

Verarbeitung von Defokussierung durch retinale Ganglienzellen beim Haushuhn

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl. Biol. Klaus Graef

aus Giengen an der Brenz

Tübingen 2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 13.04.2017

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Schaeffel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hanspeter Mallot

Zusammenfassung

Die Kurzsichtigkeit (Myopie) ist eine Einschränkung der Sehfähigkeit der betroffenen Menschen, welche bei starker Ausprägung auch ein erhöhtes Risiko für Blindheit darstellt. Um sie behandeln oder gar verhindern zu können, ist es notwendig, die ihr zu Grunde liegenden Mechanismen zu identifizieren und zu verstehen.

Einer dieser Mechanismen ist die Emmetropisierung, also die Anpassung des Längenwachstums eines Auges an die Brechkraft des optischen Apparates des Auges. Dieser Prozess führt bei gesunden Augen dazu, dass ein in der Ferne liegendes Objekt scharf auf der Netzhaut (Retina) abgebildet wird, es liegt im Fokus. Verschiebt sich diese Schärfeebene, spricht man von Defokussierung.

Es konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass Augen von Hühnern emmetropisieren, selbst wenn der optische Nerv, also die Verbindung zum Gehirn, durchtrennt ist. Die Information über die Defokussierung liegt in der Retina vor. Glukagonerge Amakrinzellen zeigen eine vom Defokus abhängige Veränderung der Bildung des Wachstumsfaktors ZENK.

Auf welche Art diese Erkennung des Defokus realisiert wird, ist bislang unbekannt. Es ist nicht klar, welche Komponenten des visuellen Umfeldes dem Auge zur Erkennung der Defokussierung sowie deren Vorzeichen dienen. Weiterhin ist bislang unklar, ob diese Information auf der Ebene der retinalen Ganglienzellen vorliegt, oder ob sie nur zur lokalen Verarbeitung verwendet, nicht aber ans Gehirn weitergeleitet wird.

Indizien, wie beispielsweise der leicht verschobene Sollwert der Emmetropisierung bei Augen mit durchtrenntem Sehnerv, sprechen dafür, dass diese Information im Gehirn vorliegt und auch ein Feedback vorhanden ist.

In dieser Arbeit wurde das Antwortverhalten der Ganglienzellen von Mäusen, vor allem aber von Hühnern, mittels extrazellulärer Ableitung in Multielektroden Arrays (MEA) aufgezeichnet. Hierfür wurden die Retinae *in vitro* optisch stimuliert. Die verwendeten MEAs konnten an 60 Elektroden zeitgleich elektrischen Signale in Form von Spannungswerten aufzeichnen.

Zur optischen Stimulation wurde ein Film verwendet. Die Wahl des Stimulus fiel auf einen Film, da hier davon ausgegangen werden kann, dass die optischen Eigenschaften vorhanden sind, welche zur Erkennung der Defokussierung notwendig sind. Wird ein Bild oder Film mit Hilfe von Linsen defokussiert, so tritt unweigerlich eine Veränderung der Größe des Abbildes auf. Um dies zu verhindern, wurde eine Badal Optik eingesetzt.

In einer Badal Optik wird eine zusätzliche Linse zwischen das Objekt (hier ein beweglich montierter Bildschirm) sowie die abbildende Linse eingebracht. Der Brennpunkt dieser Badal Linse muss auf dem hinteren Knotenpunkt der abbildenden Linse liegen. Ist dies gegeben, so wird das Objekt auf dem Ziel der Projektion, in diesem Falle der Retina, scharf abgebildet, sofern sich das Objekt im vorderen Brennpunkt der Badal Linse befindet. Nähert es sich weiter an die Badal Linse, so entsteht eine negative Defokussierung, entfernt es sich, entsteht eine positive Defokussierung. In jedem Falle ist aber die Größe des Abbildes konstant.

Da in der Retina von Mäusen inzwischen über 30 unterschiedliche Ganglienzellen bekannt sind und deren Anzahl sich auch bei anderen Arten mit jeder Studie erhöht, muss auch eine Selektierung der Zellen zur Analyse durchgeführt werden. Es wurde eine Methode gewählt,

welche Scheinsignifikanzen unwahrscheinlich macht und dennoch eine Einteilung der Zellen in Klassen anhand festgelegter Parameter zulässt.

In der Auswertung zeigt sich, dass die Ganglienzellen der Hühner eine vom Defokus abhängige, signifikante Reaktion zeigen. Speziell bei negativer Defokussierung tritt eine Verringerung der Antwortrate, gemessen an der Anzahl an elektrischen Signalen (Spikes) auf. Positive Defokussierung wird möglicherweise auf der Ebene der Ganglienzellen nicht erkannt, wohl aber kann eine globale Kontrastreduktion von der negativen Defokussierung und auch von keiner Defokussierung unterschieden werden.

Alle Experimente wurden mit Hilfe von zufällig generierten Datensätzen kontrolliert. In diesen Kontrollen zeigte sich grundsätzlich keinerlei Abhängigkeit der Werte von den Versuchsbedingungen. Es kann ausgeschlossen werden, dass die ermittelten Zellantworten und Signifikanzen nur zufällig entstanden sind.

Die Daten dieser Arbeit zeigen eine Empfindlichkeit einiger retinaler Ganglienzellen gegenüber Defokussierung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Optik.....	3
1.1.1	Geometrische Optik.....	3
1.1.2	Linsen.....	4
1.1.3	Kontrast.....	6
1.1.4	Ortsfrequenz und Modulationstransferfunktion.....	7
1.1.5	Defokussierung	9
1.1.6	Badal Optik	10
1.1.7	Optische Komponenten des Auges	11
1.1.8	Optische Stimulation.....	11
1.2	Sehen.....	13
1.2.1	Das Auge der Wirbeltiere	13
1.2.2	Das Auge des Menschen.....	20
1.2.3	Das Auge der Maus.....	21
1.2.4	Das Auge des Huhns	22
1.3	Emmetropie	23
1.4	Ametropie.....	23
1.4.1	Myopie	24
1.4.2	Hyperopie.....	28
1.5	Zwischenfazit	28
2	Methoden	29
2.1	Tiermodelle	29
2.1.1	Maus (<i>Mus musculus</i>).....	29
2.1.2	Huhn (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	31
2.2	In vitro Retinae.....	31
2.3	Der Experimentelle Aufbau	33
2.3.1	Microelectrode Array.....	33
2.3.2	Aufbau	34
2.4	Extrazelluläre Ableitungen.....	38
2.5	Optische Stimulation	39
2.5.1	Der Stimulus	39
2.6	Vom Reiz zur Auswertung.....	40
2.6.1	PC-Hardware	40
2.6.2	Datenaufzeichnung	40

2.6.3	Zusammenfügung der Dateien.....	44
2.6.4	Identifizierung von Wellenformen	45
2.6.5	Sortierung von Wellenformen	46
2.6.6	Extraktion der Daten.....	50
2.6.7	Auswahl von Zellen.....	53
2.7	Zufallsdaten als Gegenteil	55
3	Ergebnisse.....	56
3.1	Grundsätzliche Erklärung der Grafiken.	56
3.1.1	Datenverteilung.....	56
3.1.2	Zellaktivität.....	56
3.1.3	Korrelationen	57
3.1.4	Rohdaten.....	57
3.1.5	ANOVA.....	57
3.1.6	Gruppierung der Versuchsbedingungen	58
3.1.7	Einteilung selektierter Zellen in Klassen	58
3.2	Ableitungen an Hühnerretinae	59
3.2.1	Vergleich der Reizantworten bei negativem Defokus und ohne Defokus.....	59
3.2.2	Stufenweise Defokussierung mit positivem und negativem Vorzeichen	72
3.2.3	Defokussierung und Kontrastreduktion.....	83
3.2.4	Stufenweise Defokussierung und Stufenweise Kontrastreduktion.....	92
3.3	Ableitungen an Mäuseretinae.....	103
3.3.1	Vergleich der Reizantworten bei negativem Defokus und ohne Defokus.....	106
3.3.2	Defokussierung um 5D mit positivem und negativem Vorzeichen.....	107
3.3.3	Stufenweise Defokussierung um 7D und 5D mit positivem und negativem Vorzeichen.....	108
4	Diskussion.....	109
4.1	Erörterung der Ergebnisse.....	110
4.1.1	Veränderungen der Spikeraten bei negativ defokussierten Filmen	110
4.2	Interpretation.....	112
4.3	Einschätzung der Methoden.....	113
4.3.1	Versuchstiere	113
4.3.2	Arbeiten mit dem Gewebe	114
4.3.3	Badal Setup.....	114
4.3.4	Aufzeichnung der Daten	115
4.4	Mögliche Verbesserungen.....	115
4.5	Ausblick und weitere Experimente	115

Referenzen	117
Danksagung	120

Einleitung

In den industrialisierten Staaten der Erde kristallisiert sich seit Jahrzehnten ein Problem heraus, welches in der Vergangenheit noch als eher unbedeutend abgetan wurde. Die Menschen werden immer häufiger und immer stärker kurzsichtig. Speziell auf dem asiatischen Kontinent wurde ein enormer Anstieg der Kurzsichtigkeit (Myopie) in den letzten Jahrzehnten verzeichnet, teilweise sind über 80% der Menschen kurzsichtig. Seit Jahrzehnten wird untersucht, welche Faktoren hier von Bedeutung sind. Eine zentrale Frage ist, wie wichtig genetische Faktoren sind. Die rasche Zunahme der Myopie kann allerdings mit Genetik nicht erklärt werden, denn es besteht keine „Selektionszüchtung“ und eine so schnelle Änderung des genetischen Hintergrundes kann ausgeschlossen werden, auch wenn bereits viele Gene identifiziert wurden, welche im Zusammenhang mit der Myopie stehen (Chu et al. 2000; Verhoeven, Hysi, et al. 2013). Es müssen also Umweltfaktoren für die rasante Ausbreitung der Kurzsichtigkeit verantwortlich sein. Neuere Untersuchungen konnten eine Verbindung von Kurzsichtigkeit und Ausbildungsdauer belegen (Mirshahi et al. 2014; Verhoeven, Buitendijk, et al. 2013; Cuellar-Partida et al. 2016).

Diese Entwicklung ist nicht nur für die betroffenen Personen problematisch, sondern auch für die Gesundheitssysteme. Bei hoher Myopie (Refraktion $-6D$ oder negativer) steigen die Erblindungsrisiken stark an, bedingt durch die Ablösung der Netzhaut (Retina), dünne Aderhaut mit damit verbundener chorioretinaler Degeneration, erhöhtem Glaukom- (Grüner Star, Degeneration der Nervenfasern) und Kataraktrisiko (Grauer Star, Linsentrübung). In Asien ist die hohe Myopie der häufigste Grund für Erblindung. In den Großstädten Südost-Asiens haben bereits bis zu 20% der jungen Bevölkerung eine hohe Myopie mit den beschriebenen Risiken, und es sind in Zukunft erhebliche volkswirtschaftliche Lasten zu erwarten (Pechmann und Czepita 2000; Edwards und Lam 2004; Foster und Jiang 2014; Wong et al. 2014; Recko und Stahl 2015).

Diese Arbeit verfolgt das Ziel, einen Aspekt der Kurzsichtigkeit zu untersuchen, welcher in der bisherigen Literatur keine oder nur sehr geringe Aufmerksamkeit erfahren hat. Welchen Einfluss übt ein defokussiertes Bild auf die Netzhaut, speziell auf die Ganglienzellen aus? Wird dieser Bildfehler auf der Ebene der Ganglienzellen erkannt? Spielen sie also möglicherweise eine Rolle bei der Entwicklung der Myopie?

Es ist bekannt, dass auf der Ebene der Amakrinzellen die Information über das Vorzeichen der Defokussierung vorhanden ist, da der Transkriptionsfaktor ZENK in Abhängigkeit von ihr reguliert wird (Bitzer und Schaeffel 2002), die fragliche Information liegt in der Retina also vor (siehe Kapitel „Der Einfluss von ZENK auf Myopie und Augenwachstum“). Ebenso ist bekannt, dass eine Durchtrennung des optischen Nerven die normale Entwicklung des Auges beeinträchtigt, selbst wenn außer der fehlenden optischen Verbindung der Retina zum Gehirn keinerlei Schädigungen vorliegen. Der eigentliche Steuerprozess des Augenwachstums scheint jedoch intakt, obwohl sich der Sollwert des Systems verschiebt (siehe Kapitel „Biologische Mechanismen der Myopie“).

Elektrische Ableitungen von Ganglienzellen, welche optisch mit Schachbrettmustern stimuliert wurden, konnten keinerlei Vorzeichenerkennung zeigen (Diedrich und Schaeffel 2009), jedoch wurden hier die Ergebnisse aller Zellen zweier Retinae gemittelt, ohne eine weitere Auswahl

an Zellen zu treffen. Es ist nicht zu erwarten, dass alle Zellen auf die Defokussierung ansprechen, und nur dann wäre eine populationsweite Reaktion messbar. Weiterhin ist im sehr begrenzten Stimulus eines Schachbrettmusters möglicherweise der notwendige Aspekt zur Vorzeichenerkennung schlicht nicht vorhanden. Es ist bislang unbekannt, welche Faktoren des visuellen Umfeldes für die Erkennung des Vorzeichens notwendig sind.

Obwohl also Indizien für einen Einfluss der Ganglienzellen vorliegen, ist bislang unklar, ob die auf Ebene der Amakrinzellen vorhandene Information über die Defokussierung von den Ganglienzellen der Netzhaut tatsächlich verarbeitet und weitergeleitet wird. Und wenn ja, welche Teile der Information das Gehirn selbst erreichen.

Die große Anzahl an verschiedenen Ganglienzellen (Kapitel 1.2.1) sowie die Tatsache, dass die Funktion vieler dieser Zellen bislang unbekannt ist, gewährt viel Spielraum für potentielle neue Zelltypen, welche bislang zumindest funktionell nicht erfasst wurden (Masland 2012).

1.1 Optik

„But optics sharp it needs, I ween, to see what is not to be seen“

John Trumbull

1.1.1 Geometrische Optik

Die für das Verständnis dieser Arbeit wichtigen Fakten der geometrischen Optik sind konvexe Sammellinsen und konkave Streulinsen sowie, mit geringerer Bedeutung, chromatische Aberration. Nachfolgend werden die notwendigen Einheiten und Größen beschrieben.

Licht wird grundsätzlich beim Übertritt von einem optischen Medium in ein sich davon unterscheidendes, anderes optisches Medium gebrochen. Die Stärke dieser Brechung hängt von der optischen Dichte und damit dem Brechungsindex ab, welcher spezifisch für jedes Medium ist. Je höher die optische Dichte des Mediums, desto höher fällt der Brechungsindex aus, da dieser die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Licht im jeweiligen Medium beschreibt. Mit ansteigendem Brechungsindex verringert sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichts. Der Brechungsindex im Vakuum ist als 1 definiert. Jener von Luft liegt minimal darüber und wird der Einfachheit halber üblicherweise mit 1 berechnet. Jener von Wasser liegt bei 1,33, jener von Glas bei 1,45 bis über 2, abhängig von der Zusammensetzung. Tritt Licht in ein Medium über, welches den nahezu gleichen Brechungsindex aufweist wie das Austrittsmedium, so findet kaum Brechung statt. Aus diesem Grund ist eine in wässriger Lösung schwimmende Linse eines Wirbeltierauges üblicherweise, ohne Hilfsmittel oder spezielle Färbung, für Menschen nicht sichtbar.

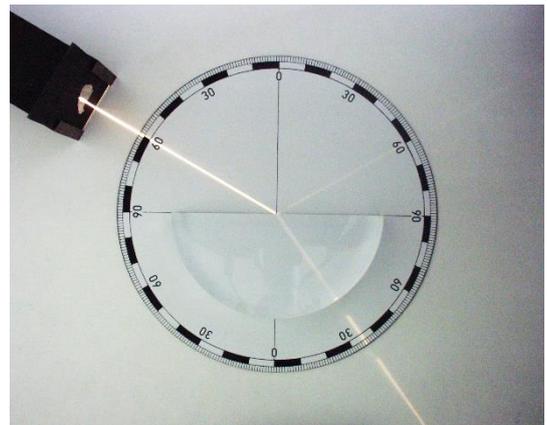


Abbildung 1: Beugung und Reflektion eines Lichtstrahls beim Übertritt von Luft (oben) in Glas (unten). Einfallender und reflektierter Lichtstrahl haben den selben Winkel zum Lot auf die Grenzfläche, der gebeugte Lichtstrahl hat nach Snellius einen Winkel von 35° zum Lot (Bild: Wikipedia.org).

Diese Prinzipien basieren auf dem Snelliusschen Brechungsgesetz, welches die Beugung von Lichtstrahlen am Übergang zweier verschiedener optischer Medien beschreibt.

$$n_1 \sin(\delta_1) = n_2 \sin(\delta_2)$$

Dabei sind n_1 und n_2 die Brechungsindizes der beteiligten Medien, δ_1 ist der Einfallswinkel des Lichtstrahls zum Lot auf die Grenzfläche der Medien, δ_2 ist der Winkel des gebeugten Lichtstrahls zum Lot.

1.1.2 Linsen

Die Brechkraft von Konvexlinsen (Sammellinsen) wird mit positivem Vorzeichen angegeben. Parallel auf diese Linsen auftreffende Lichtstrahlen werden gemeinsam auf den Brennpunkt fokussiert. Dieser Punkt stellt den Schnittpunkt der parallel einfallenden Lichtstrahlen mit der optischen Achse dar (Abbildung 2 A).

Konkavlinsen streuen Licht, es divergiert von der optischen Achse. Die Brechkraft wird mit negativem Vorzeichen angegeben und der Brennpunkt ist jener Punkt an welchem die rückwärtig verlängerten Lichtstrahlen die optische Achse schneiden (Abbildung 2 B).

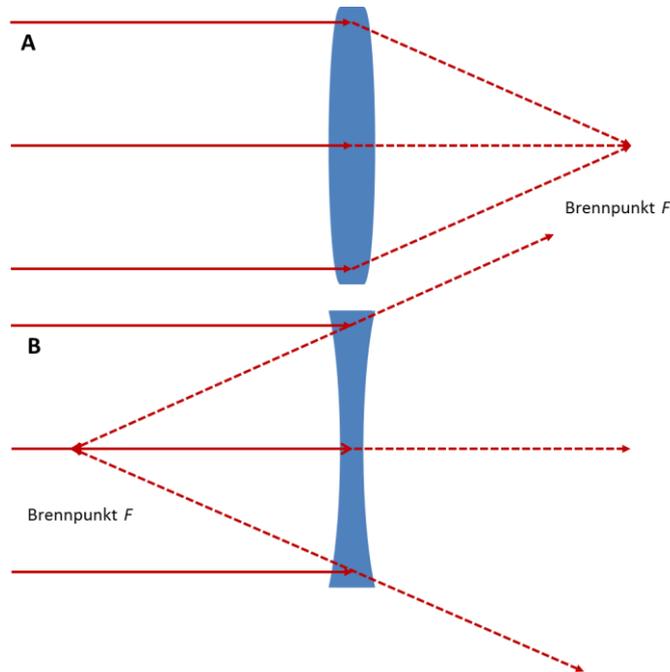


Abbildung 2: Darstellung einer Konvexen Sammellinse (A) sowie einer Konkaven Streulinse (B) mit ihren Brennpunkten. (Eigenentwurf)

Über die Linsengleichung lassen sich Bild- und Gegenstandsweite, die Höhe sowie die Brechkraft der Linse berechnen. Mithilfe des Strahlensatzes (Abbildung 3) lassen sich entsprechende Werte sowohl berechnen als auch konstruieren.

Die Brechkraft von Linsen wird grundsätzlich in Dioptrien angegeben, wobei gilt:

$$D = \frac{1}{f}$$

Wobei D die Brechkraft der Linse und f die Brennweite der Linse in Metern ist.

Weiterhin gilt die Linsen- oder Abbildungsgleichung welche die Beziehung zwischen Gegenstandsweite g , Bildweite b und Brennweite f beschreibt:

$$\frac{1}{b} + \frac{1}{g} = \frac{1}{f}$$

Hierbei beschreibt die Gegenstandsweite unter Annahme einer flachen Linse die Distanz des abgebildeten Objektes zum Linsenmittelpunkt und die Bildweite jene Distanz des Bildes des Objektes zur Linsenmitte (Abbildung 3).

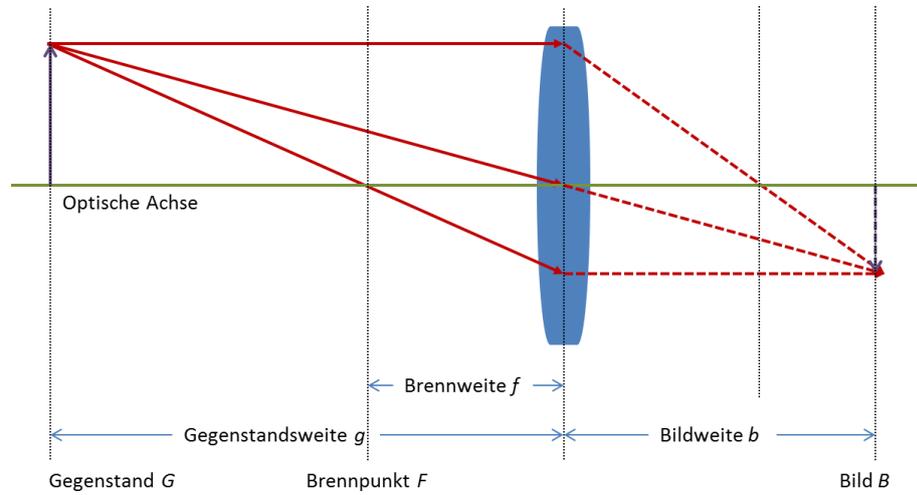


Abbildung 3: Darstellung der Konstruktion des Strahlensatzes anhand einer Konvexen Linse mit Brennweite f . (Eigenentwurf)

1.1.3 Kontrast

Es wird zwischen verschiedenen Arten von Kontrast (K) unterschieden. Der in dieser Arbeit relevante Kontrast ist der Helligkeitskontrast, wohingegen der Farbkontrast hier nur eine geringe Rolle spielt.



Abbildung 4: Einfache Darstellung von hohem (links) und niedrigem (rechts) Kontrast. (Eigenentwurf)

Der Helligkeitskontrast wird über die Leuchtdichte, also die vom Auge wahrgenommene Helligkeit, bestimmt und definiert sich über die maximale und minimale Leuchtdichte, L_{max} und L_{min} , wobei zwei gängige Definitionen nach Weber und Michelson vorliegen. Grundsätzlich gilt, je größer der Unterschied der Leuchtdichte zweier benachbarten Flächen, desto größer der Kontrast (Abbildung 4).

Der Weber-Kontrast ist

$$K_w = \frac{L_{max}}{L_{min}} - 1 \quad \text{wobei } 0 \leq K_w \leq \infty$$

$$\text{Wenn } L_{min} = 0, \text{ somit ist } K_w = \infty$$

Da zur Angabe von Kontrasten normierte Werte hilfreich sind, wird üblicherweise der Michelson-Kontrast K_m verwendet. Er erlaubt eine schnelle Einschätzung des Kontrastes:

$$K_m = \frac{(L_{max} - L_{min})}{(L_{max} + L_{min})} \quad \text{wobei } 0 \leq K_m \leq 1$$

$$\text{Somit ist } K_m = 1 \text{ für } L_{min} = 0$$

Nach dem Weber-Fechner Gesetz nehmen Sinnesorgane üblicherweise nur relative Änderungen des Sinneseindrucks wahr. Dies gilt auch für die Wahrnehmbarkeit von Helligkeitsunterschieden.

1.1.4 Ortsfrequenz und Modulationstransferfunktion

Zur Bestimmung des Detailreichtums eines Bildes wird die Modulationstransferfunktion (MTF) verwendet. Sie stellt eine Funktion der Ortsfrequenz dar, welche wiederum in der Wahrnehmungspsychologie als die Anzahl der Kanten oder Streifenpaare pro Grad des Seh winkels beschrieben wird. Je höher also die Ortsfrequenz eines Bildes ist, desto mehr Streifenpaare sind vorhanden und desto mehr Details befinden sich in diesem (Abbildung 5).

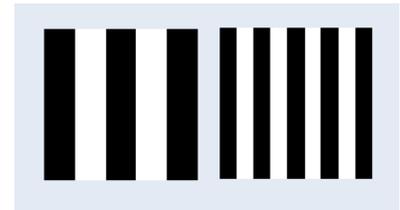


Abbildung 5: Einfache Darstellung von niedriger (links) und hoher (rechts) Ortsfrequenz. (Eigenentwurf)

$$MTF(f) = \frac{\text{Bildkontrast}(f)}{\text{Objektkontrast}(f)}$$

Wobei f die Ortsfrequenz der Modulation ist.

Wird der Helligkeitskontrast reduziert, so reduziert sich der Kontrast bei allen Ortsfrequenzen gleichmäßig, findet eine Defokussierung statt, so reduziert sich der Kontrast entsprechend der Ortsfrequenz (Abbildung 6).

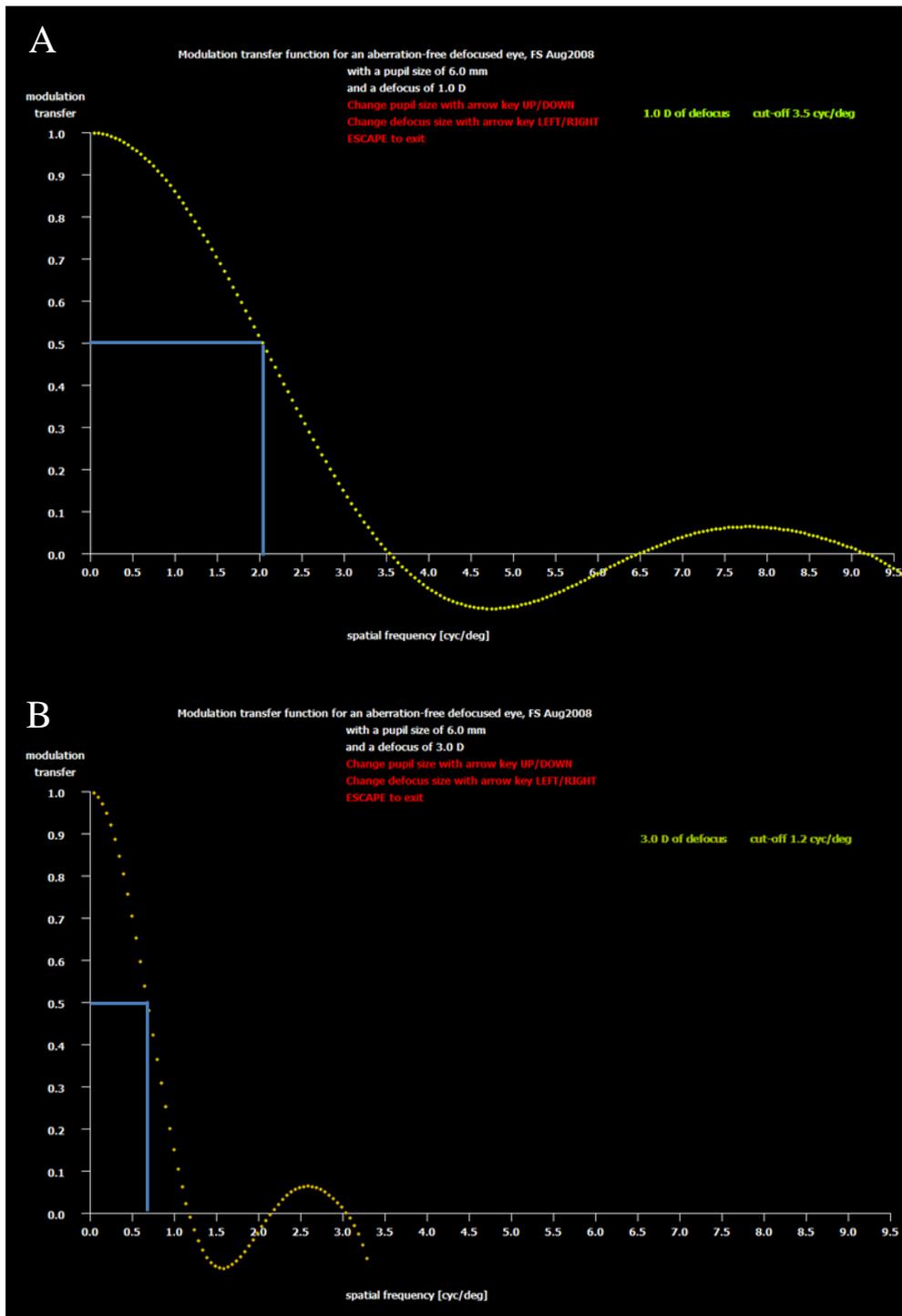


Abbildung 6: Darstellung der Modulationstransferfunktion anhand eines von Prof. Frank Schaeffel bereitgestellten Programmes. Die X-Achse gibt die Ortsfrequenz und somit den Detailreichtum an. Die Y-Achse gibt die Kontrastübertragung an. Der Wert 1 entspricht 100% Kontrastübertragung. Anhand des gelben Kurvenverlaufs kann somit die relative Kontrastreduktion entsprechend der jeweiligen Ortsfrequenz abgelesen werden (blaue Linien). Eine Kontrastreduktion von 50% findet in A mit 1dpt Defokussierung bei etwas über zwei Streifenpaaren pro Grad statt, bei B mit 3dpt bereits bei etwa 0,6 Streifenpaaren pro Grad. Die sich wieder über 0 erhebende gelbe Kurve in beiden Abbildungen stellt die Scheinauflösung dar. Durch die Defokussierung und damit einhergehende Verbreiterung benachbarter Elemente des Bildes findet eine Überlappung dieser statt, was z.B. in phasenverkehrten Streifenmustern sichtbar werden kann (M. Bach, S. Waltenspiel, und A. Schilwächter, "Detection of defocused gratings - Spurious resolution, a pitfall in the determination of visual acuity based on preferential looking or VEP," in J. J. Kulikowski, C. M. Dickinson, und I. J. Murray (eds), Seeing contour and colour, Pergamon press, 562-565 (1989))

1.1.5 Defokussierung

Wird in einem fokussierten optischen System, welches eine definierte Abbildungsweite hat, eine Linse eingefügt, so entsteht eine Defokussierung entsprechend der eingesetzten Linse. Diese durch Linsen hervorgerufene Unschärfe reduziert den Kontrast im Bild. Im Gegensatz zur direkten Kontrastreduktion über eine Veränderung der Helligkeitswerte findet diese Reduktion jedoch in Abhängigkeit der jeweiligen Ortsfrequenzen statt. Je höher die Ortsfrequenz ist, desto stärker fällt die Reduktion aus. Dieser Unterschied wirft die Frage auf, ob die Retina, im Speziellen die Ganglienzellen, dazu in der Lage sind, zwischen Defokussierung und Kontrastreduktion zu unterscheiden, auch wenn beide nominell im primären Empfindlichkeitsbereich des betrachteten Auges dieselbe Kontrastreduktion aufweisen sollten.

Das Vorzeichen der Defokussierung, also ob das Bild vor oder hinter der Retina scharf abgebildet wird, kann im Auge wahrgenommen werden. Belegt ist dies dadurch, dass sowohl Hühner- als auch Säuger Augen dazu in der Lage sind, während des Wachstums die Augenlänge entsprechend zu regulieren (siehe Kapitel 1.2.3, 1.2.4 und 0).

Wie genau diese Vorzeichenerkennung stattfindet, ist bislang nicht geklärt, einige Hinweise liegen jedoch vor (siehe 1.4, Seite 23).

Chromatische Aberration

Durch die Brechung eines Lichtbündels tritt ein physikalischer Effekt auf, welcher in optischen Systemen von sehr großer Bedeutung ist. Wie in Kapitel 1.1.1 dargelegt, wird Licht an der Grenzschicht zweier optisch unterschiedlicher Medien gebrochen. Diese Brechung ist abhängig von den jeweiligen Brechungsindizes der Medien, aber auch von der Wellenlänge des Lichts. Je kurzwelliger das Licht, desto stärker ist die Brechung die es erfährt

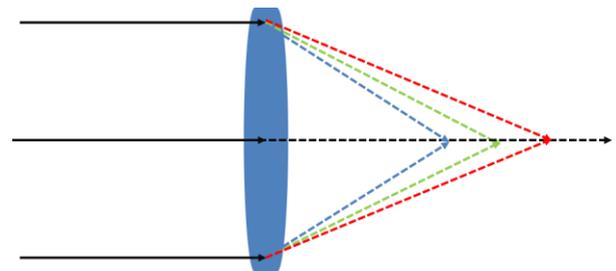


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Chromatischen Aberration: Blaues Licht wird stark, rotes wird schwächer gebrochen. (Eigenentwurf)

(Abbildung 7). Die darin begründete Chromatische Aberration resultiert in unterschiedlichen Schärfeebenen in der optischen Abbildung. Wird also ein Bild mit dem vollständigen Farbspektrum projiziert, so wird Grundsätzlich der Fokus des blauen Lichts vor jenen von grünem und rotem Licht liegen. Betrachtet man diesen Effekt entlang der optischen Achse des Systems, so spricht man von Longitudinaler Chromatischer Aberration (LCA), betrachtet man ihn auf einer Projektionsfläche, so spricht man von Transversaler Chromatischer Aberration (TCA).

Größenänderung durch Defokussierung

Wird im experimentellen Umfeld eine Defokussierung durch Einbringung einer Linse hervorgerufen, so muss bedacht werden, dass dies grundsätzlich eine Änderung der Größe des Bildes zur Folge hat. Negative Linsen verkleinern, positive vergrößern das Bild. Dies wiederum hat zur Folge, dass im Falle einer Abbildung auf der Retina eines Auges sich die Position des Bildes ändert und somit die Erregung der Zellen nicht mehr direkt verglichen lässt. Allein

durch diese Größenänderung ist es möglich, dass die Retina als Netzwerk abweichende Reaktionen zeigt, welche nicht auf die Defokussierung, sondern auf die abweichende Reizung der Zellen aufgrund des sich unterscheidenden Lichteinfalls zurückzuführen ist.

Um dieses Problem zu umgehen und dennoch eine reelle Defokussierung beizubehalten, bedarf es der Anwendung eines speziellen optischen Systems, der Badal Optik.

1.1.6 Badal Optik

Die durch Linsen hervorgerufene Defokussierung eines Bildes bedingt gleichzeitig eine Änderung der Bildgröße. Durch diese Größenänderung liegt eine abweichende optische Stimulation der Netzhaut vor, was in sich bereits eine messbare Änderung des Antwortverhaltens der Retina nach sich ziehen kann. Dies ist im experimentellen Umfeld nicht akzeptabel.

Die in dieser Arbeit verwendete Badal Optik nutzt eine zusätzliche konvexe Linse zur Abbildung (Wittenberg 1988, Atchison et al. 1995, Kedzia und Twardowski 1998). Diese Badal-Linse wird so im optischen System eingebracht, dass ihr Brennpunkt mit dem vorderen Knotenpunkt der abbildenden Linse des optischen Systems übereinstimmt (Abbildung 8). Hierdurch wird erreicht, dass der vom Objekt eingenommene Sehwinkel sich nicht verändert, wenn sich das Objekt entlang der optischen Achse bewegt. Alle von einem Punkt des Objekts ausgehenden Lichtstrahlen werden sich, gleichgültig von der Distanz des Objektes vom optischen System, am selben Punkt schneiden und das Bild wird somit grundsätzlich den identischen Bereich der Retina abdecken. Die Größe des virtuellen Bildes wird sich jedoch entsprechend der Distanz des Objektes von der Badal-Linse verändern. Je weiter sich das Objekt entfernt, desto größer wird dieses virtuelle Bild erscheinen. Dies wird als positive Defokussierung wahrgenommen. Eine Annäherung des Objektes an die Badal-Linse zieht eine Verkleinerung des virtuellen Bildes und damit eine negativere Defokussierung nach sich.

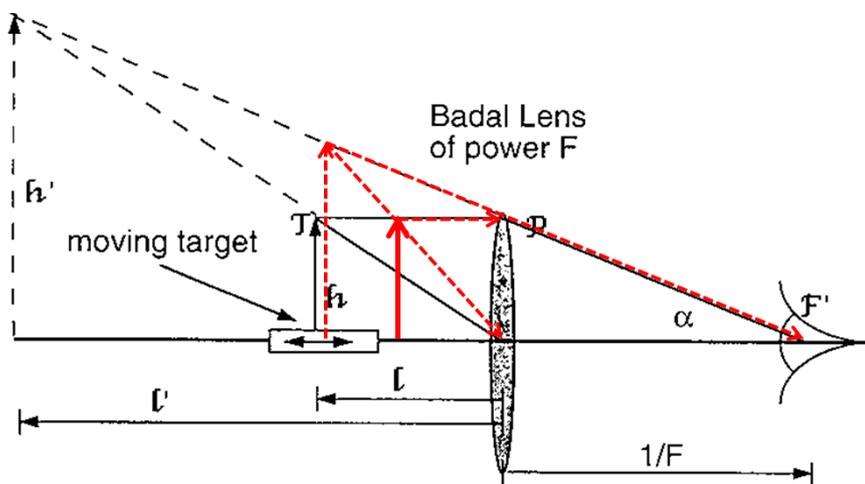


Abbildung 8: Effekt einer Badal-Linse nach Atchinson (Atchison et al. 1995). Wird das Objekt (moving target, T) an die Badal-Linse angenähert, so verändert sich die Defokussierung im System ohne, dass sich der vom Objekt eingenommene Winkel α im Sehfeld verändert (rote Linien).

Die Grenzen dieses einfachen Badal-Setups sind durch die Brechkraft der Badal-Linse sowie deren Dicke gegeben. Nimmt man eine ideale, flache Linse an, so ist die negativste

Defokussierung erreicht, wenn die Position des Objektes mit der Position der Badal-Linse übereinstimmt. Die Stärke dieser Defokussierung ist die negative Brechkraft der verwendeten Linse. Die Änderung der Defokussierung ist linear zur Distanz des Objektes vom Brennpunkt der Badal Linse, mit einer Defokussierung von 0dpt, wenn sich das Objekt im Brennpunkt der Badal-Linse befindet. Entfernt sich das Objekt weiter vom Brennpunkt der Badal-Linse, so tritt eine positive Defokussierung auf, welche theoretisch unendlich werden kann. Durch die Linearität der Defokussierung mit der Distanz des Objekts zum Brennpunkt der Badal-Linse lässt sich dieses System sehr gut in Experimenten anwenden. Wird beispielsweise eine +10D Linse verwendet, so liegt die maximale negative Defokussierung des Systems bei -10dpt und jeder Zentimeter Distanz des Objekts vom Brennpunkt entspricht einer Defokussierung um 1dpt, entsprechend der Richtung.

1.1.7 Optische Komponenten des Auges

Optisch relevante Komponenten von Augen sind jene, welche Eigenschaften der Lichtbrechung, Absorption oder Streuung aufweisen. Bei terrestrischen Lebewesen stellt der Übertritt des Lichts von der Luft in das Auge bereits die erste relevante Beeinflussung des Lichteinfalls dar. Die Grenzschichten, welche das Auge zur Luft abgrenzen weisen einen höheren Brechungsindex auf als Luft. Diese erste Schicht ist bei Wirbeltieren die Kornea, welche einen dem Wasser sehr ähnlichen Brechungsindex von 1,4 aufweist und somit das aus der Luft mit dem Brechungsindex 1,0 übertretende Licht bereits stark bricht, also im Auge fokussiert. Die zweite Komponente ist die Augenlinse. Bei wasserlebenden Tieren fällt die Kornea als optisch aktive Komponente aus, weshalb hier spezielle Anforderungen an die Brechkraft der zweiten Komponente gestellt werden. Diese Linse ist häufig sphärisch, bei höheren Lebewesen jedoch oft abgeflacht oder gar konisch, wie beispielsweise bei Eulen. Bei Katzen beispielsweise existiert eine reflektierende Schicht (*Tapetum lucidum*), welche das einfallende Licht am Augenhintergrund reflektiert und somit die Absorptionsrate erhöht, was speziell bei sehr geringer Leuchtdichte vorteilhaft ist.

In der Fachliteratur wird zur vereinfachten Darstellung häufig eine gemeinsame Brechkraft von Kornea und Linse angenommen und dargestellt.

1.1.8 Optische Stimulation

Unter dem Sammelbegriff „optische Stimulation“ verbergen sich verschiedenste Stimuli. Naturnahe Stimuli enthalten Bewegungsmuster, Farb- und Helligkeitskontraste sowie ein weites Spektrum von Ortsfrequenzen. Oft wird der verwendete Stimulus aber gezielt einfach gehalten, um die Antworten abgeleiteter Zellen auf möglichst wenige Bildeigenschaften zu beschränken. Beispielsweise beinhaltet ein phasenrevertiertes schwarz-weißes Schachbrettmuster keine Bewegungs- oder Farbinformation, man kann jedoch die Zellantworten mit dem Phasenwechsel korrelieren, und das Ortsfrequenzspektrum ist kontrollierbar, so dass mit verschiedenen großen Schachbrettmustern die Sehschärfe abgeschätzt werden kann. Andere einfache Stimuli sind Sinusgitter, bewegte Quadrate oder Modulationen der Ganzfeldhelligkeiten, wie sie im Luminanz-Elektroretinogramm verwendet werden. Auch weißes Rauschen, ähnlich eines Rauschbildes alter Fernseher, ist hilfreich, um Größe und Position der rezeptiven Felder retinaler Neurone zu bestimmen. All diesen

artifiziellen Reizen gemeinsam ist, dass sie die Untersuchung des Antwortverhaltens der gesamten Netzhaut erleichtern, dafür aber nur für eine bestimmte Bildeigenschaft.

Komplexe Stimuli

Alternativ kann der Retina ein möglichst naturnaher optischer Stimulus präsentiert werden, hier ein Film. Es ist zu erwarten, dass sämtliche Bildeigenschaften in einem Film ausreichender Komplexität enthalten sind, ähnlich wie es im intakten Auge zum Interpretieren der visuellen Umgebung nötig ist. Da jedoch keine Kontrolle über den exakten, zur Zellantwort stimulierenden Reiz möglich ist, ist eine eindeutige Identifizierung des notwendigen Reizes für die gemessene Antwort nicht direkt möglich. Es wird auch nicht zu einem definierten Zeitpunkt ein definierter Reiz gegeben, anhand dessen die abgeleitete Antwort zugeordnet werden kann, es gibt kein Trigger-Signal. Es ist nur möglich, die gemessenen Antworten im Vergleich zu den Antworten auf einen modifizierten Stimulus zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein naturnaher Reiz verwendet, der Bewegung, Farb- und Kontrastwechsel und Objekte beinhaltet. Dies war sinnvoll, da eine vorige Arbeit mit MEA-Ableitungen an der Retina des Huhns keine spezifische Antwort der Ganglienzellen auf Defokussierung des Bildes isolieren konnte: bei Reizung mit einem phasenrevertierenden Schachbrettmuster wurde Defokussierung von den Ganglienzellen ebenso bewertet, wie globaler Kontrastabfall (Diedrich und Schaeffel 2009). Da es Hinweise gibt, dass Bewegung des retinalen Bildes Voraussetzung für die Erkennung von Defokussierung ist (Bitzer und Schaeffel 2005), wurde in der vorliegenden Arbeit ein komplexer Reiz verwendet: ein Film.

1.2 Sehen

"To suppose that the eye with all its inimitable contrivances for adjusting the focus to different distances, for admitting different amounts of light, and for the correction of spherical and chromatic aberration, could have been formed by natural selection, seems, I freely confess, absurd in the highest degree."

Charles Darwin

Bereits Charles Darwin erkannte die enorme Komplexität der Augen höherer Lebewesen. Er selbst zweifelte immer wieder an seiner eigenen Theorie, versuchte er sich die Entwicklung der Augen evolutionär vorzustellen. Dennoch hielt er an ihr fest, was sich als Glücksfall für die Biologie herausstellen sollte.

Im Tierreich kommen verschiedenste Arten der Rezeptoren zur Wahrnehmung optischer Reize vor, welche in Abhängigkeit zu den Anforderungen der jeweiligen Arten und ihrem Habitat stehen. Die einfachsten Organe zur Lichtwahrnehmung sind lichtempfindliche Sinneszellen auf der Haut, die komplexesten wohl die Linsenaugen von Wirbeltieren und Kopffüßlern sowie die Facettenaugen der Insekten. Die fossil ältesten nachgewiesenen Augen sind über 500 Millionen Jahre alt und stammen aus der Ordnung der Nautiliden.

Das Linsenauge entwickelte sich in der Evolution konvergent sowohl bei Cephalopoden als auch bei Vertebraten und besitzt eine analoge, sich funktionell entsprechende Abbildungsoptik.

1.2.1 Das Auge der Wirbeltiere

Der Grundbauplan von Wirbeltieraugen entspricht prinzipiell einer Lochkamera (Abbildung 9). Durch eine begrenzte Eintrittsöffnung (Pupille) tritt das Licht ins Auge ein und formt auf der Rezeptorschicht ein Bild. Den Rezeptoren nachgeschaltet sind Nervenzellen (Neurone), welche die Signale der Rezeptorzellen aufnehmen und weiterleiten. Aufgrund der Phylogenese des Wirbeltierauges als Teil des Gehirns liegen in ihm die Photorezeptoren an der dem Lichteinfall abgewandten, hinteren Seite der zum sehen spezialisierten Zellschicht (Retina). Um Licht wahrnehmen zu können, muss dieses erst durch alle Schichten der Retina dringen, bevor es funktionell absorbiert werden kann. Dieser Aufbau ist insofern problematisch, als dass die Informationsweiterleitung in Richtung Gehirn über Axone geschieht, welche erst aus dem Augeninnenraum geleitet werden müssen. Daraus resultierend existiert im Wirbeltierauge ein blinder Fleck, welcher die Austrittsstelle der gebündelten Axone der retinalen Ganglienzellen darstellt. Die Axone der retinalen Ganglienzellen sind nicht myelinisiert, um die Absorption von Photonen zu minimieren. Aufgrund der Ergänzung fehlender Informationen am blinden Fleck selbst durch umliegende Rezeptoren sowie die Stereovision ist er im Regelfall nicht wahrnehmbar.

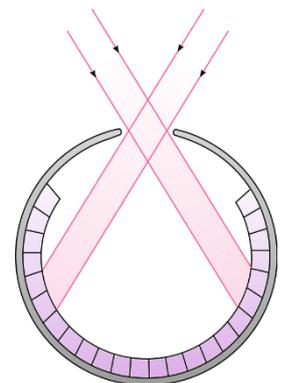


Abbildung 9: Lochkamera-
auge der Wirbeltiere

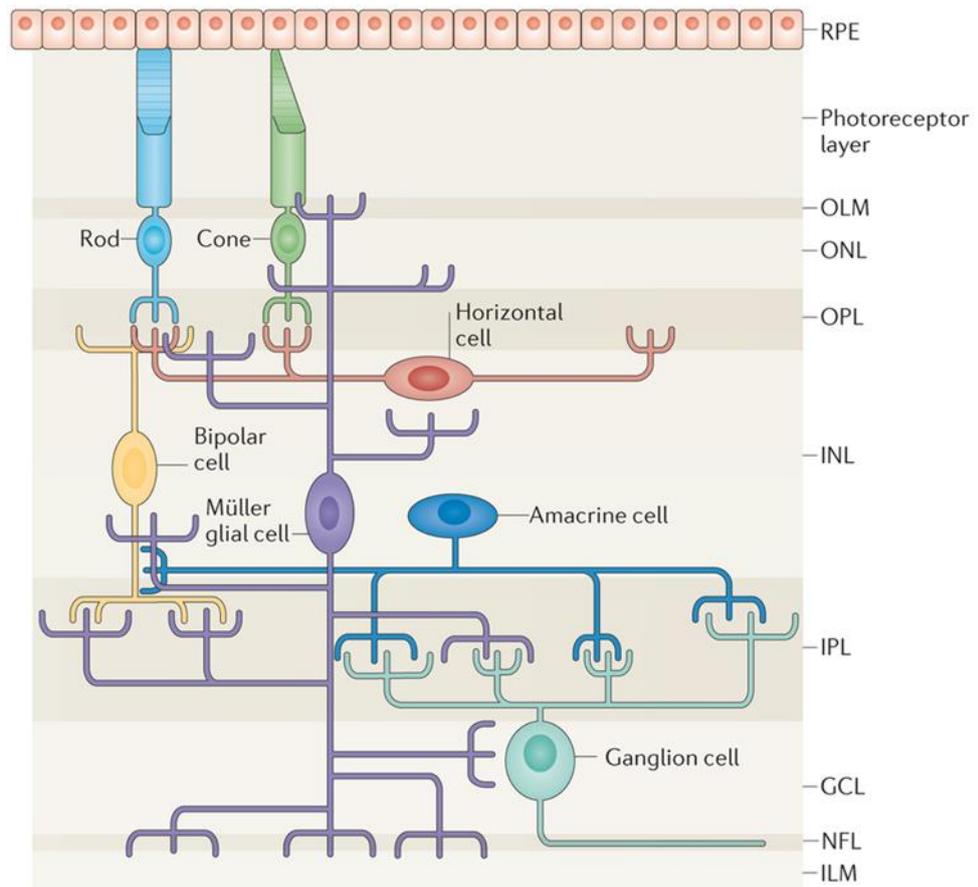
Die Retina

Die Retina ist in funktionellen Schichten organisiert, welche sich grundsätzlich innerhalb der Wirbeltiere kaum unterscheiden (Tabelle 1, Abbildung 10). Die drei großen funktionellen Klassen der Neurone der Retina, Ganglienzellen, Photorezeptoren und Interneurone, verteilen sich auf diese Schichten.

Tabelle 1: Liste der einzelnen Ebenen der Retina und der in ihnen vorkommenden Strukturen. Man beachte, dass die innere plexiforme Schicht in sechs Ebenen oder Sublamina unterteilt ist, welche jeweils für sich spezifische Funktionen in der Verarbeitung aufweisen.

<u>Zellebene</u>	<u>Bestandteile</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Ganglienzellschicht 	<ul style="list-style-type: none"> • Zellkörper von Ganglienzellen • Axone von Ganglienzellen
<ul style="list-style-type: none"> • Innere plexiforme Schicht (unterteilt in 6 Ebenen) 	<ul style="list-style-type: none"> • Dendriten von <ul style="list-style-type: none"> ○ Ganglienzellen ○ Amakrinzellen • Axone von <ul style="list-style-type: none"> ○ Bipolarzellen ○ Amakrinzellen
<ul style="list-style-type: none"> • Innere Körnerschicht 	<ul style="list-style-type: none"> • Zellkörper von <ul style="list-style-type: none"> ○ Horizontalzellen ○ Bipolarzellen ○ Amakrinzellen
<ul style="list-style-type: none"> • Äußere plexiforme Schicht 	<ul style="list-style-type: none"> • Synaptische Endigungen von <ul style="list-style-type: none"> ○ Photorezeptoren ○ Horizontalzellen ○ Bipolarzellen
<ul style="list-style-type: none"> • Äußere Körnerschicht 	<ul style="list-style-type: none"> • Zellkörper von Photorezeptoren

Die Photorezeptoren sind sowohl konvergent als auch divergent mit den nachfolgenden Bipolarzellen verschaltet. Diese wiederum projizieren auf die retinalen Ganglienzellen (RGCs). Zwischen diesen drei primären Ebenen befinden sich Horizontal- und Amakrinzellen, welche durch Inhibition und Exhibition, entsprechend der jeweiligen Bahn der Verarbeitung, der Reizmodulation dienen. Ein nicht unerheblicher Teil der Zellen der Netzhaut wird von den Gliazellen der Retina, den Müller-Zellen gestellt. Sie reichen durch alle Schichten der Retina hindurch und haben ihre Zellkerne in der inneren Körnerschicht. Sie übernehmen sowohl physiologische (Aufnahme von Kalium nach der Hyperpolarisierung der Neurone) als auch optische Funktionen. Untersuchungen konnten zeigen, dass sie Licht direkt von der Grenze des Glaskörpers hin zu den Photorezeptoren leiten, ähnlich eines Glasfaserkabels.



Nature Reviews | Neuroscience

Abbildung 10: Vereinfachte Darstellung der Zellen der Retina und ihrer Schichten nach Goldman (Goldman 2014). (RPE: Retinales Pigmentepithel; OLM: Äußere Grenzsicht; ONL: Äußere Körnerschicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere Körnerschicht; GCL: Ganglienzellschicht; NFL: Nervenbahnschicht; ILM: Innere Grenzsicht)

Photorezeptoren

Der adäquate Reiz zur Wahrnehmung von Licht durch die Photorezeptoren ist das Auftreffen eines einzelnen Photons auf ein Rhodopsin-Pigment. Geschieht dies, so erhöht sich der Energiegehalt des Rhodopsins, speziell des Retinals, also der prosthetischen Gruppe des Sehpigments. Hierdurch findet eine Konformationsänderung vom 11-cis-Retinal zum all-trans-Retinal hin statt. Durch diese cis-trans-Isomerisierung wird Transducin, ein membranständiges Protein auf der cytoplasmatischen Seite, aktiviert. Dies wiederum aktiviert Phosphodiesterase-Moleküle, welche cGMP hydrolysieren.

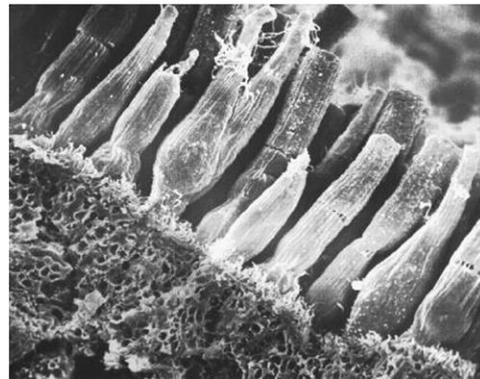


Abbildung 11: Elektronenmikroskopisches Bild von Photorezeptoren der Retina

(<http://medicalschooll.tumblr.com>)

Dieses ist von großer Bedeutung beim Na^+ -Dunkelstrom (Abbildung 12). In den Außensegmenten der Photorezeptoren findet ein konstanter Na^+ -Einstrom durch cGMP-aktivierte Kanäle statt, welcher sie depolarisiert. Im inneren Segment befinden sich K^+ -selektive Ionenkanäle, welche die Zelle hyperpolarisieren. Zusätzlich befinden sich Na^+/K^+ -Pumpen in hoher Dichte im inneren Segment, welche Na^+ hinaus und K^+ hineinbefördern, was zu einem elektrischen Gleichgewicht führt und das Membranpotential bei etwa -40 mV hält. Wird cGMP also hydrolysiert, wird die Zelle hyperpolarisiert und die Signalkaskade aktiviert. Wird der Lichtreiz beendet, so fällt die Aktivierung von Transducin aus und die Zelle wird wieder in ihren Ruhezustand versetzt. Durch die Inaktivierung der cGMP-abhängigen Ionenkanäle versiegt auch der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Dies wiederum aktiviert die Guanylatcyclase, wodurch cGMP aus GTP regeneriert wird. Dieser Prozess aktiviert schlussendlich den Dunkelstrom wieder, auch wenn der Lichtreiz anhält. Es findet also eine Adaptation statt. Die Aktivierungsrate von Transducin gegenüber Phosphodiesterase liegt bei etwa 10^6 Molekülen pro Sekunde, was eine sehr eindrucksvolle Reizverstärkung ist. Die Absorption eines einzelnen Photons ist ausreichend, um eine Antwort der absorbierenden Zelle zu generieren und die hohe Anzahl an vorhandenem Sehpigment (bis zu 20000 Moleküle pro μm^2 in den Rezeptormembranen) dient einzig der Erhöhung der Wahrscheinlichkeit, ein Photon zu absorbieren. Aus diesem Grund befindet sich die Empfindlichkeit der Wirbeltieraugen am theoretisch möglichen Maximum.

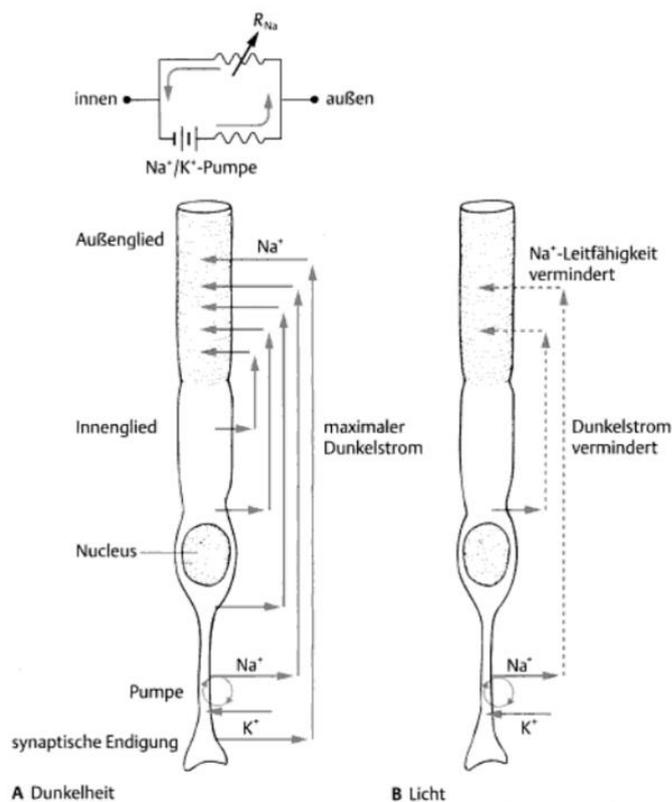


Abbildung 12: Na^+ -Dunkelstrom in Dunkelheit und Licht (Aus Eckert - Tierphysiologie).

Ein Photon stellt die kleinste Einheit des Lichtreizes dar und kann nicht weiter aufgespalten werden. Somit ist eine höhere Reizempfindlichkeit nicht möglich.

Farbsehen ist bei Wirbeltieren weit verbreitet. Um Farben wahrnehmen zu können, sind mindestens zwei unterschiedliche Photorezeptoren notwendig, welche voneinander abweichende Absorptionsspektren aufweisen. Diese Photorezeptoren sind in den meisten Fällen, benannt aufgrund ihrer äußeren Form, Zapfen. Ihnen gegenüber stehen die Stäbchen, welche eine wesentlich höhere Lichtempfindlichkeit aufweisen, jedoch nicht zum Farbsehen ausgebildet sind. Es sind jedoch auch Tiere bekannt, welche unterschiedliche Stäbchentypen aufweisen und diese somit zum Farbsehen verwenden können. Die exakte Anatomie sowie die speziellen Anpassungen der Augen verschiedener Wirbeltiere variieren sehr stark, daher werden nachfolgend nur die Augen von Mensch (*Homo sapiens*), Huhn (*Gallus gallus*) und Maus (*Mus musculus*) erörtert.

Bipolarzellen

Mindestens zwölf verschiedene Typen von Bipolarzellen wurden nachgewiesen. Sie bilden synaptische Verbindungen mit allen Zapfen oder Stäbchen im Bereich der Ausdehnung ihrer Dendriten aus, bei Säugern jedoch nicht mit beiden Typen gleichzeitig. Weiterhin existieren auch Synapsen zu Horizontalzellen, welche der lateralen Inhibition dienen. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Signaltransduktion von Rezeptor- zu Ganglienzellen inklusive der entsprechenden Verstärkung oder Abschwächung des neuronalen Signals durch On- sowie Off-Bipolarzellen (Abbildung 13), bedingt durch den ihr rezeptives Feld treffenden optischen Reiz. Die zwölf bekannten Typen transferieren, aufgrund ihrer sich deutlich unterscheidenden Rezeptoren, Ionenkanälen und internen Signalsystemen, jeweils einen anderen Teil der von den Photorezeptoren kodierten Information. Diese zwölf unterschiedlichen Signalwege generieren unter Anderem On-Off Antworten von Ganglienzellen, sowohl im Farbraum als auch im Helligkeitsraum. Viele der sich unterscheidenden Reaktionen der Bipolarzellen, wie beispielsweise abfallende und anhaltende Erregung, beruhen auf der Funktion unterschiedlicher Glutamat-rezeptoren.

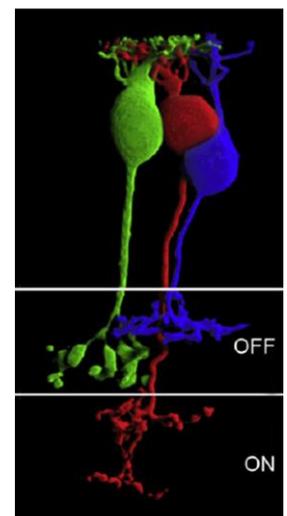


Abbildung 13: Grafische Darstellung von Bipolarzellen (Masland 2012), welche in unterschiedlichen Sublamina synaptische Verbindungen eingehen (ON- und OFF-Sublaminae).

Die verschiedenen Bipolarzellen terminieren in den sechs Ebenen der inneren plexiformen Schicht. Dort gehen sie synaptische Verbindungen mit spezifischen, morphologisch, molekular und funktionell unterscheidbaren Ganglienzellen ein. Der größte Teil der Vernetzung der inneren plexiformen Schicht geschieht innerhalb dieser Ebenen, nur ein sehr kleiner Teil des Informationsflusses findet zwischen den Ebenen statt. Sowohl intrinsische als auch extrinsische Einflüsse auf das Antwortverhalten der Bipolarzellen sind in Ableitungen am Soma eingeschlossen.

In der jüngeren Literatur wurde nachgewiesen, dass zumindest drei der Bipolarzellen auch alles-oder-nichts antworten (Spikes) generieren (Dreosti et al. 2011; Baden et al. 2011).

Horizontalzellen

In der Säugetierretina sind üblicherweise zwei Typen von Horizontalzellen nachweisbar. Einige Nager besitzen nur einen Typ von Horizontalzellen (Abbildung 14). Sie bilden inhibitorische Verbindungen mit Zapfen und Stäbchen aus und sind über Gap Junctions mit anderen Horizontalzellen Verbunden.

Ihre Aufgabe im Netzwerk ist die lokale Amplitudensteuerung. Sie messen über die auf sie projizierenden Photorezeptoren die durchschnittliche Beleuchtung eines Teiles der Retina um dann, relativ dazu, die Aktivität der Photorezeptoren anzupassen. Dies dient dazu, die Erregung der retinalen Schaltkreise innerhalb ihrer funktionellen Grenzen zu halten. Dadurch wird es möglich, verschiedene Objekte, welche Helligkeitsunterschiede im Bereich mehrerer Größenordnungen aufweisen, gleichzeitig wahrzunehmen ohne Teile der Retina zu übersättigen beziehungsweise zu blenden.

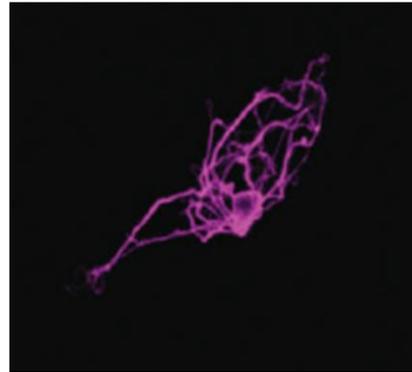


Abbildung 14: Horizontalzelle, gefärbt über Calbindin Antikörper (Guo et al. 2010).

Amakrinzellen

29 verschiedene Typen wurden in Studien von 1998 und 1999 in der Retina von Hasen nachgewiesen. Aufgrund ihrer Lage in der Retina, der nicht klaren Polarität der Zelle sowie des Fehlens eines Axons ist es schwierig, ihre Terminalen eindeutig zu lokalisieren. Sie bilden synaptische Verbindungen mit Bipolaren, Ganglienzellen und auch anderen Amakrinzellen aus und tun dies auch über die Grenzen der Ebenen der inneren plexiformen Schicht hinweg.

Sie wirken inhibitorisch auf die ihnen nachgeschalteten Neurone und haben zumeist eine klar definierte Aufgabe, oft sogar nur exakt diese eine Aufgabe. Einige Amakrinzellen umfassen weite Teile der Retina und sind in unabhängige Untereinheiten aufteilbar. Ein Beispiel ist die „Starburst“ Amakrinzelle (Abbildung 15), welche zur Identifizierung der Bewegungsrichtung eines Objektes dient, weshalb hier eine große Abdeckung des Sichtfeldes hilfreich ist.

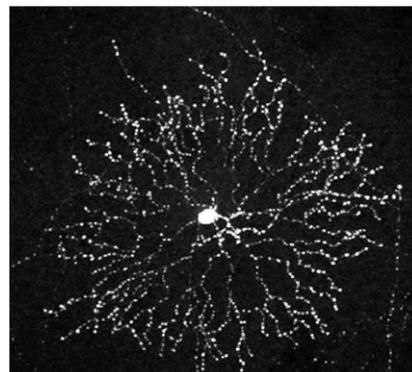


Abbildung 15: Starburst-Amakrinzelle, markiert mit AAV-GFP (Samuel et al. 2011).

Ganglienzellen

Die Anzahl derzeit bekannter Ganglienzellen steigt mit jeder weiteren Studie, welche die Identifikation derselben zum Ziel hat. Mindestens 20 morphologisch unterschiedliche Typen sind am Beispiel der Hasenretina bekannt, wovon mehr als die Hälfte bislang unbekannte Aufgaben erfüllt. Eine Besonderheit sind die seltenen, intrinsisch photosensitiven Melanopsin Ganglienzellen. Sie dienen der Synchronisation der circadianen Oszillation und beeinflussen die Pupillenreaktion. Aufgrund der Einflüsse von Amakrinzellen ist die Anzahl an unterschiedlichen Ganglienzellen höher als jene der Bipolarzellen. Beispielsweise existiert nur eine „Blue-ON“ Bipolarzelle, dennoch existiert sowohl eine „Blue-ON“ als auch eine „Blue-OFF“ Ganglienzelle als Resultat des inhibitorischen Einflusses einer Amakrinzelle, welche bei Aktivierung durch ein Signal der On-Bipolarzelle die ihr nachgeschaltete Ganglienzelle inhibiert.

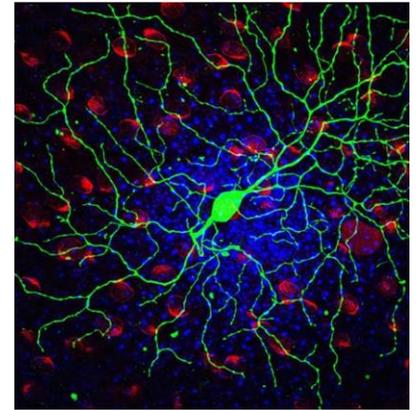


Abbildung 16: Ganglienzelle der Mausretina, markiert mit GFP (grün). Daniel O'Shea 2009.

(<https://www.princeton.edu/artofscience/gallery2009/>)

Die rezeptiven Felder der Ganglienzellen teilen das Sichtfeld nahezu ideal auf. Die Zellkörper sind, relativ zu jenen des gleichen Typs, gleichmäßig über die Retina verteilt. Jede Art von Ganglienzelle teilt das Sichtfeld Mosaikartig auf und alle diese Zellen projizieren ihre Informationen zum Gehirn, was in 20 oder mehr unterschiedlichen Informationen über jeden einzelnen Punkt im Sichtfeld resultiert.

Die hohe Anzahl an Ganglienzellen, deren Funktion bislang unbekannt ist, lässt viel Spielraum für Spekulationen und Spezialisierungen auf bislang nicht untersuchte Aspekte des visuellen Umfeldes.

Die Dendriten der Ganglienzellen reichen in der inneren Plexiformen Schicht in spezifische Ebenen hinein, wo sie von den dort lokalisierten Endknöpfen der Bipolarzellen sowie von Amakrinzellen synaptischen Input erhalten. Ihre nicht myelinisierten Axone werden über den Blinden Fleck gebündelt aus der Retina ausgeführt. Die Axone der Zellen der rechten Hemisphäre beider Augen projizieren auf den Corpus geniculatum laterale (meist LGN, *lateral geniculate nucleus* genannt) der rechten Gehirnhälfte und jene der linken Hemisphäre projizieren entsprechend auf den linken LGN. Die Axone der nasalen Ganglienzellen kreuzen hierbei am Chiasma Opticum. Die finale Verarbeitung der Sehinformation findet schließlich im primären visuellen Cortex (Area 17) statt.

Akkommodation

Wirbeltiere besitzen die Fähigkeit, die Brechkraft ihres optischen Apparates zu variieren. Hierzu sind verschiedene Prinzipien bekannt. Bei Fischen und Amphibien wird durch Muskelkontraktion die Position der Linse im Auge verschoben. Vögel, Reptilien und Säugetiere verändern die Brechkraft durch eine Veränderung der Form der Augenlinse.

Im Falle der Vögel geschieht dies durch eine direkte Muskelkontraktion, welche direkt auf die Linse einwirkt und die Krümmung der Linsenoberfläche verstärkt. Zusätzlich wird die Brechkraft durch eine Änderung der Krümmung der Hornhaut modifiziert.

Die gängige Theorie nach Helmholtz besagt, dass bei Säugetieren durch die Zonula-Fasern, welche am radiären Ziliarmuskel ansetzen, ein Zug auf die Linse ausgeübt wird, welcher die Linse in die typische Ellipsenform bringt. Durch Kontraktion des Ziliarmuskels entspannen sich die Zonula-Fasern, die Linse wird kugelförmiger und die Brechkraft erhöht sich.

1.2.2 Das Auge des Menschen

Das menschliche Auge (Abbildung 17) ist, ebenso wie jene der Altweltaffen, trichromatisch, besitzt also drei anstatt zweier Farbrezeptoren. Diese unterscheiden sich aufgrund der maximalen Absorptionsrate von Photonen mit unterschiedlichem Energiegehalt, also unterschiedlicher Wellenlänge. Sie werden in S, M und L Cones bzw. Zapfen aufgeteilt, entsprechend der von ihnen vornehmlich absorbierten Wellenlängen im kurzen (short, S), mittleren

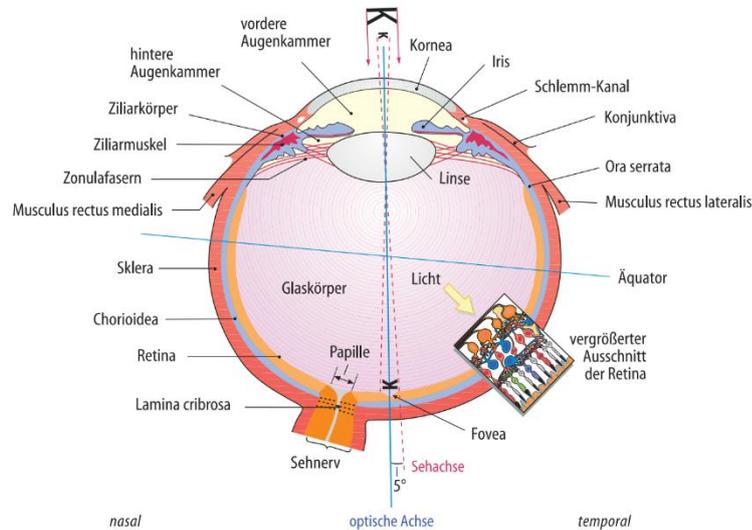


Abbildung 17: Schematische Darstellung des menschlichen Auges. (Lang, F. – Basiswissen Physiologie, 2. Auflage, S. 392)

(medium, M) oder langen (long, L) Wellenlängenbereich. Die unterschiedlichen Absorptionsspektren der Zapfen resultieren aus unterschieden im Opsin des jeweiligen Photopigments. M und L Zapfen gehen evolutionär auf einen einzelnen Photorezeptor zurück, was unter anderem ihre nah beieinanderliegenden Absorptionskurven erklärt. Eine evolutionär bedeutende Neuerung im Primatenaug ist die Fovea centralis. Sie stellt eine ca. 1,5mm durchmessende Struktur der Retina dar, welche der Maximierung der Kontrastempfindlichkeit und der Sehschärfe dient. Da Primaten und damit auch Menschen dazu in der Lage sind, Objekte mit ihren Augen zu folgen und ihren Fokus entsprechend der Aufmerksamkeit zu kontrollieren, genügt ein vergleichsweise kleiner Bereich der Retina mit maximaler Auflösung um die höchstmögliche Sehschärfe zu erhalten. Diese liegt beim Menschen bei etwa 30-60 Streifenpaaren/Grad, entsprechend individueller Umstände und den jeweiligen Bedingungen. Die Photorezeptoren der Fovea, ebenso wie das gesamte Netzwerk der nachfolgenden Nervenzellen, unterliegen einer starken Anpassung an die Anforderung, das Auflösungsvermögen zu maximieren. Dies beginnt damit, dass in der Zentralregion der Fovea, der sogenannten Foveola, ausschließlich M und L-Zapfen vorkommen. Zwischen beiden Signalwegen befinden sich sehr viele Querverbindungen, was im Gegensatz zum vergleichsweise isolierten Signalweg der S-Zapfen steht. Da M und L-Zapfen zusätzlich sehr ähnliche Absorptionsmaxima aufweisen, sind sie hervorragend dazu geeignet, gemeinsam zur Maximierung der Auflösung verwendet zu werden. Hierdurch und aufgrund des Fehlens anderer Photorezeptoren wird der vorhandene Raum optimal genutzt. Im parafovealen Bereich, also jenem Bereich direkt außerhalb der Fovea, befinden sich besonders viele S-Zapfen sowie Stäbchen. Weiterhin wird die Reizinformation der fovealen Rezeptoren 1:1 über Bipolarzellen auf Ganglienzellen übertragen. Weiter in Richtung Peripherie treten immer weniger Zapfen auf und die Signale vieler Rezeptoren konvergieren auf einzelne Ganglienzellen. Dies erhöht zwar

die Empfindlichkeit gegenüber besonders schwachen Reizen und Bewegungen, reduziert jedoch deutlich das maximale Auflösungsvermögen. Nicht zuletzt liegt der Durchmesser der fovealen Zapfen bei etwa $2\mu\text{m}$, jener der peripheren bei etwa $10\mu\text{m}$, was die Packungsdichte in der Fovea deutlich erhöht. Die Zellkörper im Bereich der Fovea sind zur Seite versetzt, was den Lichteinfall in die Photorezeptoren hier erleichtert.

1.2.3 Das Auge der Maus

Mausaugen folgen, stärker als menschliche Augen, dem Grundplan der Wirbeltieraugen. Sie sind bichromatisch und besitzen keine Fovea. Die Länge des Auges beträgt etwa 3-3,4mm, was vergleichbar mit der Augengröße ähnlich dimensionierter Säuger ist. Werden Augenlänge und Körpergewicht jedoch in Relation gesetzt, so hat die Maus ein fünffach größeres Auge als der Mensch. Dies legt die Einschätzung nahe, dass das Auge für die Maus eine große Bedeutung hat. 97% der Photorezeptoren der Maus sind Stäbchen, die verbliebenen 3% teilen sich in UV und Rot sensitive Zapfen mit einer maximalen Absorption bei 360nm bzw. 515nm Wellenlänge auf. Die Zapfen in

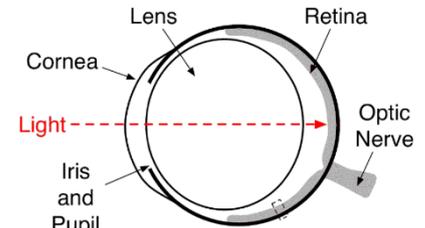


Abbildung 18: Schematische Darstellung eines Mausauges (E.L. Nylén 2010, Dissertation). Der wichtigste Unterschied im Schema, verglichen mit dem menschlichen Auge, ist die Größe und Form der Linse.

der Mausretina unterliegt einer horizontalen Aufteilung mit einer Häufung von Blauzapfen im ventralen und Rotzapfen im dorsalen Bereich. Im Gefrierschnitt auffälligstes Merkmal des Mausauges ist die relative Größe und Form der Linse, welche im adulten Tier weit über 50% der gesamten Länge des Auges einnimmt. Die Form nähert sich der Kugel an, ist also deutlich zu unterscheiden von den Linsen der Menschen. Aufgrund der geringen Größe bedarf es einer sehr hohen Brechkraft des optischen Systems um ein Bild auf der Retina zu fokussieren. Die Brechkraft von Linse und Cornea gemeinsam liegt deshalb bei über 500dpt, was bedeutend über den 60dpt des Menschen liegt. Aufgrund dieses enormen Wertes sind Bildfehler und Unschärfen für Mäuse nur von geringer Bedeutung. Dies, ebenso wie die Tatsache, dass sich die Tiefenschärfe des Mausauges über 10dpt befindet, legt nahe dass das Mausauge weder über eine ausgeprägte Akkommodation verfügt noch einer besonders präzisen Emmetropisierung bedarf.

Die Sehschärfe der hier verwendeten C57BL/6J Mäuse beträgt etwa 0,5 Streifenpaare/Grad und liegt damit deutlich unter jener von Menschen und Hühnern. Höchste Sehschärfe kann bei großen Augen mit möglichst kleinen Photorezeptoren erreicht werden. Je kleiner die Photorezeptoren sind, desto höher kann die Packungsdichte dieser in der Retina ausfallen und desto höher ist auch das Auflösungsvermögen des optischen Apparates. Die geringe Sehschärfe der Maus ist unter anderem dem Umstand geschuldet, dass sehr kleine Augen aufgrund von physiologischen und physikalischen Limitierungen niemals das Auflösungsvermögen größerer Augen erreichen können. Im Mausauge wird 1° des Sehfeldes auf etwa 0,03mm der Netzhaut abgebildet, beim Menschen sind dies etwa 0,29mm. Selbst unter der Annahme einer idealen Optik kann das Mausauge somit nur maximal etwa ein Zehntel der Sehschärfe des Menschauges erreichen. Verschiedene Messungen zeigen jedoch, dass dieser Unterschied noch um etwa eine Größenordnung deutlicher ausfällt. Dies ist zum großen Teil der Physiologie der Photorezeptoren geschuldet. Der minimale Durchmesser der äußeren Segmente von Photorezeptoren beträgt bei Wirbeltieren etwa 1000nm, also nur wenige hundert Nanometer

mehr, als die Wellenlänge von tief rotem, vom Menschen noch wahrnehmbarem Licht. Im Falle der Maus durchmessen diese zwischen 2000nm und 3000nm und teilweise mehr.

1.2.4 Das Auge des Huhns

Augen von Vögeln sind in der Regel, relativ zum Körper, größer als jene von Säugetieren. Weiterhin ist die äußere Form etwa entsprechend jener einer Halbkugel der stark gekrümmten Kornea zentral auf der abgeplatteten Seite des Auges liegend. Diese Form, kombiniert mit der Größe der Vogelaugen ist nur durch eine aus Knorpel bestehende Verstärkung des Augapfels möglich. Ohne diese haubenartige Verstärkung würden wohl die großen Augen von z.B. Adlern aufgrund der Gravitation ihre Form und damit zwangsläufig auch ihre Funktion verlieren. Wie bereits angesprochen ist die Größe eines Auges ein wichtiger Faktor zur Erlangung des maximalen Auflösungsvermögens, da sie ein besonders großes Bild auf der Netzhaut erlaubt, welches eine möglichst hohe Anzahl an Photorezeptoren belichtet. Im Gegensatz zum Säugerauge sind Vogelaugen tetrachromatisch. Diese vier Zapfen haben ihre Absorptionsmaxima im UV-, blau, grün und roten Wellenlängenbereich. Eine Besonderheit der Zapfen der Vögel ist das Vorhandensein eines zwischen äußerem und innerem Segment liegenden, farbigen Öltropfens. Dieser Öltropfen dient der Erhöhung der Farbintensität durch Fokussierung und Filterung des Lichts ins äußere Segment. Zusätzlich zu diesen vier, dem Farbsehen dienenden Zapfen existiert ein fünfter, sogenannter Doppelzapfen, dessen Funktion noch nicht endgültig geklärt ist, er könnte jedoch an der Bewegungswahrnehmung beteiligt sein.

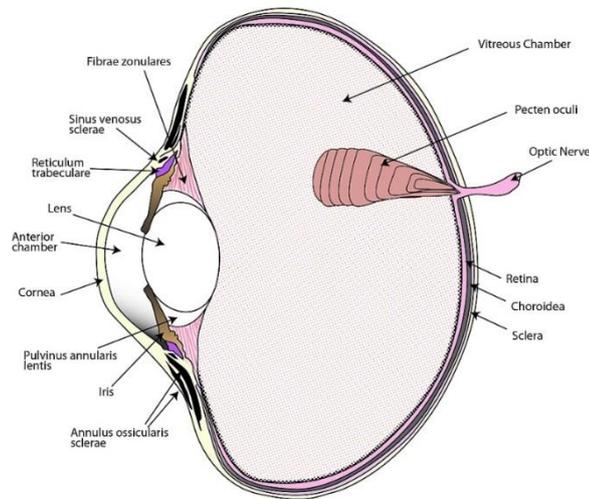


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Auges eines Huhns. Bemerkenswert ist die Struktur des pecten oculi, welcher der Nährstoffversorgung der Retina dient.

(<http://www.poultryhub.org/physiology/body-systems/nervous-systems-important-sensory-organs/>)

Die Verteilung von Zapfen und Stäbchen auf der Hühnerretina ist homogen mit einer leichten Abnahme an Zapfen zur Peripherie hin und das Verhältnis von Stäbchen zu Zapfen liegt beim Hühnerauge etwa 40:60. Das Sehen der Hühner und der meisten Vögel ist also an das Leben am Tag angepasst. Dennoch besitzt das Hühnerauge Eigenschaften, welche es zu guter Nachtsicht befähigen, wie z.B. eine hohe Bildhelligkeit und ein allgemein großes Auge.

Trotz des Fehlens einer Fovea weisen Hühner eine vergleichsweise hohe Sehschärfe von etwa 7 Streifenpaaren/Grad auf. Das höchste Auflösungsvermögen im Tierreich findet sich bei Greifvögeln. Einige Falkenarten können bis zu 160 Streifenpaare/Grad auflösen. Entgegen der Entwicklung von Säugern ist der optische Apparat des Hühnerauges direkt nach dem Schlupf voll entwickelt und vollständig einsatzbereit, was sie als Versuchstiere prädestiniert.

1.3 Emmetropie

Im Regelfall entwickeln sich Augen von heranwachsenden Menschen und anderen Wirbeltieren entsprechend ihrer Vorgaben sowie der durch die Umgebung bedingten Anforderungen. Das Längenwachstum des Auges wird direkt von den optischen Einflüssen beeinflusst und resultiert im Regelfall in einer Länge des Glaskörpers, welche die Projektion eines scharfen Bildes auf die Retina erlaubt, wenn das Auge entspannt in die Ferne blickt. Dieser Zustand wird Emmetropie genannt und steht im Gegensatz zur Ametropie, der Fehlsichtigkeit. Die Steuerung des Augenwachstums geschieht direkt über optische Stimuli. Wird das Bild eines fernen Objekts durch Linsen vor oder hinter die Retina versetzt, so kompensieren die betroffenen Augen diesen Effekt durch ein gesteigertes oder vermindertes Augenwachstum. Dieser Effekt wurde an verschiedensten Tieren gezeigt, unter anderem Hühnern, Rhesus Affen und Fischen. Es wird angenommen, dass auch die Augen von heranwachsenden Menschen die Effekte von Linsen kompensieren würden, jedoch verbieten sich Experimente dieser Art aus ethischen Gründen.

Das Längenwachstum von Augen wird von ZENK (bzw. Eg-R1 bei Säugern) gesteuert. ZENK ist ein Wachstumsfaktor, welcher von glukagonergen Amakrinzellen synthetisiert wird. Umstände, welche das Wachstum der Augen hemmen (Pluslinsen), erhöhen die Syntheserate von ZENK. Im Gegenzug wird die ZENK Synthese durch Umstände reduziert, welche das Augenwachstum stimulieren (Minuslinsen). Welche Bestandteile der optischen Eindrücke exakt für die Identifizierung der Defokussierung und speziell ihres Vorzeichens verantwortlich sind, ist bislang nicht geklärt.

Der Zeitliche Ablauf der Kontrolle des Augenwachstums hängt vom betrachteten Modell ab. Im Falle von Hühnern benötigen die Augen etwa zwei Tage, um die Wachstumsrate neu einzustellen. Zu Beginn wird die Position der Retina leicht in Richtung der neuen Schärfeebene verschoben, indem die Choroidea, je nach Bedarf, dünner oder dicker wird. Entsprechend wird auch das Längenwachstum modifiziert, bis das Objekt wieder Scharf auf der Retina abgebildet werden kann. Tritt dies ein, so wird auch die Dicke der Choroidea wieder auf ein Normalmaß eingestellt.

1.4 Ametropie

Eine Ametropie liegt vor, wenn ein Objekt das sich optisch in unendlicher Entfernung befindet, vom entspannten Auge nicht scharf auf der Netzhaut abgebildet wird. Sie unterteilt sich in Myopie, Hyperopie und Astigmatismus. Im Falle der Myopie liegt die Schärfeebene vor, im Falle der Hyperopie hinter der Retina. Bei astigmatischen Augen wird Licht, welches von einem Punkt ausgeht, nicht auf einen Punkt hinter der Augenlinse fokussiert. Stattdessen wird das Licht in einer Brennlinie abgebildet. Beim Astigmatismus lassen sich zwei unterschiedliche Schärfeebenen bestimmen, eine mit maximaler und eine mit minimaler Brechkraft. In diesen beiden Ebenen liegen die Brennlinien um 90 Grad gedreht gegeneinander vor, dazwischen liegt der „Punkt der kleinsten Verwirrung“, der rotationssymmetrisch ist, aber unscharf, man kann also mit einer sphärischen Brillenkorrektur nie ein scharfes Bild erhalten.

1.4.1 Myopie

Die Myopie als solche ist eine mitunter sehr starke Einschränkung der Sehfähigkeit und damit unter Umständen auch der Lebensqualität des betroffenen Individuums. Symptomatisch sind eine geringere Sehschärfe der Betroffenen sowie ein untypisch verlängerter Augapfel, welcher nicht mehr in Relation zur Brechkraft von Augenlinse und Kornea steht. Diese Verlängerung des Augapfels, speziell des Glaskörpers, resultiert in einer Verschiebung der Netzhaut im optischen System des Auges. Daraus folgert, je nach Länge des Glaskörpers, eine Entfernung der Bildebene von der Schärfeebene nach hinten, es tritt eine Defokussierung im entspannten Auge auf. Da die Brennweite der Augenlinse sich nicht entsprechend verändert und sie, beim entspannten Auge, sich auch nicht verringern lässt, befindet sich somit die Schärfeebene vor der Netzhaut, man spricht von einer positiven Defokussierung, da der Zustand jenem bei vorgesetzter positiver Linse entspricht. Um dies auszugleichen werden heutzutage Sehhilfen mit negativer Brechkraft eingesetzt, zumeist Brillen.

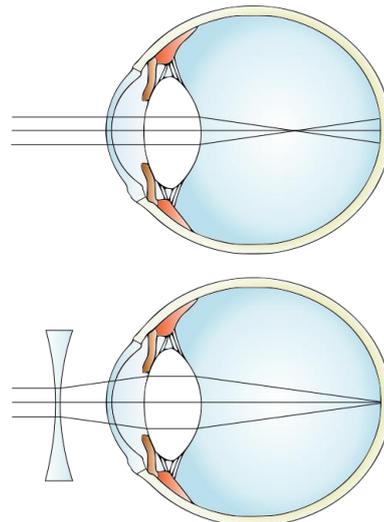


Abbildung 20: Vereinfachte Darstellung der Kurzsichtigkeit (oben) und deren Korrektur durch eine Streulinse (unten).

(wikipedia.org)

Biologische Mechanismen der Myopie

Das gesteigerte Wachstum des Auges kann nicht als einfaches, unmoduliertes Längenwachstum beschrieben werden. Entgegen der Entwicklung vieler Organe wie z.B. der Leber, ist eine durch genetische Kontrolle festgelegte Grenze des Längenwachstums nicht präzise genug. Bereits eine Verlängerung des menschlichen Auges um nur $100\mu\text{m}$ bedeutet eine Refraktionsänderung von $0,25\text{dpt}$. Dies entspricht bereits der Tiefenschärfe des menschlichen Auges und ist mitunter wahrnehmbar, obgleich es nur einem Zuwachs von $0,437\%$ entspricht. Folglich ist ein sehr präziser Kontrollmechanismus notwendig, um die maximale Sehschärfe erreichen zu können (Schaeffel, Glasser, und Howland 1988).

Bei der Geburt sind die Augen der meisten Lebewesen nicht emmetrop (Wallman und Winawer 2004). Ihre Augen entwickeln sich erst im Laufe des Wachstums zur Emmetropie hin. Wird im Auge festgestellt, dass die Schärfeebene der Optik von der Retina abweicht, so reagiert das Auge in sehr kurzer Zeit. In der ersten Phase der Anpassung spielt die Choroidea (Aderhaut) eine besondere Rolle (Wallman et al. 1995). Ist der Augapfel zu lang, verdickt sie sich (die Retina wird in Richtung Linse geschoben) und das Längenwachstum wird gehemmt. Ist er zu kurz, so verdünnt sich die Choroidea (die Retina entfernt sich von der Linse) und das Längenwachstum wird angeregt. Sobald ein scharfes Abbild ferner Objekte auf der Retina wieder realisiert ist, normalisieren sich sowohl die Dicke der Choroidea als auch das Längenwachstum.

Ein Einfluss der Akkommodation auf die Emmetropisierung scheint offensichtlich, ist jedoch bislang nicht geklärt. Außerdem findet die Emmetropisierung auch unter Ausschluss der Akkommodation, z.B. durch Läsion des Edinger-Westphal-Kerns statt, welcher den Pupillenreflex sowie die Akkommodation steuert, statt (Schaeffel et al. 1990). Auch eine Durchtrennung des Ziliarnervs bei Hühneraugen (Wildsoet 2003) verhinderte sie nicht.

Dennoch sind Effekte der Akkommodation auf die Entwicklung der Augen nachgewiesen. Wird bei Kindern nur ein Auge voll korrigiert und das zweite unterkorrigiert, so steuert das voll korrigierte Auge die Akkommodation beider Augen. Dadurch befindet sich die Schärfeebene im unterkorrigierten Auge stetig vor der Retina, was das Augenwachstum effektiv hemmt (Phillips 2005).

Da die Akkommodation meist nur in kurzen Zeitfenstern, welche nicht ausreichend sind, um einen effektiven Einfluss auf das Wachstum zu nehmen wirkt, dürfte ihr Einfluss im Normalfall gering sein. Dies wird auch durch Experimente bestätigt, die zeigen konnten, dass eine Kompensation von Linsen bei zu kurzer Verweildauer vor dem Auge nicht stattfindet, auch wenn eine etwas längere Verweildauer einen deutlichen Effekt hervorruft. Dies legt nahe, dass das Auge die Seherfahrung über längere Zeiträume zur Beurteilung der Position der Schärfeebene verwendet.

Experimente, bei welchen der optische Nerv (Wildsoet und Schmid 2000; Wildsoet und Wallman 1995), der Ziliarnerv oder beide (Wildsoet 2003) durchtrennt wurden, konnten zeigen, dass die Emmetropisierung auch unter diesen Bedingungen stattfindet, jedoch verschiebt sich der vorgegebene Sollwert. Diese Verschiebung ist sowohl ohne weitere Behandlung durch Linsen als auch mit Linsen verschiedener Stärken vorhanden. Sie deutet darauf hin, dass der Prozess der Emmetropisierung lokal in der Retina gesteuert wird, eine präzise Einstellung auf den notwendigen Endwert jedoch nur durch höhere Verschaltungen möglich ist.

Abschließend kann die Myopie auch als Anpassung an das optische Umfeld betrachtet werden, da der Prozess der Emmetropisierung weiterhin intakt ist und nur die optische Stimulation des Auges nicht der entspricht, die notwendig ist um das Bild eines fernen Objektes bei entspanntem Auge scharf auf der Retina abbilden zu können. Dies wiederum stärkt die Vermutung, dass nicht die Genetik, sondern veränderte Umwelteinflüsse und Lebensgewohnheiten den größten Beitrag zu Entstehung der Myopie leisten.

Der Einfluss von ZENK auf Myopie und Augenwachstum

ZENK ist ein Transkriptionsfaktor, welcher von vielen Neuronen der Retina von Hühnern gebildet wird. Er ist analog zum bei Säugern vorkommenden EGR-1 (Schippert et al. 2007). Interessant für die Betrachtung der Myopie sind die glukagonergen Amakrinzellen. Also jene Amakrinzellen, welche Glukagon als Botenstoff exprimieren. Im Gegensatz zu den übrigen ZENK exprimierenden Zellen der Retina ist ihre ZENK Bildung jedoch abhängig vom Vorzeichen der Defokussierung (Bitzer und Schaeffel 2002).

Mit positiver Defokussierung wird die ZENK Expression erhöht, mit negativem verringert sie sich. In anderen retinalen Zellen ist die ZENK Expression lichtabhängig, die genannten glukagonergen Amakrinzellen stellen also einen Sonderfall dar. Nachweisbar ist die sowohl über immunohistochemische Protein-Analysen als auch über eine Echtzeit-PCR. Ebenso wurde über eine spezielle Technik (Laser capture microdissection) ein Gen nachgewiesen, welches in Abhängigkeit zur Defokussierung steht.

Ebenso verringert sich die Expression bei Anwendung von Formdeprivation durch Okkluder. Bei der Formdeprivation werden aus dem optischen Stimulus die Details (hohe Ortsfrequenzen, siehe Kapitel 1.1.4) entfernt. Okkluder sind durch Bearbeitung stumpfe bzw. milchige Gläser die dies bewerkstelligen.

Experimente mit Quisqualsäure (ein Excitotoxin, welches den Zelltod der Neurone mit Glutamatrezeptor) konnten zeigen, dass die ZENK Expression bei Formdeprivation oder negativer Defokussierung unbeeinflusst bleibt, obwohl durch das Excitotoxin ein Großteil der Neurone der Retina zerstört wird (Bitzer und Schaeffel 2004). Glukagonerge, ZENK exprimierende Amakrinzellen werden von Quisqualsäure nicht zerstört. Wird die Dosierung erhöht, ist die Erkennung des Vorzeichens der Defokussierung jedoch gestört. Der Verlust der Vorzeichenerkennung erlaubt die Interpretation, dass diese entweder auf der Ebene der Ganglienzellen direkt stattfindet oder zumindest ein Feedback der Ganglienzellen auf die Amakrinzellen notwendig ist. Bemerkenswert ist, dass die ZENK Expression auch im nicht behandelten Kontrollauge beeinflusst wird, ohne dass eine chemische Verbindung besteht.

Experimentelle Erzeugung von Ametropieen

Die Augen von Menschen und vielen Tieren entwickeln sich entsprechend der in den Genen begründeten Vorgaben. Diese jedoch werden durch äußere Bedingungen stark beeinflusst. Im Regelfall entwickelt sich das Auge der juvenilen hin zur Emmetropie und wird während des Wachstums aktiv gesteuert und beeinflusst. Bei einer ungestörten Entwicklung des Auges junger Menschen stellt sich die Emmetropie ein. Das entspannte menschliche Auge hat seinen Fokus somit in der optischen Unendlichkeit, einer Entfernung aus welcher die vom betrachteten Objekt ausgehenden Lichtstrahlen parallel zueinander ins Auge einfallen und exakt auf der Ebene der Photorezeptoren fokussiert werden.

Werden jungen Tieren im Versuch Linsen vor den Augen befestigt, so verschiebt sich die Schärfeebene des Bildes. Negative Linsen verschieben den Fokus hinter die Retina (myope Defokussierung) während positive Linsen ihn vor die Retina versetzen (hyperope Defokussierung). Es wurde in vielen Versuchen gezeigt, dass hierdurch Myopie oder Hyperopie induziert werden kann. Negative Linsen fördern, positive Linsen hemmen das Wachstum der Augen. In beiden Fällen führt dies bei den Versuchstieren, zumeist dem Haushuhn (*Gallus gallus*), zu einer Emmetropisierung, welche die Linsenstärke kompensiert. Wird also ein Tier mit einer -5dpt Linse behandelt, so wird es nach der Anpassung des Auges mit dieser Linse emmetrop sein, ohne sie wird es jedoch um -5dpt kurzsichtig sein. Dieser Effekt wurde erstmals in den 1980er Jahren am Huhn beschrieben und inzwischen auch an etlichen anderen Tiermodellen belegt. Hühneraugen sind dazu in der Lage, bis über -

10dpt starke Linsen auszugleichen, es kann also eine sehr starke Myopie erreicht werden. Weiterhin ist es vielen Tieren auch möglich den Effekt positiver Linsen auszugleichen, obschon hier die Grenze der maximalen Hyperopie geringer ausfällt als jene der maximalen Myopie.

Ein Sonderfall der künstlich eingestellten Sehfehler ist die sogenannte Formdeprivation, oft auch als Deprivationsmyopie bezeichnet. Hier werden den Tieren Okkluder, also milchige Gläser, vor den Augen befestigt. Je nach Stärke der Unschärfe entwickeln sich die Augen der Versuchstiere mehr oder weniger stark in Richtung Myopie. Molekularbiologisch bestehen

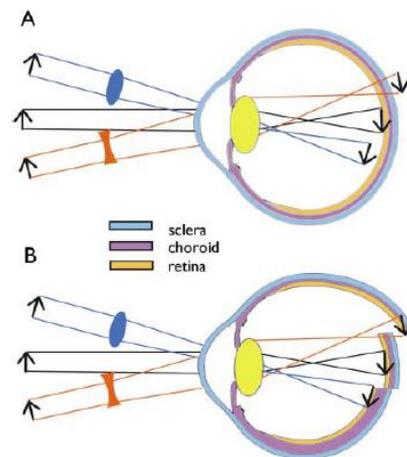


Abbildung 21: Experimentell induzierte Ametropieen (A) sowie ihre Kompensation durch das emmetropisierende Auge (B). Wie hier dargestellt, unterliegt dieser Prozess einer lokalen Kontrolle, weshalb das Auge nur im beeinflussten Bereich auf die Defokussierung reagiert (Wallman und Winawer 2004).

zwischen dieser Formdeprivation und der induzierten Myopie jedoch deutliche Unterschiede, leider wird in vielen Versuchen zur Myopieentwicklung dennoch Formdeprivation anstelle von richtiger Myopie eingesetzt.

Prävention und Behandlung der Myopie

Bereits im 19. Jahrhundert wurde von Cohn (Cohn 1982) eine Verbindung von Beleuchtungsstärke und Myopie hergestellt, jedoch konnte er aufgrund technologischer Limitierung nicht die notwendigen Schritte einleiten, um einen echten Beweis erbringen zu können. Durch neuere Untersuchungen wurde jedoch klar, dass hohe Lichtintensität stark hemmend auf die Entwicklung der Myopie wirkt (Ashby, Ohlendorf, und Schaeffel 2009; Ashby und Schaeffel 2010). Zu geringe Zeiten in intensiver Helligkeit des Tages sowie die mit langen Aufenthalten in Räumen oft einhergehende Steigerung der Naharbeit wirken negativ auf die Entwicklung und können zur Kurzsichtigkeit führen. Diese Zusammenhänge wurden auf der International Myopia Conference 2015 in Wenzhou, China von den anwesenden Forschern mit Nachdruck deutlich gemacht. Molekular lässt sich dies offenbar auf die Erhöhung des Dopaminspiegels in der Retina erklären. Bei Deprivationsmyopie sinkt der Dopaminspiegel, bei starkem Lichteinfall erhöht er sich. Durch Anwendung eines Dopamin-Antagonisten (Spiperone) konnte die hemmende Wirkung des Lichts experimentell aufgehoben werden (Ashby und Schaeffel 2010). Die stärkste, nahezu vollständige Hemmung der Myopie durch Licht tritt bei über 30000 Lux auf, was der Helligkeit an einem Sonnentag entspricht (Karouta und Ashby 2015; Karouta und Ashby 2016).

Als Behandlung der Myopie stellt sich Atropin als stärkstes bekanntes Mittel dar und ist bereits Cohn im 19. Jahrhundert bekannt gewesen (Cohn 1892). Durch die starken Nebenwirkungen (Weitstellung der Pupillen, Lähmung der Akkommodation, trockene Augen) sowie den Verlust der Wirkung bei regelmäßiger Gabe von 1% Dosierungen wurde es jedoch nur wenig beachtet. Erst wesentlich später wurde das Interesse an Atropin als „Gegenmittel“ zur Myopie wieder interessanter, da bereits geringe Dosierungen von 0,01% die gewünschten, positiven Effekte zeigen, jedoch die Nebenwirkungen nicht mehr relevant sind (Shih et al. 1999; Shih et al. 2001; Huang et al. 2016). Auch Untersuchungen mit chinesischen Kindern zeigten durchweg positive Ergebnisse (Chia, Lu, und Tan 2016).

Die genaue Wirkung von Atropin ist nicht geklärt (McBrien, Stell, und Carr 2013), jedoch beeinflusst es die Freisetzung von Dopamin. Die Deaktivierung der Akkommodation kann hier keine Rolle spielen, da es auch bei Vögeln wirkt, deren Akkommodation im Gegensatz zu jener von Säugern über nikotinerge Rezeptoren gesteuert wird (McBrien, Moghaddam, und Reeder 1993).

1.4.2 Hyperopie

Die Hyperopie entspricht einem optisch der Myopie entgegengesetzten Zustand des Auges. Hierbei ist der Glaskörper, relativ zur kombinierten Brechkraft von Augenlinse und Kornea gesehen, zu kurz. Der Betrag der hier auftretenden Defokussierung kann den selben Wert haben wie jener der Kurzsichtigkeit, jedoch ist das menschliche Auge durch seine Fähigkeit der Akkommodation dazu in der Lage, dies bis zu einem gewissen Grad auszugleichen. Aufgrund der relativ verkürzten Augen treten bei Hyperopen Personen keine Komplikationen auf, wie es bei der Myopie der Fall ist. Oft wird die Hyperopie erst im mittleren Alter von den betroffenen Personen bemerkt.

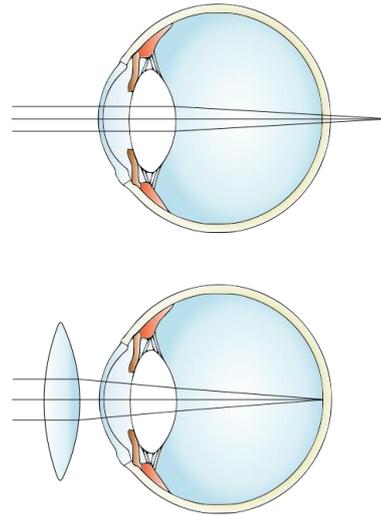


Abbildung 22: Vereinfachte Darstellung der Weitsichtigkeit (oben) und ihrer Korrektur durch eine Sammellinse (unten).

(wikipedia.org)

Presbyopie

Diese späte Erkennung liegt darin begründet, dass, die Akkommodation der Augenlinse die Hyperopie ausgleichen kann. Die hierfür notwendige Elastizität der Augenlinse verringert sich mit fortschreitendem Alter durch Sklerosierung des Linsenkernes. Dieser Prozess beginnt im frühesten Kindheitsalter und ist, nach aktuellem Stand der Forschung, irreversibel und auch nicht aufhaltbar. Erst im Zeitraum um das 40. Lebensjahr ist die Sklerosierung so weit fortgeschritten, dass die Akkommodationsfähigkeit des Auges nicht mehr genügt, um die Weitsichtigkeit auszugleichen. Und erst dann werden sich viele Betroffene ihrer Weitsichtigkeit bewusst. Dieser natürliche Prozess betrifft selbstverständlich auch Emmetropen, welche aus diesem Grund im genannten Alterszeitraum Lesebrillen benötigen.

1.5 Zwischenfazit

Wie man anhand der normalen Emmetropisierung sehen kann, ist das Auge dazu in der Lage, das Längenwachstum so zu steuern, dass eine optimale Bildqualität auf der Netzhaut erreicht werden kann. Dies ist jedoch nur möglich, wenn eine Unterscheidung zwischen positivem und negativem Defokus geschieht. Ein Prozess auf Basis von Versuch und Irrtum, entsprechend der Steuerung der Akkommodation, scheidet bei Wachstumsprozessen dieser Art aus. Es ist notwendig, über einen längeren Zeitraum die Bildschärfe auf der Retina zu mitteln, da der Wachstumsprozess, beziehungsweise die Beeinflussung dessen, ein Mindestmaß an Zeit erfordert. Weiterhin würden spontane Unschärfen durch Kopfbewegungen oder Verschiebung der Akkommodation im natürlichen Umfeld keine zuverlässige Emmetropisierung mehr ermöglichen. Dies führt zu dem Schluss, dass die Vorzeichenerkennung sowie der Prozess der Emmetropisierung in der Retina einen komplexen Mechanismus darstellt. Es ist bekannt, dass die Unterscheidung des Vorzeichens der Defokussierung auf Ebene der Amakrinzellen möglich ist, jedoch ist unklar ob und in wie weit Ganglienzellen oder das zentrale Nervensystem hier eine Rolle spielen.

2 Methoden

2.1 Tiermodelle

Die ersten Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden an den Augen von Mäusen (Stamm C57BL/6J) durchgeführt und sind hier auch beschrieben. Aufgrund der geringen Abbildungsqualität des Auges der Maus, sowohl im optischen Apparat als auch in der Struktur der Photorezeptoren, wurde in späteren Experimenten auf das klassische Tiermodell in der Myopieforschung, das Huhn, zurückgegriffen. Die Nachteile der Mäuse im optischen Bereich gegenüber den Hühnern überwogen die Vorteile der bekannten Genetik sowie der großen Verfügbarkeit an verschiedensten Mutanten und Knock-Out/Knock-In Stämmen bei der hier vorliegenden Fragestellung der Kodierung des Defokus auf Ebene der Ganglienzellen.

Tabelle 2: Direktvergleich der Tiermodelle. Speziell das im Vergleich zur Maus hohe Auflösungsvermögen und die hohe Empfindlichkeit gegenüber der Induzierung von Ametropieen macht das Huhn zum Standardmodell der Myopieforschung.

	Maus	Huhn
Augengröße	3,3mm Achsenlänge	8-14mm Achsenlänge
Auflösungsvermögen	0,5 Streifenpaare/Grad	7 Streifenpaare/Grad
Präparation	Schwierig	Einfach
Farbsehen	2 Zapfentypen (Dichromat)	4 Zapfentypen (Tetrachromat)
Verfügbarkeit von Knock-Out und Knock-In	Ausgezeichnet	Nicht vorhanden
Handling	Mäßig	Einfach

2.1.1 Maus (*Mus musculus*)

Die Tiere wurden von der Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland) erhalten und in der Tierhaltung der Universitätsklinik Tübingen gezüchtet. Sie hatten einen Tag-Nacht Zyklus von 12h/12h, die durchschnittliche Beleuchtung lag bei 500 Lux. Nahrung und Flüssigkeit standen nach Belieben zur Verfügung. Die Tiere wurden in keiner Weise behandelt oder modifiziert. Im Alter von 30-60 Tagen wurden die Tiere im Käfig ins Labor transportiert, wobei dort ihr Tag-Nacht Zyklus in etwa beibehalten wurde. Die Tiere wurden mit CO₂ getötet und ihre etwa 3mm kleinen Augen (Abbildung 23) sofort in Nährlösung eingebracht und präpariert.



Abbildung 23: Präparation eines Mauseuges. Hornhaut, Sklera und Pigmentepithel wurden entfernt. Es ist deutlich erkennbar, dass die Retina nahezu durchsichtig ist.

Präparation

Zur Enukleation der Augen wurde das bei Mäusen übliche Verfahren angewandt und diese mit einer feinen, abgewinkelten Pinzette entfernt. Die Extraktion der Retina erforderte besondere Vorsicht, alle folgenden Schritte wurden in Nährlösung und unter einem Binokular durchgeführt.

Zuerst wurde mit einer feinen Schere ein Schnitt entlang der Verbindung von Hornhaut und Sklera horizontal durchgeführt. Um mit der Federstahlschere ansetzen zu können, wurde mit einer Lanzette ein kleines Loch in gewünschter Lage der Sklera gestochen. Die Durchführung des horizontal-radiären Schnitts erfordert eine ruhige Hand und etwas Übung. Hierdurch konnte der Verbund aus Hornhaut, Iris und Linse vom verbleibenden Augapfel entfernt werden. Der sehr schmale Glaskörper haftete in den meisten Fällen an der Linse und wurde mit entfernt. Aufgrund der gleichen Brechungsindizes von wässrigen Lösungen und Glaskörper war hier eine Kontrolle erst möglich, wenn die Retina im Versuchsaufbau in der MEA-Kammer ruhte und elektrische Ableitungen möglich waren.

Die Retina wurde freigelegt, in dem der von Hornhaut und Linse befreite, verbleibende Augapfel geteilt und anschließend die Sklera samt Pigmentepithel von der Photorezeptorschicht vorsichtig durch sehr leichtes Rütteln gelöst wurde. Nur einer der verbleibenden Teile der Retina konnte direkt im Versuch verwendet werden, die andere musste verworfen werden. Das Präparat wurde vorsichtig, mit Hilfe einer Pipette in die MEA-Kammer übertragen. Die Retina wurde nun mit sehr feinen Pinseln (Stärke 0) mit der Ganglienzellschicht nach unten hin orientiert und die Nährlösung per Pipette so weit entfernt, dass das Präparat sich an der Elektrodenschicht anhaftete. Nun wurde ein Platin-Bogen mit aufgeklebten Nylonfäden als Beschwerung auf die Retina gelegt um eine Ablösung während des Experiments zu verhindern (Abbildung 24 & Abbildung 25). Anschließend wurde die MEA-Kammer in die vorgesehene Halterung im Setup eingebracht und die Retina mit Nährlösung umspült. Nach 30-60 Minuten Eingewöhnungszeit der Retina an das Einbringen in die Kammer waren nach dem physikalischen Schock der Präparation erste Messungen möglich. Wurde der Glaskörper während der Präparation nicht mit entfernt, fehlten elektrische Signale der Retina auch nach 60 Minuten. In diesem Falle wurde die Präparation am zweiten Auge wiederholt.



Abbildung 24: Aufsicht auf eine Retina in der MEA-Kammer während eines Experimentes. Deutlich erkennbar sind die Nylonfäden des Halters. Die Elektroden sind schwach durch das Gewebe sichtbar.

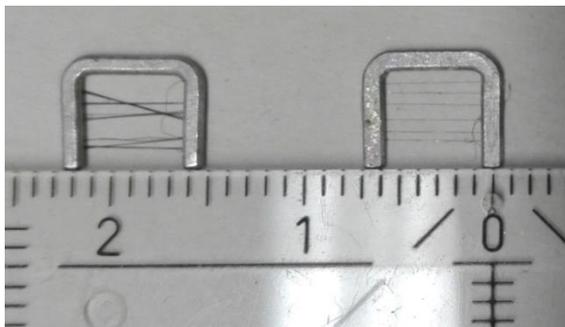


Abbildung 25: Halter zur Fixierung der Retina mit manuell angebrachten Nylonfäden. Beide Versionen wurden ohne erkennbare Unterschiede für die Experimente verwendet.

2.1.2 Huhn (*Gallus gallus domesticus*)

Die ausschließlich männlichen Hühner wurden von einer Zuchtanstalt (Firma Weiss in Kirchberg) am Tag nach ihrem Schlupf erhalten. Sie wurden in einem 12h/12h Tag-Nacht Zyklus aufgezogen und waren mindestens 7 Tage alt zum Zeitpunkt der Experimente. Die durchschnittliche Helligkeit im Tierstall lag bei 500 Lux. Nahrung und Flüssigkeit standen nach Belieben zur Verfügung. Die Tiere wurden in keiner Weise behandelt oder modifiziert. Die Tiere wurden mindestens eine Stunde dunkeladaptiert und anschließend mit Äther getötet. Die Präparation erfolgte sofort in einem Abgedunkelten Raum.

Präparation

Das Auge wurde vorsichtig aus der Augenhöhle geschnitten. Bei Verletzung des Augapfels durch die Schere musste das Auge in den meisten Fällen verworfen werden, da es ohne Innendruck seine Form verlor und die Präparation so nicht mehr durchführbar war.

Nachdem der Augapfel von Muskelresten gesäubert wurde, konnte mit einer Rasierklinge ein Schnitt durchgeführt werden, welcher Hornhaut und Linse vom Rest des Augapfels trennte. Mit einer feinen Pinzette wurde der Glaskörper aus dem verbleibenden Augapfel gezogen. Mit einem 3mm Lochstanzer wurde ca. 1mm vor dem Ansatz des Pekten, zentral in der Retina, ein Loch ausgestanzt. Das im Lochstanzer verbliebene Gewebe umfasste Retina, Pigmentepithel, Choroid und Sklera sowie vereinzelt Muskelreste. Mit einer feinen, spitzen Pinzette konnte nun das Gewebe gefasst und mit der retinalen Ganglienzellschicht zuvorderst in die MEA-Kammer und gezielt auf den Elektroden positioniert werden. Durch die Adhäsion der vorhandenen Flüssigkeiten haftete die Retina an der Elektrodenschicht. Durch seitliche Bewegung der Sklera konnte so nun sämtliches Gewebe mit Ausnahme der Retina entfernt werden. Anschließend wurde die Retina mit einem mit Nylonfäden beklebten Platinbogen beschwert, um eine Ablösung während des Experiments zu verhindern.

Auch hier mussten die Retinae, wie bei den Mausretinae, für 30-60 Minuten in der Kammer der Ableiteinrichtung belassen und von Nährlösung umspielt werden, um zuverlässige elektrische Antworten auf die optische Stimulation zu erhalten.

Ausreichende Dunkeladaptation sowie die zügige Präparation in abgedunkelten Räumen stellten sich als wichtigste Kriterien für eine erfolgreiche Präparation heraus. Ohne Dunkeladaptation waren keine erfolgreichen Experimente möglich. Im dunkeladaptierten Zustand ziehen sich die Außensegmente der Photorezeptoren aus dem RPE zurück. Möglicherweise reißen diese bei entfernen des RPE ab, wenn die Tiere nicht dunkeladaptiert sind.

2.2 In vitro Retinae

Die Behandlung der präparierten in vitro Retinae bedarf äußerster Vorsicht. Die Retinae der Mäuse sind leichter zu handhaben als jene der Hühner, jedoch ist in jedem Fall darauf zu achten, die Retina nicht, oder zumindest möglichst wenig mit Präparationswerkzeug jedweder Art zu berühren. Jede Berührung bedeutet eine Beschädigung der Retina und gefährdet den Versuch. Speziell die Retinae der Hühner sind aufgrund ihrer Größe sehr anfällig dafür, dass sie sich einfallen. Geschieht dies, ist der betroffene Teil der Retina für das Experiment verloren. Speziell bei der Präparation und Positionierung der Mausretinae im der Ableitkammer war es

unumgänglich, diese in bereits freigelegtem Zustand in die MEA-Kammer zu überführen. Der größte Erfolg wurde mit einer abgesägten und, mit Hilfe eines Brenners, verschmolzenen Pipette erzielt, da die Retina hier immer in der Lösung blieb und erst bei der Ausrichtung auf die Elektroden durch die Pinsel berührt werden musste. Die Nährlösung basiert auf einer Ringer-Lösung und entstammt aus früheren Erfahrungen aus dem Labor. Die zehnfach konzentrierte Basislösung (Tabelle 3) sowie die Zusatzlösungen (Tabelle 4) wurden im Kühlschrank bei +5°C aufbewahrt. Vor der Präparation wurden 50ml der Basislösung auf 1l aufgefüllt und der Zucker (Tabelle 5) bis zur vollständigen Lösung eingerührt. Nach etwa 30min Begasung mit Carbogen wurden die Zusatzlösungen hinzugegeben und ein Teil der Lösung für die Präparation verwendet.

Es ist zu beachten, dass unterschiedliche Labore auch unterschiedliche Erfahrungen mit der Reinhaltung des Versuchsaufbaus haben. Die Schläuche des Setups wurden nach den Versuchstagen erst mit Ethanol und anschließend mit bidestilliertem Wasser durchspült. Dennoch schlugen für einige Zeit alle Versuche fehl.

Nach Diskussionen mit Dr. Daniel Rathbun (FIA Tübingen) stellte sich für unser Labor heraus, dass die Reinigung der Schläuche zwar hilfreich, aber ein komplettes Austauschen derselben nach etwa 1-3 Monaten unumgänglich ist, um erfolgreiche Versuche zu ermöglichen. Die genauen Gründe hierfür blieben unbekannt.

Tabelle 3: 10x Pufferlösung zur Erhaltung der Vitalität der Retinae. 50ml dieser Lösung wurden mit 950ml H₂O (bidestilliert) verdünnt. Die in Tabelle 3 angegebene Zuckermenge wurde eingerührt, anschließend wurden je 2ml der Lösungen aus Tabelle 2 zugegeben und die Lösung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) für 45min vor Versuchsbeginn begast.

Substanz	Einwaage (g)	Lösung in H ₂ O (ml)	molare Masse	Molarität	molarität der Nutzlösung (mM)
NaCl	73,05	1000	58	1,259483	125,95
NaHCO ₃	21	1000	84	0,25	25
NaH ₂ PO ₄	1,72	1000	120	0,014333	1,43
KCl	2,61	1000	74	0,03527	3,53

Tabelle 4: Zusatzlösungen zur Zugabe in die vorbereitete Pufferlösung während der Begasung.

Substanz	Einwaage (g)	Lösung in H ₂ O (ml)	molare Masse	Molarität	pro 1L (ml)	molarität der Nutzlösung (mM)
MgCl ₂	5,083	50	95,3	1,066737	2	2,13
CaCl ₂	7,351	50	111	1,324505	2	2,65

Tabelle 5: Glukose zur Zugabe in die vorbereitete Pufferlösung.

Substanz	Einwaage (g)	Lösung in H ₂ O (ml)	molare Masse	Molarität	molarität der Nutzlösung (mM)
C ₆ H ₁₂ O ₆	4,5	1000	180	0,025	25

2.3 Der Experimentelle Aufbau

Im Aufbau wurden Retinae *in vitro* optisch über eine Badal-Optik stimuliert. Die Daten wurden anhand elektrischer Ableitungen mit dem Mikro-Elektroden-Array (MEA) aufgezeichnet.

2.3.1 Microelectrode Array

Das im Versuch verwendete MEA stammt von Multichannel Systems (MCS Reutlingen, Deutschland). Verwendet wurde ein analoges MEA-Inv-1060 System. Die 60 Elektroden des Arrays sind im quadratischen 8x8 Muster angelegt, wobei die vier Ecken jeweils keine Elektroden enthalten. Der Abstand der Elektroden liegt bei $200\mu\text{m}$, ihr Durchmesser bei $30\mu\text{m}$. Die MEA-Kammern bestehen aus einem Glaskammer, welche von einer Kontaktplatte eingefasst ist. Hierdurch ist es möglich, optische Stimulationen von unterhalb der Kammer durchzuführen und so eine naturnahe Belichtungsrichtung der Retina zu gewährleisten. Das Licht musste also alle Schichten der Retina durchdringen bevor es in den Photorezeptoren absorbiert werden konnte.

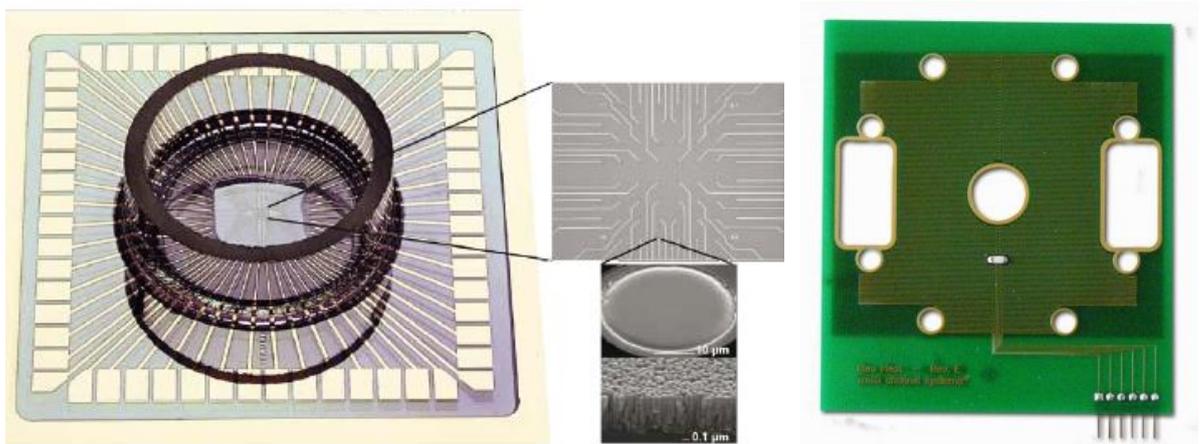


Abbildung 26: MEA-Kammer (A) mit Darstellung der Elektroden (B) sowie einer Heizplatte (C), Multichannel Systems GmbH. Die Halterung des Aufbaus erlaubte eine Platzierung der MEA-Kammer so auf der Heizplatte, dass das Elektrodenfeld und somit die Retina, mittig über dem zentralen Loch lag.

Über einen im PC eingebauten Verstärker wurden die Daten mit dem zugehörigen Programm MC_Rack gespeichert und mithilfe der grafischen Ausgabe der korrekte Versuchsablauf durch den Experimentator überprüft. Die MEA-Kammer wurde auf einem Heizelement platziert, welches in einem vertikal verstellbaren Versuchstisch installiert war. In früheren Versuchen wurde ein Heizelement mit nur $0,6\text{cm}$ Lochdurchmesser für den Lichtdurchtritt verwendet. Die später eingesetzte Version mit $1,2\text{cm}$ Lochdurchmesser erhöhte jedoch die Qualität der Daten deutlich.

2.3.2 Aufbau

Der experimentelle Aufbau (Abbildung 27, Abbildung 28 & Abbildung 29) wurde auf einem massiven Metalltisch installiert, welcher auf justierbaren Gummidämpfern lagerte und gegen elektrische Einflüsse sowie Vibrationen geschützt war. Ein Metallrahmen mit Verkleidung diente als Abschirmung gegen unerwünschte Belichtung. Zentrales Element war eine optische Schiene mit einem Meter Länge. Auf dieser Schiene befand sich ein beweglich montierter 7“ USB Bildschirm mit einer Auflösung von 800*480 Pixeln zur optischen Stimulation. Aufgrund der notwendigen horizontalen Lage der MEA-Kammer und der dadurch bedingten Stimulation von unten wurde ein Prisma eingesetzt. Eine CCTV Linse mit 6mm Brennweite fokussierte das Bild auf Ebene der Elektroden der MEA Kammer. Die eingesetzte Badal-Linse bestand aus zwei plankonvexen Linsen, deren konvexe Seiten sich berührten. Dies diente der Verringerung optischer Aberrationen, speziell der sphärischen Aberration. Die kombinierte Brennweite dieser Linsen lag bei 11,9 cm, die Brechkraft also bei 8,4D. Aufgrund der Eigenschaften des einfachen Badal-Setups standen zur negativen Defokussierung nur 7 Dioptrien zur Verfügung.

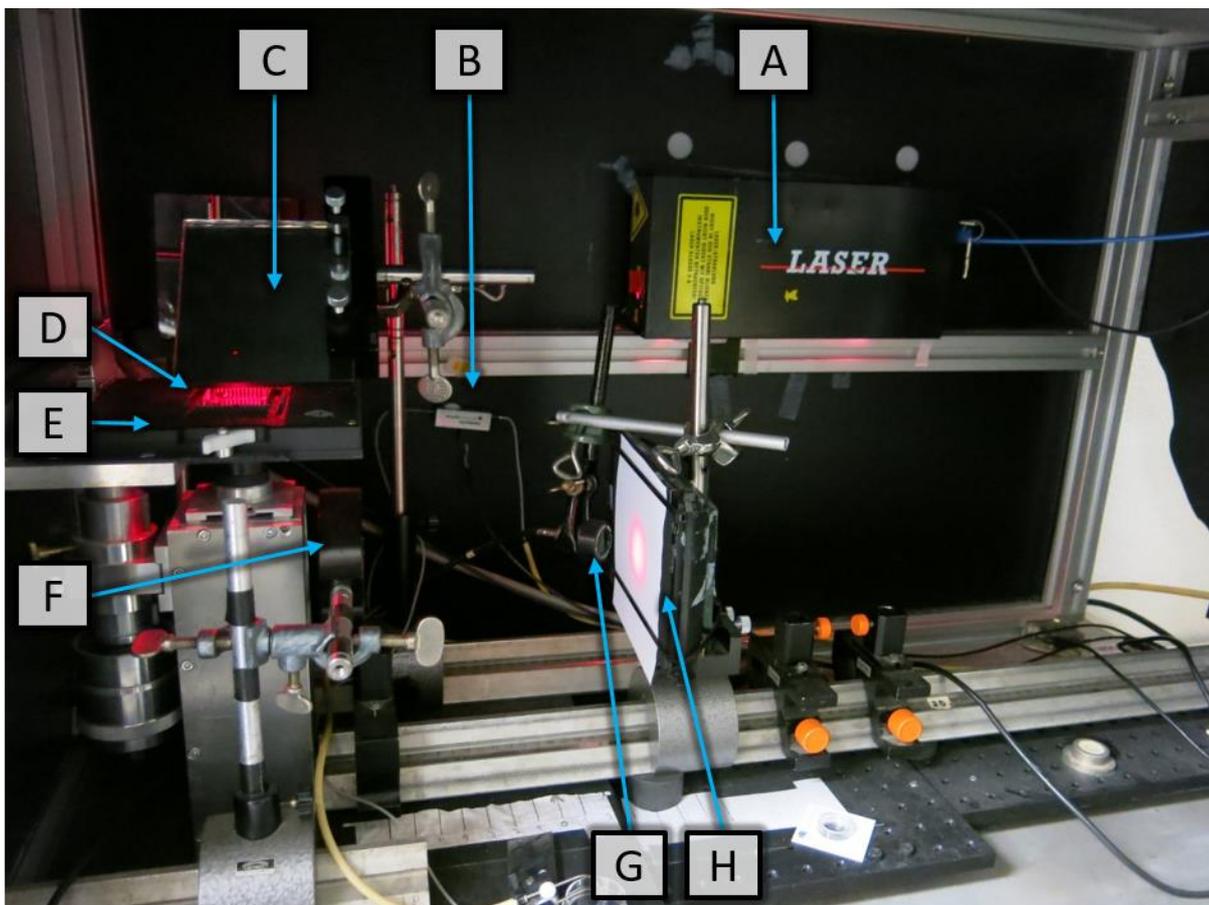


Abbildung 27: Versuchsaufbau mit aktiver Laserprojektion zur Kontrolle der Position der Elektroden im Film bzw. des Films über den Elektroden. Die einzelnen Komponenten werden in Tabelle 6 beschrieben.

Tabelle 6: Beschriftung der Komponenten aus Abbildung 27 und Abbildung 28.

- A Laser zur Projektion der Elektroden auf die Ebene des Monitors (H)
- B Durchlauferhitzer für die Nährlösung
- C Spiegel zur Umlenkung des Laserstrahls
- D MEA Kammer mit milchig-transparentem Papier zur Streuung des Lichts
- E Versuchstisch mit großflächiger Heizung inklusive 1,2cm durchmessendem Loch zur optischen Stimulation (Abbildung 26).
- F Badal Linse
- G Photozelle zur Signalgabe bei jedem Filmstart, angeschlossen an ein Lichtmessgerät.
- H Beweglicher Bildschirm zur optischen Stimulation der Präparate
- I Halterung der Schläuche der Nährstoffversorgung
- J Erdung des Versuchsaufbaus

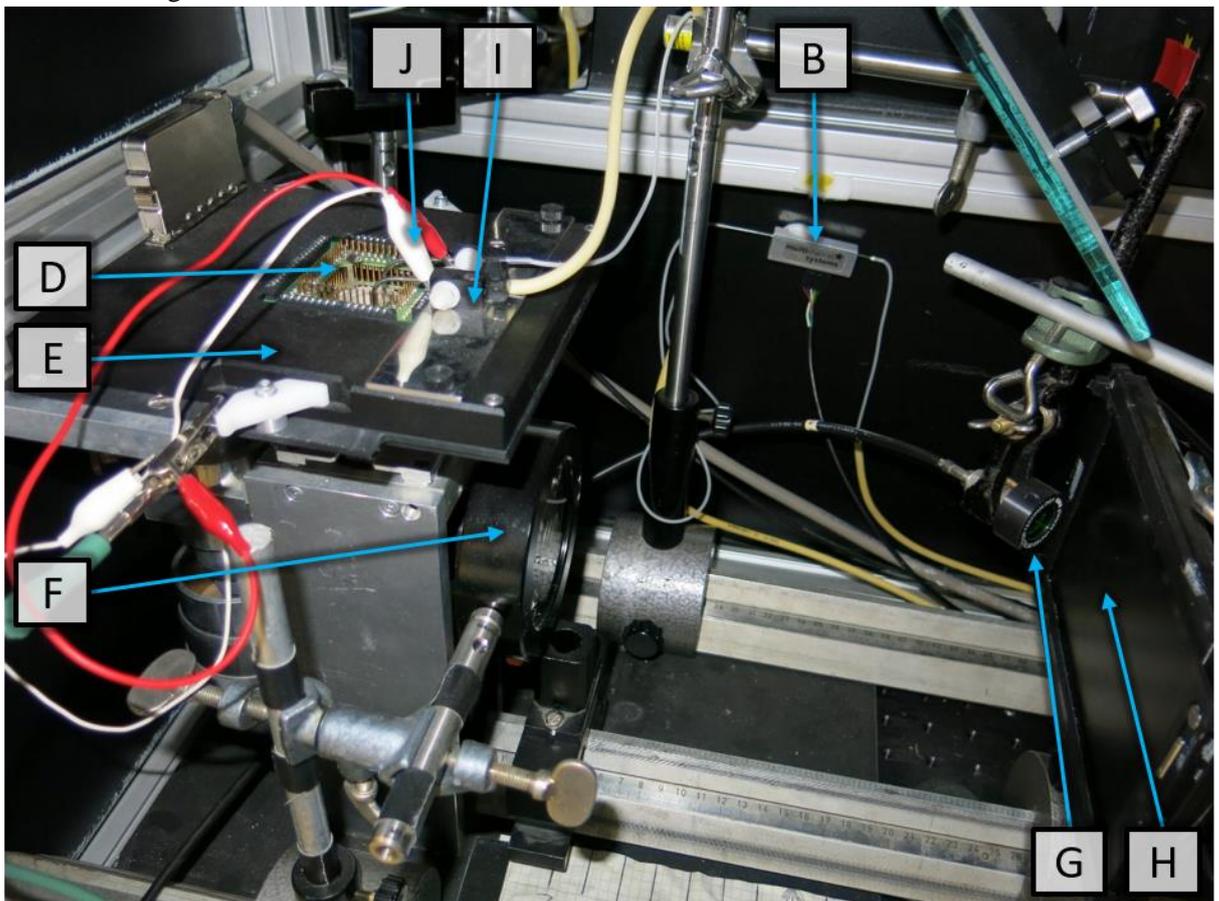


Abbildung 28: Versuchsaufbau mit aktiver Nährstoffversorgung und Erdung. Die einzelnen Komponenten werden in Tabelle 6 beschrieben.

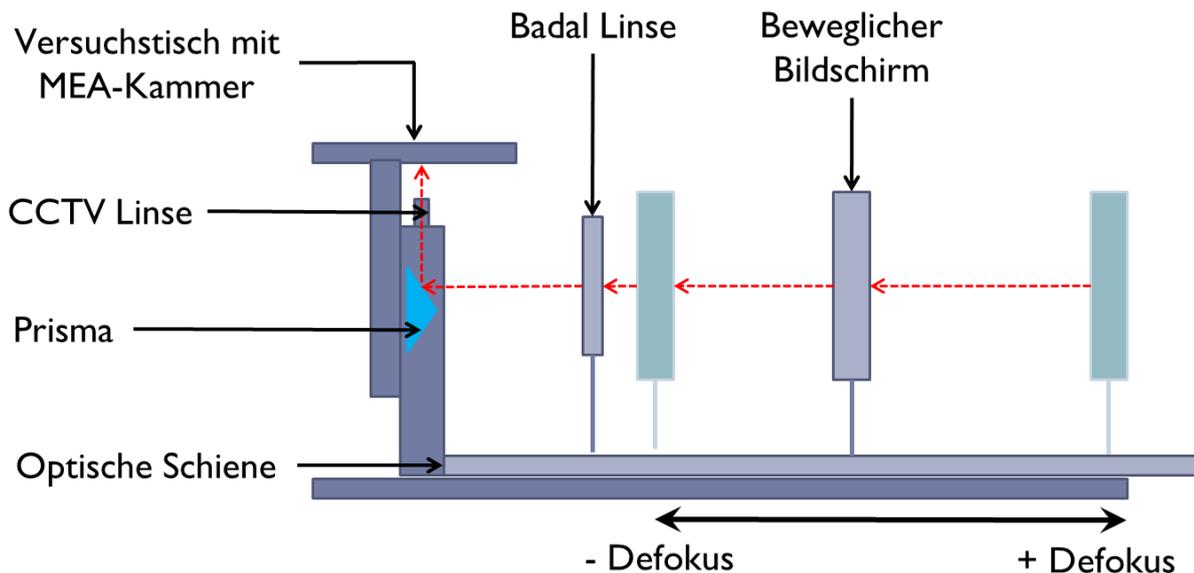


Abbildung 29: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Der bewegliche Bildschirm ist mit drei möglichen Positionen angegeben. Die rot gestrichelten Pfeile bezeichnen einen vom Monitor ausgehenden Lichtstrahl und seinen Weg durch den Aufbau. Der Versuchstisch war in der Höhe beweglich montiert und konnte sehr präzise eingestellt werden.

Um zu gewährleisten, dass die Retina grundsätzlich vom selben Filmausschnitt stimuliert wurde, musste sichergestellt werden, dass die Optische Schiene sich exakt auf der optischen Achse von Projektionslinse, Prisma und Badal Linse befand. Hierzu wurde ein Diffusor-Papier direkt auf die Elektrodenschicht einer MEA-Kammer gelegt und diese rückläufig, also von oben, mit einem Laser beleuchtet. Die hierdurch entstehende Projektion der Elektroden auf dem beweglichen Bildschirm musste also ortsfest sein, gleichgültig in welcher relevanten Entfernung der Bildschirm sich von der Badal Linse befand. Durch Verstellung der Entfernung des Versuchstisches, welcher die MEA-Kammer trug sowie durch Modifikation der Position der Badal Linse konnten Feinjustierungen vorgenommen werden.

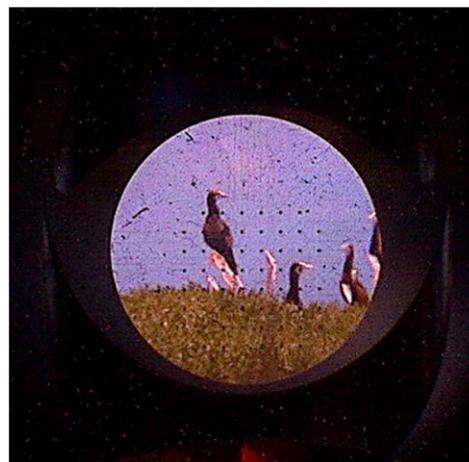


Abbildung 30: Aufsicht auf die MEA-Kammer ohne Präparat, während der Film abgespielt wurde. Die Position der Elektroden ist deutlich erkennbar (kleine, schwarze Punkte in regelmäßiger Anordnung). Aufgenommen mit einem USB Mikroskop, Fokussiert auf die Elektroden.

Wie im Kapitel 1.1.6 Badal Optik (Seite 10) angegeben, wurden die Elektroden im Brennpunkt der Badal Linse scharf abgebildet und wurden unschärfer, je weiter sich der Bildschirm vom Brennpunkt entfernte (Abbildung 31 & Abbildung 32). Eine weitere Überprüfung mittels eines USB-gesteuerten Mini-Mikroskops, welches direkt auf den Rahmen der MEA-Kammer aufgesetzt wurde und dessen Bild von einem Programm zur Messung des Pixelkontrastes ausgewertet wurde (geschrieben von Prof. Frank Schaeffel), bestätigte die korrekte Ausrichtung des Systems. Der angegebene Kontrastwert veränderte sich mit Entfernung des Bildschirms in beiden Richtungen symmetrisch.

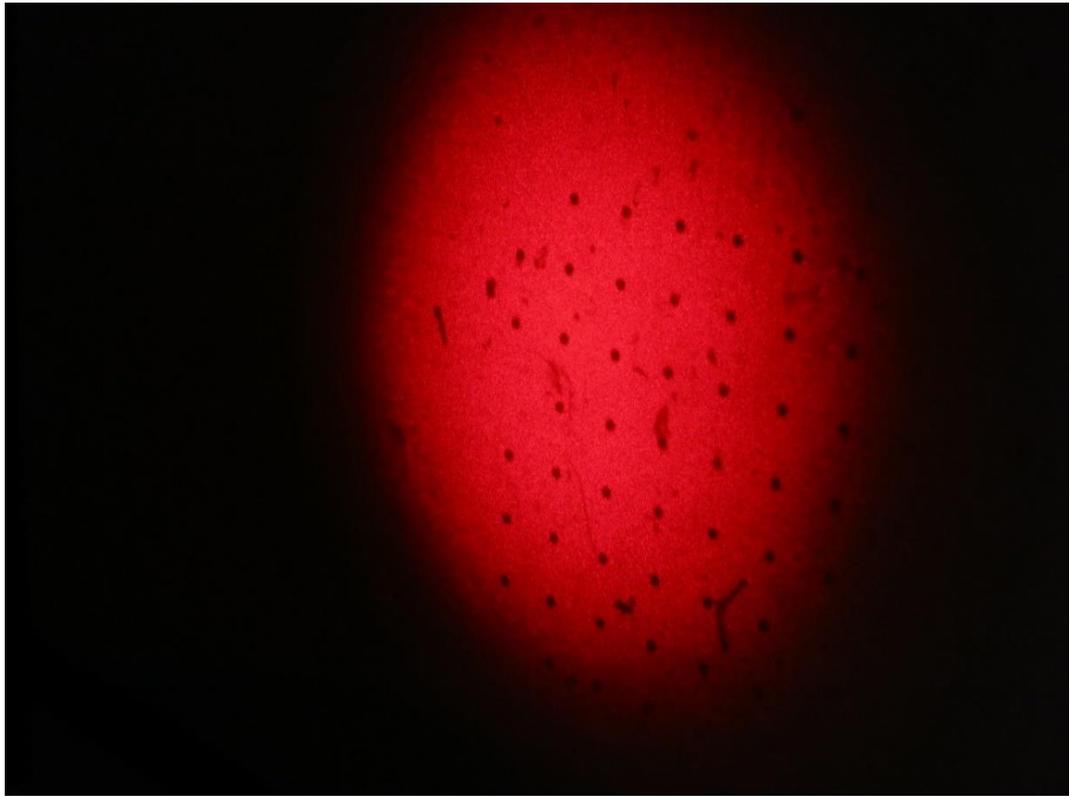


Abbildung 31: Projektion der Elektroden einer MEA Kammer auf die Ebene des Bildschirms mit Hilfe des Lasers. Die Elektroden sind deutlich sichtbar, die Projektion befindet sich im Fokus und somit der Bildschirm in der 0D Position.

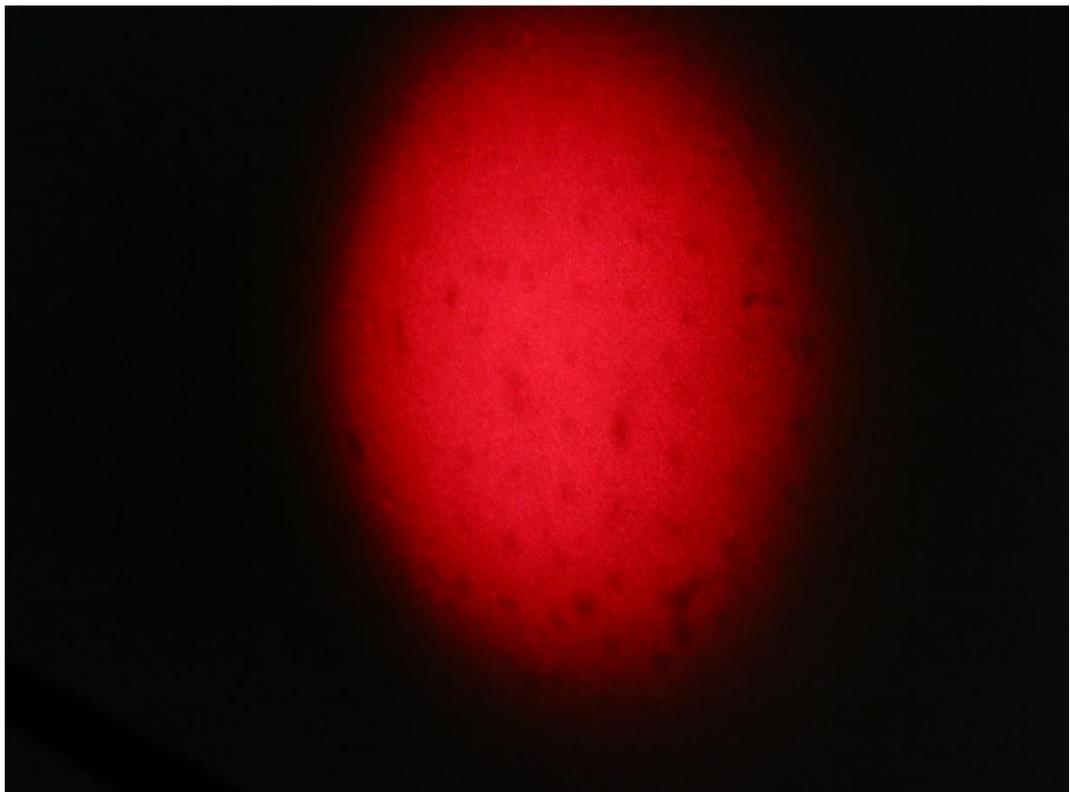


Abbildung 32: Unschärfe Projektion der Elektroden auf die Ebene des Bildschirms mit Hilfe des Lasers. Die Elektroden sind nur sehr undeutlich erkennbar, der Bildschirm befindet sich in einer defokussierten Position (hier etwa +6 D).

2.4 Extrazelluläre Ableitungen

Mit einem MEA Setup können nur extrazelluläre Ableitungen durchgeführt werden. Die extrazelluläre Ableitung hat den Vorteil, dass das Antwortverhalten einer ganzen Population von Zellen erfasst werden kann. Dies ist speziell bei Neuronen und ganz besonders bei retinalen Ganglienzellen von Bedeutung, da einzelne Zellen in der Retina zu spezifische, eng begrenzte Aufgabenbereiche haben und somit nur mit extrazellulären Ableitungen vieler Zellen gleichzeitig eine realistische Hoffnung besteht, Daten zu erhalten, anhand derer Aussagen über die untersuchten Stimuli und der zugehörigen Zellantwort zu treffen sind. Dies gilt insbesondere, wenn davon ausgegangen werden kann, dass die Populationsdichte der gesuchten Zellen sehr klein sein kann.

Zu beachten ist, dass zunächst keine Möglichkeit besteht, die Zellen zu identifizieren, deren elektrische Reaktion aufgezeichnet wurde. Weiterhin ist es in diesem System möglich, mehrere Neurone gleichzeitig abzuleiten, ohne dass diese zwangsläufig die gewünschten Ganglienzellen sind, oder dass zwei benachbarte Elektroden die Aktivität der selben Zelle aufzeichnen, welche zwischen ihnen liegt.

Wichtig ist, dass die Amplitude der gemessenen Antwort direkt von der Lage der gemessenen Zelle relativ zur Position der ableitenden Elektrode abhängig ist. Räumliche Distanz bedingt niedrige Amplituden (abfallende Amplituden mit dem Kehrwert des Abstandsquadrats), es kann also aufgrund der Amplitude keine Aussage über die gemessene Zelle getroffen werden.

Weiterhin ist es möglich, dass sich die Antworten zweier oder mehr Zellen direkt überlagern und ohne Analyse der Wellenformen des Spannungsverlaufes zunächst nicht aufgelöst werden können.

Werden diese Punkte berücksichtigt, so hat die extrazelluläre Ableitung zur Bestimmung der Antworten einzelner Zellen in einem Netzwerk auch ihre Stärken.

2.5 Optische Stimulation

Die Retinae wurden mithilfe des Bildschirms über die Badal-Optik stimuliert. Im Rahmen der Experimente wurden einfache Schachbrettmuster sowie schwarz-weiß Wechsel im Ganzfeld eingesetzt, um die Funktionsfähigkeit der Retinae zu überprüfen.

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob die Information über den Defokus sowie dessen Vorzeichen auf Ebene der Ganglienzellen erkannt wird, wurde ein kurzer Film eingesetzt. Die Gründe hierfür sind im Kapitel 1.1.8 Optische Stimulation (Seite 11) dargelegt.

2.5.1 Der Stimulus

Der hier verwendete Film ist Bestandteil des Installationspaketes von Windows 7 Professional von Microsoft zu Demonstrationszwecken („Wildlife“).

Der Film besteht aus 7 unterschiedlichen Szenen welche jeweils unterschiedliche Tiere und Verhaltens- bzw. Bewegungsmuster enthalten. Die Szenenwechsel beinhalten gleichzeitig einen Helligkeitswechsel im Film, diese sind jedoch für jeden Grad der Defokussierung oder der Kontrastreduktion identisch und sollten in einer vergleichenden Auswertung in gleichem Maße Einfluss nehmen.

Die Länge des modifizierten Filmes betrug 30s, wovon 29s auf bewegte Bilder und 1s auf ein vollständig schwarzes Bild entfielen.

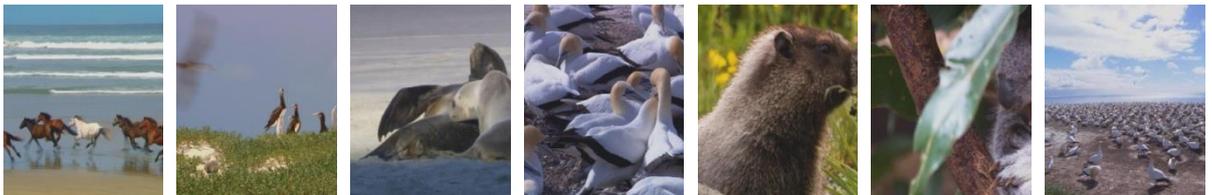


Abbildung 33: Exemplarische Bilder der einzelnen Szenen des Films, entsprechend der Abfolge der Szenen sortiert

Der Film wurde mithilfe von VirtualDub (www.virtualdub.org) bearbeitet. Die Tonspur wurde entfernt und mit Hilfe eines Filter-Plugins („all_filters“ von Emiliano Ferrari) wurden für die abschließenden Experimente kontrastreduzierte Versionen erstellt. Diese hatten 80%, 50% und 25% des ursprünglichen Kontrastes, was etwa 2dpt, 4dpt und 6dpt Defokussierung bei einer Ortsfrequenz von 1 Streifenpaar/Grad entspricht (siehe Kapitel 1.1.4, Seite7).

Der Film wurde je nach Experiment mit 2-3 Zyklen aller verwendeten Stimuli auf die Retinae projiziert, wobei ein voller Zyklus jeweils einen Block von 6 Wiederholungen jedes verwendeten Stimulus enthielt. Nach jedem Block wurde der Bildschirm für 30s schwarz geschaltet. Die Abfolge der Stimuli war nicht variabel, um mögliche Einflüsse durch die Degeneration der Retinae auf die Ergebnisse einzelner Stimuli relativ zu den anderen Stimuli zu minimieren. Adaptationsprozesse sind unwahrscheinlich, da zwischen allen Filmsequenzen eine kurze Schwarzphase lag und der Stimulus ein bewegter Film war.

2.6 Vom Reiz zur Auswertung

Eine der vielen Herausforderungen bei Arbeiten mit elektrischen Ableitungen vieler Elektroden ist die entstehende Datenmenge. Durch die verwendete, hohe Abtastrate (siehe Kapitel 2.6.2) und den damit einhergehenden, großen Speicherbedarf sind aktuelle Hardware und Software notwendig, um in vernünftiger Zeit die anfallenden Rohdaten verwerten zu können. Die Art der Versuche stellte spezielle Anforderungen an die Dateistruktur, was im Folgenden anschaulich gemacht wird.

2.6.1 PC-Hardware

Die Größe der Dateien sowie die Art der Datenauswertung wurden hohe Ansprüche an die PC-Hardware gestellt.

Der zur Auswertung verwendete private PC war ein Intel Core i7 4770k, Solid State Discs (SSD) mit insgesamt 1,3TB Speicherplatz, 32GB Arbeitsspeicher. Eine Auswertung an einer Workstation mit Intel Core i7 2700 mit 16GB Arbeitsspeicher aber Standard Festplatten war nicht möglich, mehrere Versuche wurden nach etwa 72 Stunden Rechendauer ohne erkennbaren Fortschritt abgebrochen. Limitierend ist hier die physikalische Struktur herkömmlicher Festplatten, welche durch ihren Lesekopf nur einen einzelnen Schreib- oder Leseauftrag pro Zeitpunkt ausführen kann. Aufgrund der Programmierung der verwendeten Software („Offline Sorter“ von Plexon Inc.) waren die SSDs als Arbeitsmedien der wichtigste Faktor zur erfolgreichen Auswertung.

2.6.2 Datenaufzeichnung

Die Datenaufzeichnung fand mit dem Programm MC_Rack (Multichannel Systems, Abbildung 34 & Abbildung 35) statt. Die Abtastrate lag bei 50 kHz und die Rohdaten wurden durch ein Bessel Filter 2. Ordnung mit Low-Cut-Frequenz von 51 Hz gefiltert. Jeder Film von 30 Sekunden Dauer entspricht somit 1,5 Millionen einzelnen Datenpunkten. Bei Versuchen mit 120 einzelnen Filmsequenzen sind dies bereits 180 Millionen Datenpunkte, multipliziert mit der Anzahl der Elektroden von 60 ergeben sich somit 10,8 Milliarden Datenpunkte pro Experiment. Dies erklärt die Notwendigkeit von leistungsfähiger Hardware.

Das Programm zeigt annähernd in Echtzeit (mit 1s Verzögerung) den Spannungsverlauf an den Elektroden der MEA-Kammer an. Die Anzeige wurde ständig kontrolliert, um eventuell auftretende Fehler im Versuchsablauf frühzeitig erkennen und beheben zu können. Speziell Probleme der Erdung und der Pumpe konnten hier frühzeitig erkannt werden. Ebenso diente die Anzeige zur Erkennung der Aktivität der jeweiligen Retina.

Die Daten wurden grundsätzlich für jede Elektrode getrennt gespeichert. Somit existieren pro Messung 60 einzelne Datenströme, welche jeweils die an der jeweiligen Elektrode gemessenen Spannungsverläufe repräsentieren.

Aufgrund der extrazellulären Messung ist es möglich, dass einzelne Zellen auf zwei oder mehr Elektroden festgehalten wurden. Ebenso kommt es vor, dass auf einzelnen Elektroden zwei oder mehr Zellen unterschieden werden können. Bei eindeutig gleichen Antworten auf zwei Elektroden wurden die Informationen von einer dieser Elektroden verworfen, um die Anzahl

der gemessenen Zellen nicht künstlich zu erhöhen. Waren mehrere Zellen auf einer Elektrode nachweisbar, so wurden diese alle bewertet, sofern sie den Kriterien der Auswertung (siehe Kapitel 2.6.7 Auswahl von Zellen) entsprachen.

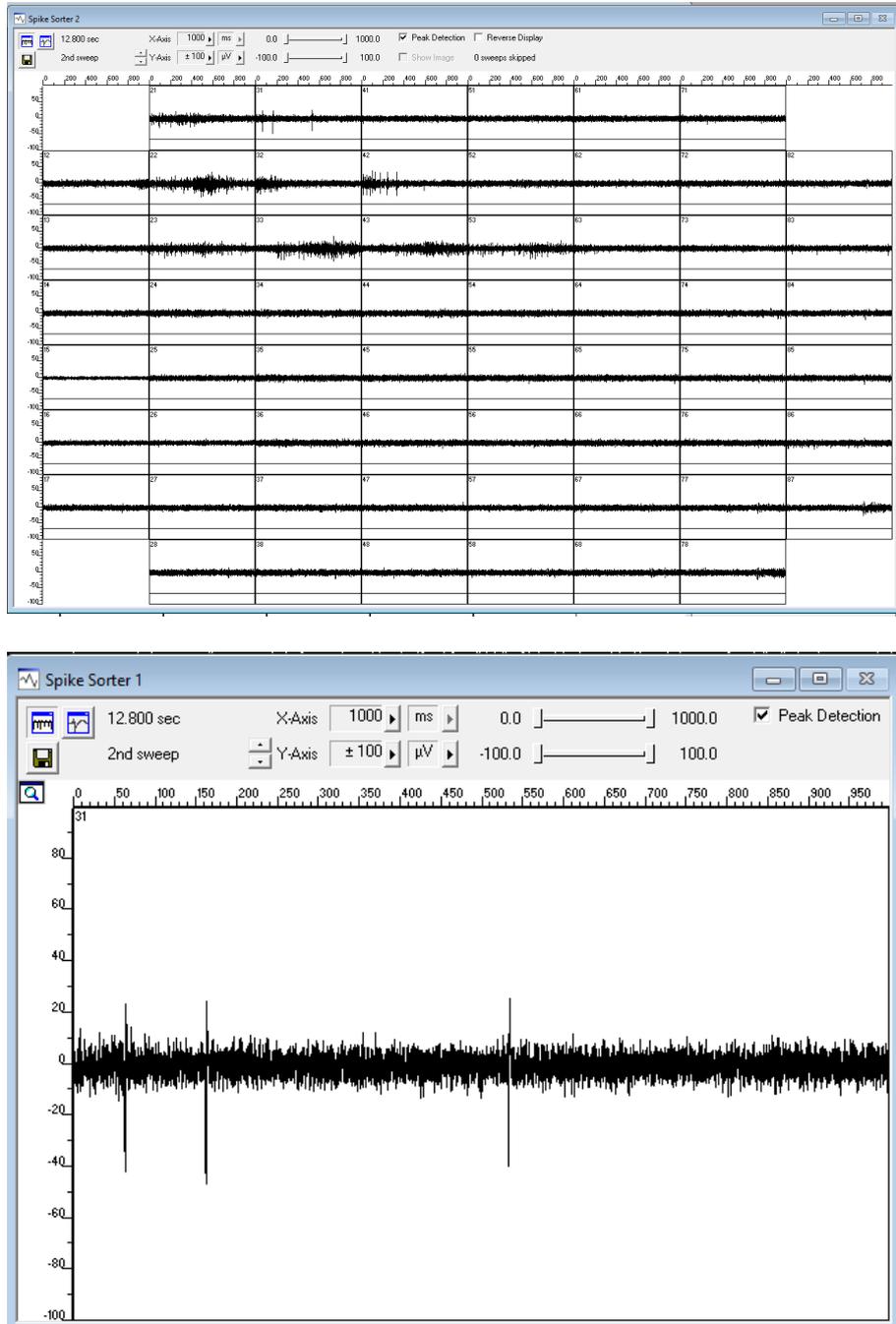


Abbildung 34: Spike Sorter Anzeige von MC_Rack. Oben ist die Übersicht über alle 60 Elektroden sichtbar, unten die vergrößerte Darstellung des Spannungsverlaufes von Elektrode 31. Das Schema der Nummerierung der Elektroden setzt sich aus der Spaltenzahl und der Zeilenzahl zusammen, weshalb beispielsweise Elektrode 11 nicht existiert, aber 12 und 21. In der Aufzeichnung ist ein schwaches Aktivitätsmuster erkennbar, wobei hier noch nicht eindeutig wird, ob die sichtbaren Spikes Ausschläge tatsächlich Zellantworten sind.

In frühen Experimenten während dieses Projekts wurde eine einzelne Datei kontinuierlicher Messungen aufgezeichnet. Da jedoch immer wieder Eingriffe ins Setup durch Versagen der peristaltischen Pumpe oder aus anderen Gründen notwendig waren, war dies nicht praktikabel. Es bestand keine Möglichkeit, in diesem Fall eine zuverlässige Zuordnung zwischen Stimulus und dem Zeitpunkt während der Messung zu erhalten, die Daten waren also wertlos.

Aus diesem Grund wurde fortan der Aufzeichnungsstart mit dem Start des Videos synchronisiert, um für jede Wiederholung des Filmes eine einzelne Datei mit klar definiertem Startzeitpunkt zu erhalten.

Zu Beginn geschah dies manuell mit einer Präzision von etwa +/- 50-100ms, später wurde ein automatischer Trigger über eine Photozelle ins System eingebracht. Der Trigger der Photozelle war so eingestellt, dass er nach einer inaktiven Phase auf einen starken Anstieg der Helligkeit reagierte und ein Trigger-Signal auslöste, weshalb zu Beginn jeder Filmsequenz für kurze Zeit ein schwarzes Bild gezeigt wurde (siehe 2.5.1, Seite 39). Danach wurde der Trigger wieder automatisch für eine vorher definierte Zeit inaktiviert. Die Aufzeichnung startete synchron mit dem Trigger-Ereignis und endete für jede Wiederholung des Films nach der selben Zeit. Die genauen Einstellungen sind in Abbildung 35 ersichtlich.

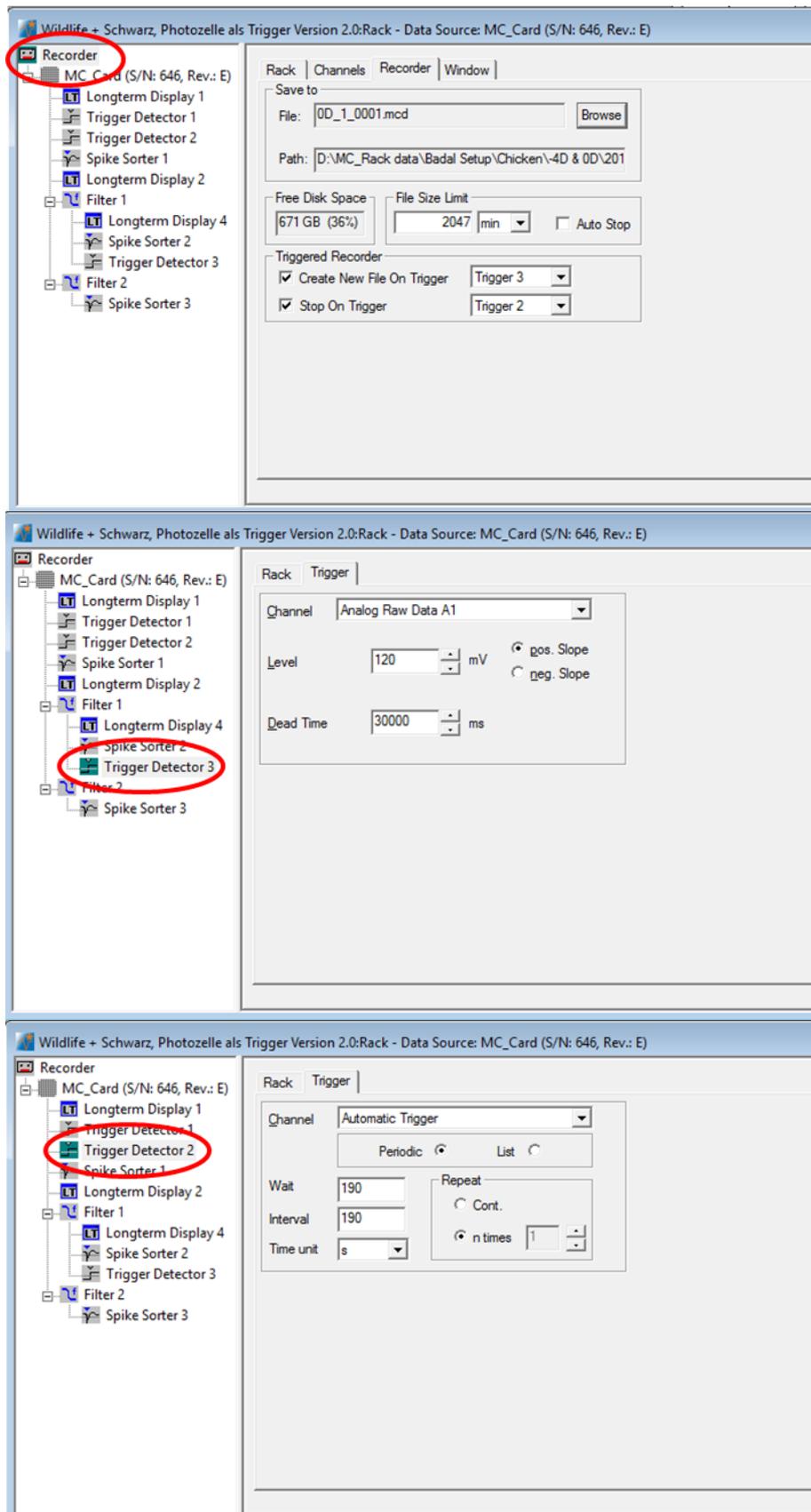


Abbildung 35: Abbildungen des Programmes MC_Rack. Die roten Ellipsen verdeutlichen den jeweils angezeigten Teil der Einstellungen zur automatischen Dateierstellung und Speicherung

2.6.3 Zusammenfügung der Dateien

Die erhaltenen Dateien (Kapitel 2.6.2) wurden mit dem Programm „MC_DataTool“ (Multichannel Systems, Abbildung 36) in chronologisch korrekter Reihenfolge zusammengeführt. Dies war zur weiteren Auswertung unerlässlich, da nur so gewährleistet werden konnte, dass die zur Analyse verwendeten Dateien keine Abschnitte ohne tatsächliche Stimulation beinhalteten. Eine Auswertung der Einzeldateien scheiterte daran, dass der im Programm „Offline Sorter“ verwendete Algorithmus für jede Auswertung eine eigene Gruppierung von Wellenformen (siehe Abbildung 38 & Abbildung 39) der Spannungsänderungen vornahm. Dies resultierte darin, dass nach der Analyse die gruppierten Wellenformen der einzelnen Dateien nicht eindeutig auf die gleiche Ursache, also die gleiche Zelle zurückgeführt werden konnten. Somit war es auch nicht möglich, eine Aussage über das Antwortverhalten der Zellen unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu treffen. Bei einer Analyse der zusammengeführten Dateien wurde die Gruppierung der Wellenformen über den gesamten Zeitverlauf durchgeführt. Somit konnten die Wellenformen eindeutig zugeordnet werden (siehe Kapitel 2.6.5).

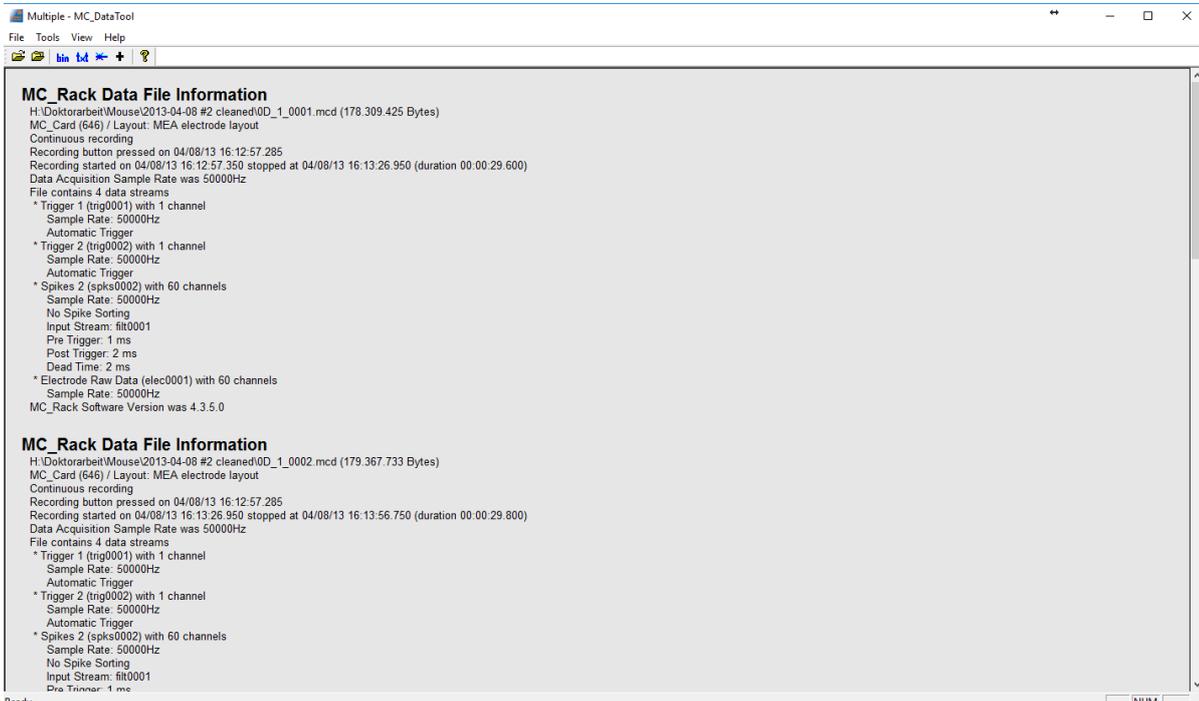


Abbildung 36: MC_DataTool (Multichannel Systems) zur Zusammenfügung der Daten. Einzeldateien werden in der Reihenfolge, in welcher sie zusammengefügt werden, untereinander angeordnet.

2.6.4 Identifizierung von Wellenformen

Die aus 2.6.3 erhaltenen, ca. 22 GB großen Dateien wurden mit dem Programm „Offline Sorter“ (Plexon Inc.) analysiert. Der erste Schritt der Analyse (Tabelle 7) diente primär der Erkennung aller Wellenformen in der Datei, gleichgültig welchen Ursprungs diese waren. Zusätzlich wurden hier bereits Artefakte erkannt und entfernt. Artefakte sind Wellenformen, welche typische Merkmale aufweisen, die in keinem Fall organischen Ursprungs sein können, wie beispielsweise sehr hohe Amplituden (im mV Bereich) oder Rechteckformen im Spannungsverlauf. Es wurde ein Hochpass-Besselfilter eingesetzt. Dieser Filter entfernt alle Wellenformen, welche eine Frequenz von 50Hz oder darunter aufweisen. Somit werden Störungen durch das Stromnetz und andere, künstlich generierte Wellenformen unterbunden. Aktionspotentiale haben in der Regel eine Dauer von etwa 2ms. Kombiniert mit der etwa 2ms andauernden Refraktärphase ergibt sich eine theoretische Frequenz von 250hz, weshalb sie nicht ausgefiltert werden.

Tabelle 7: Script zur Identifikation von Wellenformen sowie der Entfernung von Artefakten in „Offline Sorter“. Zeilen mit vorgestelltem // sind inaktiv. Das Script basiert auf einer Vorlage von Dr. Daniel Rathbun (Forschungsinstitut für Augenheilkunde Tübingen) und die gezeigte Form wurde für alle Experimente verwendet. Die Zeilen 7+8 definieren die Parameter zur Artefakterkennung (Dauer des Artefakts und Prozentsatz an Kanälen mit Artefakt). Die Zeilen 10 bis 12 legen Typ und Parameter des Filters fest und die Zeilen 14 bis 24 bestimmen Art und Parameter der Wellenformerkennung

//Dir H:\Doktorarbeit\ -5D to +5D\Processing\#1*.mcd	1
File H:\Doktorarbeit\ -5D to +5D\Processing\#3\2013-10-29_all -5 to +5 with 50% con.mcd	2
	3
Set OptionsFromFile	4
C:\Users\Klaus\Dropbox\Doktorarbeit\OfflineSorter\Config_OfflineSorterV3\OFSSOptions_Klaus3.ofss	5
	6
	7
Set ArtifactWidth 50	8
Set ArtifactPercentage 50	9
	10
Set FilterType Bessel	11
Set FilterPoles 12	12
Set FilterFreq 61	13
	14
Set DetectNPW 150	15
Set DetectNPre 28	16
Set DetectSigmas -4.0	17
Set DetectDead 0	18
	19
//Set AlignType 4	20
//Set AlignMaxShift 100	21
	22
Set SaveInvalidated 0	23
Set SaveUnsorted 1	24
Set SaveCont 0	25
	26
ForEachChannel Filter	27
ForEachChannel Detect	28
//ForEachChannel Align	29
	30
ForEachfile InvalidateArtifacts	31
ForEachFile SaveAsPlx	32
Process	33

Die Visualisierung der Ergebnisse dieses Scripts kann in Abbildung 38 eingesehen werden.

2.6.5 Sortierung von Wellenformen

Das sogenannte „spike sorting“ bezeichnet die Sortierung der Wellenformen in Gruppen ähnlicher oder gleicher Eigenschaften die davon abhängen, welche Sortierung gewählt wurde. Als „Spike“ werden Ereignisse in den Daten bezeichnet, welche in Form einer starken Veränderung der gemessenen Spannung vorliegen. Aufgrund ihres zeitlichen Verlaufs können sie als Resultat der Aktivität von Zellen oder unerwünschten äußeren Einflüssen identifiziert werden.

Die wichtigsten Kriterien dieser Sortierung sind in der Wellenform, also dem zeitlichen Ablauf der gemessenen Spannungswerte in der grafischen Darstellung zu finden. Die Steigung der einzelnen Kurvenabschnitte, die Amplitude aber auch der zeitliche Verlauf sowie die Gesamtdauer des gemessenen Ereignisses werden bewertet.

Besondere Bedeutung hat hier auch die Erkennung der Spikes. Da aufgrund einer extrazellulären Aufzeichnung der Spannungswerte, gemessen an vielen Elektroden, es leicht möglich war, dass die gewünschten Ereignisse sich kaum oder sogar nicht über die Amplitude des Rauschniveaus abhoben, war eine simple Schwellenwertmethode zur Detektion (siehe Abbildung 37) der Spikes nicht zielführend. Hierbei werden nur Wellenformen erfasst, deren Amplitude über den angegebenen Schwellenwert reicht. Bei Wellenformen, deren Amplitude nicht über jene des Rauschens hinausgeht, ist eine Erkennung somit nicht möglich (vergleiche Abbildung 39).

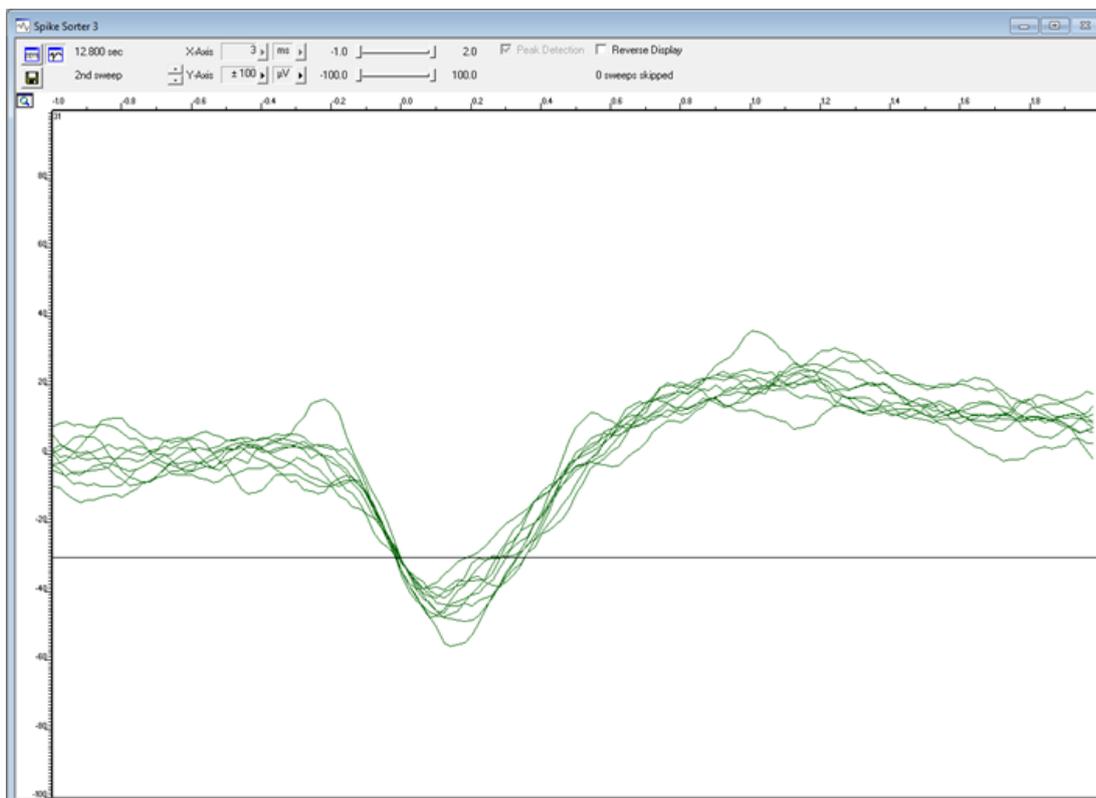


Abbildung 37: Darstellung mehrerer vom Programm MC_Rack (Multichannel Systems) per Schwellenwert (schwarze, horizontale Linie) erfasster Spikes (grün, mehrere Spikes sind überlagert dargestellt), gemessen an einer einzelnen Elektrode. Die Spannungswerte der Y-Achse werden zur Referenzelektrode des Systems über die Zeit auf der X-Achse angegeben, weswegen negative Werte auftreten.

Um also möglichst aussagekräftige Daten mit einer möglichst hohen Anzahl an Wellenformen und echten Spikes zu erhalten, mussten anhand spezieller Algorithmen (welche Eigentum der jeweiligen Softwareentwickler sind) diese Wellenformen erkannt und von den unerwünschten Daten getrennt werden.

Hierfür wurde mittels eines weiteren Scripts die Sortierung der Wellenformen in Offline Sorter vorgenommen.

Tabelle 8: Script zur Sortierung von Wellenformen. Zeilen mit vorgestelltem // sind inaktiv. Zusätzlich zum Script in Tabelle 7 wird ein weiteres Mal auf Artefakte geprüft (Zeile 12+13). In den Zeilen 15-25 wird die Art der Sortierung definiert.

//file I:\-4D & 0D\merged\2014-11-11.plx	1
//file I:\-2D & 0D\2014-10-08\Playground\2Di.plx	2
	3
	4
Dir H:\Doktorarbeit\5D to +5D\Processing\#1*.plx	5
	6
	7
Set OptionsFromFile C:\Users\Klaus\Dropbox\Doktorarbeit\Offline	8
Sorter\Config_OfflineSorterV3\OFSOptions_Klaus3.ofss	9
	10
	11
Set ArtifactWidth 50	12
Set ArtifactPercentage 50	13
	14
Set SortDim 3	15
Set FeatureX 0	16
Set FeatureY 1	17
Set FeatureZ 2	18
Set ScanType DOFMult	19
Set ScanStart 2	20
Set ScanEnd 40	21
Set ScanStep 2	22
Set ScanNormalize 1	23
Set ScanStat PsF	24
Set WaveformLimit 20000	25
	26
	27
Set SaveInvalidated 0	28
Set SaveUnsorted 1	29
Set SaveCont 0	30
	31
ForEachFile InvalidateArtifacts	32
	33
ForEachChannel Scan	34
ForEachChannel SaveScanResults	35
	36
Process	37

Abbildung 38 zeigt einen Screenshot des Programmes Offline Sorter. Dargestellt wird eine Datei, welche bereits durch beide Scripts (Tabelle 7 und Tabelle 8) analysiert wurde. Die Art der Darstellung repräsentiert das Zwischenergebnis nach dem ersten Script (Tabelle 7). Abbildung 39 sowie Abbildung 40 zeigen zwei mögliche Sortierungsmuster nach der Anwendung des Scripts in Tabelle 8.

An diesen Abbildungen wird deutlich, dass die erkennbare Gruppe von Spikes (Gelb in Abbildung 39, Dunkelblau in Abbildung 40) ohne die beschriebene Analyse nicht eindeutig erkennbar gewesen wäre.

Da die in diesen Abbildungen ersichtlichen unterschiedlichen Auswahlmöglichkeiten in der Sortierung der Gruppen von Spikes potentiell zu unterschieden in der Auswertung führen konnte, wurden nur jene Sortierungen gewählt, welche den geringsten Freiheitsgrad (DOF, **degree of freedom**, siehe Abbildung 40) aufwiesen. Aus meiner Erfahrung war dies in den meisten Fällen die sinnvollste Wahl und wurde daher als Standard festgelegt. Die Anzahl der Spikes pro Gruppe war meist niedriger, jedoch waren ebenso die Wellenformen einheitlicher. Die höhere Anzahl an Gruppen erlaubte weiterhin eine feinere Selektion der gewünschten Daten (Abbildung 40).

Tabelle 9: Liste der wichtigsten Objekte in den Abbildungen Abbildung 38, Abbildung 39 und Abbildung 40.

Buchstabe	Bezeichnung	Bedeutung
A	Wellenformen	Darstellung aller Wellenformen in überlagerter Form.
B	ISI Histogramm	InterSpike Interval (ISI) Anzeige. Es wird die Zeit zwischen den einzelnen Ereignissen (Spikes) in der Gruppe angezeigt.
C	2D Cluster	Zeigt eine zweidimensionale Ansicht der gewählten Gruppen von Spikes.
D	Zeitlinie	Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Amplitude
E	Sortierstufen	Auswahlfenster für die verschiedenen Sortierstufen entsprechend der verschiedenen Freiheitsgrade auf der X-Achse.
F	Kanäle	Liste aller Kanäle sowie der Anzahl der Wellenformen in diesen Kanälen.

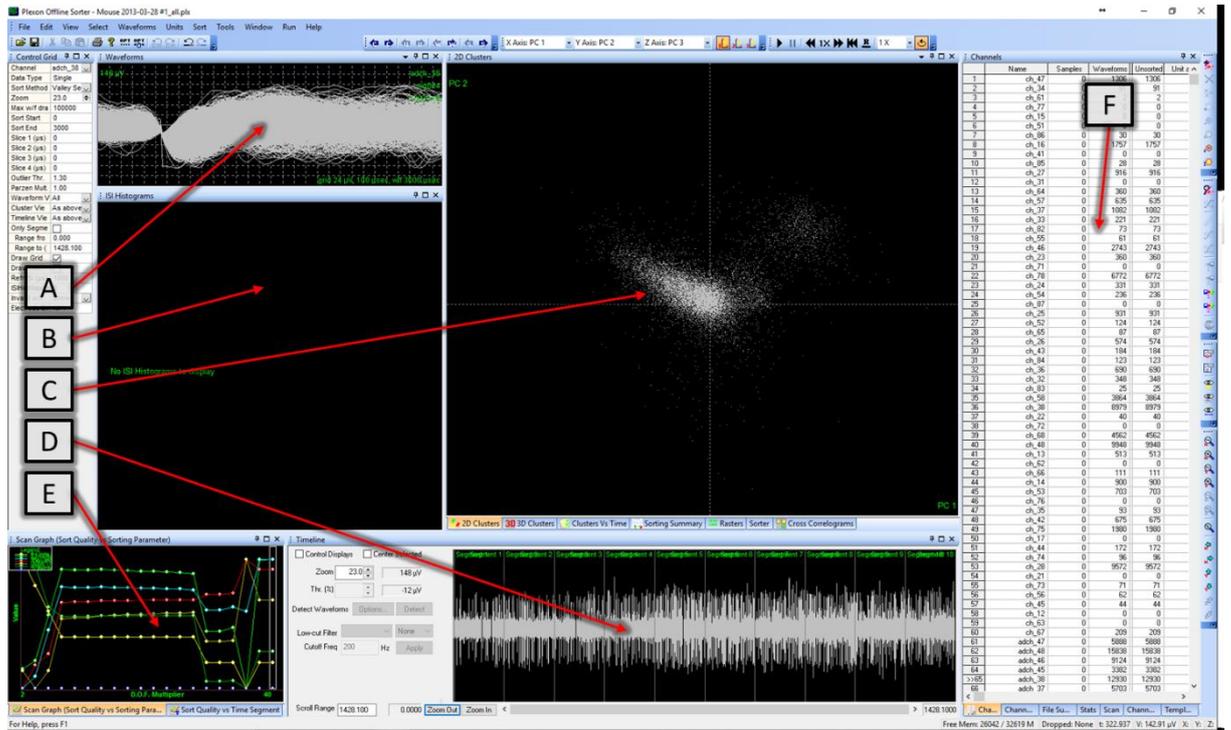


Abbildung 38: Übersicht über das Programm „Offline Sorter“(Plexon Inc.). Das Bild ist ohne grafische Darstellung der Sortierung. Jeder einzelne Punkt im Feld C repräsentiert eine einzelne Wellenform. Die einzelnen Bestandteile der Oberfläche des Programms sind in Tabelle 9 aufgeführt.

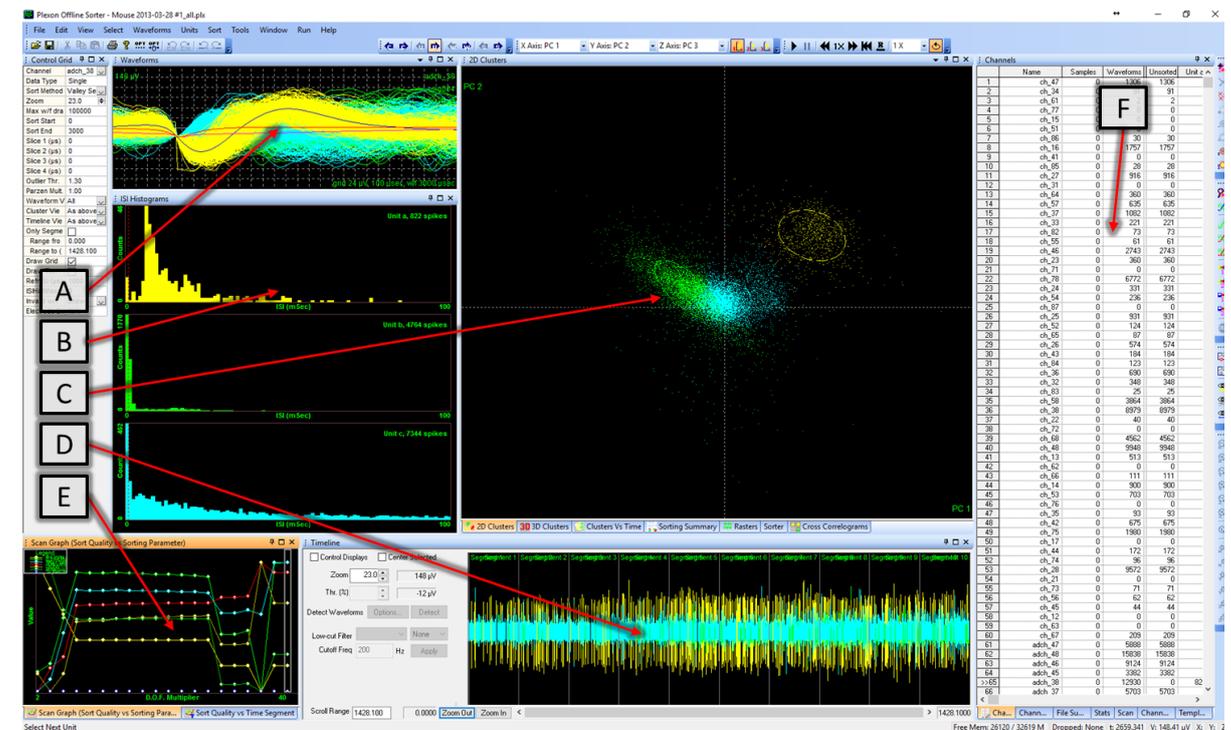


Abbildung 39: Offline Sorter Darstellung der selben Daten wie in Abbildung 38 mit grafischer Unterteilung der Spikes in drei verschiedene Gruppen (cluster).

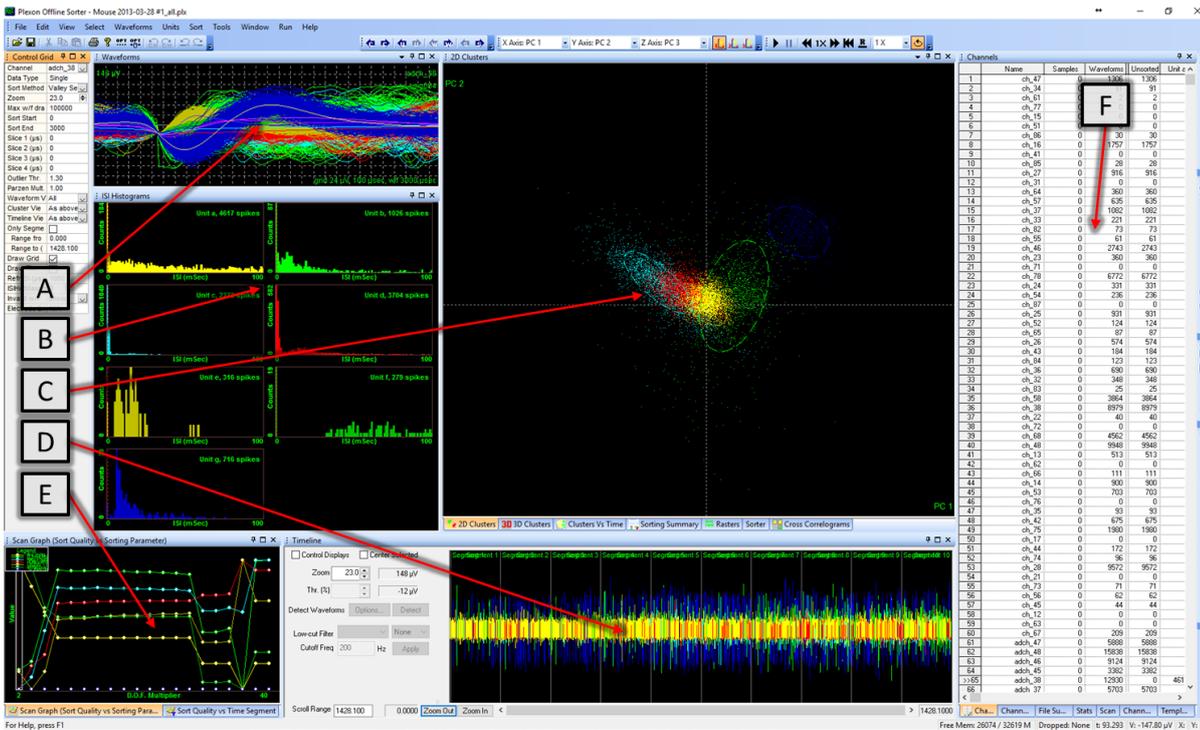


Abbildung 40: Offline Sorter Darstellung der Daten aus Abbildung 38 und Abbildung 39 mit der maximalen Anzahl der vom Script in Tabelle 8 ermittelten Gruppen von Spikes.

Die Auswahl der Kanäle, welche potentiell Spikes enthalten, geschah manuell. Als Kriterien dienten der Kurvenverlauf (Abbildung 39 und Abbildung 40, Sektion A), das Interspike Intervall (Sektion B) sowie der zeitliche Verlauf (Sektion D). Der zeitliche Verlauf war von Bedeutung, um die Daten einzelner Elektroden auszuschließen, welche mit fortschreitender Dauer des Experimentes deutlich abfielen oder unter Umständen nur in einem einzigen Zeitfenster sehr hohe Aktivität wiedergaben, im restlichen Versuchsverlauf jedoch unauffällig blieben. Dies waren Indikatoren dafür, dass diese gemessenen Antworten entweder von sterbenden Zellen stammten oder als Artefakte bzw. Störungen aufgefasst werden konnten.

2.6.6 Extraktion der Daten

Um die Daten statistisch auswerten zu können, wurden sie aus „Offline Sorter“ extrahiert und in numerischer Form in Microsoft Excel übertragen. Da bei der Stimulation mit einem Film keine direkte Korrelation zwischen der Zellantwort und spezifischen Ereignissen im Film (mit Ausnahme von starken Helligkeitswechseln, welche sich jedoch global auf alle Zellen auswirken) möglich ist, konnte nur die Gesamtdauer betrachtet und somit ein für die betrachtete Zelle gültiger Mittelwert oder eine Summe an Spikes über die Zeit bewertet werden. Diese Information über die Anzahl der Spikes wurde für jede Versuchsbedingung ermittelt. Aus den in 2.6.5 erhaltenen Dateien wurden alle bis auf die gewünschten Gruppen von Spikes entfernt (Abbildung 41).

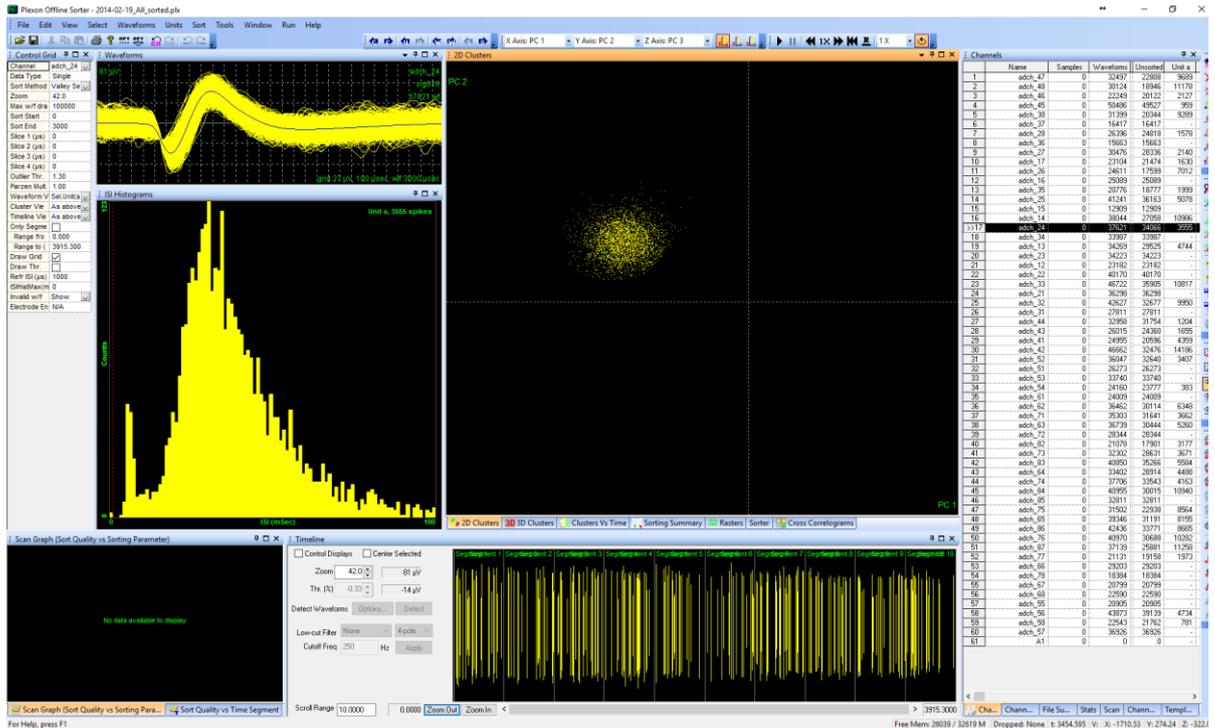


Abbildung 41: Offline Sorter Ansicht einer isolierten Gruppe von Spikes, welche in ihrer numerischen Form in Excel übertragen wurde (siehe Abbildung 39 und Abbildung 40).

Die Anzahl der Spikes für jede einzelne Filmwiederholung wurde extrahiert und entsprechend der Versuchsbedingung sortiert. Die Auftrennung der Dateien sowie die anschließende Extraktion der numerischen Daten in Excel Dateien wurde mit der Funktion „Export to Excel“ von „Offline Sorter“ durchgeführt.

Tabelle 10: Scripte zur Extraktion der einzelnen Antworten auf die Filmsequenzen (oben) sowie zur Exportierung der numerischen Daten nach Excel (unten).

//break	//	1.00	1
Set	UseRangeStart	0.00	2
Set	UseRangeEnd	30.02	3
ForEachFile	SaveAsPlx		4
Process			5
//break	//	2.00	6
Set	UseRangeStart	30.02	7
Set	UseRangeEnd	60.04	8
ForEachFile	SaveAsPlx		9
Process			10
//repeat the above			11
dir H:\Doktorarbeit\+6D to +6D\Exporting*.plx			1
			2
ForEachFile	ExportUnitInfo		3
Process			4

Die Daten wurden in Microsoft Excel mit Hilfe großer, automatisierter Tabellen zur weiteren Analyse in „JMP“ (SAS Institute Inc.) vorbereitet sowie einige Analysen durchgeführt (siehe Abbildung 42 und Kapitel 3 Ergebnisse für Details).

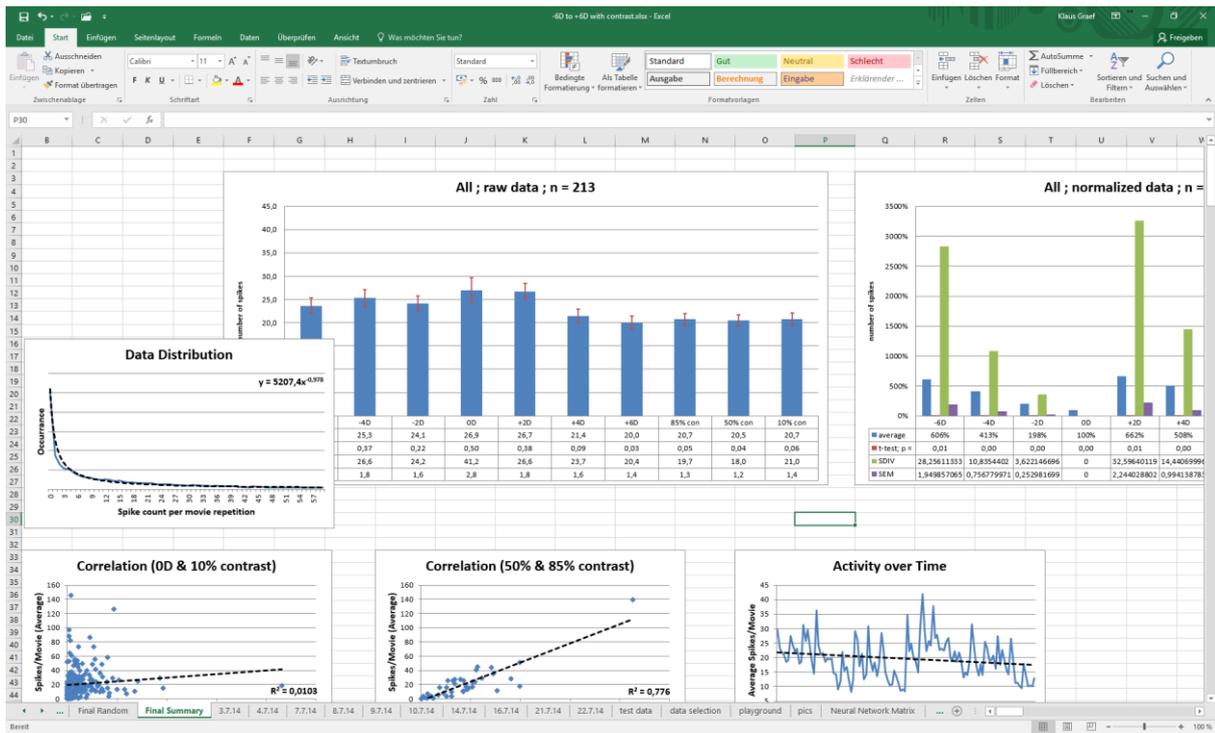


Abbildung 42: Ansicht der Zusammenfassung einer Excel Tabelle zur Analyse der Daten. Im Überblick zu sehen sind Datenverteilung, Korrelation, Aktivität der Zellen sowie ein gesamtüberblick der Spikeraten im entsprechenden Experiment zu sehen (Details siehe Kapitel 3 Ergebnisse)

2.6.7 Auswahl von Zellen

Um die vorliegenden Daten statistisch auswerten zu können, war es notwendig, eine Methode zur Auswahl von Zellen zu finden, welche nicht gezielt auf ein einzelnes Antwortmuster filtert. Wird in der Selektion beispielsweise nach Zellen gesucht, deren Antwortverhalten bei einer Bedingung höher ist als bei einer anderen, so wird sich in der erhaltenen Gruppe mit Sicherheit auch eine Signifikanz bezüglich dieser beiden Werte herausbilden, sie könnten also nicht zur Analyse verwendet werden. Man bezeichnet dieses Problem auch als „selection bias“ oder „Stichprobenverzerrung“.

Da die vorliegenden Daten die Aktivität der Zellen in Form der Anzahl der Spikes pro Zeiteinheit darstellen und verschiedene Versuchsbedingungen zur Verfügung stehen, bestand die Möglichkeit, nach generellen Unterschieden zu suchen. Wird die Frage „ist A größer als B?“ gestellt, wird eine Gruppe aus allen Paaren die diese Bedingung erfüllen, bei hinreichender Probenzahl, grundsätzlich einen signifikanten Unterschied zwischen A und B in der selektierten Gruppe aufweisen. Stellt man jedoch die Frage „ist A unterschiedlich von B“, so beinhaltet dies alle Paare, in welchen ein Unterschied zwischen A und B aufgezeigt werden kann, gleichgültig ob A nun größer oder kleiner als B ausfällt. Wird nun die daraus resultierende Gruppe auf Unterschiede zwischen diesen beiden Werten hin untersucht, so sind die drei folgenden Ergebnisse möglich:

1. A und B unterscheiden sich nicht signifikant
2. A ist signifikant größer als B
3. A ist signifikant kleiner als B

Bei rein zufälligen Unterschieden welche in der spontanen Aktivität der Zellen oder äußeren Einflüssen begründet liegen, ist Möglichkeit 1 zu erwarten. Beruhen die festgestellten Unterschiede auf einem generellen Unterschied gleicher Ursache, so ist Möglichkeit 2 oder 3 wahrscheinlich.

Statistische Untersuchung

Um diese Selektion möglichst exakt durchführen zu können, wurde die Analyse mit Hilfe des Statistikprogrammes „JMP“ durchgeführt. Mit Hilfe einer einfaktorien Varianzanalyse wurde für jede Zelle getrennt untersucht, ob signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsbedingungen bestehen. Bei mehreren Versuchsbedingungen mit gleichem Vorzeichen der Defokussierung wurde diese jeweils zusätzlich gruppiert. Für die daraus resultierenden Gruppen (Negativ, Null, Positiv, Kontrast) wurde die Varianzanalyse ebenso durchgeführt wie für den Vergleich aller Bedingungen. Nur wenn in beiden Analysen zumindest eine einfache Signifikanz vorlag, wurden die Daten zur endgültigen Auswertung verwendet.

Aufgrund der Unterschiede in den Versuchsbedingungen und deren Anzahl, wurde die Signifikanzschwelle zur Selektion der einzelnen Zellen für jedes Experiment separat festgelegt.

- Experiment 1 & 2 (Seite 59): $p < 0,05$ (zwei Versuchsbedingungen, keine Gruppen)
- Experiment 3 (Seite 72): 1x $p < 0,05$; 1x $p < 0,001$ in Versuchsbedingung oder Gruppe (sieben Versuchsbedingungen, drei Gruppen)
- Experiment 4 (Seite 83): 1x $p < 0,05$; 1x $p < 0,01$ eines Wertes zu zwei weiteren Werten (vier Versuchsbedingungen, keine Gruppen)
- Experiment 5 (Seite 92): 1x $p < 0,05$; 1x $p < 0,001$ in Versuchsbedingung oder Gruppe (zehn Versuchsbedingungen, vier Gruppen)

Weiterhin wurde ein Dunnett's Test mit Kontrollgruppe durchgeführt. Die Kontrollgruppe war die Gruppe der Antworten bei keiner Defokussierung oder Kontrastreduktion. Dies diente der Identifizierung der Art der Unterschiede zwischen den Gruppen und Versuchsbedingungen. Die Zellen wurden anhand der hierdurch festgestellten Unterschiede zwischen den Gruppen sortiert.



Abbildung 43: Beispielbild zum Selektionsverfahren. Die gezeigte Zelle (Nr. 103 in Experiment 3 (Seite 72)) wurde in die Gruppe „Null“ einsortiert. Die Varianzanalyse (englisch ANOVA, analysis of variance) zeigt generell signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsbedingungen als auch zwischen den Gruppen.

2.7 Zufallsdaten als Gegentest

Die in Kapitel 2.6 durchgeführten Schritte zur Datenverarbeitung beruhen auf der Annahme, dass die gemessenen Daten von Zellen herrühren und eventuelle Störungen durch die Filter in der Analyse durch die Programme oder die notwendigen Schwellenwerte der Signifikanzen in der Zellselektion ausgeschlossen wurden.

Um Gewissheit über die Qualität der Daten zu erhalten, wurde von Dr. Robert Krug (Institut für Informatik, jetzt TWT GmbH) ein Java-Programm zur Erstellung von zufallsgenerierten Daten (Abbildung 45) auf Basis der anhand der Rohdaten ermittelten Verteilungswerte (Abbildung 44) geschrieben. Das Programm generierte die Daten passend zur vorliegenden Struktur der Auswertetabellen in Excel. Für jeden Datenpunkt der gemessenen Daten wird also ein Wert zufällig generiert. Diese Werte sind entsprechend der Struktur der Rohdaten den verschiedenen Versuchsbedingungen zugeordnet, es existiert also für jeden realen Wert der Versuchsbedingung „-2D“ also auch ein zufallsgenerierter Wert, da für jeden Punkt der Datentabellen ein neuer Wert zufallsgeneriert und eingesetzt wird.

Somit war es möglich, sämtliche Analyseschritte aus Kapitel 2.6 für jeden Versuch mit zufallsgenerierten Daten zu wiederholen.

Die in Kapitel 2.6.7 aufgelisteten Schwellenwerte sorgten dafür, dass nur vereinzelt zufallsgenerierte Zahlen diese Werte erreichten und, wie zu erwarten, in der Gruppierung niemals eine Signifikanz erreichten.

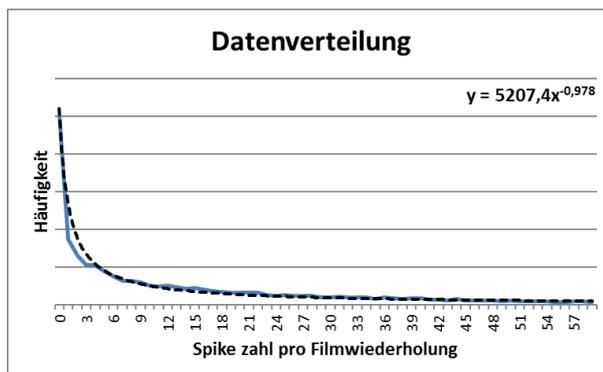


Abbildung 44 (oben): Beispiel einer Verteilungskurve der gemessenen Rohdaten. Die gestrichelte Linie zeigt die Trendlinie der Verteilung. Die zugehörige Steigungsformel wurde verwendet um die Zufallsdaten für das jeweilige Experiment (Experiment 5 in diesem Beispiel) zu erstellen.

Abbildung 45 (rechts): Menü und Eingabeansicht des Tabellengenerators. Zeilen (columns), Reihen (rows) sowie die Grenzwerte (upper & lower bound) wurden aus den Rohdaten und der Anzahl der Versuchsbedingungen und Zellen ermittelt. Die genauen Einstellungen der Verteilung wurden für jedes Experiment manuell ermittelt.

Das Bild zeigt die Benutzeroberfläche des 'Tabellengenerators'. Die Eingabefelder sind wie folgt konfiguriert:

- columns: 0
- rows: 0
- lower bound: 0
- upper bound: 0
- Verteilungstypen:
 - equally distributed
 - gaussian distribution
 - standard deviation: 0,0
 - mean: 0,0
 - power law distributed
 - exponent: 1,0
 - coefficient: 1,0
 - logarithmic distribution
 - coefficient: 1,0
 - offset: 1,0
- Buttons: 'createTable' und 'evaluate Table'

3 Ergebnisse

Als erster Schritt der Auswertung wurde ein Korrelationstest der Antworten der Ganglienzellen beim wiederholten Abspielen des Films durchgeführt. Dies stellt eine sichere Methode dar, die aufgezeichneten Daten als Antworten von Zellen zu identifizieren und von Rauscheffekten und anderen Störungen zu unterscheiden. Weiterhin vermittelt dieser Test einen Überblick über die Daten des gesamten Experimentes und zeigt Abhängigkeiten der Zellantworten von den gewählten Versuchsbedingungen auf.

Die darauf folgenden Auswertungen basieren, sofern nichts gegenteiliges beschrieben ist, auf dem Zehnerlogarithmus $[\log(10)]$ der Anzahl an Spikes während der Präsentation einzelner Filmsequenzen. Die Logarithmierung wurde vorgenommen, um den Einfluss von Extremwerten zu verringern und um die Daten eher in einer Normalverteilung zu transformieren.

3.1 Grundsätzliche Erklärung der Grafiken.

Zum besseren Verständnis der nachfolgenden Grafiken werden die verschiedenen Darstellungen hier übergreifend beschrieben.

Da die Dioptrie keine SI-Einheit ist und die Daten im englischen Gebietsschema erfasst und ausgewertet wurden, wird hier die Abkürzung „D“ für Dioptrien verwendet, anstatt des in Deutschland üblichen „dpt“.

3.1.1 Datenverteilung

Die Grafiken zur Darstellung der Datenverteilung haben eine lineare Y-Achse ohne Ziffern. Dies ist beabsichtigt, da die absolute Anzahl der Werte hier nur durch die Anzahl der ausgewerteten Zellen beeinflusst wird. Dies hat jedoch keinerlei Einfluss auf die Form der Verteilungskurve. Die Kurve verläuft scheinbar asymptotisch gegen Null. Entgegen des mathematischen Kurvenverlaufs wird die hier vorliegende Kurve den Wert Null jedoch erreichen (außerhalb des Grafikbereichs), da die maximale Spikerate der Zellen nicht überschritten werden kann und somit die Häufigkeit von darüber liegenden Zahlen Null sein muss.

Die hier ermittelte Formel des Verlaufs der Verteilungskurven wurde zur Erstellung der Zufallsdaten benötigt.

3.1.2 Zellaktivität

Diese Grafiken dienen der Darstellung der Aktivität der Zellen im Verlauf der Versuche. Die X-Achse (Zeit) ist ohne Ziffern, da diese nur über die Versuchsdauer Auskunft gibt, nicht über die Konstanz der Messungen während der Experimente, welche hier überprüft wird. Die Ergänzung der Achse um die Sekundenzahlen (bis 4200) oder zusammengefasste Bins würde die Grafiken unübersichtlich machen und keinen Mehrwert beinhalten.

3.1.3 Korrelationen

Die Korrelationen beziehen sich auf die absolute Spikezahl der einzelnen Zellen während der Stimulation mit den jeweiligen Versuchsbedingungen. Jeder Punkt im Diagramm entspricht also den Mittelwerten der Spikeraten der angegebenen Versuchsbedingungen. Hierbei ist die Spikerate bei einer Versuchsbedingung auf der X-Achse, bei der zweiten Versuchsbedingung auf der Y-Achse aufgetragen. Die Korrelationen der Antworten der Zellen bei zwei verschiedenen Fokussierungen fielen meist hoch signifikant aus.

3.1.4 Rohdaten

Diese Übersichtsgrafiken zeigen die Anzahl der Zellen (n), den T-Test der Werte der einzelnen Bedingungen gegen 0D (zweiseitig, zwei Stichproben gleicher Varianz), Standardabweichung und Standardfehler. Bei einer höheren Anzahl an Versuchsbedingungen wurde der strikere Test nach Dunnett (1955) verwendet und 0D als Kontrollgruppe definiert.

Das Programm JMP ignoriert bei Anwendung der statistischen Tests Datenreihen, welche Fehler enthalten. Dies tritt bei der Logarithmierung auf, wenn die Anzahl der Spikes in einer Filmwiederholung exakt 0 war. Da $\log_{10}(0)$ nicht lösbar ist, wurden diese Werte nicht berücksichtigt. Um eine direkte Vergleichbarkeit der logarithmierten Daten mit den nicht logarithmierten zu erhalten, wurden diese Datenreihen auch für die nicht logarithmierten Daten entfernt.

3.1.5 ANOVA

Die Grafiken der ANOVA (Varianzanalyse) enthalten einen Mittelwertsbereich, dargestellt in einer grünen Diamantform (durch JMP generiert). Beschriftungen der X-Achse in schwarzer, dicker Schrift stellen die Kontrollgruppe des Tests nach Dunnett dar. Rote Beschriftungen unterscheiden sich nicht signifikant vom Kontrollwert. Schwarze kursive Beschriftungen unterscheiden sich signifikant von diesem. Die schwarzen Punkte dieser Grafiken repräsentieren die Anzahl der während einer Filmwiederholung gemessenen Spikes.

3.1.6 Gruppierung der Versuchsbedingungen

Sind mehrere Versuchsbedingungen mit identischem Vorzeichen der Defokussierung vorhanden, so werden diese ergänzend in Gruppen zusammengefasst.

Nachfolgend sind die möglichen Gruppen aufgelistet

- Null (kein Defokus)
- Negativ (negativer Defokus)
- Positiv (positiver Defokus)
- Kontrast (Kontrastreduktion)

Obwohl Gruppe Null nur die Werte der 0D Versuchsbedingung beinhaltet, wird sie verwendet. Dies dient der eindeutigen Zuordnung der Vergleiche zu den jeweiligen Auswertungen.

Diese Auswertung findet neben der Auswertung der Spikeraten bei einzelnen Versuchsbedingungen statt und wird als Faktor zur Selektierung der Zellen verwendet.

3.1.7 Einteilung selektierter Zellen in Klassen

Es ist wichtig zu verstehen, dass hier eine Selektion von Zellen stattfindet.

Selektierung

Die Selektion findet statt, da die Retina eine Vielzahl verschiedenster Ganglienzellen beinhaltet, welche jeweils für unterschiedliche Reize empfänglich sind. Es muss also versucht werden, die hier relevanten Zellen von jenen zu trennen, welche keinen für diese Arbeit interessanten Stimulus bevorzugen.

Sie basiert auf den Unterschieden der logarithmierten Spikeraten der untersuchten Zellen. Ist also die Spikerate einer Zelle bei einer Versuchsbedingung signifikant unterschiedlich gegenüber den anderen Versuchsbedingungen, so kann diese Zelle selektiert werden und wird in die entsprechende Klasse von selektierten Zellen einsortiert.

Die möglichen Klassen sind nachfolgend aufgelistet, wobei nicht jede Klasse in jedem Experiment vorkommt.

- Klasse F – Film ist im Fokus
- Klasse N – Film ist Negativ defokussiert
- Klasse P – Film ist Positiv defokussiert
- Klasse K – Film ist Kontrastreduziert

Diese Selektierung ignoriert die Richtung der ermittelten Signifikanz. Es werden also Zellen sowohl mit höherer als auch mit niedrigerer Spikerate gegenüber dem Vergleichswert in die entsprechende Klasse einsortiert. Dies sorgt bei ausreichend hoher Anzahl an Zellen dafür, dass Scheinsignifikanzen sehr unwahrscheinlich sind.

Jede dieser selektierten Zellen beinhaltet selbstverständlich noch die Spikeraten zu allen untersuchten Versuchsbedingungen. Somit ist es also möglich das Verhalten der Zellen

innerhalb dieser Klasse bei verschiedenen, auch gruppierten, Versuchsbedingungen zu untersuchen.

3.2 Ableitungen an Hühnerretinae

Aufgrund der bereits erwähnten Probleme der Messung bei Mäuseretinae liegen für Hühnerretinae wesentlich mehr und bessere Daten vor. Die Ergebnisse sind nicht direkt vergleichbar, da durch die gesammelten Erfahrungen während der Experimente mit Mäusenetzhäuten der Ablauf der Experimente und deren Präzision erheblich verbessert werden konnte.

Alle Experimente wurden bei Gewebstemperaturen deutlich unter jener der lebenden Tiere durchgeführt. Die Zellen sind damit zwar weniger aktiv, zeigen aber auch stabilere Antworten über längere Zeiträume. 32°C haben sich als sehr guter Kompromiss zwischen Langlebigkeit der Retinae und annehmbarer Spikerate herausgestellt.

3.2.1 Vergleich der Reizantworten bei negativem Defokus und ohne Defokus

Der Vergleich der Antworten auf die Stimulation mit um -2D sowie -4D defokussiertem Reiz mit dem nicht defokussierten Reiz zeigt die Grenzen der Genauigkeit des Setups auf. Bei einer Stimulation mit dem um -2D defokussierten Reiz ist keine signifikante Veränderung der Zellantworten gegenüber dem Reiz im Fokus feststellbar. Dagegen bewirkt Defokussierung um -4D einen schwach signifikanten Unterschied in den Antworten.

Diese Vergleiche belegen die Funktionsfähigkeit des Messaufbaus sowie der Datenanalyse.

3.2.1.1 Direktvergleich der -2D und 0D Reizantworten

Dieser Versuch wurde an drei Retinae von Hühnern durchgeführt. Insgesamt wurden die Reizantworten von 68 Zellen aufgezeichnet und ausgewertet. 8160 einzelne Werte liegen hier vor.

Selektionskriterien

Da nur zwei verschiedene Versuchsbedingungen verglichen werden, sind die hier verwendeten Selektionskriterien einfach gehalten. Es wurden alle Zellen in die Analyse eingeschlossen, deren Antworten in der Varianzanalyse einen signifikanten ($p < 0,05$) Unterschied bei der Reizung mit -2D und 0D Defokussierung zeigten.

Gemessene Daten

Die Verteilung der Rohdaten zeigte einen negativ exponentiellen Kurvenverlauf (Abbildung 46). Es war ein starker Anstieg der Häufigkeiten bei sehr geringen Spikezahlen zu beobachten. Sind die Daten logarithmiert, so wird eine annähernde Normalverteilung erreicht (Abbildung 47). Diese Verteilung kann niemals einer idealen Normalverteilung entsprechen, da im Grunde liegenden biologischen Vorgang sowohl Maximalwerte (entsprechend der maximalen Spikeraten von Ganglienzellen) als auch ein Minimalwert (0, der Zehnerlogarithmus von 1) existieren.

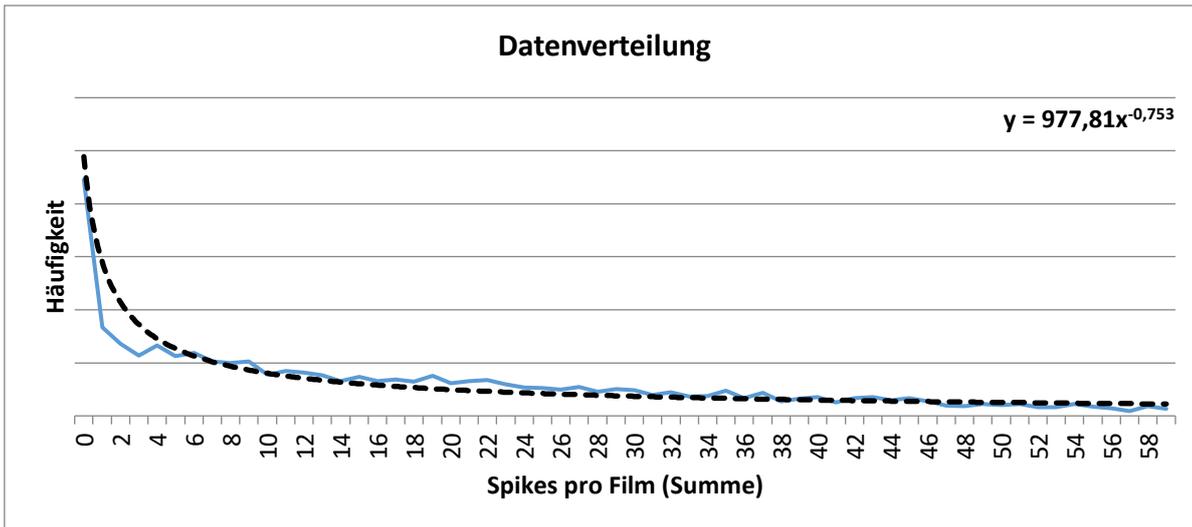


Abbildung 46: Verteilung der Spikeraten, welche in Experiment 3.2.1.1 abgeleitet wurden. Sehr niedrige Spikezahlen pro Film treten am häufigsten im Datensatz auf. Spikeraten über 100 pro Film sind sehr selten.

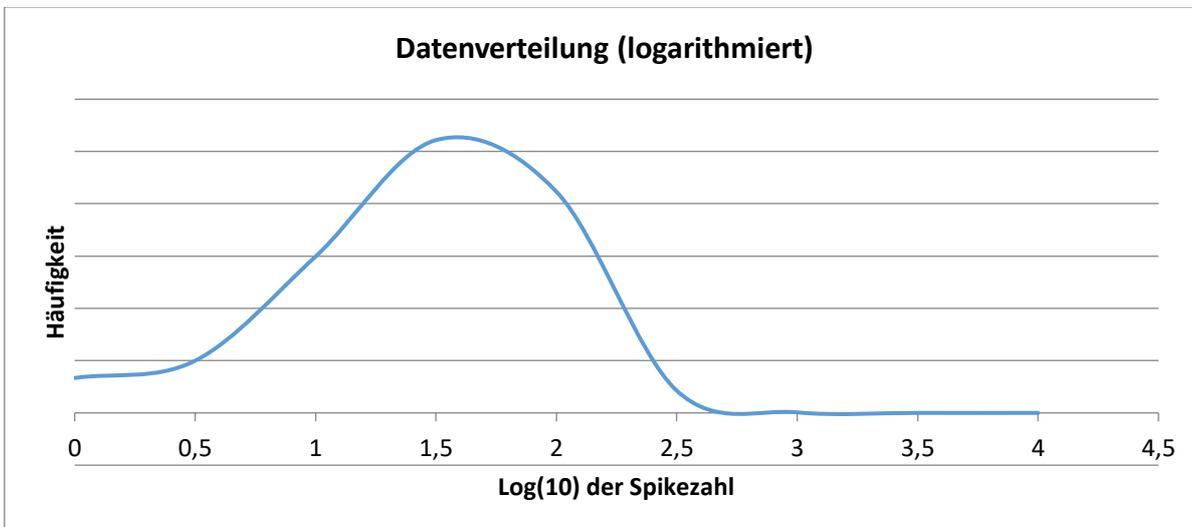


Abbildung 47: Logarithmus der Verteilung aus Abbildung 46. Die Kurve zeigt eine Annäherung an die Normalverteilung

Die Gesamtdauer der Messungen dieses Experimentes lag bei 3600 Sekunden. Die Pausenzeiten von 600 Sekunden (30s nach jedem Block, siehe Kapitel 2 Methoden) wurden zur Neueinstellung der Defokussierung sowie der Rekalibrierung der Adaptation der Zellen auf räumliche, chromatische und bewegte Reize des Stimulus verwendet.

Über diese Dauer hinweg ist eine Reduktion der Aktivität um 44,3% zu beobachten. Da diese Reduktion jedoch beide Versuchsbedingungen betrifft und diese alternierend präsentiert wurden, hat der generelle Aktivitätsabfall beim Vergleich beider Bedingungen keinen Einfluss. Eine Adaptation an den Film als Ursache der beobachteten Reduktion scheint unwahrscheinlich zu sein, da in keinem der folgenden Experimente eine signifikante Veränderung der Aktivität feststellbar war.

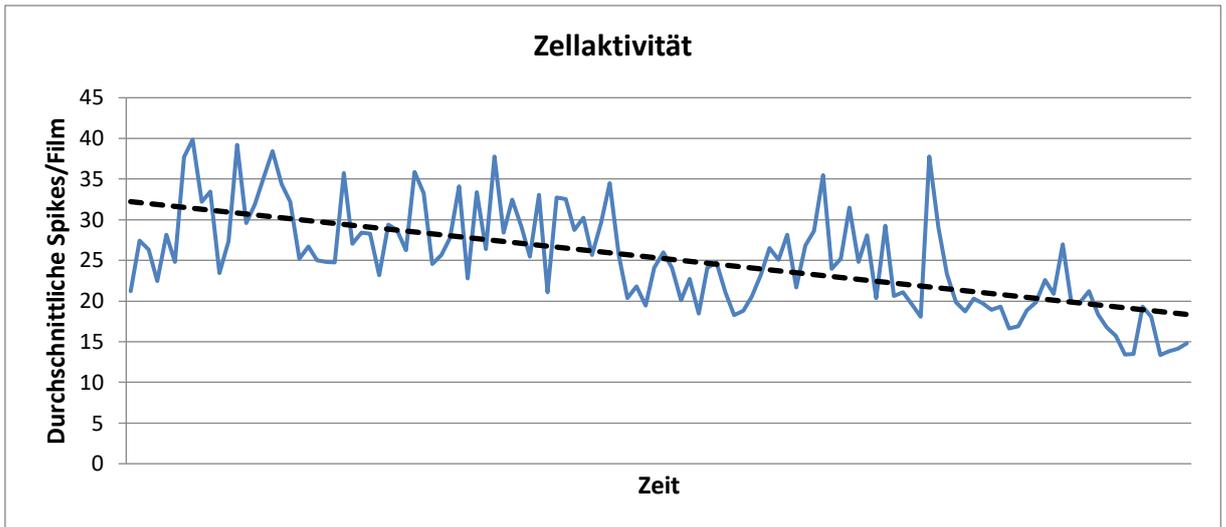


Abbildung 48: Die Aktivität der Zellen, gemessen in Spikes pro Zeiteinheit (Filmwiederholung), zeigt im Verlauf des Experimentes eine Abnahme von 44,3%. Aufgrund des zeitlichen Ablaufes, der häufigen Wiederholungen der einzelnen Reize und der weiterhin ausreichenden Aktivität, ist dies nicht von Bedeutung für die Auswertung.

Die ermittelten Spikezahlen der Zellen für jede Filmwiederholung und für beide Versuchsbedingungen zeigen eine hohe, signifikante ($p < 0,01$) Korrelation miteinander. Es zeigt sich, dass Zellen mit hoher Aktivität diese bei allen Defokussierungen beibehalten. Eventuelle Unterschiede in den Antworten einer Zelle lassen sich immer nur in Relation zum individuellen Aktivitätslevel erkennen.

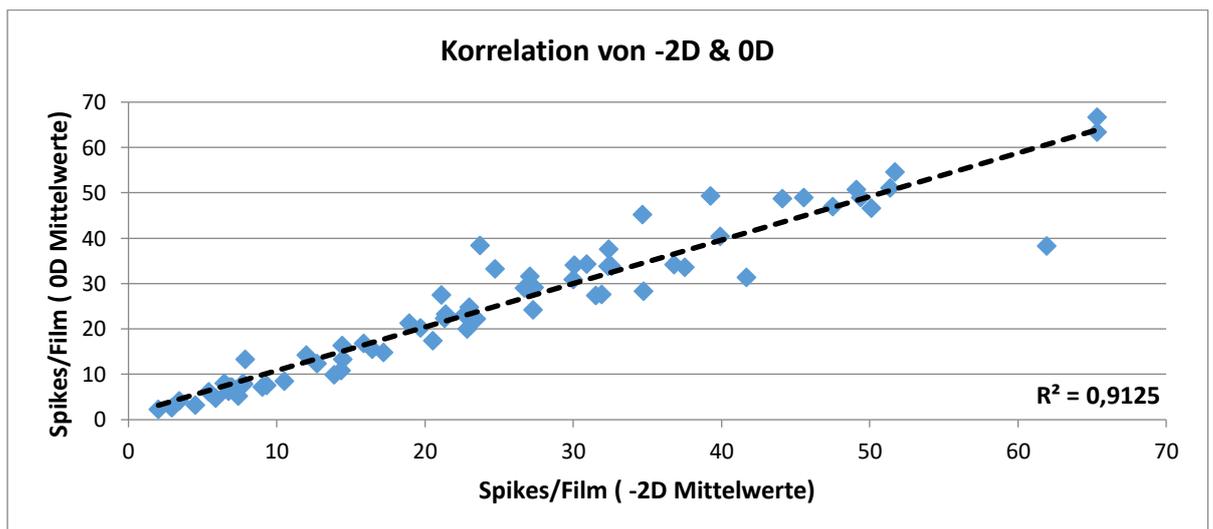


Abbildung 49: Streudiagramm der einzelnen Zellantworten entsprechend der Versuchsbedingungen. Die Werte zeigen eine hoch signifikante Korrelation ($p < 0,01$) miteinander. Jeder Punkt im Diagramm entspricht der über alle Filmwiederholungen gemittelten Anzahl an Spikes einer Zelle, wobei auf der X-Achse die -2D und auf der Y-Achse die 0D Werte aufgetragen sind.

Insgesamt lagen hier 8160 einzelne Messwerte vor. Diese Werte wurden für die jeweiligen Zellen und Versuchsbedingungen gemittelt. Das nachfolgende Diagramm (Abbildung 50) beinhaltet also diese gemittelten Werte mit je einem Wert für jede Versuchsbedingung pro Zelle. Werden so die Reizantworten verglichen, so besteht kein signifikanter ($p=0,49$) Unterschied zwischen den Antworten auf die verwendeten Bedingungen. Zu beachten ist die vergleichsweise hohe Standardabweichung, welche jedoch darin begründet liegt, dass hier keinerlei Vorselektion stattfand und somit Zellen mit hoher, als auch jene mit niedriger Spontanaktivität in der Statistik beinhaltet sind.

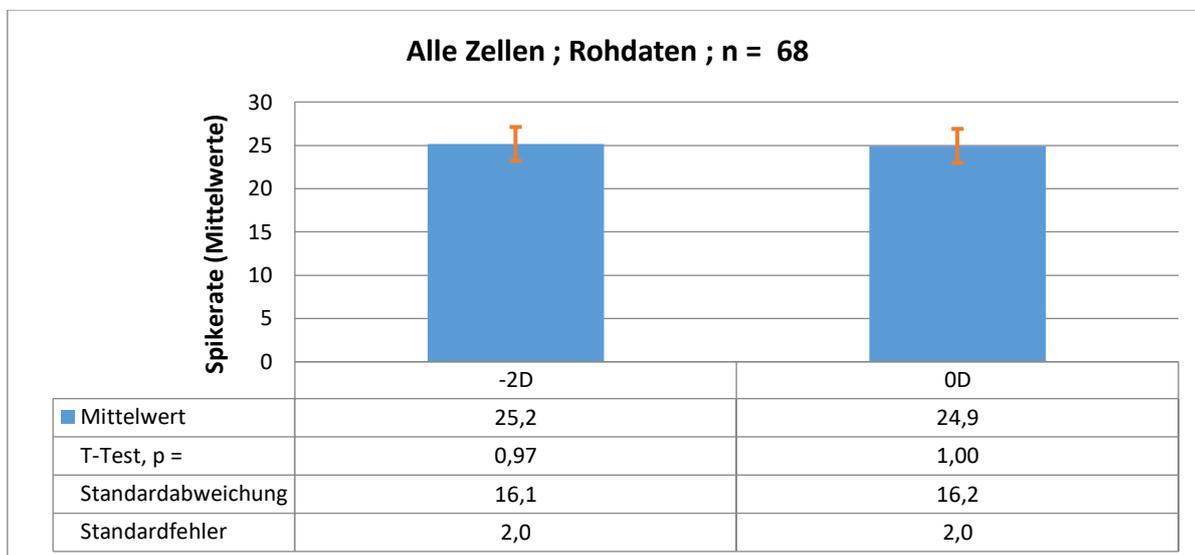


Abbildung 50: Balkendiagramm der Zellantworten auf die Reizung mit dem Film im Fokus (0D) und defokussiert (-2D). Es besteht kein signifikanter Unterschied ($p=0,97$, t-Test, beidseitig, gleiche Varianz) zwischen beiden Klassen. Die große Standardabweichung folgt aus den unterschiedlichen Spontanaktivitäten der Ganglienzellen.

Die in JMP ermittelten Signifikanzen zeigen keinen Unterschied zwischen den Antworten auf beide Reize, weder bei der Betrachtung aller Zellen, noch bei den selektierten Zellen. Insgesamt erfüllten 6 Zellen (8,8%) die Selektionskriterien.

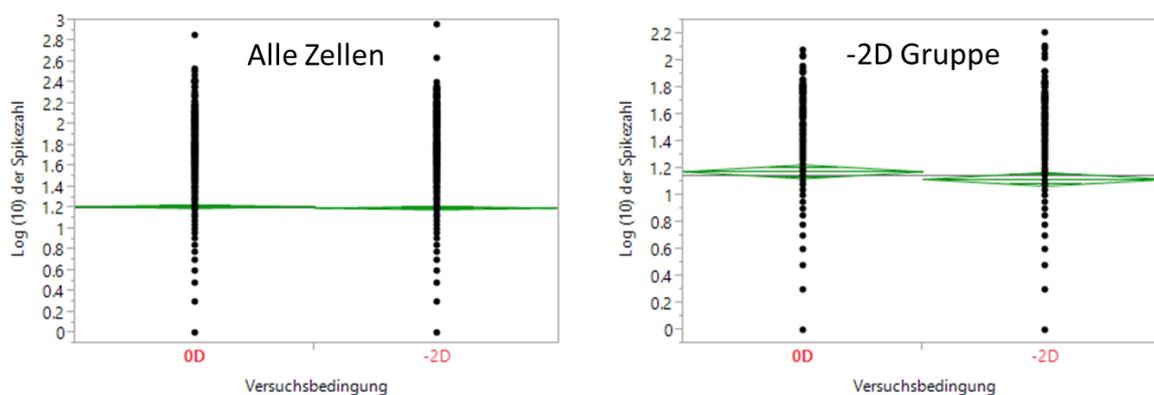


Abbildung 51: Aus dem Programm JMP übernommene Darstellung der Reizantworten der Zellen bei den Versuchsbedingungen. Links sind die Antworten aller Zellen dargestellt (entspricht Abbildung 50 im Zehnerlogarithmus). Rechts wurden nur jene Zellen selektiert, welche einen signifikanten Unterschied in den Antworten bei den Versuchsbedingungen aufwiesen ($n=6$). In beiden Fällen zeigen die Mittelwerte keine signifikanten Unterschiede auf.

Betrachtet man die einzelnen Zellen, so zeigen zwei der sechs selektierten Zellen einen Anstieg in der Spikerate bei Defokussierung. Vier zeigen dagegen eine Abnahme (Abbildung 52). Da die Selektion das Vorzeichen einer Änderung ignoriert, entsteht somit eine Klasse von Zellen, welche in ihrer Summe keinen Unterschied zeigen (Abbildung 51).

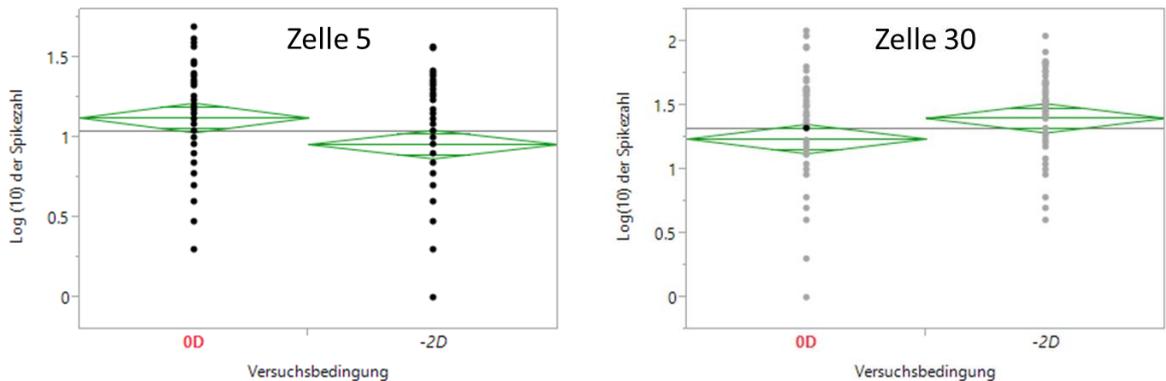


Abbildung 52: Antwortverhalten zweier Zellen als Beispiel. Zelle 5 zeigt eine Abnahme, Zelle 30 einen Anstieg der Spikerate bei Defokussierung.

Zufallsgenerierte Kontrolldaten

Wie zu erwarten war, unterlag die Aktivität der zufallsgenerierten Zellen keiner Reduktion über die Zeit (Abbildung 53). Es lagen lediglich starke Schwankungen um einen konstanten Mittelwert vor.

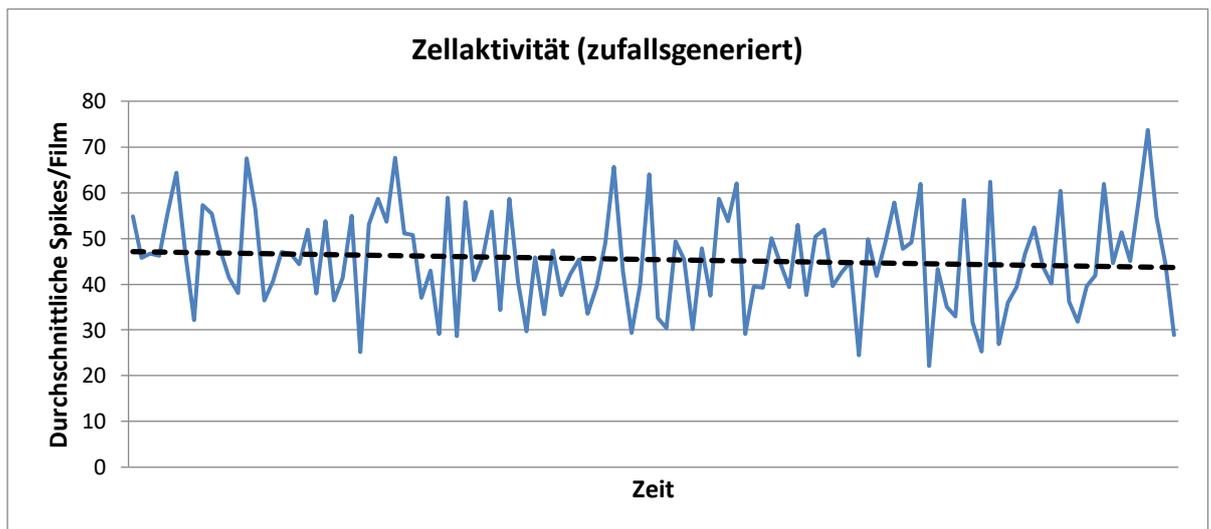


Abbildung 53: „Aktivität“ der künstlich generierten Zellen in Versuch 3.2.1.1. Wie zu erwarten ist hier eine starke Abweichung der Werte untereinander, aber keine nennenswerte Tendenz der Trendlinie zu erkennen.

Erwartungsgemäß fehlt eine Korrelation der zufallsgenerierten Daten miteinander (Abbildung 54) und der R^2 Wert ist um mehrere Größenordnungen niedriger als jener des entsprechenden Vergleichs bei den gemessenen Daten (Abbildung 49).

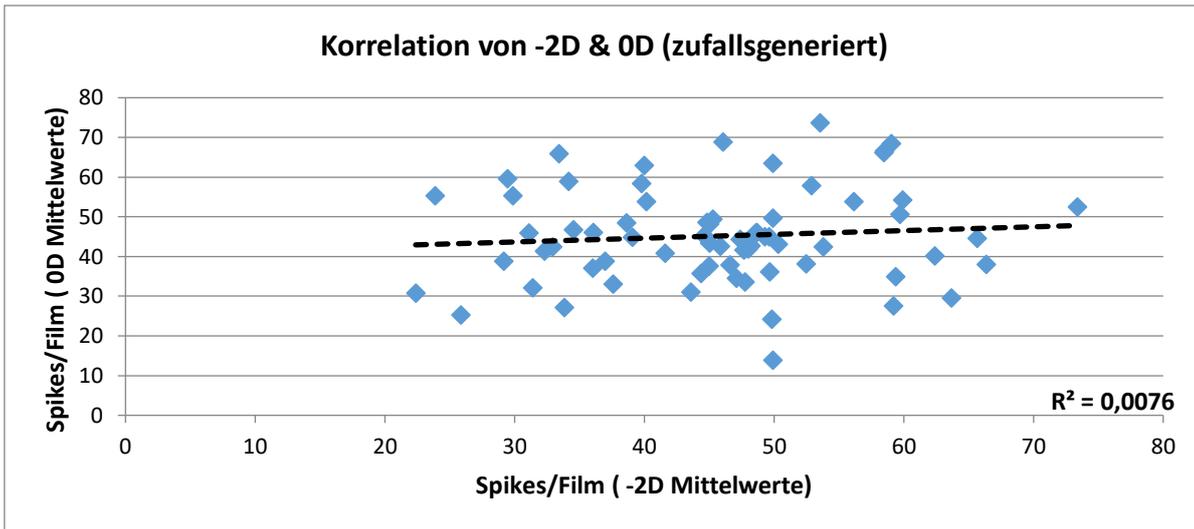


Abbildung 54: Streudiagramm der zufallsgenerierten Antworten. Wie erwartet und entgegen des Resultats bei realen Zellen (Abbildung 49) besteht keinerlei Zusammenhang zwischen den einzelnen Werten.

Bei zufällig generierten Daten besteht die Wahrscheinlichkeit, dass durch viele Wiederholungen einzelne Zellantworten zufällig dem Selektionskriterium entsprechen können. In einem Vergleich von nur zwei Werten ist davon auszugehen, dass einzelne Zellen durchaus den Selektionskriterien entsprechen können.

In diesem Datensatz erfüllen drei Zellen die Selektionskriterien für die Einsortierung in die Klasse der für die Versuchsbedingung kodierenden Zellen. Das entspricht 50% dessen in den realen Daten (n=6). Weder die Auswertung aller zufällig generierten Zellen noch der Klasse der selektierten Zellen ergibt eine Signifikanz (Abbildung 55). In der exemplarischen Darstellung zweier dieser künstlich generierten Zellen (Abbildung 56) ist kein Unterschied zu den realen Daten feststellbar.

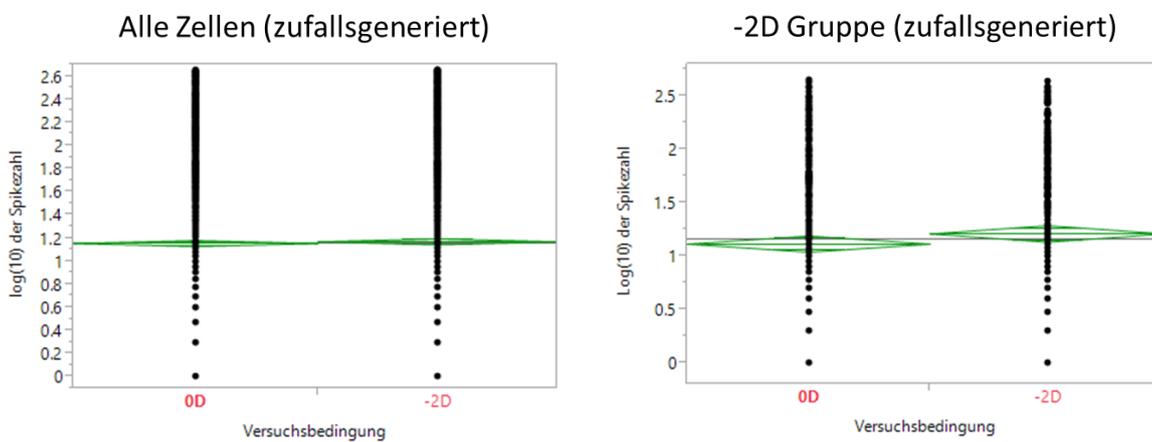


Abbildung 55: JMP Grafiken der zufallsgenerierten Zellantworten. Auch hier ist keinerlei Signifikanz zu beobachten, auch wenn eine leichte Entfernung der Mittelwerte voneinander vorliegt. Dies ist jedoch vergleichbar mit dem Antwortverhalten der realen Zellen (Abbildung 51).

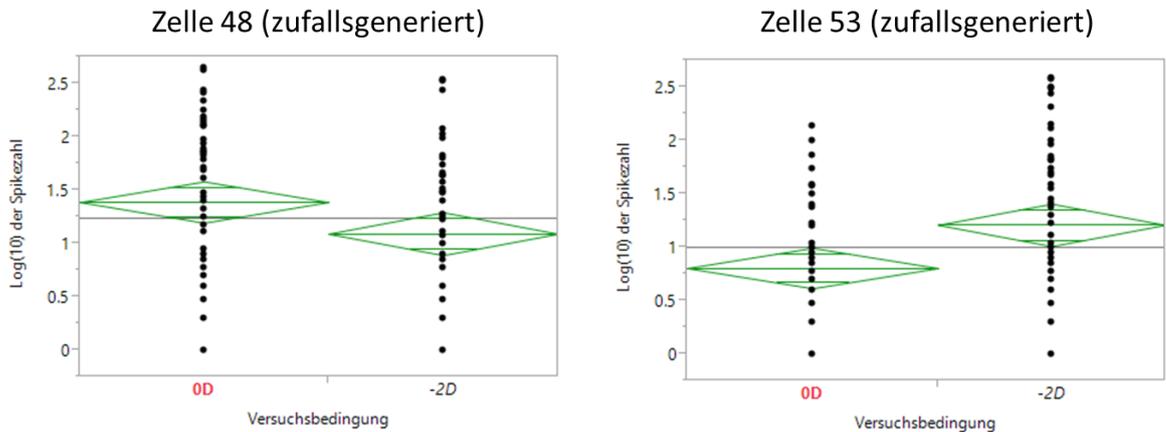


Abbildung 56: Daten zweier zufallsgenerierter Zellen, welche der in diesem Versuch verwendeten Selektion entsprechen. In dieser Einzelbetrachtung sind sie nicht von den Zellantworten aus Abbildung 51 zu unterscheiden.

3.2.1.2 Direktvergleich der -4D und 0D Reizantworten

Fünf Retinae von Hühnern wurden in diesem Experiment verwendet. Insgesamt wurden die Antworten von 113 Zellen aufgezeichnet. Insgesamt wurden 13560 Spikezahlen für einzelne Filmwiederholungen aufgezeichnet.

Selektionskriterien

Zur Selektion der Zellen wurde wie in Experiment 3.2.1.1 eine einfache Signifikanz der Unterschiede in den Reizantworten bei beiden Bedingungen in der Varianzanalyse vorausgesetzt ($p < 0,05$).

Gemessene Daten

Der Kurvenverlauf in Abbildung 57 entspricht in etwa jenem des vorhergehenden Experimentes in Abbildung 46 und entspricht damit der Erwartungshaltung. Die logarithmierten Daten sind annähernd normalverteilt mit entsprechendem Kurvenverlauf (Abbildung 58).

Die Aktivität der Zellen war in diesem Experiment über den gesamten Versuchszeitraum von 3600 Sekunden (zuzüglich 600 Sekunden Pausenzeiten) nahezu konstant und zeigt einen leichten, wenn auch nicht signifikanten Anstieg. Weiterhin unterliegt sie den zuvor schon beobachteten Schwankungen (Abbildung 59).

Aus Abbildung 60 wird eine hohe und signifikante Korrelation ($p < 0,01$) ersichtlich. Die Daten liegen, wie schon bei Experiment 3.2.1.1 (Abbildung 49) sehr nahe an der Winkelhalbierenden.

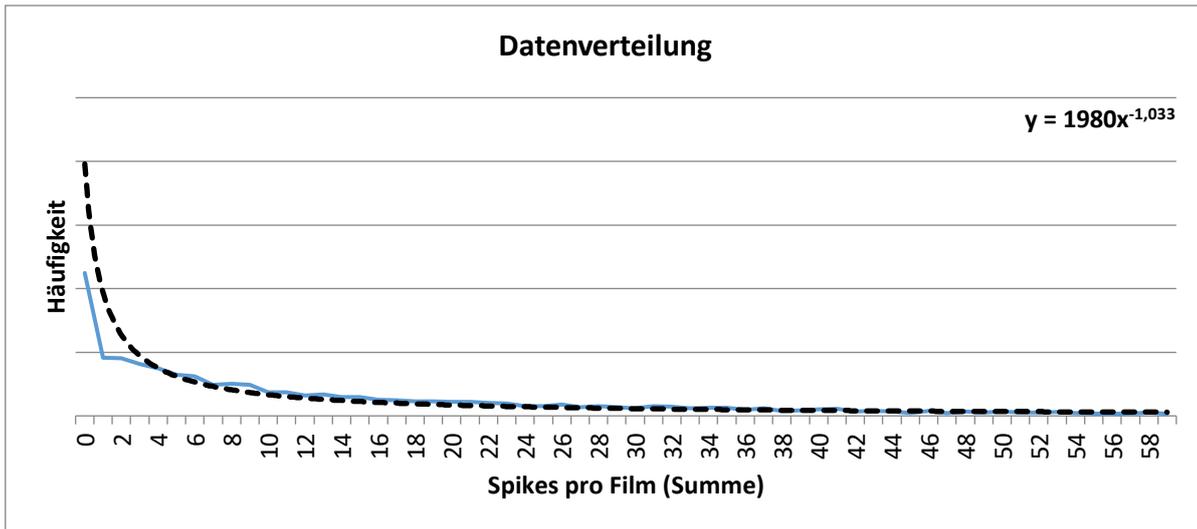


Abbildung 57: Verteilungskurve der Rohdaten von Experiment 3.2.1.2. Die Kurve zeigt in etwa die bereits bekannte Verteilung (Abbildung 46).

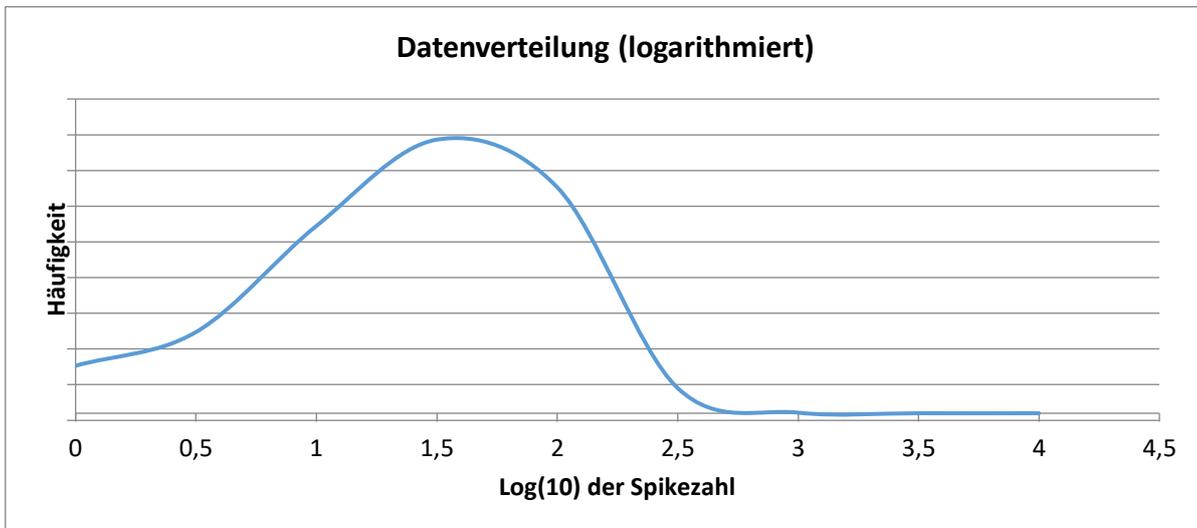


Abbildung 58: Logarithmierte Darstellung der Rohdaten aus Abbildung 57. Es liegt annähernd eine Normalverteilung vor, vergleichbar jener in Abbildung 47.



Abbildung 59: Aktivitätsverlauf der Zellen während des Versuchszeitraums. Die Aktivität der Zellen bleibt über die gesamte Dauer konstant ($p=0,18$; gepaarter t-Test zwischen den ersten und den letzten 10 Messungen).

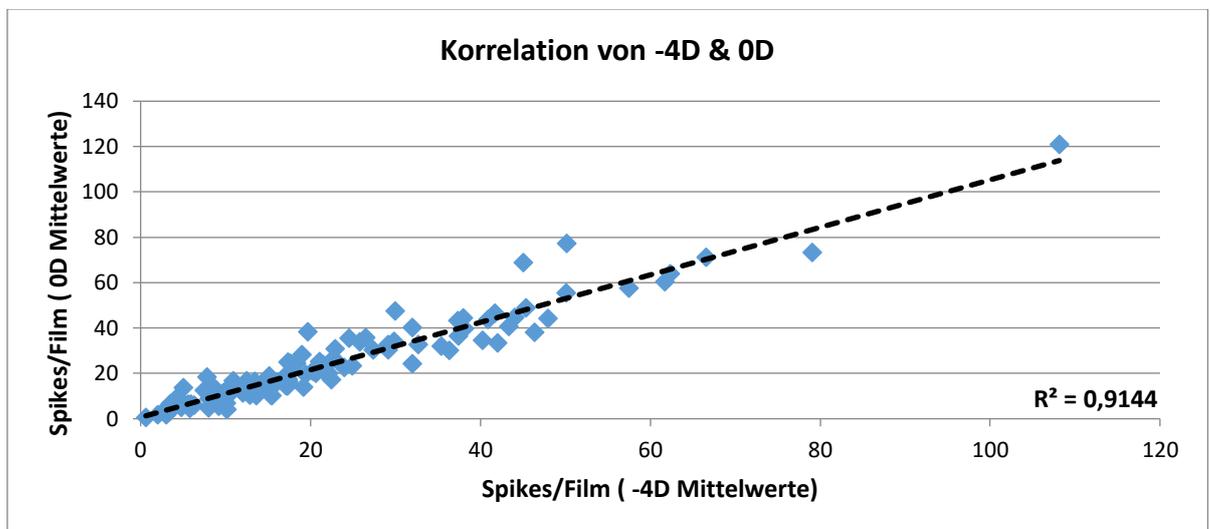


Abbildung 60: Streudiagramm zur Ermittlung der Korrelation zwischen den Werten der Reizantworten. Die Werte sind hoch signifikant ($p<0,01$) korreliert.

Der direkte Vergleich aller Messwerte beider Versuchsbedingungen zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen auf, wenngleich der P-Wert (0,21) sich bereits deutlich von jenem aus dem Vergleich von -2D und 0D Reizantworten ($p=0,49$) unterscheidet.

Die Standardabweichung ist, bedingt durch die Aufzeichnung vieler Zellen mit unterschiedlich hoher Spontanaktivität hoch (Abbildung 61) und liegt über dem Mittelwert der ermittelten Zellantworten. (Standardabweichung 17,6 bzw. 19,3 für -4D und 0D gegenüber dem Mittelwert von 15,4 bzw. 16,9).

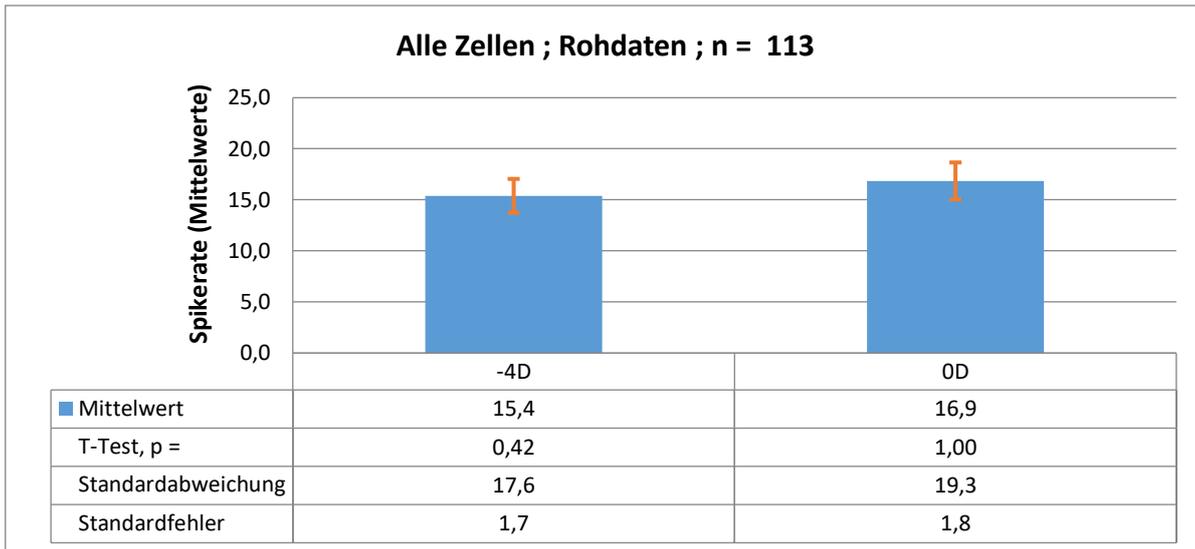


Abbildung 61: Balkendiagramm der Mittelwerte der Spikeraten der einzelnen Zellen. Die Spikeraten der einzelnen Filmwiederholungen wurden für jede Zelle gemittelt und sind in dieser Grafik dargestellt. Es besteht kein Unterschied ($p=0,42$, t-Test, zweiseitig, gleiche Varianz) zwischen den Klassen, auch wenn der p-Wert etwas niedriger ist als jener im -2D/0D Vergleich (siehe Abbildung 50, $p=0,97$).

Insgesamt erfüllten 19 Zellen (16,8% der gemessenen Population) die Selektionskriterien. Dies entspricht einem Anstieg um 91% gegenüber den 8,8% der Zellen, welche im Vergleich der -2D und 0D Antworten (siehe 3.2.1.1) selektiert wurden.

Wie bereits in Abbildung 61 gezeigt, ist im Vergleich aller Zellen kein Unterschied im Antwortverhalten gegenüber beiden Reizbedingungen feststellbar. Bei der Auswertung der selektierten Klasse von Zellen wurde ein signifikanter P-Wert ermittelt ($p=0,037$) und die Spikerate der ausgewerteten Zellen lag bei negativer Defokussierung des Films unterhalb derer ohne Defokussierung.

Auch hier wurden aufgrund der Selektionsmethoden sowohl Zellen mit höherer Spikerate bei Defokussierung ($n=8$, 7,1% der Zellen) selektiert als auch solche mit niedrigerer Spikerate ($n=11$, 9,7% der Zellen). Abbildung 63 zeigt exemplarisch von jeweils einer dieser Zellen die logarithmierte Spikezahl.

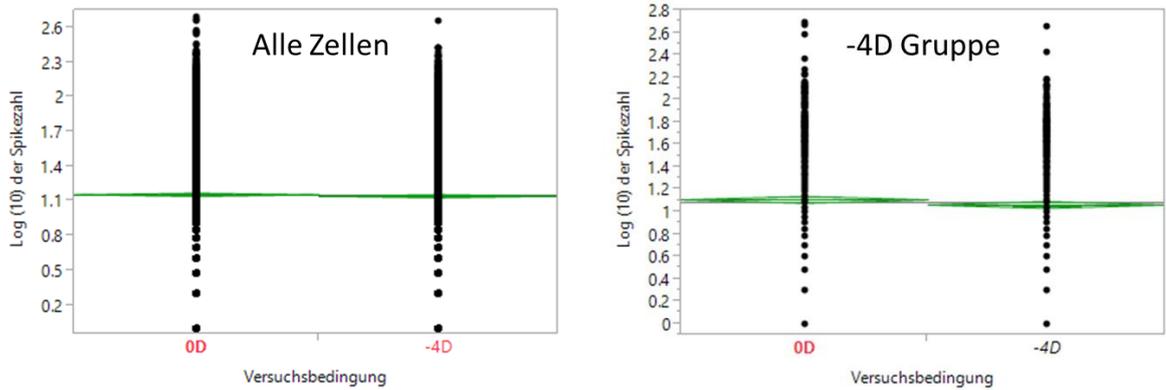


Abbildung 62: Aus dem Programm JMP übernommene Darstellung der Reizantworten der Zellen bei den Versuchsbedingungen. Links sind die Antworten aller Zellen dargestellt (entspricht Abbildung 61 im Zehnerlogarithmus). Rechts wurden nur jene Zellen selektiert, welche einen signifikanten Unterschied zwischen den Antworten beider Versuchsbedingungen aufwiesen (n=19). Entgegen der Resultate in Experiment 3.2.1.1 zeigt hier die Auswertung der selektierten -4D Klasse einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsbedingungen ($p=0,037$, t-Test, zweiseitig, gleiche Varianz).

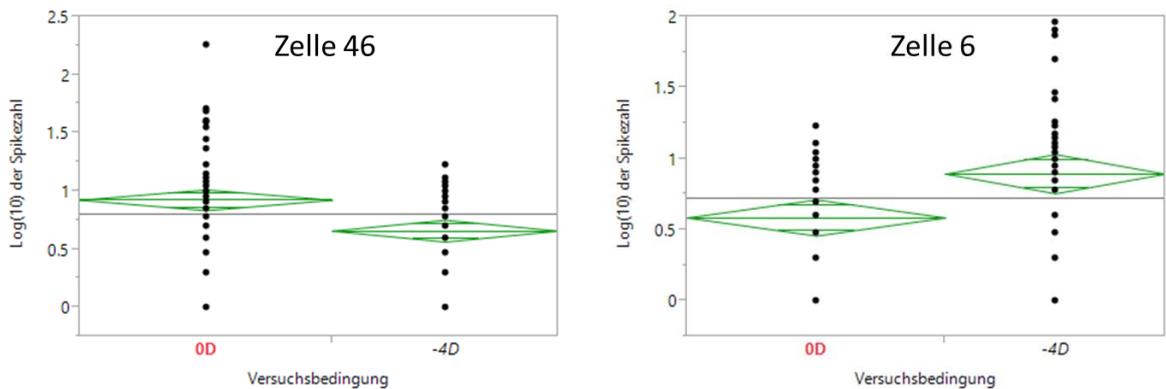


Abbildung 63: Exemplarische Darstellung der Antwortverhalten je einer Zelle mit höherer oder niedrigerer Spikerate bei Defokussierung.

Zufallsgenerierte Kontrolldaten

Erwartungsgemäß blieb die Aktivität zufallsgenerierter Zellen im Mittel konstant und zeigt zufällige Schwankungen (Abbildung 64).

Die zufällig generierten Daten sind nicht korreliert (Abbildung 65), wenngleich einzelne Zellen existieren, welche trotz Zufallsgenerierung als isolierte Einheiten einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden angenommenen Bedingungen aufzeigen (Abbildung 67). Dies entspricht der Erwartung, dass zufallsgenerierte Daten beim vergleichen weniger Werte auch Signifikanzen erzeugen können.

Die Klasse der selektierten Zellen (Abbildung 66) zeigt jedoch im Gegensatz zu jener der realen Daten (Abbildung 62) keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Versuchsbedingungen auf. Insgesamt erfüllten 7 Zellen (6,2%) die Selektionskriterien, wobei 3 (2,7%) eine höhere Antwort und 4 (3,5%) eine niedrigere Antwort bei Defokussierung gegenüber der OD Messung aufweisen. Somit haben insgesamt deutlich weniger zufallsgenerierte als realen Zellen (16,8%) den Selektionskriterien entsprochen.

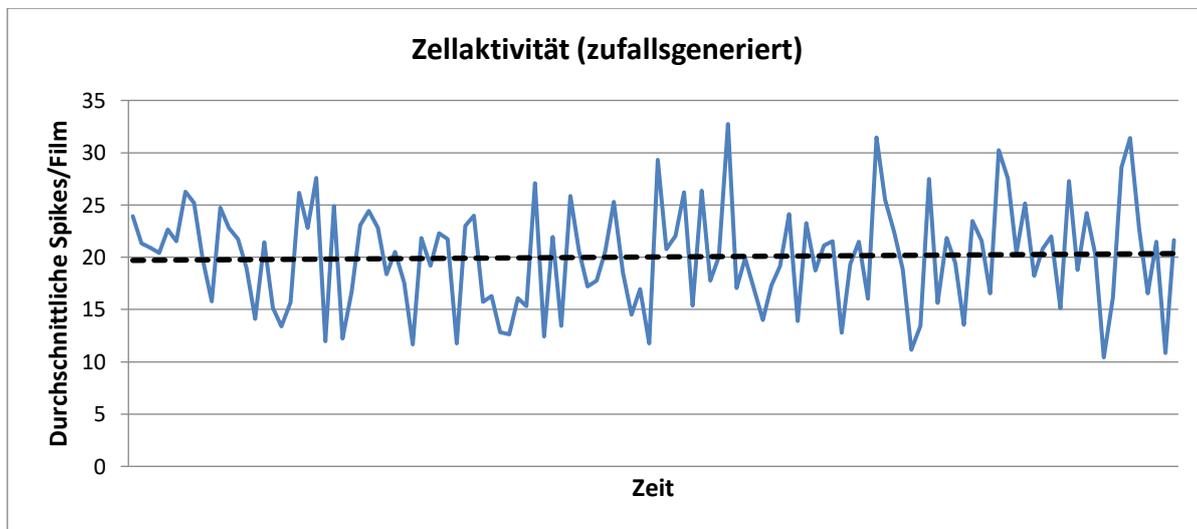


Abbildung 64: Zellaktivität der zufallsgenerierten Zellen. Die Trendlinie ist nahezu parallel zur X-Achse.

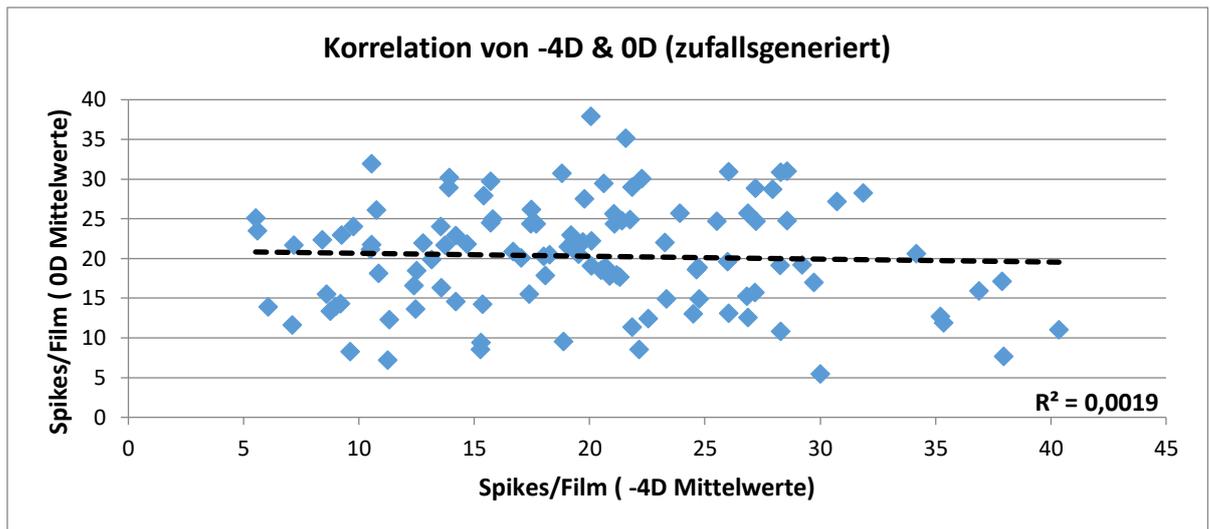


Abbildung 65: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen den zufallsgenerierten Werten.

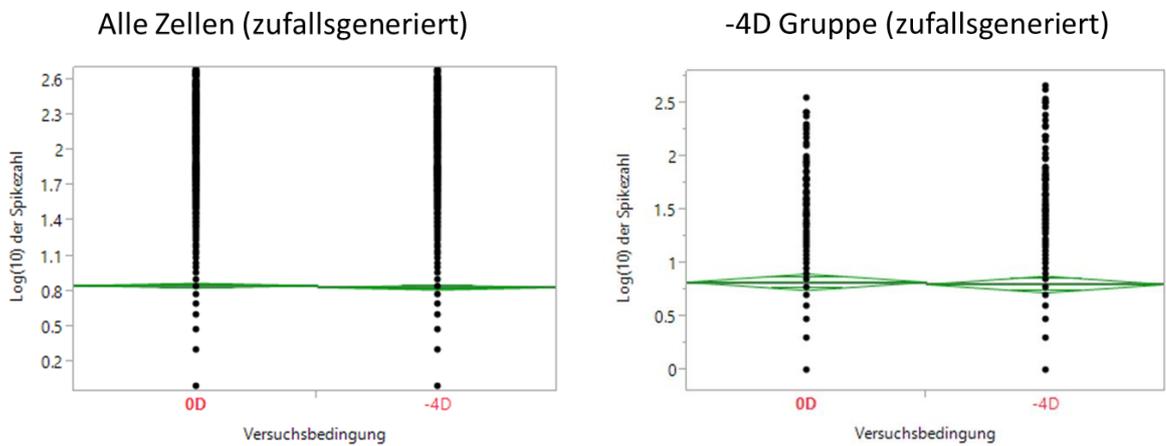


Abbildung 66: Auswertung aller zufallsgenerierten Zellen sowie der Klasse jener Zellen, welche den Selektionskriterien entsprachen. In beiden Fällen liegt keinerlei Signifikanz vor, was somit speziell die Klasse der selektierten Zellen von den selektierten Zellen in den reellen Daten unterscheidet (Abbildung 62).

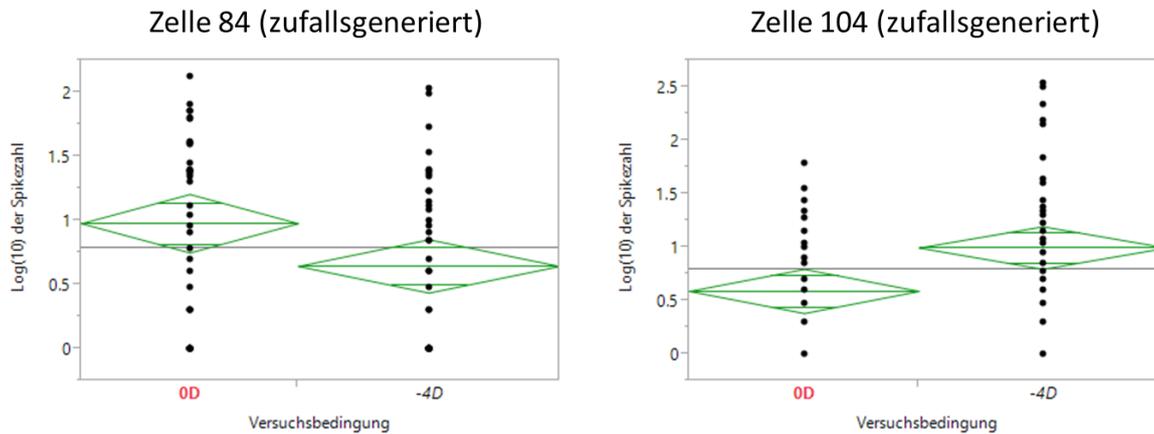


Abbildung 67: Darstellung der Ergebnisse zweier (von 7) zufallsgenerierter Zellen, welche den Selektionskriterien entsprachen.

3.2.2 Stufenweise Defokussierung mit positivem und negativem Vorzeichen

Mit 306 aufgezeichneten Zellen aus 12 Retinae wurde in diesem Versuch die höchste Anzahl an Aufzeichnungen vorgenommen. Kombiniert mit der hohen Anzahl an Filmwiederholungen (126) wurden somit insgesamt 38556 einzelne Spikewerte ermittelt.

Selektionskriterien

Die Zellen wurden entsprechend ihrer Signifikanzen in der Varianzanalyse in die Klassen N, P und F einsortiert. Ausgewählt wurden nur Zellen, welche in der fraglichen Klasse entweder im Vergleich der Versuchsbedingungen oder der zusammengefassten Gruppen einen p-Wert unter 0,001 erreichten. Der andere dieser beiden Werte musste zumindest signifikant sein ($p < 0,05$), wie in Abbildung 43 dargestellt.

Gemessene Daten

Insgesamt erfüllten 68 Zellen (22,2%) die Selektionskriterien. Hiervon entfielen 19 (6,2%) auf die Klasse N, 29 (9,5%) auf die Klasse F und 20 (6,5%) auf die Klasse P.

Die Verteilungen der Spikezahlen waren ähnlich wie in den vorherigen Experimenten, sowohl in der linearen (Abbildung 68), als auch in der logarithmierten Darstellung (Abbildung 69).

Die Aktivität der untersuchten Zellen war über den Versuchszeitraum im Mittel konstant, ähnlich wie in den vorausgegangenen Experimenten (Abbildung 48, Abbildung 59).

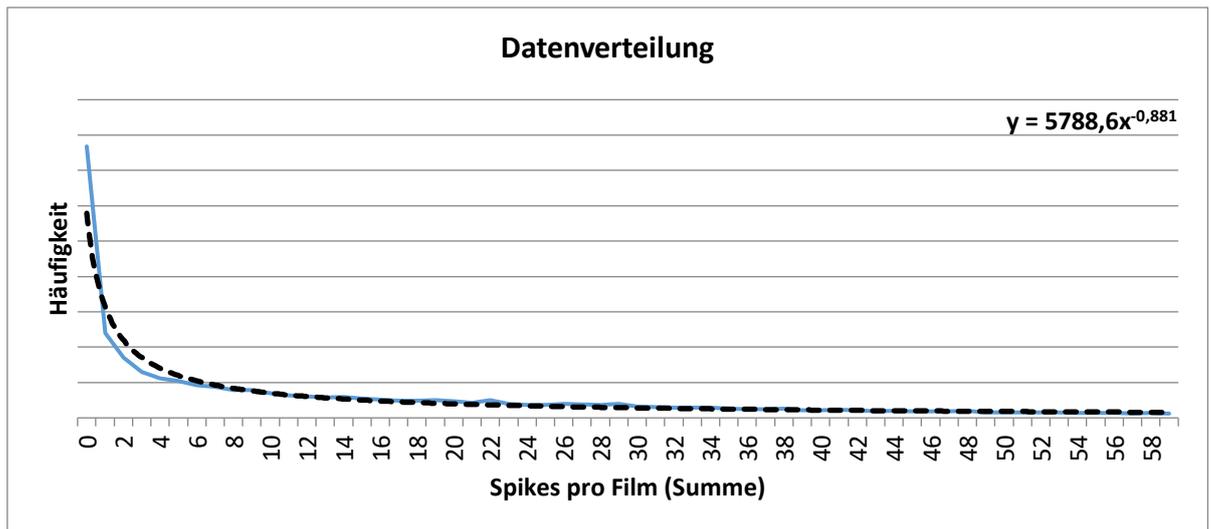


Abbildung 68: Verteilung der Rohdaten. Der Kurvenverlauf ist im Vergleich zu den vorherigen Experimenten, bei denen weniger Daten vorlagen, (Abbildung 46, Abbildung 57) erwartungsgemäß glatter, aber nicht grundsätzlich verschieden.

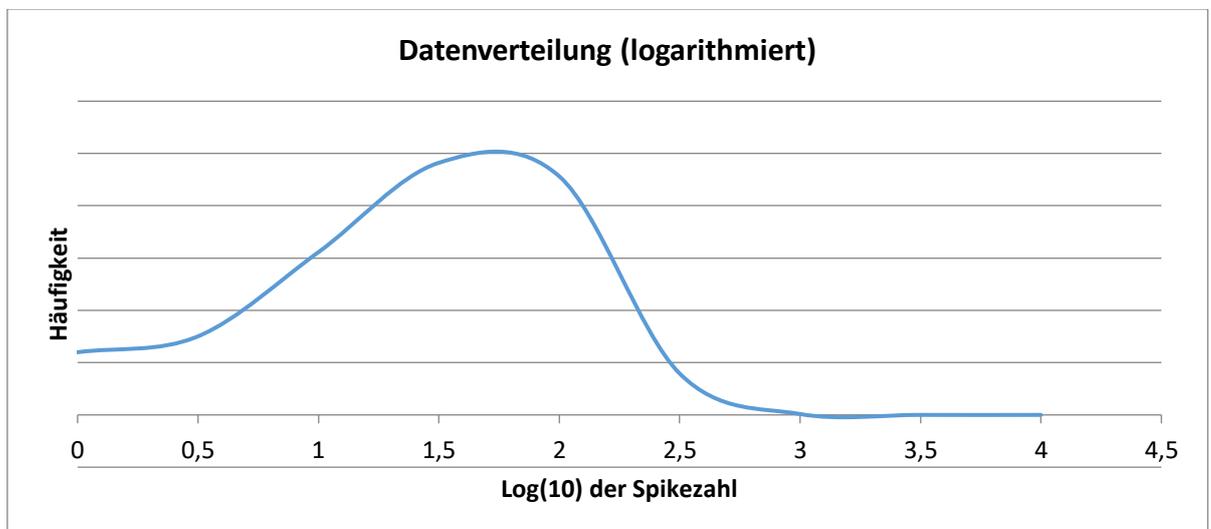


Abbildung 69: Logarithmierte Daten aus Abbildung 68. Wie im vorherigen Experiment war die Verteilung nach Logarithmierung einer Normalverteilung ähnlicher.



Abbildung 70: Aktivitätsdiagramm der Zellpopulation im Versuchszeitraum. Es liegt keine signifikante Veränderung der mittleren Spikeraten im Messzeitraum vor.

Die Korrelation der ermittelten Zellantworten untereinander war allgemein sehr hoch (Tabelle 11). Selbst Paarungen mit den geringsten Korrelationen (Abbildung 72) waren noch hoch signifikant ($p < 0,01$). Ebenso wie in den vorherigen Experimenten, wird die Korrelation nicht durch einzelne Ausreißer verringert.

Auffällig in Tabelle 11 ist die geringe Korrelation der -2D und 0D Messwerte gegenüber den übrigen Messwerten und speziell die besonders hohe Korrelation der -4D gegenüber den -6D Werten sowie der Messwerte nach positiv defokussiertem Reiz untereinander.

Tabelle 11: Tabellarische Übersicht über die Korrelationskoeffizienten. Grün unterlegte Felder zeigen hohe, rot unterlegte Felder niedrigere Korrelationen, relativ zum Mittel aller Werte. Die leeren Felder zeigen Vergleiche gleicher Datensätze, die natürlich eine Korrelation von 1 ergaben.

	-6D	-4D	-2D	0D	+2D	+4D	+6D
-6D		0,93	0,84	0,82	0,89	0,83	0,88
-4D	0,93		0,81	0,84	0,88	0,84	0,88
-2D	0,84	0,81		0,69	0,74	0,64	0,70
0D	0,82	0,84	0,69		0,77	0,77	0,85
+2D	0,89	0,88	0,74	0,77		0,89	0,88
+4D	0,83	0,84	0,64	0,77	0,89		0,90
+6D	0,88	0,88	0,70	0,85	0,88	0,90	

Werden die höchsten sowie die niedrigsten ermittelten Korrelationswerte im Streudiagramm aufgetragen, so ergibt sich das bereits bekannte Bild. Speziell die höchste Korrelation zeigt die Punktwolke sehr nahe an der Trendlinie des Diagramms.

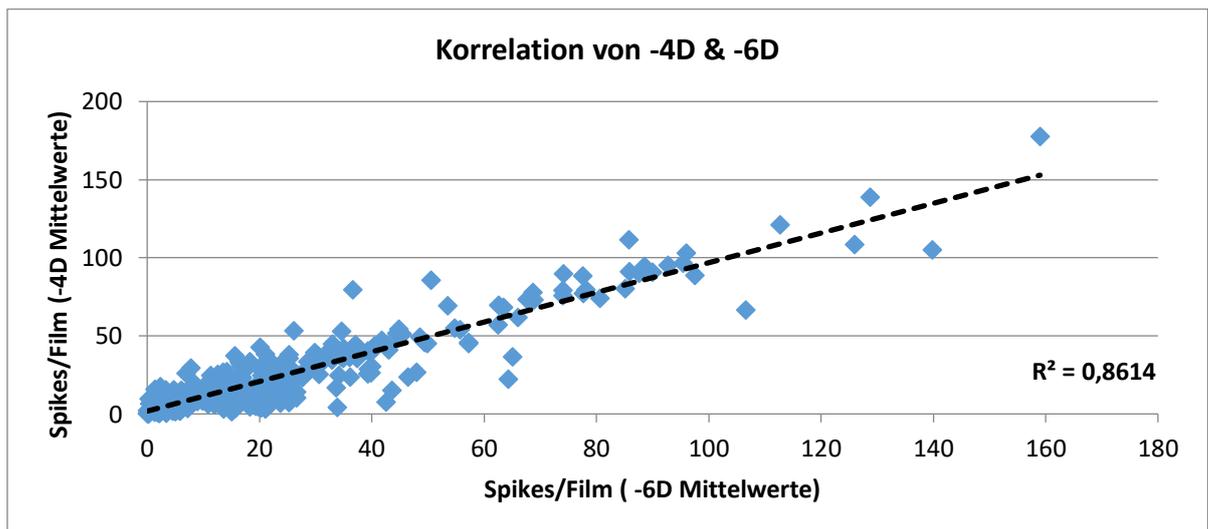


Abbildung 71: Streudiagramm der höchsten Korrelation im Experiment. Die Korrelation ist hoch signifikant ($p < 0,001$).

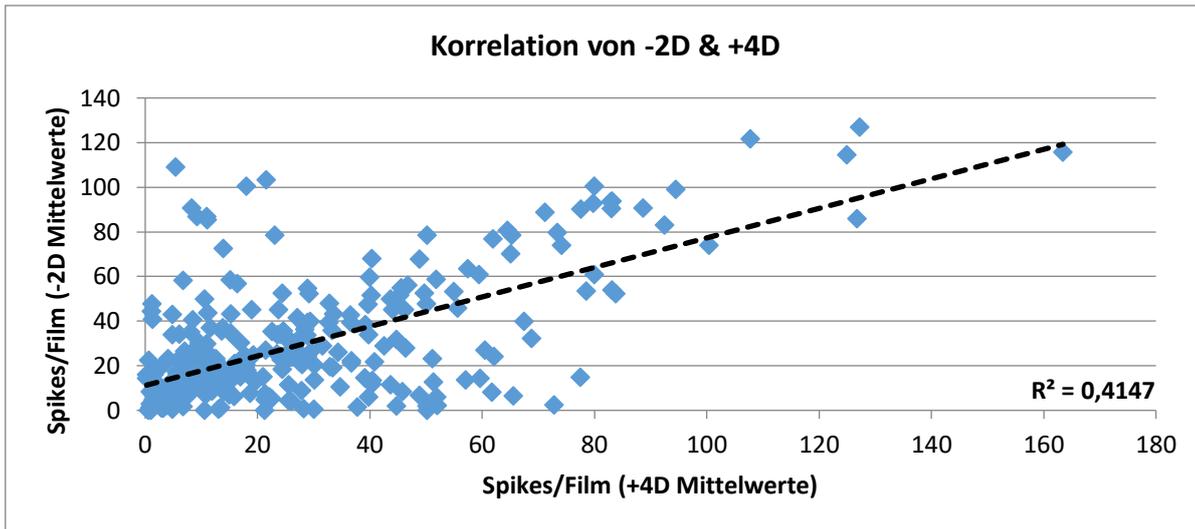


Abbildung 72: Streudiagramm der niedrigsten Korrelation im Experiment. Auch die am geringsten korrelierte Vergleichspaarung war hoch signifikant ($p < 0,001$).

Die Darstellung der gemittelten Spikeraten aller im Versuch aufgezeichneter Zellen (Abbildung 73) zeigt eine signifikante ($p < 0,001$) Erhöhung der Spikeraten bei einer Defokussierung von -2D gegenüber dem nicht defokussierten Reiz bei 0D. Ebenso unterscheidet sich die Spikerate bei einer Defokussierung um -6D signifikant ($p < 0,01$) von jener ohne Defokussierung. Es fällt auf, dass beide Werte mit signifikantem Unterschied zum fokussierten Antwortverhalten bei Defokussierungen mit negativem Vorzeichen auftreten. Diese Signifikanzen blieben natürlich auch nach Logarithmierung sichtbar (Abbildung 74) und signifikant ($p = 0,001$ für -2D, $p < 0,01$ für -6D). Die leichte Veränderung der p-Werte resultiert aus dem Verlust einzelner Datenpunkte durch die Logarithmierung, da $\log_{10}0$ nicht lösbar ist und einen Fehler ausgibt, aber einige Filmwiederholungen bei einzelnen Versuchsbedingungen keine messbaren Spikes hervorriefen.

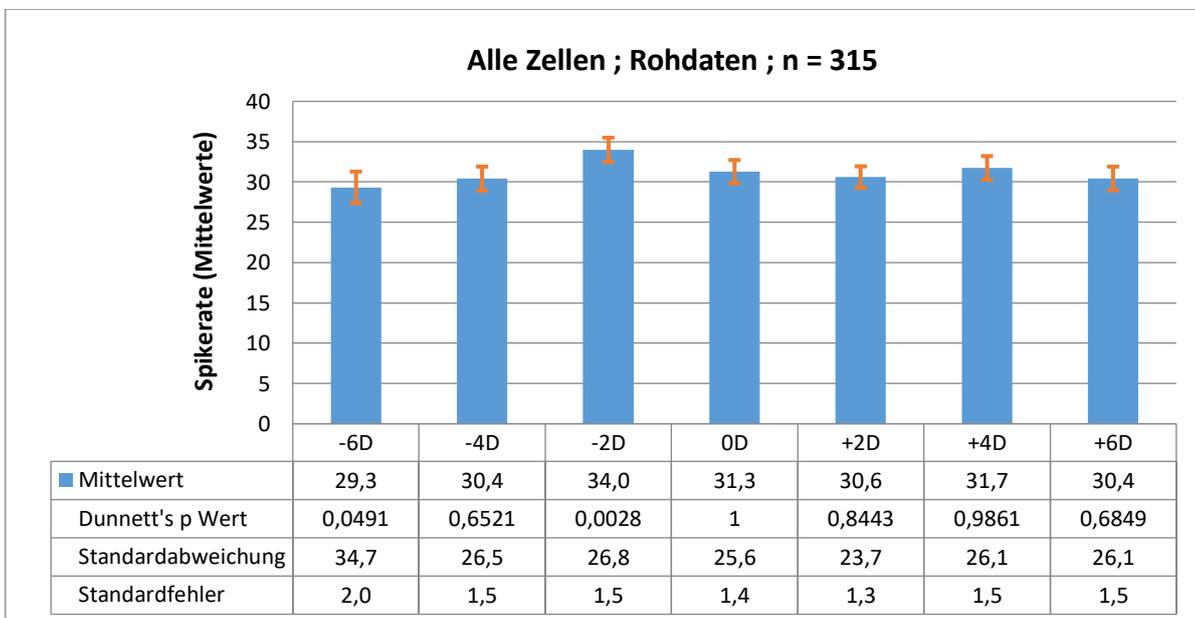


Abbildung 73: Werden die mittleren Spikeraten als Balkendiagramm dargestellt, so sieht man eine signifikant erhöhte Antwort bei einer Defokussierung von -2D ($p < 0,01$) sowie eine signifikant reduzierte Antwort bei -6D ($p < 0,05$). Die Fehlerindikatoren stellen den Standardfehler dar.

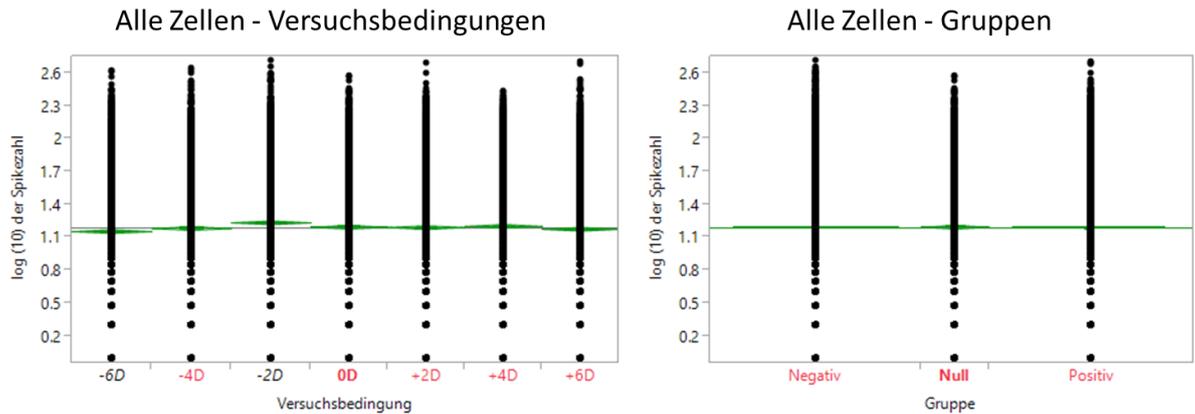


Abbildung 74: Darstellung der logarithmierten Spikeraten aus Experiment 3.2.2. Links sind die Antworten aller Zellen bei allen Versuchsbedingungen aufgezeigt, rechts wurden die jeweils drei verschiedenen Versuchsbedingungen der negativen sowie der positiven Defokussierung zusammengefasst. Gegenüber der vergleichbaren Darstellung anhand der Spikeraten (Abbildung 73) unterscheiden sich hier die -2D ($p < 0,001$) und -6D ($p = 0,001$) Reizantworten signifikant von jenen ohne Defokussierung. In der Darstellung der Gruppen (rechts) ist dies durch die Bildung des Mittelwertes nicht sichtbar.

Betrachtet man die selektierten Zellen, welche für keinen (Abbildung 75), negativen (Abbildung 76) oder positiven (Abbildung 77) Defokus als kodierend ausgewählt wurden, treten einige deutliche Unterschiede auf.

Jene Zellen, welche für die Klasse F selektiert wurden ($n=29$), weisen klare Signifikanzen von 0D zu allen Versuchsbedingungen sowie gegenüber den zusammengefassten Defokus-Gruppen auf, obwohl die Selektierung so ausgelegt ist, dass die Richtung der bewerteten Signifikanz nicht beachtet wird. Es liegt also in der Population der Zellen eine klare Tendenz vor. Die 0D Reizantworten sind deutlich niedriger als jene der defokussierten Versuchsbedingungen und Gruppen. Es besteht hier kein Unterschied im Antwortverhalten zwischen positivem und negativem Defokus.

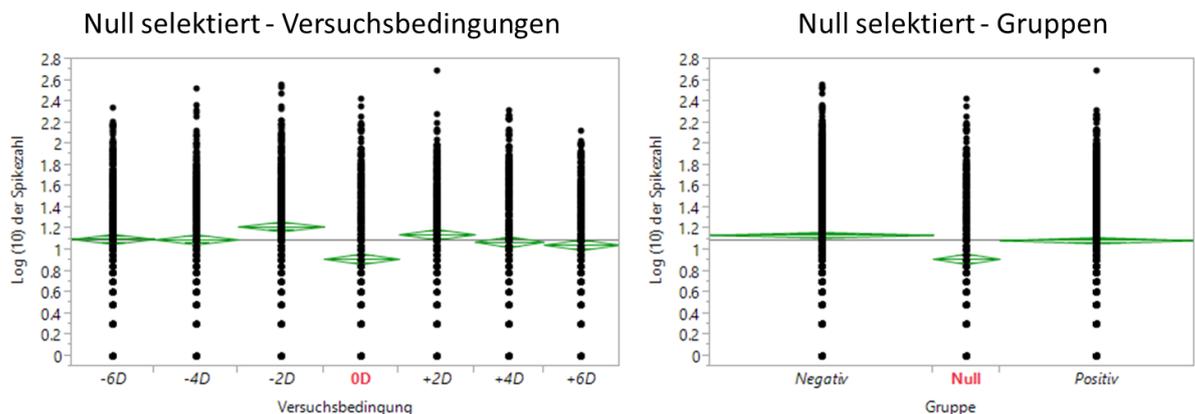


Abbildung 75: Darstellung der logarithmierten Spikeraten der für nicht defokussierte Reize kodierend selektierten Zellen ($n=29$). Links sind alle Versuchsbedingungen dargestellt, rechts sind jeweils die negativen und positiven Versuchsbedingungen zusammengefasst. Alle Vergleiche der Versuchsbedingungen und der Gruppen gegenüber der Reizung ohne Defokussierung sind hoch signifikant (geringste Signifikanz $p=0,001$ beim Vergleich -6D gegen 0D; Dunnett's Test).

Die Auswertung der für negativen Defokus kodierenden Zellen (n=19, Abbildung 76) zeigt einen sehr auffälligen Anstieg der Spikeraten bei einer Defokussierung von -2D. Er wurde bereits bei der Analyse der Spikeraten aller Zellen in Abbildung 73 sichtbar. Jedoch reagierten die Zellen auch bei anderen negativen Defokussierungen des Films mit veränderter Spikerate gegenüber dem Film im Fokus. Der Vergleich der zusammengefassten Defokus-Gruppen zeigt einen hoch signifikanten Unterschied ($p < 0,0001$) der Spikeraten zu jenen ohne oder mit positiver Defokussierung.

Im Gegensatz zu den hohen Signifikanzen der Klasse N, ist in der Klasse P (n=20, Abbildung 77) nur der Vergleich der -6D Reizantworten gegenüber den 0D Reizantworten signifikant. Sowohl die übrigen Vergleiche als auch jene der zusammengefassten Gruppen zeigen keine Signifikanzen.

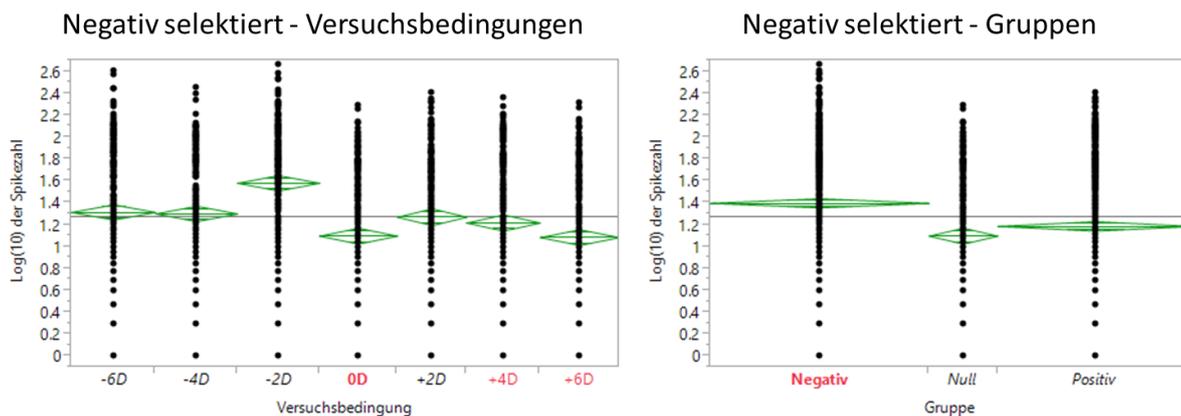


Abbildung 76: Darstellung der logarithmierten Spikeraten der für negativ defokussierte Reize kodierend selektierten Zellen (n=19). Links sind alle Versuchsbedingungen dargestellt, rechts sind jeweils die negativen und positiven Versuchsbedingungen zusammengefasst. Im Vergleich der Versuchsbedingungen weisen alle negativen ($p < 0,001$) sowie +2D ($p = 0,007$) einen signifikanten Unterschied zu 0D auf. Werden die 0D Reizantworten sowie die Gruppe der positiven Reizantworten mit den negativen Reizantworten verglichen, so besteht eine hochgradig signifikante Differenz ($p < 0,001$).

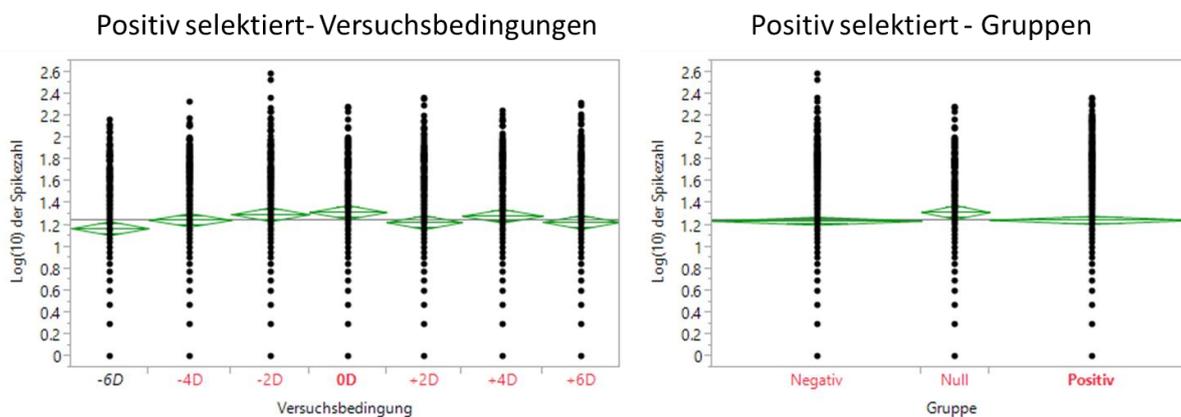


Abbildung 77: Darstellung der logarithmierten Spikeraten der für positiv defokussierte Reize kodierend selektierten Zellen (n=20). Links sind alle Versuchsbedingungen dargestellt, rechts sind jeweils die negativen und positiven Versuchsbedingungen zusammengefasst. Obgleich auf positiven Defokus selektiert wurde, weist nur die -6D Reizantwort ($p < 0,01$) einen signifikanten Unterschied zur 0D Reizantwort auf, in der zusammengefassten Gruppe verliert sich diese Signifikanz.

Im Nachfolgenden werden exemplarisch jeweils zwei Zellen der einzelnen Klassen gezeigt. Für jede Selektionsklasse existiert zumindest eine Zelle, welche ein umgekehrtes Antwortverhalten gegenüber der über die Klasse gemittelten Antwort aufzeigt. Besonders deutlich wird dies bei den Zellen 170 und 255 aus Klasse N (Abbildung 79). Im Gruppenvergleich zeigen beide eine hohe Signifikanz der 0D Reizantworten gegenüber der negativen und positiven Gruppierung, jedoch ist bei Zelle 255 die 0D Reizantwort geringer, bei Zelle 170 ist sie höher als jene der beiden Defokusgruppen.

Es ist im Datensatz möglich, für die meisten potentiellen Antwortmuster Zellen zu finden, welche diesem Entsprechen. So zeigt Zelle 194 (Abbildung 78) eindeutige eine Verringerung der Spikeraten bei steigendem negativem Defokus und Zelle 184 (Abbildung 80) zeigt einen eindeutigen Anstieg der Spikeraten bei steigendem positivem Defokus. Diese graduellen Veränderungen der Spikeraten konnten mit den hier verwendeten Mitteln jedoch nicht statistisch erfasst werden, da keine Möglichkeit der Selektierung von Zellen mit vergleichbarem Antwortmuster ohne Erzeugung einer Scheinsignifikanz gefunden wurde.

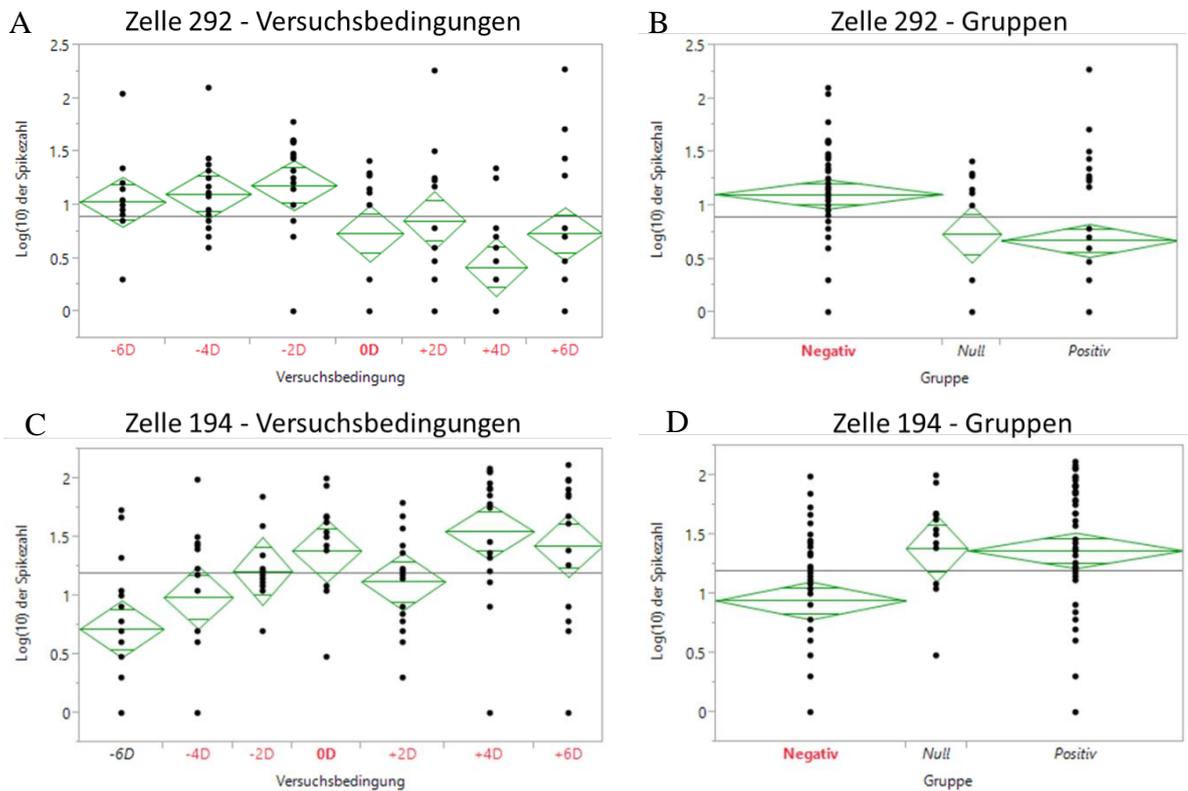


Abbildung 78: Beispiele der Antworten von Zellen aus der Klasse N. Zelle 292 (A, B) zeigt eine Steigerung, Zelle 194 (C,D) eine Reduktion der gemessenen Spikeraten. Auffällig ist die graduelle Reduktion der Spikeraten von Zelle 194 bei Erhöhung des negativen Defokus.

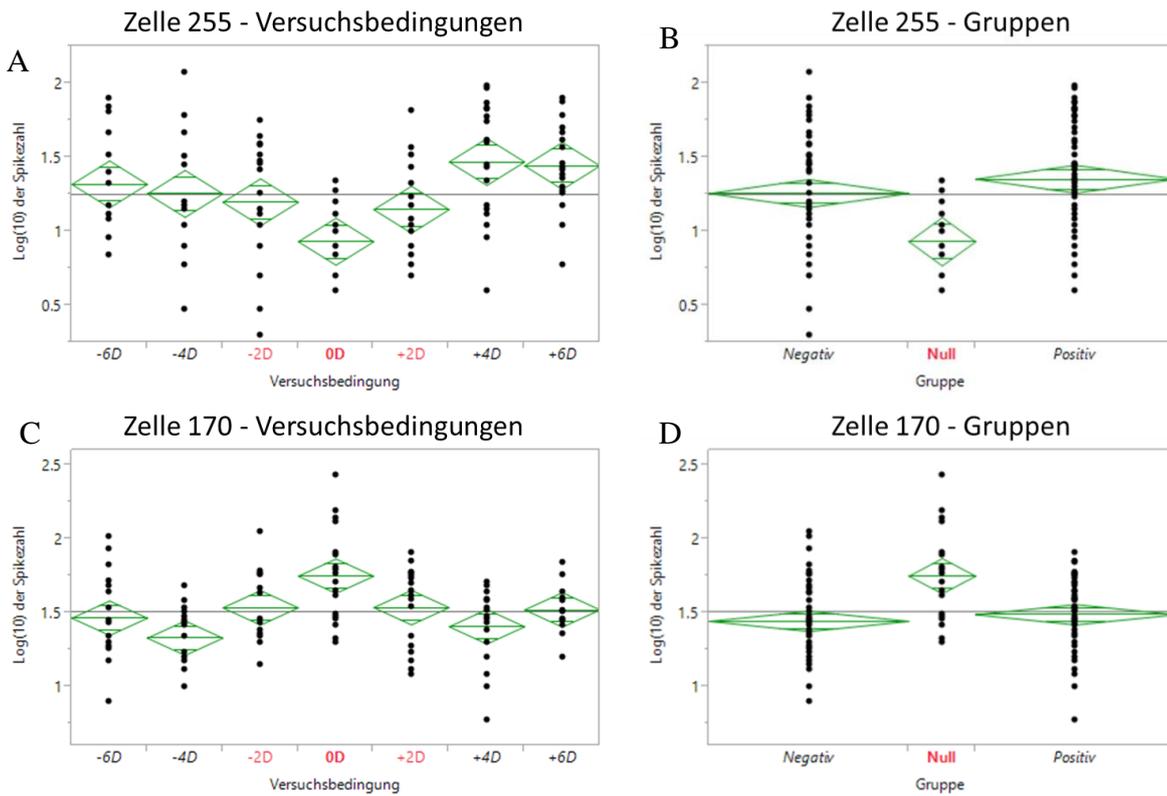


Abbildung 79: Beispiele der Antworten von Zellen aus Klasse F. Beide Zellen zeigen ähnliche Antworten, auch wenn Zelle 255 (A, B) eine Erhöhung, Zelle 170 (C, D) eine Abnahme der Spikeraten bei Defokussierung zeigt.

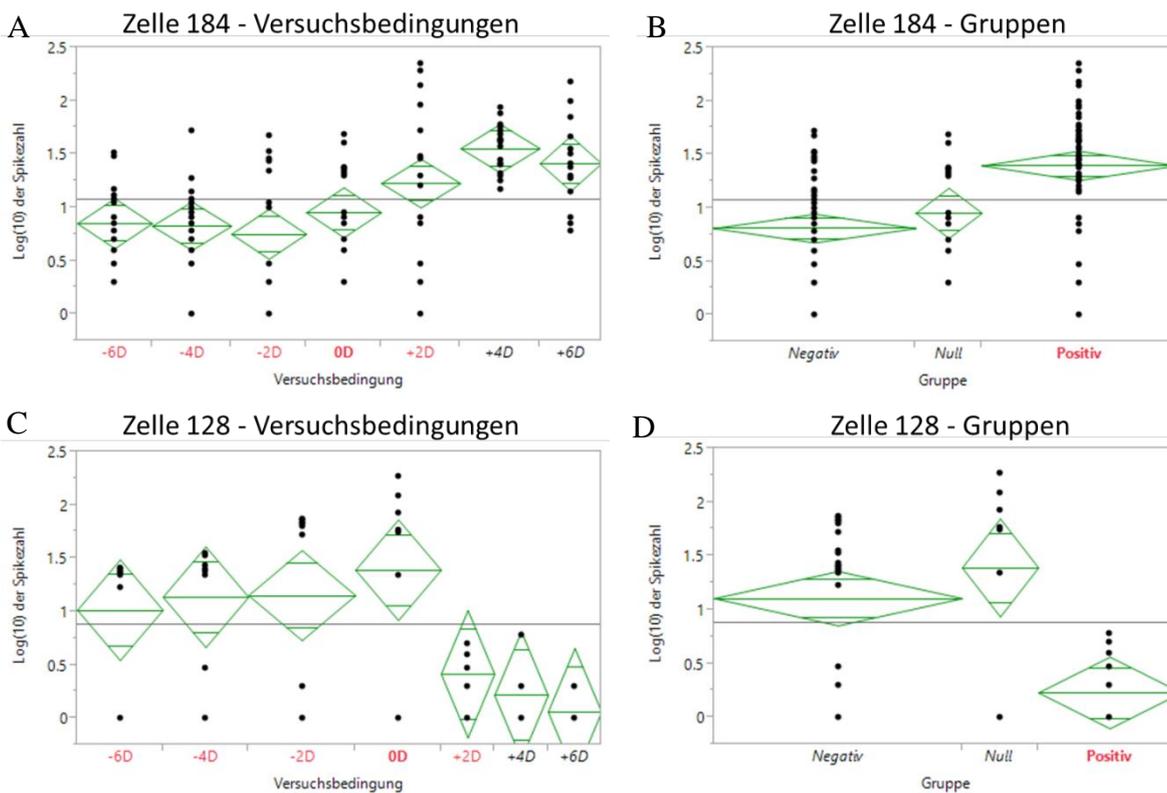


Abbildung 80: Beispiele von Zellen aus der Klasse P. Der graduelle Abfall der Spikeraten bei positiver Defokussierung bei Zelle 128 (C, D) steht im Gegensatz zum Anstieg dessen bei Zelle 184 (A, B).

Zufallsgenerierte Kontrolldaten

Die zufallsgenerierten Daten zeigen sehr deutliche Unterschiede gegenüber den gemessenen Daten. Ist die Zellaktivität noch vergleichbar und konstant (Abbildung 70 und Abbildung 81), zeigt sich erwartungsgemäß, dass keine Korrelation zwischen den einzelnen zufallsgenerierten Datenreihen besteht (Abbildung 82).

Durch die höhere Anzahl an Versuchsbedingungen gegenüber den Direktvergleichen (siehe 3.2.1) reduziert sich die Wahrscheinlichkeit, dass zufällig generierte Zellen die Selektionskriterien erfüllen können. Daraus folgt, dass nur eine einzelne (0,3%), zufallsgenerierte Zelle diese Kriterien erfüllen konnte (Abbildung 83).

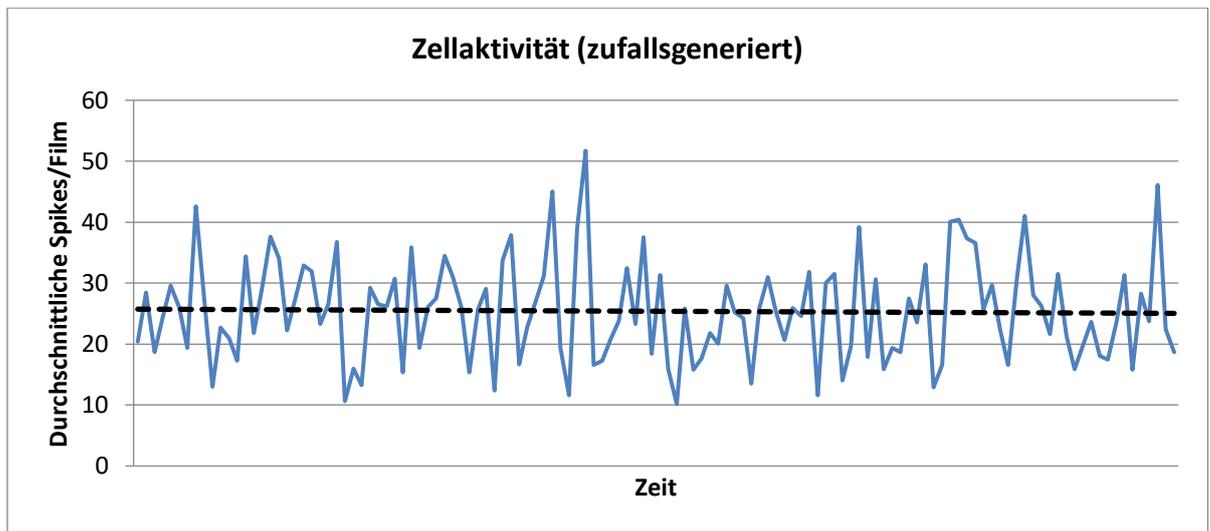


Abbildung 81: Aktivitätsprofil der zufallsgenerierten Zellen. Wie erwartet liegt eine nahezu horizontale Trendlinie vor. Dieses Profil ist nicht von jenem der gemessenen Daten unterscheidbar (Abbildung 70).

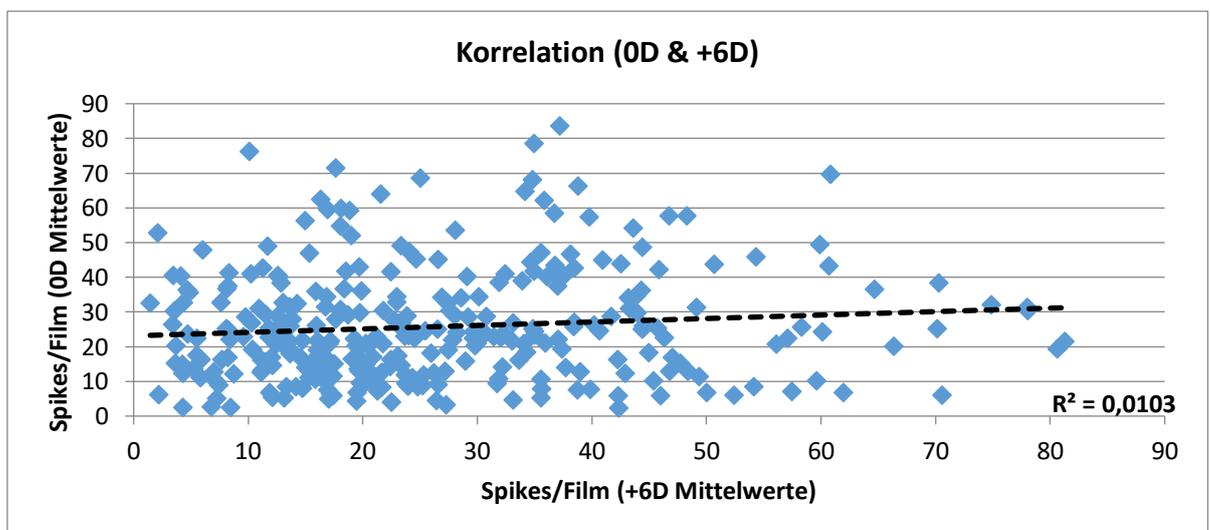


Abbildung 82: Streudiagramm der Werte des zufallsgenerierten Datensatzes, welche die höchste Korrelation untereinander aufweisen. Die Daten sind nicht korreliert.

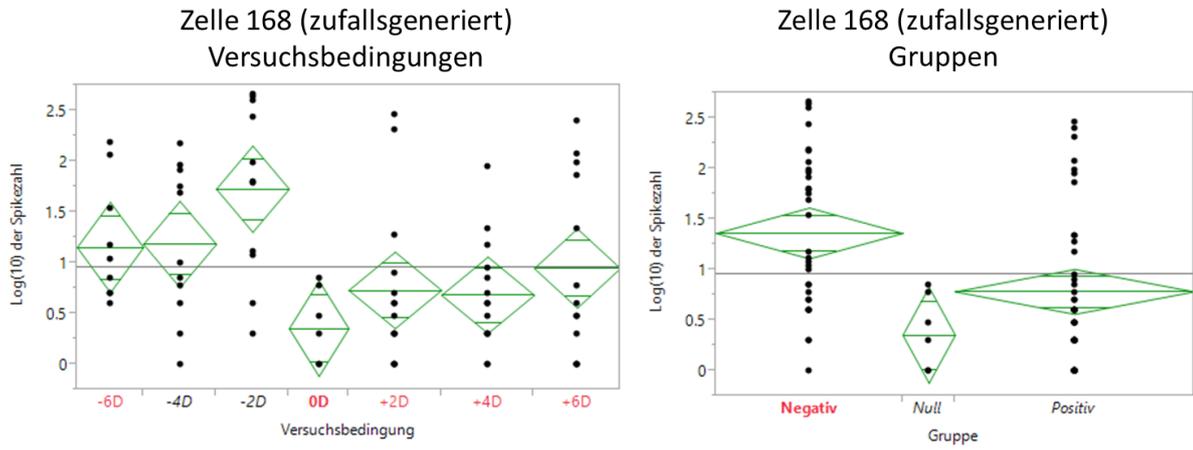


Abbildung 83: JMP Grafiken der einzigen zufallsgenerierten Zelle, welche die Selektionskriterien erfüllte. Da die zufällig generierten Daten im Bereich der negativen Defokussierung signifikant erhöht sind, würde sie in Klasse N selektiert werden.

3.2.3 Defokussierung und Kontrastreduktion

Die in 3.2.1 und 3.2.2 ermittelten Daten zeigen, dass sich die Spikeraten einiger Zellen bei Defokussierung signifikant verändern. Die Experimente beinhalteten jedoch keine Versuchsbedingungen mit Kontrastreduktion. Da bei Defokussierung auch immer der Kontrast reduziert wird (siehe Einleitung, Kapitel 1.1.4 Seite 7), wird hier untersucht, ob sich die Spikeraten von Zellen bei Kontrastreduktion anders Verhalten als bei Defokussierung.

Einfache Defokussierung und einfache Kontrastreduktion

Im diesem Experiment wurden 289 Zellen aus 9 Retinae aufgezeichnet. Insgesamt wurden 72 Filmwiederholungen gezeigt, was in 20437 ermittelten Spikeraten resultiert (einige Werte konnten aufgrund von Datenfehlern nicht ausgewertet werden. Die Ursache dieser Fehler ist ungeklärt).

Selektionskriterien

Die vier Versuchsbedingungen erlaubten keine Gruppierung der Versuchsbedingungen. Aus diesem Grund wurden Zellen selektiert, deren Reizantworten einer Versuchsbedingung sich signifikant ($p < 0,01$, t-Test) von jeweils zwei anderen Versuchsbedingungen unterschieden. Entsprechend wurden sie in die Klassen N (negativer Defokus), P (positiver Defokus), F (im Fokus) und K (Kontrastreduziert) einsortiert.

Gemessene Daten

Die Datenverteilung im Experiment zeigt einen Kurvenverlauf vergleichbar mit jenem der vorangegangenen Experimente. Niedrige Spikezahlen dominieren, besonders hohe sind sehr selten (Abbildung 84). Werden die Spikeraten logarithmiert, so entspricht das Resultat jenem einer Normalverteilung (Abbildung 85).

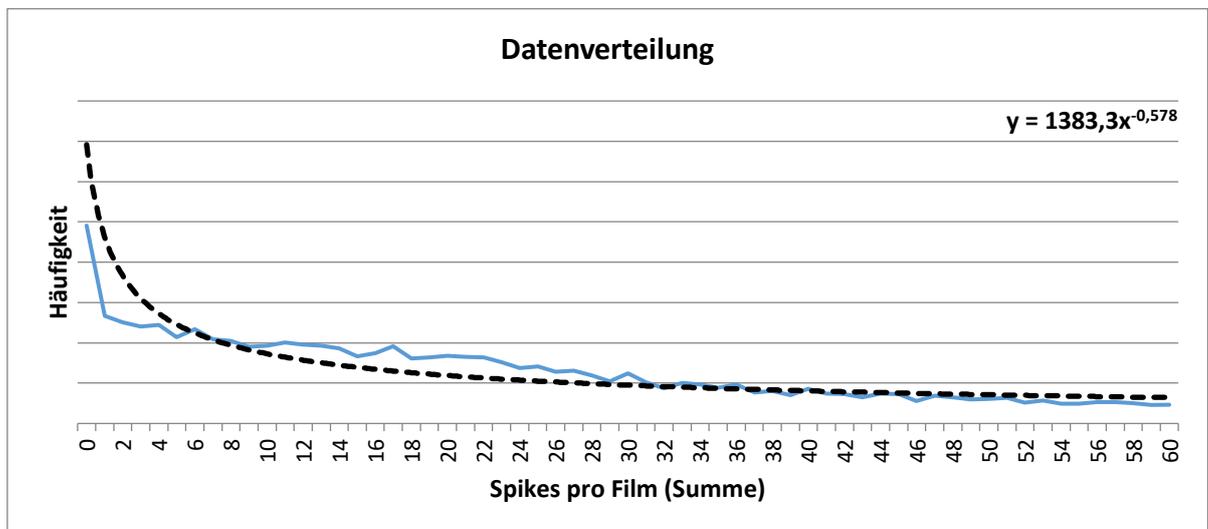


Abbildung 84: Die Verteilung der Daten entspricht dem Bekannten (siehe Abbildung 46, Abbildung 57 & Abbildung 68) und zeigt keine Auffälligkeiten.

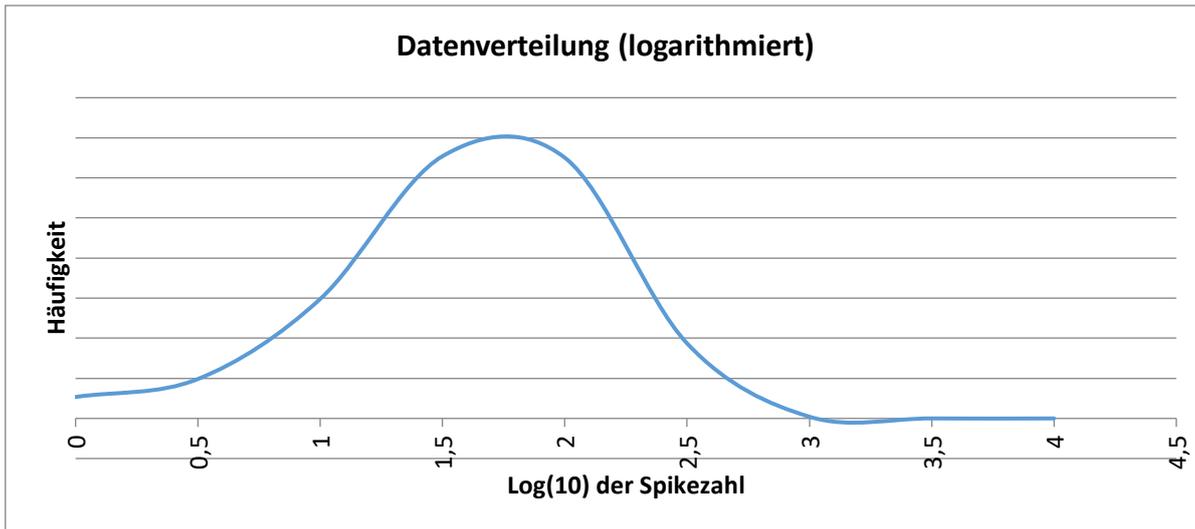


Abbildung 85: Log(10) der Daten aus Abbildung 84. Die logarithmierte Verteilungskurve entspricht in etwa dem Kurvenverlauf einer Normalverteilung und entspricht somit den Erwartungen.

Die Aktivität der aufgezeichneten Zellen bewegt sich über den kompletten Versuchszeitraum konstant entlang einer nahezu horizontalen Trendlinie. Die Schwankungen liegen im Bereich der bisher gezeigten Experimente (Abbildung 48Abbildung 59Abbildung 70), wenngleich die mittlere Spikerate etwas höher liegt. Die Versuchsdauer lag bei 2160 Sekunden zuzüglich 180 Sekunden Pausenzeiten.



Abbildung 86: Die Aktivität der Zellen nimmt über den Versuchszeitraum hinweg nicht ab. Die Amplitude der Schwankungen ist vergleichbar mit jenen der vorhergegangenen Experimente (Abbildung 48Abbildung 59 Abbildung 70)

Die Zellantworten sind untereinander, wie schon in den vorherigen Experimenten, stark korreliert. Zellen mit hoher Aktivität behalten diese also, mit relativen Veränderungen entsprechend der Versuchsbedingungen, auch in diesem Experiment bei.

Tabelle 12: Tabellarische Ansicht der Korrelationskoeffizienten der Reizantworten untereinander. Grüne Felder weisen eine relativ hohe, rote eine relativ niedrige Korrelation vor. Die Reizantworten bei defokussiertem Stimulus weisen gegeneinander die höchste, jene zwischen 0D und 50% Kontrastreduktion die geringste Korrelation auf.

Korrelationen	-5D	0D	+5D	50%
-5D		0,93	0,95	0,91
0D	0,93		0,89	0,88
+5D	0,95	0,89		0,93
50%	0,91	0,88	0,93	

Die allgemein hohe Korrelation der Werte untereinander belegt einen signifikanten ($p < 0,01$) Zusammenhang, sowohl der Daten in den Vergleichen mit der geringsten Korrelation (Abbildung 87), als auch bei jenen mit der höchsten Korrelation (Abbildung 89).

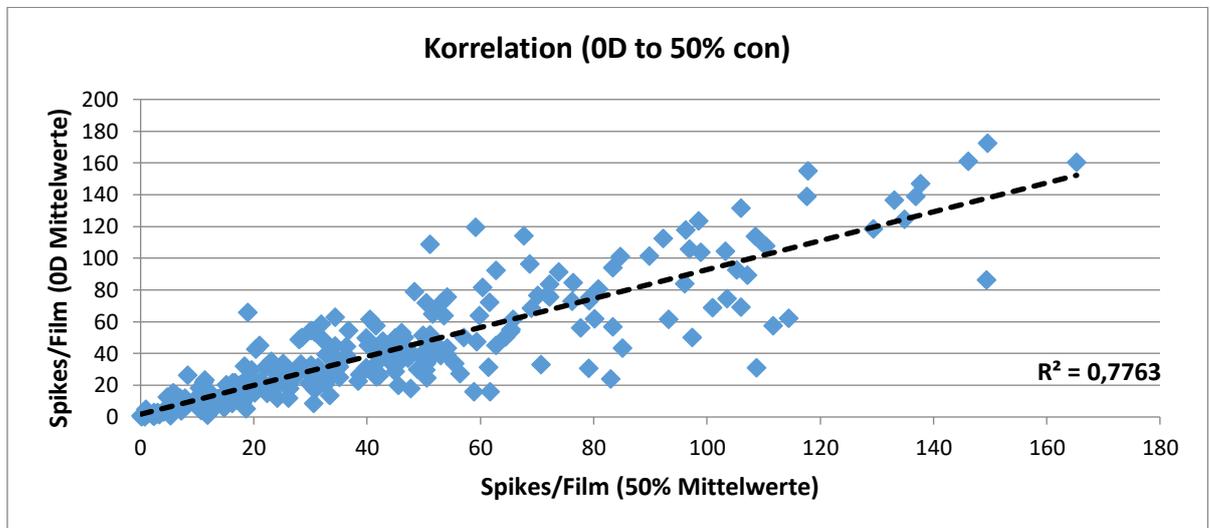


Abbildung 87: Streudiagramm der Spikeraten der Versuchsgruppen mit den geringsten Korrelationen zueinander. Auch dieser am wenigsten Korrelierte Vergleich resultiert in signifikanten ($p < 0,01$) Zusammenhängen zwischen den Werten.

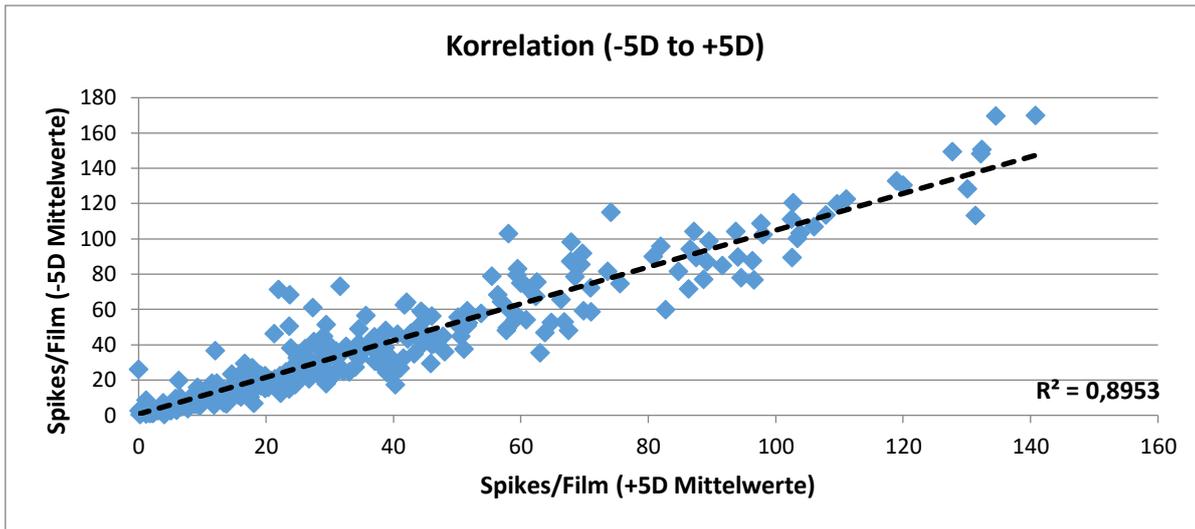


Abbildung 88: Streudiagramm der Spikeraten der Versuchsgruppen mit der höchsten Korrelation. Bemerkenswert ist, dass die Defokussierung des Filmes mit positivem und negativem Vorzeichen Zellantworten bedingte, welche im Experiment die höchste Korrelation untereinander vorweisen.

Die Darstellung der Spikeraten aller gemessenen Zellen im Balkendiagramm zeigt keine Signifikanzen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (Abbildung 89). Werden diese Daten logarithmiert, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$, Dunnett's Test) zwischen den Reizantworten der -5D Defokussierung gegenüber jenen ohne Defokussierung (Abbildung 90 A).

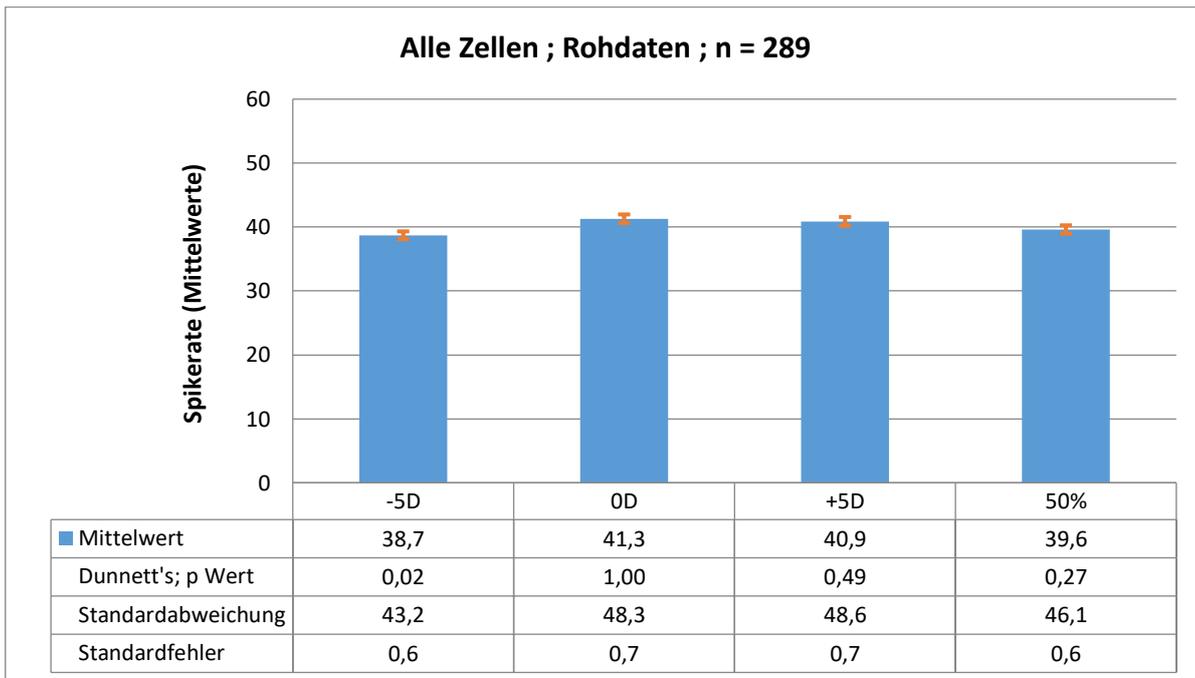


Abbildung 89: Balkendiagramm zur Übersicht über die Spikeraten aller gemessenen Zellen. Die Spikerate bei einer Defokussierung um -5D unterscheidet sich signifikant ($p < 0,05$) von den ohne Defokussierung gemessenen Antworten.

Betrachtet man die Reizantworten auf die einzelnen Versuchsbedingungen innerhalb der verschiedenen Klassen, so ergibt sich ein kontroverses Bild.

In der Klasse F (Abbildung 90 A), besteht ein signifikanter Unterschied von 0D zu -5D ($p=0,007$) sowie +5D ($p=0,008$) wohingegen kein Unterschied in den Antworten auf die kontrastreduzierte Stimulierung feststellbar ist ($n=12$, 4,15%).

Die Klasse N (Abbildung 90 C) zeigt Signifikanzen zwischen -5D und +5D ($p=0,007$) sowie 50% ($p<0,001$), jedoch keine zwischen -5D und 0D ($n=7$, 2,42%).

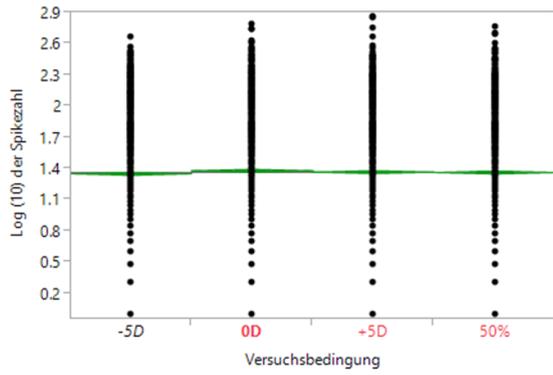
Die Klasse P (Abbildung 90 D) weist keinerlei Unterschiede zwischen den Antworten auf die verschiedenen Versuchsbedingungen auf ($n=12$, 4,15%).

Die Klasse K (Abbildung 90 E) zeigt starke Signifikanzen zwischen der Kontrastreduktion sowie den übrigen Versuchsbedingungen ($p<0,001$ für alle Vergleiche, $n=18$, 6,23%).

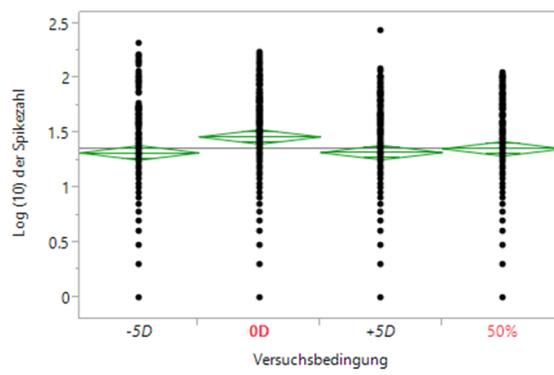
Isoliert man das Antwortverhalten einzelner Zellen der jeweiligen Klassen, so erhält man für die Klassen N, F und P Zellen, deren Antwortschema jenem entspricht, welches man bereits in 3.2.1 (Seite 59) und speziell in 3.2.2 (Seite 72) beobachten konnte (Abbildung 91 A-F). Es sind sowohl Zellen mit erhöhter als auch reduzierter Spikerate der Kontrollbedingung gegenüber den übrigen Versuchsbedingungen auffindbar.

Einzig in der Klasse K befindet sich keine Zelle, deren Spikerate bei Kontrastreduktion sich gegenüber den Vergleichswerten erhöht, sie folgen alle dem Schema von Zelle 106 (Abbildung 91 G).

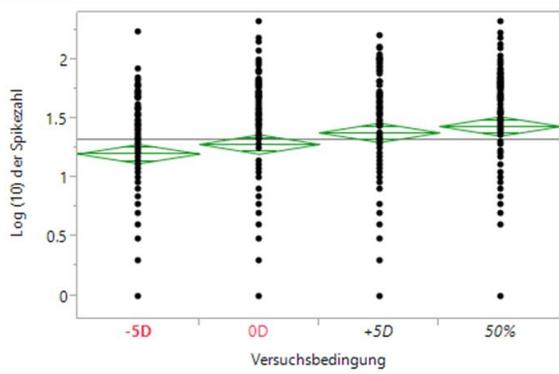
A Alle Zellen - Versuchsbedingungen



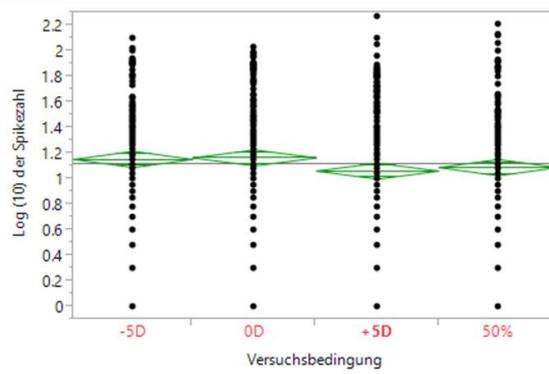
B Null selektiert - Versuchsbedingungen



C Negativ selektiert - Versuchsbedingungen



D Positiv selektiert - Versuchsbedingungen



E Kontrast selektiert - Versuchsbedingungen

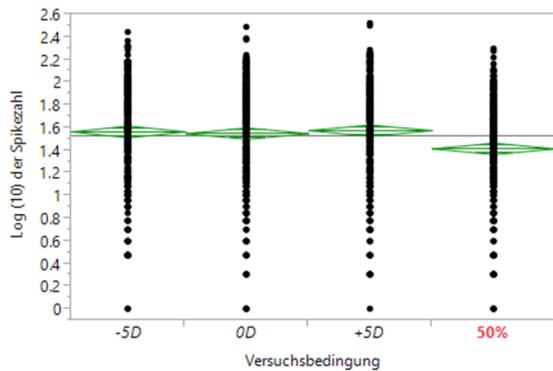


Abbildung 90: Darstellung aller Klassen in 0. Die Klassen F (B) sowie N (C) zeigen jeweils zwei Signifikanzen gegenüber der Kontrolle, P hat keinerlei Signifikanz wohingegen die Klasse K sich bei Kontrastreduktion signifikant anders verhält als bei Defokussierung oder einem Stimulus im Fokus ohne Kontrastreduktion.

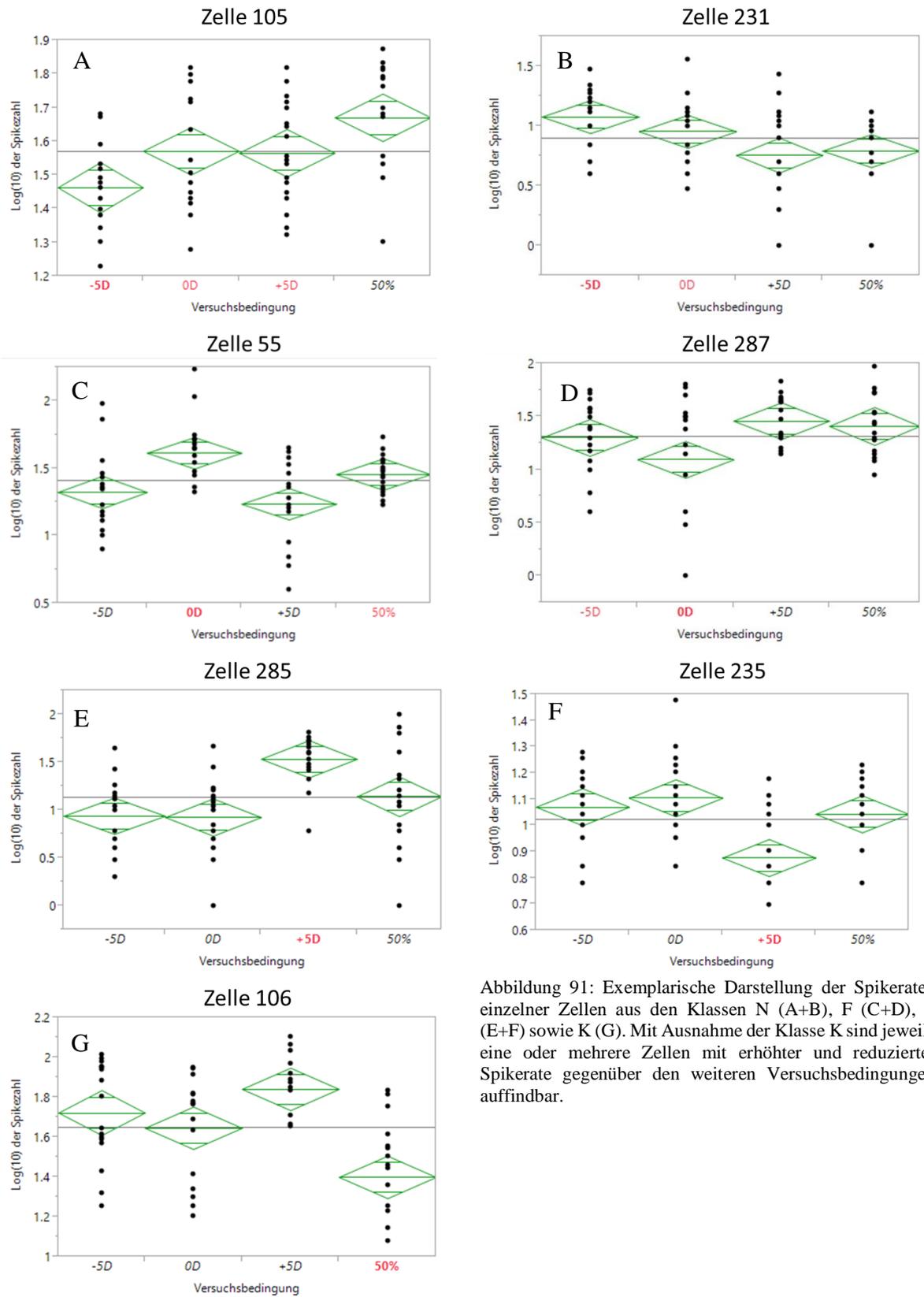


Abbildung 91: Exemplarische Darstellung der Spikeraten einzelner Zellen aus den Klassen N (A+B), F (C+D), P (E+F) sowie K (G). Mit Ausnahme der Klasse K sind jeweils eine oder mehrere Zellen mit erhöhter und reduzierter Spikerate gegenüber den weiteren Versuchsbedingungen auffindbar.

Zufallsgenerierte Kontrolldaten

Die Kontrolldaten dieses Experiments weisen keine Besonderheiten auf. Die ermittelte Aktivität der zufallsgenerierten Zellen ist konstant (Abbildung 92), es liegen auch in der am stärksten korrelierten Vergleichspaarung keine Signifikanzen vor (Abbildung 93) und nur 7 der 289 zufallsgenerierten Zellen (2,4%) erfüllen die Selektionskriterien (Abbildung 94).

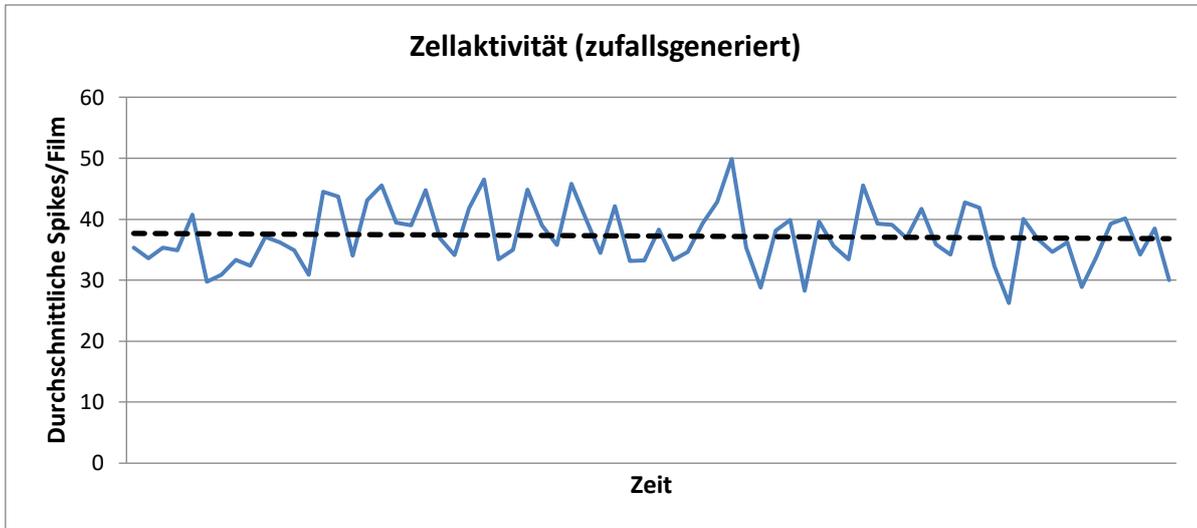


Abbildung 92: Zellaktivität der zufallsgenerierten Zellen.

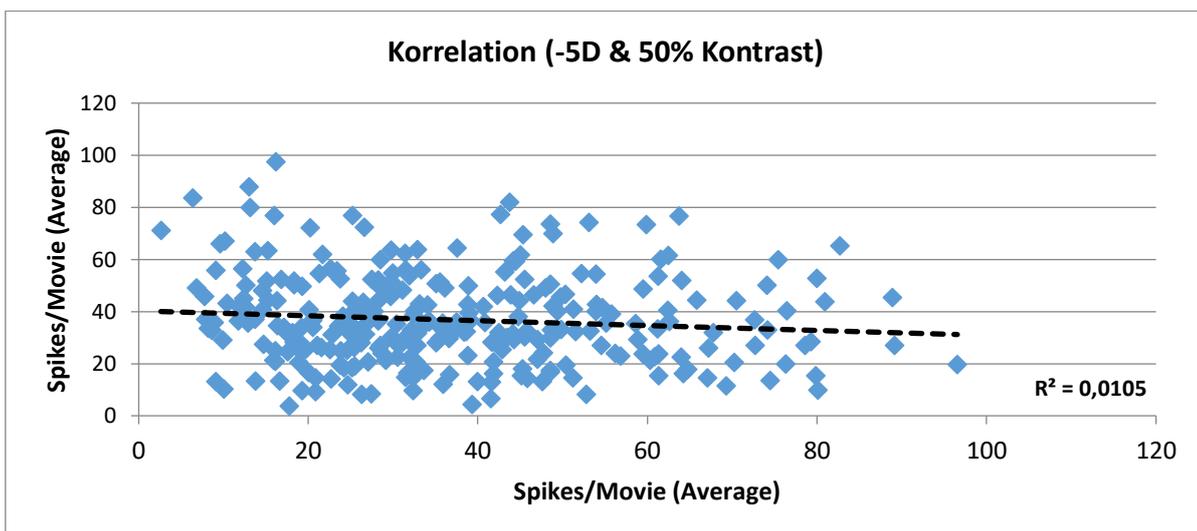


Abbildung 93: Streudiagramm der Paarung der Versuchsbedingungen mit der höchsten Korrelation (hier mit negativem Korrelationskoeffizienten). Die Werte sind nicht korreliert.

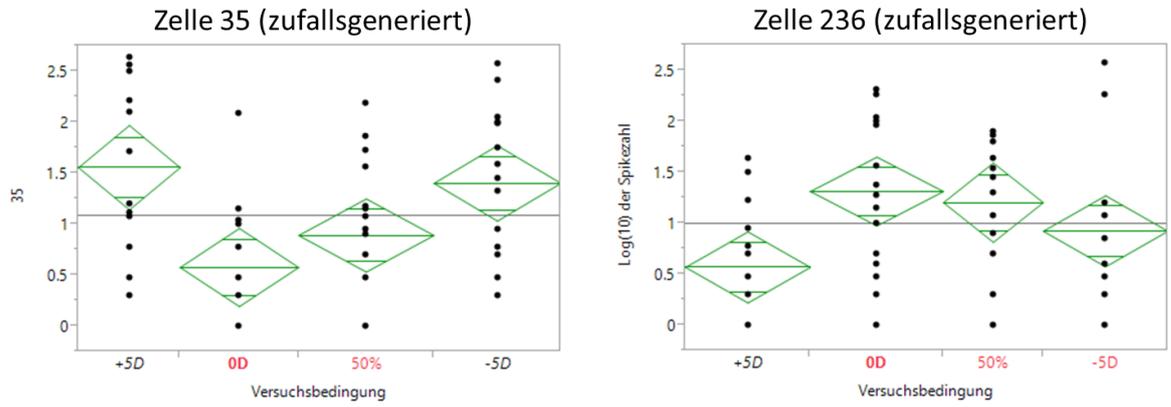


Abbildung 94: Exemplarische Darstellung der Spikeraten zweier zufallsgenerierter Zellen. Eine Einsortierung in Klassen ist aufgrund der geringen Anzahl an Zellen, welche die Selektionskriterien erfüllen nicht möglich.

3.2.4 Stufenweise Defokussierung und Stufenweise Kontrastreduktion

Dieses Experiment stellt mit 10 Versuchsbedingungen die umfangreichsten Untersuchungen dieser Arbeit dar. Insgesamt wurden aus 10 Retinae die Spikeraten von 223 Zellen aufgezeichnet. Dies ergibt 26760 einzelne Spikeraten.

Selektionskriterien

Die Zellen wurden nach der Selektion den Klassen N, F, P sowie K zugeordnet.

Die Kriterien hierfür entsprachen jenen aus Experiment 3.2.2. Zusätzlich zur Notwendigkeit, eine Signifikanz von $p < 0,001$ sowie eine von $p < 0,05$ zu erreichen, musste im T-Test der zusammengefassten Gruppen (siehe Kapitel 2.6.7, Seite 53) die Kontrollgruppe signifikant unterschiedlich zu den übrigen drei Gruppen sein ($p < 0,05$).

Gemessene Daten

Die Verteilung der Daten enthält weder bei den absoluten Spikezahlen (Abbildung 95) noch bei den logarithmierten Werten (Abbildung 96) Besonderheiten.

Die Zellaktivität ist im Verlauf des Versuchs (3600s Messung, 600s Pausenzeiten) leicht, jedoch nicht signifikant ($p = 0,08$) abfallend im Vergleich der ersten und letzten 0D und -2D Reizantworten. Die scheinbar hohen Schwankungen entsprechen in absoluten Zahlen jener der bereits gezeigten Experimente, die Spikeraten sind jedoch allgemein relativ gering (Abbildung 97).

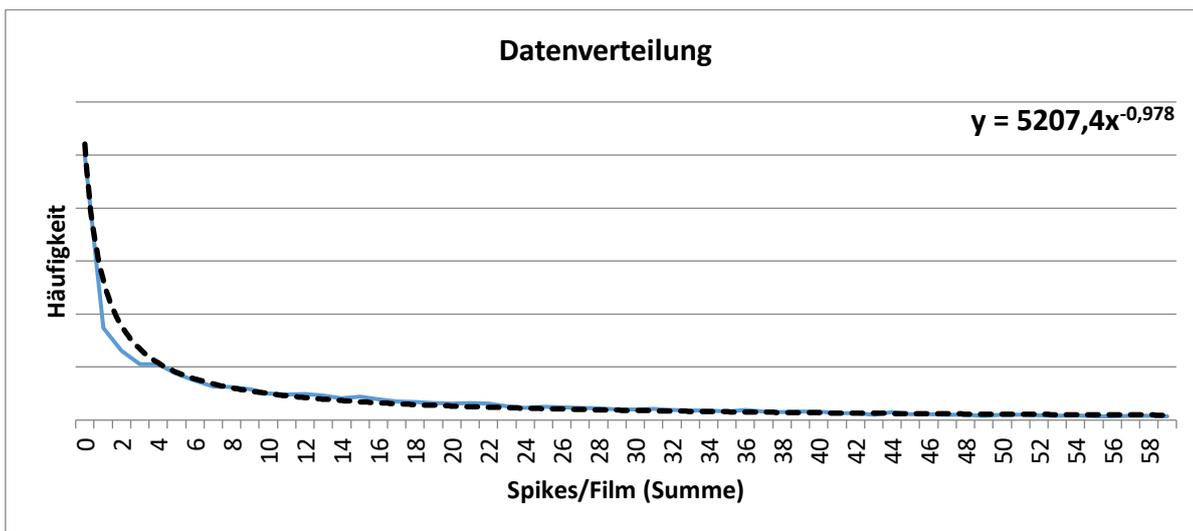


Abbildung 95: Die Verteilung der Daten entspricht dem Bekannten (siehe Abbildung 46, Abbildung 57, Abbildung 68 sowie Abbildung 84) und zeigt keine Auffälligkeiten.

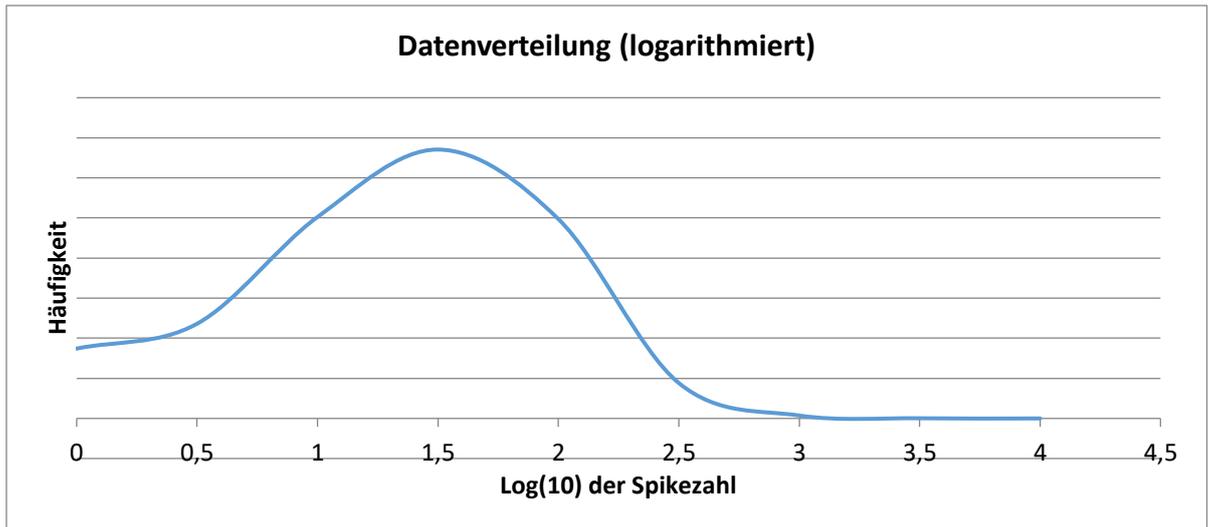


Abbildung 96: Verteilungskurve der logarithmierten Daten. Die Kurve entspricht näherungsweise einer Normalverteilung.

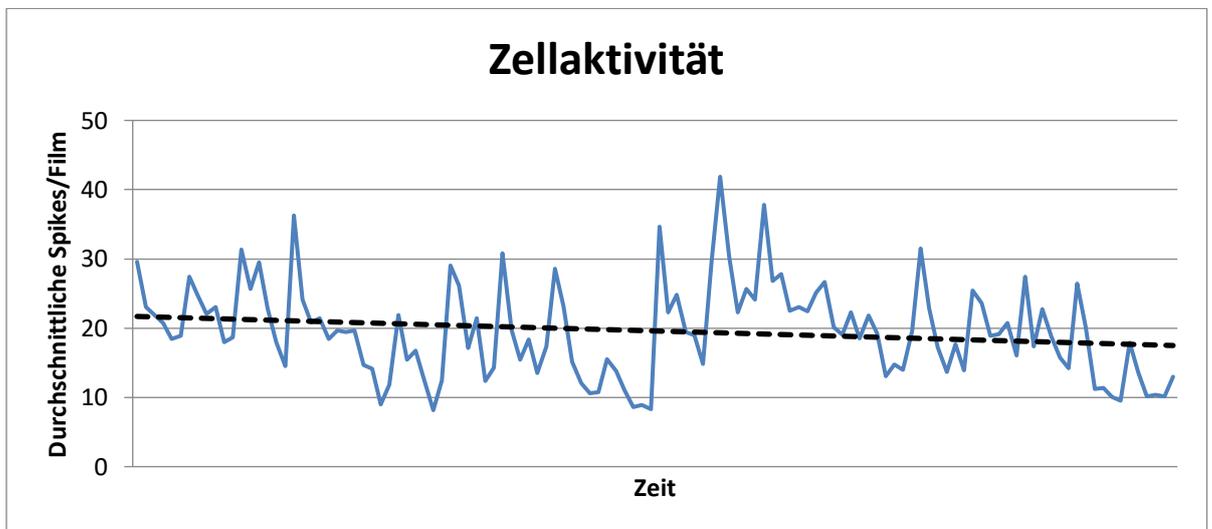


Abbildung 97: Verlaufsdiagramm der Zellaktivität über den Versuchszeitraum von 3600s (+ 600s Pausenzeiten). Der leichte Abfall der Aktivität ist nicht signifikant (p=0,08, T-Test zwischen den ersten und letzten je sechs 0D und -2D Werten).

Tabelle 13: Übersicht über die Korrelationskoeffizienten innerhalb von Experiment 3.2.4. Rote Felder markieren relativ zum Datensatz niedrige, grüne Felder hohe Korrelationswerte. Bemerkenswert sind die erhöhten Korrelationen oben links sowie unten rechts und der Korrelationen von 0D (sehr niedrig für positive Defokussierung und Kontrastreduktion, erhöht für -2D).

	-6D	-4D	-2D	0D	+2D	+4D	+6D	85% con	50% con	10% con
-6D		0,70	0,60	0,24	0,64	0,54	0,48	0,49	0,39	0,27
-4D	0,70		0,65	0,46	0,43	0,51	0,45	0,46	0,37	0,21
-2D	0,60	0,65		0,63	0,49	0,37	0,50	0,53	0,44	0,31
0D	0,24	0,46	0,63		0,29	0,13	0,21	0,27	0,18	0,10
+2D	0,64	0,43	0,49	0,29		0,50	0,46	0,45	0,48	0,41
+4D	0,54	0,51	0,37	0,13	0,50		0,61	0,57	0,49	0,48
+6D	0,48	0,45	0,50	0,21	0,46	0,61		0,55	0,53	0,59
85% con	0,49	0,46	0,53	0,27	0,45	0,57	0,55		0,77	0,51
50% con	0,39	0,37	0,44	0,18	0,48	0,49	0,53	0,77		0,75
10% con	0,27	0,21	0,31	0,10	0,41	0,48	0,59	0,51	0,75	

Betrachtet man die Korrelationskoeffizienten in Tabelle 13, so fällt eine Häufung von erhöhten Korrelationen im Bereich der Vergleichspaarungen innerhalb der jeweiligen Klassen (negativ und positiv) auf. Ebenso erscheinen die Korrelationswerte von OD gegenüber allen positiv defokussierten oder kontrastreduzierten Versuchsbedingungen deutlich reduziert.

Durch Isolation des niedrigsten (Abbildung 98) sowie des höchsten (Abbildung 99) Korrelationswertes und der Darstellung der Messwerte erhält man Streudiagramme, welche von Ausreißern beeinflusst zu sein scheinen. Entfernt man diese, so werden die jeweiligen Korrelationen zwar reduziert, aber ihre Signifikanzen verändern sich hierdurch nicht.

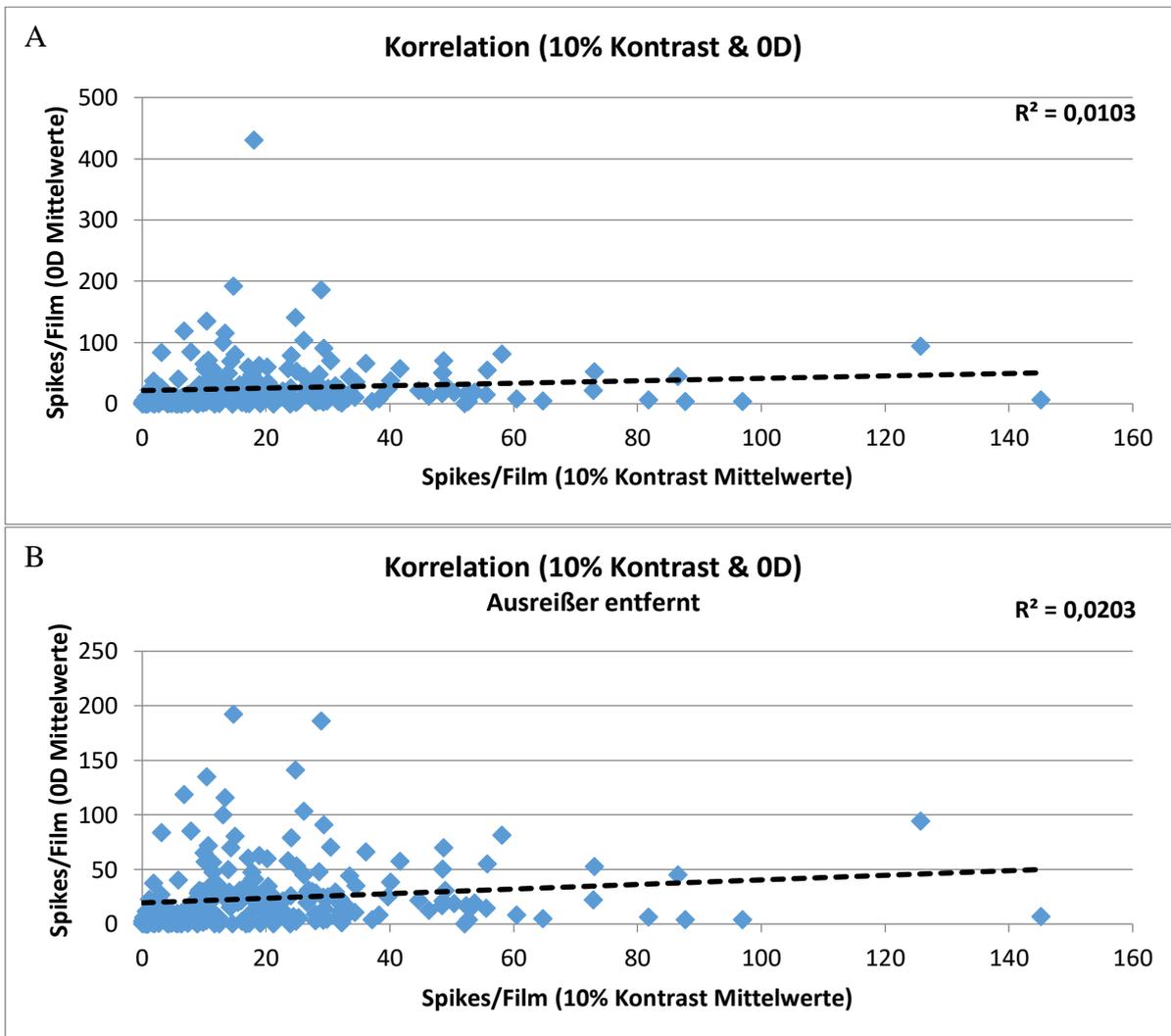


Abbildung 98: Streudiagramm der Spikeraten mit der niedrigsten Korrelation in der Paarung. A zeigt das unveränderte Diagramm mit Ausreißer, B zeigt dieselben Daten ohne diesen Ausreißer. Auch die Entfernung dieses Wertes resultiert nicht in einer signifikanten Korrelation.

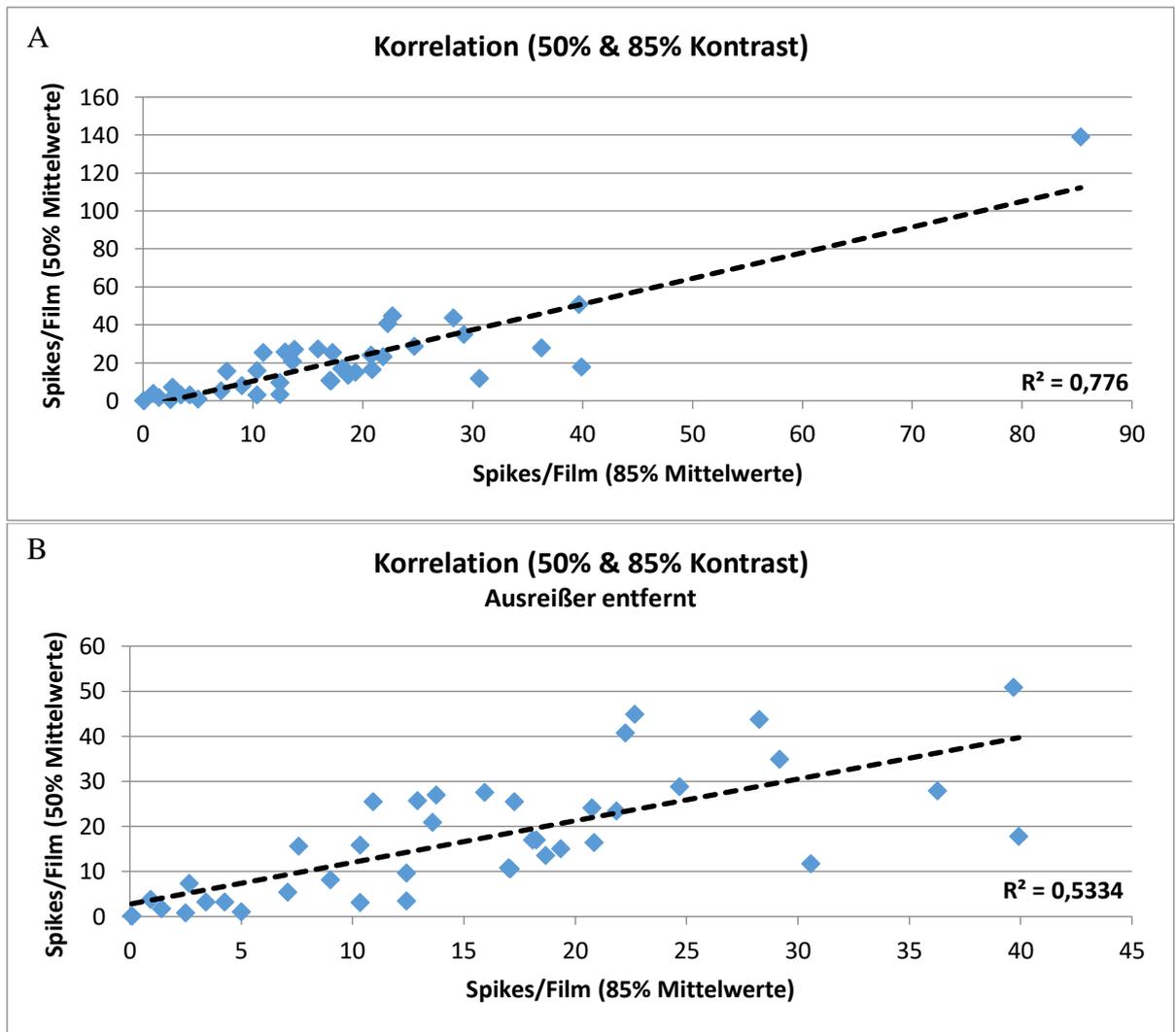


Abbildung 99: Streudiagramm der Spikeraten mit der höchsten Korrelation in der Paarung. Durch die Entfernung des deutlichen Ausreißers aus A verringert sich der Korrelationskoeffizient, die Korrelation bleibt jedoch signifikant.

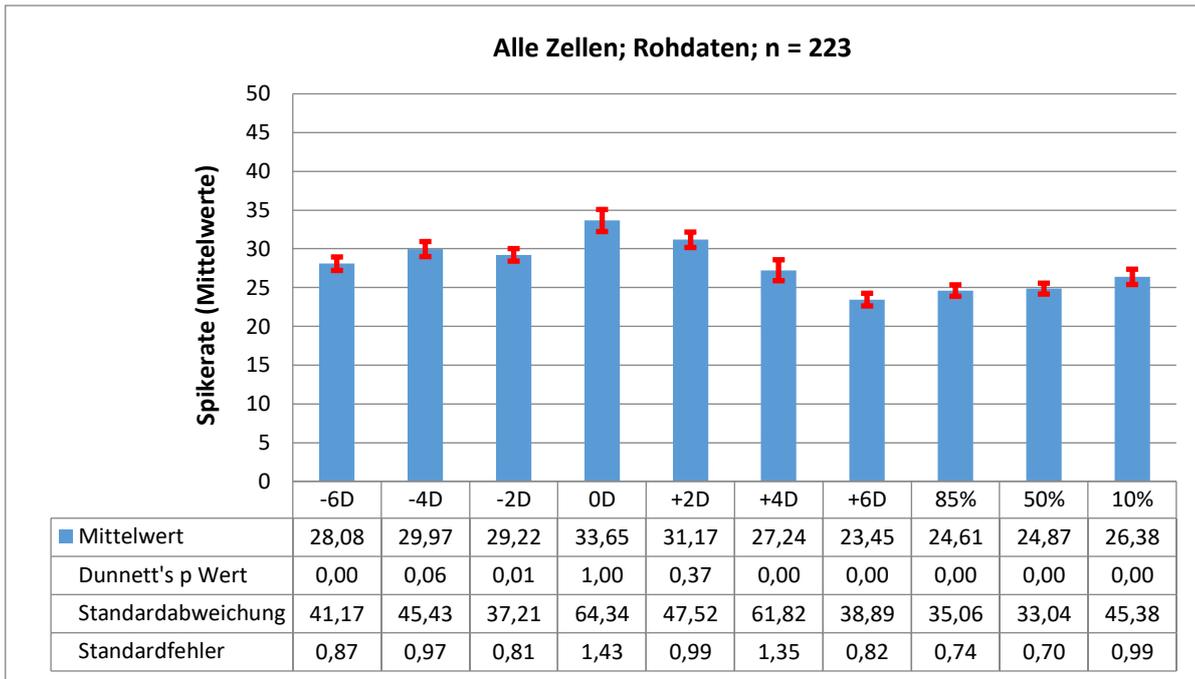


Abbildung 100: Balkendiagramm zur Darstellung der mittleren Spikeraten der 10 Versuchsbedingungen. Mit Ausnahme der Spikeraten bei einer Defokussierung um +2D und um -4D unterscheiden sich alle Werte signifikant von der Spikerate ohne Defokussierung. Dies stellt einen deutlichen Unterschied zu den bisher beschriebenen Experimenten dar, welche in der Betrachtung der gesamten Zellpopulation wenige oder keine Signifikanzen aufzeigten.

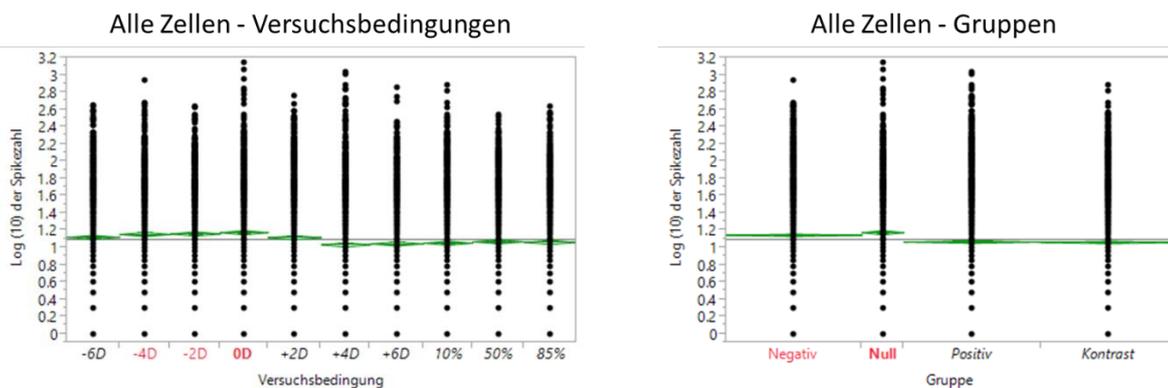


Abbildung 101: Log(10) der mittleren Spikeraten. Im Vergleich zu den nicht logarithmierten Spikeraten in Abbildung 100 verändern sich die Signifikanzen teilweise. Die Spikerate bei einer Defokussierung um +2D erreicht Signifikanz gegenüber jener ohne Defokussierung. Die Spikerate bei einer Defokussierung um -2D hingegen verliert diese Signifikanz. Werden die Versuchsbedingungen entsprechend des Vorzeichens ihrer Defokussierung und für die Kontrastreduktion gruppiert, so unterscheidet sich die mittlere Spikerate bei positiver Defokussierung sowie Kontrastreduktion signifikant von jener ohne Defokussierung.

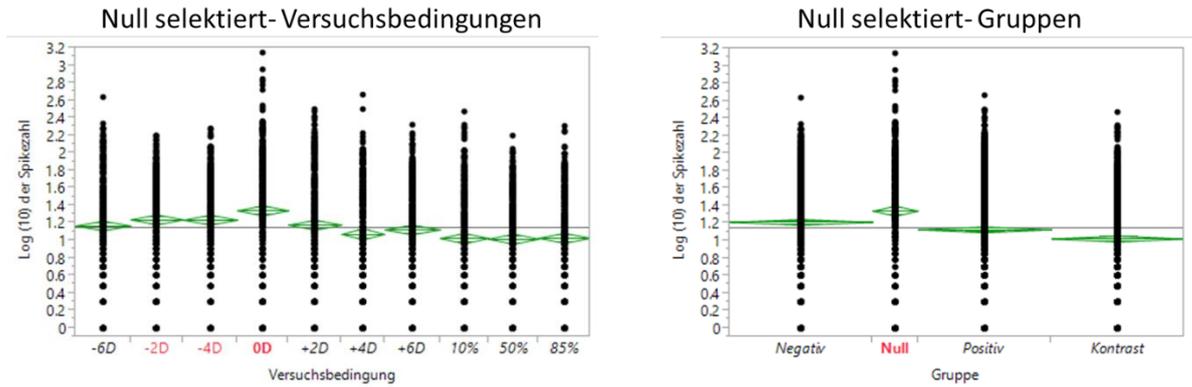


Abbildung 102: Die in der Grafik der logarithmierten Spikeraten von Klasse F (n=34; 15,2%) sichtbaren Signifikanzen (Links) entsprechen jenen aus Abbildung 101. Einzig bei der Gruppierung der Versuchsbedingungen erscheint zusätzlich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Spikeraten bei negativer Defokussierung gegenüber jener ohne Defokussierung (Rechts).

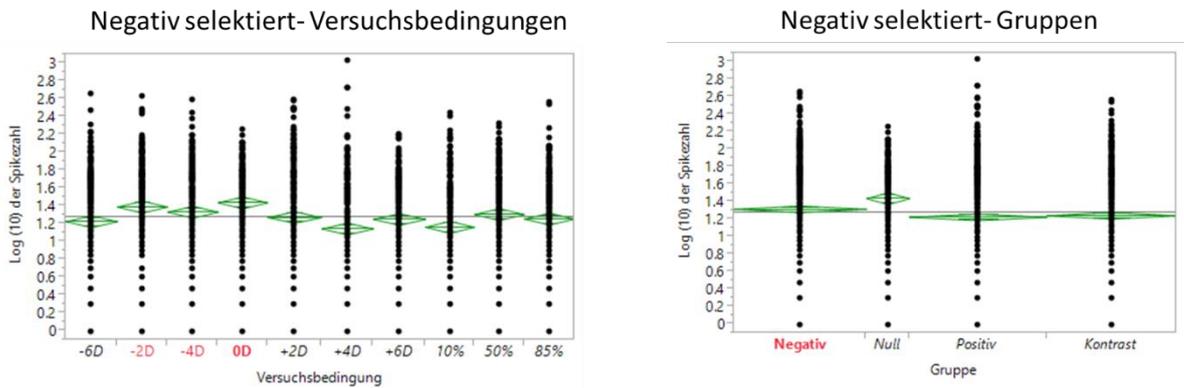


Abbildung 103: Auch in Klasse N (n=24; 10,8%) entsprechen die Unterschiede der Spikeraten bei verschiedenen Versuchsbedingungen jenen von allen Zellen (Abbildung 101) und von Klasse F (Abbildung 102). Werden die Versuchsbedingungen gruppiert, erscheinen die Unterschiede der Gruppen identisch zu jenen von Klasse F ($p < 0,01$ zwischen dem Reiz im Fokus sowie mit negativer Defokussierung und $p < 0,001$ für deren jeweiligen Vergleich zum positiv defokussierten sowie kontrastreduzierten Film). Es ist kein Unterschied zwischen beiden Klassen feststellbar.

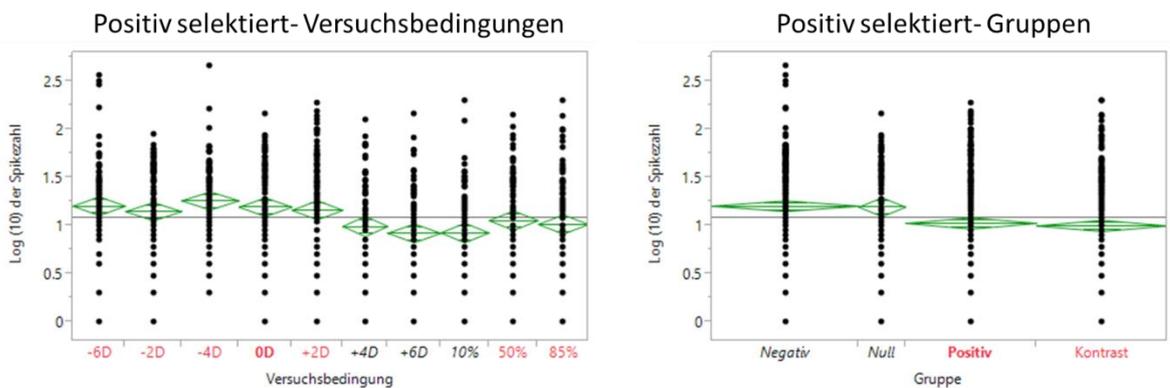
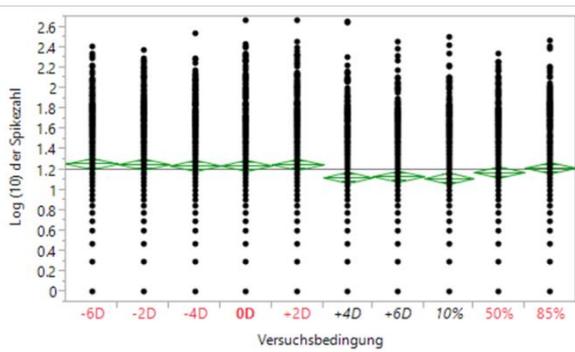


Abbildung 104: Die Zellen der Klasse P (n=9; 4%) zeigen im Vergleich von 4D ($p=0,045$), 6D ($p=0,001$) und 10% Kontrast ($p < 0,01$) mit 0D signifikante Differenzen. Im Gruppenvergleich sind die Spikeraten bei positiver Defokussierung sowie Kontrastreduktion nicht unterschiedlich. Die Spikeraten bei fokussiertem ($p=0,01$) und negativ defokussiertem ($p < 0,001$) Film sind signifikant höher als jene bei Stimulation mit dem positiv defokussierten Film.

Kontrast selektiert- Versuchsbedingungen



Kontrast selektiert- Gruppen

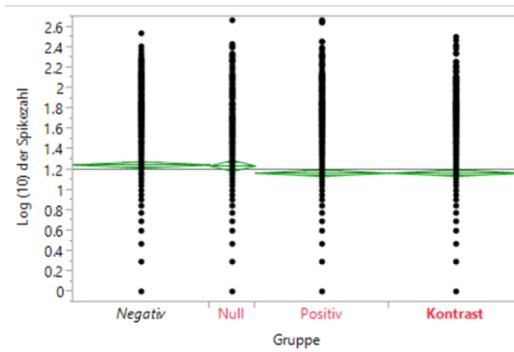
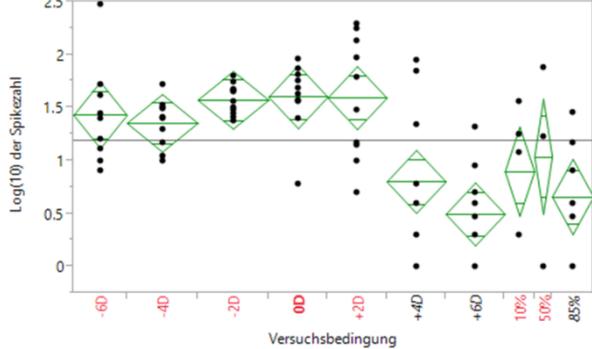


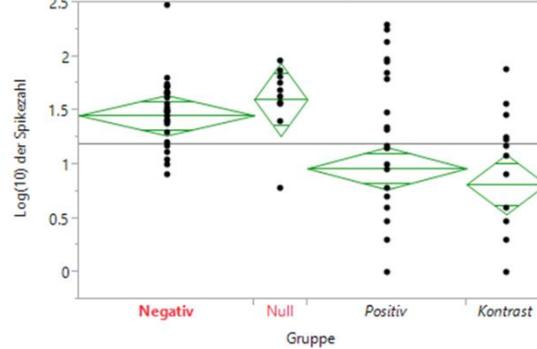
Abbildung 105: Selektion jener Zellen, welche der Klasse K (n=38; 17%) zugeordnet wurden. Im Vergleich der Versuchsbedingungen verhalten sich die Signifikanzen entsprechend jener der Klasse P. 4D ($p=0,023$), 6D ($p<0,047$) sowie 10% Kontrast ($p=0,012$) weisen signifikante Unterschiede der Spikeraten zu jenen der 0D Reizantwort auf. Bei den gruppierten Versuchsbedingungen ist nur zwischen den Spikeraten bei kontrastreduziertem Film gegenüber den Spikeraten bei negativ defokussiertem Film ein signifikanter Unterschied feststellbar ($p=0,01$).

Werden einzelne Zellen aus den verschiedenen Klassen gezeigt (Abbildung 106 Abbildung 109), fallen besonders jene Zellen auf, deren Spikeraten über die Versuchsbedingungen aufgetragen eindeutige, graduelle Muster ergeben (Abbildung 106 und Abbildung 109).

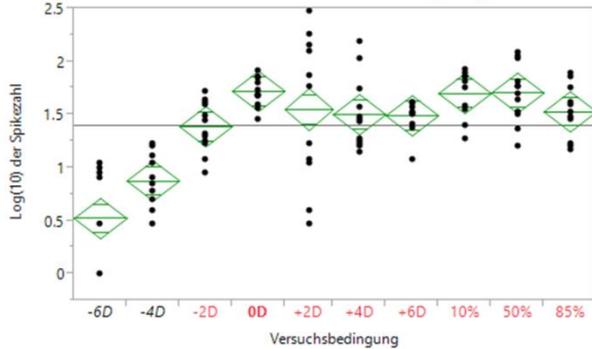
A Zelle 129 - Versuchsbedingungen



B Zelle 129 - Gruppen



C Zelle 155 - Versuchsbedingungen



D Zelle 155 - Gruppen

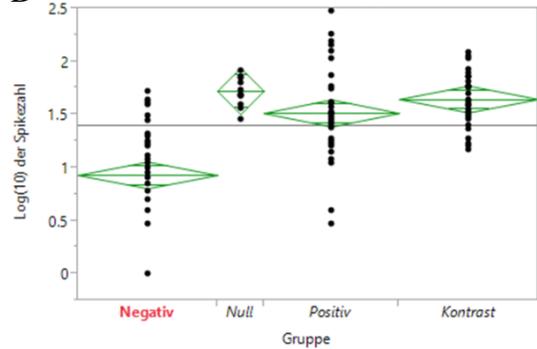


Abbildung 106: Exemplarische Darstellung zweier Zellen aus Klasse N. Während Zelle 129 (A+B) trotz unklarer Signifikanzen die Selektionskriterien erfüllte, suggeriert das Antwortverhalten von Zelle 155 (C+D) eine Abhängigkeit der Spikerate von der Stärke des negativen Defokus.

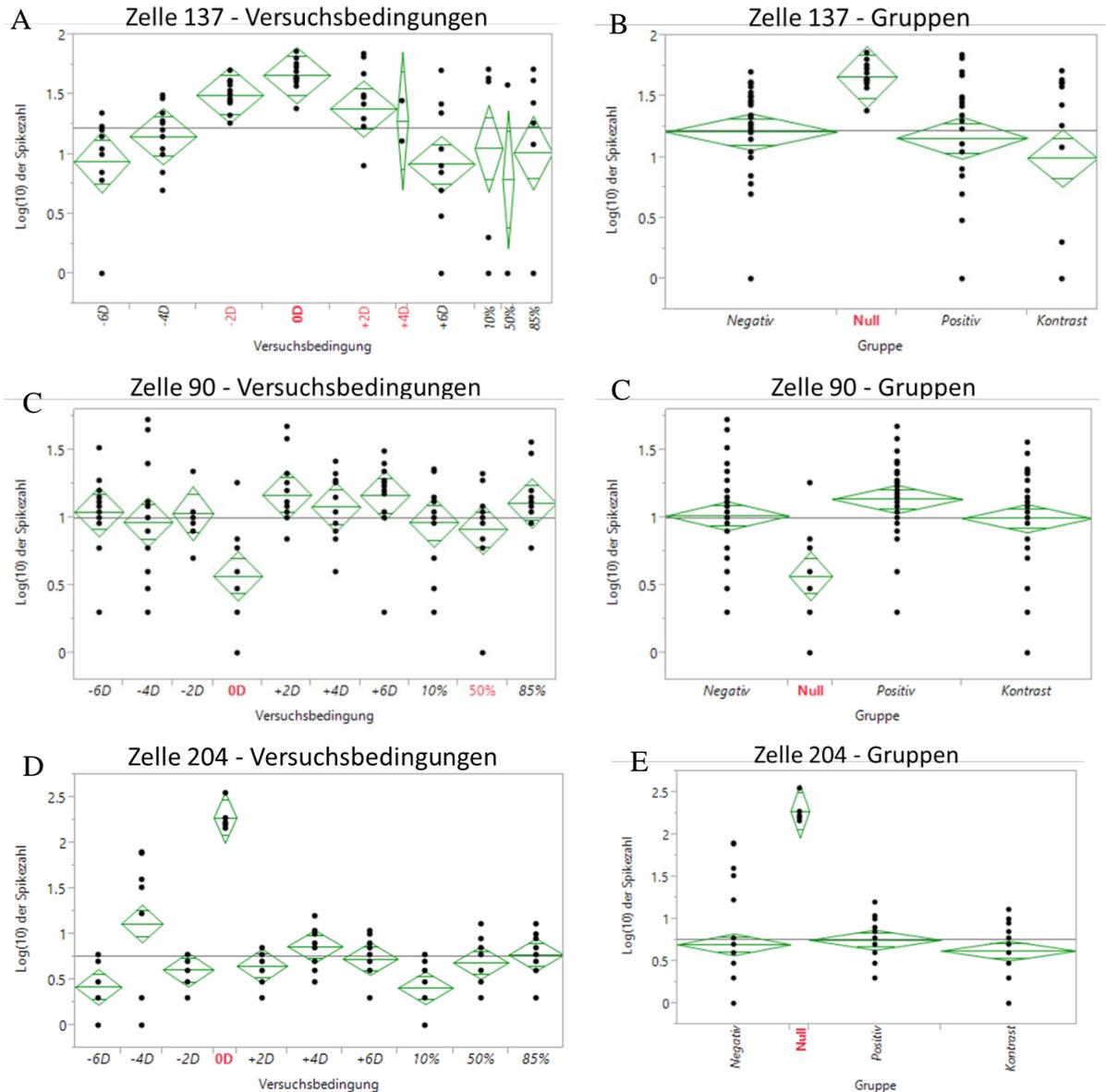


Abbildung 107: Auswahl von drei Zellen aus Klasse F. Einige Zellen zeigen eine mit zunehmender Defokussierung sinkende Spikerate, ausgehend von der Spikerate bei fokussiertem Film (A+B).

Andere Zellen zeigen ein vergleichsweise einfaches Antwortschema mit stark reduzierter (C+D) oder erhöhter (E+F) Spikerate bei der Stimulierung durch den Film im Fokus.

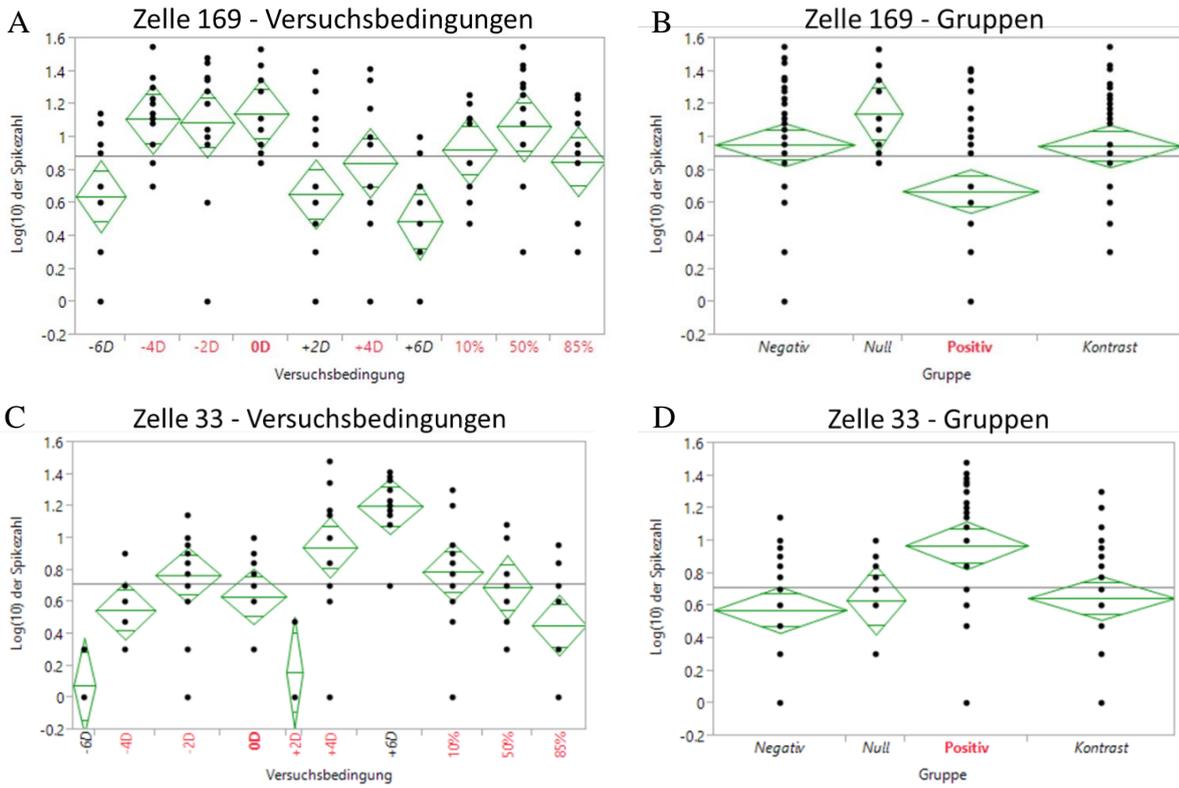


Abbildung 108: Auswahl zweier Zellen aus Klasse P. Bei beiden Zellen sind die Signifikanzen bei Betrachtung der Reizantworten der einzelnen Versuchsbedingungen unklar. Werden die Versuchsbedingungen gruppiert, so ist die Spikerate der Zelle bei positiver Defokussierung entweder erhöht (D) oder reduziert (B).

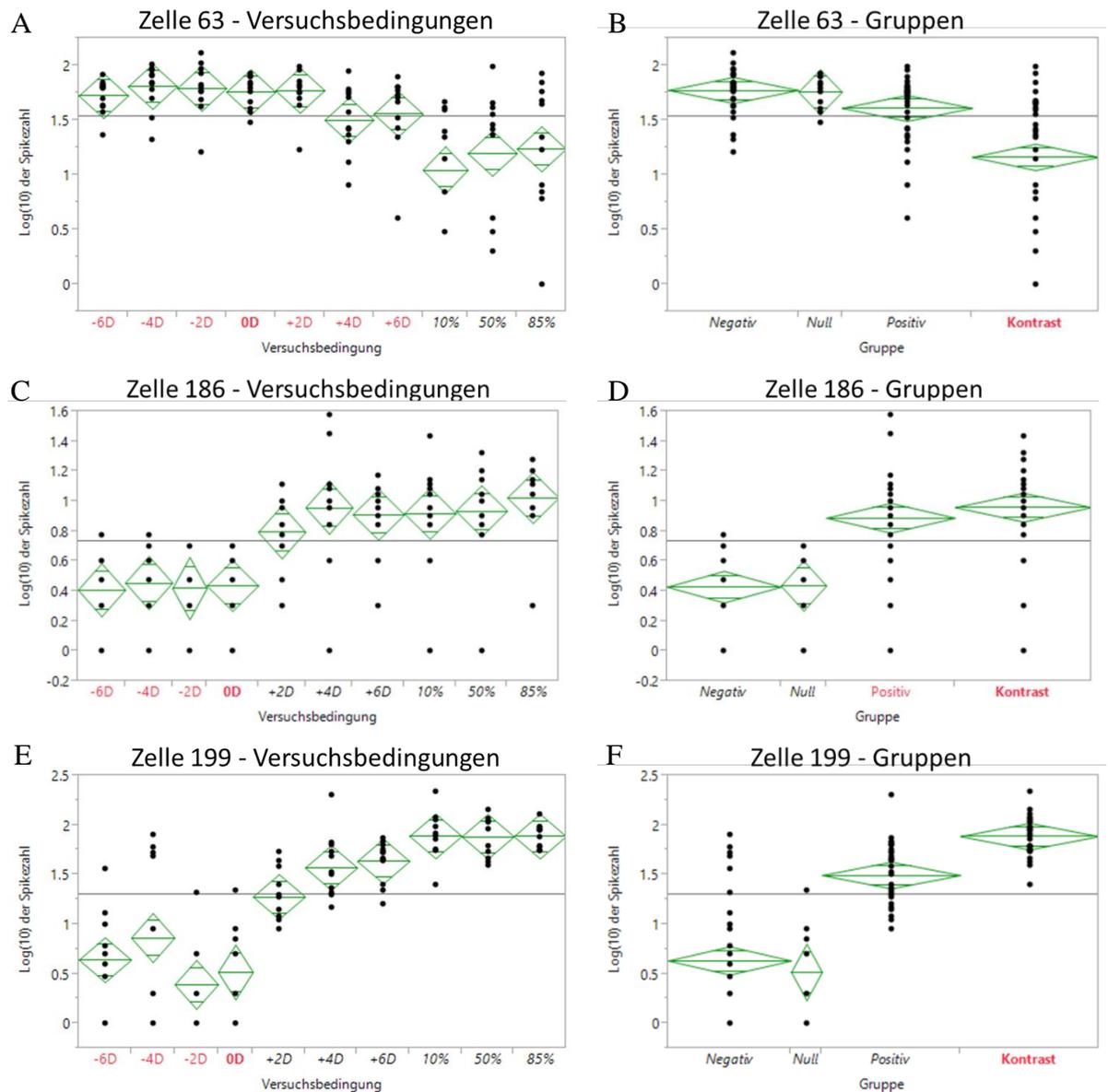


Abbildung 109: Logarithmierte Spikeraten dreier Zellen der Klasse K. Zelle 63 (A+B) zeigt eine deutliche Reduktion der Spikerate bei Reduktion des Kontrastes. Zelle 186 (C+D) weist eine konstant erhöhte Spikerate bei positiver Defokussierung und Kontrastreduktion auf, wohingegen Zelle 199 (E+F) besonders hohe Spikeraten bei Kontrastreduktion zeigt.

Zufallsgenerierte Kontrolldaten

Der zufallsgenerierte Datensatz entspricht jenen der bislang gezeigten Experimente. Die Daten weisen keine Auffälligkeiten auf und keine der zufallsgenerierten Zellen erfüllt die Selektionskriterien.

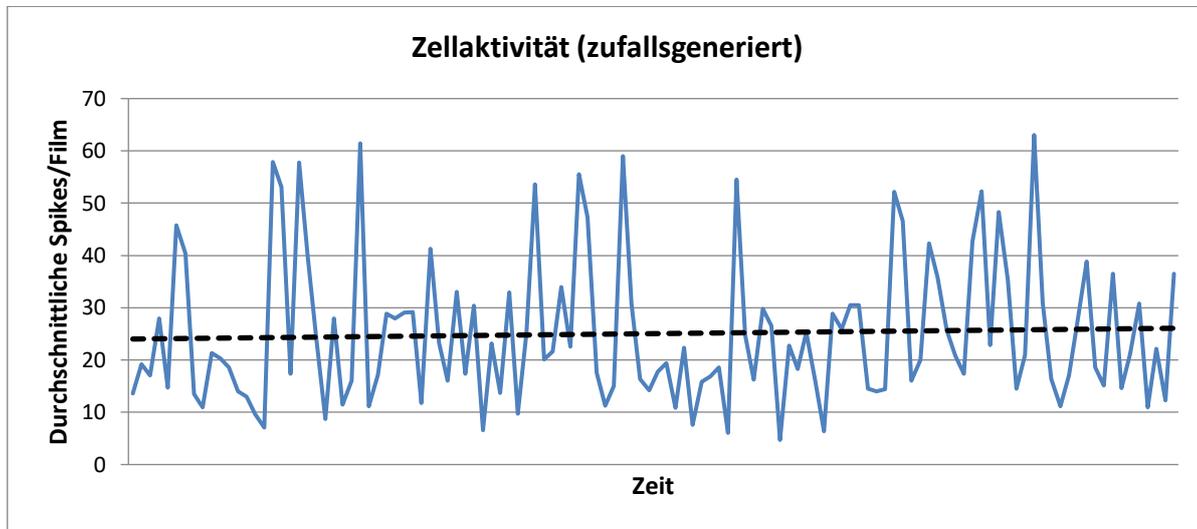


Abbildung 110: Aktivitätsmuster des zufallsgenerierten Datensatzes zu Experiment 3.2.4.

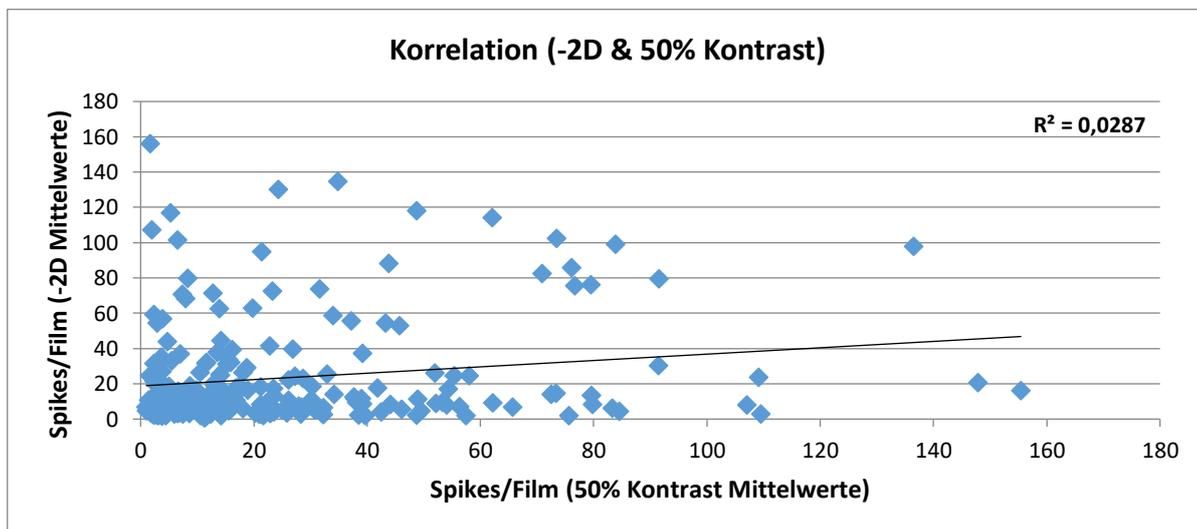


Abbildung 111: Streudiagramm der Vergleichspaarung mit dem höchsten Korrelationskoeffizienten innerhalb des zufallsgenerierten Datensatzes. Es liegt keine Korrelation vor.

3.3 Ableitungen an Mäuseretinae

Die im folgenden analysierten Daten der Mäuseretinae wurden chronologisch vor jenen der Hühnerretinae ermittelt. Die Methodik der Messung entsprach nicht jener der Experimente mit Hühnerretinae. Beispielsweise kam kein automatischer Trigger zur Speicherung der Reizantworten entsprechend der einzelnen Filmwiederholungen zum Einsatz. Ebenso entsprach die Auswahl und Wiederholungszahl der einzelnen Versuchsbedingungen nicht den neueren Methoden.

Die Auswertung der verwendbaren Daten wurde dennoch vorgenommen, um möglicherweise einen Vergleich zu den Daten der Hühnerretinae ziehen zu können und eventuelle, in der Zukunft durchgeführte Versuche zu erleichtern.

Als Versuchsbedingungen wurden -7D, -5D, 0D, +5D sowie +7D verwendet.

Datenstruktur

Insgesamt konnten 142 Zellen von 5 Retinae verwendet werden. Damit liegen 16182 einzelne Spikeraten für Filmwiederholungen vor. Da die Messungen jedoch nicht mit der notwendigen Kontinuität durchgeführt wurden, werden hier die Ergebnisse für die einzelnen Unterversuche erst ab der statistischen Auswertung in JMP getrennt aufgelistet.

Selektionskriterien

Zur Auswahl der Zellen wurden bei sieben Versuchsbedingungen die Kriterien der Versuche 3.2.2 und 3.2.4 verwendet. Es musste also in der Varianzanalyse der Versuchsbedingungen sowie der Gruppen je eine sehr hohe Signifikanz ($p < 0,001$) und eine einfache Signifikanz ($p < 0,05$) vorliegen.

Waren nur fünf Versuchsbedingungen verfügbar, wurde eine hohe Signifikanz ($p < 0,001$) eines Wertes gegenüber den übrigen Werten, bei nur zwei Versuchsbedingungen wurde eine einfache Signifikanz ($p < 0,05$) vorausgesetzt.

Zur Einsortierung in eine Klasse (hier: N, F sowie P) musste weiterhin im t-Test der Varianzanalyse die jeweilige Gruppe der Versuchsbedingungen gegenüber den beiden verbliebenen Gruppen eine signifikante Differenz aufweisen.

Gemessene Daten

Die Verteilungskurve der Spikeraten hat ihr Maximum bei 2 auf der X-Achse. Dies bedeutet, dass die häufigste Anzahl an Spikes pro Film bei 2 lag (Abbildung 112).

In der logarithmierten Datenverteilung ist dies aufgrund der Eigenschaften des Zehnerlogarithmus nicht mehr zu beobachten (Abbildung 113).

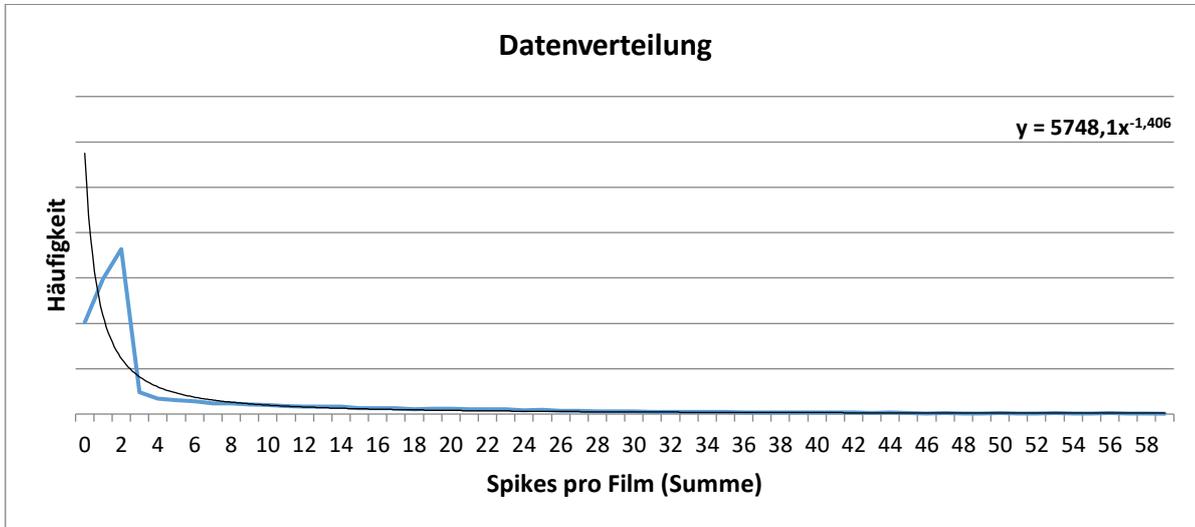


Abbildung 112: Verteilung der absoluten Spikeraten der einzelnen Filmwiederholungen. Entgegen den Verteilungskurven der Hühnerretinae (z.B. Abbildung 46) zeigt der Kurvenverlauf einen Knick unterhalb von 2 Spikes/Film.

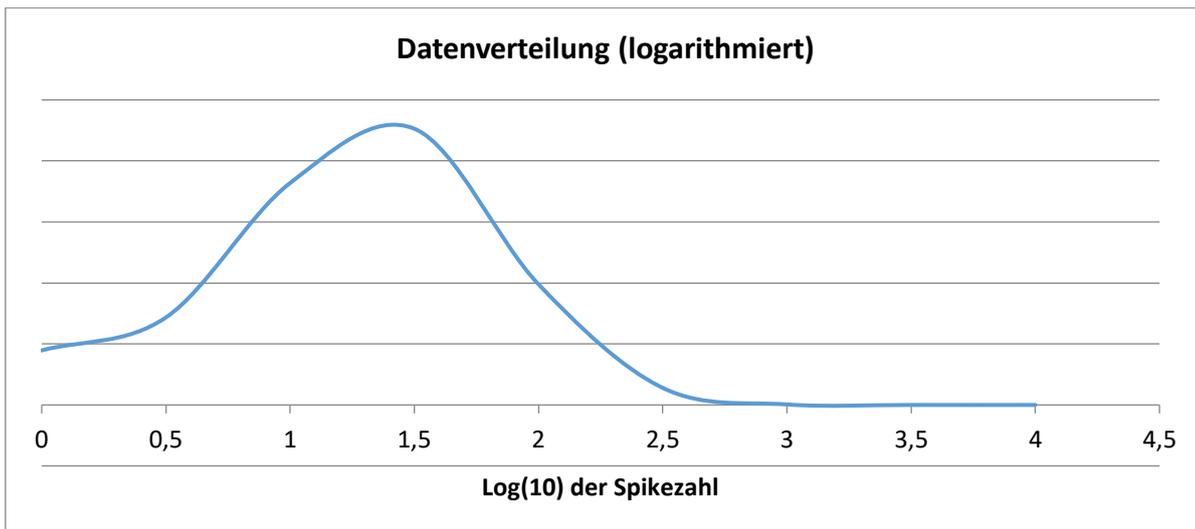


Abbildung 113: Log(10) der Spikeraten. Der Kurvenverlauf entspricht jenem einer Normalverteilung, die Auffälligkeit aus Abbildung 112 ist durch den Logarithmus nicht mehr erkennbar.

Die Korrelationskoeffizienten in Tabelle 14 zeigen kein deutliches Schema und erscheinen eher zufällig. Die höchsten und niedrigsten Korrelationswerte (Abbildung 114) zeigen jedoch die erwarteten hohen Signifikanzen ($p < 0,01$) und weisen somit eindeutig auf echte Zellantworten hin. Zu beachten ist, dass sowohl die höchsten, als auch die niedrigsten Korrelationen Defokussierungen um 7D beinhalten, welche die geringste Anzahl an einzelnen Messwerten haben.

Tabelle 14: Tabelle der Korrelationskoeffizienten. Es ist keine klare Tendenz oder besondere Erhöhung oder Reduktion der Korrelation bei bestimmten Paarungen zu beobachten.

	-7D	-5D	0D	+5D	+7D
-7D		0,90	0,66	0,98	0,73
-5D	0,90		0,86	0,87	0,69
0D	0,66	0,86		0,82	0,55
+5D	0,98	0,87	0,82		0,68
+7D	0,73	0,69	0,55	0,68	

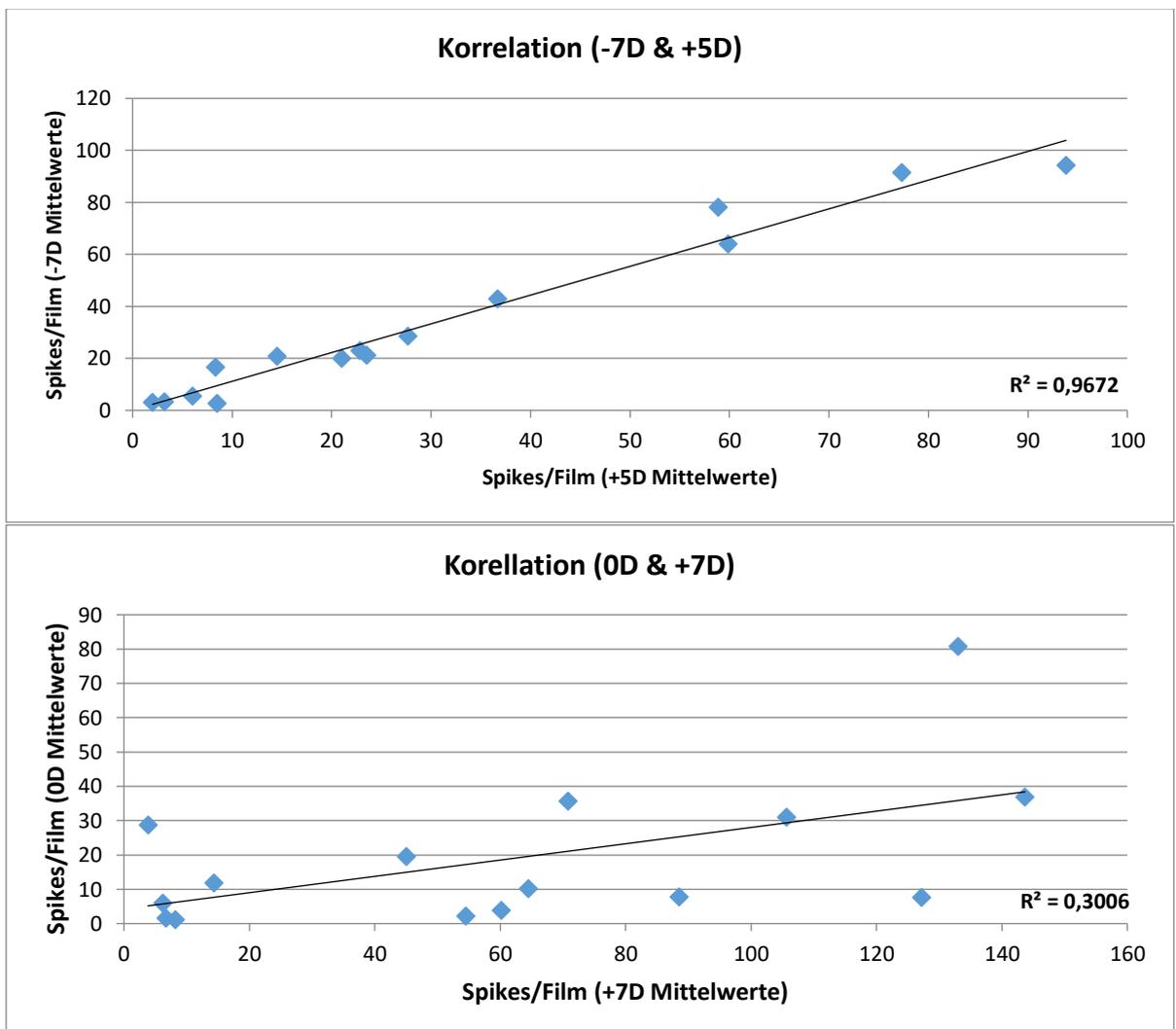


Abbildung 114: Streudiagramme der Vergleichspaare mit dem höchsten (A) sowie dem niedrigsten (B) Korrelationskoeffizienten. Beide sind signifikant ($p < 0,05$).

Im Balkendiagramm der Rohdaten (Abbildung 115) fällt eine starke Erhöhung der Spikeraten bei den Reizantworten auf die 7D Defokussierungen auf, sowohl mit positivem als auch mit negativem Vorzeichen. Sie sind entsprechend signifikant ($p < 0,01$) höher als die Spikeraten der 0D Reizantworten. Ebenso ist die Spikerate bei Defokussierung des Films um +5D signifikant höher als jene im Fokus.

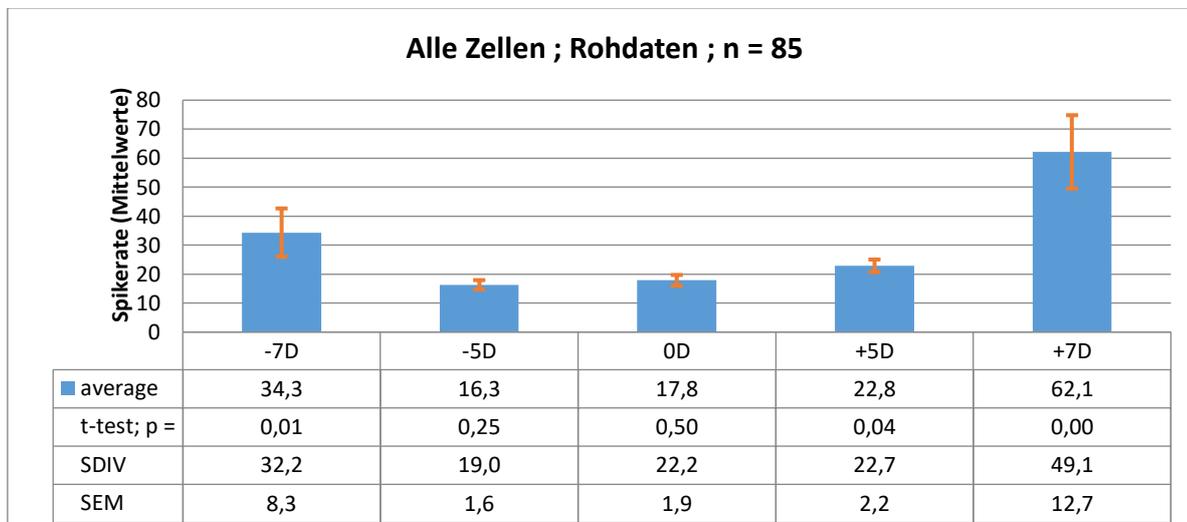


Abbildung 115: Balkendiagramm der absoluten Spikeraten der Zellen der Mause retinae. Auffällig ist die deutlich signifikante ($p < 0,01$) Erhöhung der Spikeraten bei starker Defokussierung.

3.3.1 Vergleich der Reizantworten bei negativem Defokus und ohne Defokus

Vergleichbar mit Experiment 3.2.1 liegen hier einige Zellen ($n=33$) vor, welche mit Filmen im Fokus sowie solchen mit Defokussierung um -5D stimuliert wurden. Die Analyse der Klasse der selektierten Zellen ($n=6$, 18,2%) weist ebenso wie jene aller Zellen keine Signifikanzen auf.

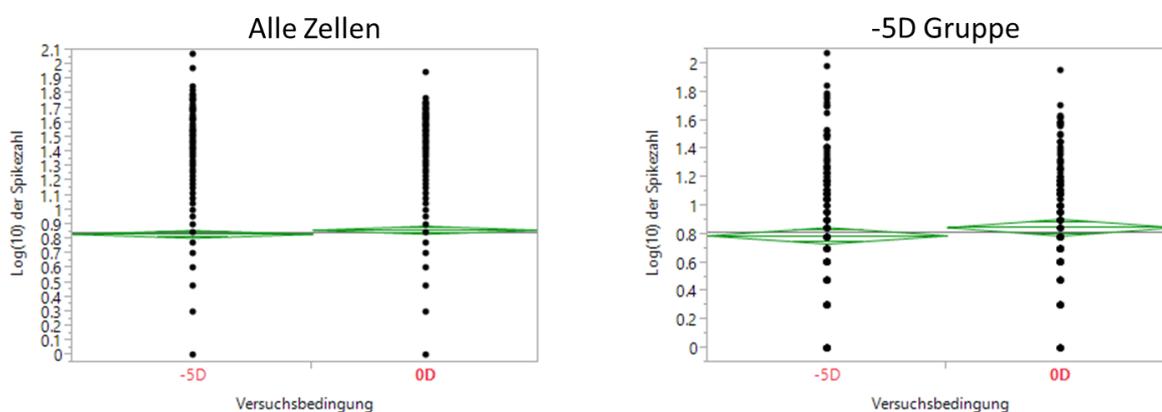


Abbildung 116: Analyse aller Zellen der Mause retinae ($n=33$) welche mit den Versuchsbedingungen -5D sowie 0D stimuliert wurden. Es existieren weder bei allen Zellen noch bei der selektierten Klasse ($n=6$) signifikante Unterschiede zwischen den Reizantworten der Versuchsbedingungen.

3.3.2 Defokussierung um 5D mit positivem und negativem Vorzeichen

Insgesamt 94 Zellen wurden mit den Versuchsbedingungen -5D, +5D sowie 0D stimuliert. Im Vergleich aller Versuchsbedingungen zeigt sich eine Signifikanz der -5D gegenüber der 0D Reizantwort (Abbildung 117 A). In der 0D Klasse verliert sich diese Signifikanz (Abbildung 117 B), wohingegen sie in der -5D Klasse besonders hervorstechend ist (Abbildung 117 C). Die +5D Klasse zeigt eine deutliche, hoch signifikante Steigerung der Spikerate bei positiver Defokussierung (Abbildung 117 C).

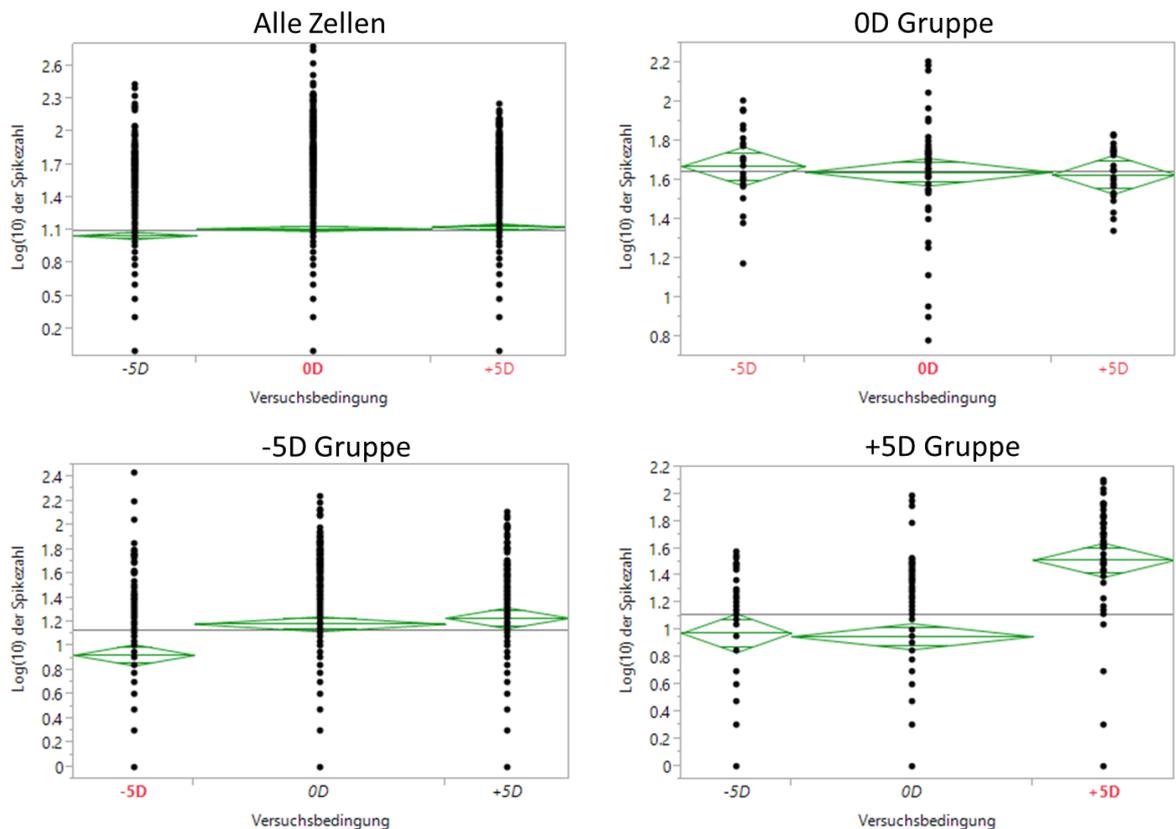


Abbildung 117: Logarithmierte Spikeraten einiger Zellen (n=94) der Mausretinae. Bemerkenswert ist der Verlust der Signifikanz innerhalb der Klasse F (B) gegenüber allen Zellen (A) sowie die deutlichen Signifikanzen in den Klassen N und P (C+D).

3.3.3 Stufenweise Defokussierung um 7D und 5D mit positivem und negativem Vorzeichen

Von den 15 Zellen (Abbildung 118), welche mit um bis zu +/-7D defokussierten Filmen stimuliert wurden, erfüllen 10 (67%) die Selektionskriterien. 8 (53%) dieser Zellen erfüllten die Kriterien der Klasse „Null“, jeweils eine ist als „negativ“ und „positiv“ kodierend ausgewählt, wobei diese aufgrund ihrer unklaren Reizantworten als Zufallsprodukte betrachtet werden können.

Bemerkenswert ist in allen Grafiken, sowohl bei Betrachtung aller Zellen als auch der Selektierten Zellen, dass die 0D Reizantwort die niedrigste Spikerate aufweist und diese hin zu stärkerem Defokus, annähernd symmetrisch, ansteigt.

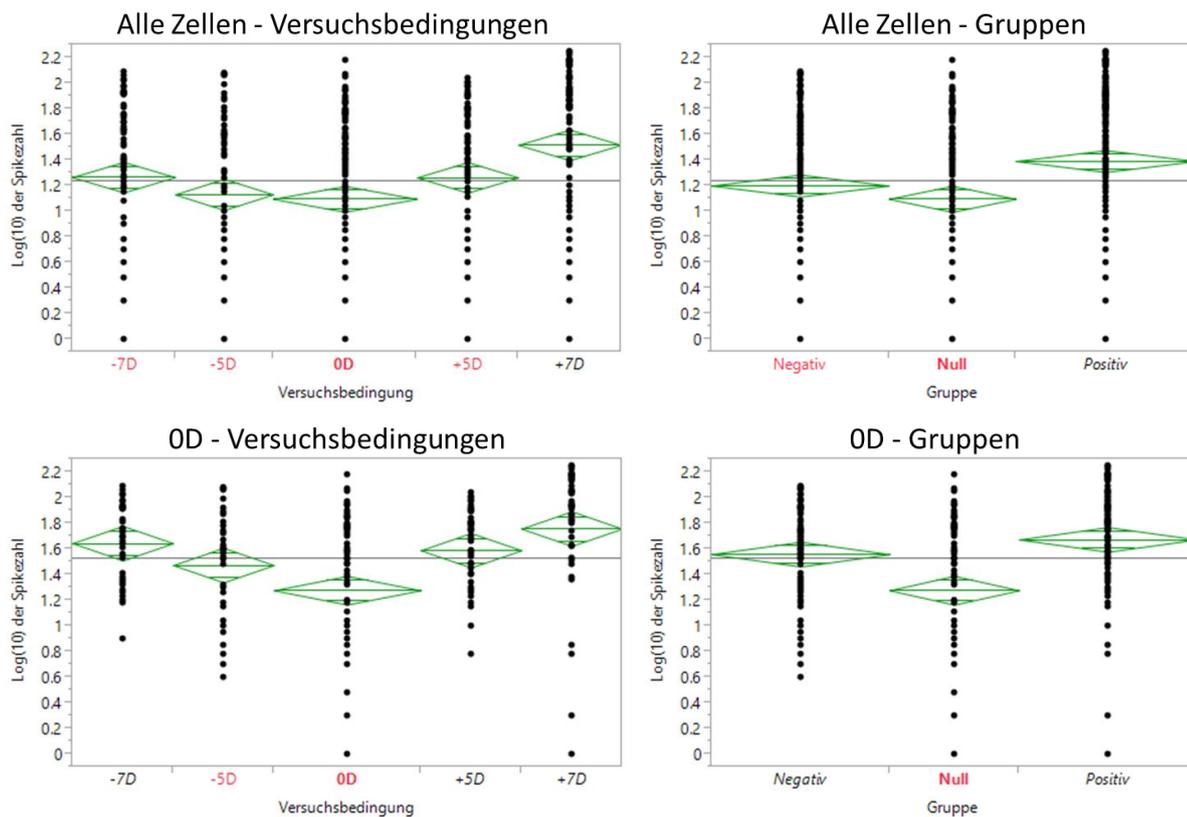


Abbildung 118: Logarithmierte Spikeraten der mit um bis zu 7D defokussierten Filme gereizten Zellen (n=15). Acht dieser Zellen wurden in die Klasse „Null“ selektiert. Die Signifikanzen bei Betrachtung der 15 stimulierten Zellen ($p < 0,001$ in A+B sowie $p < 0,01$ für alle Signifikanzen in C+D) ähneln sich und werden durch die Selektion prominenter.

4 Diskussion

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten eröffnen vielfältige Möglichkeiten der Interpretation. Allgemein lässt sich festhalten, dass die Datenverteilung in allen Experimenten sehr vergleichbar ist. Werden diese Daten logarithmiert, so ergibt sich eine Normalverteilung der Datenhäufigkeit über die logarithmierte Spikezahl. Einzig die Verteilung der bei Mäuseretinae aufgezeichneten Spikeraten weist eine geringfügige Abweichung in der absoluten Anzahl der Spikes gegenüber den Hühnerdaten auf (vergleiche Abbildung 46 und Abbildung 112). Dieser Unterschied verschwindet jedoch durch die Logarithmierung und fällt somit bei der Auswertung nicht ins Gewicht.

Die Aktivität der Retinae in allen Experimenten ist relativ gering, jedoch lässt sich dies durch die gering gewählte Temperatur der Pufferlösung leicht erklären, sowie dadurch, dass in-vitro Messungen keine idealen Bedingungen für extrahierte Retinae darstellen können.

Die Korrelationswerte über alle Experimente hinweg sind sehr hoch und unterscheiden sich sehr deutlich von jenen der zufallsgenerierten Daten, in welchen jeglicher Zusammenhang der Werte entfällt. Als Ausnahme muss hier Experiment 3 (Kapitel 3.2.2 auf Seite 72) aufgeführt werden, in welchem die 0D Reizantworten einige nicht signifikante Korrelationswerte zu anderen Reizantworten vorweisen.

In einigen Experimenten wird ein Zusammenhang der Stärke der Korrelation mit der Ähnlichkeit der Reize offenbar (Experiment 3 auf Seite 72 und Experiment 5 auf Seite 92). Vergleicht man die Ergebnisse zweier Reize aus einer Reizgruppe, jedoch mit unterschiedlicher Reizstärke, so tendiert die Korrelation hier dazu, höhere Werte anzunehmen als in Vergleichen zwischen Werten verschiedener Reizgruppen.

Ab einer Defokussierung um 4D in negativer Richtung (Experiment 2, Seite 65) wird eine signifikante Veränderung der Spikeraten gegenüber der nicht defokussierten Reizung offenbar. Die Identifizierung des positiven Defokus muss in dieser Arbeit in Frage gestellt werden. Über alle Experimente hinweg, welche eine Stimulierung der Retinae mit positiv defokussierten Filmen beinhalten, sind die nachweisbaren Unterschiede in der Spikerate der Zellen im negativen Bereich wesentlich deutlicher als im positiven Bereich. Weiterhin ist in den entsprechend selektierten Zellgruppen (Beispielsweise in Experiment 3, Seite 72ff; Abbildung 76 und Abbildung 77) keinerlei Unterschied der Zellantworten gegenüber positivem Defokus im Vergleich zu den weiteren Versuchsbedingungen feststellbar, obgleich die identische Selektionsmethode bei negativen Defokus eindeutige Signifikanzen liefert.

Die Antworten der Zellen gegenüber kontrastreduzierten Filmen im Vergleich zu defokussierten Zellen liefert in den beiden Experimenten, die hierüber Daten enthalten (Experiment 4, Seite 83 sowie Experiment 5, Seite 92) unklare Ergebnisse.

4.1 Erörterung der Ergebnisse

Aufgrund der Tatsache, dass die Ganglienzellen der Retina verschiedenste Aufgaben erfüllen und somit immer nur ein gewisser Prozentsatz von Zellen an der Verarbeitung einzelner Eigenschaften der optischen Reize beteiligt ist, war auch zu erwarten, dass nur ein sehr geringer Anteil der gesamten Population von Zellen spezifisch auf eine Defokussierung des Films anspricht.

Daraus folgt, dass eine Untersuchung der gesamten vorliegenden Population nicht zielführend sein kann. Zwar liegen im Film vermutlich alle notwendigen physikalischen Eigenschaften vor, welche eine Erkennung von positivem und negativem Defokus ermöglichen, jedoch sind auch Farb- und Helligkeitskontraste, verschiedene Bewegungsmuster, vielfältige Formen sowie die Veränderung all dieser Eigenschaften über die Zeit hinweg vorhanden. Diese sehr unterschiedlichen Reizungen erfordern spezifisch reagierende Zellen. Da sie jedoch alle zur selben Zeit vorliegen, müssen Zellen selektiert werden, welche für die zu untersuchenden Reizungen empfänglich sind.

Tatsächlich wurden in den Experimenten 3 bis 5 insgesamt 2,4% bis 10,8% der Zellen in die Klasse N und 4% bis 6,5% der Zellen in die Klasse P einsortiert. Damit wären im Mittel 6,47% der Zellen für negativen und 4,88% der Zellen für positiven Defokus empfindlich. Dementsprechend zeigen 9,61% der Zellen bei scharfen, fokussierten Filmen auffällige Spikeraten. Für einfache Kontrastveränderungen zeigten sich 11,62% der Zellen empfänglich, wobei nur zwei Experimente auch Versuchsbedingungen mit einfacher Kontrastreduktion beinhalteten.

Selektionen beinhalten immer das Risiko, Zellen zu selektieren welche nur zufällig den Selektionskriterien entsprechen. Weiterhin besteht immer die Möglichkeit, dass durch eine Selektion aufgrund spezieller Parameter Scheinsignifikanzen erzeugt werden. Beides sollte jedoch mit den verwendeten Methoden nicht ins Gewicht fallen.

4.1.1 Veränderungen der Spikeraten bei negativ defokussierten Filmen

Zwischen den Ergebnissen der Hühner- und Mäuseretinae lassen sich Parallelen ziehen. Da die Datenaufzeichnung zum Zeitpunkt der Messungen mit den Mäusen noch nicht ausgereift war, werden die Ergebnisse getrennt behandelt.

Hühnerretinae

Wurden die Ergebnisse über die gesamten Zellpopulationen der einzelnen Experimente hinweg analysiert, so ergab sich zunächst das erwartete Bild. Es ist in den ersten Experimenten (Seiten 59ff) kein signifikanter Unterschied in den Spikeraten bei der Defokussierung gegenüber den Spikeraten bei fokussiertem Film feststellbar (Abbildung 50 & Abbildung 61). Bereits in Abbildung 61 ist jedoch zu erkennen, dass der Mittelwert der Spikerate bei Defokussierung geringer wurde. Steigt die Anzahl der ausgewerteten Zellen (Abbildung 73), so wird dieser Unterschied bereits signifikant. Diese Reduktion der Spikeraten ist in Experiment 3.2.2 (Seite 72) und in Experiment 3.2.3 (Seite 83) zu beobachten. In Experiment 3.2.2 liegt jedoch eine deutliche Erhöhung der Spikeraten bei einer Defokussierung um -2D vor. Da bei den übrigen Experimenten die Spikerate am höchsten war, wenn der Film fokussiert war, besteht hier die grundsätzliche Möglichkeit, dass durch eine versehentliche Verschiebung der Badal Linse oder

Verstellung des Versuchstisches, auf welchem die MEA Kammer befestigt war, der reale Fokuspunkt sich bei der eigentlichen -2D Position des Bildschirms befand. Dieser Fehler kann im Nachhinein nicht vollständig ausgeschlossen werden. Jedoch lag hier der Wert bei stärkster negativer Defokussierung signifikant unter sowohl dem angegebenen 0D Wert als auch dem angegebenen -2D Wert, was den Ergebnissen der anderen Experimente entsprach.

Bereits hier fällt auf, dass die negative Defokussierung sich offenbar von der positiven Defokussierung unterscheiden lässt.

Selektiert man die Zellen aufgrund der Unterschiede der Spikeraten zwischen dem fokussierten und dem defokussierten Film, erhält man die Klassen der Zellen, welche entweder für positiven oder für negativen Defokus einen signifikanten Unterschied in ihrer Spikerate gegenüber einem fokussierten Reiz aufweisen.

Die Selektion ignoriert, ob der Vergleichswert (Spikerate bei negativem oder positivem Defokus) höher oder niedriger als der Kontrollwert (Spikerate ohne Defokus) ist. Aus diesem Grund, sowie aufgrund des Vergleichs mit zufallsgenerierten Daten, kann ausgeschlossen werden, dass diese Klassen zufälliger Herkunft sind.

In diesen selektierten Klassen herrscht keine Homogenität, es werden also Zellen zusammengefasst, welche sich in ihrem Antwortmuster bei Defokussierung zum Teil deutlich voneinander unterscheiden, sowohl in der Stärke als auch der Richtung der Abweichung. Dennoch zeigt sich über alle Experimente hinweg, dass die Klasse der für negativen Defokus selektierten Zellen meist eine signifikante Veränderung ihrer Spikeraten gegenüber den verbliebenen Versuchsbedingungen aufzeigt.

Im Gegensatz hierzu waren in der Klasse der für positiven Defokus selektierten Zellen meist deutlich geringere oder keine Unterschiede der Spikeraten gegenüber den Vergleichswerten bei den verbliebenen Versuchsbedingungen zu finden. Diese Tatsache wird besonders bei einer Gruppierung der Versuchsbedingungen mit gleichem Vorzeichen deutlich (Experimente 3-5, Seiten 72ff).

Mäuseretinae

Betrachtet man die Auswertung aller Zellen der Mäuseretinae, welche mit einem maximalen Defokus um 5 Dioptrien gereizt wurden, so verringern sich die Spikeraten bei negativem Defokus. Diese Beobachtung bestätigt, was anhand der Hühnerretinae berichtet wurde. In der Klasse F erscheint kein Unterschied zwischen den Spikeraten, wohingegen Klasse N eine Verringerung der Spikeraten bei negativem Defokus, Klasse P eine Erhöhung bei positivem Defokus zeigt. Betrachtet man die Zellen, welche auch mit Defokussierungen um plus und minus 7 Dioptrien stimuliert wurden, steigen die Spikeraten bei Defokussierung in beide Richtungen deutlich an. Da hier nur 15 Zellen ausgewertet wurden, kann dieses Antwortverhalten nicht abschließend bewertet werden.

4.2 Interpretation

Die Ganglienzellen der Retina stellen die Verbindungszellen des Auges zu den höheren verarbeitenden Zentren des Gehirns dar. Aufgrund der sehr hohen Anzahl von Photorezeptoren und der damit einhergehenden Datenmenge, ist eine sehr starke Reduktion des Datenvolumens von den Photorezeptoren bis hin zu den Ganglienzellen notwendig und auch quantifiziert. Die im menschlichen Auge von etwa 120 Millionen Photorezeptoren ermittelten Informationen der Umwelt werden auf nur etwa 6 Millionen Ganglienzellen reduziert. Dies entspricht einer Reduktion der anfallenden Daten um 95%. Es ist also davon auszugehen, dass auch bei der Übermittlung von Informationen über die Bildschärfe eine Datenreduktion vorliegt.

Wird ein Bild defokussiert, so entsteht bekanntlich auch eine Kontrastreduktion. Diese unterscheidet sich jedoch von einer einheitlichen Kontrastreduktion insofern, als dass nicht alle im Bild oder Film vorhandenen Ortsfrequenzen in gleichem Maße reduziert werden. Je detailreicher das Bild, desto deutlicher ist der Unterschied. In der Natur tritt eine einheitliche Kontrastreduktion des Bildes auf der Retina nur in wenigen, zeitlich sehr begrenzten Phasen auf. Offensichtliche, für Hühner relevante Beispiele sind Nebelbildung sowie Dämmerlicht. Bewegt sich ein Huhn jedoch im normalen Lebensraum, so tritt eine Kontrastreduktion meist nur in Form von Defokussierung auf. Wird ein Objekt fokussiert, so werden andere Objekte in der Nähe oder Distanz defokussiert.

Die vorliegenden Daten erlauben die Interpretation, dass die Information über den positiven Defokus auf der Ebene der Ganglienzellen nicht vorhanden ist. Ist ein Film jedoch negativ defokussiert, so kann die Retina dies erkennen. Kombiniert mit der Information über die Kontrastreduktion im Bild ergibt sich so die Möglichkeit, positive Defokussierung zu erkennen, ohne hierfür spezifische Ganglienzellen zu benötigen. Ist ein Reiz kontrastreduziert aber nicht negativ defokussiert, wäre eine Interpretation der Kontrastreduktion als positiv defokussiert möglich.

Ebenso ist es möglich, dass die Information über den positiven Defokus in der weiterführenden Verarbeitung nicht notwendig ist und somit aus Gründen der Datenreduktion nicht vorliegt.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die Verarbeitung und Bewertung von positivem und negativem Defokus sich deutlich unterscheiden. Der bereits in der Einleitung vorgestellte Wachstumsfaktor ZENK ist Teil der unterschiedlichen Reaktionen der Augen auf die verschiedenen Defokussierungen. Mit Flimmerlicht lässt sich Myopie, abhängig von der Frequenz des Flimmerns hemmen, es hat jedoch keinen Einfluss auf die Entstehung von Hyperopie. Sehr kurzes Tragen von Pluslinsen hemmt die Entwicklung von Myopie wesentlich stärker als das Tragen von Minuslinsen die Entwicklung von Hyperopie und beide Prozesse haben einen unterschiedlichen zeitlichen Verlauf. Wird Atropin ins Auge getropft, so tritt eine starke Hemmung der Myopieentwicklung ein, es hat aber keinen Einfluss auf die Entwicklung der Hyperopie. Ebenso hat eine Reizung des sogenannten „ON-Pathways“ über Licht oder Pharmakologie eine hemmende Wirkung auf die Myopie, die Reizung des „OFF-Pathways“ verstärkt sie.

Viele dieser Unterschiede in der Reaktion des Auges auf positive und negative Defokussierung haben gemeinsam, dass eine Einflussnahme auf die Erzeugung der Myopie durch Minuslinsen, oft möglich und sehr deutlich ist. Demgegenüber zeigen viele der untersuchten Pharmaka und Änderungen der Bildqualität auf der Netzhaut keinen Einfluss auf die Erzeugung von Hyperopie mit Pluslinsen.

Dieser generelle Unterschied in den Wirkungen der Linsen lässt sich auf die Ergebnisse dieser Arbeit übertragen. Die entsprechend selektierten Zellen zeigen meist eine messbare und deutliche Reaktion bei negativer Defokussierung. Auf gleiche Weise selektierte Zellen zeigen jedoch keine, oder nur kaum veränderte Reaktionen bei positiver Defokussierung.

Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass von Mani & Schwartz (Current Biology 2016, im Druck) eine retinale Ganglienzelle der Maus gefunden wurde, welche offenbar für Defokussierung empfindlich ist. Die beschriebene Zelle reagiert mit erhöhter Spikerate und verringerter Latenz auf eine Vergrößerung der Zelle. Ihre Funktion wird von Baden et. al im gleichen Journal diskutiert, möglicherweise spielt sie eine Rolle bei der Emmetropisierung der Maus.

4.3 Einschätzung der Methoden

Die verwendeten Versuchs- und Analysemethoden wurden Schritt für Schritt entwickelt. Der ursprüngliche Gedanke, jedwede Zellselektion zu unterlassen, wurde frühzeitig verworfen. Er war nicht haltbar, da im Umfeld eines Gewebes mit spezialisierten Zellen für die verschiedensten visuellen Eigenheiten von Bildern und speziell Filmen ist eine Selektion unerlässlich, um sinnvolle Aussagen zu ermöglichen. Eine aktuelle Studie von Baden et. al. (Baden et al. 2016) beschreibt 32 verschiedene Typen von Ganglienzellen bei Mäusen, gegenüber den zuvor angenommenen 15-20 verschiedenen Typen. Dennoch kommen die Autoren zu dem Schluss, dass selbst bei dieser hohen Anzahl von klassifizierten Zellen eine weitere Unterteilung notwendig ist und zeigen immunhistochemische Hinweise hierfür.

Baden et. al. verwendetem zur Klassifizierung der Ganglienzellen vier verschiedene Stimuli. Zuerst wurde ein Ganzfeld Stimulus bestehend aus einem stufenartigen Helligkeitsanstieg sowie zwei sinusartigen Intensitätsveränderungen, einer mit steigendem Kontrast, der andere mit steigender Helligkeit eingesetzt. Anschließend wurden die Mäuseretinae mit einem beweglichen Balken, abwechselnd grünen und blauen Lichtblitzen und mit einem binären schwarz-weiß Rauschen stimuliert.

Doch auch diese Arbeit schließt keine Stimuli zur Identifizierung eventueller auf Defokus reagierenden Zellen ein.

4.3.1 Versuchstiere

Die Maus als Tiermodell erschien nach ersten Versuchen ungeeignet, da das maximale Auflösungsvermögen der Mäuseaugen einen stark limitierenden Faktor darstellt. Dennoch zeigt die Auswertung der wenigen, zur Verfügung stehenden Daten von Mäuseretinae, dass auch mit diesem Tiermodell erfolgreiche Experimente mit diesem oder einem vergleichbaren Aufbau möglich sein sollten.

Hühner stellen seit etlichen Jahren das am häufigsten verwendete Tiermodell in der Myopieforschung dar. Dies bedingt auch, dass sie sehr gut geeignet sind um jedwede Experimente mit Defokus in beide Richtungen sowie im Farbraum durchzuführen. Die vorliegende Arbeit stellt hier keine Ausnahme dar und die Experimente mit Hühnerretinae waren, nach anfänglichen Schwierigkeiten mit der Präparation, sehr erfolgreich.

4.3.2 Arbeiten mit dem Gewebe

Nachdem erkannt wurde, dass eine Dunkeladaptation der Tiere vor der Präparation die Erfolgsrate bedeutend erhöht, war fortan die erfolgreiche Fixierung der Retinae an der Elektrodenschicht der MEA-Kammern die größte Problematik.

Eine simple Anhaftung des Gewebes an diese Glasfläche aufgrund der Adhäsion der immer vorhandenen Wassermoleküle ist für eine kurze Versuchsdauer von bis zu 30min durchaus verwendbar, jedoch ist hier nie garantiert, dass die Retina sich nicht vorzeitig löst.

Um diese Anhaftung zu erreichen, wurde die Retina der Mäuse mithilfe einer präparierten Pipette mit großer Öffnung mit wenig Flüssigkeit ins MEA eingebracht. Die Hühnerretinae konnten wie gehabt aufgesetzt werden. Danach wurde mit medizinischen Augenstäbchen die Flüssigkeit um die Retina herum komplett abgesaugt.

Weitere Versuche, die Retina mit einem speziellen Silikon-Halter von Dr. Rathbun zu fixieren erbrachten aus unbekanntem Gründen leider keine erfolgreichen Resultate. Hierbei wurde ein ringförmiges Stück Silikon, welches an den Rändern zwei Löcher zur Perfusion besaß, mit einer permeablen Zellulose-Membran bespannt. Der Ring füllte den Innenraum der MEA-Kammer vollständig aus, so dass die Membran auf der Retina auflag und diese am Boden der Kammer fixierte.

Die im Labor bereits bekannte Methode zur Fixierung der Retina mithilfe eines Gold- oder Platin Stücks in U-Form, auf welches dünne Nylonfäden aus Damenstrümpfen aufgeklebt sind, erwies sich als einfachste und zuverlässigste Methode.

Moderne MEA-Systeme mit perforierten MEA-Kammern erlauben das Anlegen eines leichten Unterdrucks, so dass die Retinae gegen die Elektrodenschicht gesaugt werden. Diese Methode wäre bei weiteren Experimenten vorteilhaft, da die Fixierung der Retina im MEA ein kritischer Punkt ist. Wird die Retina durch die verwendeten Halter fixiert, so entstehen zwangsläufig Schäden am Gewebe.

4.3.3 Badal Setup

Das Badal Setup zur Defokussierung des verwendeten Films erfüllte seine Funktion vollständig. Durch Feinjustierung mit Hilfe eines Lasers konnte eine ausreichende Präzision erreicht werden, um Aussagen bezüglich der verschiedenen Versuchsbedingungen zu ermöglichen, ohne Gefahr zu laufen, dass verschiedene Versuchsbedingungen auf Grund abweichender Bildgrößen auch unterschiedliche Teile der Retinae stimulierten. Die Tatsache, dass speziell negativer Defokus durch die Zellen erkennbar war, sowie die eindeutigen Unterschiede der Korrelationswerte echter Daten verglichen mit jenen der zufallsgenerierten Daten, untermauert die Funktionsfähigkeit des Aufbaus.

Die verwendete, einfache Badal Optik war in ihrer Funktion und ihrer Limitierung des maximalen negativen Defokus auf die Brechkraft der Badal Linse, vollkommen ausreichend.

4.3.4 Aufzeichnung der Daten

Die Aufzeichnung der Rohdaten in Form von kleinen Dateien, welche jeweils die Elektrodendaten während eines einzelnen Films enthalten erwies sich als sehr vorteilhaft. Durch diese feine Aufteilung ist es leicht möglich, Auswertungen anhand spezieller Parameter vorzuführen. Ebenso können eventuelle Schäden an Dateien, welche aus unbekanntem Gründen gelegentlich auftraten, nicht alle Messungen wertlos machen. Ist nur eine von 12 oder 18 Dateien beschädigt, so kann die Arbeit mit den 11 verbliebenen problemlos fortgeführt werden, sofern die Verschiebung der damit verbundenen Zeiten im Experiment und den zusammengeführten Daten beachtet wird.

Die Methode, die Aufzeichnung mithilfe einer Photoelektrode an den Filmstart selbst zu koppeln, zeigte eine sehr hohe Präzision sowie eine hundertprozentige Erfolgsrate. Sofern der Trigger richtig eingestellt war, besaßen die gespeicherten Dateien identische Größen, entsprechend der Anzahl an aufgezeichneten Elektroden.

4.4 Mögliche Verbesserungen

Die Aufzeichnung der in dieser Arbeit ausgewerteten Daten entsprach nicht in allen Versuchen den gleichen Standards. Die Unterschiede wurden immer berücksichtigt, jedoch wäre es für weitere Versuche von großem Wert, die Standards der Aufzeichnung von Beginn an fest zu legen.

Die Funktionsfähigkeit der Badal Optik konnte gezeigt werden. Im Aufbau war es jedoch notwendig, den zur Stimulation verwendeten Bildschirm manuell zu positionieren. Aufgrund der Stabilität und Lage der optischen Schiene hat sich hierdurch die Bildposition nicht verändert, jedoch wäre die Einstellung über einen vom PC aus gesteuerten Motor vorzuziehen.

Zusätzlich wäre es für den Versuchsablauf und die sichere sowie schonende Positionierung der Retinae auf dem MEA vorteilhaft, modernere MEA zu verwenden, welche das Gewebe durch leichten Unterdruck auf der Elektrodenschicht fixieren.

4.5 Ausblick und weitere Experimente

Diese Arbeit behandelte die Fragestellung, ob die Information über die Defokussierung eines optischen Stimulus auf der Ebene der retinalen Ganglienzellen noch vorhanden ist und somit an weiterverarbeitende Schaltzentren des Gehirns weitergegeben werden kann.

Die Frage kann insofern beantwortet werden, als dass Unterschiede in der Verarbeitung der verschiedenen Defoki feststellbar waren. Da die vorliegenden Daten kein einheitliches Bild liefern, wären weitere Experimente auf diesem Feld, unter Verwendung einer Badal-Optik, wünschenswert.

Weitere Versuche sollten mit einer präzise und maschinell einstellbaren Defokussierung vorgenommen werden. Zur genaueren Identifizierung der Ganglienzellen sowie deren Funktion, wäre eine Bestimmung ihres rezeptiven Feldes vorteilhaft, ebenso wie die

Grundlegende Klassifizierung der Ganglienzellen in beispielsweise ON- und OFF-Ganglienzellen.

Frances Rucker konnte zeigen, dass es möglich ist, Hühner allein über die Verwendung von Farbkontrasten kurzsichtig zu machen (Rucker und Wallman 2012). Dies steht scheinbar im Widerspruch zu den bekannten Tatsachen, dass eine Kompensation der vor Hühneraugen gesetzten Linsen, sowohl positive als auch negative, in monochromatischem Licht ebenso stattfindet wie im normalen, in Tierhaltungen verwendeten Kunstlicht mit breitem Wellenlängenspektrum. Somit wäre es von großem Interesse, Hühnerretinae mit Filmen zu stimulieren, welche monochromatisch sind. Dies ließe sich durch entsprechende Farbfilter realisieren und wäre für einen großen Teil des für Hühner sichtbaren Spektrums möglich.

Möglicherweise könnten ähnliche Experimente auch bei Verwendung des sogenannten „two photon Ca^{2+} imaging“ weiteren Einblick in die Verarbeitung der Defokussierung erlauben (Dreosti et al. 2011; Baden et al. 2011; Kulkarni et al. 2015). Tom Baden und seinen Kollegen war es möglich, über diese Technik die Anzahl der klassifizierten Ganglienzellen der Mäuseretina auf über 30 zu erhöhen (Baden et al. 2016), jedoch wurden bislang keine vergleichbaren Experimente unter Verwendung von Stimuli durchgeführt, welche zur Erkennung der Defokussierung geeignet sind.

Es bleibt also festzuhalten, dass sowohl der hier verwendete Aufbau als auch Alternativen noch vielfältige Möglichkeiten zur Untersuchung der Verarbeitung der Defokussierung auf Ebene der retinalen Ganglienzellen ermöglichen.

Referenzen

- Ashby, R., A. Ohlendorf, und F. Schaeffel. 2009. 'The effect of ambient illuminance on the development of deprivation myopia in chicks', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50: 5348-54.
- Ashby, R. S., und F. Schaeffel. 2010. 'The effect of bright light on lens compensation in chicks', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51: 5247-53.
- Atchison, D. A., A. Bradley, L. N. Thibos, und G. Smith. 1995. 'Useful variations of the Badal Optometer', *Optom Vis Sci*, 72: 279-84.
- Baden, T., P. Berens, K. Franke, M. Roman Roson, M. Bethge, und T. Euler. 2016. 'The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse', *Nature*, 529: 345-50.
- Baden, T., F. Esposti, A. Nikolaev, und L. Lagnado. 2011. 'Spikes in retinal bipolar cells phase-lock to visual stimuli with millisecond precision', *Curr Biol*, 21: 1859-69.
- Bitzer, M., und F. Schaeffel. 2002. 'Defocus-induced changes in ZENK expression in the chicken retina', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 246-52.
- Bitzer, M., und F. Schaeffel. 2004. 'Effects of quisqualic acid on retinal ZENK expression induced by imposed defocus in the chick eye', *Optom Vis Sci*, 81: 127-36.
- Chia, A., Q. S. Lu, und D. Tan. 2016. 'Five-Year Clinical Trial on Atropine for the Treatment of Myopia 2: Myopia Control with Atropine 0.01% Eyedrops', *Ophthalmology*, 123: 391-9.
- Chu, R., P. Ni, M. Ni, und F. Shen. 2000. 'Genetic epidemiology study of pathological myopia', *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 17: 178-80.
- Cuellar-Partida, G., Y. Lu, P. F. Kho, A. W. Hewitt, H. E. Wichmann, S. Yazar, D. Stambolian, J. E. Bailey-Wilson, R. Wojciechowski, J. J. Wang, P. Mitchell, D. A. Mackey, und S. MacGregor. 2016. 'Assessing the Genetic Predisposition of Education on Myopia: A Mendelian Randomization Study', *Genet Epidemiol*, 40: 66-72.
- Diedrich, E., und F. Schaeffel. 2009. 'Spatial resolution, contrast sensitivity, and sensitivity to defocus of chicken retinal ganglion cells in vitro', *Vis Neurosci*, 26: 467-76.
- Dreosti, E., F. Esposti, T. Baden, und L. Lagnado. 2011. 'In vivo evidence that retinal bipolar cells generate spikes modulated by light', *Nat Neurosci*, 14: 951-2.
- Edwards, M. H., und C. S. Lam. 2004. 'The epidemiology of myopia in Hong Kong', *Ann Acad Med Singapore*, 33: 34-8.
- Foster, P. J., und Y. Jiang. 2014. 'Epidemiology of myopia', *Eye (Lond)*, 28: 202-8.
- Goldman, D. 2014. 'Muller glial cell reprogramming and retina regeneration', *Nat Rev Neurosci*, 15: 431-42.
- Guo, C., A. A. Hirano, S. L. Stella, Jr., M. Bitzer, und N. C. Brecha. 2010. 'Guinea pig horizontal cells express GABA, the GABA-synthesizing enzyme GAD 65, and the GABA vesicular transporter', *J Comp Neurol*, 518: 1647-69.
- Huang, J., D. Wen, Q. Wang, C. McAlinden, I. Flitcroft, H. Chen, S. M. Saw, H. Chen, F. Bao, Y. Zhao, L. Hu, X. Li, R. Gao, W. Lu, Y. Du, Z. Jinag, A. Yu, H. Lian, Q. Jiang, Y. Yu, und J. Qu. 2016. 'Efficacy Comparison of 16 Interventions for Myopia Control in Children: A Network Meta-analysis', *Ophthalmology*, 123: 697-708.
- Karouta, C., und R. Ashby. 2016. 'Author Response: Light Levels and the Development of Deprivation Myopia', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 57: 825.
- Karouta, C., und R. S. Ashby. 2015. 'Correlation between light levels and the development of deprivation myopia', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56: 299-309.

- Kedzia, B., und P. Twardowski. 1998. 'Control of the myopic shift in modified Badal optometer', *Ophthalmic Physiol Opt*, 18: 57-62.
- Kulkarni, M., T. Schubert, T. Baden, B. Wissinger, T. Euler, und F. Paquet-Durand. 2015. 'Imaging Ca²⁺ dynamics in cone photoreceptor axon terminals of the mouse retina', *J Vis Exp*: e52588.
- Masland, R. H. 2012. 'The neuronal organization of the retina', *Neuron*, 76: 266-80.
- McBrien, N. A., H. O. Moghaddam, und A. P. Reeder. 1993. 'Atropine reduces experimental myopia and eye enlargement via a nonaccommodative mechanism', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34: 205-15.
- McBrien, N. A., W. K. Stell, und B. Carr. 2013. 'How does atropine exert its anti-myopia effects?', *Ophthalmic Physiol Opt*, 33: 373-8.
- Mirshahi, A., K. A. Ponto, R. Hoehn, I. Zwiener, T. Zeller, K. Lackner, M. E. Beutel, und N. Pfeiffer. 2014. 'Myopia and level of education: results from the Gutenberg Health Study', *Ophthalmology*, 121: 2047-52.
- Pechmann, A., und D. Czepita. 2000. '[Epidemiology of myopia]', *Klin Oczna*, 102: 297-300.
- Phillips, J. R. 2005. 'Monovision slows juvenile myopia progression unilaterally', *Br J Ophthalmol*, 89: 1196-200.
- Recko, M., und E. D. Stahl. 2015. 'Childhood myopia: epidemiology, risk factors, and prevention', *Mo Med*, 112: 116-21.
- Rucker, F. J., und J. Wallman. 2012. 'Chicks use changes in luminance and chromatic contrast as indicators of the sign of defocus', *J Vis*, 12.
- Samuel, M. A., Y. Zhang, M. Meister, und J. R. Sanes. 2011. 'Age-related alterations in neurons of the mouse retina', *J Neurosci*, 31: 16033-44.
- Schaeffel, F., A. Glasser, und H. C. Howland. 1988. 'Accommodation, refractive error and eye growth in chickens', *Vision Res*, 28: 639-57.
- Schaeffel, F., D. Troilo, J. Wallman, und H. C. Howland. 1990. 'Developing eyes that lack accommodation grow to compensate for imposed defocus', *Vis Neurosci*, 4: 177-83.
- Schippert, R., E. Burkhardt, M. Feldkaemper, und F. Schaeffel. 2007. 'Relative axial myopia in Egr-1 (ZENK) knockout mice', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48: 11-7.
- Shih, Y. F., C. H. Chen, A. C. Chou, T. C. Ho, L. L. Lin, und P. T. Hung. 1999. 'Effects of different concentrations of atropine on controlling myopia in myopic children', *J Ocul Pharmacol Ther*, 15: 85-90.
- Shih, Y. F., C. K. Hsiao, C. J. Chen, C. W. Chang, P. T. Hung, und L. L. Lin. 2001. 'An intervention trial on efficacy of atropine and multi-focal glasses in controlling myopic progression', *Acta Ophthalmol Scand*, 79: 233-6.
- Verhoeven, V. J., G. H. Buitendijk, Error Consortium for Refractive, Myopia, F. Rivadeneira, A. G. Uitterlinden, J. R. Vingerling, A. Hofman, und C. C. Klaver. 2013. 'Education influences the role of genetics in myopia', *Eur J Epidemiol*, 28: 973-80.
- Verhoeven, V. J., P. G. Hysi, R. Wojciechowski, Q. Fan, J. A. Guggenheim, R. Hohn, S. MacGregor, A. W. Hewitt, A. Nag, C. Y. Cheng, E. Yonova-Doing, X. Zhou, M. K. Ikram, G. H. Buitendijk, G. McMahon, J. P. Kemp, B. S. Pourcain, C. L. Simpson, K. M. Makela, T. Lehtimaki, M. Kahonen, A. D. Paterson, S. M. Hosseini, H. S. Wong, L. Xu, J. B. Jonas, O. Parssinen, J. Wedenoja, S. P. Yip, D. W. Ho, C. P. Pang, L. J. Chen, K. P. Burdon, J. E. Craig, B. E. Klein, R. Klein, T. Haller, A. Metspalu, C. C. Khor, E. S. Tai, T. Aung, E. Vithana, W. T. Tay, V. A. Barathi, Error Consortium for Refractive, Myopia, P. Chen, R. Li, J. Liao, Y. Zheng, R. T. Ong, A. Doring, Control Diabetes, Interventions Complications Trial/Epidemiology of Diabetes, Group Complications Research, D. M. Evans, N. J. Timpson, A. J. Verkerk, T. Meitinger, O. Raitakari, F. Hawthorne, T. D. Spector, L. C.

- Karssen, M. Pirastu, F. Murgia, W. Ang, Consortium Wellcome Trust Case Control, A. Mishra, G. W. Montgomery, C. E. Pennell, P. M. Cumberland, I. Cotlarciuc, P. Mitchell, J. J. Wang, M. Schache, S. Janmahasatian, R. P. Igo, Jr., J. H. Lass, E. Chew, S. K. Iyengar, Group Fuchs' Genetics Multi-Center Study, T. G. Gorgels, I. Rudan, C. Hayward, A. F. Wright, O. Polasek, Z. Vataavuk, J. F. Wilson, B. Fleck, T. Zeller, A. Mirshahi, C. Muller, A. G. Uitterlinden, F. Rivadeneira, J. R. Vingerling, A. Hofman, B. A. Oostra, N. Amin, A. A. Bergen, Y. Y. Teo, J. S. Rahi, V. Vitart, C. Williams, P. N. Baird, T. Y. Wong, K. Oexle, N. Pfeiffer, D. A. Mackey, T. L. Young, C. M. van Duijn, S. M. Saw, J. E. Bailey-Wilson, D. Stambolian, C. C. Klaver, and C. J. Hammond. 2013. 'Genome-wide meta-analyses of multi-ancestry cohorts identify multiple new susceptibility loci for refractive error and myopia', *Nat Genet*, 45: 314-8.
- Wallman, J., C. Wildsoet, A. Xu, M. D. Gottlieb, D. L. Nickla, L. Marran, W. Krebs, and A. M. Christensen. 1995. 'Moving the retina: choroidal modulation of refractive state', *Vision Res*, 35: 37-50.
- Wallman, J., and J. Winawer. 2004. 'Homeostasis of eye growth and the question of myopia', *Neuron*, 43: 447-68.
- Wildsoet, C. 2003. 'Neural pathways subserving negative lens-induced emmetropization in chicks--insights from selective lesions of the optic nerve and ciliary nerve', *Curr Eye Res*, 27: 371-85.
- Wildsoet, C. F., and K. L. Schmid. 2000. 'Optical correction of form deprivation myopia inhibits refractive recovery in chick eyes with intact or sectioned optic nerves', *Vision Res*, 40: 3273-82.
- Wildsoet, C., and J. Wallman. 1995. 'Choroidal and scleral mechanisms of compensation for spectacle lenses in chicks', *Vision Res*, 35: 1175-94.
- Wittenberg, S. 1988. 'The Badal optometer paradox', *Am J Optom Physiol Opt*, 65: 285-91.
- Wong, T. Y., A. Ferreira, R. Hughes, G. Carter, and P. Mitchell. 2014. 'Epidemiology and disease burden of pathologic myopia and myopic choroidal neovascularization: an evidence-based systematic review', *Am J Ophthalmol*, 157: 9-25 e12.

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Frank Schaeffel sowie den Mitarbeitern des Labors, welche mir diese Arbeit und die Teilnahme an der „International Myopia Conference 2015“ in Wenzhou (China) als Redner ermöglicht haben. Ebenso bin ich Daniel Rathbun sehr dankbar, der mir aufgezeigt hat, mit welchen Werkzeugen die Auswertung der Daten möglich ist.

Weiterhin möchte ich mich bei den aktuellen und früheren Doktoranden und Diplomanden in Frank Schaeffels Labor bedanken, welche mir viele unvergessliche Erinnerungen beschert haben.

Eine besondere Bedeutung hatten natürlich meine Eltern, welche mir mein Studium überhaupt ermöglichten. Ebenso danke ich meinen Schwiegereltern, die immer ein offenes Ohr und aufmunternde Worte bereithielten. Auch meine Freunde und Geschwister trugen ihren Teil bei. Besonders Robert Krug und Gerhard Deuter sind hervorzuheben, welche mir seit vielen Jahren wertvolle Freunde sind und mir vor allem, aber nicht nur, bei den letzten Schritten dieser Arbeit viel geholfen haben und mich auch moralisch unterstützt haben.

Meine größte Dankbarkeit gilt jedoch meiner Frau Christina und meinen Kindern Julian und Laura. Ohne die Unterstützung und den Rückhalt meiner Familie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Diese Dankbarkeit ist nicht in Worte zu fassen!