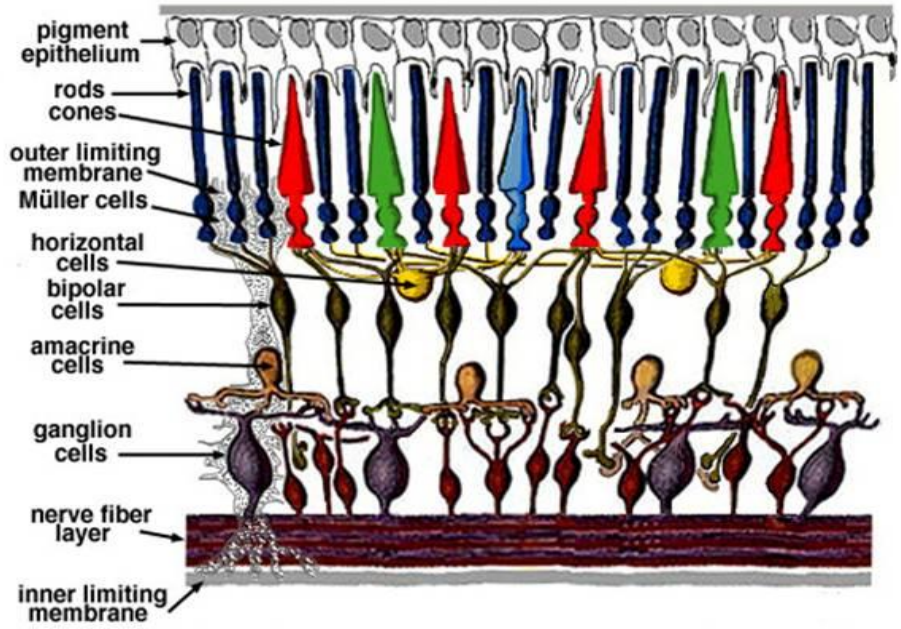

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Retina. Erläuterung zu den einzelnen Schichten siehe Text. (Quelle: http://webvision.med.utah.edu/imageswv/schem.jpeg)

1.3 Signalverarbeitung und Weiterleitung in der Retina

Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, werden Lichtquanten des einfallen Umgebungslichts von den Photorezeptoren aufgefangen und wie folgend beschrieben, über mehrere Schritte in ein elektrisches Aktionspotenzial umgewandelt. Im ersten Schritt werden die Sehpigmente der Photorezeptorzellen von den Lichtquanten angeregt. Die Sehpigmente sind in den Zapfen und den Stäbchen unterschiedlich aufgebaut, wodurch sie Licht unterschiedlicher Wellenlänge registrieren können. Grundsätzlich bestehen die Sehpigmente immer aus dem Carotinoid Retinal, das an ein Protein der Transmembranproteinfamilie Opsin gekoppelt ist. Diese Proteine befinden sich bei den Zapfen in der Plasmamembran des Rezeptors, während das Sehpigment der Stäbchen in Membranbläschen, sog. Discs, implementiert ist (siehe Abbildung 4). Die Struktur des Opsins definiert letztlich das Absorptionsspektrum des Sehpigments. Der zugrundeliegende biochemische Mechanismus aller Pigmente ist aber grundsätzlich gleich und soll hier am Beispiel des Stäbchenpigments Rhodopsin verdeutlicht werden [67].

Das einfallende Licht isomerisiert das Retinal, das sich daraufhin vom Opsin löst und damit eine Signalkaskade auslöst. Durch die Trennung wird das Opsin aktiv und aktiviert seinerseits das G-Protein Transducin, welches wiederum das Enzym Phosphodiesterase (PDE) aktiviert. Im nächsten Schritt wird durch die PDE cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) zu 5‘-Guanosinmonophosphat (GMP) hydrolysiert, wodurch die die Membran durchziehenden Natriumkanäle (Na^+-Kanäle) geschlossen werden. Folglich hyperpolarisiert die Membran und es kommt zu einer verminderten Ausschüttung des in den Vesikeln konzentrierten Neurotransmitters Glutamat (Glu) an den synaptischen Enden (siehe Abbildung 4).

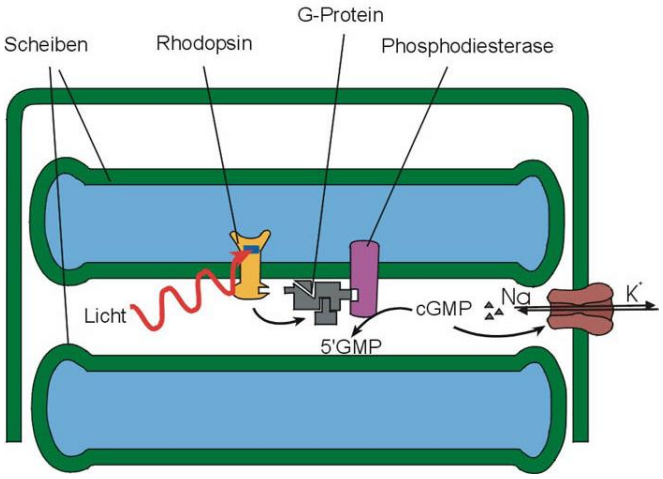

Abbildung 4: Phototransduktion in der Discmembran eines Stäbchens. Rhodopsin wird durch einen Lichtreiz aktiviert und aktiviert selbst ein G-Protein. Dies induziert die Hydrolyse von cGMP zu 5’GMP durch die Aktivierung der Photodiesterase. Aufgrund des steigenden 5’GMP-Gehalts werden letztlich die Na^+-Kanäle in der Membran geschlossen. (Quelle: http://www.neurobiologie.fu-berlin.de/gruenewald/grundkurs/Phototransduktion.jpg)

Das Lichtsignal wird also als elektrisches Signal über die Zellmembran weitergegeben und als chemisches Signal über den Neurotransmitter Glutamat von Neuron zu Neuron über den synapthischen Spalt weitergeleitet (siehe Abbildung 5). Die Glutamatrezeptoren des postsynaptischen Neurons registrieren die Veränderung in der Neurotransmitterkonzentration. Dies führt zu einer veränderten Permeabilität der Zellmembran für Natrium, Kalium, Calcium und weiteren Ionen, wodurch es zu einer Hyperpolarisation oder Depolarisation kommt.

Glutamatrezeptoren werden aufgrund ihrer molekularen Zusammensetzung in ionotrope (iGluR) oder metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) unterteilt. Die Gruppe der iGluR umfasst die AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)-, NMDA (N-

methyl-D-aspartic acid)- und Kainat-Rezeptoren. Neben Glutamat sind diese Rezeptoren von ihren Namen ableitend hochaffin für die Glutamat-Agonisten AMPA, NMDA und Kainat. Auch wenn sie alle zu den iGlu-Rezeptoren zählen, besitzen sie unterschiedliche selektive Eigenschaften. So handelt es sich beim NMDA-Rezeptor um einen nichtselektiven Kationenkanal, während die anderen für den Transport von Natrium und Kalium durch die Membran verantwortlich sind. Bei allen iGluR bindet der Ligand direkt an den Rezeptor wodurch der Kanal geschlossen oder geöffnet wird.
Bei den mGluR handelt es sich nicht um einen Kanal sondern um ein Transmembranprotein, welches an ein G-Protein gekoppelt ist. Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Aktivierung des G-Proteins und zur Induktion einer intrazellulären Signalkaskade, die dann zur Öffnung von Transmembrankanälen führt. Bekannt sind acht Rezeptoren die in drei Gruppen unterteilt sind [34, 84].

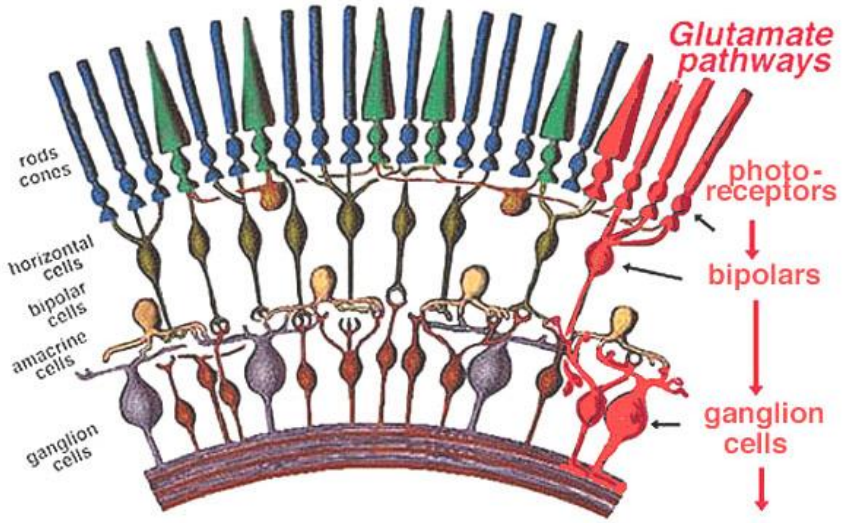

Abbildung 5: Glutamat vermittelter Signalweg der Retina.
(Quelle: http://webvision.med.utah.edu/imageswv/GLU13.jpeg).

Zusammenfassend führt die Bindung von Glutamat zu einem veränderten Membranpotential und folglich zu einer elektrischen Signalweiterleitung. Zusätzlich zu den Glutamatvermittelten erregenden (exzitatorischen) Signalen gibt es inhibierende Signale, die kurzzeitig eine Erregung des Neurons verhindern. Die Inhibition der Zelle wird durch die Neurotransmitter Gamma Amino Buttersäure (gamma-aminobutyric acid, GABA) und Glycin vermittelt. In der Retina sind GABA-Rezeptoren hauptverantwortlich für inhibierende Signale.

GABA-Rezeptoren werden ebenfalls in ionotrope ($GABA_A$-Rezeptoren) und metabotrope ($GABA_B$-Rezeptoren) Rezeptortypen unterteilt. Bei den GABA-Rezeptoren führt die Ligandenbindung typischerweise zu einer Hyperpolarisation des Neurons. Dies wird bei $GABA_A$-Rezeptoren durch die erhöhte selektive Permeabilität für Chloridionen in die Zelle und bei $GABA_B$-Rezeptoren durch einen gesteuerten Kalium-Ausstrom hervorgerufen. GABA-Rezeptoren findet man in der Retina primär in den Axonenden der Amakrinen Zellen.
Der von den Photorezeptoren aufgenommene Lichtreiz wird, nachdem die Signale von den Horizontal-, Bipolar- und ggf. Amakrinen Zellen prozessiert wurden, auf die Ganglienzellen übertragen und typischerweise zum Gehirn weitergeleitet [57, 62].

1.4 Retinale Ganglienzellen

Die Dendriten der Ganglienzellen befinden sich in der IPL und empfangen Signale von den AZ und BZ. Die Erregung der Ganglienzellen durch Glutamat führt zur Depolarisation der Ganglienzellmembran. Ist ein bestimmter Schwellwert erreicht, wird nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip ein Aktionspotential (Spike) ausgelöst und über das Axon der Ganglienzelle weitergeleitet. Allerdings erzeugen Ganglienzellen nicht nur aufgrund eines Lichtreizes Spikes. Sie besitzen eine sogenannte Spontanaktivität. Das bedeutet, sie generieren Spikes und leiten diese an das Gehirn weiter ohne dass vorher ein Lichtreiz die Signalkaskade der Retina aktiviert hat. Das Gehirn separiert in den höheren Zentren die Spontanaktivität von lichtinduzierten Signalen[35, 36].
Wie bereits erklärt, kann die Bindung des Liganden auch zu einer Hyperpolarisation und somit zu einer Hemmung der Aktivität führen. Da die retinalen Ganglienzellen ihr Signal in Form von Aktionspotentialen weitergeben, erkennt man ein exzitatorisches Signal an einer temporär erhöhten Aktivität (erhöhte Spikerate) und ein inhibitorisches Signal an einer verminderten oder einem Aussetzen der Aktivität. Ganglienzellen, welche inhibitorische Signale weiterleiten, werden als OFF-Zellen und GZ, die exzitatorische Signale weiterleiten, als ON-Zellen bezeichnet (siehe Abbildung 6 [49]).

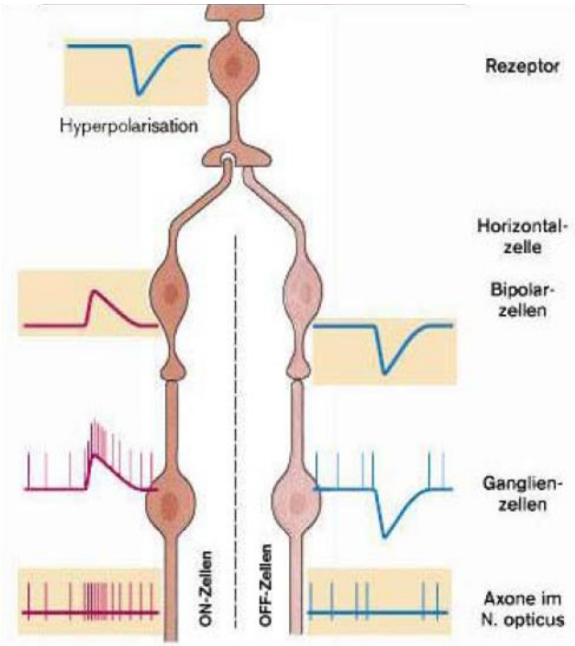

Abbildung 6: Signalverarbeitung des Zapfensignalwegs. Der registrierte Lichtreiz induziert eine Hyperpolarisation der Zapfenmembran. Dies führt entweder zur Depolarisation der BC (exzitatorisches Signal, ON-Zelle) oder zur Hyperpolarisation (inhibitorisches Signal, OFF-Zelle). Das exzitatorische Signal ruft eine erhöhte Spikeaktivität der Ganglienzelle hervor, während das inhibitorische Signal zu einem Aussetzen führt.
(Quelle: http://www.bioboard.de/topic,2375,-neuronale-verschaltung-der-retina%3A-laterale-hemmung-undamp%3B-co.html)

1.5 Pharmakologische Modifikation der retinalen Signalverarbeitung

Auch wenn die Rezeptoren der retinalen Neuronen auf die Bindung ihrer Liganden spezialisiert sind, gibt es weitere Bindungspartner, sogenannte Antagonisten, die ebenfalls an den Rezeptor binden können. Anders als der eigentliche Ligand führt die Bindung des Antagonisten nicht zu einer erhöhten oder herabgesetzten Aktivität sondern blockiert die Bindestelle, verhindert so die Bindung eines Liganden und somit die Signalweiterleitung. In dieser Arbeit wurden folgende Antagonisten verwendet.

1.5.1 D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5) und 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX)

Um die Signalweiterleitung durch die ionotropen Glutamatrezeptoren zu unterbrechen wurden mit Hilfe von CNQX und D-AP5 die ionotropen exzitatorischen Signalwege in der Retina blockiert. Diese beiden Glutamat-Antagonisten inhibierten die Signalweiterleitung zwischen den Bipolar-, Amakrinen- und Ganglienzellen [84].

1.5.2 Bicucullin

Einer der wichtigsten hemmenden Neurotransmitter ist GABA (siehe 1.4). In der Retina befinden sich GABA-Rezeptoren vor allem in den Amakrinenzellen und an den Axonenden

der Bipolarzellen. Mit Hilfe von Bicucullin, einem GABA Antagonisten, kann die Signalvermittlung über $GABA_A$-Rezeptoren gehemmt werden [62, 7, 49].

1.6 „Retinal remodeling“

Retinitis pigmentosa (RP) ist eine neurodegenerative Krankheit in deren Verlauf die Photorezeptoren der Retina absterben. Es handelt sich bei RP um eine Gruppe von Erkrankungen, die durch unterschiedliche genetische Defekte charakterisiert ist. Diese Defekte führen in der Regel zunächst zum Absterben der Stäbchen. Im weiteren Verlauf degenerieren auch die Zapfen und der Patient erblindet [26, 3, 20]. Untersuchungen an Tiermodellen mit einer genetisch induzierten Netzhautdegeneration zeigten, dass das Absterben der Photorezeptoren Umbauprozesse in der Netzhaut hervorruft, welche als „retinal remodeling“ bezeichnet werden. Diese Veränderungen finden vorwiegend in der inneren Körnerschicht statt. Besonders deutlich sind die starken morphologischen Veränderungen der Bipolarzellen, deren dendritischen Enden sich scheinbar unkontrolliert in der Retina verteilen. Im weiteren Verlauf kommt es auch zur Degeneration der Horizontalzellen. Die zum RPE hin gewandten Enden der Müllerzellen bilden schließlich eine neue Schicht zwischen INL und RPE. Das Remodeling scheint jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Morphologie der verbleibenden Neurone nahe der IPL und in der GCL zu haben [12, 42, 40] (siehe Abbildung 7).

Zusätzlich zu den morphologischen Zellveränderungen wurde eine erhöhe Spontanaktivität beobachtet. Hierbei handelt es sich zumeist nicht um Einzelspikes, sondern um Bursts von Spikes. Diese abgewandelte Spontanaktivität ist ein Hinweis auf eine veränderte Signalverarbeitung zwischen der INL und GCL, evtl. auch ausgelöst durch Umbauprozesse der synaptischen Verknüpfungen in der IPL [58].

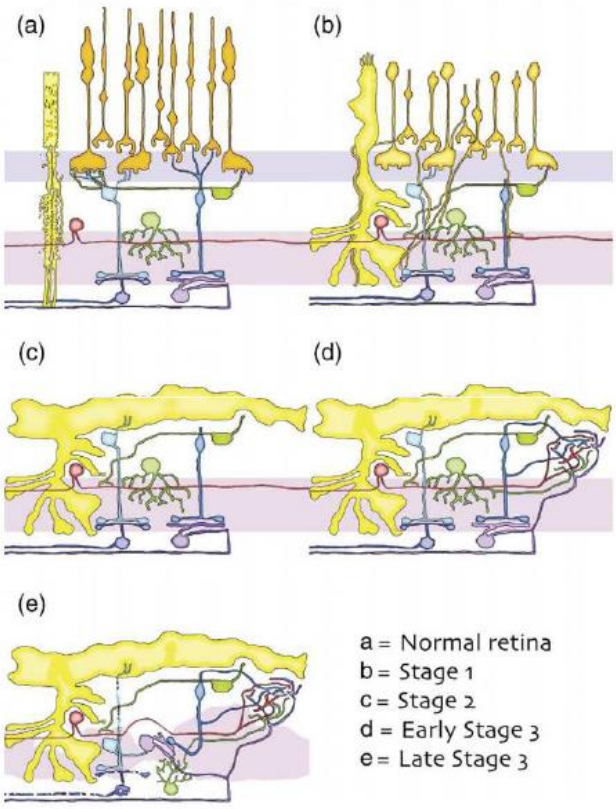

Abbildung 7: Retinal remodeling. Ausgelöst durch die Photorezeptordegeneration werden Umbauprozesse in der Retina hervorgerufen. (a) Gesunde Retina. (b) Stadium 1: Die PR degenerieren und die Synapsen der ONL beginnen sich aufzulösen. (c) Stadium 2: Müllerzellen bilden eine neue Schicht zwischen INL und RPE. (d) Frühes Stadium 3: Die Dendriten der Bipolar und Horizontalzellen verteilen sich scheinbar orientierungslos innerhalb der Retina. (e) Spätes Stadium 3: Die Normalen synaptischen Verbindungen der IPL sind nicht mehr vorhanden. Die Neurone der INL haben sich morphologisch stark verändert und ihre synaptischen Enden verteilen sich willkürlich in der INL. (Quelle: Retinal remodeling during retinal degeneration, B. W. Jones and R. E. Marc, 2005)

1.7 Tiermodelle mit einer genetisch induzierten Photorezeptordegeneration

Eines der meist untersuchten Tiermodelle mit genetisch induzierter Photorezeptordegeneration ist die retinal degeneration (*rd*)1 Maus. Die Degeneration in diesem Tiermodell beginnt unmittelbar nach der Geburt und somit bevor die Retina voll entwickelt ist. In diesem Model konnten alle Stadien des retinal remodeling beobachtet werden (siehe 1.6). In elektrophysiologischen Untersuchungen der retinalen Ganglienzellen wurden Oszillationen in der Spontanaktivität mit einer Frequenz von 10 Hz gemessen. Diese langsamen Feldpotentiale, sog. slow waves, treten oft, aber nicht immer, gekoppelt mit Burst-Aktivität auf.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch in der *rd*10 Maus detektiert. In diesem Tiermodell beginnt die Netzhaut-Dystrophie erst wenn die Retina vollständig entwickelt ist (etwa PND 20) [12]. Ebenso wie in der *rd1* wurde auch in den GZ der *rd10* Maus eine erhöhte burstartige Spontanaktivität sowie langsam oszillierende slow waves beobachtet. Jedoch beträgt in diesen Tieren die Frequenz etwa 5 Hz [30, 29, 61, 74]. Offensichtlich hat der aufgrund der

Photorezeptordegeneration induzierte Umbauprozess in der Netzhaut (remodeling) einen starken Einfluss auf die Spontanaktivität der retinalen Ganglienzellen.

Ein weiteres Tiermodell mit genetisch induzierter Photorezeptordegeneration ist die Royal College of Surgeons (RCS) Ratte [23]. In diesem Tier beginnt, vergleichbar zur *rd10* Maus, die Degeneration der Photorezeptoren erst nachdem die Retina voll entwickelt ist (etwa PND20). Anders als in den *rd* Mäusen beeinflusst der genetische Defekt nicht direkt die Funktion der lichtempfindlichen Sehsinneszellen, sondern induziert deren Absterben indirekt über die Zellen des RPE. Hierbei handelt es sich um eine Punktmutation im *MERTK*-Gen. Aufgrund dieser genetischen Anomalie wird die Phagozytose von Zellmembranresten der Photorezeptoren verhindert. Es kann dadurch keine Erneuerung der Stäbchen und Zapfen stattfinden, was letztlich zum Absterben der Zellen führt [21, 23, 80].

1.8 Elektrische Stimulation und retinale Implantate

Bis heute gibt es für RP Patienten keine effektive Behandlungsmethode. Netzhautprothesen, die die Retina mit Hilfe von Elektroden elektrisch stimulieren, können erblindeten Patienten jedoch wieder einen Seheindruck vermitteln. Die meisten Retina-Implantate registrieren mit Hilfe eines Lichtdetektors, beispielsweise einer Kamera, die einfallenden Lichtquanten und wandeln diese in elektrische Impulse um. Dabei werden nicht alle Elektroden gleichzeitig stimuliert, sondern nur die zur Abbildung erforderlichen angesteuert [37, 43, 63].
Um die optimalen Stimulationsparameter sowie Elektrodenkonfigurationen und Materialien zu finden, wurden in den letzten zehn Jahren verschiedene Studien zur elektrischen Stimulation der Retina durchgeführt. Ein Ansatz, bei dem die Stimulationselektrode zwischen Pigmentepithel und Netzhaut platziert wird, bezeichnet den subretinalen Ansatz. Bei dieser Konfiguration soll der verbliebene neuronale Schaltkreis der degenerierten Retina zur Signalverarbeitung genutzt werden. Mit dieser Konfiguration ist es mehreren Gruppen gelungen, Aktionspotenziale in Ganglienzellen zu evozieren [38, 85].
Ein weiterer Ansatz ist die Platzierung der Stimulationselektroden auf der GZS. Bei diesem epiretinalen Ansatz werden die Ganglienzellen direkt mit elektrischen Impulsen stimuliert [81, 24, 71]. Somit werden beim epiretinalen Ansatz die direkt unter der Elektrode befindlichen GZ stimuliert, während beim subretinalen Ansatz die Stimulation der GZ indirekt durch die Stimulation der vorgeschalteten Neurone geschieht.

Forschergruppen ist es gelungen sowohl epiretinale als auch subretinale Netzhauprothesen bei erblindeten RP-Patienten zu implantieren. Interessanterweise konnte mit beiden Ansätzen den blinden Patienten ein Seheindruck vermittelt werden. Hierbei handelt es sich allerdings um schemenhaftes Kontrastsehen, das nicht vergleichbar ist mit dem Farbsehen gesunder Menschen [60, 1, 68].
Um eine bessere Umgebungsvermittlung zu erzeugen, sind weitere Studien über die Eigenschaften der degenerierten Retina und die Erzeugung von elektrischen Reizen erforderlich. Über die Stimulationseigenschaften und die Signalverarbeitung in der degenerierten Retina ist bislang nur wenig bekannt.

1.9 Ziel der Arbeit

Wie in 1.8 beschrieben ist es essentiell, mehr über die Grundlagen der Signalverarbeitung und die elektrophysiologischen Eigenschaften in der degenerierten Retina zu erfahren, um neue Therapieansätze zu entwickeln bzw. bestehende zu optimieren. Daher werden im Rahmen dieses Promotionsprojekts die elektrophysiologischen Eigenschaften der retinalen Ganglienzellen in der blinden Royal College of Surgeons Ratte untersucht.
Mittels Multielektrodenarrays (MEA) werden in einem epiretinalen Ansatz zum einen die Spontanaktivität zahlreicher Ganglienzellen zeitgleich detektiert und zum anderen einzelne Ganglienzellen elektrisch stimuliert. Weiterführend werden Untersuchungen zur neuronalen Verschaltung und der elektrisch induzierten Signalkaskade in der degenerierten Retina mit Hilfe von synaptischen Blockern durchgeführt.

Ziel der Arbeit ist es, Anzeichen zu ermitteln, ob die veränderte Spontanaktivität (siehe 1.6) auch eine Umstrukturierung der bekannten Wege der Signalweiterleitung bedeutet. Gut dokumentiert sind an der Maus die beschriebenen strukturellen Veränderungen des Remodelings. Offen bleibt jedoch die Frage, ob es auch gleichzeitig zu einer veränderten Membranrezeptorzusammensetzung kommt. Unsere Vermutung ist, dass dies der Fall ist, und sowohl das induzierte Remodeling als auch eine veränderte Membranrezeptorzusammensetzung einen entscheidenden Einfluss auf die Stimulationseffizienz und Spontanaktivität haben. Folglich soll auch die Frage untersucht und diskutiert werden, ob sich Stimulationsparadigmen, die an gesunden Tieren entwickelt

werden, eins zu eins auf die degenerierte Retina übertragen lassen oder ob es zielführender ist, Stimulationsparadigmen an Retinae erblindeter Tier zu etablieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Alle Tierversuche wurden nach Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Aktenzeichen 84-02.04.2011.A386) sowohl in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz als auch nach den Richtlinien der Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) durchgeführt. In dieser Studie wurden gesunde Wistar Ratten und als Netzhautdegenerationsmodell RCS Ratten verwendet. Die Wistar Ratten wurden bei Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bestellt und anschließend im Institut für Versuchstierkunde sowie Zentrallaboratorium für Versuchstierkunde gehalten. Die RCS Ratten wurden im genannten Institut gezüchtet. Alle Tiere wurden nach den Richtlinien der Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA) und dem deutschen Tierschutzgesetz mit freien Zugang zu Futter und Wasser in einem 12:12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus gehalten.

2.1.2 Chemikalien, Medium und pharmakologische Stoffe

Bezeichnung	Hersteller
Ames Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Poly-D-Lysin	Sigma -Aldrich, St. Louis, MO, USA
Carbogen (95% O_2, 5% CO_2)	Linde AG, Pullach, Deutschland
Isofluran	Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Bicucullin	Tocris Bioscience, Bristol, UK
D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
6-Cyano-7-nitrochinoxalin-2,3-dion (CNQX)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Instrumente

Bezeichnung	Hersteller
Petri Schalen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Skalpell	Feather Safety Razor Co., Ltd, Osaka, Japan
Scheren, gerade	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Schere, gebogen	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Schere (Dekapitation)	Bochem Instrumente GmbH, Weilburg, Deutschland
15 mL und 50 mL Gefäße	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Kanülen 20G x 1 1/2“	Tyco, Neuhausen am Rheinfall, Schweiz
Pinzette	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Colibri Pinzette	Bernhard Hermle GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Filterpapier	MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland
2 mL Spritze	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn, Deutschland
Nitrozellulose, Optitran®	Whatman, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

2.1.4 Software

Bezeichnung	Hersteller
MC_RACK 4.5.10	Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany
MC_Stimulus 3.4.4	Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany
OfflineSorter 3.3.2	Plexon, Dallas, TX, USA
NeuroExplorer 4.126	Nex Technologies, Madison, AL, USA
GraphPad Prism 6.03	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
Excel 2007	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
GIMP 2.6.11	The GIMP Team
OriginPro 9.1	OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA

2.1.5 Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Bemerkung
MEAs	Qwane Biosciences SA, Lausanne, Schweiz	60 3D-Platinelektroden Anordnung: 8x8 Abstand Zentrum-Zentrum: 200 µm Elektrodendurchmesser: 40 µm
MEA2100-System	Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Deutschland	Mit integriertem Verstärker und Stimulator
Perfusionssystem: VC^3-4C	ALA Scientific Instruments, Inc., Farmingdale, NY, USA	
Begasungssystem: Bubbler-4	ALA Scientific Instruments, Inc., Farmingdale, NY, USA	
Abflusspumpe: MINI PULS 3	Gilson, Inc., Middleton, WI, USA	
Stereomikroskop: Stemi 1000	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	
Plasmasystem: Femto	Diener electronic GmbH + Co. KG, Ebhausen, Deutschland	
Vakuumpumpe für Plasmasystem	Pfeiffer Vacuum GmbH, Asslar, Deutschland	
Faradayscher Käfig Glaszylinder	Uk Aachen Werkstatt Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön, Deutschland	Spezialanfertigung

2.2 Methoden

2.2.1 Ansetzen des Mediums

2.2.1.1 Ames

Frisches Ames Medium (siehe 2.1.2) wurde unmittelbar vor dem Experiment angesetzt. Hierfür wurden zuerst 1,9 mg $NaHCO_3$ (siehe 2.1.2) in 900 mL demineralisiertem und mit CO_2 begastem H_2O gelöst. Anschließend wurden 8,8 mg Ames Pulver in der $NaHCO_3$-Lösung bei RT gelöst und mit demineralisiertem H_2O auf 1 L aufgefüllt. Während des Experiments wurde das Ames Medium bei RT gelagert. Überschüssiges Medium wurde nach dem Experiment für höchstens eine Woche bei 4 °C gelagert. Älteres Medium wurde verworfen.

2.2.1.2 Pharmakologische Lösungen

Alle verwendeten pharmakologischen Stoffe wurden in Pulverform geliefert und entsprechend der Herstellerangaben gelagert (siehe auch 2.1.2). Ihr Einfluss auf die retinale Signalverarbeitung ist unter 1.5 erläutert.
Vor der experimentellen Verwendung wurde von jedem pharmakologischen Stoff eine 1 mM Stocklösung hergestellt. Hierzu wurde das Pulver in Ames Medium gelöst. Jeweils 5 mL der Stocklösung wurden in 15 mL Gefäße überführt und bis zum Ansetzen der finalen Lösung bei -4 °C im Dunkeln gelagert. Generell wurden die Versuchslösungen am Versuchstag angesetzt. War nach einem Experiment überschüssige fertige Lösung vorhanden, wurde diese bei -4 °C gelagert und beim nächsten Experiment verwendet. In diesem Fall wurde die Lösung am Versuchstag bei RT aufgetaut und ggf. gerührt.

Für 100 mL einer 30 µM Bicucullin-Lösung wurden 3 mL der 1 mM Stocklösung mit 97 mL Ames Medium vermischt und während des Experiments bei RT gelagert.

Für den CNQX/D-AP5-Mix mit einer Konzentration von jeweils 25 µM, wurden von jeder Stocklösung 2,5 mL mit 95 mL Ames-Medium vermischt und während des Experiments bei RT gelagert.

Für den Cocktail aus CNQX, D-AP5 und Bicucullin (Konzentrationen: CNQX und D-AP5 jeweils 25 µM, Bicucullin 30 µM) wurden jeweils 2,5 mL CNQX und D-AP5 Stocklösung, sowie 3 mL

Bicucullin Stocklösung mit 92 mL Ames Medium vermischt und während des Experiments bei RT gelagert.

2.2.2 Enukleation und Präparation der Retina

Die Versuchstiere wurden für eine Stunde dunkel adaptiert. Anschließend wurde das Tier getötet und die Netzhaut unter Rotlicht und bei RT präpariert. Alle Tiere wurden mit Isofluran (siehe 2.1.2) narkotisiert. Dazu wurde der Boden eines Glaszylinders (siehe 2.1.5) mit Cellulose (siehe 2.1.3) bedeckt. Das flüssige Isofluran wurde auf die Cellulose geträufelt. Der Deckel wurde geschlossen, damit sich der Innenraum des Zylinders mit Isoflurangas füllen konnte. Anschließend wurde das Versuchstier in den Zylinder gesetzt und das Gefäß verschlossen. Der Verlauf der Narkose wurde ständig visuell überwacht. Sobald das Tier in tiefer Narkose war, wurde es aus dem Zylinder geholt und mit einer Schere (siehe 2.1.3) enthauptet. Direkt im Anschluss wurden die Augen mit einer gebogenen Schere (siehe 2.1.3) aus der Augenhöhle entnommen und in eine Petrischale mit Carbogen (siehe 2.1.2) gesättigtem Ames Medium überführt. Die Augen wurden unter einem Stereomikroskop (siehe 2.1.5) mit zwei feinen Pinzetten fixiert (siehe 2.1.3) und mit einem Skalpell (Nr. 11, siehe 2.1.3) am Limbus geöffnet. Mit einer geraden Schere (siehe 2.1.3) wurde am Limbus entlang geschnitten und der Vorderabschnitt mit Linse vom Bulbus getrennt. Der Bulbus wurde mit einer Pinzette fixiert und der Glaskörper mit einer Colibri-Pinzette (siehe 2.1.3) entnommen. Danach wurde der Bulbus mit einem Skalpell (Nr. 21) in der Mitte geteilt. Um letztlich die Retina zu isolieren, wurde die Bulbushälfte mit einer feinen Pinzette an der Sklera gehalten und die Retina vorsichtig mit einer Colibri-Pinzette an der Peripherie vom RPE gelöst. Anschließend wurde die Retina sehr vorsichtig mit der Colibri-Pinzette vollständig vom RPE geschabt.

2.2.3 Vorbereitung des MEA-Setups und des MEA2100 System

Um Störsignale zu minimieren, befand sich das MEA2100 System sowie alle Teile des Perfusions- und Abflusssystems innerhalb eines Faradayschen Käfigs (siehe 2.1.5 und Abbildung 8). Das Perfusionssystem verfügt über vier Behälter für Medien. Folglich können in einem Experiment bis zu vier unterschiedliche Medien in die Kammer des MEAs (siehe Abbildung 8 und 2.1.5) geschleust werden. Zusätzlich verfügt jeder Behälter über eine separate Carbogenbegasung. Jeder Behälter wurde über einen Schlauch, welcher in ein

Sperrsystem (siehe 2.1.5) eingespannt wurde, mit einer Kanüle (siehe 2.1.3) verbunden. Die freie Kanülenspitze wurde mit Hilfe eines Magneten knapp über dem Boden des MEAs fixiert. Die Zuflussbehälter des Perfusionssystems wurden mit 50 mL des angesetzten Mediums gefüllt. Die Flussgeschwindigkeit wurde mittels einer Stellschraube am Schlauch auf 3-4 mL/s Medium eingestellt.

Das Abflusssystem des MEA-Systems besteht aus einer Pumpe, welche die Abflusskanüle, die an der Oberkante der MEA-Kammer sitzt, mit dem Abflussbehälter verbindet. Die Pumpgeschwindigkeit für den Abfluss wurde der Perfusionsgeschwindigkeit angepasst.

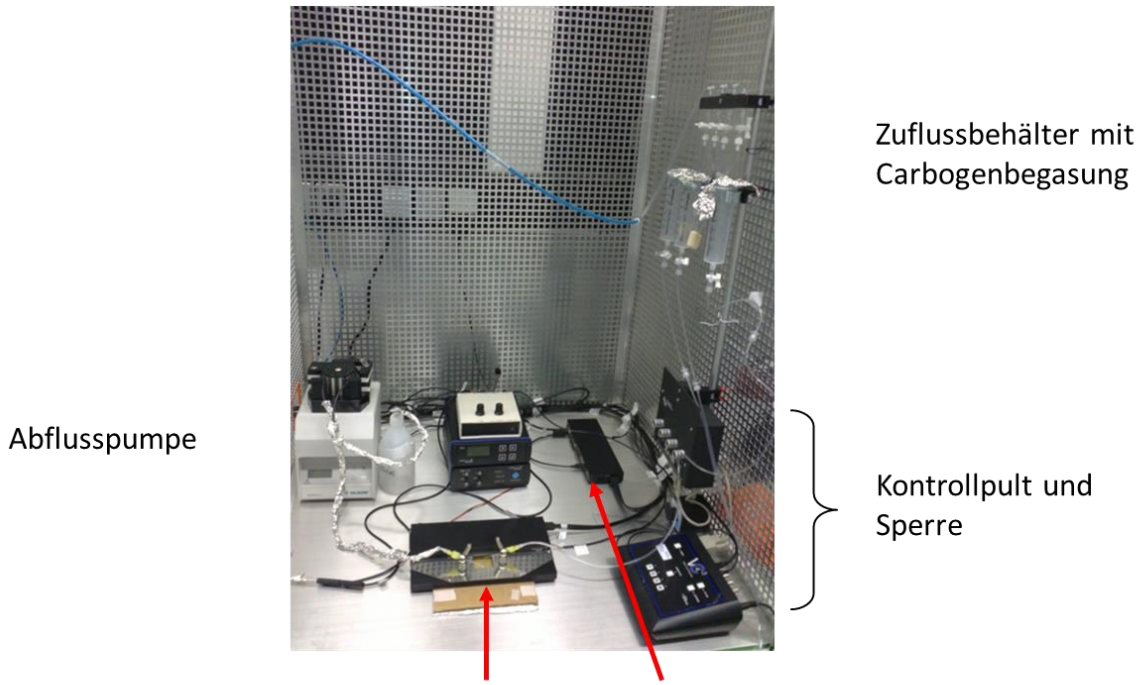

Abbildung 8: MEA2100 System mit Perfusions- und Abflusssystem im Faradayschen Käfig. Zentral befindet sich die Headstage des MEA2100 System mit Zu- und Abfluss. Die Headstage ist mit dem Interface Board verbunden. Jeder Behälter des Zuflusssystems hat einen Carbogengaszugang. Über das Kontrollpult wird die Sperre angesteuert, durch die der Zufluss der einzelnen Kanäle reguliert wird. Die Abflusspumpe verbindet die Abflusskanüle in der MEA-Kammer mit dem Abflussbehälter.

2.2.4 Vorbereitung des Multielektrodenarrays

Für eine erfolgreiche Aufnahme der Aktionspotenziale ist ein sehr guter Kontakt zwischen Elektroden und Retina erforderlich. Um dies zu erreichen wurden zuerst durch eine 2 min Niederdruckplasma Reinigung mit dem Femto Plasmasystem (siehe 2.1.5) feinste Rückstände

entfernt und anschließend die Oberfläche des MEA hydrophilisiert. Dadurch ist eine optimale Anhaftung des feuchten Gewebes und ein besserer Zugang für das Medium am Oberflächen-Retina-Grenzbereich gewährleistet. Für die Reinigung wurde das MEA in die Prozesskammer des Femto Plasmasystems gelegt. Mit Hilfe einer Vakuumpumpe (siehe 2.1.5) wurde die Luft vollständig aus der Kammer gepumpt. Anschließend wurde die Prozesskammer mit O_2 geflutet und ein Innendruck von 0,5 Pa eingestellt. Danach wurde für 2 min ein elektrisches Feld angelegt. Angeregt durch die Energiezufuhr entstehen aus O_2 Sauerstoffradikale ($O^{\bullet}$) und Ozon (O_3). Die Sauerstoffradikale sorgen dafür, dass reaktive Rückstände, wie Öle und Fette, zu den Gasen CO, CO_2 und H_2O oxidiert werden und einfach abgepumpt werden können. Im letzten Schritt wurde die Kammer mit Luft gefüllt und ein atmosphärischer Druck hergestellt. Bei ausgeglichenem Druck konnte die Kammer geöffnet und die MEAs entnommen werden.
Um die Affinität zwischen Elektrodenoberfläche und Gewebe noch weiter zu erhöhen wurde die Oberfläche der MEA-Kammer mit Poly-D-Lysin (siehe 2.1.2) beschichtet. Dazu wurden 5 mg Poly-D-Lysin Pulver in 20 mL autoklaviertem H_2O gelöst (Endkonzentration 0,25 mg/mL). Anschließend wurde die Kammer mit Hilfe einer Spritze (siehe 2.1.3) mit 0,5 mL der Poly-D-Lysin-Lösung gefüllt und für mindestens 30 min bei RT stehen gelassen. Nach der Inkubation wurde das MEA mit demineralisiertem H_2O gewaschen und mit Druckluft getrocknet. Um eine Verschmutzung zu verhindern wurde das gereinigte MEA mit einem staubfreien Tuch bedeckt.

Um das Retinapräparat in der MEA-Kammer zu positionieren, wurde mit einem Skalpell (Nr. 11) in ein kleines Stück Nitrocellulose(siehe 2.1.3) ein quadratisches Loch geschnitten. Dies diente später der visuellen Kontrolle, ob die Retina vollständig das Elektrodenfeld des MEA bedeckte. Ein isoliertes Retinapräparat wurde mit der Photorezeptorseite nach unten in Ames auf die Nitrocellulose übertragen. Anschließend wurde die Nitrocellulose mit der Retina vorsichtig aus dem Ames-Medium entnommen, um die Achse gedreht und mit der Ganglienzellschicht nach unten auf den Elektroden platziert. Mit einem Stück Filterpapier (siehe 2.1.3) wurde die überschüssige Flüssigkeit in der Kammer und von der Retina sehr vorsichtig abgesaugt und das MEA anschließend etwa 1 min bei RT stehen gelassen, um die Adhäsion zwischen Elektrodenoberfläche und Gewebe zu erhöhen. Danach wurde das MEA

in die Headstage des MEA2100 Systems eingespannt, Zufluss- sowie Abflusskanüle in der Kammer platziert und die Kammer langsam mit Medium gefüllt.

2.2.5 Aufnahme der elektrophysiologischen Aktivität

Für die Aufnahme der extrazellulären Signale wurde das Mehrkanalaufnahme- und stimulationsgerät MEA2100-System (Multi Channel Systems, siehe 2.1.5 und Abbildung 8) eingesetzt. Zur Bedienung des Systems und Aufnahme der Daten wurde das Programm MC_Rack (siehe 2.1.4) verwendet. Die Datenabtastrate betrug 25 kHz/Kanal, Verstärkungsfaktor 2. Es wurden nur Aufnahmen durchgeführt, wenn an mindestens 15 der 60 Elektroden Spontanaktivität zu erkennen war. Die Amplitude eines Aktionspotenzials war in der Regel ≥ 3 x Hintergrundrauschen (Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) ≥ 3:1). Wenn es sich deutlich um ein Aktionspotential mit einem kleinen SNR handelte wurde der Schwellwert entsprechend für die Elektrode eingestellt. Das SNR war nie < 2:1.
Die Retina wurde während des Versuchs permanent mit Carbogen-gesättigtem Medium perfundiert. Vor Beginn der Aufnahme wurde die explantierte Netzhaut für mindestens 20 Minuten mit Carbogen-gesättigtem Ames Medium bei RT überspült. Zu Beginn des Experiments wurde eine Aufnahme der Rohdaten ohne Stimulation von 30 s bis 5 min durchgeführt. Alle Daten wurden auf der internen Festplatte des MEA2100 System-Computers gespeichert. Für die weitere Datenanalyse wurden immer Kopien der Originaldaten verwendet.

2.2.5.1 Elektrische Stimulation

Die Stimulationseinstellungen wurden mit der MEA-Software MC_Rack (siehe 2.1.4) festgesetzt. Die Elektroden zur epiretinalen Stimulation wurden in jedem Versuch individuell ausgesucht. Ausschlaggebend war die Anzahl und Anordnung der Elektroden, an denen Spontanaktivität detektiert werden konnte. Um Signalüberlagerungen zu vermeiden, musste zwischen den Stimulationselektroden ein Abstand von mindestens einer Elektrode eingehalten werden. Alle benachbarten Elektroden sollten Aktivität aufzeichnen.
Der erste Stimulationsimpuls wurde nach 30 – 60 s Aufnahme induziert. Es wurde immer ein biphasischer Stromimpuls mit einer Amplitude vom 40 µA benutzt. Die anodische und kathodische Phasendauer betrug jeweils 500 µs, ohne Interphasenpause, wobei immer die anodische Phase begann (siehe Abbildung 9). Zwischen den Pulsen wurde eine

Interpulspause von 10 s eingehalten. Die Anzahl der epiretinalen Stromimpulse in einer Aufnahme variierte von 15 – 25 Impulsen. Während und bis zu 600 µs nach der Strominduktion war die Stimulationselektrode vom Verstärker des Aufnahmegeräts entkoppelt (Blanking), um Stimulationsartefakte zu verhindern.

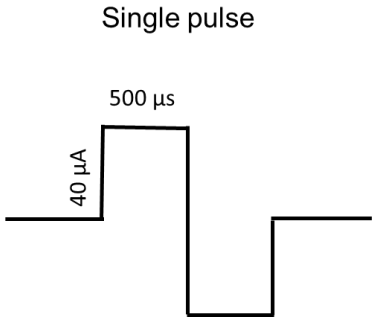

Abbildung 9: Darstellung biphasischer Stromimpuls zur Stimulation der Retina. Für die Stimulation wurde ein biphasischer Stromimpuls mit einer Amplitude vom 40 µA benutzt. Die anodische und kathodische Phasendauer betrug jeweils 500 µs, ohne Interphasenpause, wobei immer die anodische Phase begann.

2.2.5.2 Stimulationsreihe

In Vorversuchen wurden unterschiedliche Impulsstärken und -längen getestet, um die Parameter zu ermitteln, die sowohl in der degenerierten als auch in der gesunden Retina zu einem Stimulationserfolg führen. Dazu wurde die Retina mindestens 15 mal mit dem gleichen Impuls stimuliert. Die anfängliche Stromstärke von 10 µA wurde in 10 µA Schritten bis auf 100 µA erhöht. Die Dauer variierte für jede Pulsstärke von anfänglich 100 µs in 100 µs Schritten bis zuletzt auf 1.000 µs.
Für jede Parameterkonstellation wurde die Anzahl stimulierter GZ in unmittelbarer Nachbarschaft zur Stimulationselektrode gezählt und verglichen (siehe Abbildung 25).

2.2.5.3 Pharmakologische Behandlung

Für die pharmakologischen Versuche wurde die Netzhaut für mindestens 20 min mit der Carbogen-gesättigten pharmakologischen Substanz perfundiert. Die Zusammensetzung der Medien mit pharmakologischen Substanzen ist unter 2.2.1.2 gelistet. Ihre Wirkweise ist in Abschnitt 1.5 erläutert.
Vor jedem Stimulationsexperiment wurde die Spontanaktivität aufgenommen. Anschließend wurden die Stimulationsexperimente wie unter 2.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Nach einem Versuch in Anwesenheit einer pharmakologischen Substanz wurde die Netzhaut

erneut für mindestens 20 min mit Carbogen-gesättigtem Ames Medium durchspült (wash out). Danach wurde erneut die Spontanaktivität in einer Datei dokumentiert und anschließend das nächste Stimulationsexperiment durchgeführt.

2.2.6 Datenanalyse

Die von den Elektroden aufgezeichneten extrazellulären Signale wurden von der Headstage mittels eines eSATA Kabels an das Interface-Board weitergeleitet (siehe 2.1.5 und Abbildung 8). In der Headstage sind sowohl der Signalverstärker als auch der Stimulator und der Analog-Digital-Wandler integriert. Für die Bedienung des Systems sowie zur Datenvisualisierung und -speicherung ist das Interface-Board über ein USB-Kabel mit einem Computer verbunden.

2.2.6.1 Filtern der Rohdaten

Mit dem Programm MC_Rack (Multi Channel Systems) wurden die Rohdaten mit einem Tiefpassfilter von 3000 Hz und einem Hochpassfilter von 300 Hz gefiltert um die Spikes vom Hintergrundrauschen zu separieren. Erläuterungen zur Detektion der Aktionspotenziale und SNR siehe 2.2.5.
Für die Analyse der Oszillationen wurde ein Tiefpassfilter von 50 Hz ohne Hochpassfilter verwendet.
Die Spikedaten sowie vorhandene Trigger Daten bei Stimulationsexperimenten wurden mit MC_Rack als *.mcd Datei gespeichert (siehe 2.1.4).

2.2.6.2 Spikesorting

Aufgrund der extrazellären Ableitung und der Elektrodengröße ist es nicht auszuschließen, dass eine Elektrode die Aktionspotenziale von mehreren Ganglienzellen aufzeichnet. Um die Spikes unterschiedlicher Neurone zu sortieren wurden die zuvor als *.mcd Datei (siehe 2.2.6.1) gespeicherten und gefilterten Daten in das Programm OfflineSorter (Plexon, siehe 2.1.4) importiert. Die pro Elektrode bzw. Kanal aufgezeichnet Spikes wurden auf Basis ihrer Wellenformen in Units unterteilt. Eine Unit entspricht einem Neuron.
Zum „Sorting“ wurde der T-Verteilungs *Expectation-Maximization*-Algorithmus (t-Verteilung EM Algorithmus) nach Shoham et al. 2003 verwendet, der den Vektor $v^{(k)}$ berücksichtigt, um eine optimale Auflösung der Signale einzelner Units bei Multiunitaufnahmen zu erlangen [72]:

$$v^{(k)} = \frac{2}{y + \log y - 1} + 0.0416\left(1 + erf\left(0.6594*\log\left(\frac{2.1971}{y + \log y - 1}\right)\right)\right)$$

Abbildung 10: $v^{(k)}$ Vektor des EM-Algorithmus nach Shoham. y = auxiliary variable; erf = error function.

Hierbei werden die Spikes zunächst mit der Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis, PCA) unterteilt [65].
Anschließend werden die Spikes beruhend auf der Hauptkomponentenanalyse in Cluster innerhalb eines 2-Dimensionalen Koordinatensystems auf Basis des t-Verteilung EM-Algorithmus eingeteilt. Jedes Cluster entspricht einer Unit und somit den abgefeuerten Spikes eines Neurons. Nach der automatischen Sortierung wurden die Daten visuell überprüft. Falsch zugeordnete Spikes wurden manuell zugeteilt [72].
Die sortierten Spikedaten wurden zur Analyse als *.plx Datei gespeichert.

2.2.6.3 Peristimulus time histogram (PSTH)

Mit dem PSTH werden die Spikes untersucht, die um ein Ereignis herum abgefeuert werden. In dieser Arbeit wird die Spikeaktivität vor und nach dem elektrischen Stimulationsimpuls analysiert. Bei jedem Stimulationsimpuls sendet das MEA2100-System einen Trigger, der zeitlich mit dem Stimulationsimpuls übereinstimmt. Dieser Trigger dient in der Analyse als Orientierungsereignis.
Für die Analyse wurden die in der *.plx Datei (siehe 2.2.6.2) als Units sortierten Spikedaten in das Programm NeuroExplorer (Nex Technologies, siehe 2.1.4) importiert. Mit der Funktion „Perievent Rasters“ wurden die Spikes in einem Zeitraum von X s vor und nach jeder Stimulation in einem Rasterplot dargestellt. Zusätzlich wurden die Daten gemittelt und in einem Histogramm visualisiert. Die x-Achse ist in Bins mit einer definierten Größe unterteilt und zeigt den Zeitraum vor und nach Stimulation. Von der y-Achse lässt sich die Anzahl Spikes pro Bin ableiten.
Für weitere statistische Analysen und alternative graphische Darstellungen wurden die Daten in die Programme Microsoft Excel 2007 (Microsoft), GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.) und OriginPro 9.1 (OriginLab Corporation) importiert (siehe 2.1.4).

2.2.6.4 Frequenzanalyse mittels Power Spectral Densities (PSD)

Um eine Aussage über die Frequenzverteilung innerhalb des gemessenen Signals zu erhalten wurde eine PSD-Analyse durchgeführt. Der kontinuierliche und gefilterte Datensatz (siehe 2.2.6.1) wurde in das Programm NeuroExplorer importiert und mit der Funktion „Power Spectral Densities“ ausgewertet. Bei der PSD-Analyse wird die Häufigkeit einer Frequenz innerhalb eines Signals in einem Frequenzspektrum dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Datensätze wurde der Gesamtheit eines Datensatzes auf 100% normalisiert und der Prozentanteil der Frequenzen (y-Achse) im Frequenzspektrum (x-Achse) graphisch dargestellt.

2.2.6.5 Statistische Auswertung

Generell wurde die Stimulation als erfolgreich betrachtet, wenn in mindestens 50 % der einzelnen Durchläufe künstlich evozierte Aktionspotentiale zu erkennen waren. Für die Untersuchung der Latenz wurde die Zeitspanne zwischen Stimulus und dem ersten Aktionspotenzial bzw. bei Burstantworten bis zur Spitze des Burts im PSTH (siehe 2.2.6.3) betrachtet.

Die statistische Analyse erfolgte mit den Programmen GraphPad Prism 6 und MS Excel 2007 (siehe 2.1.4). Die Datengruppen wurden mit einem zweiseitigen t-Test verglichen. Bei gemittelten Werten wurde innerhalb einer Stichprobe sowie beim Vergleich verschiedener Stichproben mit gleichem Umfang die Standardabweichung (SD) berechnet. Beim Vergleich von Stichproben mit unterschiedlichem Umfang, wurde der Standardfehler (SEM) berechnet. Ab einem Signifikanzwert von $p < 0,05$ wurden die Ergebnisse als signifikant unterschiedlich betrachtet.

3 Ergebnisse

Für diese Arbeit wurden Versuche zur Untersuchung der Spontanaktivität als auch dem Stimulationsverhalten, sowohl in RCS Ratten als auch Wistar Ratten als Kontrolltiere durchgeführt. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der verwendeten Tiere mit Alter und gemessenen retinalen Ganglienzellen, die die Datengrundlage der folgenden Ergebnisse bilden. Im folgenden Ergebnissteil werden die jeweiligen Versuchsergebnisse beschrieben, welche auch im Anhang tabellarisch dargestellt sind. Die statistische Auswertung wurde wie unter 2.2.6.5 Statistische Auswertung beschrieben durchgeführt. Im folgenden Abschnitt wird der p-Wert nur bei statistischer Signifikanz beschrieben, bei nicht signifikanten Ergebnissen ist der p-Wert immer $p \geq 0{,}05$.

Tabelle 1: Übersicht der Versuchstiere mit Alter und Anzahl der gemessenen Neurone.

Tiermodell	Alter [Monate]	Aufnahme-dauer [s]	Anzahl Neurone	Anzahl Bursty-Neurone	Anzahl Bursty-Neurone [%]	Neurone pro Altersgruppe
Wistar	1	300	63	37	59%	92
	1	300	6	2	33%	
	1	300	23	9	39%	
	3	120	68	52	76%	104
	3	180	36	14	39%	
	5	180	15	14	93%	43
	9	300	28	28	100%	
RCS	1	300	37	24	65%	80
	1	180	67	52	78%	
	1	300	43	41	95%	
	4	300	51	45	88%	195
	4	180	90	67	74%	
	4	180	54	17	31%	
	7	445	10	2	20%	59
	8	187	8	2	25%	
	9	300	41	23	56%	

3.1 Einfluss der Photorezeptordegeneration auf die Spikefrequenz

3.1.1 Abhängigkeit zwischen Spikeaktiviät und Degenerationsstadium

Wie in 1.7 beschrieben, sind Unterschiede im Spikeverhalten der retinalen Ganglienzellen zwischen erblindeten und gesunden Mäusen bekannt. Um festzustellen, ob es auch einen Unterschied zwischen Wistar und RCS Ratte gibt, wurde die Spontanaktivität in Bezug auf das Spikeverhalten und das Vorkommen von slow waves in unterschiedlichen Degenerationsstufen analysiert (siehe 2.2.6.1 Filtern der Rohdaten).
Wie Abbildung 11 zeigt, sind auch in den Ganglienzellen der degenerierten RCS Ratten Retina Oszillationen und Burstverhalten zu erkennen, welche in der Wildtypkontrolle nicht messbar sind.

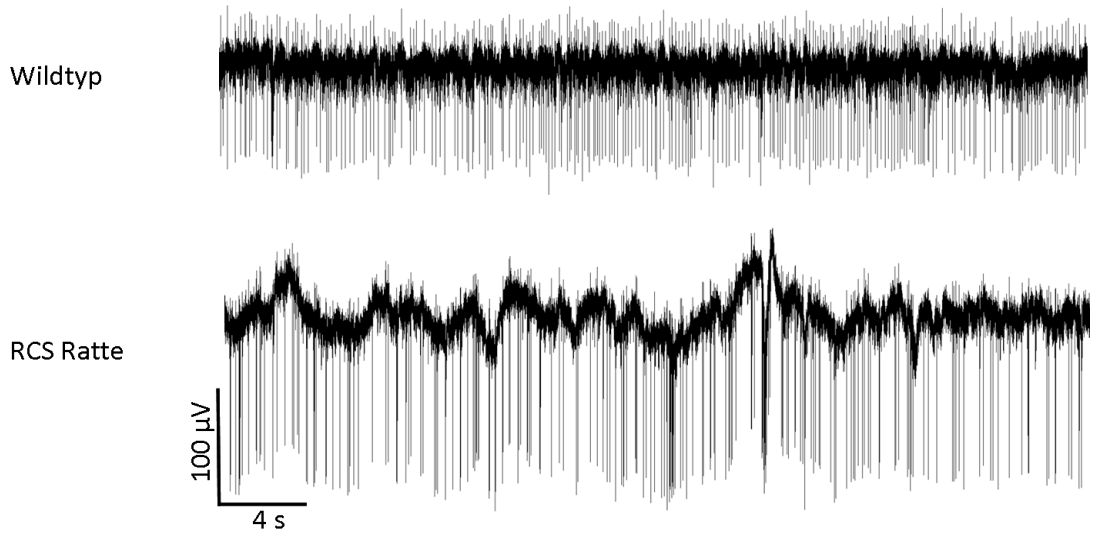

Abbildung 11: Vergleich der Spontanaktivität zwischen Wistar und RCS Ratte. Die Daten wurden wie unter 2.2.6.1 Filtern der Rohdaten beschrieben, bearbeitet. Beim Wildtyp ist keine Schwankung der Baseline und ein gleichmäßiges Abgeben von Spikes zu erkennen. In der RCS Retina sind Oszillationen von etwa 3 Hz zu sehen. Außerdem generieren die GZ der RCS Ratte oft Spikes in Bursts ab.

Im ersten Monat ist nur ein geringer Unterschied in der mittleren Spontanaktivität von Wistar 8,52 Hz (gemessen in 3 Retinae aus 3 Tieren, 92 Zellen) und RCS Ratten GZ 8,07 Hz (3 Retinae, 3 Tiere, 80 Zellen) zu erkennen (siehe Abbildung 12). Betrachtet man die Altersstufen 3-4 Monate nach Geburt, konnte in der mittlere Spontanaktivität im Wildtypen mit 7,27 Hz (3 Retinae, 3 Tiere, 104 Zellen) kein Unterschied zu den GZ der RCS Ratte (5,54 Hz, 3 Retinae, 3 Tier, 195 Zellen) festgestellt werden. Während, bei Tieren älter als

5 Monate, im Wildtypen die Feuerrate fast unverändert bei 7,23 Hz (2 Retinae, 2 Tiere, 43 Zellen) bleibt, generieren die GZ der RCS Ratte in den darauffolgenden Altersstufen signifikant weniger Spikes als im ersten Monat (mittlere Feuerrate: 3,37 Hz, 3 Retinae; 3 Tiere, 59 Zellen; Ergebnisse siehe auch Tabelle 4 und Tabelle 1, Auswertung siehe 2.2.6.5 Statistische Auswertung).

In nächsten Schritt wurden die retinalen Ganglienzellen nach der Frequenz ihrer Spikeaktivität innerhalb einer Altersgruppe aufgeteilt (siehe Tabelle 3 und Abbildung 13). Hierbei zeigt sich beim Wt, dass im ersten Monat vor allem eine Feuerrate von < 1 Hz dominiert (53%, Zellen ausgewertet: 92, siehe Abbildung 13), während 29% der Neurone Aktionspotenziale mit einer Frequenz von 1-10 Hz generieren. In der RCS Ratte zeigen die GZ (Zellen ausgewertet: 80) dagegen vorwiegend eine Frequenz zwischen 1-10 Hz (42%), wobei der prozentuale Anteil der Gruppe < 1 Hz, nur unwesentlich niedriger ist (37%). Den kleinsten Anteil bilden in beiden Tieren GZ mit einer Feuerrate > 10 Hz (Wistar: 18%; RCS Ratte: 20%).
In den Altersstufen 3-4 Monate *post natal* ähnelt sich das Verteilungsmuster der Spikeaktivität von Wistar (Zellen ausgewertet: 104) und RCS Ratte (Zellen ausgewertet: 195). Sowohl im Wt als auch in der RCS Retina feuert der Großteil der Neurone mit einer Frequenz zwischen 1-10 Hz (Wistar: 51%; RCS: 60%). Den zweitgrößten Anteil bilden Neurone mit einer Feuerrate < 1 Hz (Wistar: 26%; RCS: 30%) und den geringsten Anteil bilden GZ mit einer hohen Spikerate >10 Hz (Wistar: 23%; RCS: 10%).
In den Tieren älter als fünf Monate unterscheiden sich beide Tiermodelle wieder deutlicher in ihren Spikeeigenschaften. In der Wistar Ratte (Zellen ausgewertet: 43) spiken 32% der untersuchten retinalen Ganglienzellen mit einer Frequenz < 1 Hz. Wie in der vorhergehenden Altersstufe zeigen die meisten Zellen eine Frequenz zwischen 1-10 Hz (53%). Die kleinste Gruppe bilden GZ mit einer Feuerrate > 10 Hz (15%). In der RCS Ratten Retina (ausgewertete Zellen: 59) spiken 70% der Zellen mit einer Frequenz < 1 Hz. 29% haben eine mittlere Feuerrate von 1-10 Hz und der geringste Anteil an Ganglienzellen feuert mit einer Frequenz > 10 Hz (1%, siehe Abbildung 13).

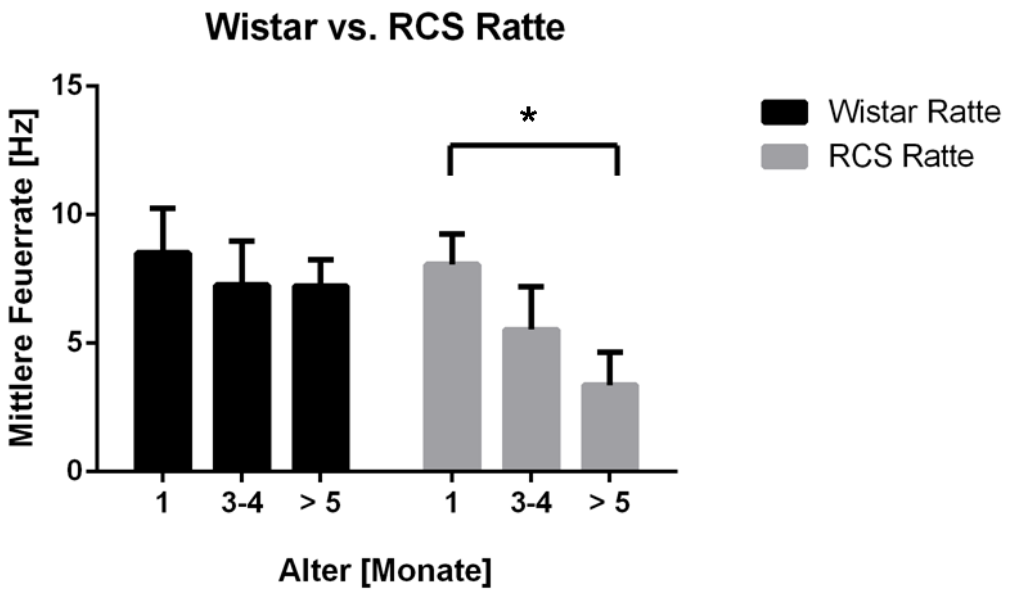

Abbildung 12: Vergleich der mittleren Spontanaktivität von Aktionspotenzialen zwischen Wistar und RCS Ratte. Im ersten Monat *post natal* ist die mittlere Spontanaktivität beider Tiere etwa gleich. In den Altersstufen 3-4 Monate ist die Aktivität in der RCS Retina geringer als im Wt. Jedoch ist erst in Tieren >5 Monate eine signifikante Abnahme der mittleren Spikeaktivität messbar. Spikes wurden wie unter 2.2.6.2 beschrieben gefiltert. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert ±SD. Anzahl an Retinae und Tieren siehe Text (siehe 2.2.6.5 Statistische Auswertung).

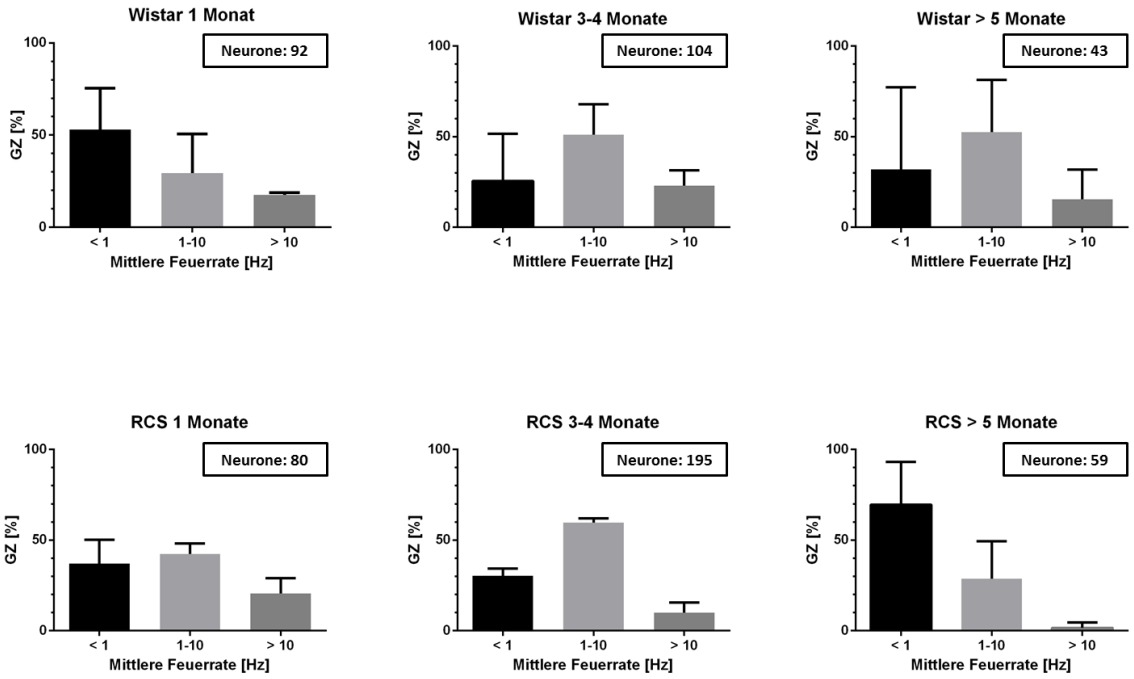

Abbildung 13: Einteilung der GZ nach der mittleren Frequenz ihrer spontanen Spikeaktivität je Altersgruppe. In der Retina gesunder Wistar Ratten zeigen die meisten GZ im ersten Entwicklungsmonat eine Frequenz von <1 Hz. In den folgenden Altersstufen sinkt der Anteil dieser Gruppe bis auf 32% in Tieren > 5 Monate. Der prozentuale Anteil an GZ die eine Feuerrate von 1-10 Hz steigt von 29% im ersten Monat bis auf 53% in Tieren > 5 Monate. Den geringsten Anteil bilden in allen Altersstufen Zellen mit einer mittleren Spikefrequenz > 10 Hz. In den RCS-Retinae zeigen im ersten Entwicklungsmonat 42% der GZ eine Frequenz zwischen 1-10 Hz. In den folgenden Altersstufen steigt der prozentuale Anteil auf 60% in der Altersstufe 3-4 Monate und sinkt wieder auf 29% in Tieren > 5 Monate. Der prozentuale Anteil an GZ die eine Spikerate von < 1 Hz zeigen steigt von 37% im ersten Monat bis auf 70% in Tieren > 5 Monate. Den geringsten Anteil bilden in allen Altersstufen Zellen mit einer mittleren Spikefrequenz > 10 Hz. Spikes wurden wie unter 2.2.6.2 beschrieben gefiltert. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert ±SD. Daten siehe Anhang Tabelle 3.

3.1.2 Analyse des Spikeverhaltens – Burstaktivität

Nachdem in den ersten Analysen der Fokus auf die mittlere Spikerate gelegt wurde, wird in einem weiteren Schritt untersucht, ob sich die spontane Spikeaktivität hinsichtlich des Auftretens von Einzelspikes und Burst von Spikes unterscheiden lässt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Degeneration der Lichtsinneszellen häufig zu einem Burst-Spike-Verhalten der GZ führt (siehe 1.7 und 2.2.6.1) [30, 29, 61, 74]. Für die vorliegende Arbeit wurde ein Burst wie folgt definiert: Es müssen mindestens zwei Spikes in weniger als 15 ms aufeinanderfolgen. Der Burst gilt als beendet sobald zwischen zwei Spikes mehr als 30 ms liegen (siehe Abbildung 14).

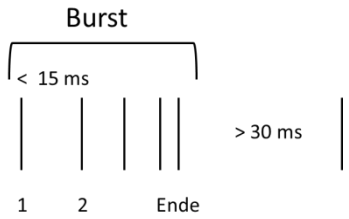

Abbildung 14: Graphische Darstellung eines Burst. Eine Spikereihenfolge wird dann als Burst gezählt, wenn zwei Spikes in weniger als 15 ms aufeinanderfolgen. Der Burst gilt als beendet sobald zwischen zwei Spikes mehr als 30 ms liegen.

Die prozentualen Anteile aller GZ von WT und RCS Ratte die Spikes in Bursts generieren (Bursty Neurons) beträgt 62% bei den WT und 59% bei den RCS Retina (ausgewertete Zellen: Wistar Ratte 239; RCS Ratte 334; siehe Abbildung 15; siehe Tabelle 4). Jedoch unterscheiden sich die Anteile in Bezug auf ihr Auftreten während der Entwicklung. In der Wistar-Retina sind 44% der GZ bursty im ersten Lebensmonat (ausgewertete Zellen: 92), während 79% der GZ bei der RCS Ratte (ausgewertete Zellen: 80) bursty sind. In den Altersstufen 3-4 Monate *post natal* sind die Anteile an Bursty Neurons in beiden Tiermodellen etwa gleich (Wistar: 58% (ausgewertete Zellen: 104); RCS: 64% (ausgewertete Zellen: 195)). Bei den Tieren älter als fünf Monate ist jedoch wieder ein drastischer Unterschied von 97% Bursty Neurons in der Wistar-Retina (43 Zellen ausgewertet) zu 34% in der RCS-Retina (59 Zellen ausgewertet) zu erkennen.

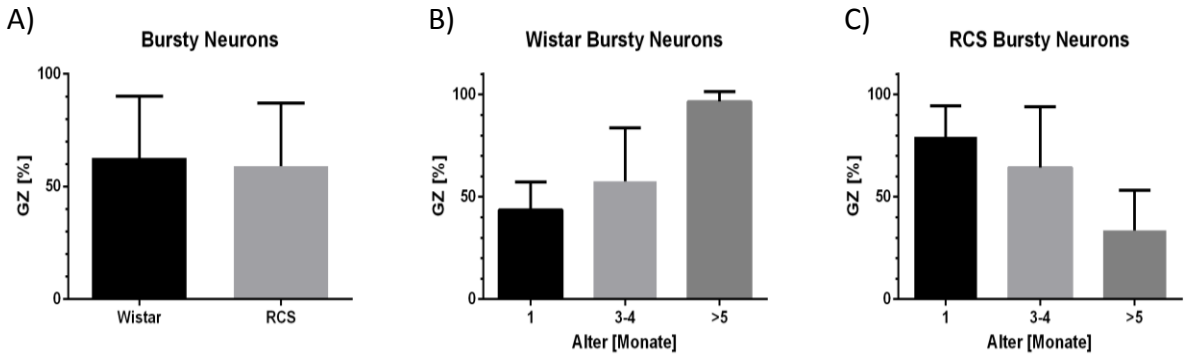

Abbildung 15: Prozentualer Anteil an „Bursty Neurons". A) Der prozentuale Anteil an Bursty Neurons gemessen an der Gesamtzahl der GZ ist in beiden Tiermodellen ähnlich. B) Der Anteil an Bursty Neurons ist im ersten Monat der Wt GZ am geringsten und steigt im Laufe der Entwicklung auf 97% an. C) In der RCS-Retina ist der Anteil an Bursty Neurons im ersten Entwicklungsmonat mit 79% am größten. Im Laufe der Degeneration verringert sich der Anteil auf 34%. Erläuterungen siehe Text. Spikes wurden wie unter 2.2.6.2 beschrieben gefiltert. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert an Bursty Neuronen ±SD. Anzahl ausgewerteter Zellen siehe Text und Tabelle 4.

3.1.3 Altersbedingte morphologische Veränderung des Auges in der RCS Ratte

Aufgrund der beobachteten Abnahme in der Spontanaktivität der GZ, in der RCZ Ratten Retina, mit zunehmendem Alter, wurden die Augen von älteren Tieren makroskopisch untersucht.

In RCS Ratten älter als 7 Monate konnten häufig morphologische Veränderungen der Retina sowie des Glaskörpers in Kombination mit einem Katarakt festgestellt werden. Abbildung 16 zeigt beispielhaft ein geöffnetes Auge einer 11 Monate alten RCS Ratte mit deutlicher Trübung der Linse (siehe Abbildung 16A). Der Glaskörper hat sich zu einer undurchsichtigen weißen Masse verändert. Bei näherer Betrachtung sind schollenartige strukturelle Veränderungen sowie ein Netz aus feinen und relativ dicken Blutgefäßen in der Retina zu erkennen (siehe Abbildung 16B).

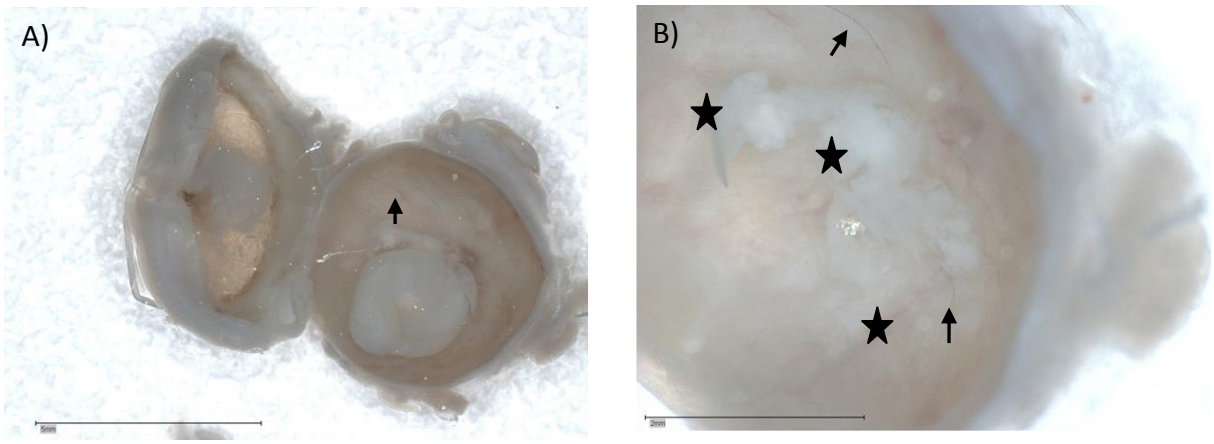

Abbildung 16: Auge einer 11 Monate alten RCS Ratte. A) Morphologische Veränderungen der Retina, sowie des Glaskörpers in Kombination mit einem Katarakt (Maßbalken: 5 mm). B) Eine Vergrößerung der Retina aus A) zeigt deutlich schollenartige strukturelle Veränderungen der Retina (gekennzeichnet durch ★,) sowie ein Netz feiner und dicker Blutgefäße (gekennzeichnet durch ↑, Maßbalken: 2 mm).

3.2 Oszillatorische Anteile in der degenerierten RCS Retina

3.2.1 Vergleich von Wildtyp und RCS Retina

Wie in Abschnitt 1.7 bereits beschrieben wurde auch in anderen Tiermodellen mit einer genetisch bedingten Photorezeptordegeneration eine Änderung der Spontanaktivität beobachtet. Um die Theorie vom Zusammenhang zwischen dem Auftreten von slow waves

und dem Verlust von Photorezeptoren zu überprüfen, wurde in extrazellulären Ableitungen von degenerierten Netzhäuten gezielt nach slow waves gesucht (siehe 2.2.6.4).

Die extrazellulären Ableitungen von Ganglienzellen zeigen einen deutlichen Unterschied in der Spontanaktivität zwischen Wildtyp und degenerierter Retina (siehe Abbildung 11). Während die GZ von Wistar Ratten keine Schwankungen der Grundlinie aufweisen, sind in der RCS Retina deutliche Unterschiede in der Spontanaktivität erkennbar. So können in der PSD Analyse (siehe 2.2.6.4) deutliche Oszillationen der Grundlinie im Frequenzbereich zwischen 3 Hz und 7 Hz herausgefiltert werden (siehe Abbildung 17).

Außerdem ist oftmals eine Veränderung des Spikeverhaltens zu erkennen. Hierbei ist ein vermehrtes Aufkommen von Bursts anstatt Einzelspikes zu detektieren (siehe Abbildung 11). Diese sind oft, aber nicht immer, mit den slow wave Oszillationen gekoppelt.

Weder Burstverhalten noch slow wave Oszillationen sind in jeder GZ zu beobachten. Zusätzlich ist zu sehen, dass diese Eigenschaften am gleichen Neuron verschwinden und später wieder messbar sind. Festzuhalten bleibt dabei, dass beide Eigenschaften nicht an GZ von gesunden Wistar Retinae gemessen werden konnten.

Wistar RCS

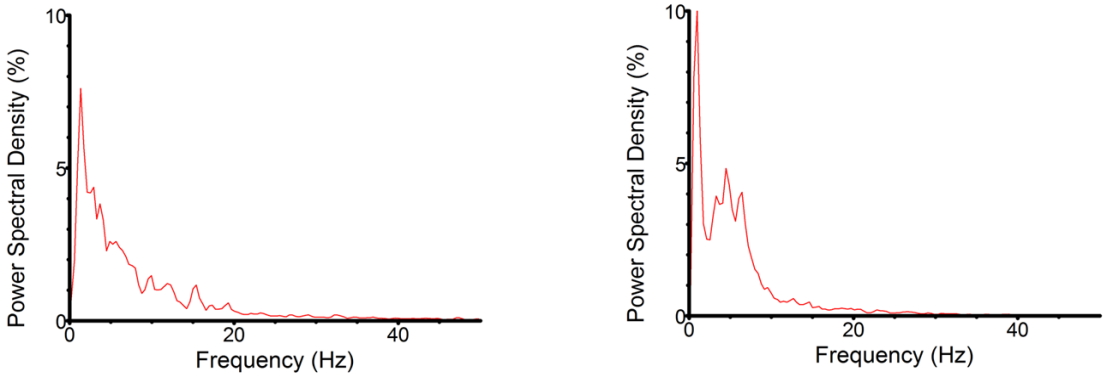

Abbildung 17: Power Spectrum Analyse der Wistar und degenerierten RCS Ratten Retina. Im Wildtyp (Wistar) befinden sich viele Signale im Frequenzbereich von < 2 Hz. Anschließend fällt die Kurve etwa gleichmäßig ab. Die Auswertung der RCS Datensätze zeigt im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Anteil an Frequenzen zwischen 3 Hz und 7 Hz. Zusätzlich ist der prozentuale Anteil an Frequenzen < 2 Hz höher als im Wildtyp. Die Daten wurden wie unter 2.2.6 beschrieben analysiert und mit einem 50 Hz Tiefpassfilter selektiert.

3.2.2 Einfluss von CNQX und D-AP5 auf die Spontanaktivität

Um die Entstehung der Oszillationen und des Burstverhalten zu untersuchen, wurde die Aktivität der GZin Anwesenheit eines Cocktails aus CNQX und D-AP5 analysiert (Versuchsübersicht siehe Tabelle 6, Methode siehe 2.2.1.2). Der genaue Versuchsablauf und die Inkubationszeiten sind in Abschnitt 2.2.5.3 erläutert.

Wie Abbildung 18 zeigt, konnte in Gegenwart dieses Cocktails die oszillatorische Komponente nicht mehr wie in Abbildung 11 zu sehen detektiert werden. In der PSD-Analyse ist ebenfalls während des Perfundierens der Retina mit dem Blockermix kein erhöhter Anteil an Frequenzen zwischen 3-7 Hz zu sehen (siehe Abbildung 19). Stattdessen zeigt die PSD-Analyse eine starke Ähnlichkeit des Frequenzspektrums zu den Ergebnissen der Wistar Retina, wobei ein zusätzlicher Peak im Bereich ≤ 2 Hz zu sehen ist (siehe Abbildung 17). Durch anschließendes Spülen der Retina mit Ames Medium werden die Oszillationen wieder messbar (siehe Abbildung 19).

Diese Beobachtung kann allerdings nicht auf das Spikeverhalten übertragen werden. In Abbildung 18 scheint es, als habe die Blockierung der iGluR keine Auswirkung auf die Burstaktivität der Ganglienzelle. Dagegen zeigt Abbildung 20 eine andere Ganglienzelle, die unter Referenzbedingungen mit Ames Medium ebenfalls Oszillationen und Burstverhalten zeigt. Während der Perfusion mit dem Mix aus CNQX und D-AP5 ist jedoch zusätzlich zu den fehlenden Oszillationen auch ein Verlust der Spontanaktivität zu detektieren. Nachdem die Retina mit Ames ausgewaschen wurde, sind Oszillationen und spontane Burstaktivität wieder vorhanden (siehe Abbildung 20 „wash out“).

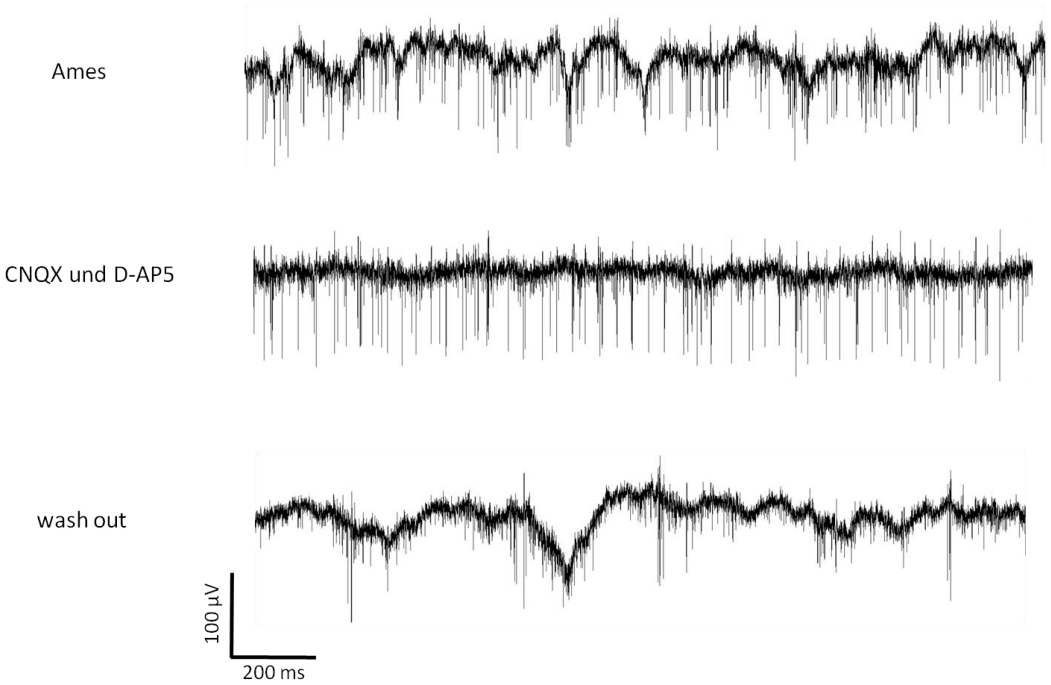

Abbildung 18: Einfluss von CNQX und D-AP5 auf die slow wave Komponente. Unter Kontrollbedingungen mit Ames Medium sind Oszillationen und Burstaktivität zu erkennen. Werden die iGluR mit CNQX und D-AP5 blockiert, können keine 3-7 Hz slow waves detektiert werden. Das Burstverhalten ist in diesem Fall nicht betroffen. Die Oszillationen erscheinen wieder, wenn das Gewebe mit Ames gespült wird und die Blockade der Glutamat-vermittelten Signalwege aufgehoben wird. Die Retina wurde wie unter 2.2.2 beschrieben behandelt, anschließend wurden die Rohdaten wie unter 2.2.6.1 beschrieben gefiltert.

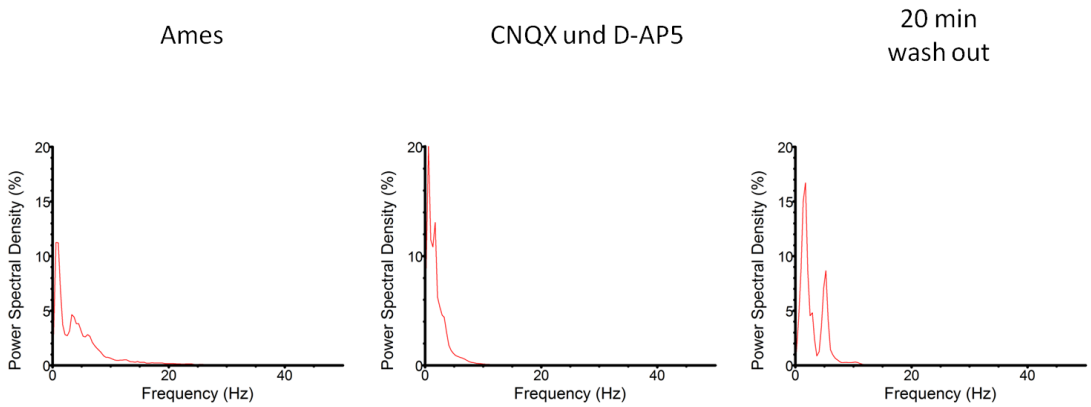

Abbildung 19: Analyse des Frequenzspektrums in Anwesenheit eines CNQX/D-AP5-Cocktails. Unter Kontrollbedingungen (Ames) ist ein zweiter erhöhter Anteil an Frequenzen im Bereich von etwa 5 Hz zu sehen. Wird die Retina mit dem Blockercocktail perfundiert befindet sich der größte Teil der Signale im Frequenzbereich von < 2 Hz. Dies ähnelt stark den Ergebnissen der Wistar Retina (siehe **Abbildung 17**). Nach wash out ist wieder eine deutliche zweite Spitze bei etwa 5 Hz zu erkennen. Die Retina wurde wie unter 2.2.2 beschrieben behandelt, anschließend wurden die Daten wie unter 2.2.6 beschrieben analysiert und mit einem 50 Hz Tiefpassfilter selektiert.

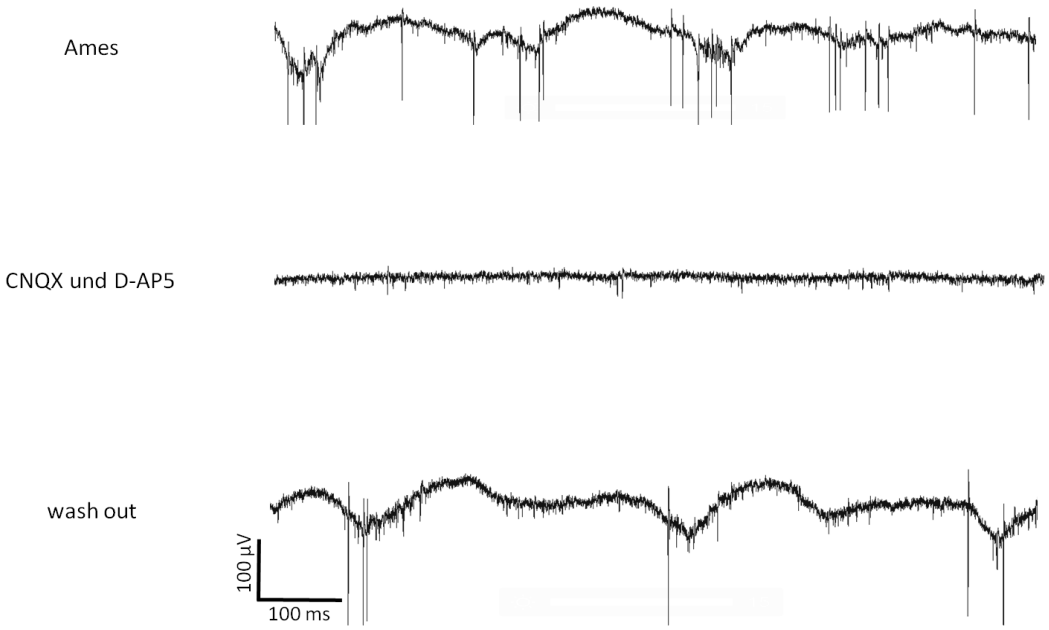

Abbildung 20: Einfluss des CNQX/D-AP5-Cocktail auf die Oszillation und Spikeaktivität der GZ. Unter Kontrollbedingungen mit Ames Medium sind Oszillationen und Burstaktivität in dieser GZ zu erkennen. Werden die iGluR mit CNQX und D-AP5 blockiert können keine slow waves, aber auch kein Burstverhalten detektiert werden. Oszillationen und Burstaktivität erscheinen wieder, wenn das Gewebe mit Ames gespült wird und die Glutamat-vermittelten Signalwege nicht mehr blockiert sind. Die Retina wurde wie unter 2.2.2 beschrieben behandelt, anschließend wurden die Rohdaten wie unter 2.2.6.1 beschrieben gefiltert.

3.2.3 Einfluss von Bicucullin auf die slow wave Komponente

Mit Hilfe von Bicucullin wurde untersucht, ob $GABA_A$-vermittelte inhibitorische Signalwege an der Entstehung der oszillatorischen Komponente oder dem Burstverhalten beteiligt sind. Hierfür wurde die degenerierte RCS Retina zunächst unter Kontrollbedingung mit Ames und anschließend mit Bicucullin gespült (Versuchsübersicht siehe Tabelle 7, Methoden siehe 2.2.5.3).

Im Gegensatz zur Blockade der exzitatorischen iGluR-vermittelten Signalwege, scheint die Anwesenheit des $GABA_A$-Antagonisten keinen oder wenn nur geringen Einfluss auf die slow waves oder das Burstverhalten zu haben. Bei Betrachtung der extrazellulären Ableitung scheint es so, als bleibt die Spontanaktivität in Anwesenheit einer 30 µM Bicucullinlösung wie unter den Kontrollbedingungen (siehe Abbildung 21). Auch im „wash out“ scheint bei Betrachtung der Grundlinie und des Spikeverhaltens keine Veränderung erkennenbar.

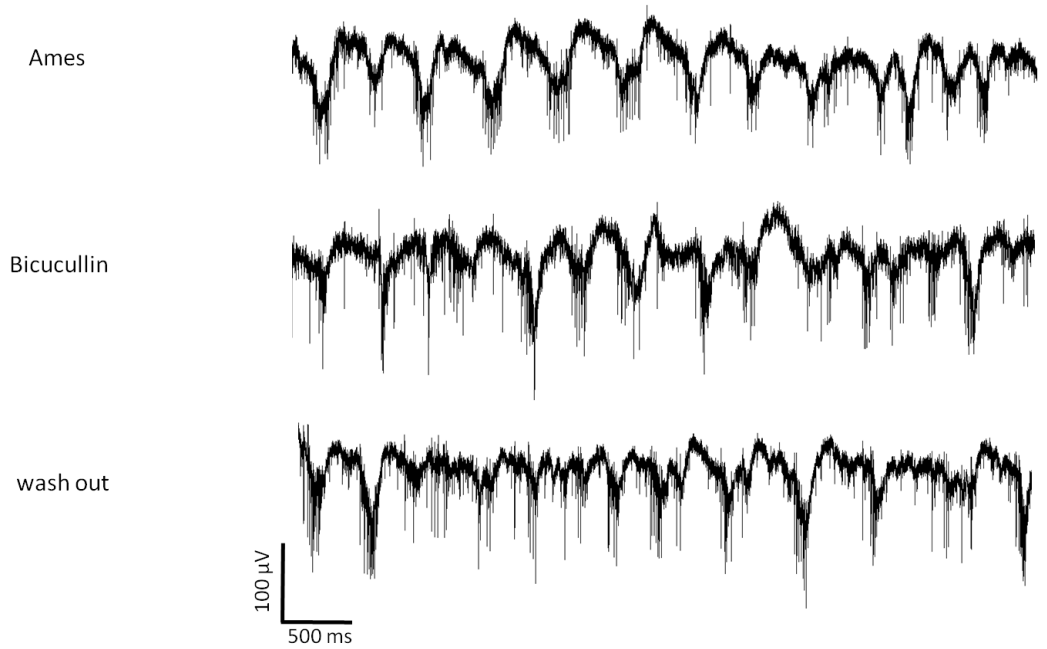

Abbildung 21: Einfluss von Bicucullin auf die Oszillationen in der degenerierten RCS Ratten Retina. Unter Kontrollbedingungen mit Ames Medium sind Oszillationen und Burstaktivität zu erkennen. Die Spontanaktivität scheint trotz Blockade der inhibitorischen $GABA_A$-vermittelten Signalwege unverändert. Das Gleiche gilt auch für den wash out. Die Retina wurde wie unter 2.2.2 beschrieben behandelt, anschließend wurden die Rohdaten wie unter 2.2.6.1 beschrieben gefiltert.

Die PSD-Analyse zeigt jedoch während der Perfusion mit Bicucullin eine leichte Veränderung. Im Kontrollansatz mit Ames ist ein deutlicher Peak bei 3 Hz sowie ein weiterer kleinerer Peak bei 5 Hz zu erkennen (siehe Abbildung 22). Werden die inhibitorischen GABA-vermittelten Signalwege durch Bicucullin blockiert, verschwindet der zweite Peak bei 5 Hz und der Anteil an Oszillationen mit einer Frequenz von 3 Hz ist mit 16% größer als unter Kontrollbedingungen (10%). Im wash out ähnelt die prozentuale Verteilung an Frequenzanteilen wieder denen unter Normalbedingungen (leicht erhöhter Anteil an Signalen mit einer Frequenz von 5 Hz, sowie ein Peak bei 3 Hz).

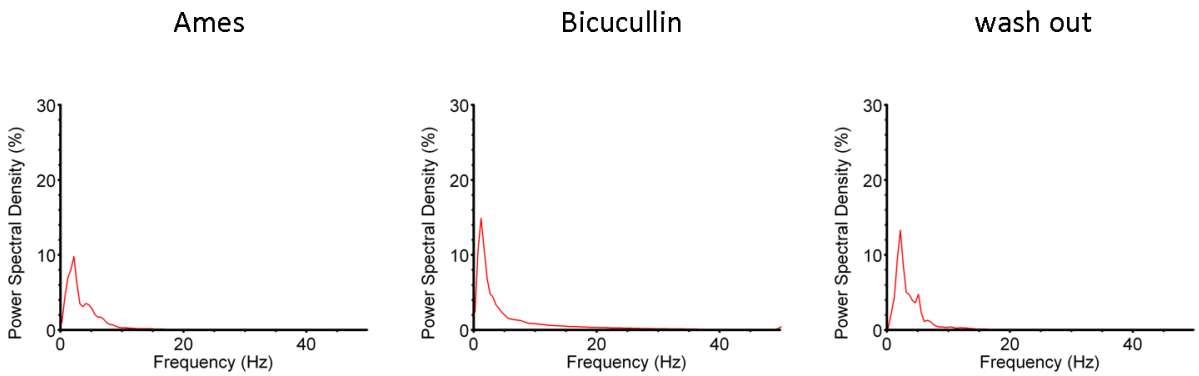

Abbildung 22: PSD-Analyse der mit Bicucullin perfundierten RCS Ratten Retina. Unter Kontrollbedingungen (Ames) ist neben einem deutlichen Peak bei 3 Hz ein zweiter erhöhter Anteil an Frequenzen von 5 Hz zu sehen. Wird die Retina mit dem Bicucullin perfundiert befindet sich der größte Teil der Signale in einen Frequenzbereich von 3 Hz mit einem darauffolgenden starken Abfall der Signalanteile bei steigender Frequenz. Im wash out ist wieder eine deutliche zweite Spitze bei 5 Hz zu erkennen. Die Retina wurde wie unter 2.2.2 beschrieben behandelt, anschließend wurden die Daten wie unter 2.2.6 beschrieben analysiert und mit einem 50 Hz Tiefpassfilter selektiert.

3.2.4 Behandlung mit Mix aus CNQX, D-AP5 und Bicucullin

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.2 und 3.2.3 zeigen die Auswirkung auf die Grundlinie und die Spikeaktivität der degenerierten RCS Ratten Retina, wenn man entweder die Glutamat-vermittelten exzitatorischen Signal- oder die $GABA_A$-vermittelten inhibitorischen Wege blockiert. In einem weiteren Ansatz wurde ein Cocktail aus allen verwendeten pharmakologischen Stoffen verwendet (siehe 2.2.1.2) und somit die Glutamat- und $GABA_A$-vermittelten Signale gleichzeitig blockiert.

Abbildung 23 zeigt, dass in Anwesenheit des Cocktails die Oszillationen deutlich reduziert sind und die Spontanaktivität vom Burstverhalten in ein gleichmäßiges Generieren von Einzelspikes wechselt.

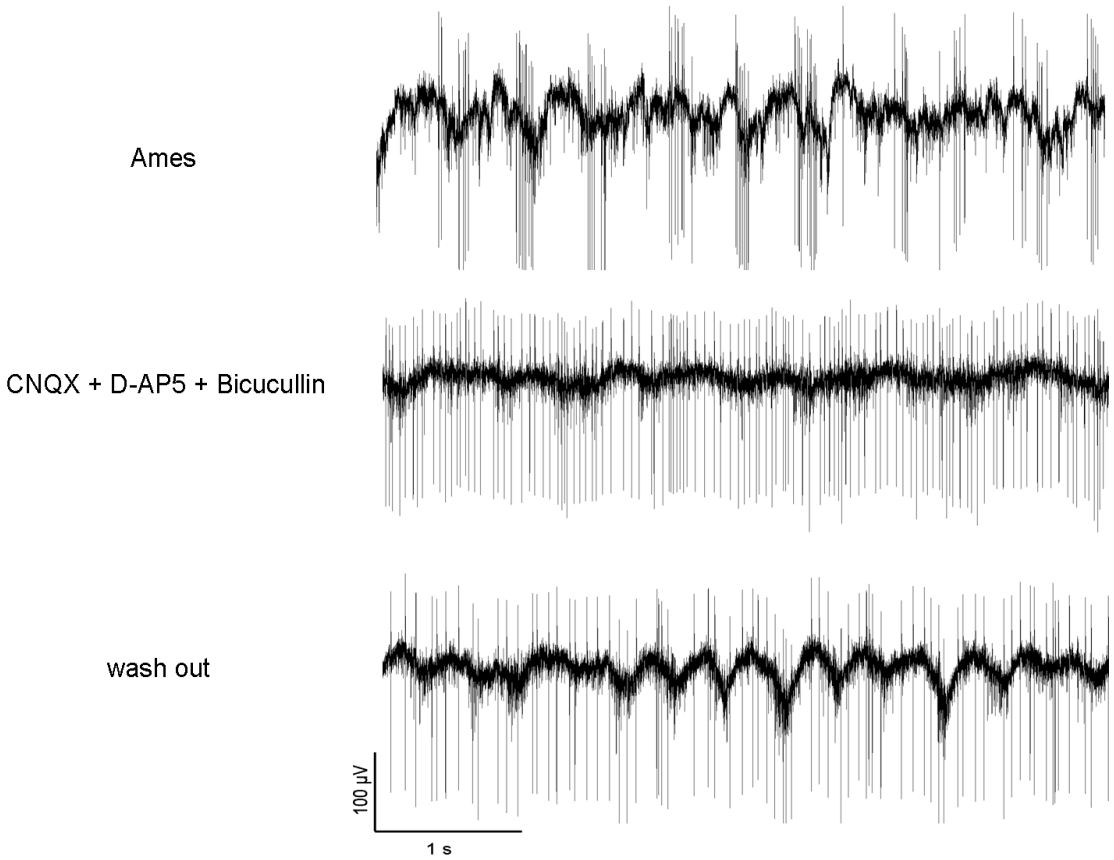

Abbildung 23:Gleichzeitige Perfusion der RCS Ratten Retina mit CNQX, D-AP5 und Bicucullin. Unter Kontrollbedingungen mit Ames Medium sind Oszillationen und Burstaktivität zu erkennen. Werden die iGluR mit CNQX und D-AP5 und gleichzeitig die $GABA_A$ vermittelten Signale mit Bicucullin blockiert, sind visuell keine slow waves mit ähnlicher Amplitude und Frequenze wie unter Ames Bedingungen zu detektieren. Zusätzlich geht das Burstverhalten in ein gleichmäßiges Abgeben von Einzelspikes über. Die, wie unter Anfangsbedingungen sichtbaren Oszillationen, kehren zurück, sobald das Gewebe mit Ames gespült wird. Auch das Generieren der Spikes in Bursts erscheint wieder. Die Retina wurde wie unter 2.2.2 beschrieben behandelt, anschließend wurden die Rohdaten wie unter 2.2.6.1 beschrieben gefiltert.

Die Analyse des Frequenzspektrums ergibt unter Kontrollbedingungen mit Ames Medium einen Peak bei 3 Hz (siehe Abbildung 24). Werden sämtliche verwendeten synaptischen Blocker gleichzeitig eingesetzt, ist weiterhin ein Peak bei 3 Hz zu erkennen, jedoch ist der Anteil von 28% auf 5% vermindert. Werden die synaptischen Blocker mit Ames ausgespült steigt der Anteil der 3 Hz Signale wieder an (wash out).

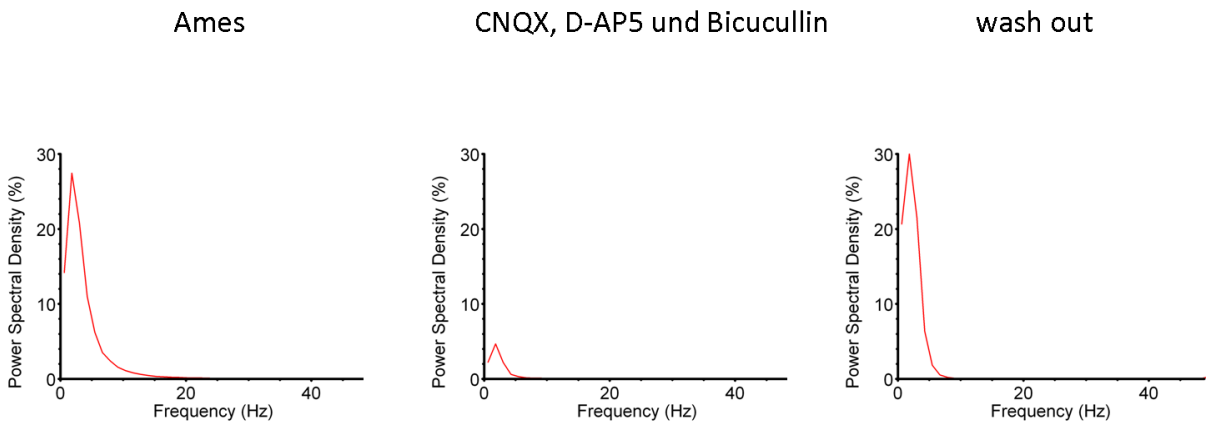

Abbildung 24: PSD-Analyse der mit CNQX, D-AP5 und Bicucullin gespülten RCS Retina. Unter Kontrollbedingungen (Ames) ist ein Peak bei 3 Hz zu sehen. Wird die Retina mit dem Cocktail aus D-AP5, CNQX und Bicucullin gespült verringert sich der Anteil an 3 Hz-Signalen von 28% auf 5%. Im wash out mit Ames steigt der Anteil an Signalen mit einer Frequenz von 3 Hz wieder an. Die Retina wurde wie unter 2.2.5.3 beschrieben behandelt, anschließend wurden wie unter 2.2.6 beschrieben die Rohdaten mit einem 50 Hz Tiefpassfilter selektiert.

3.3 Epiretinale Stimulation der Retina

3.3.1 Vorversuch zur Stimulierbarkeit von retinalen Ganglienzellen

Mithilfe von Vorversuchen wurden geeignete Stimulationsparameter gesucht, die sowohl in den GZ der RCS Retina als auch in den GZ der Wistar Retina Spikes evozieren. Zur Vergleichbarkeit wurden immer die Zellen in direkter Nachbarschaft zur Stimulationselektrode betrachtet und die Gesamtzahl der Zellen auf 100% normalisiert (siehe 2.2.5.1). Pro Tiermodelle wurde eine Retina an 2-3 verschiedenen Positionen stimuliert. Das Alter der Tiere betrug 5 Monate für die Wistar Ratte und 4 Monate für die RCS Ratte.

Allgemein konnten mit der gleichen Impulskonfiguration (siehe Abschnitt 2.2.5) in der Wistar Ratte signifikant mehr GZ stimuliert werden als in der degenerierten RCS Retina. Abbildung 25 zeigt, dass in Bezug auf die Pulsdauer im Mittel 15,4% (SEM ± 7,2, $p = 0{,}0447$, statistische Auswertung siehe 2.2.6.5) mehr Ganglienzellen im Wt als in der RCS Retina stimuliert werden. Vergleichbares gilt für die Stimulationsintensität: Im Mittel werden hier 15,5% (SEM ± 7,3, $p = 0{,}0452$) mehr Neurone stimuliert als in der RCS Retina.

Die Erhöhung der Impulsdauer noch der Impulsintensität führte in der Wistar und RCS Retina zu einer höheren Anzahl an stimulierten GZ (siehe Abbildung 25; $p \geq 0{,}05$).
Für die Berechnung wurde jeder Zelle als unabhängig betrachtet, da keine direkte Verbindung nachweisbar ist. Für die Auswertung wurde die prozentuale Menge an stimulierten Zellen pro µA bzw. ms Größe aus der Gesamtanzahl an Zellen angrenzend zur Stimulationselektrode berechnet. Beispiel: Bei 20µA und 100 ms konnten in 40% der Zellen angrenzend an die Stimulationselektrode eine Antwort evoziert werden.

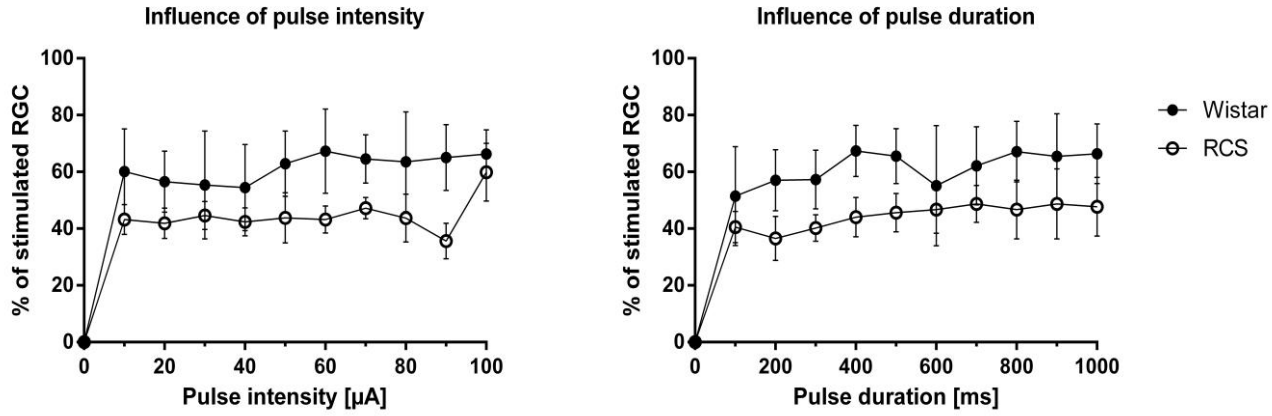

Abbildung 25: Vergleich der Stimulationseffizienz von RCS und Wistar Ganglienzellen. Gezeigt ist der Einfluss der A) Impulsintensität und B) der Impulsdauer auf die Stimulationseffizienz. Die Stimulationseffizienz ist in Prozent stimulierter GZ angezeigt, wobei 100% die Gesamtzahl an Ganglienzellen ist, die von den Elektroden in direkter Nachbarschaft zur Stimulationselektrode gemessen wurden (siehe Abbildung 26). Die Anzahl an stimulierten Neuronen ist im Wildtypen immer größer als in der RCS Retina. Es konnte jedoch weder in der Wistar noch in der RCS Retina ein signifikanter Anstieg der stimulierten Zellen mit zunehmender Intensität bzw. Dauer des Impulses festgestellt werden. Für die Berechnung wurde die Gesamtanzahl an stimulierten Zellen pro µA bzw. ms Größe einbezogen. Erläuterungen siehe Text.

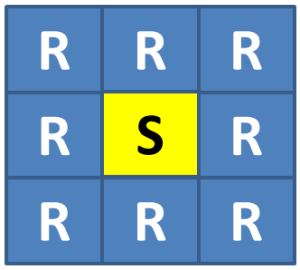

Abbildung 26: Anordnung der Aufnahmeelektrode R zur Stimulationselektrode S. Für den Vorversuch zur Stimulierbarkeit der Elektrode, wurden immer die Antwort der Ganglienzellen in direkter Nachbarschaft zur Stimulationselektrode betrachtet.

3.3.2 *Epiretinale Stimulation von GZ evoziert drei Antwortmuster in der degenerierten RCS Ratten Retina*

Die elektrische Stimulation (siehe Abschnitt 2.2.5.1.) der degenerierten RCS Ratten Retina ruft drei unterschiedliche Antwortmuster hervor. Sie können anhand ihrer Latenz nach dem Stimulus und der Anzahl an evozierten Spikes in direkte Antwort, „OFF-Antwort“ und „Delayed-Antwort“ unterschieden werden (siehe Abbildung 27). Für die Berechnung der Latenz des jeweiligen Antwortmusters, wurde die Latenz nach dem Stimulus bis zum ersten Spike bei Einzelspike-Antworten oder bis zur Mitte des Burst für Burst-Antworten gemessen. Anschließend wurden alle gemessenen Werte des jeweiligen Antwortmusters gemittelt.

Das erste Muster ist die direkte Antwort unmittelbar nach dem Stimulationsimpuls (Latenz im Mittel 24,4 ms ± 2,7 SD; n= 19; siehe Tabelle 5). Während im Wildtyp nur Einzelspike-Antworten detektiert werden konnten, kann die direkte Antwort der RCS Retina GZ mithilfe der Anzahl an evozierten Spikes in eine Einzelburst-, eine Bursty- oder eine Einzelspike-Antwort unterteilt werden (siehe Abbildung 27 a-c).
Die Einzelspike-Antwort wurde im Mittel mit einer Latenz von 20,4 ms (± 6,4; n=7) nach Stimulationsbeginn detektiert. Einzelburst-Antworten sowie Bursty-Antworten besitzen vergleichbare Latenzen: Einzelburst: 22,5 ms ± 4,6; n=8; Bursty: 26,3 ms ± 11.1; n=4 (siehe Tabelle 5 und Abbildung 27; statische Auswertungsmethoden siehe Abschnitt 2.2.6.5).

Die mittlere Burstdauer für die Einzelburst-Antwort beträgt 18,8 ms ± 6,8. Damit ist sie kürzer als die Dauer des ersten Bursts der Bursty-Antwort (23,6 ms ± 8,0). Im Vergleich der Anzahl an Spikes innerhalb eines Bursts sind in der Einzelburst-Antwort 3,6 Spikes ± 2,3 und im ersten Burst der Bursty-Antwort (2,5 ± 0,4 vorhanden). Ein signifikanter Unterschied konnte nicht festgestellt werden (Daten siehe Tabelle 5, Auswertungsmethode siehe Abschnitt 2.2.6.5.).

Der zweite Antworttyp ist die „OFF-Antwort". Diese ist charakterisiert durch eine Verminderung oder ein Aussetzen der Spontanaktivität für 54,4 ms (± 49,9; n = 14, siehe Abbildung 27 d und Tabelle 5) direkt nach dem Stimulationsimpuls. Dieses Antwortmuster wurde nicht in der Wildtyp-Kontrolle beobachtet (Auswertungsmethode siehe Abschnitt 2.2.6.5.).

Das dritte Antwortmuster ist die verzögerte Antwort, die sog. „Delayed-Antwort“ welche ebenfalls nicht im Wt beobachtet werden konnte. Dieses Antwortmuster besteht aus zwei Komponenten. Bei der frühen Phase, unmittelbar nach der Stimulation, kann es sich entweder um eine verminderte Aktivität, ein Aussetzen der Spontanaktivität oder eine unveränderte Aktivität handeln. Die zweite Phase besteht entweder aus einem einzigen Spike oder einer erhöhten Spikeaktivität (Abbildung 27 e -g). Hierbei können entweder Einzelspikes, Einzelburst oder mehrere Bursts (Bursty) auftreten. Das gemeinsame Merkmal ist die verzögerte Reaktion, welche im Mittel 150,7 ms (± 72,8; n=13; siehe Tabelle 5) nach dem Stimulus erfolgt.

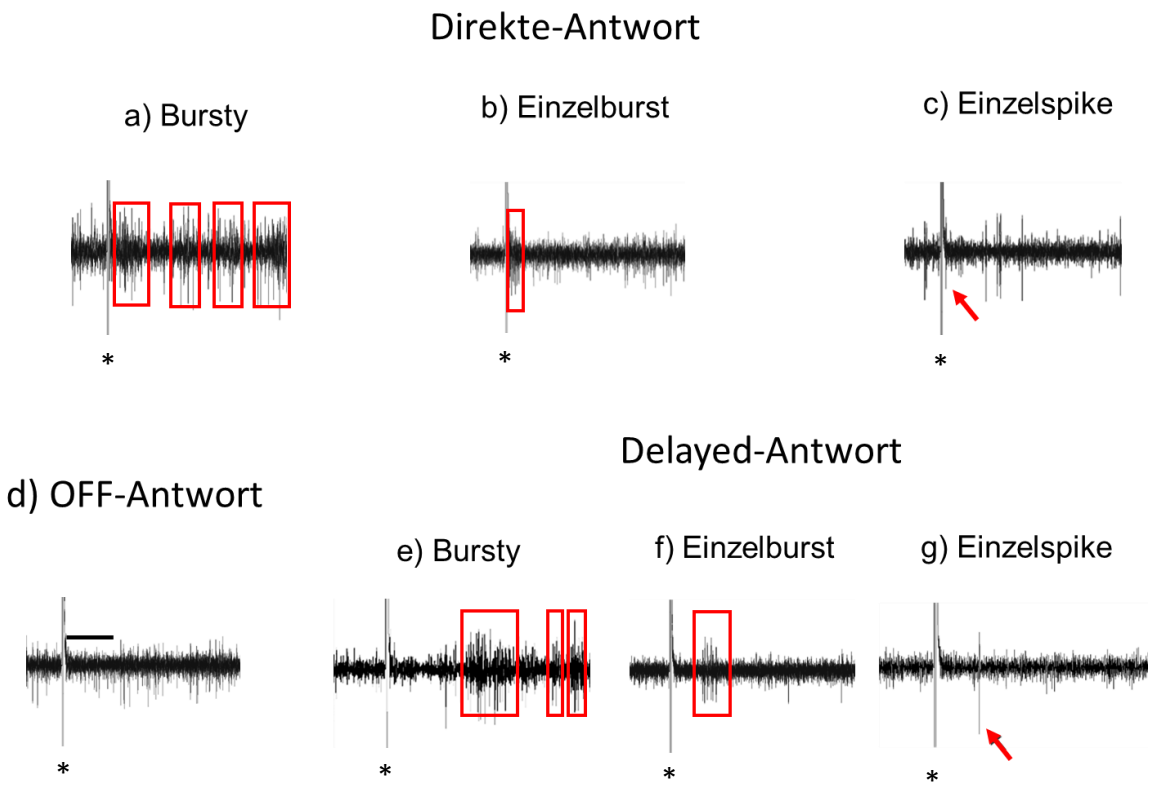

Abbildung 27: Durch epiretinale Stimulation evozierte Muster in GZ der degenerierten RCZ Retina. Alle Antworten wurden mit einem biphasischen Stromimpuls evoziert (gekennzeichnet durch *; siehe Abschnitt 2.2.5.1). a-c) zeigen das direkte Antwortmuster. Dieses Muster kann unterteilt werden anhand der Anzahl an hervorgerufenen Spikes in Einzelspike, Einzelburst und Bursty-Antworten. Das OFF-Antwortmuster in d) ist oft durch eine verminderte oder ein Aussetzen der Spontanaktivität gekennzeichnet. Die Delayed-Antwort (e)-g) besteht aus zwei Phasen: Einer verminderten Spontanaktivität mit darauffolgender Einzelspike- ( ), Einzelburst- oder Bursty-Antwort). Dargestellt sind 0,1 s vor sowie 0,5 s nach der Stimulation. Statistische Eigenschaften siehe Tabelle 5.

Die Einzelspike-Antwort tritt nach 85 ms (± 46; n=2; siehe Tabelle 5) auf, die Einzelburst-Antwort nach 138,1 ms (± 85,5; n=7) und der erste Burst der Bursty-Antwort nach 229 ms (± 48,6; n=4). Wie bei den direkten Burst-Antworten ist die Burstdauer der Einzelburst-Antwort kürzer (76,4 ms ± 46,5) als die der Bursty-Antwort (100 ms ± 30,7). Ebenso ist die Anzahl der Spikes in der Einzelburst-Antwort höher (7,2 ms ± 4,0) als im ersten Burst der Bursty-Antwort (6,2 ± 3,2; Daten siehe Tabelle 5, Auswertungsmethode siehe Abschnitt 2.2.6.5.).

3.3.3 Hemmung der exzitatorischen Signalwege

Aufgrund der Diversität der Antwortmuster ist nicht auszuschließen, dass außer den retinalen Ganglienzellen auch Neurone anderer retinaler Schichten stimuliert werden. Um festzustellen, ob die epiretinale elektrische Stimulation die GZ direkt und/oder indirekt durch die Aktivierung von Bipolar- und/oder Amakrinzellen stimuliert, wurden die über ionotrope Glutamatrezeptoren vermittelten exzitatorischen Signalwege zwischen Bipolaren-, Amakrinen- und Ganglienzellen mit CNQX und D-AP5 inhibiert (siehe 1.5.1 und 2.2.1.2) [85].

Auch unter dieser Bedingung konnten alle drei Antwortmuster und deren Subtypen erfasst werden (siehe Abbildung 28).

Wie in Tabelle 6 aufgelistet beträgt die Latenz der direkten Einzelspike-Antwort 17,5 ms ± 1,0; n=3 und des ersten Bursts der Bursty-Antwort 25 ms ± 17,6; n=2 in Anwesenheit von CNQX und D-AP5 Für die Einzelburst-Antwort ist ein signifikanter Zeitunterschied (Latenz: 28,5 ms ± 2,2; n=5 p = 0,0215; statistische Methoden siehe Abschnitt 2.2.6.5) zu den Stimulationen in Ames-Medium zu erkennen. Im Vergleich der Mittelwerte der direkten Antworten, konnte keine signifikante Differenz zwischen den Experimenten mit Ames und des Cocktail gemessen werden (mittlere Latenz Direktantworten mit Blockercocktail: 26,8 ms ± 2,5; siehe Tabelle 6 und Abschnitt 2.2.6.5). Für die Bursty-Antworten ist die Anzahl der Spikes innerhalb des ersten Burst und die Burstdauer ebenfalls vergleichbar mit den Ergebnissen in Anwesenheit von Ames (Spikes/Burst: 2,8 ± 2,0, Dauer: 34,5 ms ± 20,5; siehe Tabelle 6). Interessanterweise erhöht sich jedoch die Dauer der einzelnen Bursts signifikant von 18,8 ms auf 54,6 ms ± 9,0

($p < 0{,}0001$; siehe Tabelle 6 und Abschnitt 2.2.6.5). Auch die Anzahl der Spikes innerhalb des ersten Bursts erhöht sich signifikant von 3,6 auf 5,9 ± 1,4 (siehe Tabelle 6).

Im Fall der OFF-Antwort verlängert sich die Dauer der verminderten Spontanaktivität in Anwesenheit der Blocker um das Dreifache von 54,4 ms auf 158,3 ms (SD ±92,9, n = 3; Statistik siehe Abschnitt 2.2.6.5).

Durch die Blockade der exzitatorischen Signalwege sind in der RCS Ratten Retina die Delayed-Antworttypen nicht so vorherrschend wie unter Standardbedingungen. So konnten keine delayed-Einzelburst-Antworten detektiert werden. Eine Einzelspike-Antwort konnte nur einmal mit einer dreifach erhöhten Latenz (268 ms) gemessen werden.
Im Gegensatz dazu ist kein Unterschied der Latenzen (246 ms ± 21,1; n=3, siehe Tabelle 6) und Dauer (88,3 ms ± 20,8) der Bursty-Antwort zu beobachten. Im Vergleich der Anzahl an Spikes im ersten Burst ist, von 6,2 auf 2,6 ± 0,8, ebenfalls kein Unterschied festzustellen ($p = 0{,}1197$, siehe Tabelle 6 und Abschnitt 2.2.6.5).

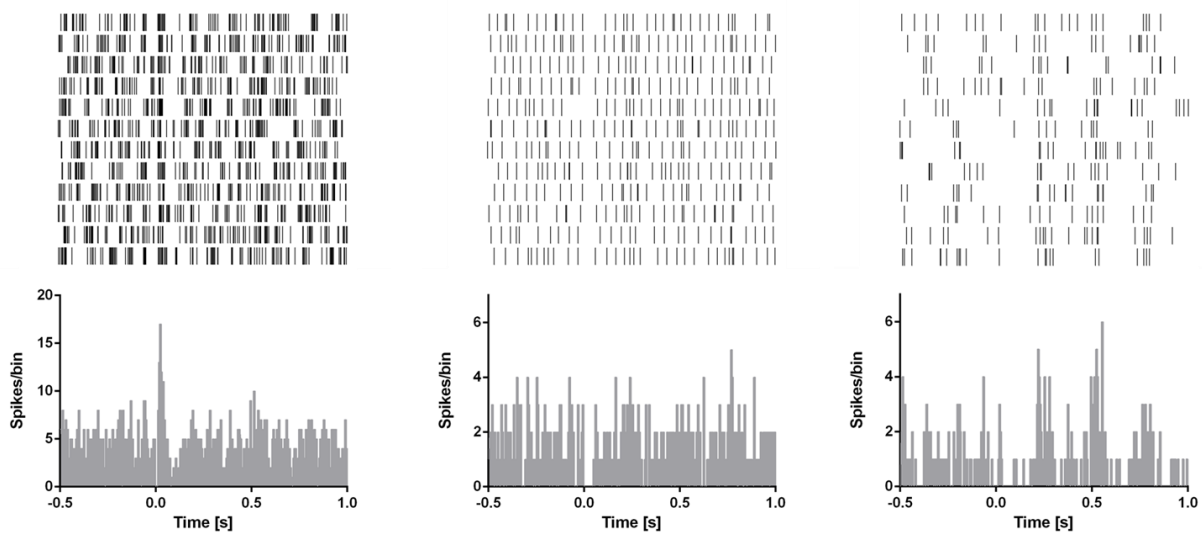

Abbildung 28: Peri-event Raster Plot und Histogramm in Anwesenheit von CNQX und D-AP5. Die Abbildung zeigt die Antwortmuster von drei repräsentativen retinalen RCS Ratten Ganglienzellen auf 15 Einzelstimulationen (v.l. Direkte Antwort, OFF-Antwort und Delayed-Antwort). Oben sind die einzelnen Stimulationen in einem Peri-event Raster dargestellt. Das Histogramm darunter zeigt die gemittelten Werte der einzelnen Durchgänge. Die Stimulation erfolgte durch einen biphasischen Einzelimpuls zum Zeitpunkt „0“. Die Graphen zeigen die Spikeaktivität 0,5 s vor bis 1,0 s nach dem Stimulus unter Blockade der exzitatorischen Signalwege. Binweite: 5 ms. Während und bis zu 600 µs nach der Strominduktion war die Stimulationselektrode vom Verstärker des Aufnahmegeräts entkoppelt (Blanking), um Stimulationsartefakte zu verhindern. Stimmulationsparameter siehe Abschnitt 2.2.5.1, Blocker siehe 2.2.1.2.

3.3.4 Hemmung des GABAergen-Signalweges vermindert die OFF- und Delayed-Antwort

Um zu prüfen ob GABAerge Signale an den Antwortmustern beteiligt sind, wurde der GABA-Antagonist Bicucullin verwendet (siehe 1.5.2) [7, 62, 49].

Im Vergleich zu den Bedingungen unter Ames sind in Gegenwart von Bicucullin nur die direkten Antwortmuster zu erkennen. Abbildung 29 A zeigt ein Beispiel einer OFF-Antwort GZ, wenn die Netzhaut mit Ames Medium perfundiert wird. Wird der hemmende Signalweg durch Bicucullin blockiert, ist eine deutliche Steigerung der Spikeaktivität direkt nach der Stimulation zu beobachten (siehe Abbildung 29 B)). Das gleiche gilt für das verzögerte Delayed-Antwortmuster (siehe Abbildung 30).
Im Durchschnitt erscheinen die Antworten in Anwesenheit von Bicucullin
28,1 ms ± 1,8 (n=21; siehe Tabelle 7 und Abschnitt 2.2.6.5) nach der Stimulation.

Interessanterweise gibt es eine signifikante Differenz bei den Antwortlatenzen in Anwesenheit von Bicucullin- und Ames , wohingegen es keine statistisch signifikante Differenz zu den Experimenten in Anwesenheit von CNQX + D-AP5 gibt (siehe Abbildung 31, Tabelle 5 bis Tabelle 7 und Abschnitt 2.2.6.5). Der Großteil der evozierten Antworten sind Einzelburst-Antworten mit einer Latenz von 29,4 ms ± 6,8 (n=16; siehe Tabelle 7). Die Anzahl der Spikes innerhalb des Bursts beträgt durchschnittlich 5,1 ± 3,5 (siehe Tabelle 7) und entspricht damit in etwa der Anzahl an Spikes, wenn die Retina mit CNQX + D-AP5 bzw. Ames durchströmt wird (siehe Tabelle 5 bis Tabelle 7). Im Vergleich der Burstdauer wurde ein signifikanter Unterschied zu den Experimenten mit Ames, aber nicht zu den Experimenten mit CNQX + D-AP5 gemessen. Einzelspikes erscheinen 26,8 ms ± 11,1 (n=5; siehe Tabelle 7) nach der Stimulation.

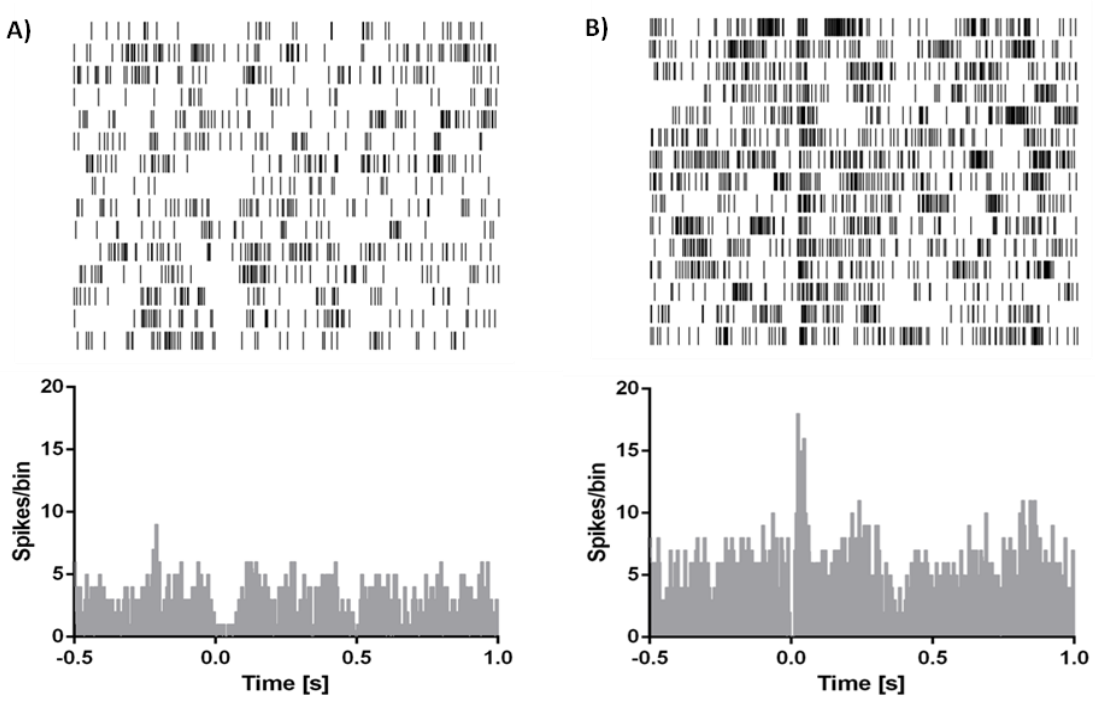

Abbildung 29: Peri-event Raster Plot und Histogramm einer repräsentativen OFF-Antwort Ganglienzelle in Anwesenheit von Bicuculin. Das Peri-event Raster zeigt die Antworten einer repräsentativen RCS Ratten Ganglienzelle auf 15 Einzelstimulationen. Das Histogramm zeigt die gemittelten Werte der einzelnen Durchgänge. Es wurde immer mit einem biphasischen Einzelimpuls zum Zeitpunkt „0“ stimuliert. Die Graphen zeigen die Spikeaktivität 0,5 s vor bis 1,0 s nach dem Stimulus unter Blockade der inhibitorischen $GABA_A$-vermittelten Signalwege. Binweite: 5 ms. A) zeigt eine exemplarische OFF-GZ-Antwort. Wird die $GABA_A$-vermittelte inhibitorische Signalweiterleitung gehemmt ist eine deutliche Antwort direkt nach dem Stimulus zu erkennen (B). Während und bis zu 600 µs nach der Strominduktion war die Stimulationselektrode vom Verstärker des Aufnahmegeräts entkoppelt (Blanking), um Stimulationsartefakte zu verhindern. Stimulationsparameter siehe Abschnitt 2.2.5.1, Blocker siehe 2.2.1.2.

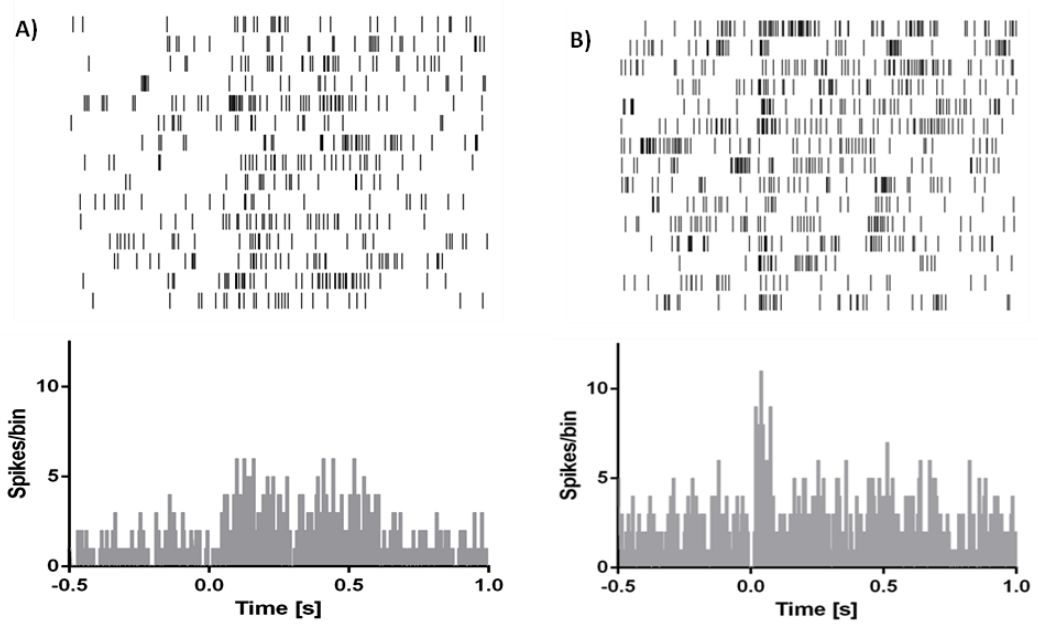

Abbildung 30: Peri-event Raster Plot und Histogramm einer repräsentativen Delayed-Ganglienzelle in Anwesenheit von Bicucullin. Das Peri-event Raster zeigt die Antworten einer repräsentativen RCS Ratten Ganglienzelle auf 15 Einzelstimulationen. Das Histogramm zeigt die gemittelten Werte der einzelnen Durchgänge. Es wurde immer mit einem biphasischen Einzelimpuls zum Zeitpunkt „0“ stimuliert. Die Graphen zeigen die Spikeaktivität 0,5 s vor bis 1,0 s nach dem Stimulus unter Blockade der inhibitorischen $GABA_A$-vermittelten Signalwege. A) zeigt eine exemplarische Delayed-GZ-Antwort. Wird die $GABA_A$-vermittelte inhibitorische Signalweiterleitung gehemmt ist eine deutliche Antwort direkt nach dem Stimulus zu erkennen (B). Binweite: 5 ms. Während und bis zu 600 µs nach der Strominduktion war die Stimulationselektrode vom Verstärker des Aufnahmegeräts entkoppelt (Blanking), um Stimulationsartefakte zu verhindern. Stimulationsparameter siehe Abschnitt 2.2.5.1, Blocker siehe 2.2.1.2.

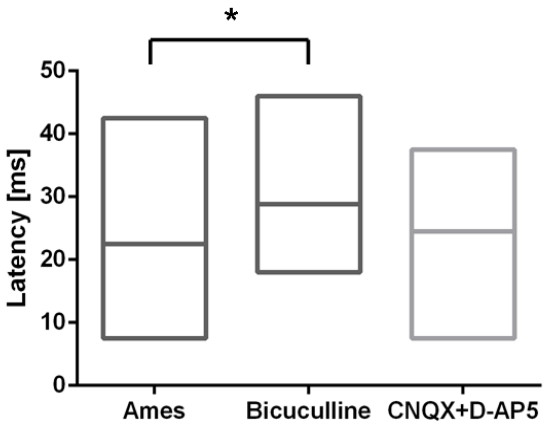

Abbildung 31: Vergleich der Latenzen der direkten Antwortmuster. Im Mittel ist in Gegenwart von Bicucullin die Latenz der Antworten am höchsten und signifikant unterschiedlich zu Ames. Die Experimente mit dem Cocktail aus CNQX und D-AP5 zeigen keinen signifikanten Unterschied zu den Latenzen der anderen Experimente. Darstellung: Horizontale Line: Mittelwert; Boxoberkante = 75%, Boxunterkante = 25%. Statistische Auswertung siehe Abschnitt 2.2.6.5; Werte siehe Tabelle 5 - Tabelle 7.

3.3.4.1 Einfluss von CNQX und D-AP5 bei gleichzeitiger Blockade der inhibitorischen Signalwege

Wird die degenerierte Retina gleichzeitig mit sämtlichen verwendeten synaptischen Blockern gespült (siehe 2.2.1.2.) zeigt sich ein vergleichbares Ergebnis wie in Anwesenheit von Bicucullin. Sowohl OFF- als auch Delayed-Antworten sind unter den Bedingungen ebenfalls nicht mehr vorhanden. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben sind der Großteil der Antworten auch unter diesen Bedingungen Burst-Antworten (siehe Abbildung 32 und Abbildung 33).

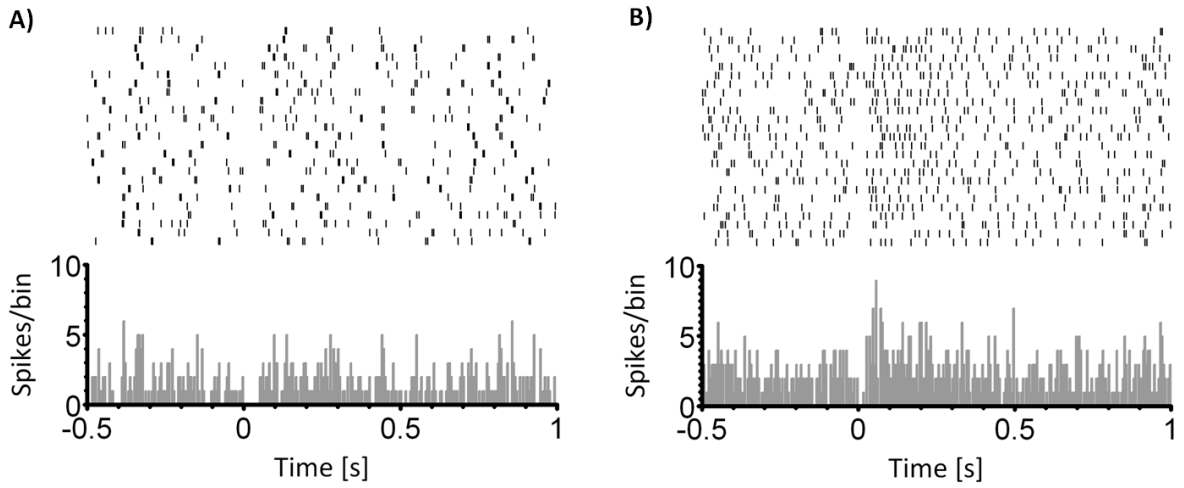

Abbildung 32: PSTH RCS OFF-Antwort in Gegenwart von CNQX + D-AP5 und Bicucullin. Das Peri-event Raster zeigt die Antworten von einer repräsentativen RCS Ratten Ganglienzelle auf 25 Einzelstimulationen. A) zeigt eine exemplarische OFF-Antwort GZ. Wird die Signalweiterleitung blockiert, ist eine deutliche Antwort direkt nach dem Stimulus zu erkennen (B). Das Histogramm zeigt die gemittelten Werte der einzelnen Durchgänge. Es wurde immer mit einem biphasischen Einzelimpuls zum Zeitpunkt „0“ stimuliert. Die Graphen zeigen die Spikeaktivität 0,5 s vor bis 1,0 s nach dem Stimulus unter gleichzeitiger Blockade der inhibitorischen $GABA_A$-vermittelten und exzitatorischen Glutamat-vermittelten Signalwege. Binweite: 5 ms. Während und bis zu 600 µs nach der Strominduktion war die Stimulationselektrode vom Verstärker des Aufnahmegeräts entkoppelt (Blanking), um Stimulationsartefakte zu verhindern. Stimulationsparameter siehe Abschnitt 2.2.5.1, Blocker siehe 2.2.1.2.

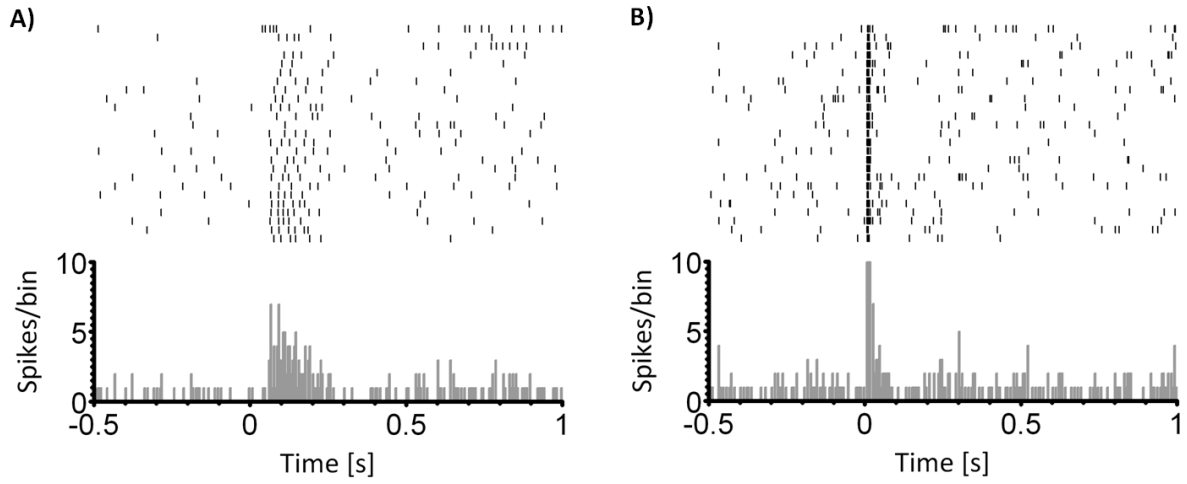

Abbildung 33: PSTH RCS Delayed-Antwort in Gegenwart von CNQX + D-AP5 und Bicucullin. Das Peri-event Raster zeigt die Antworten von einer repräsentativen RCS Ratten Ganglienzelle auf 25 Einzelstimulationen. A) zeigt eine exemplarische Delayed-Antwort GZ. Wird die Signalweiterleitung blockiert, ist eine deutliche Antwort direkt nach dem Stimulus zu erkennen (B). Das Histogramm zeigt die gemittelten Werte der einzelnen Durchgänge. Es wurde immer mit einem biphasischen Einzelimpuls zum Zeitpunkt „0“ stimuliert. Die Graphen zeigen die Spikeaktivität 0,5 s vor bis 1,0 s nach dem Stimulus unter gleichzeitiger Blockade der inhibitorischen $GABA_A$-vermittelten und exzitatorischen Glutamat-vermittelten Signalwege. Binweite: 5 ms. Während und bis zu 600 µs nach der Strominduktion war die Stimulationselektrode vom Verstärker des Aufnahmegeräts entkoppelt (Blanking), um Stimulationsartefakte zu verhindern. Stimulationsparameter siehe Abschnitt 2.2.5.1, Blocker siehe 2.2.1.2.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften retinaler Ganglienzellen in der degenerierten Rattennetzhaut untersucht. Hierbei lag der Fokus auf Experimenten zur Spontanaktivität und zur Stimulierbarkeit der Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass das Absterben der Photorezeptoren einen starken Einfluss auf die Spontanaktivität der retinalen Ganglienzellen hat. Extrazelluläre Ableitungen von RCS Ratten Ganglienzellen zeigten ein verändertes Spikeverhalten sowie oszillatorische Komponenten, sogenannte slow waves, welche in RGZ gesunder Vergleichstiere nicht detektiert werden konnten. Darüber hinaus konnten in weiterführenden Stimulationsexperimenten unterschiedliche Antwortmuster (OFF, delayed sowie Formen der Direkt-Antwort), evoziert werden, die im Wt nicht auftraten. Um der Frage nachzugehen, wie diese Veränderungen in der Elektrophysiologie zu deuten sind, wurden die retinalen Signalwege mit pharmakologischen Stoffen blockiert und die Auswirkung analysiert.

4.1 Im Verlauf der Degeneration nimmt die Spikeaktivität in der RCS Ratte ab

Im ersten Monat *post natal* ist die Spontanaktivität in beiden Tiermodellen gleich (siehe Abbildung 12). Dies ist auf ihre gleiche Entwicklung zurückzuführen. Zwar beginnt um PND 20 die Degeneration der ersten Stäbchen, da es sich aber noch um ein sehr frühes Stadium handelt, ist der Einfluss auf die Entwicklung statistisch nicht ersichtlich. Eine umfangreichere Studie, die Abweichungen tageweise in Woche vier *post natal* dokumentiert, könnte hier genauere Erkenntnisse liefern. Ob der Unterschied in der Degeneration der Retina signifikant ist, bleibt zu bezweifeln, da ein Unterschied selbst im darauffolgenden Stadium nicht gemessen werden konnte. Rösch *et al.* zeigt in der optischen Kohärenztomographie (Optical coherence tomography, OCT) und immunhistologischen Untersuchungen, dass bis Woche 4 *post natal* die äußere retinale Schicht zu erkennen ist. In den darauffolgenden Altersstufen wird eine Unterscheidung zwischen ONL und der inneren Retina zunehmend schwierig bis nicht erkennbar ab 4 Monat *post natal [69]*.
Im Vergleich der Altersstufen 3-4 Monate *post natal* ist der etwas kleiner Wert der mittleren Spikeaktivität in den GZ der RCS Ratte nicht signifikant unterschiedlich zum Wildtyp (siehe 3.1.1). Eine vertiefende Studie mit kürzeren Messabständen könnte auch hier einen detaillierteren Einblick über den Einfluss der Photorezeptordegeneration auf die

Spontanaktivität geben. Besonders die Wochen 6-12 wären hierbei interessant, da in diesem Zeitraum Stäbchen und Zapfen gleichzeitig absterben und ab einem Punkt innerhalb dieses Zeitraums auch keine Unterscheidung der Schichten mittels OCT mehr durchgeführt werden kann [44, 69]. Sollte das Remodeling in der RCS Ratten Retina vergleichbar mit den Abläufen in der *rd* 10 Maus stattfinden, müssten in diesem Alter die entscheidenden Phasen des Remodeling ablaufen (siehe 1.6)[44, 66]. Aufgrund der Umbauprozesse könnte zu diesem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied der mittleren Spikeaktivität messbar sein. Interessanterweise kann bei Tieren älter als 5 Monate, im Vergleich der Aktivität zu Tieren im Alter von 1 Monat, eine signifikant niedrigere Spikerate in den GZ der RCS Retina gemessen werden.
In der Wistar Ratte ist kein signifikanter Abfall von Monat eins *post natal* zu den Tieren älter 3 Monate festzustellen. Danach ist die Spikerate in den gemessenen GZ stabil (siehe Abbildung 12). Somit konnte nur in der RCS Ratte ein kontinuierlicher Abfall der Spikeaktivität über die Altersstufen gemessen werden.

Abbildung 16 zeigt die deutliche morphologische Veränderung des Augeninneren einer 11 Monate alten RCS Ratte. Mehrere Blutgefäße sind verdickt und penetrieren die Retina. Wang et al. publizierten, dass es in der Retina von RCS Ratten ab der Altersstufe 2 Monate zu einer Neovaskularisation kommt [82]. Dabei durchziehen neue Blutgefäße alle Schichten der Retina und lagern sich auch auf der RGZ-Schicht ab. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass es zwischen den Blutgefäßen und den Axonen retinaler GZ Kontaktpunkte gibt. An diesen Kontaktpunkten schnüren die Blutgefäße die Axone ab, wodurch zunächst die Fortsätze und schließlich die gesamte Zelle absterben [82, 83]. Mit fortschreitendem Alter nimmt die Anzahl dieser Abschnürungen zu und somit die Anzahl intakter GZ ab. Fluoreszenzangiographien zeigen, dass ab einem Alter von 8 Monate eine erhöhte Anzahl an Blutgefäßen im Vergleich zum Wildtyp vorhanden ist und diese Netzwerk weiter wächst mit fortschreitendem Alter [69].
In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen fällt auf, dass es bei Tieren, die 9 Monate oder älter waren, häufig nicht mehr möglich war, Aktionspotenziale zu detektieren (siehe 3.1.2 und 3.1.3). Die fortschreitende Abschnürung der Axone von GZ könnte eine Erklärung sein, warum besonders in den hohen Altersstufen der RCS Ratte eine signifikante Abnahme in der Aktivität gemessen wurde und zweitens, warum der Anteil an GZ mit einer

mittleren Spikerate unter 1 Hz im Verlauf der Degeneration auf 70 % ansteigt. Im Gegensatz dazu sinkt im Wt der Anteil an gemessenen niederfrequenten Zellen (siehe Abbildung 13).

Stasheff et al. führten eine ähnliche Studie mit der *rd*1 und *rd*10 Maus durch. Sie publizierten jedoch eine kontinuierlich höhere Spikerate in den GZ der degenerierten Tiere als im Wt. Die Differenz zwischen den dystrophen und nicht dystrophen Tieren vergrößerte sich sogar mit zunehmendem Alter [74]. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass es bei den *rd*-Mäusen keine Neovaskularisation gibt bzw. es nicht zu einem Absterben der GZ im Laufe der Degeneration kommt. Da hierzu keine Publikation gefunden werden konnte, würde auch hier eine Studie zur Frage, inwieweit sich die Degenerationen zwischen den Versuchsmodellen unterscheiden, hilfreiche Erkenntnisse liefern.
Ein anderer Aspekt kann eine unterschiedliche Datenauswertung sein. Stasheff könnte in seiner Stichprobe nur Zellen eingebunden haben, die die typischen Abweichungen wie Burstaktivität und Oszillation zeigten. Damit wären Neurone die ihre Spikes mit einer niedrigen Frequenz abgeben ausgeschlossen und es würde sich dann eine konstant höhere Spikerate ergeben [74]. In dieser Arbeit wurde der durchschnittliche Wert aller GZ berücksichtigt, die während der Aufnahmedauer von 3 -5 min Aktivität zeigten. Somit wurden sowohl Bursty Neurone als auch nicht Bursty Neurone eingerechnet. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Stasheff korrelieren die hier beschriebenen Ergebnisse mit den Messdaten einer Studie an Retinaschnittpräparaten von RCS Ratten. In jener Studie wurde die Spontanaktivität der GZ per Patch-Clamp-Technik gemessen [14]. Wie in der vorliegenden Arbeit zeigte sich auch hier anfangs kein signifikanter Unterschied in der Spontanaktivität von Wildtyp und RCS Ratte (Woche 1 – 6 *post natal*). Nach 7 – 8 Wochen *post natal* protokollierten die Wissenschaftler in der RCS Retina jedoch einen Anteil von etwa 25% an GZ die keine Aktivität zeigten. Nach drei Monaten stieg diese Gruppe signifikant auf etwa 60% der gemessenen GZ an. Der Großteil der übrigen gemessenen Zellen feuerte nur noch vereinzelte Spikes ab [14].

4.2 Oszillationen in der degenerierten RCS Retina

Wie im Abschnitt zuvor beschrieben ist anzunehmen, dass die generelle Abnahme der spontanen Spikeaktivität bei Tieren älter als 5 Monate auf die zunehmende Neovaskularisation der Retina in der RCS Ratte zurückzuführen ist. Jedoch muss auch das

veränderte Spontanverhalten in Form von slow waves (auch lokale Feldpotenziale (LFP) genannt) und das regelmäßige Abgeben von Bursts einiger RGZ in der degenerierten Retina diskutiert werden.

Parallelen gibt es hier wieder zu den intensiv untersuchten *rd* Mausmodellen. So wurden sowohl slow wave Komponenten als auch das rhythmische Abgeben von Bursts in der *rd1* Maus [53, 73, 8, 31] und in der *rd10* Maus [31, 74, 4] beobachtet. Bei den slow waves unterscheidet sich aber die gemessene Frequenz in den Modellen. So ist in der *rd1* Maus eine Frequenz von 10 Hz gemessen worden [73, 8], während in der *rd10* Maus eine Frequenz von 3 – 6 Hz detektiert wurde [31, 4]. In der vorliegenden Studie wurde eine zur *rd10* Maus vergleichbare Frequenz von 3-7 Hz gemessen (siehe Abbildung 17). Eine Erklärung hierfür kann der sehr ähnliche Entwicklungsverlauf zwischen RCS Ratte und *rd10* Maus sein. So beginnt bei beiden die Photorezeptordegeneration erst nachdem die Retina voll entwickelt ist. Im Gegensatz dazu startet bei der *rd1* Maus die Degeneration bereits während sich die Retina noch in der Entwicklung befindet, ca. um Tag 10 *post natal* [11, 64]. Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, welche Zellen die Oszillationen hervorrufen und/oder verantwortlich sind für die veränderte Spontanaktivität. Der Großteil der publizierten Studien zu diesem Thema wurde in der *rd1* Maus durchgeführt. Da allerdings vermutet wird, dass aufgrund der späteren Degeneration, sich Ergebnisse der *rd10* Maus besser auf humane Erblindungskrankheiten übertragen lassen, werden zunehmend Studien mit der *rd10* Maus publiziert [30, 29, 61, 74]. Obwohl die RCS Ratte in diesen Bereich noch unterrepräsentiert ist, ist es wahrscheinlich, dass ein sehr ähnlicher Degenerationsverlauf wie in der *rd10* Maus stattfindet. Dies wird gestützt durch immunhistologische Untersuchungen [69]. Zusätzlich lässt auch die sehr ähnliche Veränderung in der Spontanaktivität nach Photorezeptordegeneration auf einen zur *rd10* Maus vergleichbaren Verlauf schließen. Basierend auf den Erkenntnissen der *rd* Maus Studien werden zwei Möglichkeiten zur Erklärung der veränderten Spontanaktivität diskutiert: Zum einen kann es sein, dass es in Folge des induzierten Remodelings zur Ausbildung neuer Synapsen und Netzwerken kommt. Zum anderen könnte eine unprovozierte rhytmische Aktivität eines vorhandenen Netzwerks zu Grunde liegen.

Eine Unterstützung der ersten Theorie liefern bekannte Auswüchse von beispielsweise Zapfen, Bipolarzellen, Horizontalzellenund Müllerzellen im Zuge des remodelings [45, 48, 19, 18]. Haq *et al*. konnten in der *rd1* Maus ein entstehendes Netzwerk in der äußeren Retina

aus Zapfenphotorezeptoren, Stäbchenbipolarzellen und Horizontalzellen identifizieren [33]. Außerdem konnten die Autoren innerhalb des Netzwerks lokale Feldpotenziale von 3 Hz messen. In den hier beschriebenen Experimenten konnten ähnliche Potenziale gemessen werden. Es muss jedoch an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die gemessenen 3 - 7 Hz Schwingungen in den RCS Retinaversuchen in den Ganglienzellen, also der inneren Retina, gemessen wurden. Des Weiteren zeigten Hag *et al*., dass die Signalweiterleitung durch Glutamat reguliert wird. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass in der RCS Ratteretina, bei der pharmakologischen Blockade der Glutamat vermittelten Signalweiterleitung mit CNQX und D-AP5, sowohl die Oszillationen als auch größtenteils die Burst-Aktivität verschwinden. Haq *et al*. vermuten, dass vorwiegend Glutamattransporter wie EAATs (excitatory amino acid transporter) in die Signalweiterleitung involviert sind [33]. Diese Vermutung wird ebenfalls durch die zuvor beschriebenen Ergebnisse in Anwesenheit von CNQX und D-AP5 gestützt. Abbildung 18 zeigt, dass bei Blockade der ionotropen Glutamatrezeptoren die Oszillationen deutlich reduziert werden. Zusätzlich verschwindet teilweise auch die spontane Spikeaktivität (siehe Abbildung 20). Menzler und Zeck beschrieben ähnliche Ergebnisse in der *rd1* Maus. Hier wurden die Oszillationen sowie die spontane Spikeaktivität mittels Blockade der iGluR durch Gabe der pharmakologischen Blocker DNQX und D-AP7 eliminiert [61]. Da die spontane Spikeaktivität aber nicht in allen RGZ durch die Blockade der iGluR beeinflusst wird, scheinen noch andere Signalwege die Veränderung herbei zu führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in weiteren Versuchen die $GABA_A$ vermittelte Signalweiterleitung durch Bicucullin blockiert. Wie Abbildung 22 zeigt, verschieben sich die Anteile an LFP mit etwa 5 - 7 Hz in Richtung 3 Hz. Es scheint also, dass auch $GABA_A$ in die Signalweiterleitung involviert ist. Ähnliches wurde in der *rd* Maus Retina beobachtet. So konnte durch Blockade von GABAergen Signalen sowohl die Oszillationen als auch die Burstaktivität der RGZ minimiert, aber ebenfalls nicht vollständig unterbunden, werden [86, 4, 33].Die Versuche der vorliegenden Arbeit unterstützen die Annahme, dass auch $GABA_A$ vermittelte Signale eine tragende Rolle in der veränderten Spontanaktivität haben. Diese Theorie wird dadurch untermauert, dass bei Blockade der iGluR und $GABA_A$ vermittelten Signalwege sowohl die Oszillationen als auch die Burstaktivität verschwinden (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24).

Der zweiten Theorie zur veränderten Spontanaktivität liegt zugrunde, dass ein vorhandenes Netzwerk aufgrund fehlender Impulse spontan oder auf eine bisher unbekannte Weise, rhythmische Signale erzeugt. Im Gegensatz zum oben beschriebenen Netzwerk wird hier ein Netzwerk der inneren Retina angeführt, bestehend aus AII Amakrinezellen und On Zapfenbipolarzellen, welche die rhythmische Spontanaktivität der RGZ triggern [8, 77]. Bekannt ist, dass AII AZ und On Zapfen BZ gekoppelt sind [25, 76, 75, 79, 78]. In solch einem Netzwerk wurden in der degenerierten *rd1* Maus Retina 10 Hz Oszillationen gemessen. Es wird vermutet, dass die Signalweiterleitung der lokalen Feldpotenziale vorwiegend durch Gap Junctions zwischen AII AZ und On Zapfen BZ stattfindet. Die On Zapfen BZ leiten wiederum das rhythmische Signal mittels Glutamat an On RGZ weiter. Zusätzlich wird das Signal über Verbindungen von On Zapfen BZ und AII AZ mit weiteren AZ Typen innerhalb der inneren Retina gestreut und auf diverse RGZ Typen übertragen.
Unterstützt wird die Hypothese durch die Beobachtung von Menzler und Zeck [61], dass in Anwesenheit von Gap Junction Blockern in der *rd1* Maus keine Oszillation gemessen werden konnten.
Interessanterweise zeigen Versuche bei denen die in den AII AZ sehr präsenten spannungsgesteuerten Na^+ Kanale blockiert werden, dass keine Oszillationen im Netzwerk mehr gemessen werden können [17]. Der Auslöser für die rhythmische Signalentstehung scheint der fehlende Input in das Netzwerk aufgrund der Degeneration der Photorezeptoren zu sein. Ein starkes Argument für diese Erklärung ist eine Versuchsreihe in der *rd1* Maus von Trenholm *et al*. bei denen sie nachweisen konnten, dass bei pharmakologischer Blockade der Signalweiterleitung von den Photorezeptorsignalen an die innere Retina, 10 Hz Oszillationen im AII AZ – On Zapfen BZ Netzwerk messbar sind [77]. Das würde bedeuten, dass die Hyperpolarisation des Netzwerks und nicht wie in der ersten Theorie beschrieben Rewiring Effekte für die Oszillationen verantwortlich sind.
In den hier durchgeführten Experimenten konnte nur eine Frequenz der LFP von 3 – 7 Hz detektiert werden. Dies kann entweder bedeuten, dass in der RCS Ratte die lokalen Feldpotenziale im Netzwerk der inneren Retina deutlich langsamer oszillieren als in *rd1* Maus, oder dass in der RCS Ratte das Netzwerk aus AII AZ und On Zapfen BZ die Spontanaktivität nicht triggert. Immunhistologisch konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Zapfen BZ sowie AZ bis 2 Monate *post natal* deutlich erkennbar sind. Beide Zelltypen sind sogar bis zu 8 Monate *post natal* über Antikörper zu detektieren, allerdings sind sie in

Lage und Morphologie deutlich verändert [69]. Offen ist allerdings, um welche Zapfen BZ bzw. AZ es sich genau handelt. Erschwerend für die Interpretation kommt hinzu, dass die hohen Frequenzwerte von 10 Hz bei der *rd1* Maus auch stark von den gemessenen Werten aus RGZ der *rd10* Maus abweichen [8, 77, 52]. Um herauszufinden, ob dieses Phänomen exklusiv für die *rd1* Maus ist können beispielsweise Einzelzellmessungen mittels Patch Clamp in Kombination mit Immunhistologischen Nachweisen an Retinaschnittpräparaten von *rd10* Maus und RCS Ratte Aufschluss geben. Damit könnte auch die Frage geklärt werden, welches Netzwerk, das der äußeren oder das der inneren Retina, verantwortlich für die veränderte Spontanaktivität der RGZ ist.
Wie bereits besprochen, scheinen beide Tiermodelle, RCS Ratte und *rd10* Maus, einen vergleichbaren Degenerationsverlauf zu haben, der sich von dem der *rd1* Maus unterscheidet. Dies könnte u.a. daran liegen, dass die Degeneration erst beginnt nachdem sich die Retina voll entwickelt hat. Möglicherweise haben die neugebildeten Synapsen der äußeren Retina auch einen stärken Einfluss auf die Spontanaktivität der RGZ als die Hyperpolarisation des bestehenden AII AZ – On Zapfen BZ Netzwerks der inneren Retina. Um hier eine klare Aussage treffen zu können sind zusätzlich zu den oben erwähnten Einzelzellmessungen, Messungen der äußeren RCS Retina und immunhistologische Analysen erforderlich.

4.3 Stimulationsfähigkeit der RGZ

Zu Beginn des Promotionsprojekts wurden die Stimulationsparameter in der RCS Ratten-Retina bestimmt, da die hierzu veröffentlichten Daten nicht konsistent sind. So haben mehrere Gruppen publiziert, dass der Schwellenwert um ein Aktionspotenzial in Ganglienzellen der degenerierten *rd* Maus Netzhaut auszulösen höher ist, als beim Wildtyp [87, 39]. Im Gegensatz dazu beschreiben Sekirnjak *et al*., dass die benötigte Pulsstärke in Ganglienzellen der Ratten P23H Retina und in Wildtypneuronen vergleichbar ist [71].
Wie Abbildung 25 zeigt, ist die erforderliche Pulsstärke signifikant unterschiedlich. Die Schwelle für die elektrische Stimulation von RGZ ist deutlich höher in der RCS Rattenretina als im Wt. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit Messungen an blinden Menschen [22]. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang nicht bekannt. Die Ergebnisse mehrerer Studien belegen, dass die angeschlossenen Neuronen der INL sowie der äußeren Retina Einfluss auf die Stimulationseigenschaften der Ganglienzellen haben [51, 50, 9]. Während

der Degeneration der Netzhaut kommt es zu Veränderungen in der neuronalen Vernetzungen aller retinaler Zellen, dem sog. Retinal remodeling [45, 47, 46, 42, 41, 40, 69]. Ein Punkt, der diskutiert wird ist, welchen Einfluss das Retinal remodeling auf die Stimulationseigenschaften der Ganglienzellen hat. Um diese Fragestellung zu bearbeiten, sollten gezielte Immunhistologische Untersuchungen der neuronalen Vernetzung in der degenerierten Retina erfolgen, die dann mit den elektrophysiologischen Ergebnissen ein Gesamtbild ergeben.

Ein weiterer Punkt für den höheren Schwellenwert könnte eine veränderte Zusammensetzung der Axon-Membran sein. Die Anzahl von Natriumkanälen ist entscheidend für die elektrophysiologischen Eigenschaften der Membran. Fried *et al*. veröffentlichten, dass der Bereich, bei dem die niedrigste Pulsstärke benötigt wird das Natriumkanalband ist [28]. In diesem Bereich ist die Konzentration an Natriumkanälen sehr hoch. Folglich wird, um ein Aktionspotential auszulösen eine geringere Pulsstärke benötigt, wenn die Stimulationselektrode in der Nähe dieses Bereichs positioniert ist.
Eine neue Studie über Natrium- und Kaliumkanäle in der RCS Ratte zeigt, dass die Anzahl der Natriumkanäle in RGZ mit fortschreitendem Alter geringer wird [13]. Außerdem beobachten die Wissenschaftler, dass es zusätzlich zu einer Verschiebung des Membranruhepotentials (RMP) in Richtung der Depolarisation kommt. Cho et al. publizierten in einer früheren Studie, dass der Schwellenwert bei RGZ, mit einem positiven RMP niedriger ist als bei RGZ mit einem negativen RMP[15]. Eine Schlussfolgerung könnte sein, dass eine Abnahme der Natriumkanäle in der RCS Ratte zu einer Verschiebung bzw. Negativierung des RMP führt. Dies wäre eine Erklärung dafür, dass die benötigte Pulsstärke um ein Aktionspotenzial zu induzieren im Wildtyp geringer ist als in der degenerierten RCS Ratten Retina. Es muss an dieser Stelle jedoch auch erwähnt werden, dass Cho et al. diese Korrelation zwischen Schwellenwert und RMP in RGZ der *rd1* Maus nicht beobachten konnten [16]. Dies muss nicht bedeuten, dass diese Korrelation bei der RCS Ratte nicht vorhanden ist. Weitere Versuche zum RMP in RGZ der RCS Ratte liefern sicherlich wichtige Informationen zum Verständnis, warum die Stimulationseigenschaften teilweise stark unterschiedlich sind.

Desweiteren konnte weder in der Wistar noch in der RCS Retina ein signifikanter Anstieg der stimulierten Zellen mit zunehmender Intensität bzw. Dauer des Impulses festgestellt

werden. Dies könnte am Erreichen der oberen Stimulationsgrenze liegen. Die obere Stimulationsgrenze wird von Boinagrov et al. als Grenze bezeichnet, ab der trotz Erhöhung der Stimulationsparameter keine Zunahme der Amplitude zu messen ist. Oft kommt es sogar zum Verlust der Antwort bevor die Zellzerstörung oder ein technischer Schaden der Elektrode auftritt [6]. Dies wurde sowohl an RGZ der gesunden Long-Evans Ratte als auch im Computermodell beobachtet. Jedoch gibt es auch hier eine starke Variation zwischen den Zellen. Zellgröße, Zellmorphologie, Zellmembrankomposition und der Abstand zur Stimulationselektrode scheinen die einflussreichsten Parameter zu sein. Die Ergebnisse wurden durch weitere Studien bestätigt [2, 59]. Es sollte beachtet werden, dass diese Versuche an gesunden Versuchstieren stattfanden. Einzig Barriga-Rivera et al. konnten dies auch bei erblindeten Patienten messen [2].

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass es für die optimale elektrische Stimulation eine Ober- und Untergrenze gibt. Ob diese Grenzen innerhalb von Zelltypen mit ähnlicher Morphologie immer gleich sind bleibt zu untersuchen. Auch wie sich dieses Phänomen zwischen gesunden vs. erblindeten Tieren verhält.

4.4 Stimulationsmuster und Wege der Signalweiterleitung nach epiretinaler Stimulation

Die vorliegende Studie befasst sich vorwiegend mit durch epiretinale Stimulation evozierte Antwortmuster der RGZ. Jensen und Rizzo beobachteten in der degenerierten Netzhaut der *rd1* Maus drei Antworttypen [39]. Die von Ihnen als Typ I Zellen bezeichneten RGZ antworten direkt mit einem Einzelburst, welcher nach 20 ms beendet ist, auf den Stromimpuls. Typ II Zellen antworten mit einem Einzelburst mit einer Latenz >37 ms während Typ III Zellen direkt mit zwei oder drei Bursts-Antworten [39]. Boinagrov et al. beobachteten ebenfalls drei Antwortmuster in der gesunden Long-Evans Rattenretina [5]. Im Wesentlichen konnten die gleichen Typen in der degenerierten RCS Ratten Retina gefunden werden. Darüber hinaus kann man zum einen anhand der Latenzen die Antwortmuster nach direkter- (direct-), verzögerter- (delayed-) und Aus (OFF-)-Antworten klassifizieren und sie zum anderen auch nach Anzahl der Spikes in Einzelspike- oder Burstantworten unterteilen (siehe Abbildung 27).

Generell haben Untersuchungen über Antworteigenschaften nach Stimulation gezeigt, dass eine direkte Stimulation von Ganglienzellen einen Reiz in Form von Spikes unmittelbar nach dem Puls hervorruft [70]. Normalerweise führt dies zu einem einzigen Spike [27]. Wie oben beschrieben wurden in dieser Arbeit darüber hinaus direct und delayed Einzelburst sowie Bursty und OFF Antwortmuster in der degenerierten RCS Ratten Retina detektiert (siehe Abbildung 23). Im Gegensatz zu der RCS Ratte konnten in Wildtyp-Kontrollexperimenten weder delayed- noch OFF-Antworten, sondern nur direct-Antworten gemessen werden. Diese Beobachtung stützt die These, dass die Photorezeptordegeneration auch in der RCS Ratte einen Remodelingprozess induziert, welcher einen Einfluss auf die neuronale Signalverarbeitung nach elektrischer Stimulation hat.
Um festzustellen, ob die delayed- und OFF- Antwort vielleicht durch eine unbeabsichtigte Stimulation von Neuronen der inneren Retina hervorgerufen wurden, wurden die exzitatorischen iGlu vermittelten Signalwege durch Gabe von CNQX und D-AP5 blockiert [27, 70]. Stimulationsversuche in der *rd1* Maus zeigten, dass bei Blockierung der iGlu vermittelten Signalwege zumindest die verzögerte Burst-Antwort der Typ II RGZ unter diesen Bedingungen verschwindet [39]. In unseren Versuchen mit der RCS Ratten Retina kam es jedoch in Anwesenheit dieser Blocker zu keiner signifikanten Veränderung der direct Antworten (siehe Anhang Tabelle 6).

Jensen und Rizzo beobachteten in ihren Experimenten ebenfalls eine Antwort, die hier als delayed-Antwort bezeichnet wird. Sie definierten diese als Typ-II-Antwort [39]. In ihrer Publikation beschrieben sie eine Burstantwort mit einer Latenzzeit von mehr als 37 ms. In dieser Arbeit konnten nicht nur delayed-Einzelburst-Antworten sondern auch delayed-Einzelspike und delayed-Bursty-Antworten mit einer Latenzzeit von mehr als 85 ms detektiert werden. Zu beachten ist, dass Jensen und Rizzo das retinale Netzwerk mittels Stimulationen von der subretinalen Seite aktivierten [39], während in dieser Studie ein epiretinaler Ansatz verwendet wurde (siehe 2.2.5.1). Dies kann eine Erklärung dafür sein, warum sie die verzögerten Antwortmuster auch in Wildtyp-Mäusen beobachten konnten während in der vorliegenden Arbeit in den Wildtyp-Experimenten keine verzögerten Antwortmuster zu beobachten waren. Außerdem muss erwähnt werden, dass hier die delayed-Einzelspike-Antwort in lediglich zwei Zellen detektiert werden konnte. Bei den

meisten delayed-Antworten handelte es sich um Einzelburst und Bursty-Antwortmuster (siehe Tabelle 5 Anhang).
Interessanterweise konnten nach Gabe des CNQX und D-AP5 Cocktails keine delayed Einzelburst-Antworten mehr gemessen werden. Dieses Ergebnis ist vergleichbar zur *rd1* Maus Studie, in der die Blockierung der iGlu vermittelten Signalwege nach Gabe eines CNQX und AP-7 Cocktails die verzögerten Antworten der Typ II RGZ eliminierte. AP-7 blockiert, wie auch D-AP5, die iGlu Rezeptoren [39]. Delayed Bursty-Antworten konnten hingegen weiterhin beobachtet werden.
Außerdem konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den delayed-Antworten unter normalen Bedingungen und in Gegenwart des Blocker-Cocktails festgestellt werden.

Die Anzahl der gemessenen OFF-Antworten war in Gegenwart von CNQX und D-AP5 reduziert. Zudem wurde eine dreifach höhere Verzögerung mit einem großen SD-Wert detektiert. Es scheint also, dass iGlu -Rezeptoren an diesem Antwortmuster beteiligt sind, wobei der Mechanismus unklar ist.

Festzuhalten bleibt, dass in der *rd1* Maus Retina iGlu Rezeptoren in die mittels elektrischer Stimulation evozierten Antwortmuster involviert sind. Im Gegensatz dazu haben die iGlu Rezeptoren nur wenig Einfluss auf die evozierten Antworten in der degenerierten RCS Ratten Retina. Damit stellt sich die Frage, ob es aufgrund des Remodelings zu einer Neuverschaltung kommt und folglich neben den iGlu Rezeptoren noch weitere Rezeptoren in die delayed-Antwortmuster involviert sind. Versuche in denen beispielweise zusätzlich die mGlu Rezeptoren blockiert werden könnten zum tieferen Verständnis der Gesamtrolle von Glutamat in der degenerierten RCS Ratten Netzhaut beitragen.
Außerdem bleibt offen, welche Auswirkung die zuvor beschriebenen verschiedenen Membranzusammensetzungen auf die elektrische Signalverarbeitung der RCS Ratten Retina haben (siehe 4.3). Da diese Negativierung des RMP in der Maus jedoch nicht stattfindet, könnte die Veränderung ein Grund dafür sein, warum eine Blockierung der iGlu vermittelten Signalwege in der RCS Ratte nicht denselben Effekt hat wie in den Mausmodellen [27, 70]. Wie hier die detaillierten Zusammenhänge sein könnten bleibt jedoch offen und müsste in weiteren Studien zum RMP und den Stimulationseigenschaften von RGZ in degenerierten RCS Ratten Retina untersucht werden.

Eine andere Erklärung kann auch sein, dass in der RCS Ratte der Einfluss des Remodeling deutlich höher ist und/oder es anders abläuft als in den ausführlicher untersuchten Mausmodellen. Immunhistologische Analysen des Degenerationsverlaufs könnten hier zum weiteren Verständnis beitragen.

Um neben den iGlu vermittelten Signalwegen eine Beteiligung von GABAergen Rezeptoren zu klären, wurden diese im Experiment mit Bicucullin blockiert. Wie Abbildung 29 und Abbildung 30 zeigt, sind in Gegenwart von Bicucullin in der RCS Ratten Retina nur direct-Antworten zu erfassen. Damit entspricht das Antwortverhalten der degenerierten Retina bei Blockierung der GABAergen Signalwege dem des Wildtyps. Daraus kann abgeleitet werden, dass hemmende GABAerge Signale einen hohen Einfluss auf die delayed- und OFF-Antwortmuster haben.
Bleibt die Frage zu diskutieren, wie sind die GABAergen Signalwege in den Mechanismus der degenerierten RCS Ratten Retina nach der elektrischen Stimulation eingebunden?
Bereits Margalit *et al*. wiesen nach, dass eine Freisetzung von GABA in der *rd1* Maus durch epiretinale Stimulation hervorgerufen wird [50]. GABAerge-Signale werden in der Regel auf Aktivität der Amakrinen Zellen (AZ) zurückgeführt. Es scheint, dass unter bestimmten Bedingungen AZs entweder direkt von der epiretinalen Stimulation (siehe Abbildung 34A) oder durch indirekte Aktivierung über stimulierte Bipolarzellen aktiviert werden. Bei letzterem Szenario würde die Stimulation der bipolaren Zellen zu einer Freisetzung von Glutamat führen, was in der Folge benachbarte AZs aktiviert und welche daraufhin GABA freisetzen. Diese Freisetzung von GABA in den synaptischen Spalt induziert eine Hemmung in der Spikeaktivität der von der AZ angesteuerten retinalen Ganglienzelle. Final würde diese Kaskade die beobachtete Blockierung der RGZ Spikeaktivität verursachen (siehe Abbildung 35A). Diese Theorie wird dadurch unterstützt, dass in Anwesenheit von Bicucullin nur direkte-Antwortmuster beobachtet werden konnten.
Es bleibt somit festzuhalten, dass die Verzögerung bei den delayed-Antworten, als auch das vollständige Aussetzen der Spikeaktivität bei den OFF-Antworten, auf die Blockierung durch GABA-vermittelte Signale zurückzuführen ist (siehe Abbildung 34B und Abbildung 35B).

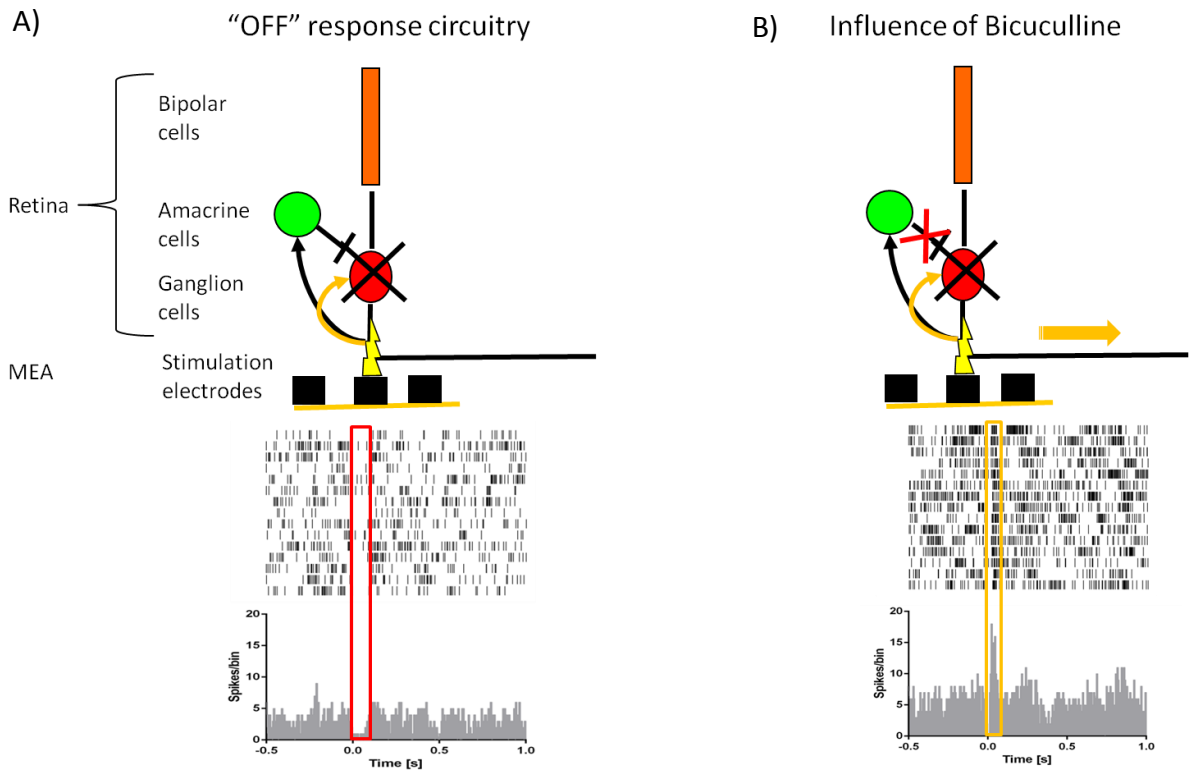

Abbildung 34: Möglicher induzierter OFF-Signalweg. A) Entstehung der OFF Antwort. Der epiretinale Impuls führt zu einer direkten Aktivierung der Amakrinen Zellen. Diese wiederum hemmen die Spikeaktivität der Ganglienzelle. B) Signalkaskade in Anwesenheit von Bicucullin: Bicucullin blockiert die GABA-vermittelte Signalweiterleitung, daher kommt es nicht zur Hemmung der Spikeaktivität der Ganglienzelle obwohl Amakrine Zellen aktiviert wurden. Peri-event raster plot und Histogramm einer repräsentativen OFF-Antwort Ganglienzelle in Anwesenheit von Bicuculin. Das Peri-event Raster zeigt die Antworten einer repräsentativen RCS Ratten Ganglienzelle auf 15 Einzelstimulationen. Das Histogramm zeigt die gemittelten Werte der einzelnen Durchgänge (siehe Abbildung 29).

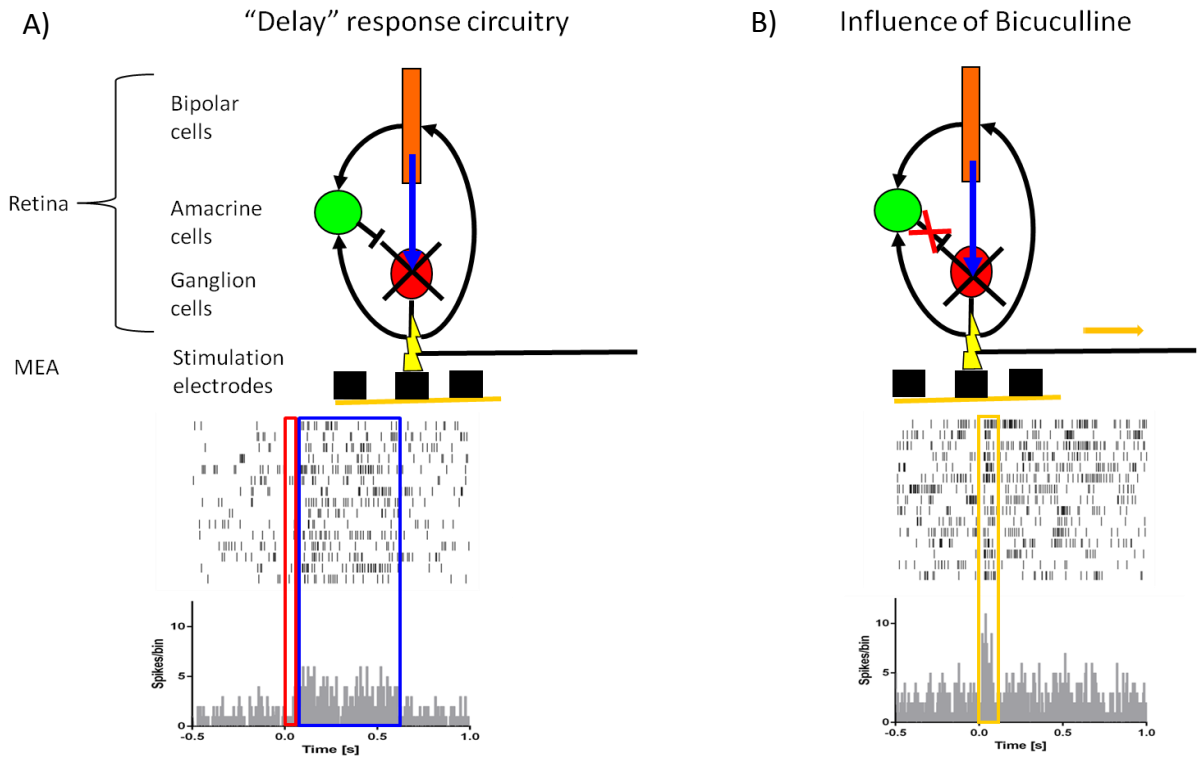

Abbildung 35: Möglicher induzierter delayed-Signalweg. A) Entstehung der delayed-Antwort. Der epiretinale Impuls führt zu einer direkten Aktivierung von Ganglien- und Bipolarzellen. Die Biopolarzellen aktivieren wiederum Amakrine Zellen, welche die Spikeaktivität der Ganglienzelle hemmen und so ein verzögertes Antwortmuster hervorrufen. B) Signalkaskade in Anwesenheit von Bicucullin: Der epiretinale Impuls führt zu einer direkten Aktivierung von Ganglien- und Bipolarzellen. Bicucullin blockiert hier jedoch die GABA-vermittelte Signalweiterleitung zwischen den von den Biopolarzellen aktivierten Amakrinen Zellen und den Ganglienzellen. Daher kommt es nicht zur Hemmung der Spikeaktivität der Ganglienzelle obwohl Amakrine Zellen aktiviert wurden. Folglich ist ein direktes Antwortmuster zu erkennen. Peri-event raster plot und Histogramm einer repräsentativen Delayed-Ganglienzelle in Anwesenheit von Bicucullin. Das Peri-event Raster zeigt die Antworten einer repräsentativen RCS Ratten Ganglienzelle auf 15 Einzelstimulationen. Das Histogramm zeigt die gemittelten Werte der einzelnen Durchgänge (siehe Abbildung 30).

Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Photorezeptordegeneration einen entscheidenden Einfluss auf die Signalweiterleitung in der degenerierten Retina hat. Wie und wo der Trigger für diese Signale liegt ist noch unklar. Vieles deutet darauf hin, das Neuverschaltungen in der äußeren Retina in Kombination mit spontaner Aktivität des inneren Netzwerks, ausgehend von AII Amakrinzellen, die Hauptakteure sind. Hierbei scheinen Glutamat vermittelte Signale eine Schlüsselrolle einzunehmen.

In Bezug auf die epiretinale Stimulation können in der RCS Ratte drei Arten von Antwortmustern, direct-, delayed- und OFF –Antworten, in den retinalen Ganglienzellen der degenerierten Netzhaut evoziert werden. In Anwesenheit von Bicucullin können weder OFF- noch delayed-Antworten gemessen werden. Folglich haben GABAerge Signale, welche vorwiegend von Amakrinzellen vermittelt werden, einen hohen Einfluss auf diese Antwortmuster. Die Tatsache, dass diese Antwortmuster nicht in der Netzhaut gesunder Wistar-Ratten zu beobachten sind, zeigt, dass das aufgrund der Photorezeptordegeneration induzierte Retinal Remodeling einen starken Effekte auf die Signalverarbeitung in der inneren plexiformen Schicht und vielleicht auch eine Änderung des Axons-Ruhemembranpotenzials hervorruft.

Wie in meiner Hypothese dargestellt, wird vermutlich die Spontanaktivität der retinalen Ganglienzellen als auch die epiretinale Stimulation von einen Netzwerk aus Amakrinzellen reguliert. Ein besseres Verständnis, wie die Signalweiterleitung der rhythmischen Spontanaktivität funktioniert, wird sicher auch dazu beitragen, die Abläufe der Signalweiterleitung nach epiretinaler Stimulation in der degenerierten Netzhaut, besser interpretieren zu können. Dieses Wissen ist besonders für klinische Entwicklungen wichtig. Heutige Stimulationsstrategien von retinalen Implantaten orientieren sich an bekannten Signalwegen der gesunden Retina. Diese Stimulationsparadigmen müssen weiter optimiert und angepasst werden an die neustrukturierte Retina blinder Patienten. Hybrid-Implantate oder kombinierte Therapien, bei denen elektrische Stimulation und gezielte pharmakologische Modulation kombiniert werden, könnte eine Möglichkeit zur Steuerung bieten.

Aus heutiger Sicht ist dies ein technisch sowie biomedizinisch hoch komplexer Ansatz. Daher sollten weitere Ziele sein:

1. Umfangreiche Immunhistologische Untersuchungen der Degenerationsstadien um gezielt synaptische Veränderungen zu analysieren
2. Ein besseres Verständnis der Signalweiterleitung in der degenerierten Retina
3. Mehr Grundlagenwissen über die veränderte Spontanaktivität
4. Die Elektrodentechnologie verbessern um die Stimulationsparadigmen gezielt einsetzen zu können.

Anhang

Tabelle 2: Übersicht mittlere Frequenz pro Retina geordnet nach Alter.

Alter [Monate]	Wistar		RCS	
	Mittlere Feuerrate [Hz]	Anzahl Tiere	Mittlere Feuerrate [Hz]	Anzahl Tiere
1	8,5	3	8,1	3
3-4	7,3	2	5,5	3
> 5	7,2	2	3,4	3

Tabelle 3: Übersicht Mittlere Feuerrate geordnet nach Versuchstier und Alter.

Tier	Alter [Monate]	Tiernr.	Anzahl Neurone [%]			Absolute Anzahl Neuronen
Mittlere Feuerrate [Hz]			< 1	1-10	> 10	
Wistar	1	1	27	54	19	63
		2	67	17	17	6
		3	65	17	17	23
	3 – 4	4	7	63	29	68
		5	44	39	17	36
	5	6	0	73	27	15
		7	64	32	4	28
RCS	1	1	51	38	11	37
		2	25	49	25	67
		3	35	40	26	43
	3 – 4	4	35	61	4	51
		5	28	61	11	90
		6	28	57	15	54
	5	7	90	10	0	10
		8	75	25	0	8
		9	44	51	5	41

Tabelle 4: Analysierte Tiermodelle mit Anzahl an Neuronen und busty Neuronen geordnet nach ihrem Alter.

Animal	Age [Month]	Recording [s]	Number Neurons	Bursty Units	Bursty Units [%]	Total number of neurons per age
Wistar	1	300	63	37	59%	92
Wistar	1	300	6	2	33%	
Wistar	1	300	23	9	39%	
Wistar	3	120	68	52	76%	104
Wistar	3	180	36	14	39%	
Wistar	5	180	15	14	93%	43
Wistar	9	300	28	28	100%	
RCS	1	300	37	24	65%	80
RCS	1	180	67	52	78%	
RCS	1	300	43	41	95%	
RCS	4	300	51	45	88%	195
RCS	4	180	90	67	74%	
RCS	4	180	54	17	31%	
RCS	7	445	10	2	20%	59
RCS	8	187	8	2	25%	
RCS	9	300	41	23	56%	

Tabelle 5: Eigenschaften der evozierten Antwortmuster. Die Daten wurden gemittelt und mit ±SD dargestellt. Bei Bursty-Antworten wurde die Latenz und Dauer des ersten Burst betrachtet. Für die Bestimmung der Mitte eines Burst wurde die Zeitspanne zwischen dem ersten und dem letzten Spike des Burst gemessen. Von diesem Wert wurde die Hälfte als Messpunkt Mitte für die Berechnung der Latenz verwendet.

Antwortmuster	**Subtypen**	**Anzahl an Spikes/ Burst**	**Latenz nach dem Stimulus bis zum ersten Spike bei Einzelspike-Antworten und bis zur Mitte des Burst für Burst-Antworten.**	**Dauer des Burst**
Direkte-Antwort	Einzelspike (n=7)	-	20.4 ms ± 6.4	-
	Einzelburst (n=8)	3.6 ± 2.3	22.5 ms ± 4.6	18.8 ms ± 6.8
	Bursty (n=4)	2.5 ± 0.4	26.3 ms ± 11.1	23.6 ms ± 8.0
	Durchschnitt		24,4 ms ± 2,7	
Delayed-Antwort	Einzelspike (n=2)	-	85 ms ± 46.0	-
	Einzelburst (n=7)	7.2; ± 4.0	138.1 ± 85.5ms	76.4 ms ± 46.5
	Bursty (n=4)	6.2; ± 3.2	229 ms ± 48.6	100 ms ± 30.7
	Durchschnitt		150,7 ms ± 72,8	
				Dauer verminderter Aktivität
Off-Antwort	n=14			54,4 ms ± 49,9

Tabelle 6: Eigenschaften der evozierten Antwortmuster in Anwesenheit von CNQX und D-AP5. Die Daten wurden gemittelt und mit ±SD dargestellt. Bei Bursty-Antworten wurde die Latenz und Dauer des ersten Burst betrachtet. Für die Bestimmung der Mitte eines Burst wurde die Zeitspanne zwischen dem ersten und dem letzten Spike des Burst gemessen. Von diesem Wert wurde die Hälfte als Messpunkt Mitte für die Berechnung der Latenz verwendet.

Antwortmuster	**Subtypen**	**Anzahl an Spikes/Burst**	**Latenz nach dem Stimulus bis zum ersten Spike bei Einzelspike-Antworten und bis zur Mitte des Burst für Burst-Antworten.**	**Dauer des Burst**
Direkte-Antwort	Einzelspike (n=3)	-	17.5 ms ± 1.0	-
	Einzelburst (n=5)	5.9 ± 1.4	28.5 ms ± 2.2	54.6 ms ± 9.0
	Bursty (n=2)	2.8 ± 2.0	25 ms ± 17.6	34.5 ms ± 20.5
	Durchschnitt		26,8 ms ± 2,5	
Delayed-Antwort	Einzelspike (n=1)	-	268 ms	-
	Bursty (n=3)	2.6 ± 0.8	246 ms ± 21.1	88 ms ± 20.8
Off-Antwort	n=3		158,3 ms (± 92,9)	

Tabelle 7: Eigenschaften der evozierten Antwortmuster in Anwesenheit von Bicucullin. Die Daten wurden gemittelt und mit ±SD dargestellt. Bei Bursty-Antworten wurde die Latenz und Dauer des ersten Burst betrachtet. Für die Bestimmung der Mitte eines Burst wurde die Zeitspanne zwischen dem ersten und dem letzten Spike des Burst gemessen. Von diesem Wert wurde die Hälfte als Messpunkt Mitte für die Berechnung der Latenz verwendet.

Antwortmuster	**Subtypen**	**Anzahl an Spikes/Burst**	**Latenz nach dem Stimulus bis zum ersten Spike bei Einzelspike-Antworten und bis zur Mitte des Burst für Burst-Antworten.**	**Dauer des Burst**
Direkte Antwort	Einzelspike (n=5)	-	26,8 ms ± 11,1	-
	Einzelburst (n=16)	5,1 ± 3,5	29,4 ms ± 6,8	42,2 ms ± 16,8
	Durchschnitt		28,1 ms ± 1,8	

Literatur

[1] A. K. Ahuja, J. Yeoh, J. D. Dorn, A. Caspi, V. Wuyyuru, M. J. McMahon, M. S. Humayun, R. J. Greenberg, and L. Dacruz. Factors affecting perceptual threshold in argus ii retinal prosthesis subjects. *Transl Vis Sci Technol*, 2(4):1, Apr 2013.

[2] A. Barriga-Rivera, T. Guo, C. Yang, A. Al Abed, S. Dokos, N. Lovell, J. Morley, and G. Suaning. High-amplitude electrical stimulation can reduce elicited neuronal activity in visual prosthesis. *Nat. Sci. Rep.*, 42682 (2017), 2017.

[3] E. L. Berson. Retinitis pigmentosa. the friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34(5):1659–1676, Apr 1993.

[4] S. Biswas, C. Haselier, A. Mataruga, G. Thumann, P. Walter, and F. Müller. Pharmacological analysis of intrinsic neuronal oscillations in rd10 retina. *PLoS One*, 9(6):e99075, 2014.

[5] D. Boinagrov, S. Pangratz-Fuehrer, G. Goetz, and D. Palanker. Selectivity of direct and network-mediated stimulation of the retinal ganglion cells with epi-, sub- and intra-retinal electrodes. *J Neural Eng.*, 11(2): 026008, April 2014.

[6] D. Boinagrov, S. Pangratz-Fuehrer, B. Suh, K. Mathieson, N. Naik, and D. Palanker. Upper threshold of extracellular neural stimulation. *J Neurophysiol.*, 15; 108(12): 3233–3238, December 2012.

[7] R. Boos, H. Schneider, and H. Wässle. Voltage- and transmitter-gated currents of all-amacrine cells in a slice preparation of the rat retina. *J Neurosci*, 13(7):2874–2888, Jul 1993.

[8] J. Borowska, S. Trenholm, and G. B. Awatramani. An intrinsic neural oscillator in the degenerating mouse retina. *J Neurosci*, 31(13):5000–5012, Mar 2011.

[9] M. A. Cameron, G. J. Suaning, N. H. Lovell, and J. W. Morley. Electrical stimulation of inner retinal neurons in wild-type and retinally degenerate (rd/rd) mice. *PLoS One*, 8(7):e68882, 2013.

[10] N. A. Campbell and J. B. Reece. *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2003.

[11] L. D. Carter-Dawson, M. M. LaVail, and R. L. Sidman. Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 17(6):489–498, Jun 1978.

[12] B. Chang, N. L. Hawes, R. E. Hurd, M. T. Davisson, S. Nusinowitz, and J. R. Heckenlively. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res*, 42(4):517–525, Feb 2002.

[13] Z. Chen, Y. Song, J. Yao, C. Weng, and Z. Q. Yin. Alterations of sodium and potassium channels of rgcs in rcs rat with the development of retinal degeneration. *J Mol Neurosci*, 51(3):976–985, Nov 2013.

[14] Z. S. Chen, Z. Q. Yin, S. Chen, and S. J. Wang. Electrophysiological changes of retinal ganglion cells in royal college of surgeons rats during retinal degeneration. *Neuroreport*, 16(9):971–975, Jun 2005.

[15] A. K. Cho, A. P. Sampath, and J. D. Weiland. Physiological response of mouse retinal ganglion cells to electrical stimulation: effect of soma size. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2011:1081–1084, 2011.

[16] A. K. Cho, A. P. Sampath, and J. D. Weiland. Physiological response of normal and rd mouse retinal ganglion cells to electrical stimulation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2012:2985–2988, 2012.

[17] H. Choi, L. Zhang, M. S. Cembrowski, C. F. Sabottke, A. L. Markowitz, D. A. Butts, W. L. Kath, J. H. Singer, and H. Riecke. Intrinsic bursting of aii amacrine cells underlies oscillations in the rd1 mouse retina. *J Neurophysiol*, 112(6):1491–1504, Sep 2014.

[18] Y. Chu, M. F. Humphrey, and I. J. Constable. Horizontal cells of the normal and dystrophic rat retina: A wholemount study using immunolabelling for the 28-kda calcium-binding protein. *Experimental Eye Research*, 57(2):141–8, Sep 1993.

[19] N. Cuenca, I. Pinilla, Y. Sauvé, and R. Lund. Early changes in synaptic connectivity following progressive photoreceptor degeneration in rcs rats. *Eur J Neurosci*, 22(5):1057–1072., Sep 2005.

[20] S. P. Daiger, S. J. Bowne, and L. S. Sullivan. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*, 125(2):151–158, Feb 2007.

[21] P. M. D'Cruz, D. Yasumura, J. Weir, M. T. Matthes, H. Abderrahim, M. M. LaVail, and D. Vollrath. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene mertk in the retinal dystrophic rcs rat. *Hum Mol Genet*, 9(4):645–651, Mar 2000.

[22] J. Delbeke, D. Pins, G. Michaux, M. C. Wanet-Defalque, S. Parrini, and C. Veraart. Electrical stimulation of anterior visual pathways in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(1):291–297, Jan 2001.

[23] J. E. DOWLING and R. L. SIDMAN. Inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol*, 14:73–109, Jul 1962.

[24] R. Eckhorn, M. Wilms, T. Schanze, M. Eger, L. Hesse, U. T. Eysel, Z. F. Kisvárday, E. Zrenner, F. Gekeler, H. Schwahn, K. Shinoda, H. Sachs, and P. Walter. Visual resolution with retinal implants estimated from recordings in cat visual cortex. *Vision Res*, 46(17):2675–2690, Sep 2006.

[25] E. Famiglietti, Jr and H. Kolb. A bistratified amacrine cell and synaptic cirucitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Res*, 84(2):293–300, Feb 1975.

[26] D. B. Farber, J. R. Heckenlively, R. S. Sparkes, and J. B. Bateman. Molecular genetics of retinitis pigmentosa. *West J Med*, 155(4):388–399, Oct 1991.

[27] S. I. Fried, H. A. Hsueh, and F. S. Werblin. A method for generating precise temporal patterns of retinal spiking using prosthetic stimulation. *J Neurophysiol*, 95(2):970–978, Feb 2006.

[28] S. I. Fried, A. C. W. Lasker, N. J. Desai, D. K. Eddington, and J. F. Rizzo. Axonal sodium-channel bands shape the response to electric stimulation in retinal ganglion cells. *J Neurophysiol*, 101(4):1972–1987, Apr 2009.

[29] C. Gargini, E. Terzibasi, F. Mazzoni, and E. Strettoi. Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and erg study. *J Comp Neurol*, 500(2):222–238, Jan 2007.

[30] Y. S. Goo, K. N. Ahn, Y. J. Song, S. H. Ahn, S. K. Han, S. B. Ryu, and K. H. Kim. Spontaneous oscillatory rhythm in retinal activities of two retinal degeneration (rd1 and rd10) mice. *Korean J Physiol Pharmacol*, 15(6):415–422, Dec 2011.

[31] Y. S. Goo, K. N. Ahn, Y. J. Song, S. B. Ryu, and K. H. Kim. Comparison of basal oscillatory rhythm of retinal activities in rd1 and rd10 mice. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2011:1093–1096, 2011.

[32] F. Grehn. *Augenheilkunde*. Springer-Verlag, 2008.

[33] W. Haq, B. Arango-Gonzalez, E. Zrenner, T. Euler, and T. Schubert. Synaptic remodeling generates synchronous oscillations in the degenerated outer mouse retina. *Front Neural Circuits*, 8:108, 2014.

[34] M. H. Higgs, C. Romano, and P. D. Lukasiewicz. Presynaptic effects of group iii metabotropic glutamate receptors on excitatory synaptic transmission in the retina. *Neuroscience*, 115(1):163–172, 2002.

[35] D. H. Hubel and T. N. Wiesel. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. 1962.

[36] D. H. Hubel and T. N. Wiesel. Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. *J Physiol*, 195(1):215–243, Mar 1968.

[37] M. S. Humayun, E. de Juan, J. D. Weiland, G. Dagnelie, S. Katona, R. Greenberg, and S. Suzuki. Pattern electrical stimulation of the human retina. *Vision Res*, 39(15):2569–2576, Jul 1999.

[38] R. J. Jensen and J. F. Rizzo. Thresholds for activation of rabbit retinal ganglion cells with a subretinal electrode. *Exp Eye Res*, 83(2):367–373, Aug 2006.

[39] R. J. Jensen and J. F. Rizzo. Activation of retinal ganglion cells in wild-type and rd1 mice through electrical stimulation of the retinal neural network. *Vision Res*, 48(14):1562–1568, Jun 2008.

[40] B. W. Jones, M. Kondo, H. Terasaki, Y. Lin, M. McCall, and R. E. Marc. Retinal remodeling. *Jpn J Ophthalmol*, 56(4):289–306, Jul 2012.

[41] B. W. Jones and R. E. Marc. Retinal remodeling during retinal degeneration. *Exp Eye Res*, 81(2):123–137, Aug 2005.

[42] B. W. Jones, C. B. Watt, J. M. Frederick, W. Baehr, C.-K. Chen, E. M. Levine, A. H. Milam, M. M. Lavail, and R. E. Marc. Retinal remodeling triggered by photoreceptor degenerations. *J Comp Neurol*, 464(1):1–16, Sep 2003.

[43] M. Keserü, M. Feucht, N. Bornfeld, T. Laube, P. Walter, G. Rössler, M. Velikay-Parel, R. Hornig, and G. Richard. Acute electrical stimulation of the human retina with an epiretinal electrode array. *Acta Ophthalmol*, 90(1):e1–e8, Feb 2012.

[44] M. M. LaVail. Retinal degeneration rat model resource availability of p23h and s334ter mutant rhodopsin transgenic rats and rcs inbred and rcs congenic strains of rats. 2011.

[45] R. E. Marc and B. W. Jones. Retinal remodeling in inherited photoreceptor degenerations. *Mol Neurobiol*, 28(2):139–147, Oct 2003.

[46] R. E. Marc, B. W. Jones, J. R. Anderson, K. Kinard, D. W. Marshak, J. H. Wilson, T. Wensel, and R. J. Lucas. Neural reprogramming in retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(7):3364–3371, Jul 2007.

[47] R. E. Marc, B. W. Jones, C. B. Watt, and E. Strettoi. Neural remodeling in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res*, 22(5):607–655, Sep 2003.

[48] R. E. Marc, B. W. Jones, C. B. Watt, F. Vazquez-Chona, D. K. Vaughan, and D. T. Organisciak. Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. *Mol Vis*, 14:782–806, 2008.

[49] S. D. Marco, D. A. Protti, and S. G. Solomon. Excitatory and inhibitory contributions to receptive fields of alpha-like retinal ganglion cells in mouse. *J Neurophysiol*, 110(6):1426–1440, Sep 2013.

[50] E. Margalit, N. Babai, J. Luo, and W. B. Thoreson. Inner and outer retinal mechanisms engaged by epiretinal stimulation in normal and rd mice. *Vis Neurosci*, 28(2):145–154, Mar 2011.

[51] E. Margalit and W. B. Thoreson. Inner retinal mechanisms engaged by retinal electrical stimulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(6):2606–2612, Jun 2006.

[52] D. J. Margolis, A. J. Gartland, J. H. Singer, and P. B. Detwiler. Network oscillations drive correlated spiking of on and off ganglion cells in the rd1 mouse model of retinal degeneration. *PLoS One*, 9(1):e86253, 2014.

[53] D. J. Margolis, G. Newkirk, T. Euler, and P. B. Detwiler. Functional stability of retinal ganglion cells after degeneration-induced changes in synaptic input. *J Neurosci*, 28(25):6526–6536, Jun 2008.

[54] R. H. Masland. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci*, 4(9):877–886, Sep 2001.

[55] R. H. Masland. Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol*, 11(4):431–436, Aug 2001.

[56] R. H. Masland. The neuronal organization of the retina. *Neuron*, 76(2):266–280, Oct 2012.

[57] R. H. Masland. The tasks of amacrine cells. *Vis Neurosci*, 29(1):3–9, Jan 2012.

[58] F. Mazzoni, E. Novelli, and E. Strettoi. Retinal ganglion cells survive and maintain normal dendritic morphology in a mouse model of inherited photoreceptor degeneration. *J Neurosci*, 28(52):14282–14292, Dec 2008.

[59] K. Meng, A. Fellner, F. Rattay, D. Ghezzi, H. Meffin, M. Ibbotson, and T. Kameneva. Upper stimulation threshold for retinal ganglion cell activation. *J. Neural Eng.*, 046012 (13pp), June 2018.

[60] J. Menzel-Severing, T. Laube, C. Brockmann, N. Bornfeld, W. Mokwa, B. Mazinani, P. Walter, and G. Roessler. Implantation and explantation of an active epiretinal visual prosthesis: 2-year follow-up data from the epiret3 prospective clinical trial. *Eye (Lond)*, 26(4):501–509, Apr 2012.

[61] J. Menzler and G. Zeck. Network oscillations in rod-degenerated mouse retinas. *J Neurosci*, 31(6):2280–2291, Feb 2011.

[62] V. S. Miya-Coreixas, R. Maggesissi Santos, R. Carpi Santos, P. F. Gardino, and K. Calaza. Regulation of gaba content by glucose in the chick retina. *Exp Eye Res*, 115:206–215, Oct 2013.

[63] W. Mokwa, M. Goertz, C. Koch, I. Krisch, H. K. Trieu, and P. Walter. Intraocular epiretinal prosthesis to restore vision in blind humans. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2008:5790–5793, 2008.

[64] F. Paquet-Durand, S. Beck, S. Michalakis, T. Goldmann, G. Huber, R. Mühlfriedel, D. Trifunovic, M. D. Fischer, E. Fahl, G. Duetsch, E. Becirovic, U. Wolfrum, T. van Veen, M. Biel, N. Tanimoto, and M. W. Seeliger. Á key role for cyclic nucleotide gated (cng) channels in cgmp-related retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet*, 20(5):941–947, Mar 2011.

[65] K. Pearson. On lines and planes of closest fit to a system of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 1901.

[66] M. J. Phillips, D. C. Otteson, and D. M. Sherry. Progression of neuronal and synaptic remodeling in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *J Comp Neurol*, 518(11):2071–2089, Jun 2010.

[67] D. A. Protti, N. Flores-Herr, W. Li, S. C. Massey, and H. Wässle. Light signaling in scotopic conditions in the rabbit, mouse and rat retina: a physiological and anatomical study. *J Neurophysiol*, 93(6):3479–3488, Jun 2005.

[68] G. Roessler, T. Laube, C. Brockmann, T. Kirschkamp, B. Mazinani, M. Goertz, C. Koch, I. Krisch, B. Sellhaus, H. K. Trieu, J. Weis, N. Bornfeld, H. Röthgen, A. Messner, W. Mokwa, and P. Walter. Implantation and explantation of a wireless epiretinal retina implant device: observations during the epiret3 prospective clinical trial. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(6):3003–3008, Jun 2009.

[69] S. Rösch, C. Aretzweiler, F. Müller, and P. Walter. Evaluation of retinal function and morphology of the pink-eyed royal college of surgeons (rcs) rat: A comparative study of in vivo and in vitro methods. *CURRENT EYE RESEARCH*, 42(2):273–281, Jun 2016.

[70] C. Sekirnjak, P. Hottowy, A. Sher, W. Dabrowski, A. M. Litke, and E. J. Chichilnisky. Electrical stimulation of mammalian retinal ganglion cells with multielectrode arrays. *J Neurophysiol*, 95(6):3311–3327, Jun 2006.

[71] C. Sekirnjak, C. Hulse, L. H. Jepson, P. Hottowy, A. Sher, W. Dabrowski, A. M. Litke, and E. J. Chichilnisky. Loss of responses to visual but not electrical stimulation in ganglion cells of rats with severe photoreceptor degeneration. *J Neurophysiol*, 102(6):3260–3269, Dec 2009.

[72] S. Shoham, M. R. Fellows, and R. A. Normann. Robust, automatic spike sorting using mixtures of multivariate t-distributions. *J Neurosci Methods*, 127(2):111–122, Aug 2003.

[73] S. F. Stasheff. Emergence of sustained spontaneous hyperactivity and temporary preservation of off responses in ganglion cells of the retinal degeneration (rd1) mouse. *J Neurophysiol*, 99(3):1408–1421, Mar 2008.

[74] S. F. Stasheff, M. Shankar, and M. P. Andrews. Developmental time course distinguishes changes in spontaneous and light-evoked retinal ganglion cell activity in rd1 and rd10 mice. *J Neurophysiol*, 105(6):3002–3009, Jun 2011.

[75] E. Strettoi, R. F. Dacheux, and E. Raviola. Cone bipolar cells as interneurons in the rod pathway of the rabbit retina. *J Comp Neurol*, 347(1):139–149, Sep 1994.

[76] E. Strettoi, E. Raviola, and R. F. Dacheux. Synaptic connections of the narrow-field, bistratified rod amacrine cell (aii) in the rabbit retina. *J Comp Neurol*, 325(2):152–168, Nov 1992.

[77] S. Trenholm, J. Borowska, J. Zhang, A. Hoggarth, K. Johnson, S. Barnes, T. J. Lewis, and G. B. Awatramani. Intrinsic oscillatory activity arising within the electrically coupled aii amacrine-on cone bipolar cell network is driven by voltage-gated na+ channels. *J Physiol*, 590(10):2501–2517, May 2012.

[78] M. L. Veruki and E. Hartveit. Aii (rod) amacrine cells form a network of electrically coupled interneurons in the mammalian retina. *Neuron*, 33(6):935–946, Mar 2002.

[79] M. L. Veruki and E. Hartveit. Electrical synapses mediate signal transmission in the rod pathway of the mammalian retina. *J Neurosci*, 22(24):10558–10566, Dec 2002.

[80] M. P. Villegas-Pérez, J. M. Lawrence, M. Vidal-Sanz, M. M. Lavail, and R. D. Lund. Ganglion cell loss in rcs rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *J Comp Neurol*, 392(1):58–77, Mar 1998.

[81] P. Walter, Z. F. Kisvárday, M. Görtz, N. Alteheld, G. Rossler, T. Stieglitz, and U. T. Eysel. Cortical activation via an implanted wireless retinal prosthesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(5):1780–1785, May 2005.

[82] S. Wang, M. P. Villegas-Pérez, T. Holmes, J. M. Lawrence, M. Vidal-Sanz, N. Hurtado-Montalbán, and R. D. Lund. Evolving neurovascular relationships in the rcs rat with age. *Curr Eye Res*, 27(3):183–196, Sep 2003.

[83] S. Wang, M. P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz, and R. D. Lund. Progressive optic axon dystrophy and vacuslar changes in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(2):537–545, Feb 2000.

[84] J. Yang, J. P. Nemargut, and G.-Y. Wang. The roles of ionotropic glutamate receptors along the on and off signaling pathways in the light-adapted mouse retina. *Brain Res*, 1390:70–79, May 2011.

[85] Y.-T. Yang, P.-K. Lin, C. Wan, W.-C. Yang, L.-J. Lin, C.-Y. Wu, and C.-C. Chiao. Responses of rabbit retinal ganglion cells to subretinal electrical stimulation using a silicon-based microphotodiode array. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(13):9353–9361, 2011.

[86] J. H. Ye and Y. S. Goo. The slow wave component of retinal activity in rd/rd mice recorded with a multi-electrode array. *Physiol Meas*, 28(9):1079–1088, Sep 2007.

[87] J. H. Ye, K. H. Kim, and Y. S. Goo. Comparison of electrically-evoked ganglion cell responses in normal and degenerate retina. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2008:2465–2468, 2008.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des menschlichen Auges.. 7
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Stäbchens (Rod) und Zapfen (Cone) 8
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Retina.. 9
Abbildung 4: Phototransduktion in der Discmembran eines Stäbchens 10
Abbildung 5: Glutamat vermittelter Signalweg der Retina. 11
Abbildung 6: Signalverarbeitung des Zapfensignalwegs 13
Abbildung 7: Retinal remodeling. 15
Abbildung 8: MEA2100 System mit Perfusions- und Abflusssystem im Faradayschen Käfig. . 24
Abbildung 9: Darstellung biphasischer Stromimpuls zur Stimulation der Retina 27
Abbildung 10: $v^{(k)}$ Vektor des EM-Algorithmus nach Shoham. 29
Abbildung 11: Vergleich der Spontanaktivität zwischen Wistar und RCS Ratte 32
Abbildung 12: Vergleich der mittleren Spontanaktivität von Aktionspotenzialen zwischen Wistar und RCS Ratte.. 34
Abbildung 13: Einteilung der GZ nach der mittleren Frequenz ihrer spontanen Spikeaktivität je Altersgruppe.. 35
Abbildung 14: Graphische Darstellung eines Burst. 36
Abbildung 15: Prozentualer Anteil an „Bursty Neurons“.. 36
Abbildung 16: Auge einer 11 Monate alten RCS Ratte.. 37
Abbildung 17: Power Spectrum Analyse der Wistar und degenerierten RCS Ratten Retina... 39
Abbildung 18: Einfluss von CNQX und D-AP5 auf die slow wave Komponente 40
Abbildung 19: Analyse des Frequenzspektrums in Anwesenheit eines CNQX/D-AP5-Cocktails. 41
Abbildung 20: Einfluss des CNQX/D-AP5-Cocktail auf die Oszillation und Spikeaktivität der GZ. 41
Abbildung 21: Einfluss von Bicucullin auf die Oszillationen in der degenerierten RCS Ratten Retina.. 42
Abbildung 22: PSD-Analyse der mit Bicucullin perfundierten RCS Ratten Retina 43
Abbildung 23:Gleichzeitige Perfusion der RCS Ratten Retina mit CNQX, D-AP5 und Bicucullin. 44

Abbildung 24: PSD-Analyse der mit CNQX, D-AP5 und Bicucullin gespülten RCS Retina 45
Abbildung 25: Vergleich der Stimulationseffizienz von RCS und Wistar Ganglienzellen..... 46
Abbildung 26: Anordnung der Aufnahmeelektrode R zur Stimulationselektrode S..... 46
Abbildung 27: Durch epiretinale Stimulation evozierte Muster in GZ der degenerierten RCZ Retina 48
Abbildung 28: Peri-event Raster Plot und Histogramm in Anwesenheit von CNQX und D-AP5. 51
Abbildung 29: Peri-event Raster Plot und Histogramm einer repräsentativen OFF-Antwort Ganglienzelle in Anwesenheit von Bicuculin..... 53
Abbildung 30: Peri-event Raster Plot und Histogramm einer repräsentativen Delayed-Ganglienzelle in Anwesenheit von Bicucullin..... 54
Abbildung 31: Vergleich der Latenzen der direkten Antwortmuster. 54
Abbildung 32: PSTH RCS OFF-Antwort in Gegenwart von CNQX + D-AP5 und Bicucullin 55
Abbildung 33: PSTH RCS Delayed-Antwort in Gegenwart von CNQX + D-AP5 und Bicucullin. 56
Abbildung 34: Möglicher induzierter OFF-Signalweg.. 69
Abbildung 35: Möglicher induzierter delayed-Signalweg.uster zu erkennen..... 70

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name:	Stephan Hesse
Geburtstag:	14.09.1982
Geburtsort:	Göttingen
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Verheiratet, zwei Kinder

Berufliche Tätigkeit

10/2019 – bis heute	Regional Account Manager, NanoString Technologies Inc
08/2016 – 09/2019	Sales Specialist qPCR, dPCR, Microarrays and Sequencing, Thermo Fisher Scientific
01/2015 – 07/2016	Sales Specialist Life Science, VWR International GmbH
05/2014 – 12/2014	Wissenschaftlicher Außendienst, Peqlab Biotechnologie GmbH, a VWR Company
04/2011 – 05/2014	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Augenklinik, Universitätsklinikum der RWTH Aachen

Studium

04/2011 05/2014	Doktorand, Augenklinik, Universitätsklinikum der RWTH Aachen Betreuer: Universitätsprofessor Dr. med. Peter Walter Betreuer: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Hermann Wagner
10/2006 – 09/2010	Universität Bremen, Hauptstudium in Molekularbiologie Hauptfach: Molekulare Zellbiologie Nebenfächer: Biochemie und Mikrobiologie
10/2004 – 09/2006	Universität Kassel, Grundstudium im Fach Biologie

Diplomarbeit

Titel	Untersuchungen zur Apoptose von *Xenopus laevis* Embryonen
Betreuer	Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Raimer Stick

Wehrdienst

07/2004 – 08/2004	Freiwillige Wehrübung
07/2002 – 06/2004	Ausbildung zum Offizier der Reserve

Schule

08/1999 – 06/2002	Berufliches Gymnasium Witzenhausen, Abitur
08/1993 – 07/1999	Valentin-Traudt Gesamtschule Großalmerode, Realschule

Auslandsaufenthalt

05/2008 – 09/2008	Durham, England Praktikum „Fortgeschrittene Techniken in der Rasterelektronen-mikroskopie“ an der *School of Biological and Biomedical Sciences*

Veröffentlichungen

Artikel

Florian Waschkowski, Stephan Hesse, Anne Christine Rieck, Tibor Lohmann, Claudia Brockmann, Thomas Laube, Norbert Bornfeld, Gabriele Thumann, Peter Walter, Wilfried Mokwa, Sandra Johnen and Gernot Roessler: Development of very large electrode arrays for epiretinal stimulation (VLARS), BioMedical Engineering OnLine, 2014, 13:11

Kongresse

Stephan Hesse et al: Retinal Degeneration in the Royal College of Surgeons Rat – A Study on Electrophysiological Properties. Annual Meeting of the Association of Research in Vision and Ophthalmology ARVO, Seattle, USA 2013 5091 - B004, Posterpräsentation

Stephan Hesse et al: Studies on Electrophysiological Properties in a Rat Model of Retina Degeneration. Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft 2013, Berlin, Vortrag

Stephan Hesse et al: Electrical Stimulation of Retinal Ganglion Cells in a Rat Model of Retinal Degeneration. European Retina Meeting, Alicante 2013, Vortrag

Stephan Hesse et al: Different response patterns evoked via epiretinal stimulation in the royal college of surgeons rat. Artificial Vision Conference, Aachen 2013, Vortrag

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die Unterstützung zahlreicher Personen nicht möglich gewesen. Stellvertretend möchte ich einigen besonderen Stützen der vergangenen Jahre meinen Dank ausdrücken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Peter Walter der mir die Möglichkeit gab diese Arbeit in seinem Institut durchzuführen und mich immer mit Verständnis und Anregungen begleitet hat.
Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hermann Wagner möchte ich auch besonders für seine geistigen Anstöße und kritischen Fragen, ohne die einige Dinge unerwähnt geblieben wären, danken.

Für vielfältige Unterstützung im Labor und der praktischen Arbeit danke ich Claudia Werner, Anna Dobias und Dr. Sandra Johnen.
Für die vielen schönen und teilweise herausfordernden Stunden am Feilen der Experimente und über der Auswertung der Daten mit Massen an Kaffee danke ich Dr. Christine Haselier, Dr. Janis Brusius und Sabine Diarra.

Für die nötige geistige Pause am besten mit einer Currywurst danke ich Mihael, Dave und dem Wolfsrudel.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Annika, du warst immer die größte Stütze und mein bester Motivator. Danke, dass du immer an mich glaubst.

Dank auch an meine Töchter Hanna und Amelie, die mich erfolgreich abgelenkt haben, wenn die Zeit für eine Pause war…oder auch nicht.

Diese Arbeit ist in Gedenken an meine liebe Mutter Daeng Hesse. Leider war ich nicht schnell genug um diesen schönen Moment mit dir zu teilen. Ich weiß, du freust dich am meisten.

Author's Contributions

Stephan Hesse hat die Versuche unter Supervision von Herrn Prof. Dr. med. Peter Walter und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hermann Wagner durchgeführt.

Das MEA System wurde gemeinsam mit Dr. rer. nat. Christine Haselier installiert.

Die Arbeit konnte dank Unterstützung durch die DFG angefertigt werden

DFG Grant WA 1472/6-1.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Stephan Hesse, erklärt hiermit, dass diese Dissertation und die darin dargelegten Inhalte die eigenen sind und selbstständig, als Ergebnis der eigenen originären Forschung, generiert wurden.

Hiermit erkläre ich an Eides statt

1. Diese Arbeit wurde vollständig oder größtenteils in der Phase als Doktorand dieser Fakultät und Universität angefertigt;

2. Sofern irgendein Bestandteil dieser Dissertation zuvor für einen akademischen Abschluss oder eine andere Qualifikation an dieser oder einer anderen Institution verwendet wurde, wurde dies klar angezeigt;

3. Wenn immer andere eigene- oder Veröffentlichungen Dritter herangezogen wurden, wurden diese klar benannt;

4. Wenn aus anderen eigenen- oder Veröffentlichungen Dritter zitiert wurde, wurde stets die Quelle hierfür angegeben. Diese Dissertation ist vollständig meine eigene Arbeit, mit der Ausnahme solcher Zitate;

5. Alle wesentlichen Quellen von Unterstützung wurden benannt;

6. Wenn immer ein Teil dieser Dissertation auf der Zusammenarbeit mit anderen basiert, wurde von mir klar gekennzeichnet, was von anderen und was von mir selbst erarbeitet wurde;

7. Kein Teil dieser Arbeit wurde vor deren Einreichung veröffentlicht.

Lohmar, den 05.12.2020 Stephan Hesse

(Ort, Datum) (Unterschrift)