

Aus der Klinik für Augenheilkunde
(Prof. Dr. med. H. Hoerauf)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Einfluss des HCN-Kanalblockers Ivabradin auf die
Kontrastsensitivität und zeitliche Auflösung der
Signalverarbeitung in der Retina**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Larissa Selena Lauterbach
aus
Berlin

Göttingen 2019

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent:	Prof. Dr. rer. nat. T. Gollisch
Ko-Referentin:	Prof. Dr. rer. nat. Carolin Wichmann
Drittreferentin:	Prof. Dr. hum. biol. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 22. April 2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Einfluss des HCN-Kanalblockers Ivabradin auf die Kontrastsensitivität und zeitliche Auflösung der Signalverarbeitung in der Retina“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

Larissa Selena Lauterbach

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
2 Die Netzhaut.....	4
2.1 Zellen der Netzhaut: Anatomie und Funktion.....	4
2.1.1 Photorezeptoren.....	6
2.1.2 Bipolarzellen.....	7
2.1.3 Ganglienzellen.....	9
2.1.4 Laterale Verbindungen.....	10
2.2 Kontrast- und Frequenzauflösung der Retina.....	11
2.3 Ionenkanäle in der Retina.....	12
2.3.1 Ionenkanäle dirigieren die Kommunikation zwischen den Zellen.....	12
2.3.2 HCN-Kanäle wirken sich auf das Membranpotential aus.....	13
2.3.3 HCN-Kanäle in der Retina und ihr Einfluss auf die Zellsignale.....	15
2.4 Zielsetzung dieser Arbeit: HCN-Kanäle und ihre Inhibition durch Ivabradin.....	18
3 Methoden.....	20
3.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials.....	20
3.1.1 Die Maus als geeignetes Versuchstier für die Erforschung der Retina.....	20
3.1.2 Präparation der Retina.....	21
3.1.3 Herstellung der Pufferlösungen.....	21
3.2 Apparativer Aufbau des Experiments: Stimulation und Ableitung der Retina.....	22
3.2.1 Aufbringen der Netzhaut auf das Multielektroden-Array.....	22
3.2.2 Stimulation der Retina durch Lichtreize.....	25
3.3 Auswertung der abgeleiteten Signale mittels <i>Spike Sorting</i>	25
3.4 Stimuli für die Charakterisierung der Ganglienzellen.....	27
3.4.1 Klassifizierung der Ganglienzellen in ON und OFF mittels ON-OFF-Stimulus.....	27
3.4.2 Analyse des <i>Spike-Triggered Average</i> (STA) mittels STA-Stimulus.....	28
3.5 Stimuli für die Analyse von Kontrast- und Frequenzsensitivität.....	29
3.5.1 Stimulus zur Erfassung der Kontrastsensitivität.....	30
3.5.2 Stimulus zur Erfassung der zeitlichen Auflösungseigenschaften.....	37
3.6 Statistische Methoden.....	47
4 Ergebnisse.....	49
4.1 Kontrastsensitivität.....	49
4.1.1 Streudiagramme.....	49
4.1.2 Boxplots.....	53

4.1.3 Zusammenfassung	54
4.2 Frequenzauflösung	57
4.2.1 Auswertung des Periodenhistogramms	58
4.2.2 Streudiagramme	60
4.2.3 Boxplots	62
4.2.4 Zusammenfassung	65
4.3 Feuerraten	65
5 Diskussion	69
5.1 Kritische Überlegungen zum Experiment.....	69
5.2 Ergebnisdiskussion: Der Einfluss von Ivabradin auf die Signalcodierung der Retina.....	71
5.2.1 Einfluss auf die Kontrastsensitivität	71
5.2.2 Einfluss auf die Frequenzauflösung.....	72
5.2.3 Einfluss auf die Feuerrate	73
5.2.4 Unterschiedliche Auswirkung von Ivabradin auf ON- und OFF-Ganglienzellen.....	73
5.2.5 Reversibilität des Ivabradineffekts	74
5.3 Schlussfolgerungen: Bedeutung der HCN-Kanäle, Phosphene bei Ivabradintherapie	74
6 Ausblick.....	76
7 Zusammenfassung.....	78
8 Anhang: Hard- und Software, Materialien, Chemikalien	80
9 Literaturverzeichnis	82
Danksagung	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schichten der Retina	6
Abbildung 2	Vereinfachte Darstellung der Signalübertragung von den Zapfen über die Bipolarzellen an die Ganglienzellen und deren Spannungsänderung bei Lichteinfall auf die Retina	9
Abbildung 3	Schematische Darstellung des Aufbaus eines HCN-Kanals und transmembranäre Topologie	14
Abbildung 4	Funktion der HCN1-Kanäle in den Photorezeptoren.....	16
Abbildung 5	Aufsicht auf das Multielektroden-Array und den membranüberspannten Zylinder zur Fixierung der Netzhaut auf der Glasoberfläche	23
Abbildung 6	Aufbau der Apparatur zur Ableitung der Ganglienzellsignale	24
Abbildung 7	Monitoranzeige der Ableitungskanäle des MEA	25
Abbildung 8	Signale von ON-, OFF- und ON-OFF-Ganglienzellen im Rasterplot dargestellt.....	27
Abbildung 9	Berechnung des <i>Spike-Triggered Average</i> unter Verwendung des STA-Stimulus	29
Abbildung 10	Versuchsprotokoll zur schematischen Darstellung der Vorgehensweise der Experimente zur Ermittlung der Sensitivität für Kontraste und Frequenzen	30
Abbildung 11	Versuchsprotokoll und schematische Darstellung des Kontraststimulus	32
Abbildung 12	Rasterplot einer ON-Ganglienzelle	34
Abbildung 13	<i>Peri-Stimulus-Time</i> -Histogramm einer ON-Ganglienzelle	35
Abbildung 14	Bestimmung der Detektionswahrscheinlichkeit für einen bestimmten Kontrastwert mittels der <i>Two-Alternative-Forced-Choice</i> -Analyse	36
Abbildung 15	Berechnung der Kontrastschwelle einer ON-Ganglienzelle	37
Abbildung 16	Frequenzstimulus zur Erhebung der zeitlichen Auflösungsseigenschaften.....	39
Abbildung 17	Rasterplot der Antwortsignale einer OFF-Zelle als Reaktion auf den Frequenzstimulus.....	41
Abbildung 18	<i>Peri-Stimulus-Time</i> -Histogramm (PSTH) einer OFF-Ganglienzelle	42
Abbildung 19	Periodenhistogramm (PH) für eine OFF-Ganglienzelle	44
Abbildung 20	Schematische und vereinfachte Darstellung: Berechnung eines Gesamtvektors aus den Zellantworten.....	45
Abbildung 21	Vektorstärke, normierte Vektorstärke und die daraus folgende Berechnung der Frequenzschwelle	47
Abbildung 22	Darstellung der Veränderung der Kontrastschwellen einer ON-Ganglienzelle vor Ivabradin und nach längerem Einwaschen.....	50
Abbildung 23	Streudiagramme zur Darstellung der Kontrastschwellen der Ganglienzellen.....	52
Abbildung 24	Darstellung der Kontrastschwellen aus allen Testreihen	55
Abbildung 25	Darstellung der Kontrastschwellen der einzelnen Versuchstiere	56
Abbildung 26	Prozentuale Veränderung der Kontrastschwellen vor und nach Ivabradin-Einwirkung	57
Abbildung 27	Periodenhistogramme (PH) einer OFF-Ganglienzelle für die Ableitungen vor, während und nach Ivabradin	59
Abbildung 28	Berechnung der Frequenzschwelle.....	60
Abbildung 29	Streudiagramme zur Darstellung der Frequenzschwellen der Ganglienzellen	61
Abbildung 30	Frequenzschwellen der ON- und OFF-Ganglienzellen von Ivabradin- und Kontrollgruppen	63
Abbildung 31	Darstellung der Frequenzschwellen der einzelnen Versuchstiere	64

Abbildung 32	Prozentuale Veränderung der Frequenzschwellen vor und nach Ivabradineinfluss....	65
Abbildung 33	Streudiagramme zur Darstellung der Feuerraten der Ganglienzellen	67
Abbildung 34	Boxplots zur Darstellung der Veränderung der Feuerraten durch Ivabradin.....	68

Abkürzungsverzeichnis

cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
ERG	Elektroretinogramm
HCN	<i>Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channel</i>
I	Ionenstrom
MEA	Multielektroden-Array
PH	Periodenhistogramm
PSTH	<i>Peri-Stimulus-Time-Histogramm</i>
STA	<i>Spike-Triggered Average</i>
VEP	visuell evozierte Potentiale
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die visuelle Wahrnehmung unserer Umwelt ist ein scheinbar müheloser Prozess: Wir öffnen unsere Augen, und eine Fülle von Eindrücken erreicht unser Gehirn innerhalb von Millisekunden. Das dreidimensionale Panorama, das sich vor uns aufbaut, wird durch das Zusammenarbeiten verschiedener Hirnregionen unverzüglich in einen sinnvollen Zusammenhang gebracht. Wir sind dadurch in der Lage, uns räumlich zu orientieren und in der Umgebung zu interagieren.

Die Bedeutung des Sehens für unsere Gesamtwahrnehmung der Außenwelt wird auch in der Größe und Anzahl der involvierten Gehirnbereiche erkennbar: Mehr als 25% der kortikalen Areale von Primaten dienen der Verarbeitung visueller Reize (Van Essen und Drury 1997). Das Eingangstor der optischen Information ist das Auge, dessen Netzhaut (Retina) den Beginn des visuellen Systems darstellt. Sie kleidet als hauchdünnes Gewebe die Innenseite des Augenbeckens aus und besteht im Bereich des Augenhintergrundes aus verschiedenen Zelltypen, die über synaptische Verbindungen ein hierarchisch organisiertes Netzwerk bilden. In diesem Netzwerk werden die physikalischen Lichtreize in elektrophysiologische Zellsignale übersetzt und noch vor Erreichen höherer Areale des zentralen Nervensystems (ZNS) verarbeitet. Die Qualität unseres Sehens hängt daher maßgeblich von der Sensitivität der Netzhaut ab, mit der sie visuelle Information registriert und analysiert. Das Endergebnis der Informationsverarbeitung wird durch die Ganglienzellen geliefert, in denen die Signale der vorangeschalteten Netzhautzellen konvergieren. Die Ganglienzellaxone bilden den Sehnerven (*Nervus opticus*), in dem die Sinnesinformation kompakt gebündelt dem Gehirn übermittelt wird. Aus den Nervenzellsignalen der Ganglienzellen, den Aktionspotentialen, rekonstruiert es die visuelle Umwelt. Den Zusammenhang zwischen visuellen Reizen und den durch sie ausgelösten Aktionspotentialabfolgen zu untersuchen, ist eine zentrale Aufgabe in der Erforschung des Sehens. Erkenntnisse hierüber tragen nicht nur zum Verständnis der Funktionsweise der Netzhaut bei, sondern geben einen Einblick in die Reizverarbeitung neuronaler Netzwerke im Allgemeinen.

Die Kommunikation der Netzhautzellen erfolgt über synaptische Verbindungen, an denen chemische und elektrische Signale weitergeleitet bzw. empfangen werden. Sowohl die Erregungsbildung als auch die Erregungsfortleitung basieren auf elektrischen Prozessen an der Zellmembran, die durch Ionenverschiebungen von intra- nach extrazellulär und *vice versa* hervorgerufen werden. Diese Ionenströme kommen durch fein geregeltes Öffnen und Schließen verschiedener Ionenkanäle zustande. Eine besondere Stellung unter den Ionenkanälen nimmt die Familie der HCN-Kanäle ein (aus dem Englischen für *Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channel*). Im Gegensatz zu anderen spannungsgesteuerten Ionenkanälen erfolgt ihre Aktivierung nicht bei Zunahme des Membranpotentials (Depolarisierung), sondern bei seiner Negativierung (Hyperpolarisation). Durch die dann geöffneten HCN-Kanäle strömen Kationen in die Zelle ein und depolarisieren sie. Dieser Mechanismus erschien bei seiner Entdeckung derart ungewöhnlich, dass der von den HCN-Kanälen getragene Ionenstrom (kurz: I) die Bezeichnungen *funny*- (If), *queer*- (Iq) oder *anomalous rectifying*-Ionenstrom erhielt. Für den Ionenstrom in den Zellen des zentralen Nervensystems ist der Begriff Ih-Ionenstrom geläufig, wobei das „h“ für hyperpolarisierend steht (DiFrancesco und DiFrancesco 2015; Pape 1996).

HCN-Kanäle wurden in vielen Geweben nachgewiesen, darunter Herz, Skelettmuskel und zentrales Nervensystem (ZNS). Sie sind an der Steuerung wichtiger physiologischer Funktionen beteiligt, beispielsweise an der Rhythmogenese des Sinusknotens im Herzen (He et al. 2014; Larsson 2010) und der Erzeugung von oszillatorischen Entladungen in bestimmten Gehirnarealen (Ulrich 2002; Wang et al. 2006; Xue et al. 2012). Auch in der Netzhaut, die einen Teil des ZNS darstellt, werden alle der vier identifizierten HCN-Kanal-Isoformen (HCN1 bis HCN4) exprimiert (Muller et al. 2003).

Die Stäbchen-Photorezeptoren (im Folgenden Stäbchen genannt), einer der zwei Haupttypen von Sinnesrezeptoren in der Retina, exprimieren hauptsächlich die HCN1-Isoform auf der Membran ihrer

Innensegmente (Knop et al. 2008; Muller et al. 2003; Sothilingam et al. 2016). Bei Lichteinfall hyperpolarisieren die Stäbchen, woraufhin die HCN1-Kanäle aktiviert werden und ihr depolarisierender Ioneneinstrom (kurz Ih-Ionenstrom) der Hyperpolarisation entgegenwirkt. Dadurch wird die Antwort der Stäbchen auf den Lichtreiz begrenzt. Obwohl der Ih-Ionenstrom in den Stäbchen bereits in den siebziger Jahren entdeckt wurde (Fain et al. 1978), ist sein Einfluss auf die Signalverarbeitung in der Retina erst im Begriff, verstanden zu werden.

Das Interesse an den HCN-Kanälen in der Netzhaut wurde durch die Einführung des herzfrequenzsenkenden Medikamentes Ivabradin (Handelsname Procoralan®, Hersteller Servier) befeuert. Ivabradin ist ein selektiver HCN-Kanalblocker, der seit 2005 in der Europäischen Union zur symptomatischen Therapie bestimmter Herzleiden zugelassen ist (Borer et al. 2003; Bucchi et al. 2002; Bucchi et al. 2006; Ruzyllo et al. 2007; Savelieva und Camm 2006; Sulfi und Timmis 2006). Er darf u. a. bei Kontraindikation gegenüber den herkömmlichen Betablockern eingesetzt werden und eröffnet damit neue therapeutische Optionen, z. B. für die Behandlung der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz.

Der Wirkmechanismus von Ivabradin basiert auf der Blockierung der im Sinusknoten exprimierten HCN4-Kanäle und verzögert dadurch die Entstehung neuer Aktionspotentiale (Bucchi et al. 2006). Die verlangsamte Erregungsbildung im Sinusknoten führt zur Absenkung der Herzfrequenz, wodurch der Sauerstoffbedarf verringert und die Sauerstoffversorgung des Herzmuskels verbessert werden. Bei bis zu 15% der Patienten treten innerhalb der ersten zwei Monate nach Therapiebeginn mit Ivabradin passagere Sehstörungen in Form von Phosphenen (Scheinwahrnehmung von Farbe und Licht) und der Herabsetzung der Sehschärfe auf (Savelieva und Camm 2006). Die visuellen Nebenwirkungen sind in der Regel mild bis moderat ausgeprägt, nehmen abhängig von der Dosierung des Medikaments zu und sistieren im Laufe der Behandlung oder nach seiner Beendigung (Borer et al. 2003; Cervetto et al. 2007; Savelieva und Camm 2006). In vielen Fällen werden die Phosphene durch plötzliche Veränderungen in der Lichtintensität ausgelöst (Demontis et al 2009), insbesondere bei Dunkelheit und Dämmerlicht - also dann, wenn die Sensitivität der Retina besonders hoch ist (Cervetto et al. 2007).

Wie die visuellen Nebenwirkungen bei therapeutischer Anwendung von Ivabradin zustande kommen, ist nicht ausreichend geklärt. Experimentelle Studien an Versuchstieren bestätigen, dass Ivabradin die Blut-Retina-Schranke passieren kann (Cervetto et al. 2007) und den Ih-Ionenstrom der Stäbchen und der Bipolarzellen inhibiert (Della Santina et al. 2012; Demontis et al. 2009). Unter Ivabradineinfluss zeigen diese Zellen eine verzögerte Antwortreaktion auf Lichtreize hoher Frequenzen (Della Santina et al. 2010; Della Santina et al. 2012; Demontis et al. 2009). Neben Messungen von Elektoretinogrammen (ERGs) an lebenden Versuchstieren (Della Santina et al. 2010) konnte ein ähnliches Ergebnis auch an *Knock-Out*-Modellen mit gentechnisch „ausgeschalteten“ HCN1- und HCN2-Kanälen erhoben werden (Della Santina et al. 2012; Knop et al. 2008; Seeliger et al. 2011). Kürzlich wurden zudem Auswirkungen einer HCN-Kanal-Inhibition auf die Ganglienzellen nachgewiesen, deren Aktivität und Antwortreaktion auf Lichtreize durch Ivabradin verändert wurden (Bemme et al. 2017). Diese Befunde untermauern die Bedeutung des Ih-Ionenstroms für die Informationsverarbeitung in der Netzhaut und lassen einen Zusammenhang zu den visuellen Nebenwirkungen bei medikamentöser Anwendung von Ivabradin erkennen.

Die vorliegende Arbeit macht sich zur Aufgabe, die Funktion der HCN-Kanäle für die Signalverarbeitung der Netzhaut näher zu beleuchten. Welchen Beitrag leisten sie für die Codierung von Lichtintensitäten und ihren zeitlichen Veränderungen, zwei wichtigen Komponenten des Sehens? Lassen sich aus den Ergebnissen Rückschlüsse auf die visuellen Nebenwirkungen bei therapeutischem Einsatz von Ivabradin ziehen?

Zur Beantwortung dieser Fragen werden die Ganglienzellen auf ihre Kontrast- und Frequenzauflösung mit und ohne Ivabradineinfluss untersucht. Verschiedene Kontrast- und Frequenzabstufungen werden durch spezielle Lichtstimuli auf die Netzhaut projiziert. Aus den Aktionspotentialen der Ganglienzellen, die das Ergebnis der Informationsverarbeitung in der Netzhaut wiedergeben, wird die Kontrast- und

Frequenzsensitivität analysiert. Die Ableitung der Ganglienzellsignale erfolgt extrazellulär mittels Multielektroden-Arrays, wodurch die Integrität der Netzhaut nicht gestört wird. ON- und OFF-Ganglienzellen werden getrennt voneinander analysiert, da die Information über Zunahme („ON“) bzw. Abnahme („OFF“) des Kontrastes bzw. der Lichtintensität in Bezug auf die Hintergrundbeleuchtung in unterschiedlichen zellulären Schaltkreisen der Netzhaut verarbeitet wird.

Alle Experimente fanden *in vitro* an isolierten Retinae von Mäusen statt, einem typischen Säugetiermodell in der Grundlagenforschung des zentralen Nervensystems. Der Aufbau der murinen Netzhaut stimmt im Wesentlichen mit denen anderer Säugetiere überein (Dowling and Dubin 2011), weshalb Rückschlüsse auf die Funktionsweise der menschlichen Retina möglich sind.

Die vorliegende Arbeit ist anschließend an die Einleitung in folgende fünf Kapitel gegliedert:

Im zweiten Kapitel wird auf die Architektur und Funktion der Säugetierretina eingegangen und ihr anatomischer Aufbau mit den zugrundeliegenden Zelltypen wird erläutert. Die Funktionsweise der Netzhautzellen wird zusammenfassend dargestellt. Ein besonderes Augenmerk gilt den Ganglienzellen, die das Ergebnis der Informationsverarbeitung in der Netzhaut dem Gehirn übermitteln und im Fokus dieser Arbeit stehen. Die elektrischen Zellsignale der Ganglienzellen sind die Aktionspotentiale, deren Entstehungsmechanismus anschließend erklärt wird. Bei der Entstehung der Zellsignale von Ganglienzellen, Bipolarzellen und Photorezeptoren wirken maßgeblich die HCN-Kanäle mit. Ihr Einfluss in den Netzhautzellen ist noch nicht gänzlich verstanden, weshalb im nächsten Abschnitt der derzeitige Wissensstand zu den HCN-Kanälen zusammengefasst wird. Abschließend wird auf die Bedeutung von Kontrast- und Frequenzauflösung der Retina eingegangen - zwei für das Sehvermögen wichtige Eigenschaften, die in dieser Arbeit untersucht werden.

Das dritte Kapitel gibt einen detaillierten Einblick in die experimentelle Herangehensweise und Umsetzung. Die einzelnen Arbeitsschritte der elektrophysiologischen Experimente werden begründet und erklärt: von der Gewinnung der Netzhaut über das Aufbringen auf das Multielektroden-Array bis hin zur Ableitung der elektrophysiologischen Signale in den verschiedenen Testreihen. Die anschließende Datenanalyse wird zur Anschaulichkeit anhand einer Beispielzelle erklärt. Die Stimuli, die zum Einsatz kamen, werden beschrieben und schematisch in Graphiken dargestellt. Abschließend werden die statistischen Tests genannt und es wird erläutert, warum sie für die Ergebnisauswertung eingesetzt wurden.

Das vierte Kapitel beschäftigt sich mit dem eigentlichen Ergebnis der Experimente. Aus den Zellantworten der Ganglienzellen werden ihre Detektionsschwellen für Kontraste bzw. Frequenzen berechnet und die Daten aller abgeleiteten Zellen zusammengefasst. Der Einfluss der HCN-Kanalblockade durch Ivabradin auf die Kontrast- und Frequenzsensitivität der Netzhaut wird analysiert und statistisch überprüft.

Das fünfte Kapitel befasst sich mit der Evaluierung der Ergebnisse, zeigt mögliche Einflussfaktoren auf und diskutiert die Experimente. Die Ergebnisse aus der Arbeit werden in den aktuellen Forschungsstand zum Thema eingereiht und anschließend zusammengefasst. Hier wird auf die Bedeutung der HCN-Kanäle für die Signalcodierung in der Netzhaut eingegangen und erörtert, wie sich die visuellen Nebenwirkungen von Ivabradin erklären ließen.

In Kapitel 6 werden weitere offenbleibende oder sich neu ergebende Fragen als Ausblick für weitere potenzielle Forschungsthemen angeführt, die die Bedeutung der HCN-Kanäle für den Sehsinn und andere Sinnesorgane betreffen.

2 Die Netzhaut

2.1 Zellen der Netzhaut: Anatomie und Funktion

Das visuelle System der Säugetiere umfasst die Anteile des zentralen Nervensystems (ZNS), die primär der Verarbeitung optischer Sinnesinformation dienen. Es beginnt mit der Netzhaut, einem entwicklungsgeschichtlich externen Teil des ZNS, das als Gewebe von 200 µm Dicke die Innenseite des Augapfels auskleidet (O'Rahilly 1975). Sie besteht im Wesentlichen aus verschiedenen Typen von Nervenzellen, die in spezifischer Art und Weise untereinander synaptisch verschaltet sind und dadurch ein komplexes zelluläres Netzwerk ausbilden (Masland 2001).

Die Netzhaut erfüllt die Aufgabe, Lichtsignale zu registrieren, diese in elektrophysiologische Zellsignale umzuwandeln und an das Gehirn zu leiten. Neben der Übersetzung der Lichtstimuli in die „Sprache“ des ZNS findet in der Retina bereits eine umfangreiche Verarbeitung der visuellen Information statt, um aus der Vielzahl an Reizen die für das Gehirn relevante Information zu erfassen und zu bündeln (Masland 2011; Wässle 2004). Allein die Bandbreite unterschiedlicher Lichtintensitäten, die vom menschlichen Auge wahrgenommen werden kann, variiert in der natürlichen Umwelt um den Faktor von 10^{10} und bedarf aufgrund der limitierten zellulären Kapazität eine entsprechende „Komprimierung“. Daneben werden auch Details wie Form, Farbe und Bewegungsrichtung extrahiert und in parallelen Schaltkreisen analysiert (Gollisch und Meister 2010). Die Signale der unterschiedlichen Verarbeitungswege konvergieren auf der Ebene der Ganglienzellen, die das Endergebnis der Informationsverarbeitung dem Gehirn in Form von Aktionspotentialen signalisieren. Innerhalb der Säugetierspezies besteht eine große Ähnlichkeit im Aufbau der Netzhaut, ihren Zelltypen und Verschaltungen untereinander sowie den Ionenkanälen in der Zellmembran, die für die zelluläre Kommunikation entscheidend sind (Masland 2001, 2011, 2012a). Dieses Kapitel widmet sich daher allgemein umfassend der Säugetier-Retina. Die wichtigsten Erkenntnisse über die Zelltypen und ihre Funktionen werden zusammengefasst. Anschließend wird auf den bisherigen Wissensstand über die HCN-Ionenkanäle in der Netzhaut eingegangen, deren Einfluss auf die Signalverarbeitung in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

Die Retina lässt sich funktionell in zwei Bereiche gliedern: die *Pars optica* und die *Pars caeca*, aus dem lateinischen für „sehender Teil“ und „blinder Teil“. Die *Pars optica* kleidet den Augenhintergrund aus und wird in zwei Schichten eingeteilt: Die Nervenzellschicht (*Stratum nervosum*) und das darunterliegende Pigmentepithel. Das Pigmentepithel ist ein einschichtiges Epithel, das aufgrund seiner Melanineinlagerung schwarz erscheint und durch die Abdunkelung des inneren Augapfels einer Lichtstreuung entgegenwirkt. Es versorgt die Sinnesrezeptoren der Nervenzellschicht mit Energie, indem es u. a. ihre Photopigment-haltigen Segmente phagozytiert und wiederbereitstellt (Young 1971). Neben diesem „Photopigment-Recycling“ dient das Pigmentepithel durch seine Lage zur Aderhaut als Blut-Retina-Schranke, die den Stoffaustausch zwischen dem Blut und der Netzhaut weitestgehend aktiv kontrolliert und vor schädlichen Einflüssen schützt (Diaz-Coranguez et al. 2017).

Das *Stratum nervosum* ist der lichtempfindliche Anteil, das eigentliche Sinnesepithel zur Detektion und Verarbeitung der Sinnesreize. Es geht in Richtung des vorderen Augenabschnitts in die *Pars caeca* über, die aus dem Ziliarepithel und dem pigmentierten Anteil der Iris besteht. Der Einfachheit halber wird im Folgenden jedoch nur von der Retina oder Netzhaut gesprochen, wenn die Nervenzellschicht der *Pars optica* gemeint ist.

Die Nervenzellschicht der Vertebraten ist erstaunlich ähnlich aufgebaut, wie Ramon y Cajal bereits vor mehr als 100 Jahren erkannte (y Cajal 2018): sie besteht aus verschiedenen Zelltypen, die in fünf Zellklassen eingeteilt werden (Sanes und Masland 2015) und sich morphologisch und funktionell voneinander unterscheiden. Zu ihnen zählen fünf Typen von Nervenzellen, die in einer bestimmten

Weise untereinander synaptisch verschaltet sind. Durch ihre Anordnung innerhalb des *Stratum nervosum* bilden ihre Zellkörper und Zellfortsätze im histologischen Schnittbild voneinander abgrenzbare Schichten (Abbildung 1). Zu den fünf Zelltypen zählen:

1. die Photorezeptoren, die den Lichtreiz detektieren und in ein elektrophysiologisches Signal umwandeln
2. die Bipolarzellen, die das Signal der Photorezeptoren aufnehmen und an die Ganglienzellen weiterleiten
3. die Ganglienzellen, deren Zellfortsätze (Axone) den Sehnerven bilden
4. die Horizontalzellen und Amakrinzellen, die überwiegend inhibitorisch wirken und aufgrund ihrer „zwischen geschalteten“ Funktion als Interneurone bezeichnet werden. Sie vermitteln zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen respektive den Bipolarzellen und Ganglienzellen und modulieren die Signalübertragung.

Die Detektion und Verarbeitung von Lichtreizen verläuft in umgekehrter Richtung zum Eintreffen des Lichts in das Augeninnere: Licht, das durch die Pupille in den Augapfel eindringt und von der Linse auf den Augenhintergrund gebündelt wird, muss zunächst die Photorezeptoren erreichen, die als unterste Schicht des *Stratum nervosum* am weitesten vom einfallenden Licht entfernt liegen. Sie sind die eigentlichen Sinneszellen, die die Lichtreize detektieren, in zelluläre Signale überführen und diese mittels chemischer Synapsen an die Bipolarzellen weiterleiten. Bipolarzellen übermitteln das Signal an die Ganglienzellen, die dem Augeninneren zugewandt liegen. Die Ganglienzellfortsätze (beim Menschen circa 1,1 Millionen Axone pro Auge) verlaufen in Richtung der *Lamina cribrosa* in der Lederhaut und bilden hier den Sehnerven, der die gesammelte Information aus der Netzhaut an das Gehirn weiterleitet. Die Ganglienzellen werden daher auch als „Ausgabezellen“ (geläufiger engl. *Output-Cells*) der Retina bezeichnet. Diese vertikale Informationsübertragung von den Photorezeptoren zu den Ganglienzellen wird durch die inhibitorischen Interneurone moduliert, zu denen Horizontal- und Amakrinzellen zählen und deren Fortsätze überwiegend horizontal in den Retinaschichten verlaufen.

Innerhalb der fünf Zellklassen existieren zahlreiche Subtypen, die sich hinsichtlich anatomischer Struktur, molekularer Eigenschaften und Verbindungen zu anderen Zellen unterscheiden (Gollisch und Meister 2010). Mittlerweile sind mehr als 60 verschiedene Subtypen von Netzhautzellen beschrieben worden, deren morphologische Vielfalt offenbar auch mit einer funktionellen Differenzierung einhergeht (Masland 2012a). Die Klassifikation der Subtypen ist jedoch nicht gänzlich abgeschlossen, da eine gewisse Variabilität zwischen den untersuchten Spezies und den angewendeten experimentellen Methoden existiert. Allerdings treffen für alle untersuchten Säugetiere sowohl die Einteilung der fünf hauptsächlichen Zellklassen als auch das Prinzip der Signalübermittlung zu, sodass im Folgenden detaillierter auf die Funktion der fünf Zellklassen eingegangen wird.

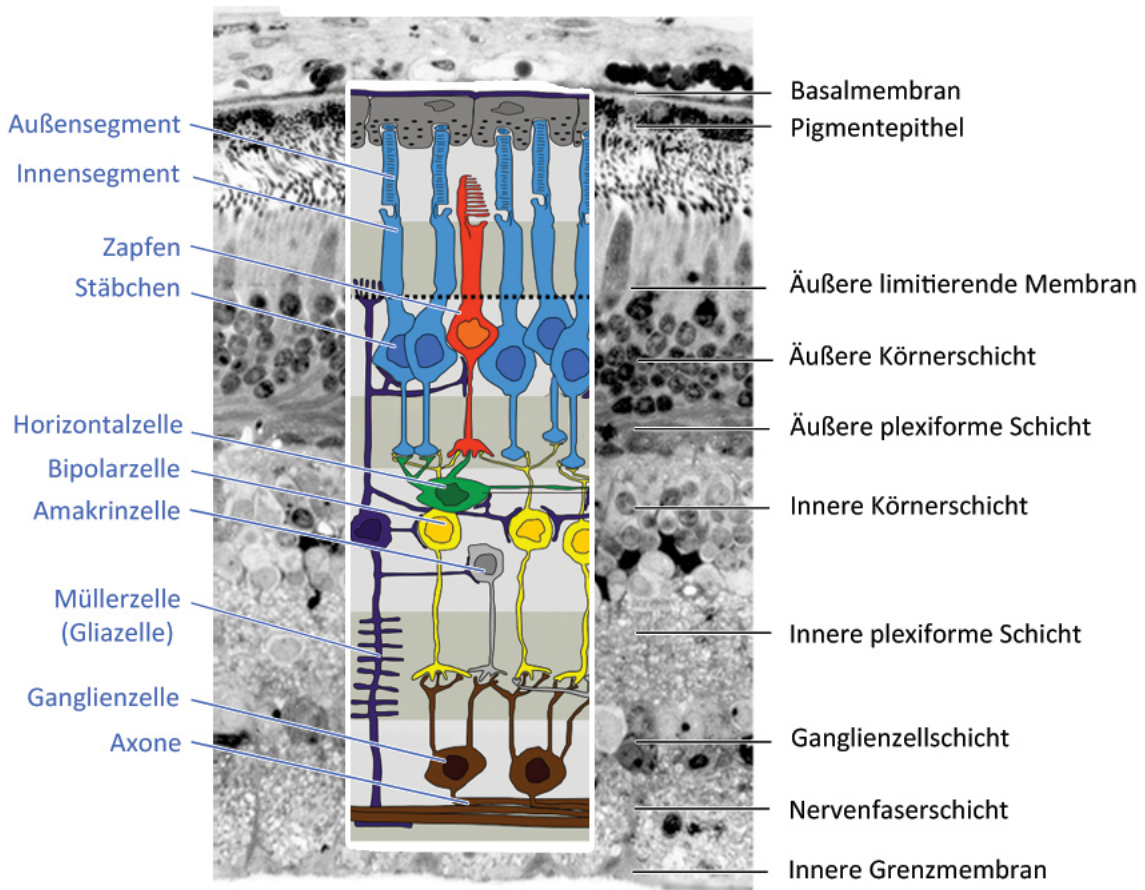


Abbildung 1 Schichten der Retina

Elektronenmikroskopische Schnittbildaufnahme der menschlichen Netzhaut mit den voneinander abgrenzbaren Schichten von Zellkörper und Zellfortsätzen sowie schematische Zeichnung der Zellen mit ihren Zellkörpern und Fortsätzen. Die hier gezeigte und im Text nicht weiter erwähnte Müllerzelle ist eine Gliazelle und übernimmt verschiedene Aufgaben in der Retina (z. B. stützende und lichtleitende Funktionen).

Elektronenmikroskopisches Bild modifiziert nach Regents of the University of Michigan, 2008, Creative Commons Lizenz (CC BY-NC-SA 3.0). Schematische Zeichnung von Wikipedia, Creative Commons Lizenz (CC BY-SA 3.0).

2.1.1 Photorezeptoren

Die Photorezeptoren sind die Sinneszellen der Retina und detektieren das für den Menschen sichtbare Licht, d. h. den Teil der elektromagnetischen Strahlung, der Wellenlängen von circa 400-760 nm umfasst. Neben der spektralen Zusammensetzung des Lichts, die von uns als Farbe wahrgenommen wird, überliefern die Photorezeptoren die Information über die Lichtintensität, die der Cortex als unterschiedliche Helligkeitsabstufungen registriert. Die große Bandbreite an Lichtintensitäten wird durch zwei Typen von Photorezeptoren abgedeckt, die gemäß ihrem histologischen Erscheinungsbild als Stäbchen und Zapfen bezeichnet werden. Sie weisen unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber Lichtintensitäten auf, die sie komplementär zueinander abdecken. Im Bereich mittlerer Lichtintensität, den man als Dämmerungssehen oder mesopisches Sehen bezeichnet (griech. *mesos* „Mitte“), überschneiden sich die Aktivitätsbereiche beider Photorezeptoren.

Stäbchen sind hochsensitive Lichtdetektoren, die bereits ein einziges Photon registrieren können (Tinsley et al. 2016). Ihre Sensitivität, die etwa 20-mal höher ist als die der Zapfen (Strettoi et al. 2010), führt jedoch bei zunehmender Lichtintensität schnell zu ihrer Übersättigung (Baylor et al. 1984). Stäbchen detektieren Lichtreize daher am sensitivsten bei geringer Umgebungshelligkeit und ermöglichen das Sehen bei Nacht, das als skotopisches Sehen (griech. *skotos* „Dunkelheit“) bezeichnet wird. Sie machen bei den meisten Säugetieren den Großteil der Photorezeptoren aus: In der

menschlichen Retina liegen Stäbchen etwa 20-fach zahlreicher vor als die Zapfen. Eine große Anzahl von Stäbchen gibt ihre Signale an zahlenmäßig deutlich weniger Bipolarzellen weiter, woraus sich eine hohe Lichtempfindlichkeit jedoch geringe räumliche Auflösung ergibt.

Stäbchen exprimieren den Sehfärbstoff Rhodopsin, dessen Empfindlichkeitsmaximum im blaugrünen Bereich liegt (bei etwa 500 nm Wellenlänge). Mit nur einem Sehpigment ist es den Stäbchen nicht möglich, die verschiedenen spektralen Anteile des Lichts zu differenzieren. Sie können daher keine Information über Farben liefern. Das Sprichwort „in der Nacht sind alle Katzen grau“ illustriert die Gegebenheit, dass bei Dunkelheit, wenn die Stäbchen aktiv sind, Farben für das menschliche Auge kaum voneinander zu unterscheiden sind.

Zapfen übernehmen die Aufgabe des Scharf- und Farbsehens. Sie arbeiten am besten bei hoher Lichtintensität und sind für das photopische Sehen bei (Tages)licht verantwortlich (griech. *photos* „Licht“). Im Gegensatz zu den Stäbchen haben sie eine geringe absolute Helligkeitsempfindlichkeit, weshalb sie bei niedriger Lichtintensität kaum aktiv sind. Zapfen ermöglichen das Farbsehen, da Zapfen-Typen mit Sehpigmenten unterschiedlicher spektraler Empfindlichkeit existieren. Durch den Abgleich der Signale aus den verschiedenen Zapfentypen kann das Gehirn die Information über Farbe rekonstruieren. Die meisten Wirbeltiere verfügen über zwei Zapfentypen, man nennt sie daher Dichromaten. Sie besitzen einen Zapfentyp mit einem Sensitivitätsmaximum für kurze Wellenlängen (blaues Licht), der evolutionär gesehen am ältesten ist, sowie einen Zapfentyp für mittlere Wellenlängen, der den Bereich für gelbes bis rotes Licht umfasst (Okano et al. 1992). Menschen sind Trichromaten, ihre Retina besitzt zusätzlich einen Zapfentyp für lange Wellenlängen (rotes Licht). Umgangssprachlich werden die unterschiedlichen Zapfentypen vereinfachend als blaue, grüne oder rote Zapfen bezeichnet.

Die Anordnung der Zapfen in der Netzhaut weist bei Primaten und einigen Nicht-Säugetieren eine anatomische Besonderheit auf: die *Fovea centralis*. Dies ist ein kleiner Bereich auf der Retina, in dem sich ein Großteil der Zapfen konzentriert, wohingegen sich die Stäbchen hauptsächlich in der Peripherie befinden (Curcio et al. 1990). In diesem Abschnitt der Retina sind die anderen Zellschichten und Gefäße zur Seite gedrängt, sodass das Licht mit nur minimaler Dispersion die Zapfen erreicht. Diese konvergieren annähernd 1:1 auf je eine Ganglienzelle, woraus eine hohe räumliche Auflösung resultiert (Ahmad et al. 2003). Während sich die Zapfen und Stäbchen in ihrer Detektionsempfindlichkeit von Lichtintensitäten unterscheiden, erfolgt ihre Erregungsbildung und -weiterleitung nach einem gemeinsamen Prozess, der als Phototransduktion bezeichnet wird. Dieser Vorgang beschreibt die Umwandlung von Lichtreizen in zelluläre Signale, die in Form gradueller Glutamatausschüttung aus den Zellendigungen an die nachfolgenden Neurone übermittelt werden. Die Phototransduktion wird durch einen Lichtreiz ausgelöst, der auf die Außensegmente der Photorezeptoren trifft. Die Photonen treffen auf das Sehpigment der Photorezeptoren und lösen eine chemische Kaskade aus, in deren Folge sich ein sonst offener Kationenkanal in der Zellmembran des Photorezeptors schließt. Dadurch können keine Kationen mehr in das Innere der Sinneszellen strömen und das zelluläre Membranpotential wird zu negativen Werten hin verschoben (als Hyperpolarisation bezeichnet). In Folge der intrazellulären Spannungsänderung wird die ansonsten stetige Freisetzung von Glutamat an den Nervenendigungen der Photorezeptoren gedrosselt. Die Veränderung der Glutamatausschüttung aus den Photorezeptoren signalisiert den nachfolgenden Bipolar- und Horizontalzellen das Lichtsignal.

2.1.2 Bipolarzellen

Die Bipolarzellen empfangen die Signale der Photorezeptoren und stehen an ihrem anderen Ende mit den Ganglienzellen in Verbindung. So wie die Sinnesrezeptoren erzeugen auch die Bipolarzellen gradierte Signale über die Ausschüttung von Glutamat. Bei Depolarisation der Bipolarzellen nimmt die Ausschüttung des Botenstoffs zu und bei Hyperpolarisation ab. Die Bipolarzellen sind nicht nur Vermittlungszellen zwischen den Sinnesrezeptoren und den Ganglienzellen, sondern sind individuell

spezialisiert für bestimmte Details der optischen Information. So beginnt bereits an der ersten synaptischen Verschaltung in der Retina die Analyse der Sinnesinformation in parallelen Schaltkreisen. Die erste grundlegende Unterscheidung betrifft die Differenzierung von Helligkeit (ON) und Dunkelheit (OFF), sodass man die Bipolarzellen funktionell in ON-Bipolarzellen und OFF-Bipolarzellen einteilt (Abbildung 2). ON-Bipolarzellen reagieren auf Lichtreize bzw. auf die Zunahme der Lichtintensität, wohingegen OFF-Bipolarzellen bei Dunkelheit und Abnahme der Lichtintensität aktiv sind (Kolb 1994). ON- und OFF-Bipolarzellen reagieren gegensätzlich auf die Glutamatausschüttung der Photorezeptoren, da sie an ihren dendritischen Endigungen unterschiedliche Glutamatrezeptoren besitzen. Die OFF-Bipolarzellen exprimieren ionotrope Glutamatrezeptoren, die bei Bindung von Glutamat aus den Photorezeptoren zu einer Depolarisation und damit Aktivierung der OFF-Bipolarzellen bei Dunkelheit führen. Analog zu den Photorezeptoren schütten die OFF-Bipolarzellen dann ebenfalls Glutamat an ihren Endigungen aus. Bei Lichteinfall hingegen, wenn das Glutamat aus den Photorezeptoren abnimmt, hyperpolarisieren die OFF-Bipolarzellen und ihre eigene Neurotransmitterausschüttung nimmt ebenfalls ab (Abbildung 2).

ON-Bipolarzellen besitzen einen metabotropen Glutamatrezeptor, der bei Bindung von Glutamat eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt und zur Hyperpolarisation der Zelle führt. Die ON-Bipolarzelle ist somit in Dunkelheit inaktiv (Nawy und Jahr 1990, 1991). Bei Belichtung, wenn die Glutamatreisetzung der Photorezeptoren vermindert wird, depolarisieren die ON-Bipolarzellen und werden dadurch aktiv (Abbildung 2).

ON- und OFF-Bipolarzellen liegen zu etwa gleichen Anteilen in der Netzhaut vor (Masland 2001), werden aber in unterschiedlicher Weise von den Photorezeptoren kontaktiert. Zapfen geben ihre Signale an beide Bipolarzelltypen weiter, wohingegen die Stäbchen ausschließlich mit speziellen ON-Bipolarzellen Synapsen ausbilden. Daher teilt man die Bipolarzellen auch nach ihrer Verschaltung mit den Photorezeptoren in (ON-)Stäbchen-Bipolarzelle, ON-Zapfen-Bipolarzelle und OFF-Zapfen-Bipolarzelle ein.

Obwohl unter den Photorezeptoren die Stäbchen zahlenmäßig die Zapfen übertreffen, existieren umgekehrt wesentlich weniger Stäbchen-Bipolarzellen als Zapfen-Bipolarzellen (Strettoi und Masland 1995). Eine einzige Stäbchen-Bipolarzelle empfängt die Signale mehrerer Stäbchen und die hohe Konvergenz der Stäbchensignale macht die Stäbchen-Bipolarzellen zu hochsensitiven Lichtdetektoren. Zapfen-Bipolarzellen, deren Anzahl die der Stäbchen-Bipolarzellen um etwa das Drei- bis Vierfache übertrifft, bilden nur zu wenigen Zapfen Synapsen aus. Sie übernehmen vielfältige Aufgaben: neben ON- und OFF-Signalen können sie spezielle Details des visuellen Eindrucks erfassen und verarbeiten. Es existieren daher mehrere spezialisierte Subtypen von Zapfen-Bipolarzellen, von denen 13 in der Säugetierretina bekannt sind und die sich morphologisch voneinander unterscheiden lassen (Light et al. 2012). In der Regel wird die Information aus einem einzigen Zapfen an jeden Subtyp der Zapfen-Bipolarzellen weitergegeben. Auf diese Weise wird die Zapfeninformation auf ihre verschiedenen Komponenten von den spezialisierten Zapfen-Bipolarzellen analysiert (McGilllem und Dacheux 2001; Wässle et al. 2009). Die einzige bisher bekannte Ausnahme davon bildet eine Zapfen-Bipolarzelle, die ausschließlich Signale von blauen Zapfen erhält (Dacey und Lee 1994; Ghosh et al. 1997; Kouyama und Marshak 1992). Interessanterweise spiegeln sich die funktionellen Unterschiede der Zapfen-Bipolarzellen in ihrer Anordnung innerhalb der Netzhaut wider: ihre Zellkörper und Nervenzellendigungen liegen, je nach Subtyp, in unterschiedlichen Schichten der Retina (Ghosh et al. 2004). Stäbchen- und Zapfen-Bipolarzellen wiederum geben ihre Signale über Synapsen an die Ganglienzellen weiter. Während Zapfen-Bipolarzellen direkte synaptische Verbindungen zu ON- oder OFF-Ganglienzellen ausbilden, stehen die Stäbchen-Bipolarzellen indirekt über Amakrinzellen mit ON- und OFF-Ganglienzellen in Verbindung (siehe Kapitel 2.2.4).

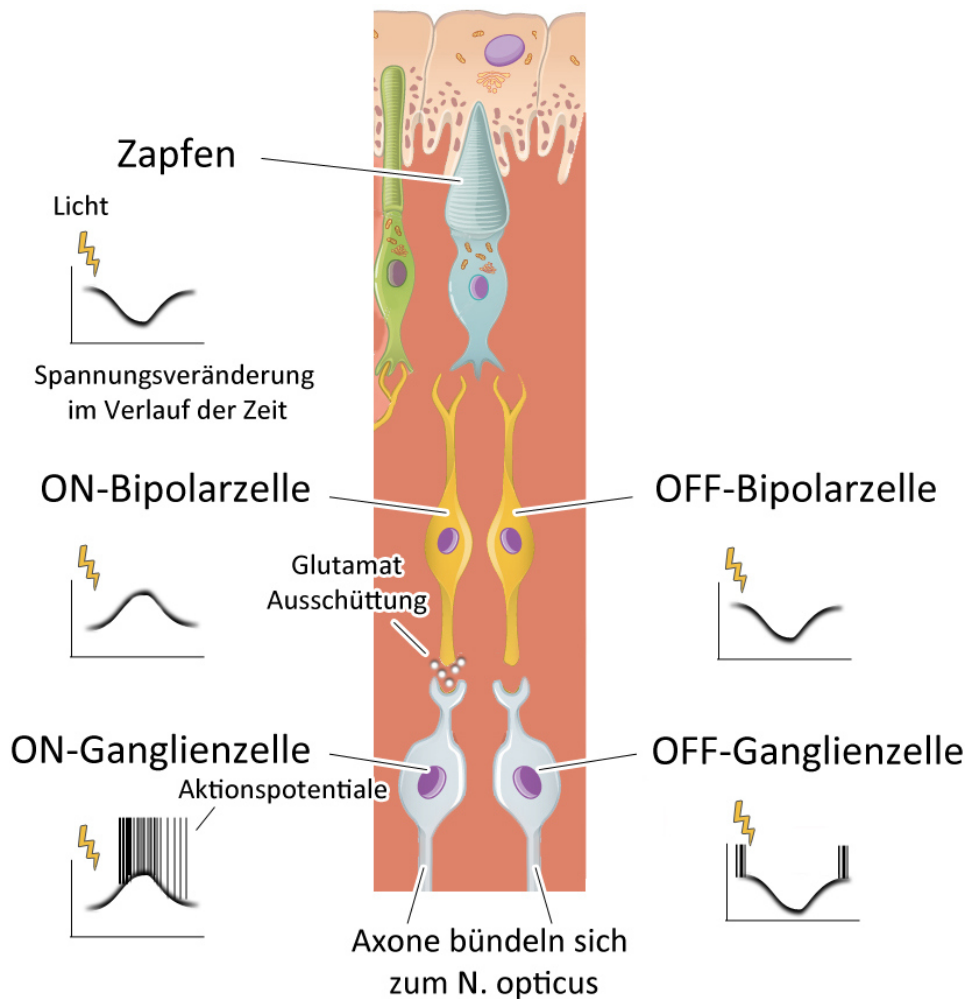


Abbildung 2 Vereinfachte Darstellung der Signalübertragung von den Zapfen über die Bipolarzellen an die Ganglienzellen und deren Spannungsänderung bei Lichteinfall auf die Retina

Bei Lichteinfall (symbolisiert durch den gezackten gelben Pfeil) wird der Zapfen hyperpolarisiert und die Glutamatausschüttung an seiner Endigung nimmt ab. Durch das Fehlen des Glutamats, nimmt seine inhibitorische Wirkung auf die ON-Bipolarzellen ab und sie werden aktiv. Infolgedessen depolarisieren letztere und schütten an ihrem Nervenzellende Glutamat aus, das wiederum aktivierend auf die ON-Ganglienzellen wirkt. OFF-Bipolarzellen hyperpolarisieren durch die Abnahme der Glutamatausschüttung aus den Zapfenendigungen und ihre eigene Glutamatausschüttung nimmt ebenfalls ab. Die Ganglienzellen leiten das Signal der Bipolarzellen gemäß ihrer Polarität in Form von Aktionspotentialen weiter. Bei Lichteinfall werden ON-Ganglienzellen durch ON-Bipolarzellen erregt, depolarisieren und generieren Aktionspotentiale. OFF-Ganglienzellen hingegen hyperpolarisieren und die Generierung von Aktionspotentialen sistiert. Mehr zu Ganglienzellen in Kapitel 2.2.3. Die Darstellung ist vereinfacht, da in Realität wesentlich mehr Synapsen und auch laterale Verbindungen von Interneuronen bestehen.

Mittige Graphik mit Retinazellen übernommen und modifiziert nach Wikimedia Commons, Creative Commons Lizenz (CC BY-SA 4.0).

2.1.3 Ganglienzellen

Die Ganglienzellen sind die letzte und wahrscheinlich komplexeste Verarbeitungsstation der Netzhaut, denn sie erhalten - direkt oder indirekt - die Signale aus allen vorgeschalteten Netzhautzellen. Auf der Ebene der Ganglienzellen setzt sich die Information aus den unterschiedlichen Schaltkreisen der Netzhaut zusammen. Die Axone der Ganglienzellen verlaufen in der Nervenzellschicht der Retina bis zur *Lamina cribrosa*, an der sie sich zum Sehnerven bündeln und zu unterschiedlichen Gehirnabschnitten ziehen (Wassle 2004). Daher werden die Ganglienzellen auch als Ausgabe- oder (engl.) *Output-Zellen* bezeichnet. Was die Retina an das Gehirn vermittelt, hängt von der Integration der

Sinnesinformation in den Ganglienzellen ab. Sie signalisieren ihre Antworten in Form von Aktionspotentialen, kurzen elektrischen Nervenimpulsen, die entlang der Axone fortgeleitet werden und an deren Ende eine Neurotransmitterausschüttung hervorrufen. Auf die Entstehung von Aktionspotentialen wird in Kapitel 2.3.1 näher eingegangen.

Die Ganglienzellen nehmen über ihre weit verzweigten Dendriten synaptischen Kontakt zu den vorgeschalteten Bipolarzellen auf. Analog zu den Bipolarzellen reagieren sie ebenfalls auf Lichtzu- bzw. Lichtabnahme (Hartline 1940) und werden in ON- oder OFF-Ganglienzellen eingeteilt (Demb et al. 2004; Kolb und Nelson 1993; Nelson et al. 1993). Ganglienzellen, die sowohl von ON- als auch von OFF-Bipolarzellen kontaktiert werden, bezeichnet man als ON-OFF-Ganglienzellen. Sie reagieren auf Wechsel zwischen Helligkeit und Dunkelheit, indem sie sowohl den Anfang als auch das Ende eines Lichtreizes in Form von Aktionspotentialen signalisieren.

Unter den Ganglienzellen existieren etwa 30-40 verschiedene Subtypen (Baden et al. 2016; Sanes und Masland 2015), die sich hinsichtlich ihrer Morphologie, Physiologie und den Projektionszielen in das Gehirn unterscheiden (Badea und Nathans 2004; Berson 2008; Coombs et al. 2006; Gollisch und Meister 2010; Kong et al. 2005; Masland 2012a; Volgyi et al. 2009; Wassle 2004). Einigen Subtypen konnten ganz bestimmte Funktionen zugeordnet werden, beispielsweise die Registrierung von Bewegungen in der Umwelt (Barlow et al. 1964). Die funktionelle Klassifizierung umfasst u. a. auch Farb-spezifische und Kanten-erkennende Ganglienzellen (Caldwell und Daw 1978; Cleland und Levick 1974).

Die Arbeitsweise der Ganglienzellen, Signale zu empfangen und zu verarbeiten, lässt sich vereinfacht über das gängige Konzept des rezeptiven Feldes beschreiben. Das rezeptive Feld einer Ganglienzelle bezeichnet die Fläche auf der Netzhaut, deren Signale die Ganglienzelle erhält. Aus elektro-physiologischen Experimenten ist bekannt, dass das rezeptive Feld ein etwa kreisförmiges Detektionsareal auf der Netzhaut ausmacht (Kuffler 1953) und aus zwei Anteilen besteht: einem Zentrum und einer es umfassenden Peripherie. Beide Bereiche lösen gegensätzliche Reaktionen in den Ganglienzellen aus. Fällt ein Lichtreiz in das Zentrum einer ON-Ganglienzelle, so antwortet diese mit einer Salve an Aktionspotentialen. Trifft der Stimulus hingegen auf die Peripherie werden weniger Aktionspotentiale ausgelöst. Wird das gesamte rezeptive Feld einer ON-Ganglienzelle beleuchtet, kann durch den Antagonismus von Zentrum und Peripherie die Zellantwort komplett unterdrückt werden. Das rezeptive Feld einer OFF-Ganglienzelle verhält sich konträr zu dem der ON-Ganglienzelle: OFF-Ganglienzellen generieren Aktionspotentiale dann, wenn das Zentrum verdunkelt wird. Das Lesen dieser schwarzen Buchstaben auf weißem Papier stellt beispielsweise einen starken Reiz für die OFF-Ganglienzellen dar. Entscheidend für die Ganglienzellantwort ist daher nicht die absolute Helligkeit des Reizes, sondern wie die Lichtintensität des Reizes im Verhältnis zur Umgebung steht, d. h. seinem Kontrast (dazu mehr in Kapitel 2.2).

2.1.4 Laterale Verbindungen

Die Informationsübermittlung von den Photorezeptoren über die Bipolarzellen zu den Ganglienzellen wird durch inhibitorische Interneurone moduliert, zu denen die Horizontalzellen und die Amakrinzellen zählen. Horizontalzellen wirken sich auf die Signale der Photorezeptoren aus, während Amakrinzellen bei der Signalweitergabe von den Bipolarzellen an die Ganglienzellen eine Rolle spielen.

Die **Horizontalzellen** erhielten ihre Bezeichnung aufgrund der Tatsache, dass ihre langen Nervenzellfortsätze horizontal innerhalb der Netzhaut verlaufen. Sie gehen Verbindungen mit mehreren Photorezeptoren ein und bilden auch untereinander elektrische Synapsen (*gap junctions*) aus, wodurch sie die Signale vieler Photorezeptoren eines weiten Bereiches der Retina integrieren können. Auf diese Weise erhalten sie Informationen über die vorherrschende Lichtintensität und modulieren rückwirkend die Signalstärke der Photorezeptoren (Hirasawa und Kaneko 2003; Kamermans et al. 2001; Koutalos und Yau 1996). Durch Drosselung der Glutamatausschüttung aus den Zapfen wird z. B. die Antwortkapazität unter sehr hellen Bedingungen nicht übersättigt. Des Weiteren

führen die Horizontalzellen zu einer besseren Abgrenzung einzelner lokaler Reize: Fällt ein Lichtreiz auf die Retina, werden die Photorezeptoren im Zentrum des Lichtreizes am stärksten und die umliegenden Sinneszellen etwas schwächer erregt. Die Horizontalzelle hemmt die Signalweitergabe der schwächer aktivierten Photorezeptoren an der Peripherie des Reizes und „schärft“ damit das Signal im Sinne einer Kontrastverstärkung.

Amakrinzellen sind Interneurone, deren Name „ohne Axon“ bedeutet, da ihr Erstbeschreiber Ramon y Cajal 1892 einen Subtyp ohne gut abgrenzbares Axon entdeckte. Mittlerweile sind mehr als 30 verschiedene Amakrinzellen beschrieben, auch solche mit Axon-ähnlichem Zellfortsatz. Die große morphologische Vielfalt unter den Amakrinzellen lässt eine entsprechende funktionelle Diversität vermuten, tatsächlich ist jedoch wenig über diese Zellklasse bekannt (Masland 2012b). Der Subtyp „All“ (spricht: A-zwei) leitet die Signale der Stäbchen über das phylogenetisch ältere Zapfensystem an die Ganglienzellen weiter. All-Amakrinzellen werden bei Beleuchtung durch Stäbchen-ON-Bipolarzellen aktiviert und kontaktieren fast alle Bipolarzellen-Subtypen (Tsukamoto und Omi 2017). Über elektrische Verbindungen (*gap junctions*) leiten sie die Signale an ON-Zapfen-Bipolarzellen weiter. Gleichzeitig üben sie mittels glycinergen Synapsen einen hemmenden Einfluss auf OFF-Zapfen-Bipolarzellen aus (Seeliger et al. 2011) und führen bei konstanter Hintergrundbeleuchtung zu einer tonischen bzw. bei schrittweiser Erhöhung der Lichtintensität zu einer phasischen Inhibition der OFF-Ganglienzellen (Zaghloul et al. 2003). Durch diese aktive Inhibition kann die bei Beleuchtung reduzierte, aber immer noch vorhandene basale Glutamatausschüttung aus den OFF-Bipolarzellen keine Aktivierung der OFF-Ganglienzellen hervorrufen (Zaghloul et al. 2003).

2.2 Kontrast- und Frequenzauflösung der Retina

Die Kontrast- und Frequenzauflösung sind wichtige Voraussetzungen für eine ungestörte visuelle Wahrnehmung. Daher stehen diese zwei wesentlichen Funktionen der Retina im Fokus der vorliegenden Arbeit. In diesem Kapitel sollen zunächst die Begriffe anschaulich erklärt werden.

In unserer Natur existiert eine große Bandbreite an Lichtintensitäten, die zwischen tiefer Nacht und gleißendem Sonnenlicht um das 10^{10} -fache variieren. Zahlreiche Objekte absorbieren, brechen und reflektieren das Licht je nach ihrer Oberflächenbeschaffenheit und Größe. Durch die Detektion verschiedener Lichtintensitäten sind wir in der Lage, Konturen zu erkennen und Objekte voneinander und von ihrer Umwelt abzugrenzen. Dabei spielt nicht allein die absolute Lichtintensität eine Rolle, sondern vor allem der relative Helligkeitsunterschied zwischen den Objekten bzw. zu ihrer Umgebungsbeleuchtung. Anhand des folgenden Beispiels lässt sich dieser Zusammenhang verbildlichen: Wir nehmen diese schwarzen Buchstaben auf dem weißen Blatt Papier sowohl bei Tageslicht als auch unter dem Licht einer Schreibtischlampe oder im Schein einer schwachen Kerze stets als dunklen Text auf einer hellen Seite wahr. Selbst unter gänzlich unterschiedlichen Lichtverhältnissen ist der Druck stets lesbar, da ein hoher Kontrast zu seinem Hintergrund besteht (sofern eine ausreichende Beleuchtung vorhanden ist). Erst durch die Fähigkeit, Kontraste wahrzunehmen, werden selbst kleine Objekte voneinander abgrenzbar. Kontrast (lat. *contra* „gegen“, *stare* „stehen“) stellt daher eine wichtige Charakteristik unserer visuellen Welt dar und wird klinisch bei der Messung der Sehschärfe berücksichtigt. Je genauer die Helligkeitsunterschiede von der Netzhaut differenziert werden können, desto höher ist ihre Sensitivität für Kontraste.

Die optische Information ist jedoch nicht statisch: Unser Körper, unser Kopf und unsere Augen bewegen sich in einer Umgebung, die sich ständig verändert und mit ihr die Lichtverhältnisse. Die Netzhaut muss daher dynamisch arbeiten, um die zeitliche Komponente der Sinnesinformation dem Gehirn zu übermitteln, das die visuelle Information integriert. Intermittierende Lichtveränderungen erscheinen uns als separate Reize unterschiedlicher Lichtintensität (z. B. Blinken) oder als Flimmern, sofern sie mit einer Geschwindigkeit unterhalb einer bestimmten Schwelle auftreten. Die maximale Abfolge von Lichtreizen, die noch als einzelne Reize voneinander differenziert werden kann, wird als

Flimmerfusionsfrequenz definiert (Levin et al. 2011). Sie liegt beim Menschen für achromatisches Licht im Wesentlichen zwischen etwa 35 und 60 Hz (De Dzn 1954; Hecht und Shlaer 1936; Hoffman et al. 2011). Wird die Grenze der Frequenzauflösung überschritten, verschwimmen die Lichtreize miteinander und werden als Licht einer mittleren Lichtintensität (d. h. kontinuierliches Licht) wahrgenommen. Maßgeblich ist dabei die Empfindlichkeit der Netzhaut, die einzelnen aufeinanderfolgenden Lichtreize getrennt voneinander zu detektieren.

2.3 Ionenkanäle in der Retina

2.3.1 Ionenkanäle dirigieren die Kommunikation zwischen den Zellen

Die Netzhautzellen bilden mit ihren synaptischen Verschaltungen ein komplexes Netzwerk aus, in dem sie über Zellsignale miteinander kommunizieren. Während Photorezeptoren und Bipolarzellen graduierte Antwortsignale erzeugen, sind Ganglienzellen - mit Ausnahme einiger Amakrinzell-Subtypen (Heflin und Cook 2007) - die einzigen Zellen der Netzhaut, die Aktionspotentiale generieren. Diese elektrischen Signale von nur 1-2 ms Dauer werden ohne Spannungsverlust rasch entlang der Zellmembran der Ganglienzellen fortgeleitet und erreichen auf diese Weise das Gehirn. Einzelne Aktionspotentiale werden als *Spikes* (engl. Spitze) bezeichnet und ihre dichte Aneinanderreihung wird „Salve“ genannt. Aus den Signalmustern rekonstruiert das Gehirn die Sinnesinformation, weshalb in der Fachliteratur häufig vom „Code der Ganglienzellen“ die Rede ist. Die Entschlüsselung dieses Signalcodes, z. B. welche Details der optischen Information (wie z. B. Farbe, Bewegung, Richtung etc.) mit welcher Abfolge von *Spikes* korrelieren und welche Netzhautzellen in die Signalentstehung involviert sind, ist ein Hauptaugenmerk der Neurowissenschaften im Bereich der Retinaforschung.

Voraussetzung für die Entstehung von Aktionspotentialen in den Ganglienzellen ist die an der unerregten Nervenfasern aufrechterhaltene Spannungsdifferenz zwischen Zellinnerem und Zelläußeren, dem Ruhemembranpotential. Das Ruhemembranpotential wird in der Literatur mit Werten zwischen -55 und -80 mV angegeben, abhängig davon, ob es *in situ* oder *in vitro* gemessen wurde (Ishida 1995). Es entsteht durch ein bestimmtes Ionenverhältnis von Kalium, Natrium und Chlorid im Intra- und Extrazellulärraum, welches durch Ionenkanäle reguliert wird (Hodgkin und Huxley 1952). Ionenkanäle bilden in der hydrophoben Lipidschicht der Zellmembran transmembranäre Poren aus, durch die die geladenen Teilchen passieren können. Sie sind typischerweise selektiv für jeweils eine Gruppe von Kationen bzw. Anionen und ihre Leitfähigkeit wird von der Membranspannung beeinflusst.

Ein Aktionspotential ist eine kurzzeitige Veränderung des Membranpotentials in Richtung positiver Werte, das als elektrisches Signal entlang der Zellmembran bis hin zum Nervenzellende fortgeleitet wird. Initiiert wird das Aktionspotential der Ganglienzellen durch die Bipolarzellen, deren ausgeschüttete Neurotransmitter an den synaptischen Verbindungen auf die Glutamatrezeptoren der Ganglienzellen trifft. Über die aktivierende Wirkung des Glutamats kommt es zu einer Depolarisation der Ganglienzellmembran, d. h. ihre Membranspannung wird vom unerregten Zustand (Ruhepotential) in Richtung positiverer Werte angehoben. Sobald die Aktivierungsschwelle der spannungsabhängigen Natrium-Kanäle in der Membran der Ganglienzellen erreicht wird, öffnen diese und lassen Natriumionen in das Zellinnere passieren, wodurch das Membranpotential weiter depolarisiert wird. Es kommt zu einer Spannungsumkehr in den deutlich positiven Spannungsbereich (der sogenannte *Overshoot*). Noch vor Erreichen des Spannungsmaximums haben sich die Natrium-Kanäle bereits wieder verschlossen und spannungsabhängige Kalium-Kanäle geöffnet, die ebenfalls durch Depolarisation aktiviert werden. Die entlang ihres Konzentrationsgradienten aus der Zelle strömenden Kaliumionen führen die Ganglienzelle nun wieder zu ihrem Ausgangspotential zurück (Repolarisationsphase). Kalium-Kanäle haben jedoch eine trägere Kinetik und bleiben auch nach Erreichen des Ruhepotentials noch weiter offen, sodass es durch den Verlust an positiver Ladung kurzzeitig zu einer Unterschreitung des Ruhepotentials kommt (als Hyperpolarisierung bezeichnet). Ein Natrium-Kalium-Austauscher stellt das elektrochemische Gleichgewicht wieder her.

Die oben beschriebene initiale und passagere Öffnung der spannungsaktivierten Natrium-Kanäle in der Membran bleibt nicht lokal begrenzt, sondern verselbstständigt sich entlang der Nervenfasern der Ganglienzelle. Benachbarte spannungsabhängige Natrium-Kanäle werden aufgrund der Spannungsänderung aktiviert und öffnen sich ebenfalls. Auf diese Weise wird die Veränderung des Membranpotentials bis zum Erreichen der Nervenzellendigungen fortgetragen. Eine Ausbreitung des Aktionspotentials in die entgegengesetzte Richtung ist nicht möglich, da die Natrium-Kanäle nach ihrem Schließen in einen inaktiven Zustand übergehen. Daher ist die Auslösung eines weiteren Aktionspotentials erst dann wieder möglich, wenn die Natrium-Kanäle wieder in ihren aktivierbaren Zustand übergehen. Diese Zeitspanne von wenigen Millisekunden, in der kein weiteres Aktionspotential auslösbar ist, wird als Refraktärzeit bezeichnet und begrenzt die maximale Anzahl an generierbaren Aktionspotentialen.

2.3.2 HCN-Kanäle wirken sich auf das Membranpotential aus

Neben den klassischen spannungsgesteuerten Natrium- und Kalium-Kanälen existieren noch weitere Ionenkanalgruppen, unter denen die HCN-Kanäle in den letzten drei Jahrzehnten zunehmend an Interesse gewonnen haben. HCN-Kanäle (aus dem Englischen für *Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channels*) befinden sich nicht nur in der Netzhaut, sondern auch im Herz, Gehirn und Muskel und sind an wichtigen Organfunktionen beteiligt. Während sie im Gehirn (Ulrich 2002; Wang et al. 2006; Xue et al. 2012) und Herzen (He et al. 2014; Larsson 2010) zu rhythmischen Zellentladungen führen, spielen sie in der Retina eine Rolle in der Signalverarbeitung (Della Santina et al. 2012; Seeliger et al. 2011). Auf die derzeitigen Erkenntnisse der HCN-Kanäle in der Netzhaut wird zu einem späteren Zeitpunkt näher eingegangen Kapitel (2.3.3), um zunächst einen generellen Überblick über die Eigenschaften der Kanäle voranzustellen.

Während spannungsabhängige Ionenkanäle in der Regel bei Depolarisation des Membranpotentials öffnen, erfolgt die Aktivierung der HCN-Kanäle im Gegensatz dazu durch Hyperpolarisation. Durch die geöffneten HCN-Kanäle strömen Kalium- und Natriumionen in die Zelle ein, und die positive Ladung dieser Ionen hebt die Membranspannung wieder an. Der Mechanismus erschien zum Zeitpunkt der Entdeckung so außergewöhnlich, dass dieser von HCN-Kanälen getragene Ionenstrom die Bezeichnung *anomalous rectifier current*, im Herzen *funny current* (If) und in Neuronen *queer current* (Iq) erhielt (Pape 1996). Für Nervenzellen ist heutzutage die Bezeichnung „hyperpolarisationsaktivierter Ionenstrom“ (Ih) gebräuchlich, im Herzen spricht man weiterhin vom *funny current*.

Eine weitere funktionelle Besonderheit der HCN-Kanäle führte zu ihrer Bezeichnung *cyclic nucleotide-gated*, nämlich die Regulation ihres Öffnungsverhaltens durch zyklische Nukleotide (Banks et al. 1993; Cuttle et al. 2001; DiFrancesco und Tortora 1991; Ingram und Williams 1996). Bindet intrazelluläres zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) an die dem Zellinneren zugewandte Seite des HCN-Kanals, erhöht sich dessen Öffnungswahrscheinlichkeit (DiFrancesco und Tortora 1991).

Obwohl der Ionenstrom erstmalig bereits 1961 in Motoneuronen von Katzen beschrieben wurde (Araki et al. 1961; Ito und Oshima 1965), blieb die molekulare Struktur der HCN-Kanäle lange Zeit unbekannt. Erst mithilfe der fortgeschrittenen molekularbiologischen Labortechniken ließen sich die HCN-Kanäle nachweisen (Santoro et al. 1997) und dadurch der gemeinsame Ursprung der ungewöhnlich betitelten Ionenströme in den verschiedenen Geweben feststellen. Es wurden vier Isoformen (HCN1-HCN4) in Säugetieren identifiziert (Biel et al. 1999; Biel et al. 2009; Santoro et al. 1998; Santoro und Tibbs 1999; Seifert et al. 1999), die abhängig von Gewebe und Zelltyp in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert werden. Abbildung 3 zeigt schematisch den molekularen Aufbau eines HCN-Kanals, der sich aus vier Untereinheiten zu je sechs Segmenten zusammensetzt. Die Untereinheiten der vier Isotypen unterscheiden sich in ihren biophysikalischen Eigenschaften, wie beispielsweise der Sensitivität für cAMP, die bei den HCN1- und HCN3-Kanäle geringer ist als bei HCN2 (Chen et al. 2001; Santoro und Tibbs 1999) und HCN4 (Ishii et al. 2001; Seifert et al. 1999). Außerdem bestehen Unterschiede in der

Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik der Isotypen. Am schnellsten aktivierbar und deaktivierbar ist der HCN1-Kanal mit einer Latenz von etwa 100 ms, während die anderen HCN-Kanäle Zeiten von über 200 ms bis hin zu mehreren Sekunden benötigen (Knop et al. 2008; Moosmang et al. 2001; Muller et al. 2003). Je nachdem, mit welchen HCN-Kanälen die Zellmembran ausgestattet ist, weisen die I_h-Ionenströme etwas andere Eigenschaften auf. Diese biophysikalische Vielfalt wird ungleich komplexer, wenn die Untereinheiten der Kanäle als Heteromere vorliegen (Chen et al. 2001).

Trotz der unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften ähneln sich HCN-Isotypen in ihrer molekularen Struktur, da sie eine starke Homologie in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen. Dies betrifft auch ihre intrazellulär zugewandte Porenregion, die Wirkort verschiedener inhibierender Substanzen ist (Cheng et al. 2007). An dieser Stelle bindet das Medikament Ivabradin, das als bisher einziger selektiver HCN-Kanalblocker therapeutische Anwendung findet.

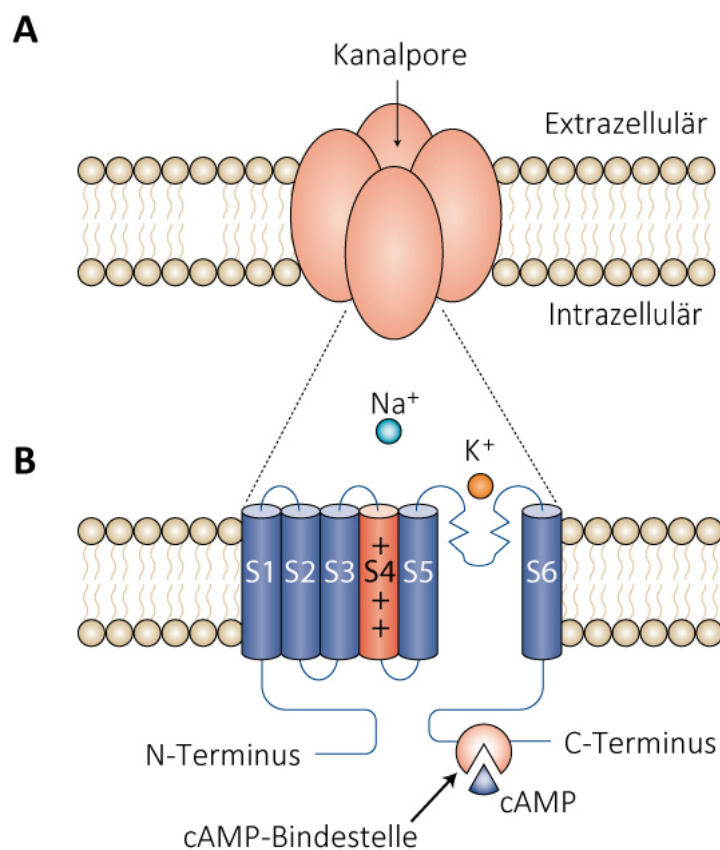


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Aufbaus eines HCN-Kanals und transmembranäre Topologie

Der HCN-Kanal befindet sich in der doppelwandigen Zellmembran und ist ein tetrameres Protein, d. h. aus vier Untereinheiten zusammengesetzt, die eine Pore formen (A). Jede dieser Untereinheiten besteht aus sechs transmembranären α -Helices (als Segment S1-S6 bezeichnet; unten). Das S4-Segment (Vergrößerung in B) ist positiv geladen und fungiert als transmembranärer Spannungssensor. Bei Hyperpolarisation des Membranpotentials (Verschiebung der Membranspannung zu negativen Werten) wird der Kanal aktiviert und durch eine noch nicht bekannte Konformationsänderung durchlässig für positiv geladene Natrium- und Kaliumionen. Dadurch kommt der I_h-Ionenstrom zustande, der die intrazelluläre Ladung zu positiveren Werten verschiebt. Das carboxylierte Ende (C-Terminus) des S6-Segments umfasst eine Bindestelle für intrazelluläre Messenger-Moleküle, die zyklischen Nukleotide (B).

Abbildung aus Seeliger et al. (2011) modifiziert mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlags.

Ivabradin ist seit 2005 auf dem europäischen Markt zur Behandlung von Patienten mit koronarer Herzerkrankung oder chronischer Herzinsuffizienz NYHA II-IV zugelassen, wenn Kontraindikationen oder Unverträglichkeiten gegenüber Betablockern bestehen (Borer et al. 2003; Fox et al. 2009).

Voraussetzung für den Einsatz von Ivabradin ist das Vorhandensein eines normalen Sinusrhythmus (≥ 75 Schläge pro Minute), da er seine herzfrequenzabsenkende Wirkung über Inhibition der HCN4-Kanäle des Sinusknotens entfaltet. Die Zellen des Sinusknoten sind keine Neurone, sondern spezialisierte Herzmuskelzellen, die durch spontane Depolarisierung autonom Aktionspotentiale erzeugen können. Die repetitiven Entladungen entstehen durch die direkt an die Repolarisationsphase anschließende erneute Depolarisierung des Membranpotentials. An diesem Automatismus wirken maßgeblich die HCN4-Kanäle mit, die mit 80% den Hauptanteil der exprimierten HCN-Isotypen im Sinusknoten ausmachen (Shi et al. 1999). Sie öffnen am Ende eines Aktionspotentials, wenn das Membranpotential hyperpolarisiert ist (Noma und Irisawa 1976) und der durch sie hervorgerufene I_f -Ionenstrom hebt das Membranpotential an die Auslöseschwelle für ein weiteres Aktionspotential an (Wang et al. 2001).

Ivabradin inhibiert die HCN4-Kanäle des Sinusknotens und reduziert seine Entladungsfrequenz, wodurch die Herzfrequenz sinkt (negative Chronotropie). Durch die verminderte Herzarbeit und verlängerte Entspannungs- und Füllungsphase des Herzzyklus (Diastole) sinkt der Sauerstoffbedarf des Myokards. Gleichzeitig nimmt die koronare Vasodilatation zu, wodurch die Perfusion und damit Sauerstoffzufuhr des Herzmuskels begünstigt werden (Colin et al. 2003). Im Gegensatz zu den ebenfalls negativ-chronotrop wirkenden Betablockern, senkt Ivabradin nicht die Kontraktionskraft des Herzens und kann daher auch bei fortgeschrittener, chronischer Herzinsuffizienz eingesetzt werden (Bois et al. 1996; Gardiner et al. 1995). Damit bietet Ivabradin ein neues antianginöses Wirkprinzip zu den bisherigen Medikamenten. Zu Beginn der Ivabradineinnahme kommt es allerdings bei etwa 15% der Patienten zu Sehstörungen (Borer et al. 2003). Eine plausible Erklärung für die visuellen Nebenwirkungen ist die Interaktion von Ivabradin mit den HCN-Kanälen der Netzhaut, da die Substanz zu einem gewissen Anteil durch die Blut-Retina-Schranke diffundieren kann (Cervetto et al. 2007). Diese Nebenwirkung lenkte das medizinische Interesse auf die HCN-Kanäle in der Retina, deren Bedeutung für die Signalcodierung bislang nicht abschließend geklärt ist. Der derzeitige Wissensstand wird im folgenden Kapitel zusammengefasst.

2.3.3 HCN-Kanäle in der Retina und ihr Einfluss auf die Zellsignale

Lange bevor alle vier Isoformen der HCN-Kanäle in der Netzhaut nachgewiesen wurden (Muller et al. 2003), entdeckte man ihren I_h -Ionenstrom zunächst in den Stäbchen (Fain et al. 1978). Mittlerweile ist bekannt, dass HCN-Kanäle in unterschiedlichem Ausmaß auch in Zapfen, Bipolarzellen (Cangiano et al. 2007; Ivanova und Muller 2006; Kim et al. 2003), Ganglienzellen (Oi et al. 2008; Stradleigh et al. 2011), Amakrinzellen (Koizumi et al. 2004) und wahrscheinlich auch Horizontalzellen (Knop et al. 2008) vorhanden sind. HCN1-Kanäle besitzen wie in 2.3.2 erwähnt die schnellste Aktivierungskinetik unter den vier Isotypen und werden hauptsächlich von den Photorezeptoren exprimiert, während sich HCN2-Kanäle vor allem in Stäbchen-Bipolarzellen nachweisen lassen (Barrow und Wu 2009; Muller et al. 2003). Beide Zelltypen exprimieren, allerdings in wesentlich geringerem Maße, auch andere HCN-Isotypen - beispielsweise kommen HCN4-Kanäle in bestimmten Subtypen der Bipolarzellen und HCN3-Kanäle in Zapfen vor. HCN1- und HCN2-Kanäle sind hinsichtlich ihrer Lage und Funktion in Photorezeptoren und Bipolarzellen am besten untersucht worden. HCN1-Kanäle sind an den Innensegmenten der Sinneszellen konzentriert (Barrow und Wu 2009; Cangiano et al. 2007; Demontis et al. 2002), während HCN2-Kanäle vor allen an Dendriten (Cangiano et al. 2007; Della Santina et al. 2012; Fyk-Kolodziej und Pourcho 2007) und Axonterminalen (Muller et al. 2003) von Stäbchen-Bipolaren lokalisiert sind. Damit befinden sie sich im Bereich der synaptischen Endigungen dieser Zelltypen, nämlich dort, wo die Signalübertragung stattfindet.

Allen HCN-Isoformen in der Retina ist gemeinsam, dass sie bei einer Hyperpolarisation von etwa -70 mV aktiviert werden (Barrow und Wu 2009) und ihr I_h -Ionenstrom das Membranpotential der Netzhautzellen wieder anhebt. Dadurch wird im Sinne einer Rückkopplung eine zu starke bzw. zu lange

zelluläre Hyperpolarisation der Netzhautzellen verhindert (Muller et al. 2003). Photorezeptoren hyperpolarisieren bei Beleuchtung (siehe Kapitel 2.1.1), da ihr Membranpotential durch die Phototransduktionskaskade zu negativeren Werten hin verschoben wird (Fain et al. 1978). Die Hyperpolarisation aktiviert die HCN1-Kanäle und der nun entstehende Ih-Ionenstrom führt das Membranpotential in Richtung des Ruhepotentials zurück (Abbildung 4). Aufgrund dieses Mechanismus wird die Reaktion der Sinneszelle auf einen Lichtreiz begrenzt (Cangiano et al. 2007), folglich können die Photorezeptoren wieder rasch auf einen weiteren Reiz mit einer erneuten Hyperpolarisation reagieren.

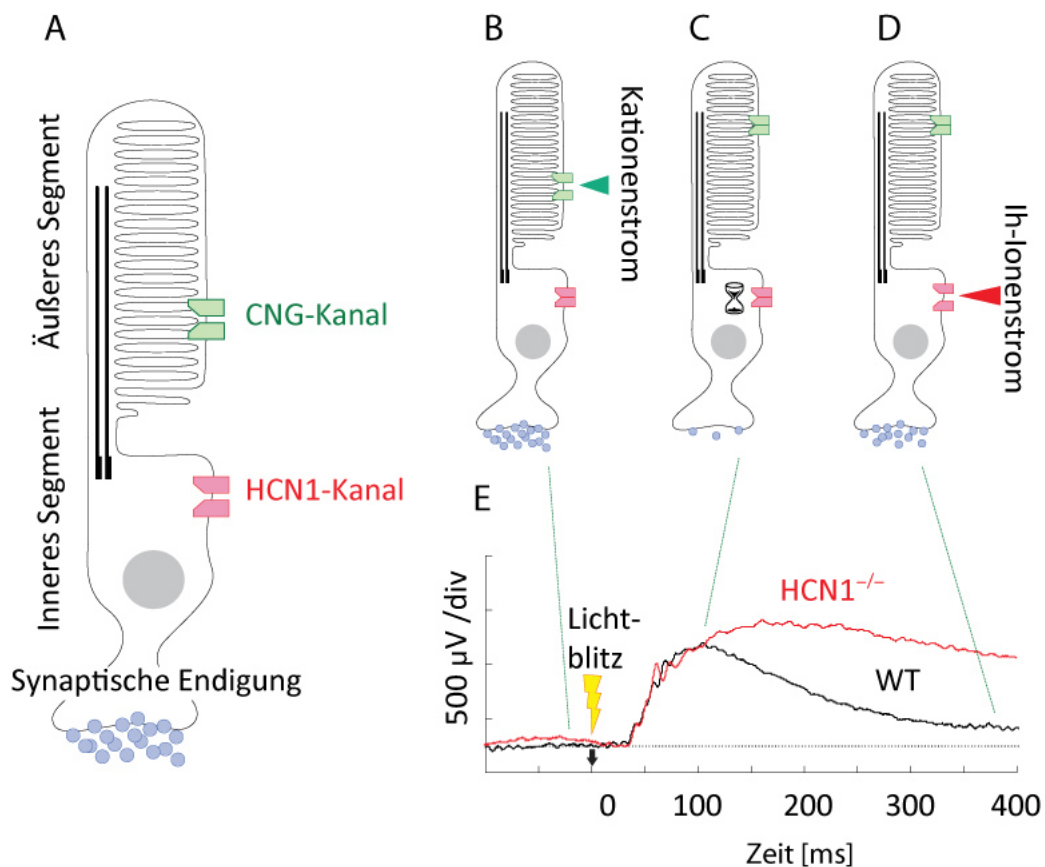


Abbildung 4 Funktion der HCN1-Kanäle in den Photorezeptoren

A Die Photorezeptoren, hier schematisch ein Stäbchen dargestellt, exprimieren HCN1-Kanäle konzentriert in der Außenmembran der proximalen Region (Demontis et al. 2002), zu der das innere Segment und die präsynaptischen Endigungen zählen (Della Santina et al. 2012). Das photosensitive äußere Segment, in dem die Phototransduktion stattfindet, zeigt hingegen keine Expression von HCN-Kanälen (Demontis et al. 2002; Fyk-Kolodziej und Pourcho 2007; Knop et al. 2008; Muller et al. 2003). Hier liegen die CNG-Kanäle (zyklisch Nukleotid-gesteuerte Kanäle), die an der Phototransduktion beteiligt sind. In **B**, **C** und **D** werden die Zustände der Ionenkanäle vor (**B**) und nach (**C**, **D**) einem Lichtblitz gezeigt. **E** zeigt korrespondierend dazu die Spannungsveränderungen pro Zeit [ms] im ERG jeweils bei HCN1-Kanal-Knock-Out (HCN1^{-/-}) und beim Wildtyp (WT). Im Ruhezustand (bei Dunkelheit, **B**) lassen die Kanäle Kationen in das Zellinnere passieren. In Folge einer Lichtexposition beginnt die Phototransduktionskaskade und die CNG-Kanäle schließen. Dadurch kommt es zur Hyperpolarisation des Membranpotentials (**C**), wodurch die Glutamat-Ausschüttung an den Endigungen der Photorezeptoren sistiert. Die Hyperpolarisation initiiert die Öffnung der HCN1-Kanäle (**D**), über deren Ih-Ionenstrom die Photorezeptoren depolarisieren und wieder zu ihrer Ausgangsspannung zurückgebracht werden. Abbildung aus Postea und Biel (2011), modifiziert mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlags.

In Dunkelheit hingegen schütten die Photorezeptoren kontinuierlich Glutamat aus, wodurch die ON-Bipolarzellen hyperpolarisiert werden. Die HCN2-Kanäle der ON-Bipolarzellen sind unter diesen Bedingungen tonisch aktiv, wirken der Hyperpolarisation entgegen und stabilisieren das Membran-

potential der Zelle innerhalb eines physiologischen Spannungsbereichs (Cangiano et al. 2007). Sobald eine Änderung der Glutamatausschüttung durch die Sinneszellen erfolgt, z. B. aufgrund eines eintreffenden Lichtreizes, kann das Membranpotential der ON-Bipolarzelle unverzüglich depolarisiert werden.

Da sich HCN-Kanäle auf die Entstehung bzw. Beendigung der Zellaktivität auswirken, beeinflussen sie maßgeblich die zeitlichen Eigenschaften der Signalcodierung. Dies wird besonders deutlich bei der Auflösung hoher Frequenzen, wenn schnell aufeinanderfolgende Lichtreize detektiert werden müssen (Demontis et al. 1999; Knop et al. 2008; Sothilingam et al. 2016). In genetisch veränderten Netzhäuten, denen der HCN1-Kanal fehlt (*HCN1-Knock-Out*), kommt es nach Lichtstimulation zu einer überschießenden Hyperpolarisation der Photorezeptoren mit konsekutiver Übersättigung der ON-Bipolarzellen und beide Zelltypen verlieren die Fähigkeit, auf Stimuli mit hohen Frequenzen zu reagieren (Della Santina et al. 2012; Knop et al. 2008). Dieser Befund konnte auch anhand von Elektroretinogrammen (ERGs) lebender Versuchstiere nachgewiesen werden. Transgene Mäuse, denen entweder das Gen für HCN1-Kanäle oder für HCN2-Kanäle fehlte (*HCN1-* bzw. *HCN2-Knock-Out*), zeigten bei Stimulation mit repetitiven Lichtreizen unterschiedlicher Frequenzen unter mesopischen und photopischen Bedingungen ERG-Veränderungen, die mit einer herabgesetzten Frequenzauflösung zu vereinbaren sind. Daraus lässt sich schließen, dass HCN-Kanäle den Photorezeptoren und Bipolarzellen die Funktion eines Bandpassfilters verleihen, der bevorzugt Signale im hohen Frequenzbereich passieren lässt (Barrow und Wu 2009; Cangiano et al. 2007; Della Santina et al. 2012). Lichtreize niedrigerer Frequenzen hingegen werden nicht weitergeleitet, da sie sich nur schwach auf das Membranpotential auswirken und somit keine Zellantwort auslösen (Hutcheon und Yarom 2000). Des Weiteren scheinen HCN-Kanäle für die korrekte Signalweiterleitung von Zapfen- und Stäbchensignalen notwendig zu sein, wenn beide Photorezeptortypen gleichzeitig aktiv sind. Stäbchen nutzen für die Übertragung ihrer Signale an die Ganglienzellen u. a. die Zapfen-Bipolarzellen, die sie über einen indirekten Weg mit zwischengeschalteten Stäbchen-Bipolarzellen und Amakrinzellen kontaktieren (siehe Kapitel 2.1.2 und 2.1.4). Bei *HCN1-Knock-Out* wurde in einer Studie festgestellt, dass unter mesopischen Bedingungen, wenn sowohl Zapfen als auch Stäbchen aktiv sind, die Zapfensignale nicht mehr an die Bipolarzellen fortgeleitet werden, obwohl die Zapfenaktivität per se durch das *HCN1-Knock-Out* nicht beeinträchtigt wird. Als Grund für die fehlende Fortleitung wird die verlängerte Hyperpolarisation der Stäbchen angenommen, die die Weiterleitung der Zapfensignale unterdrücken, indem sie den gemeinsam genutzten Signalweg übersättigen (Seeliger et al. 2011).

In Übereinstimmung mit den erwähnten *HCN-Knock-Out*-Befunden führt auch eine pharmakologische Blockade der HCN-Kanäle mit Ivabradin zu einer Unterdrückung des I_h-Ionenstroms sowohl in den Photorezeptoren als auch in den Bipolarzellen (Della Santina et al. 2012; Demontis et al. 2009). Bei Stimulation mit schnell aufeinanderfolgenden Lichtreizen unter Ivabradineinfluss zeigte sich im ERG eine herabgesetzte Auflösung für hohe Frequenzen, ähnlich wie sie bei *HCN-Knock-Out*-Tieren beobachtet wurde (Della Santina et al. 2010; Della Santina et al. 2012). Der Frequenzbereich, auf den die Photorezeptoren und Stäbchen-Bipolarzellen normalerweise reagieren, wird durch Ivabradin zu niedrigen Frequenzen hin verschoben.

Weder kurz- noch langzeitiges Einwirken der Substanz führt zu morphologischen Veränderungen an den Netzhautzellen, weshalb die Effekte von Ivabradin allein auf seine inhibitorische Wirkung an den HCN-Kanälen zurückgeführt werden können (Borer et al. 2003; Della Santina et al. 2010; Gargini et al. 1999). Auch der strukturverwandte HCN-Kanal-Inhibitor Zatebradin (ZD7288) verlängert und verstärkt die Hyperpolarisierung von Photorezeptoren (Barrow und Wu 2009; Satoh und Yamada 2000) und Bipolarzellen (Cangiano et al. 2007) nach Stimulation mit repetitiven Lichtreizen. Ferner nimmt unter Zatebradineinfluss die Spontanaktivität in den Photorezeptoren zu (Kawai et al. 2005).

In einer aktuell veröffentlichten Studie wurde der Effekt von Ivabradin auf die Ganglienzellsignale untersucht, deren Antwortverhalten sich durch die HCN-Kanalblockade veränderte (Bemme et al.

2017). Bei den ON-Ganglienzellen nahm die Spontanaktivität zu, während die Spontanaktivität der OFF-Ganglienzellen sich insgesamt reduzierte und salvenartig auftrat. Die durch Ivabradin inhibierten HCN-Kanäle beeinflusste auch die zeitlichen Antworteigenschaften der Ganglienzellen, die verzögert auf Lichtstimulation reagierten. Die Inhibition der HCN-Kanäle führt offenbar zu einem Ungleichgewicht in den ON- und OFF-Signalwegen der Netzhaut. Dies könnte einen Erklärungsansatz für die visuellen Nebenwirkungen liefern (Bemme et al. 2017), die mit 15% zu den häufigsten unerwünschten Medikamentennebenwirkungen bei Therapie mit Ivabradin zählen (Borer et al. 2003; Ruzyllo et al. 2007; Tardif et al. 2005). Sie umfassen Scheinwahrnehmungen von Licht und Farbe, die als Phosphene bezeichnet werden (griech. für *phos* „Licht“ und *phainain* „erscheinen“), sowie die Herabsetzung der Sehschärfe. Die Symptome treten typischerweise innerhalb der ersten zwei Monate nach Therapiebeginn auf und nehmen mit Dosissteigerung zu (Borer et al. 2003).

Phosphene im Allgemeinen sind unspezifische visuelle Phänomene, die mit Pathologien der Netzhaut oder des Gehirns assoziiert sein können. Meistens werden sie als unerwünschte Arzneimittelwirkung bei einer Vielzahl von Substanzen beobachtet (Fraunfelder et al. 2014). Unter Ivabradineinnahme treten sie oftmals bei schwacher Beleuchtung auf, wenn die Sensitivität der Retina für Lichtreize besonders hoch ist und werden häufig durch abrupte Veränderungen der Lichtintensität ausgelöst (Cervetto et al. 2007; Tse und Mazzola 2015). Bei länger fortgeführter Einnahme oder spätestens nach Absetzen des Medikaments sistierten die Sehstörungen, die auch bei herzgesunden Probanden im Rahmen klinischer Testreihen nachgewiesen wurden (Cervetto et al. 2007).

Der Entstehungsmechanismus von Phosphenen ist nicht gänzlich geklärt (Mathis et al. 2017). Als visuelle Nebenwirkung bei der Einnahme von Ivabradin wird ursächlich die Inhibition der HCN-Kanäle in der Netzhaut angenommen, da Ivabradin im Gegensatz zur Blut-Gehirn-Schranke (Savelieva und Camm 2006) über die Blut-Retina-Schranke diffundieren kann (Cervetto et al. 2007). Es ist jedoch noch wenig darüber bekannt, wie sich die pharmakologische Blockade der retinalen HCN-Kanäle auf die Signalverarbeitung in den Ganglienzellen und damit letztlich auf das Sehvermögen auswirkt. Diesem Thema widmet sich die vorliegende Arbeit, deren Zielsetzung im nachfolgenden Kapitel ausgeführt wird.

2.4 Zielsetzung dieser Arbeit: HCN-Kanäle und ihre Inhibition durch Ivabradin

Die HCN-Kanäle in der Netzhaut und ihre Bedeutung für die Signalentstehung und -fortleitung in den Netzhautzellen ist ein aktuelles Thema in der Sinnesphysiologie des Sehsystems. Durch die Einführung des Herzmedikaments Ivabradin, dem ersten therapeutisch angewendeten selektiven HCN-Kanalblocker, wurden die retinalen HCN-Kanäle auch ins medizinische Interesse gerückt. Warum bei einigen Patienten unter Ivabradineinnahme Phosphene auftreten, ist nicht ausreichend verstanden. Aus mehreren Studien geht hervor, dass die HCN-Kanäle der Netzhaut bei der Signaltransduktion zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen eine Rolle spielen müssen, da sich die Inhibition oder das Fehlen der HCN-Kanäle auf das Membranpotential dieser Zellen auswirkt. Die bisherigen Erkenntnisse über die Funktion der HCN-Kanäle in der Netzhaut (siehe Kapitel 2.3.3) beruhen größtenteils auf Einzelzelleitungen an isolierten Netzhautzellen sowie Elektroretinogrammen, die an Retinae mit gentechnisch deaktivierten oder pharmakologisch inhibierten HCN-Kanälen erhoben wurden. Eine jüngst publizierte Studie untersuchte erstmals die Ganglienzellsignale unter Ivabradineinfluss anhand von Multielektrodenableitungen (Bemme et al. 2017). Die Ganglienzellen reagierten unter HCN-Kanal-Inhibition nicht nur mit Verzögerung auf Lichtstimulation, sondern zeigten Veränderungen in ihrem Antwortmuster und ihrer Spontanaktivität.

Die vorliegende Arbeit macht sich zur Aufgabe, den Ivabradineinfluss auf die Ganglienzellen näher zu beleuchten. Ausgehend von den bisherigen Erkenntnissen, dass 1.) die Sehstörungen bei Ivabradineinnahme durch Lichtintensitätsveränderungen ausgelöst werden können und 2.) eine HCN-Kanalblockade die zeitlichen Antworteigenschaften der Netzhautzellen beeinflusst, werden zwei

wesentliche Eigenschaften der Reizverarbeitung untersucht: die Auflösung von Kontrasten und zeitlichen Frequenzen. Die Empfindlichkeit, mit der die Retina verschiedene Lichtintensitäten und deren zeitliche Veränderungen detektiert, bildet die Grundlage für das räumliche und zeitliche Auflösungsvermögen des visuellen Systems. Daher machte sich die Arbeit zum Ziel, die Kontrast- und Frequenzsensitivität der Netzhaut mit und ohne Ivabradin-vermittelter HCN-Kanalblockade zu analysieren. Dazu wurden die Aktionspotentiale der Ganglienzellen mittels Multielektroden-Arrays (MEA) *in vitro* abgeleitet. Der Einsatz von MEAs macht es möglich, die Signale vieler einzelner Ganglienzellen gleichzeitig und ohne Zerstörung ihrer zellulären Intaktheit zu erfassen. ON- und OFF-Ganglienzellen wurden getrennt voneinander betrachtet, da die Information über Helligkeit, bzw. Lichtintensitätszunahme (ON) und Dunkelheit bzw. Lichtintensitätsabnahme (OFF) über unterschiedliche Verarbeitungswege an die ON- und OFF-Ganglienzellen weitergeleitet wird.

Aus dem Antwortverhalten der Ganglienzellen vor, während und nach Anwendung einer Ivabradin-haltigen Pufferlösung wurde in zwei separaten Versuchsanordnungen ihre Sensitivität für Kontraste und Frequenzen analysiert. Darüber hinaus wurde durch längeres Ausspülen der Substanz untersucht, ob die Veränderungen der Ivabradin-vermittelten Blockade umkehrbar sind. Eine Reversibilität der HCN-Kanal-Inhibition würde sich mit der klinischen Beobachtung vereinbaren lassen, dass die Scheinwahrnehmungen nach dem Absetzen des Medikaments sistieren (Borer et al. 2003; Cervetto et al. 2007; Savelieva und Camm 2006). Neben der Kontrast- und Frequenzsensitivität wird in einer weiteren Analyse die Veränderung der Feuerrate der Ganglienzellen analysiert, um weiteren Aufschluss über die Auswirkung von Ivabradin zu gewinnen.

Die Fragestellungen dieser Arbeit lassen sich wie folgt konkretisieren: Führt Ivabradin zu einer Veränderung der Sensitivität für Kontraste und Frequenzen und inwiefern ist dieser Effekt reversibel? Kommt es zu einer Veränderung der Feuerrate der Ganglienzellen und wenn ja, wie steht dieser Befund im Zusammenhang mit der Auflösung von Kontrasten und Frequenzen? Bestehen Unterschiede zwischen ON- und OFF-Ganglienzellen? Lassen sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit die visuellen Nebenwirkungen von Ivabradin bei Einsatz als Herzmedikament erklären? Welche Bedeutung könnten die HCN-Kanäle generell für das Sehvermögen haben?

Die Experimente fanden *in vitro* an isolierten Retinae von Mäusen statt, einem typischen Säugetiermodell in der Grundlagenforschung des zentralen Nervensystems. Da die Netzhaut der Säugetiere in Hinblick auf die wesentlichen Zelltypen, Ionenkanälen und Funktionen übereinstimmt (Dowling und Dubin 2011; Wu 2010), lassen sich somit Rückschlüsse auf die Funktionsweise der menschlichen Retina ziehen.

3 Methoden

Um den Einfluss der HCN-Kanal-Inhibition auf die Signalcodierung in der Retina zu untersuchen, wurden die Aktionspotentiale der Ganglienzellen vor, während und nach Einwirken eines Ivabradin-haltigen Puffers abgeleitet. Im ersten Versuchsansatz wurden die Ganglienzellen hinsichtlich ihrer Sensitivität für Kontraste und in einem zweiten Versuchsansatz hinsichtlich ihrer Frequenzauflösung analysiert. Zur Stimulation der explantierten Netzhaut mit Lichtimpulsen wurden spezifische Abfolgen von Lichtimpulsen auf die Retina projiziert. Diese als Stimuli bezeichneten Lichtmuster imitierten eine Bandbreite von Kontrasten bzw. Frequenzen, wie sie in der natürlichen Umwelt vorkommen können. Die Antwortreaktion der Ganglienzellen wurde extrazellulär mit Multielektroden-Arrays (MEAs) abgeleitet, die sich für Untersuchungen großer Zellpopulationen elektrisch aktiven Gewebes bewährt haben (Spira und Hei, 2013). Multielektroden-Arrays haben den Vorteil, dass sie bei zuvor entsprechend sorgfältiger Präparation die Unversehrtheit der Netzhaut über eine ausreichend lange Zeit bewahren. Die Netzhaut befand sich zur Aufrechterhaltung ihrer Vitalität stets in einer Nährlösung, um eine stabile Aufzeichnung der Aktionspotentiale über mehrere Stunden zu erreichen. Die abgeleiteten Daten wurden anschließend offline mit speziell auf die Stimuli angepasster Software in dem Computerprogramm MatLab analysiert und auf statistische Signifikanz überprüft.

In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Etappen der Experimentdurchführung dargelegt, von der Gewinnung des Untersuchungsmaterials, dem apparativen Aufbau und der Durchführung der Versuche bis zur Aufbereitung und Auswertung der abgeleiteten Zellsignale. Die Gestaltung und Anwendung der Stimuli werden erklärt und begründet. Abschließend werden anhand von ausgewählten Ganglienzellen die einzelnen Schritte der Datenanalyse zur Erfassung von Kontrastsensitivität und Frequenzauflösung veranschaulicht. Die Durchführung der Experimente erfolgte strikt nach einem vorher festgelegten Versuchsprotokoll (nicht gezeigt), um alle Ableitungen unter standardisierten Bedingungen durchzuführen.

3.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Die Daten der vorliegenden Studie wurden an explantierten Retinae adulter Mäuse erhoben. Im Folgenden wird zunächst begründet, warum sich die Maus als Modellorganismus für die Erforschung der Netzhaut eignet. Anschließend wird auf die Präparation des Gewebes und auf die Herstellung von Nährlösung (Pufferlösung) zum Erhalt der Vitalität während der Versuche eingegangen.

3.1.1 Die Maus als geeignetes Versuchstier für die Erforschung der Retina

Die Maus nimmt in der Grundlagenforschung aus verschiedenen Gründen eine besondere Stellung ein. Im Laufe des letzten Jahrzehnts ist sie das weltweit am häufigsten verwendete Versuchstier für die Erforschung des zentralen Nervensystems und des Sehsinns geworden (Naarendorp et al. 2010). Dies liegt vor allem darin begründet, dass das visuelle System der Maus viele Parallelen zu dem des Menschen aufweist (Huberman und Niell 2011; Prusky und Douglas 2004; Umino et al. 2008; Wassle und Boycott 1991). Auch wenn die Maus nachtaktiv ist und ihr Auflösungsvermögen weniger hoch als das von Menschen ist, besteht eine starke Übereinstimmung zu der humanen Netzhaut und darüber hinaus auch zu vielen anderen Säugetieren (Boycott und Wassle 1999; Wassle und Boycott 1991). Sowohl die wesentlichen Schaltkreise für die Informationsverarbeitung als auch die anatomische Architektur von der Retina bis hin zum Kortex sind intensiv erforscht (Andermann et al. 2011; Huberman und Niell 2011; Marshel et al. 2011; Niell 2011). Daher können an der Maus erhobene Ergebnisse als Brücke zwischen Grundlagenforschung und Klinik angesehen werden und erlauben Rückschlüsse auf den Menschen. Zudem ermöglicht die Vielzahl an gentechnisch veränderten Stämmen eine gezielte Untersuchung auf bestimmte Fragestellungen hin. Der weit verbreitete experimentelle Einsatz der Maus hat zum Vorteil, dass die Ergebnisse verschiedener

Forschungsgruppen vergleichbar werden. Im Unterschied zum Menschen, besitzt die Retina der Maus keine *Fovea centralis* (siehe Kapitel 2.2.1) und ihre Ganglienzellen sind nahezu gleichmäßig verteilt, so wie es der Netzhautperipherie der Primaten entspricht (Badea und Nathans 2004; Jeon et al. 1998; Sun et al. 2002). Dies stellt einen Vorteil für die vorliegende Studie dar, da somit die Ableitungen der Ganglienzellen unabhängig von der Position der Elektroden auf dem Gewebe sind.

3.1.2 Präparation der Retina

Mäuse beiderlei Geschlechts (*Mus musculus*, Stamm C57BL/6J) im Alter von circa 7-8 Wochen wurden von der Firma Charles River Deutschland und der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen erworben. Die Tierhaltung und Handhabung erfolgte nach standardisierten Richtlinien der Universitätsmedizin Göttingen und unter Berücksichtigung der Anforderungen des Deutschen Tierschutzgesetzes. Der Stamm C57BL ist ein populäres Tiermodell in der medizinischen Forschung und der dafür am häufigsten eingesetzte Mäusestamm (Bryant 2011). Vor der Gewinnung des Untersuchungsmaterials wurden die Versuchstiere mindestens 30 min dunkeladaptiert. Auch die anschließenden Schritte erfolgten in einem vollkommen abgedunkelten Raum, der durch eine Lichtschleuse betreten werden konnte. Wenn notwendig, wurde ausschließlich schwaches Rotlicht verwendet, da Mäuse als Dichromaten weniger empfindlich auf lange Wellenlängen reagieren und dadurch weitestgehend dunkeladaptiert blieben. Die Augen wurden nach zervikaler Dislokation zügig entnommen und in eine Petrischale mit Nährmedium (Pufferlösung) gelegt (Herstellung siehe Kapitel 3.1.3), die kontinuierlich mit Carbogen (Volumengemisch von 5% CO₂ und 95% O₂) begast wurde. Die Präparation erfolgte unter einem Stereoskop (Model SZX7, Olympus, Japan) mit Infrarotlicht und angebrachten Nachtsichtgeräten (Model PS-14, ATN Corporation, San Francisco, USA) bei einer Raumtemperatur von 22 °C.

Die Retina der Mäuse hat einen Durchmesser von etwa 5 mm und liegt im hinteren Bereich des Auges. Zur schnellstmöglichen Versorgung des Gewebes mit Nährmedium wurden die Augäpfel rasch eröffnet. Dazu wurde mit einem Skalpell ein Schnitt dicht hinter dem Ziliarkörper gesetzt und der vordere Anteil des Auges mitsamt der Linse abgetrennt. Reste des Glaskörpers, die sich noch im Augenbecher befanden, wurden mit einer stumpfen Pinzette sorgfältig herausgezupft und entfernt. Die Entfernung des Glaskörpers ist notwendig, da nur so eine ausreichende Zufuhr mit Nährmedium und ein guter Kontakt zwischen Ganglienzellen und den Ableitelektroden gewährleistet sind. Pro Ableitung wurde ein Drittel oder die Hälfte der Retina verwendet. Der Rest des Gewebes wurde (für den späteren Gebrauch) in einem geschlossenen Behältnis mit oxygenierter Pufferlösung aufbewahrt. Mit einem stumpfen, gebogenen Glasstäbchen wurde das Retina-Stück vorsichtig von der Sklera und dem Pigmentepithel abgestreift. Anschließend wurde die Netzhaut mit den Ganglienzellen nach oben zeigend auf eine Dialyse-Membran gelegt, die über einen Plastikzylinder gespannt ist. Dieser wurde dann auf dem Mikroelektroden-Array befestigt. Die beschriebenen Präparationsschritte erfolgten zügig in einem Zeitfenster von maximal 15 min, da bei längerer Präparationszeit erfahrungsgemäß die Funktionalität des Gewebes beeinträchtigt wird.

3.1.3 Herstellung der Pufferlösungen

Die stabile Ableitung der Ganglienzellsignale explantierter Retinae setzt eine kontinuierliche Versorgung mit angereichertem Nährmedium voraus. Für *in-vitro*-Experimente hat sich Ames-Medium (Sigma Aldrich) bewährt (Ames und Nesbett 1981), unter dessen Verwendung das Gewebe länger vital als bei der alternativen Ringer-Lösung bleibt (Wong et al. 1993). Zur Herstellung von insgesamt 2 Litern Pufferlösung, wird die vorgegebene Menge an Ames-Medium zunächst in 1800 ml *aqua dest.* in Lösung gebracht und mit 3,8 g Natriumhydrogencarbonat (zur Pufferung mit CO₂) und 1,6 g Glucose (als zusätzliche Energieversorgung) versetzt. Aus dieser Basis-Pufferlösung wurden anschließend eine Kontroll-Pufferlösung von 1600 ml sowie eine 3 µM Ivabradin-Pufferlösung von 400 ml hergestellt. Für

die Ivabradin-Pufferlösung wurde ein Teil der Basis-Pufferlösung mit einem Ivabradinkonzentrat versetzt. Zur Herstellung eines 300 μM Ivabradinkonzentrats wurde der Überzugsfilm einer Ivabradin-Tablette (Handelsname Procoralan®, Hersteller Servier) mithilfe eines Skalpell entfernt, die Tablette fein zermörsert und 27 mg des entstandenen Ivabradinpulvers in 10 ml *aqua dest.* aufgelöst. In einem separaten Gefäß wurden 4 ml des Ivabradinkonzentrats sowie 360 ml der Basis-Pufferlösung überführt und anschließend mit 36 ml *aqua dest.* auf ein Gesamtvolumen von 400 ml aufgefüllt, sodass sich eine 3 μM Ivabradin-Pufferlösung ergab. Diese Ivabradinkonzentration hat sich sowohl in Vorexperimenten derselben Forschungsgruppe als auch in anderen Studien als günstig erwiesen, um die sensiblen Netzhautzellen auf die Substanz ansprechen zu lassen (Bemme et al. 2017; Della Santina et al. 2012; Demontis et al. 2009). Alle Lösungen wurden frisch am Untersuchungstag vor Beginn der Experimente bei einer Raumtemperatur von etwa 22 °C hergestellt und ihr pH-Wert durch die stetige Zufuhr von Carbogen auf pH=7,4 eingestellt.

3.2 Apparativer Aufbau des Experiments: Stimulation und Ableitung der Retina

Um die Signale der Ganglienzellen extrazellulär mittels Multielektroden-Arrays (MEAs) abzuleiten, wurde die Netzhaut so auf das MEA aufgebracht, dass die Ganglienzellen direkt mit dessen Ableitelektroden in Kontakt standen. Das MEA mitsamt der Netzhaut wurde in eine Apparatur eingefügt, durch die die Netzhaut von oben mit Lichtreizen aus einem Projektor stimuliert werden konnte. Ein Computerprogramm speicherte die unter Lichtstimulation auftretenden Zellsignale ab. Während der Testreihe wurde die auf dem MEA befindliche Netzhaut fortwährend mit frischer Pufferlösung versorgt, die über ein Schlauchsystem mit einer konstanten Rate von ca. 4 ml/min zu- und abgeführt wurde. Durch den Wechsel zwischen Kontroll- und Ivabradin-Pufferlösung konnten Testreihen vor, während und nach Ivabradin-Einwirkung abgeleitet werden.

3.2.1 Aufbringen der Netzhaut auf das Multielektroden-Array

Multielektroden-Arrays sind flache Glasträger, auf denen eine bestimmte Anzahl an planaren Elektroden matrizenartig aufgedampft ist. Die Elektroden sind hochsensible Sensoren, die Spannungsänderungen von der Membranaußenseite elektrisch aktiver Zellen mit einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung erfassen (Liu et al. 2012). Der Einsatz dieser nichtinvasiven Ableitmethode bewahrt die zelluläre Intaktheit der Retina, wodurch eine stabile Ableitung der Ganglienzellsignale möglich wird. Für die vorliegende Arbeit kamen zwei planare MEAs mit jeweils 60 Elektroden (Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, MEA 60 I) zum Einsatz. Die unisolierten Elektrodenspitzen dieser MEAs liegen 100 μm voneinander entfernt und haben einen Durchmesser von 10 μm , was in etwa der Größe der Ganglienzellsomata entspricht.

Ganglienzellen reagieren auf Lichtimpulse mit der Generierung von Aktionspotentialen (Kapitel 2.3.1), die als extrazelluläre Membranströme von den Elektroden des MEAs registriert werden. Um die Ganglienzellen in unmittelbaren Kontakt zu den Elektroden des MEAs zu bringen, wurde eine kleine Apparatur konstruiert, mit der die Netzhaut auf der Glasoberfläche des MEAs fixiert werden konnte (Abbildung 5): Auf dem MEA wurde ein kleiner Plastikring befestigt, der das Elektrodenfeld wannenartig umgrenzte. In diesen Plastikring passte der im Kapitel 3.1.2 erwähnte Plastikzylinder, der auf einer Seite mit einer durchsichtigen Membran überspannt war und auf den die Retina am Ende der Präparationsschritte gelegt wurde. Dieser Plastikzylinder wurde vorsichtig in die wannenförmige Halterung auf dem Array eingefügt, bis sich die Retina an die Elektroden anlegte und der Kontakt zu ihnen hergestellt war. Die durchsichtige Membran ermöglichte die Stimulation der Netzhaut mit Lichtimpulsen, die von oben auf das Gewebe projiziert wurden.

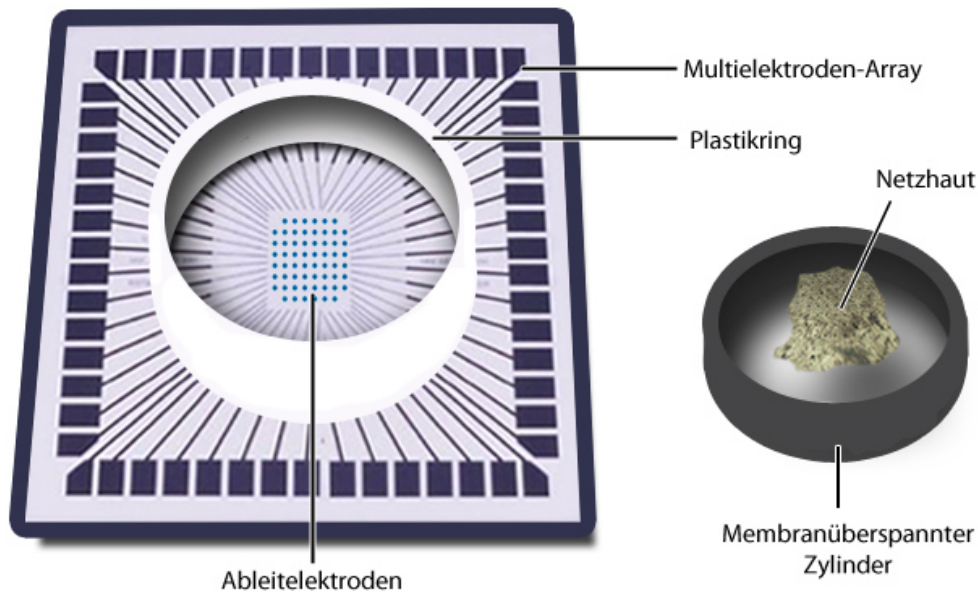


Abbildung 5 Aufsicht auf das Multielektroden-Array und den membranüberspannten Zylinder zur Fixierung der Netzhaut auf der Glasoberfläche (nicht maßstabsgerecht)

Die Netzhaut liegt auf der Membran des Zylinders (rechts), welcher mit der Netzhaut nach unten zeigend in den Plastikring des MEAs eingeführt wird, sodass das Gewebe in direkten Kontakt mit den Ableitelektroden steht. Die Netzhaut kann aufgrund der durchsichtigen Membran von oben mit Lichtimpulsen stimuliert werden.

Eigene Abbildung unter Verwendung einer MEA-Grafik von Multi Channel Systems, MCS GmbH, Reutlingen

Um die Netzhaut während der Testreihen kontinuierlich mit oxygenierter Pufferlösung zu versorgen, wurden ein zu- und ein abführender Schlauch an die Halteplatte des MEAs angebracht, die über ein Metallrohr in der wannenartigen Konstruktion mündeten (Abbildung 6). Die frische Pufferlösung wurde kurz vor Einlass in die Apparatur mithilfe eines Heizgerätes (Model PH01, Multi Channel Systems, Reutlingen) auf eine nahezu physiologische Temperatur von 31 °C erwärmt und durch die beheizbare Auflagefläche der MEA-Halteplatte bei dieser Temperatur konstant gehalten. Zu- und Abfluss der Pufferlösung erfolgten mit einer Rate von etwa 4 ml/min. Beide Parameter, Temperatur und Durchflussgeschwindigkeit der Nährlösung, waren entscheidend für eine stabile Ableitung der Zellantworten und standen daher fortwährend unter Überprüfung. Aus vorangegangenen Experimenten und Studien anderer Forschungsgruppen (Wei et al. 2010; Wong et al. 1993) ist bekannt, dass die Retina unter diesen Konditionen mehr als acht Stunden physiologisch stabil bleiben kann.

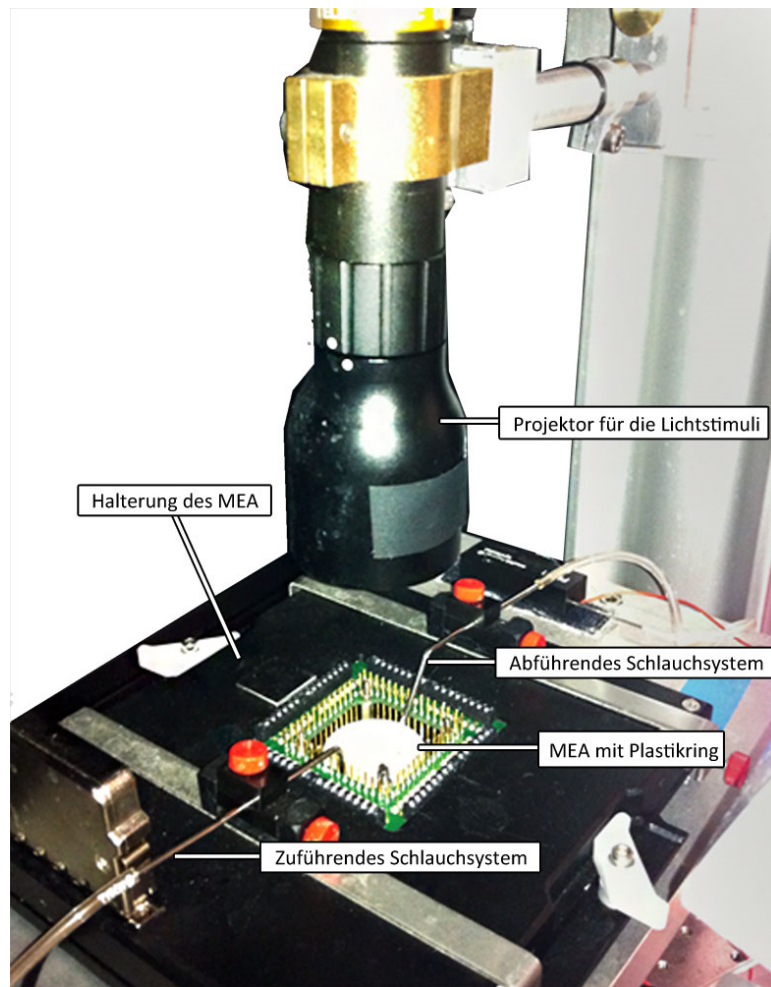


Abbildung 6 Aufbau der Apparatur zur Ableitung der Ganglienzellsignale

Gezeigt wird das MEA in der Befestigungs- und Ableitapparatur. Auf dem MEA liegt die Retina, die von oben über einen Projektor mit Lichtsignalen stimuliert wird. Das Schlauchsystem, das die Netzhaut mit Pufferlösung versorgt, mündet in die wannenartige Konstruktion, die auf dem MEA angebracht wurde, um die Netzhaut in ihrer Position zu fixieren.

Die hier beschriebenen Schritte stellen die letzten Vorbereitungen vor dem Beginn der Testreihen dar. Bevor die Stimulation und Ableitung der Zellantworten erfolgten, wurde die Netzhaut auf dem MEA mindestens 20 min im Dunkeln ruhen gelassen, um sie an die experimentelle Umgebung zu adaptieren. Diese Ruhezeit ermöglichte dem Gewebe, sich an die Temperatur des Puffers zu gewöhnen, auszudehnen und sich an die Oberfläche des MEAs anzuschmiegen, sodass der Kontakt zwischen den Zellen und den Elektroden verbessert und die Ableitung dadurch stabiler wurde. Die sensitiven Elektroden registrieren bereits kleine elektrische Spannungsänderungen von wenigen zehn Mikrovolt, die ein Vorverstärker (Multichannel Systems) um den Faktor 1200 amplifizierte. Ein Bandpassfilter filterte hohe Frequenzen über 5 kHz heraus sowie niedrige Frequenzen bis 200 Hz, die auf lokale Feldpotentiale entfernter Zellen zurückzuführen sind. Dadurch konnten die für die Auswertung irrelevanten Störsignale, z. B. von Bipolar- oder weiter entfernt liegenden Ganglienzellen, minimiert werden. Die auf diese Weise optimierten Ableitungen wurden im Testreihen-Computer mit der Software MC Rack in Echtzeit dargestellt (Abbildung 7) und für die spätere Analyse mit einer Abtastrate von 10 kHz gespeichert.

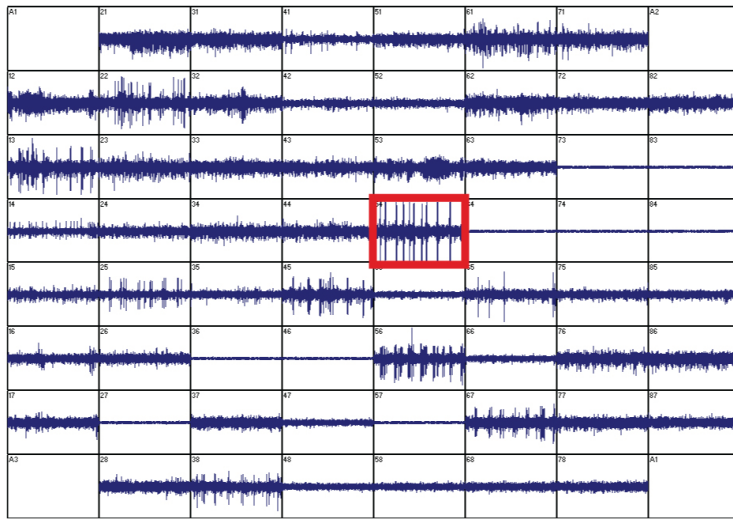
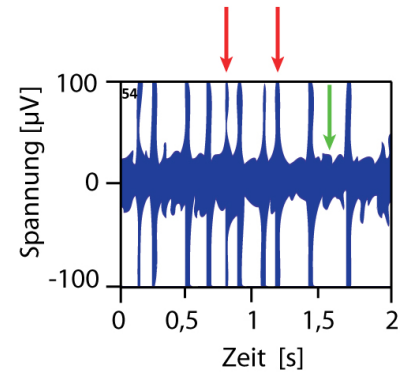
A**B**

Abbildung 7 Monitoranzeige der Ableitungskanäle des MEA

A Übersicht über die abgeleiteten Ganglienzellen jeder Einzelelektrode des MEA (auf dem Ableitungsbildschirm). Die direkt auf den Monitor übertragenen Signale zeigen die Zellaktivität der durch das MEA erfassten Zellen als Spannungsänderungen an. Die Anzeige aller Elektrodensignale ermöglicht es, einen Überblick über ähnliche Signalmuster sowie Störsignale oder stumme Elektroden zu erhalten. **B** Detail aus **A** (roter Kasten): Das Signal einer Beispiелеktrode zeigt den Stromverlauf einer extrazellulär abgeleiteten Ganglienzelle an: die Zellsignale (rote Pfeile) heben sich deutlich von der Grundlinie und dem sie umgebenden Hintergrundrauschen (grüner Pfeil) ab.

3.2.2 Stimulation der Retina durch Lichtreize

Die Stimulation der Netzhaut erfolgte über die Projektion von Licht eines Bildschirms (OLED Monitor, eMagin) auf die im MEA befindliche Netzhaut. Jedes Pixel des Monitors entsprach einer Fläche von $7,5 \mu\text{m} \times 7,5 \mu\text{m}$ auf dem Gewebe. Durch die Bildwiederholfrequenz von 60 Hz ist davon auszugehen, dass die präsentierten Stimuli ausreichend hoch über der Flimmerfusionsfrequenz der murinen Photorezeptoren lagen und von ihnen flimmerfrei registriert wurden.

Als experimentelle Stimuli werden hier Lichtimpulse bestimmter zeitlichen Abfolge, Dauer und Lichtintensität bezeichnet, die verschiedene Eigenschaften der optischen Umwelt imitieren, wie beispielsweise Frequenzen und Kontraste. Die eigens für diese Arbeit konzipierten Stimuli wurden mithilfe eines Computerprogramms (Open Graphics Library, basierend auf Visual C++) als reine Graustufen generiert, d. h. als Reizmuster unterschiedlicher Intensität ohne Farbstimulation. Die hellen und dunklen Lichtimpulse gehen als Erhöhung oder Erniedrigung von einer mittleren Lichtintensität aus (als Hintergrundbeleuchtung bezeichnet), die mit $1,0 \text{ mW/m}^2$ im mesopischen Bereich lag. Dieser Zwischenbereich, der dem Dämmerungssehen entspricht, wird sowohl von den Stäbchen als auch von den Zapfen wahrgenommen, sodass beide Photorezeptoren durch die Reize stimuliert wurden.

Damit ausschließlich die gewünschten Lichtstimuli die Zellen beeinflussen, erfolgten alle Ableitungen in einem lichtdicht geschlossenen Faraday'schen Käfig, der den Versuchsaufbau vor elektrischen Störeinflüssen schützte (z. B. elektrische Felder, Licht der Computermonitore). Durch die Anbringung des Faraday'schen Käfigs auf einem schwingungsgedämpften Tisch wurde die Vorrichtung auch vor Erschütterungen isoliert.

3.3 Auswertung der abgeleiteten Signale mittels *Spike Sorting*

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, lassen sich die Zellsignale der Netzhautzellen als elektrische Spannungsänderungen messen. Diese werden als *Spikes* (engl. Spitze) bezeichnet, um die kurzzeitige Abweichung des Spannungspotentials von der Grundlinie hin zu positiven Werten figurativ

zu umschreiben. Die Elektroden des Multielektroden-Arrays registrieren diese Spannungsänderungen und leiten den Datenstrom zur Speicherung in das Programm des Auswertungscomputers weiter (Abbildung 7).

Nach Beendigung der Testreihen wurden die abgeleiteten Daten in einer Offline-Analyse ausgewertet, um die einzelnen *Spikes* den jeweiligen Ursprungsganglienzellen zuordnen zu können. Dies ist die Voraussetzung dafür, die Veränderung der Antwortsignale jeder einzelnen Ganglienzelle im Verlauf des Experiments nachzuverfolgen. Das *Spike Sorting* (Lewicki 1998) erfolgte daher vor der weiteren Aufarbeitung der Daten im Computerprogramm Igor Pro 6.03A (WaveMetrics, Lake Oswego, USA). Das *Spike Sorting* berücksichtigt zwei Probleme, die durch das Größenverhältnis von Elektroden und neuronalem Gewebe entstehen:

1. Durch den geringen Abstand zwischen benachbarten Elektroden kann es zu einer Mehrfachableitung einer einzelnen Ganglienzelle auf unterschiedlichen Elektroden kommen.
2. Umgekehrt kann eine einzelne Elektrode das Signal mehrerer eng beieinander liegender Ganglienzellen aufnehmen, sodass diese voneinander differenziert werden müssen.

Darüber hinaus ist das *Spike Sorting* notwendig, um Störsignale aus der weiteren Datenanalyse auszuschließen. Zwar leiten die Elektroden des MEA durch ihren Kontakt zu den Ganglienzellen hauptsächlich deren Spannungsänderungen ab, es ist jedoch nicht auszuschließen, dass unspezifische Signale anderer Zellen ebenfalls aufgezeichnet wurden. Störsignale, die ähnlich wie ein Aktionspotential die zuvor erfolgte analoge Bandpassfilterung (siehe Kapitel 3.2.1) überwunden haben, könnten sonst die Datenanalyse negativ beeinflussen.

Das *Spike Sorting* erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurde eine spezielle Software angewendet (ursprünglich entwickelt von Dr. Ofer Mazor, Harvard University, Cambridge, USA), die auf einem Analysealgorithmus (*Expectation Maximization Algorithmus*) zur Auswertung elektrophysiologischer Daten basiert (Pouzat et al. 2002). Im Anschluss daran wurde das Ergebnis manuell überprüft und durch erneute Filterung des Datensatzes verfeinert.

Das Prinzip des *Spike Sortings* beruht darauf, dass die registrierten Spannungsänderungen einer bestimmten Ganglienzelle, je nach ihrer Lage zur ableitenden Elektrode, charakteristische Merkmale aufweisen (Pouzat et al. 2002). Anhand dieser Merkmale kann jedes abgeleitete Signal, ähnlich eines Fingerabdrucks, ihrer Ursprungszelle zugeordnet werden. Zu den Charakteristika zählen der zeitliche Verlauf der Spannungsänderung (ihre Wellenform), ihre Amplitude und die Dauer der Refraktärperiode zwischen den einzelnen *Spikes*. Diese „elektrische Identität“ der Ganglienzelle bleibt unter stabilen experimentellen Bedingungen (z. B. konstante Temperatur und Position des Gewebes zu den Elektroden, Vitalität der Zellen) weitestgehend unverändert, sodass sich im Verlauf der Testreihen die Aktivität jeder einzelnen gemessenen Ganglienzelle beurteilen lässt.

Die Software Igor Pro verglich die Daten aus vier angrenzenden Elektroden, um das Risiko der Mehrfachzählung einer Ganglienzelle zu minimieren. Der automatisierten Analyse schloss sich eine manuelle Überprüfung und Verfeinerung des Datensatzes an: Nur die Signale, die gut voneinander abgrenzbar und somit sehr wahrscheinlich von individuellen Ganglienzellen stammten, wurden für die nachfolgenden Analysen berücksichtigt. Eine weitere Voraussetzung für die Auswahl der Ganglienzellen war das Vorhandensein einer typischen Refraktärperiode zwischen ihren einzelnen Aktionspotentialen, um eine Verwechslung mit unspezifischen Zellsignalen zu verhindern. Das Endergebnis des automatisierten und manuellen *Spike Sortings* wurde mit einem selbstgeschriebenen Programm in MatLab (The MathWorks®, Inc.) auf Kreuzkorrelation der Signale ein weiteres Mal überprüft, um eine Mehrfacherfassung einzelner Ganglienzellen zu vermeiden.

3.4 Stimuli für die Charakterisierung der Ganglienzellen

Nach einer Ruhephase unter Dunkeladaptation folgte die Stimulation der Netzhaut mit unterschiedlichen Stimuli. Vor der eigentlichen Untersuchung der Kontrast- und Frequenzsensitivität ist die Unterscheidung von ON- und OFF-Ganglienzellen notwendig, da sie gegensätzlich auf Lichtreize reagieren (siehe Kapitel 2.2.3) und daher in allen weiteren Analysen getrennt voneinander beurteilt werden müssen. Für die Charakterisierung der Polarität der Ganglienzellen kamen zwei Stimuli zum Einsatz, die in den folgenden Kapiteln erklärt werden.

3.4.1 Klassifizierung der Ganglienzellen in ON und OFF mittels ON-OFF-Stimulus

Da ON-Ganglienzellen bei Zunahme und OFF-Ganglienzellen bei Abnahme der Lichtintensität feuern, wurde ihre Antwortpolarität mithilfe eines Stimulus getestet, dessen Lichtintensität repetitiv von hell (ON) zu dunkel (OFF) wechselte. Er wird daher im Folgenden als ON-OFF-Stimulus bezeichnet. Die abwechselnden Lichtimpulse wurden für jeweils 500 ms über das gesamte Bildfeld des Monitors präsentiert, das wiederum auf die Netzhaut projiziert wurde. Ausgehend von einer konstanten Hintergrundbeleuchtung, auf die die Zellen zuvor 2 Minuten lang adaptiert wurden, nahm die Lichtintensität des ON-OFF-Stimulus um 50% zu oder ab. Die Ableitung der Ganglienzellantworten auf den ON-OFF-Stimulus erfolgte für 2 Minuten, sodass 120 Hell-Dunkel-Wechsel gezeigt wurden.

Die unter Stimulation auftretenden Aktionspotentiale jeder einzelnen Ganglienzelle wurden in Rasterplots dargestellt (siehe Abbildung 8) und abhängig von der Stimulusphase, in der ihre Feuerrate am höchsten war (hell, dunkel oder in beiden Phasen), entweder den ON-, den OFF- oder den ON-OFF-Ganglienzellen per Durchsicht zugeordnet (Bemme et al. 2017). Für die nachfolgende Analyse der Kontrast- und Frequenzauflösung wurden jedoch ausschließlich die ON- und die OFF-Ganglienzellen untersucht und die ON-OFF-Ganglienzellen aussortiert.

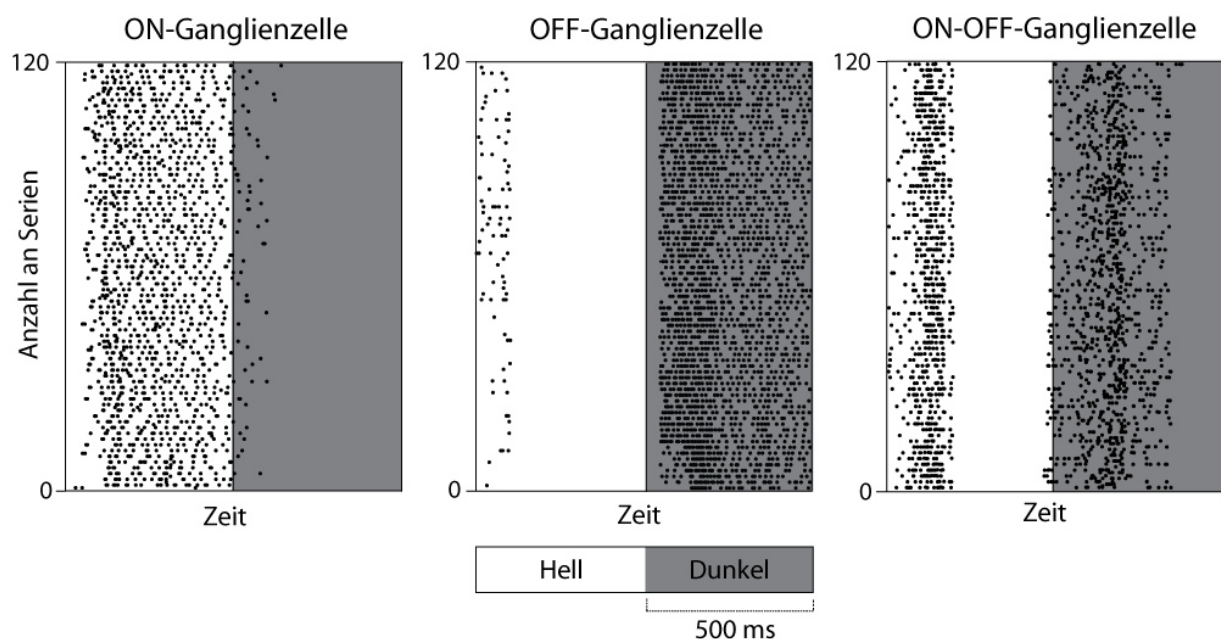


Abbildung 8 Signale von ON-, OFF- und ON-OFF-Ganglienzellen im Rasterplot dargestellt

Die Klassifizierung der Ganglienzellen erfolgt durch optische Beurteilung der Rasterplots, die die Zellantworten jeder einzelnen Ganglienzelle in Bezug auf den ON-OFF-Stimulus wiedergeben. Die Stimulusphase ist durch weiße (ON) respektive graue (OFF) Unterlegung verdeutlicht; jede Phase dauert jeweils 500 ms (x-Achse). Die Änderungen zwischen Hell (ON) und Dunkel (OFF) werden insgesamt über 2 Minuten gezeigt, die sich alle 500 ms abwechseln (ergibt 120 Serien; y-Achse). Die Aktionspotentiale, durch jeweils einen Punkt repräsentiert, sind im Verlauf der Zeit (x-Achse) dargestellt. Fallen die meisten Aktionspotentiale in die Hell-Phase, spricht man von einer ON-Ganglienzelle. Treten die meisten *Spikes* in der Dunkel-Phase auf, wird die Ganglienzelle den OFF-Zellen zugeordnet. Feuert sie während beider Episoden, bezeichnet man sie als ON-OFF-Ganglienzelle.

3.4.2 Analyse des *Spike-Triggered Average* (STA) mittels STA-Stimulus

Zur Qualitätsbeurteilung der zuvor erfolgten Zellklassifizierung mittels ON-OFF-Stimulus wird der *Spike-Triggered Average* (STA) berechnet, der die linearen Filtereigenschaften einer individuellen Ganglienzelle beschreibt. Dieser Filter ist ein stochastisch gemitteltes Reizmuster, das die entsprechende Ganglienzelle mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer starken Antwort anregt.

Um den *Spike-Triggered Average* zu berechnen, wurde der Netzhaut eine Abfolge unterschiedlicher Stimuli präsentiert. Ausgehend von der mesopischen Hintergrundbeleuchtung wurde die Lichtintensität gemäß einem weißen Rauschen nach einer Gauß'schen Zufälligkeitsverteilung circa alle 20 ms (genauer 1/60 von einer Sekunde) verändert. So konnte innerhalb kürzester Zeit eine große Variation von Lichtimpulsen verschiedener Abfolgen präsentiert werden (Chichilnisky 2001). Die Mittelung aller Aktionspotential-auslösenden Sequenzen, genannt *Spike-Triggered Ensemble*, ergibt den *Spike-Triggered Average*. Aus der graphischen Darstellung des STA einer Ganglienzelle (Abbildung 9) lässt sich schlussfolgern, ob es sich um eine ON- oder OFF-Ganglienzelle handelt, je nachdem, ob es sich bei dem ersten Extremum um ein Maximum oder Minimum handelt. ON-OFF-Zellen können hingegen nicht klar abgegrenzt werden.

Der STA liefert zudem Informationen über die Sensitivität der Ganglienzelle gegenüber hohen Frequenzen: Folgt unmittelbar nach dem ersten Extremum ein in die entgegengesetzte Richtung weisender Ausschlag, spricht man von einem biphasischen Filter der Zelle. Je ausgeprägter die biphasische Form des Filters ist, desto sensitiver ist die Zelle für hohe Frequenzen (Zaghloul et al. 2007). Des Weiteren kann auch das rezeptive Feld der Ganglienzelle (siehe Kapitel 2.2.3) ermittelt werden. Diese Berechnung wurde für die vorliegende Arbeit nicht benötigt und daher nicht durchgeführt.

Der Einsatz des STA-Stimulus hat für das Experiment auch einen praktischen Nutzen, da erfahrungsgemäß die zuvor dunkeladaptierten Ganglienzellen durch die wechselnden Lichtimpulse des STA-Stimulus auf Lichtreize sensibilisiert werden. Daher können Zellantworten als Reaktion auf die nachfolgenden Stimuli stabiler aufgenommen werden.

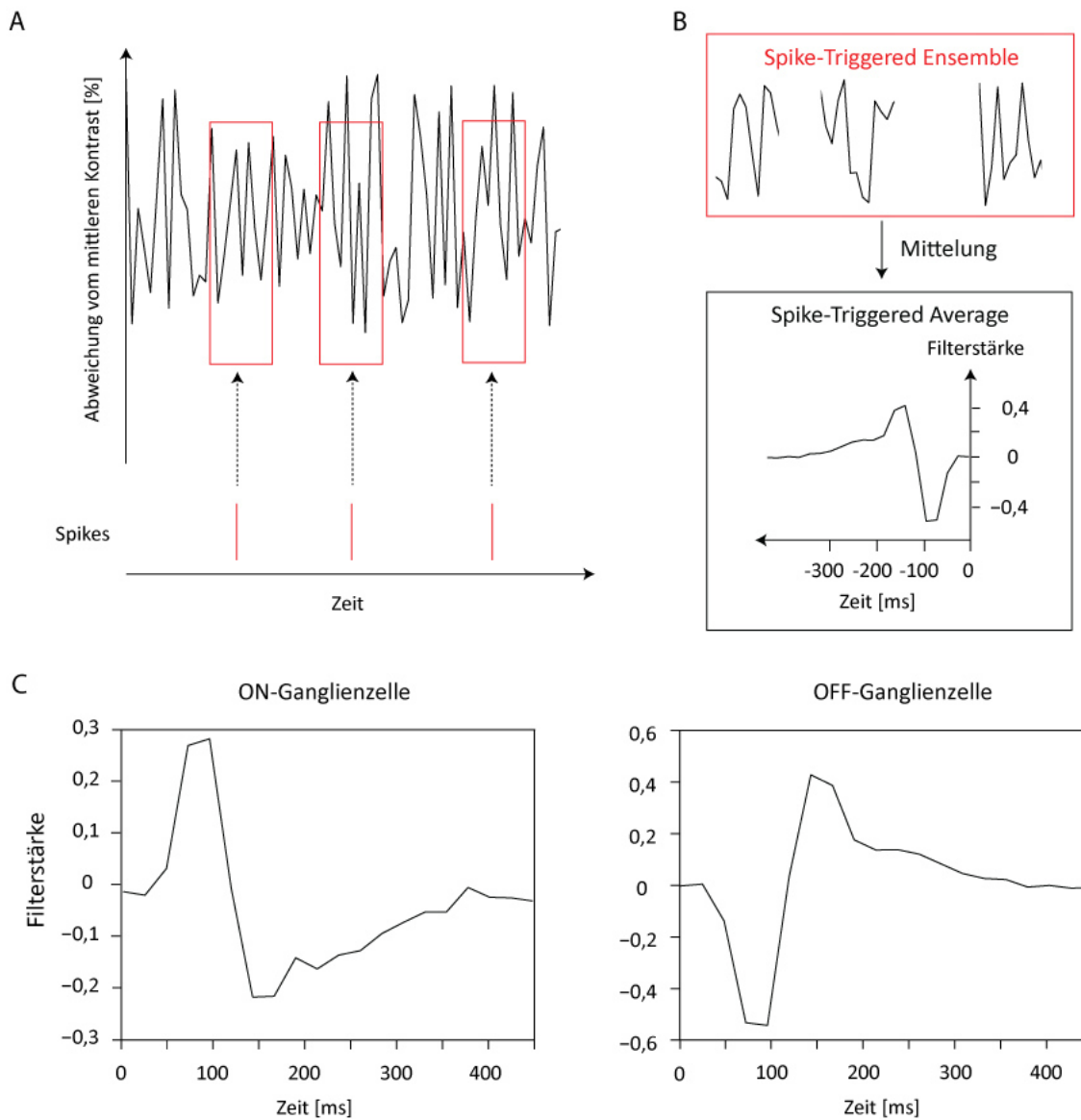


Abbildung 9 Berechnung des Spike-Triggered Average (STA) unter Verwendung des STA-Stimulus

A STA-Stimulus: Zeitlicher Verlauf des Gauß'schen weißen Rauschens. Die Lichtintensität relativ zum Hintergrundgrauwert (y-Achse) ändert sich im Zeitverlauf (x-Achse). Der Ganglienzelle wird damit ein breites Spektrum an Reizen angeboten. Die Sequenzen innerhalb eines Zeitfensters, die ein Aktionspotential auslösen (durch rote Kästen markiert), werden als *Spike-Triggered Ensemble* bezeichnet. **B Mittelung des reizauslösenden Signals.** Die Sequenzen aus A sind hier verkleinert dargestellt. Aus ihnen wird der *Spike-Triggered Average* berechnet, ein gemittelt Signalmuster, das mit größter Wahrscheinlichkeit eine Zellantwort bei der Ganglienzelle auslöst. Der Zeitpunkt 0 ist der Beginn des ersten Aktionspotentials. In diesem Fall handelt es sich um eine OFF-Ganglienzelle, da das erste Extremum (von r.n.l. der Zeitleiste folgend) ein Minimum ist, entsprechend einer Abnahme der Lichtintensität. **C Spike-Triggered Average für eine ON- und eine OFF-Ganglienzelle.** Im Vergleich zu B in umgekehrter zeitlicher Reihenfolge zur besseren Darstellung. Die Form des STA repräsentiert die linearen Filtereigenschaften der Ganglienzellen, auch Filter genannt. In diesem Beispiel erkennt man die biphasische Form des Filters. Näheres dazu siehe Text.

3.5 Stimuli für die Analyse von Kontrast- und Frequenzsensitivität

Nachdem die Ganglienzellen durch den ON-OFF- und STA-Stimulus charakterisiert wurden, schloss sich der eigentliche Stimulus zur Feststellung der Kontrast- bzw. Frequenzsensitivität an. Ziel war es, für jede individuelle Ganglienzelle, ihre Kontrast- bzw. Frequenzschwelle zu berechnen. Anschließend wurde analysiert, inwiefern sich ihre Schwellwerte unter HCN-Kanalblockade verändern. Die Kontrast-

und Frequenzsensitivität wurde in voneinander separaten Versuchsanordnungen ermittelt. Hierfür kamen als Kontraststimulus bzw. Frequenzstimulus bezeichnete Reizmuster zum Einsatz, die in fünf aufeinanderfolgenden Testreihen auf die Netzhaut projiziert wurden. Die Ableitung der zweiten und dritten Testreihe erfolgte unter Verwendung von Ivabradin-haltiger Pufferlösung, indem vor Beginn der zweiten Testreihe Pufferlösung zugeführt („Einwaschen“) und nach dem Ende der dritten Testreihe wieder ausgespült („Ausspülen“) wurde. Die vierte und fünfte Testreihe wurde unter Ivabradin-freier Kontroll-Pufferlösung abgeleitet („kurz nach Ausspülen“ respektive „nach längerem Ausspülen“).

Die Ableitungen der einzelnen Stimuli bzw. Testreihen des Kontrast- respektive Frequenzstimulus wurden durch die Einblendung der Hintergrundbeleuchtung für einige Minuten voneinander zeitlich getrennt (siehe Abbildung 10). In dieser Zeit adaptierte sich die Netzhaut an die mittlere Lichtintensität (Hintergrundbeleuchtung), sodass für jede Testreihe gleiche Ausgangsbedingungen bestanden. Während der Pausen zwischen den Ableitungen erfolgten Vor- und Nachbereitungen, beispielsweise das Abspeichern der Daten der vorherigen Ableitung, die Überprüfung von Temperatur und Flussrate des Puffers und ggf. der Wechsel der Pufferlösungen zwischen Kontrollpuffer und 3 μM Ivabradin-haltiger Pufferlösung. Um einen tatsächlichen Effekt des HCN-Kanalblockers zu ermitteln, wurde das Versuchsprotokoll auch stets mit einer Kontrollgruppe durchgeführt. Die Kontrollgruppen wurden analog den Versuchsgruppen abgeleitet, nur dass anstatt des HCN-Kanalblockers durchgehend Kontroll-Pufferlösung verwendet wurde.

Aus den abgeleiteten Aktionspotentialen wurde anschließend für jede Ganglienzelle ihre individuelle Kontrast- bzw. Frequenzschwelle berechnet. Der niedrigste Kontrast, auf den die Ganglienzelle noch eine systematische Antwortreaktion zeigte, wurde als ihre individuelle Kontrastschwelle definiert. Als Frequenzschwelle wurde hingegen die höchste Frequenz bezeichnet, bis zu der eine Ganglienzelle den wechselnden Lichtintensitäten folgen kann.

Im folgenden Kapitel werden das Design der beiden eingesetzten Stimuli und die Datenanalyse der Ganglienzellantworten anhand einer jeweils repräsentativen Beispielizele erläutert.

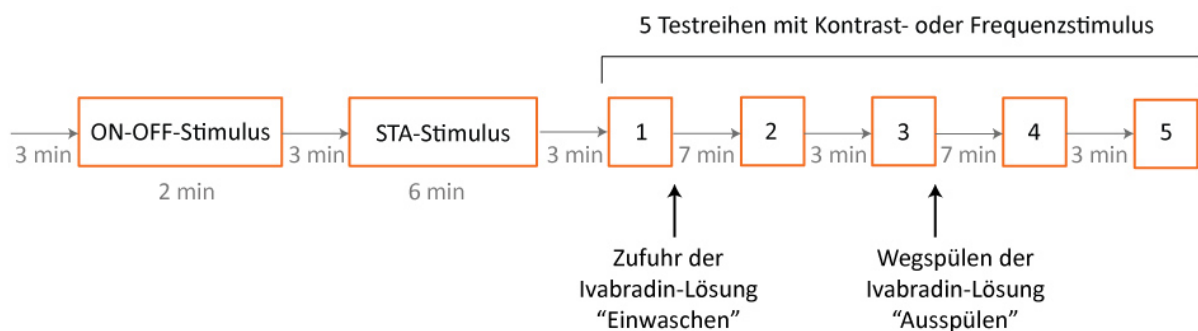


Abbildung 10 Versuchsprotokoll zur schematischen Darstellung der Vorgehensweise der Experimente zur Ermittlung der Sensitivität für Kontraste und Frequenzen

Die grauen waagerechten Pfeile kennzeichnen die Adaptationszeit an die Hintergrundbeleuchtung, in der ausschließlich die mittlere Lichtintensität und kein Stimulus projiziert wird. Die Kästen symbolisieren die Stimuli, die nacheinander zum Einsatz kamen und durch die Einblendung der Hintergrundbeleuchtung voneinander getrennt wurden. ON-OFF-Stimulus und STA-Stimulus dienten der Klassifizierung der Ganglienzellen in ON- und OFF-Ganglienzellen. Je nach Versuchsprotokoll wurde anschließend der Kontrast- bzw. Frequenzstimulus in fünf Testreihen projiziert. Vor der zweiten Testreihe wurde die Ivabradin-haltige Pufferlösung zugeführt und nach der dritten Testreihe durch Kontroll-Lösung ausgespült.

3.5.1 Stimulus zur Erfassung der Kontrastsensitivität

3.5.1.1 Design des Stimulus

Zur Ermittlung der Kontrastsensitivität wurde ein Stimulus eingesetzt, der unterschiedliche Kontraste anhand verschiedener Abfolgen von Lichtintensitätsänderungen imitiert und der für das Testen der visuellen Kontrastempfindlichkeit gebräuchlich ist (Bowen et al. 1989). Das im Folgenden als

Kontraststimulus bezeichnete Signalmuster bestand aus einer Abfolge von kurzen Erhöhungen und Erniedrigungen der Lichtintensität relativ zur Hintergrundbeleuchtung. Die alternierende Abfolge von jeweils acht sukzessive zunehmenden Positivkontrasten und ihren betragsgleichen Negativkontrasten bildeten eine Serie (Abbildung 11, A und B), die pro Testreihe 21 Mal ununterbrochen wiederholt auf die Netzhaut projiziert wurde. Die Abweichungen der Lichtintensitäten von der Hintergrundbeleuchtung dauerten jeweils 200 ms und wurden durch die Einblendung der Hintergrundbeleuchtung um 1,8 Sekunden voneinander getrennt. Durch diese kurze Unterbrechung zwischen den Lichtreizen wurde den Netzhautzellen Zeit zur Regeneration gelassen und Adaptationseffekte minimiert, die durch Stoffwechselprozesse (Vesikelentleerung) und synaptischen Veränderungen (z. B. der Inaktivierung von Ionen-Kanälen) entstehen (Grabner et al. 2016). Die Kontrastwerte, die mittels einer Photodiode gemessen wurden, betragen 1,8, 2,6, 3,5, 5,3, 8,9, 12,6, 19,1, 24,5 Prozent Änderung zur Hintergrundbeleuchtung. Aus vorangegangenen Test-Experimenten war bekannt, dass die Kontrastschwellen der murinen Ganglienzellen typischerweise innerhalb dieses Wertebereiches liegen. Zur Erhebung einer ausreichenden Datenmenge wurde die beschriebene Abfolge pro Testreihe 13 min lang auf die Netzhaut projiziert. Aus den Antworten einer Ganglienzelle auf die einzelnen Kontrast-schritte wurde der von ihr kleinstmögliche detektierbare Kontrast berechnet und dieser Kontrastwert als ihre individuelle Kontrastschwelle definiert. Je niedriger die Kontrastschwelle liegt, desto sensitiver reagiert demnach die Ganglienzelle auf Kontraste (und *vice versa*).

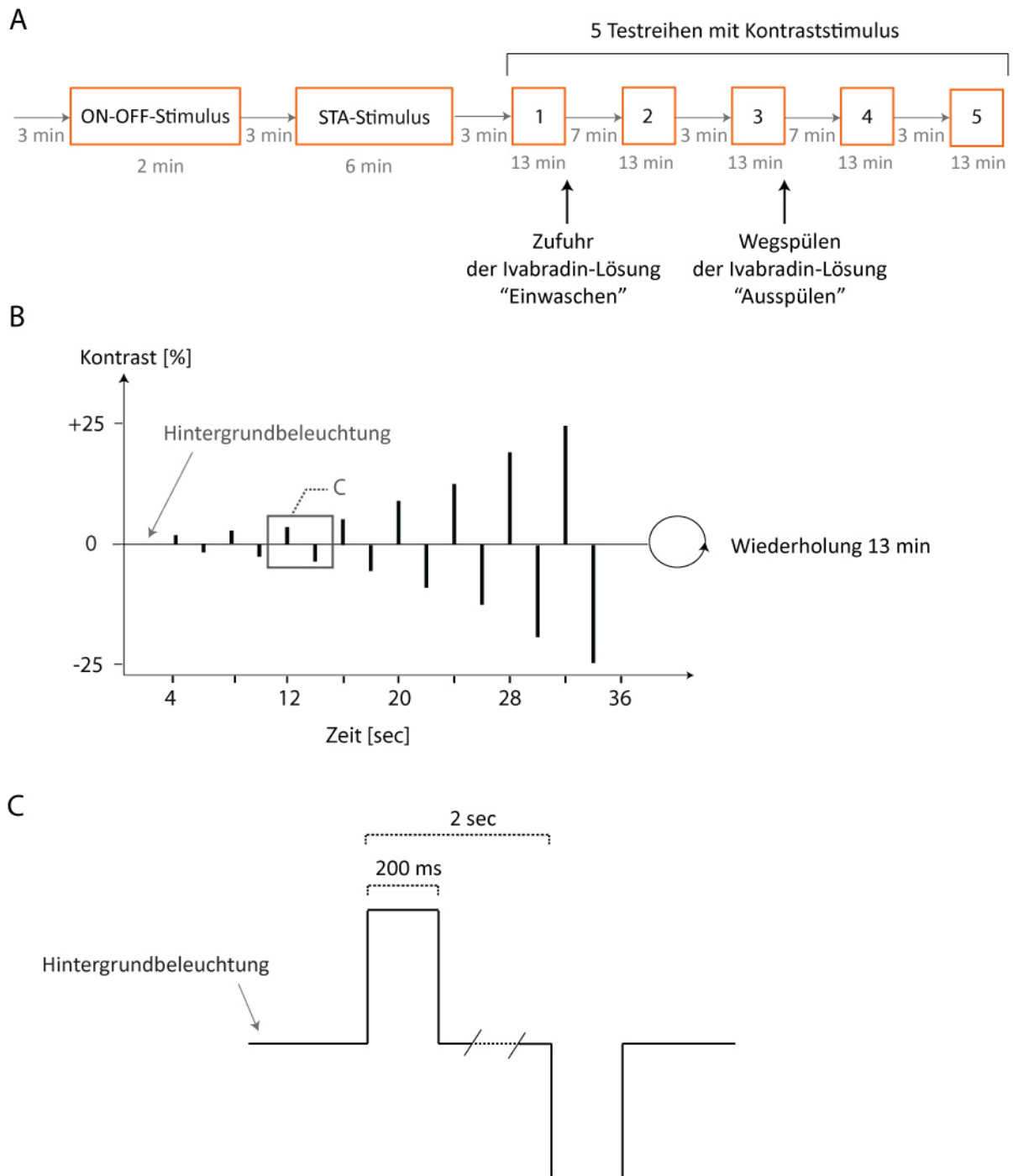


Abbildung 11 Versuchsprotokoll (A) und schematische Darstellung des Kontraststimulus (B,C)

A Versuchsprotokoll zur Ableitung der Ganglienzellen eines Retina-Stücks. Die Namen der verwendeten Stimuli werden in den Kästen angegeben. Vor jeder Testreihe wurden die Zellen an die Hintergrundbeleuchtung (grauer Pfeil) adaptiert. Zunächst erfolgten die Testreihen der Antworten auf den ON-OFF-Stimulus und den STA-Stimulus zur Klassifikation der Ganglienzellen (Erläuterungen siehe Kapitel 3.4). **B Kontraststimulus.** Eine Serie besteht aus acht alternierenden Erhöhungen und betragsgleichen Erniedrigungen der Lichtintensität ausgehend von der mittleren Hintergrundbeleuchtung. Diese Abfolge wird in jeder Testreihe 13 Minuten lang ununterbrochen wiederholt. **C Vergrößerter Ausschnitt aus B.** Die Kontrastabweichungen dauern jeweils 200 ms und sind voneinander durch die Einblendung der Hintergrundbeleuchtung getrennt.

3.5.1.2 Datenanalyse

Nachdem die Ableitung der Ganglienzellantworten als Reaktion auf den Kontraststimulus erfolgte, wurde für jede einzelne Ganglienzelle ihr kleinster noch detektierbarer Kontrast berechnet und als Kontrastschwelle definiert. Um Effekte der Zelladaptation an den Hintergrund zu Beginn der Testreihe von der Analyse weitestgehend auszuschließen, wurden von den insgesamt 21 Serien pro Testreihe die ersten beiden Serien nicht für die weitere Auswertung berücksichtigt. Zusätzlich zur eigentlichen Berechnung der Kontrastschwellen wurden die Antwortsignale jeder einzelnen Ganglienzelle auf den Kontraststimulus graphisch dargestellt, um sie per Durchsicht auf Konsistenz zu überprüfen. Dazu wurden die Antwortsignale einer Ganglienzelle im Verlauf einer Testreihe als **Rasterplot** visualisiert (Abbildung 12). In diesem ist jedes einzelne Aktionspotential in Bezug zum Zeitpunkt seines Auftretens (x-Achse) als Strich wiedergegeben. Da sich die Abfolgen des Kontraststimulus (y-Achse) innerhalb einer Testreihe mehrmals wiederholen, lässt sich die Reaktion der Ganglienzelle im Verlauf einer Testreihe anhand des Rasterplots optisch beurteilen.

Sistieren die Aktionspotentiale beispielsweise ab einer bestimmten Abfolge der Testreihe (d. h. es treten keine Striche mehr auf), könnte dies auf ein Absterben der Ganglienzelle während der Aufnahme hinweisen oder auf einen Kontaktverlust zur Ableitelektrode. Ganglienzellen bei denen derartige Veränderungen in den Rasterplots zu beobachten waren, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

In dem beispielhaften Rasterplot einer ON-Ganglienzelle (Abbildung 12) wird die Zellreaktion auf den Kontraststimulus dargestellt. Es fällt eine dichte Anreihung von Aktionspotentialen in jeder Serie des Kontraststimulus auf. Lediglich zu Beginn (Abfolgen 1 und 2) reagiert die Ganglienzelle etwas weniger stark (grüner Kasten); dies kann durch den Einfluss der vorangegangenen Adaptation an den Hintergrundgrauwert erklärt werden. Insgesamt zeigt sich jedoch eine starke und weitestgehend gleichmäßige Antwort der ON-Ganglienzelle auf die Kontrast Schritte. Je weiter die Zeit fortschreitet (d. h. umso höher die Kontraste werden), desto stärker scheint die ON-Ganglienzelle zu feuern (circa ab der 15. Sekunde). Die einzelnen Aktionspotentiale sind dann so dicht hintereinander gedrängt, dass die einzelnen Striche graphisch nicht mehr voneinander abzugrenzen sind und als „Blöcke“ erscheinen (roter Kasten).

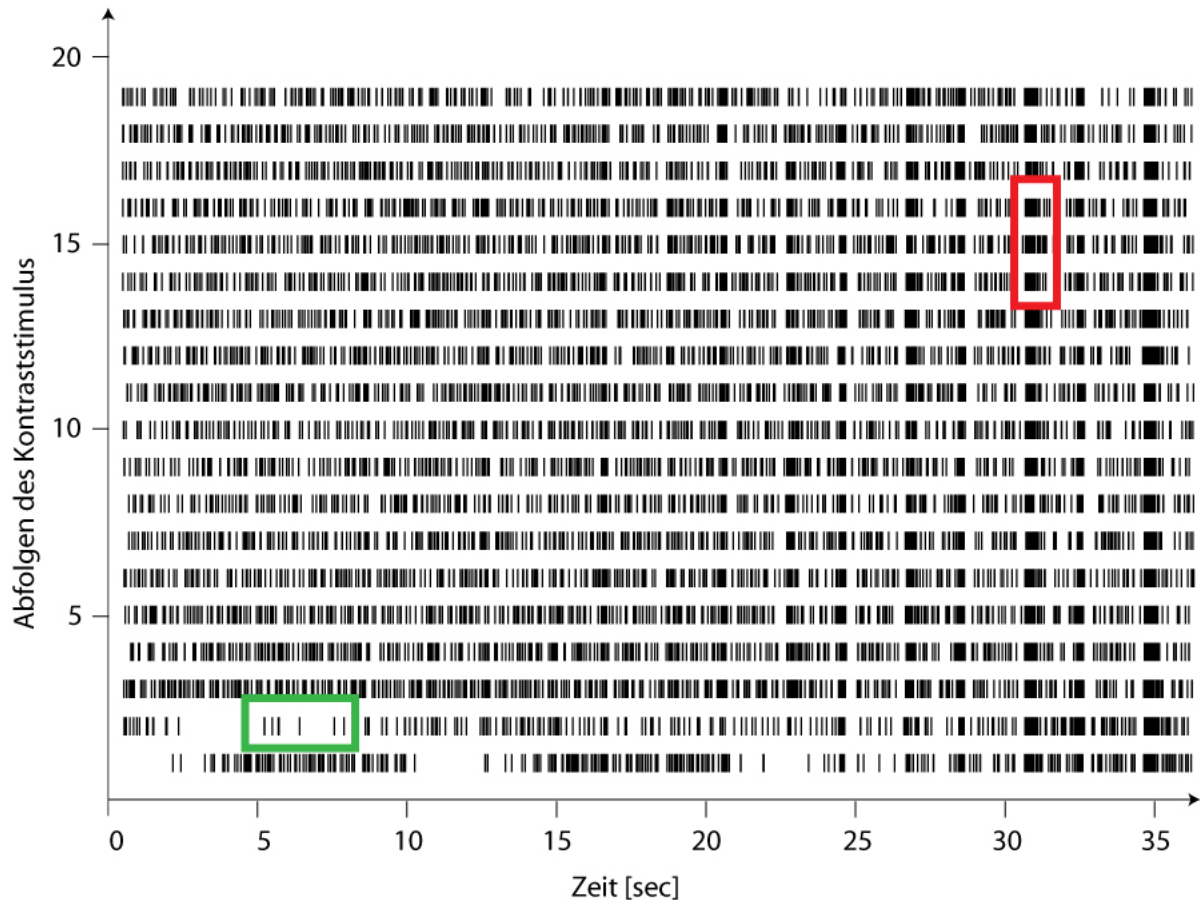


Abbildung 12 Rasterplot einer ON-Ganglienzelle (erste Testreihe, vor Einfluss Ivabradin)

Als Reaktion auf die wiederholten Abfolgen des Kontraststimulus (y-Achse) generiert die Ganglienzelle Aktionspotentiale, die als einzelne Striche dargestellt sind (grüner Kasten). Ihr zeitliches Auftreten ist auf der x-Achse ablesbar. Diese ON-Ganglienzelle feuert nicht bei jedem Kontrastwechsel gleich viele Aktionspotentiale: Salven von Spikes, die in der Abbildung durch die Verdichtung als schwarze Blöcke (roter Kasten) erscheinen, werden vor allem bei höheren Kontrastwerten (ab circa 15 Sekunden) generiert.

Eine weitere Darstellungsmethode der Ganglienzellantworten ist das *Peri-Stimulus-Time-Histogramm* (PSTH, Abbildung 13). Mit dieser Graphik kann die Stärke der gemittelten Zellreaktion über eine Testreihe auf die unterschiedlichen Kontrastschritte gezeigt werden. Die Anzahl der Aktionspotentiale pro Sekunde (y-Achse), als Feuerrate bezeichnet, wird in Bezug zu ihrem zeitlichen Auftreten (x-Achse) gesetzt. Im Unterschied zum Rasterplot werden die Aktionspotentiale aus allen Serien einer Testreihe gemittelt. Dadurch tritt mögliches „Rauschen“ in den Hintergrund, sodass die eigentliche Antwort auf den Reiz besser abgrenzbar ist.

An dem Beispiel der ON-Ganglienzelle ist erkennbar, dass die Zelle auf die Kontrasterhöhungen mit einer verstärkten Generierung von Aktionspotentialen reagiert und in Abhängigkeit von der Höhe des positiven Kontrasts stärker feuert.

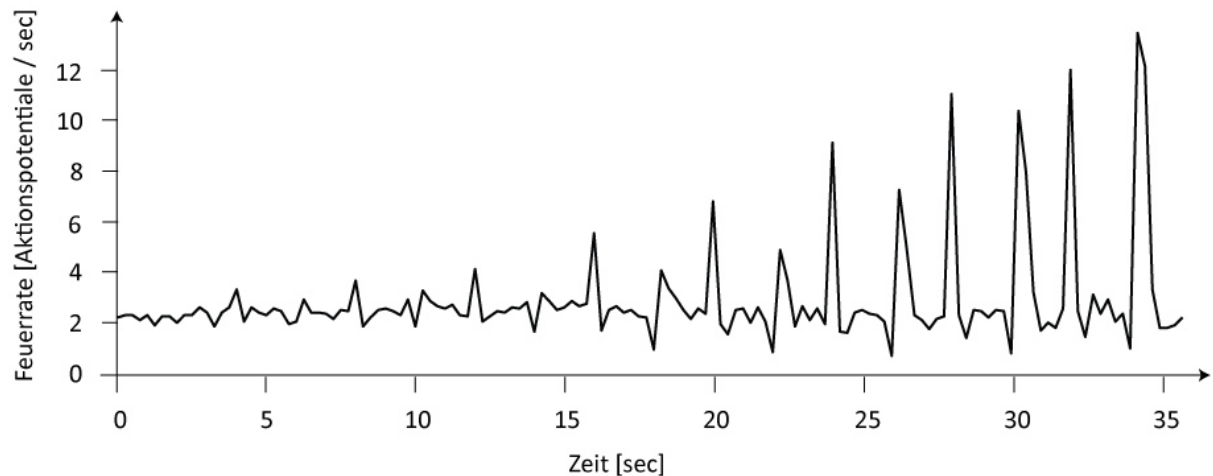


Abbildung 13 Peri-Stimulus-Time-Histogramm einer ON-Ganglienzelle (erste Testreihe, vor Ivabradin)

Der gleiche Datensatz aus Abbildung 13 wird hier als *Peri-Stimulus-Time-Histogramm* (PSTH) abgebildet. Das PSTH zeigt die gemittelten Aktionspotentiale pro Sekunde (y-Achse) der ersten Testreihe in Bezug zum Zeitverlauf des Kontraststimulus (x-Achse). Die ON-Ganglienzelle feuert bereits in den ersten Sekunden nach Einblendung des Stimulus (bei geringen Kontrasten), was sich im PSTH als positiver Ausschlag darstellt. Die Feuerrate der ON-Ganglienzelle nimmt im Verlauf des Stimulus zu (mit zunehmenden Kontrastwerten), wie anhand der höher werdenden Peaks sichtbar ist. Zwischen den positiven Ausschlägen befinden sich auch kleine, nach unten abweichende Kurven, d. h. die Feuerrate nimmt ab - als Reaktion der Ganglienzelle auf die negativen Kontraste.

Die zuvor erwähnten graphischen Darstellungen ermöglichen eine visuelle Einschätzung der Ganglienzellantworten, sind aber zu ungenau, um Schlussfolgerungen auf die Kontrastschwelle der Ganglienzellen zu ziehen. Dazu bedarf es einer weiteren Analyse, die die Reaktion der Ganglienzelle auf die einzelnen Kontrastwerte in Form von Detektionswahrscheinlichkeiten angibt, die **Two-Alternative-Forced-Choice-Analyse**. Anschließend wird aus den Detektionswahrscheinlichkeiten der einzelnen Kontraste die individuelle Kontrastschwelle einer jeden Ganglienzelle ermittelt.

Die im ersten Schritt angewendete *Two-Alternative-Forced-Choice-Analyse* ist eine aus der Psychophysik stammende Methode, die sich für die Untersuchung von Antwortwahrscheinlichkeiten neuronaler Systeme auf Stimuli etabliert hat (Tolhurst et al. 1983). Sie beruht auf der Gegebenheit, dass sich die Antwortreaktion einer Zelle (hier Ganglienzelle) auf einen Reiz (in diesem Fall Kontrast) durch die Veränderung ihrer Feuerrate ausdrückt. Für eine hier als Beispiel angeführte ON-Ganglienzelle bestehen dabei zwei Möglichkeiten: 1.) Die ON-Ganglienzelle feuert nach Beginn des Kontrastschrittes mehr als zuvor und hat die Lichtintensitätserhöhung demnach zuverlässig detektiert. 2.) Ist hingegen ihre Feuerrate vor und nach der Lichtintensitätsveränderung gleich oder überwiegt sie sogar vor der Einblendung des Reizes, ist dieser Kontrastschritt zu schwach gewesen, um eine adäquate Antwortreaktion auszulösen. Maßgeblich für die Analyse der Detektionswahrscheinlichkeit ist daher nicht die absolute Feuerrate, sondern lediglich das Verhältnis an Aktionspotentialen vor und nach einem Stimulus. Dieser methodische Ansatz ist vorteilhaft, da die Feuerrate einer Ganglienzelle auf einen Kontrastwert, der innerhalb der Testreihe mehrmals präsentiert wird, durchaus unterschiedlich hoch ausfallen kann, dies jedoch nicht per se mit einer schwankenden Sensitivität gleichzusetzen ist. Die Detektionswahrscheinlichkeit einer Ganglienzelle für einen bestimmten Kontrastschritt wird dann durch Mittelung über die gesamte Testreihe erhoben und kann Werte zwischen 50% (Zufallswahrscheinlichkeit) und 100% (d. h. gleichbedeutend mit einer stets zuverlässigen Detektion) annehmen.

Die Abbildung 14 zeigt eine schematische Darstellung der angewendeten *Two-Alternative-Forced-Choice-Analyse*. Die Zeitfenster, in denen die Aktionspotentiale vor und nach dem Kontrastschritt gezählt wurden, sind in A schematisch dargestellt. Sie sind jeweils von 225 ms Dauer und erstrecken

sich in bestimmten zeitlichen Abständen zum Beginn des Kontrastschritts. Das erste Zeitfenster beginnt 225 ms vor der Einblendung des Kontrastschritts und endet entsprechend direkt mit seinem Beginn. Die Zählung der Aktionspotentiale im zweiten Zeitfenster startet 50 ms nach Einblenden des Kontrastschritts. Diese zeitliche Versetzung des zweiten Zeitfensters in Bezug auf den Beginn der Lichtintensitätsänderung wurde gewählt, da die Zunahme der Feuerrate üblicherweise mit einer leichten Verzögerung eintritt. Diese Taktung der Zeitfenster erlaubt eine gute Zuordnung der Aktionspotentiale als Antwort auf den jeweiligen Kontrastschritt unter Berücksichtigung eines ausreichenden Zeitabstandes zu dem darauffolgenden Lichtimpuls.

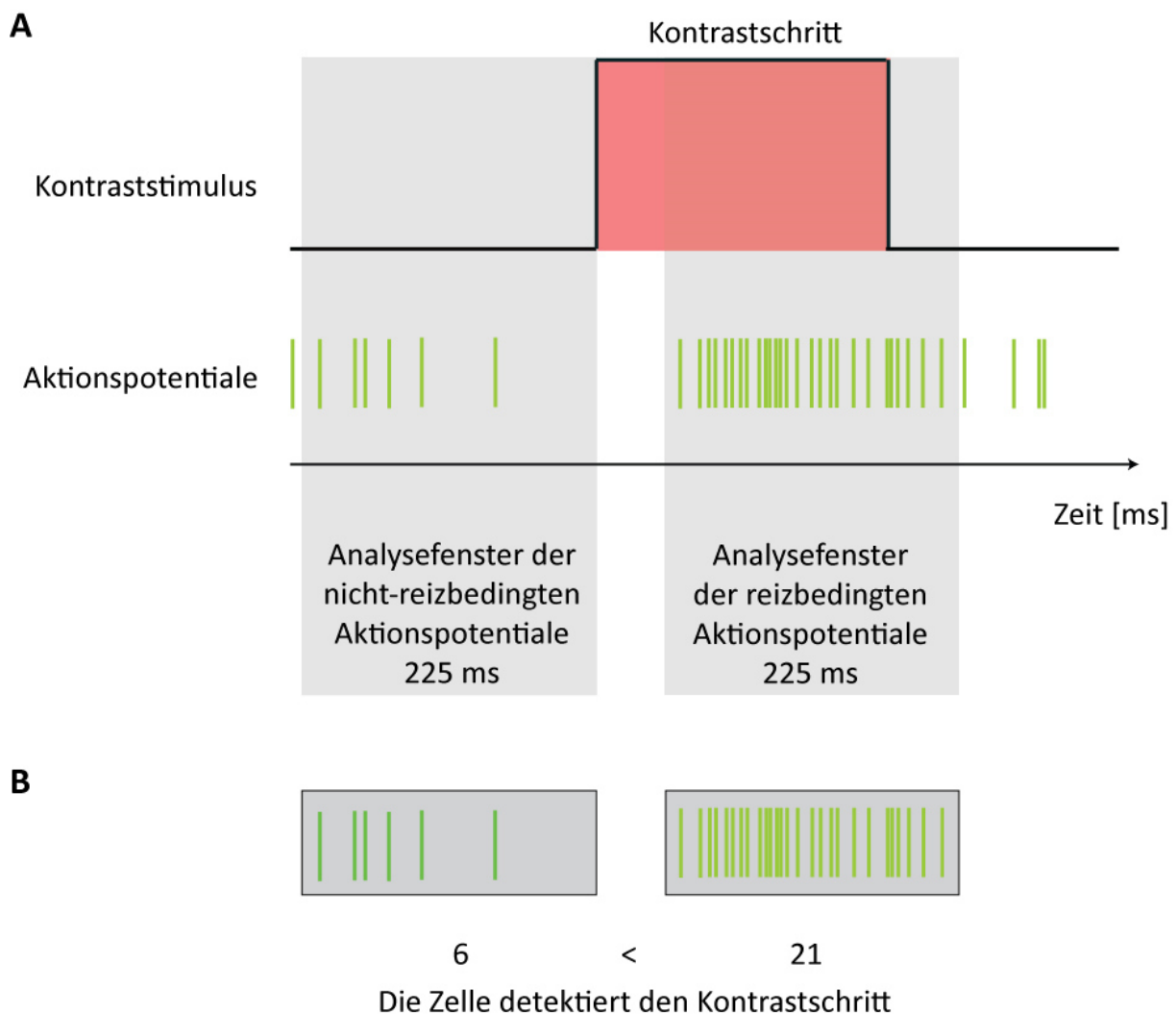


Abbildung 14 Bestimmung der Detektionswahrscheinlichkeit für einen bestimmten Kontrastwert mittels der Two-Alternative-Forced-Choice-Analyse

A Analysefenster für die Zählung der Aktionspotentiale. In zwei Zeitfenstern (grau unterlegt) von jeweils 225 ms Dauer, werden die *Spikes* vor bzw. kurz nach Änderung des Kontrastes gezählt (in diesem Fall eine Kontrasterhöhung, rot unterlegt). **B Auswertung.** Die Anzahl der Aktionspotentiale der beiden Fenster wird miteinander verglichen. Fallen mehr *Spikes* in das Analysefenster für die reizbedingte Reaktion, hat die Ganglienzelle den Kontrastwert erkannt. Das Procedere wird für denselben Kontrastwert in allen Trials durchgeführt und das Ergebnis über alle 19 Trials gemittelt.

Aus den Detektionswahrscheinlichkeiten der einzelnen Kontrastschritte wird schließlich die individuelle Kontrastschwelle der Ganglienzelle berechnet (Abbildung 15). Dazu werden die Detektionswahrscheinlichkeiten (y -Achse, rote Kreise in A) einer Ganglienzelle für die Kontrastwerte des Stimulus

(x-Achse) in einem Koordinatensystem aufgetragen und an eine Weibull-Verteilungskurve angepasst. Die sigmoid verlaufende Kurve beginnt mit 50% Detektionswahrscheinlichkeit (entsprechend einer rein zufälligen Detektionswahrscheinlichkeit, siehe oben) und saturiert bei 100%. Es ergibt sich eine neurometrische Kurve, aus der sich die Kontrastschwelle ableiten lässt (Smith und Dhingra 2009). Der Einsatz von neurometrischen Kurven ist eine gebräuchliche Methode zur Ermittlung von Schwellwerten sensorischer Systeme (Britten et al. 1992; Parker und Newsome 1998). Üblicherweise wird der Schwellwert definiert als der Kontrastwert, dessen Detektionswahrscheinlichkeit 80% beträgt, da dieser Prozentsatz ein zuverlässiges Ergebnis liefert. Bei niedrigeren oder höheren Prozentwerten nimmt die Fehlerrate zu: Werte gegen 50% sind zunehmend rauschbehaftet, während bei 100% eine Sättigung der Detektion durch die Zelle eintritt. Demnach wurde als Kontrastschwelle der Kontrastwert bestimmt, bei dem die Ganglienzelle die Detektionswahrscheinlichkeit von 80% erreicht.

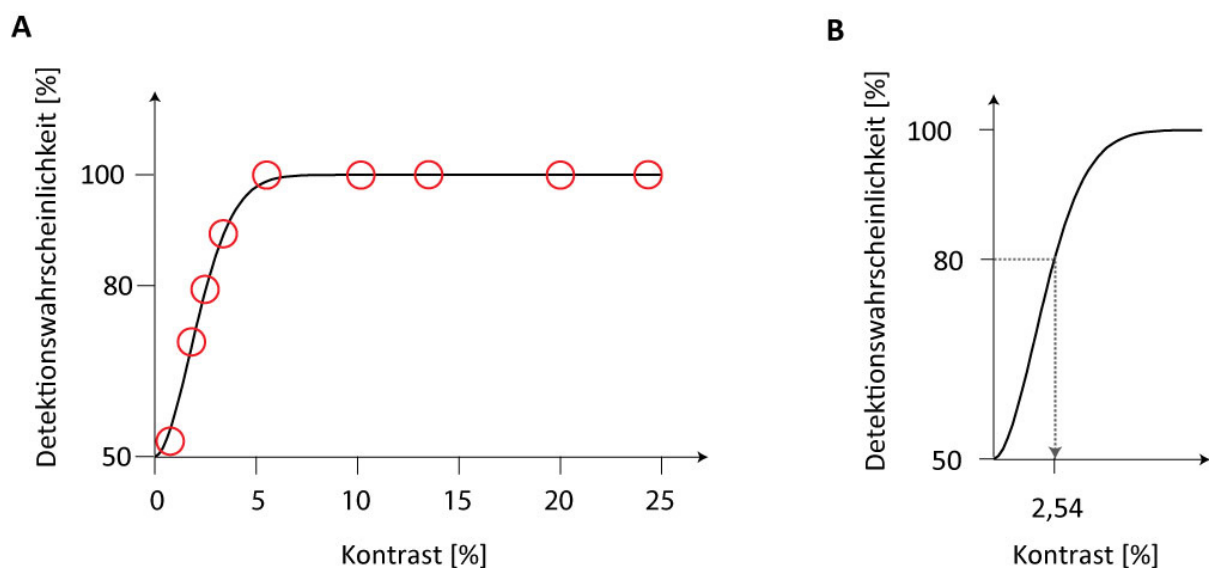


Abbildung 15 Berechnung der Kontrastschwelle einer ON-Ganglienzelle

A Neurometrische Kurve. Die Detektionswahrscheinlichkeit (y-Achse) der Kontrastwerte (x-Achse) ist als neurometrische Kurve dargestellt. Die schwarze Linie repräsentiert die einzelnen Datenpunkte (rot) nach Anpassung der Weibull-Verteilungs-Funktion. Die Kurve beginnt bei 50%, der Zufallswahrscheinlichkeit für die Detektion eines Stimulus. Bei höheren Kontrastwerten nimmt die Wahrscheinlichkeit zu und nähert sich 100% an.

B Bestimmung der Kontrastschwelle. Der Kontrastwert, bei dem die Ganglienzelle eine Detektionswahrscheinlichkeit von 80% erreicht, wird als Kontrastschwelle definiert. Diese Beispielzelle erreicht bereits bei niedrigen Kontrastwerten eine hohe Detektionswahrscheinlichkeit: Ihre Kontrastschwelle liegt bei 2,54%.

3.5.2 Stimulus zur Erfassung der zeitlichen Auflösungsseigenschaften

Um die Frequenzsensitivität der Ganglienzellen und ihre Veränderung durch Ivabradin zu ermitteln, wurde der Netzhaut ein Stimulus präsentiert, der verschiedene zeitliche Frequenzen imitiert. Über das Multielektroden-Array werden die Aktionspotentiale der Ganglienzellen abgeleitet und für jede Testreihe ermittelt, bis zu welcher maximalen Frequenz die einzelnen Ganglienzellen dem Stimulus folgen können. Diese Grenze ist als die individuelle Frequenzschwelle definiert. Sie wird über einen Synchronisations-Index ermittelt, dessen Berechnung eine übliche Methode in der Neurophysiologie von Sinnessystemen ist, um Zellsignale als Antwort auf zeitliche Frequenzen zu analysieren (Lachaux et al. 1999). Anschließend kann durch den Vergleich der Frequenzschwellen einer Ganglienzelle zwischen den verschiedenen Testreihen (vor, während, nach Ivabradin) beurteilt werden, ob die Ganglienzelle dem Reiz auch während und nach der Ivabradin-Zugabe folgen kann. Durch die Gegenüberstellung mit den Kontrollgruppen kann untersucht werden, ob die Veränderungen tatsächlich durch Ivabradin hervorgerufen wurden.

In diesem Kapitel werden der Stimulus, die Analyse der hervorgerufenen Antwortsignale und die Ermittlung der Frequenzschwellen erklärt.

3.5.2.1 Design des Stimulus

Zur Simulation von Frequenzen wird ein bestimmtes Muster von Lichtimpulsen auf die Retina projiziert, das in seiner Gesamtheit als Frequenzstimulus bezeichnet wird. Der Frequenzstimulus zeigt folgenden Aufbau (Abbildung 16): Zu Beginn wird eine Hintergrundbeleuchtung im mesopischen Bereich für zwei Sekunden eingeblendet. Daran schließt sich ein Zeitfenster von fünf Sekunden Dauer an, indem sinusoidal modulierten Änderungen der Lichtintensität (Hell-Dunkel-Änderungen) mit einer Frequenz von 1 Hertz (Hz) den Netzhautzellen präsentiert werden. Die Amplitude der Hell-Dunkel-Abweichungen beträgt 50% von der Hintergrundbeleuchtung. Der Wechsel zwischen der Hintergrundbeleuchtung und dem Zeitfenster mit Hell-Dunkel-Abweichungen wiederholt sich ununterbrochen. In jedem der insgesamt zwölf Zeitfenster erhöht sich die Frequenz der Hell-Dunkel-Wechsel sukzessiv um je 1 Hz, bis eine maximale Frequenz von 12 Hz im zwölften Zeitfenster erreicht ist. Nach dem letzten (12-Hertz-)Zeitfenster wird diese Abfolge 14 Minuten lang wiederholt, um genügend Zellantworten abzuleiten.

Die Wahl von 12 Hz als obere Grenze fiel aufgrund von Vorexperimenten, in denen eine verminderte Reaktion der murinen Ganglienzellen auf Frequenzen über 9 Hz festgestellt werden konnte. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in anderen Frequenzstudien an Mäusen gemacht (Tsai et al. 2017; Umino et al. 2008). Zudem konnte in anderen Arbeiten nachgewiesen werden, dass murine Netzhäute mit HCN1-Kanal-*Knock-Out* bereits ab 5 Hz keine Antwortamplituden mehr registrieren (Seeliger et al. 2011) und sich unter Ivabradin die stärksten Elektroretinogramm-Veränderungen bei Stimulation mit Flimmerreizen im Bereich von 1 bis 7 Hz ergeben (Della Santina et al. 2010). Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit der Frequenzbereich zwischen 1 bis 12 Hertz gewählt.

Die Ableitungen erfolgten analog zum vorherigen Kontrastexperiment über fünf Testreihen (erste Testreihe ohne Ivabradineinwirkung, zwei folgende unter Ivabradineinfluss und die letzten zwei Testreihen nach dem Ausspülen des Blockers, siehe Abbildung 16).

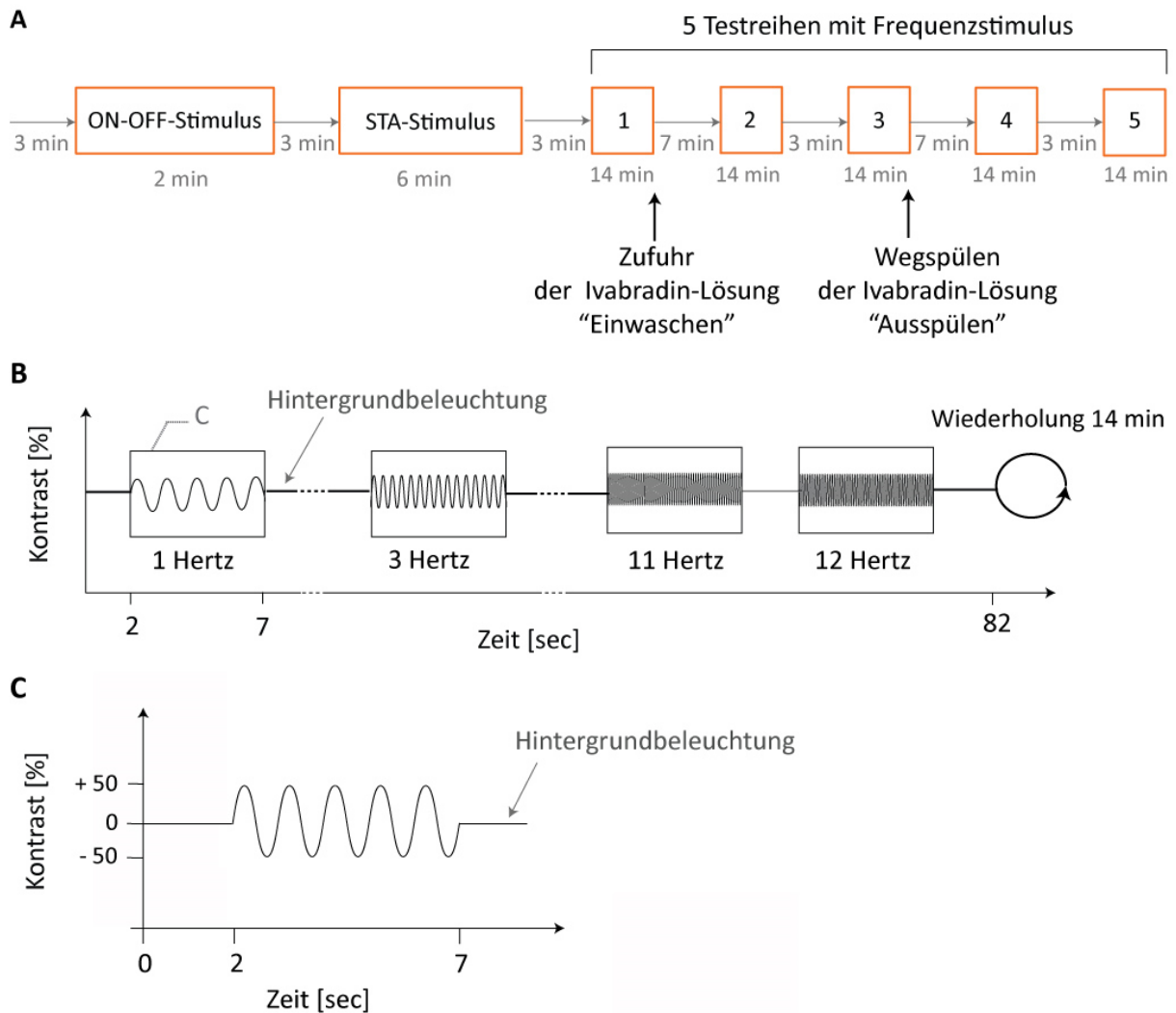


Abbildung 16 Frequenzstimulus zur Erhebung der zeitlichen Auflösungseigenschaften

A Versuchsprotokoll. Die Reihenfolge der Ableitungen entspricht der des Kontrastexperiments. ON-OFF-Stimulus siehe Kapitel 3.5.1, STA-Stimulus siehe Kapitel 3.5.2. **B Schematische Darstellung des Frequenzstimulus.** Eine Serie besteht aus zwölf Zeitfenstern von jeweils 5 Sekunden Dauer, in denen sich die Lichtintensität ausgehend von der Hintergrundbeleuchtung sinusoidal verändert. Die Frequenz nimmt von einem Fenster zum nächsten sukzessive zu (1 Hz bis 12 Hz). Dazwischen wird die Hintergrundbeleuchtung für zwei Sekunden eingeblendet. Diese Abfolge wird 14 min lang für jede Testreihe wiederholt. **C Vergrößerung aus B.** Sinusoidaler Lichtreiz mit einer Frequenz von 1 Hz und Hintergrundbeleuchtung.

3.5.2.2 Datenanalyse

Anhand einer OFF-Ganglienzelle werden die Analyseschritte zur Ermittlung der Frequenzschwelle beispielhaft dargelegt. Zur Verdeutlichung des Ivabradineffekts wird der gleiche Datensatz in unterschiedlichen Graphiken dargestellt.

Entsprechend der Analyse der Kontrastsensitivität wird zunächst ein **Rasterplot** erstellt, um einen ersten Überblick über die Ganglienzellantworten auf die einzelnen Abfolgen des Stimulus zu erhalten (Abbildung 17). Die Aktionspotentiale sind im Rasterplot als dünne Striche dargestellt und treten bei hoher Aktivität als *Spike-Salven* auf. Durch ihre enge Drängung hintereinander erscheinen sie in der Abbildung 17 A als breite Striche, die durch kurze Pausen voneinander getrennt sind. Der Ausschnitt der Abbildung 17 A (roter Kasten) wird in B vergrößert dargestellt, hier ist der Wechsel zwischen den Salven an Aktionspotentialen und Pausen besser zu erkennen. Während der fünf Sekunden, in denen der sinusoidale Lichtstimulus eingeblendet wird, tritt eine phasenweise starke Zellreaktion auf, die

zeitlich mit der Einblendung der negativen Kontraste zusammenfällt. Die Pausen zwischen den *Spike*-Salven sind wiederum auf die positiven Kontraste zurückzuführen, d. h. die OFF-Ganglienzelle reagiert wie zu erwarten nicht auf eine Erhöhung der Lichtintensität. Während der Einblendung des Hintergrundgrauwerts (z. B. Sekunde 7 bis 9) reagiert die Zelle mit mehreren vereinzelt Aktionspotentialen (roter Pfeil, Abbildung 17 B).

Im Rasterplot der Beispielizele ist zu sehen, dass die OFF-Ganglienzelle das Antwortmuster mit steigender Anzahl an Aktionspotentialen bis etwa zur 60. Sekunde beibehält. Ab etwa diesem Zeitpunkt, wenn die höchsten Frequenzen eingeblendet werden, feuert die Ganglienzelle weniger beständig und das zuvor beobachtete Reaktionsmuster verliert sich in unsystematisch auftretenden Aktionspotentialen. Die OFF-Ganglienzelle scheint den schnellsten Lichtintensitätswechseln nicht mehr folgen zu können und es ist anzunehmen, dass ihre Detektionsschwelle überschritten wurde.

Für die Darstellung als ***Peri-Stimulus-Time-Histogramm*** (PSTH, Abbildung 18) werden die Zellantworten (Feuerrate in Hertz, y-Achse) über den zeitlichen Verlauf einer Testreihe (x-Achse) gemittelt. Es wird sichtbar, dass die beispielhafte OFF-Ganglienzelle auf den sinusoidalen Reiz mit einem Anstieg in der Feuerrate reagiert (Sternchen), während die dazwischen eingeblendete Hintergrundbeleuchtung nur wenige Aktionspotentiale auslöst (Klammer). Die im Zeitverlauf bzw. mit steigender Frequenz zunehmenden Feuerraten lassen sich gut mit der Beobachtung aus dem Rasterplot vereinbaren. Auch im PSTH zeigt sich im Bereich der höchsten Frequenzen (ab etwa der 60. Sekunde) eine geringere Anzahl an Aktionspotentialen. Abbildung 18 B zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des PSTH, in dem die periodische Antwort in Bezug auf die Hell-Dunkel-Wechsel besser zur Geltung kommt.

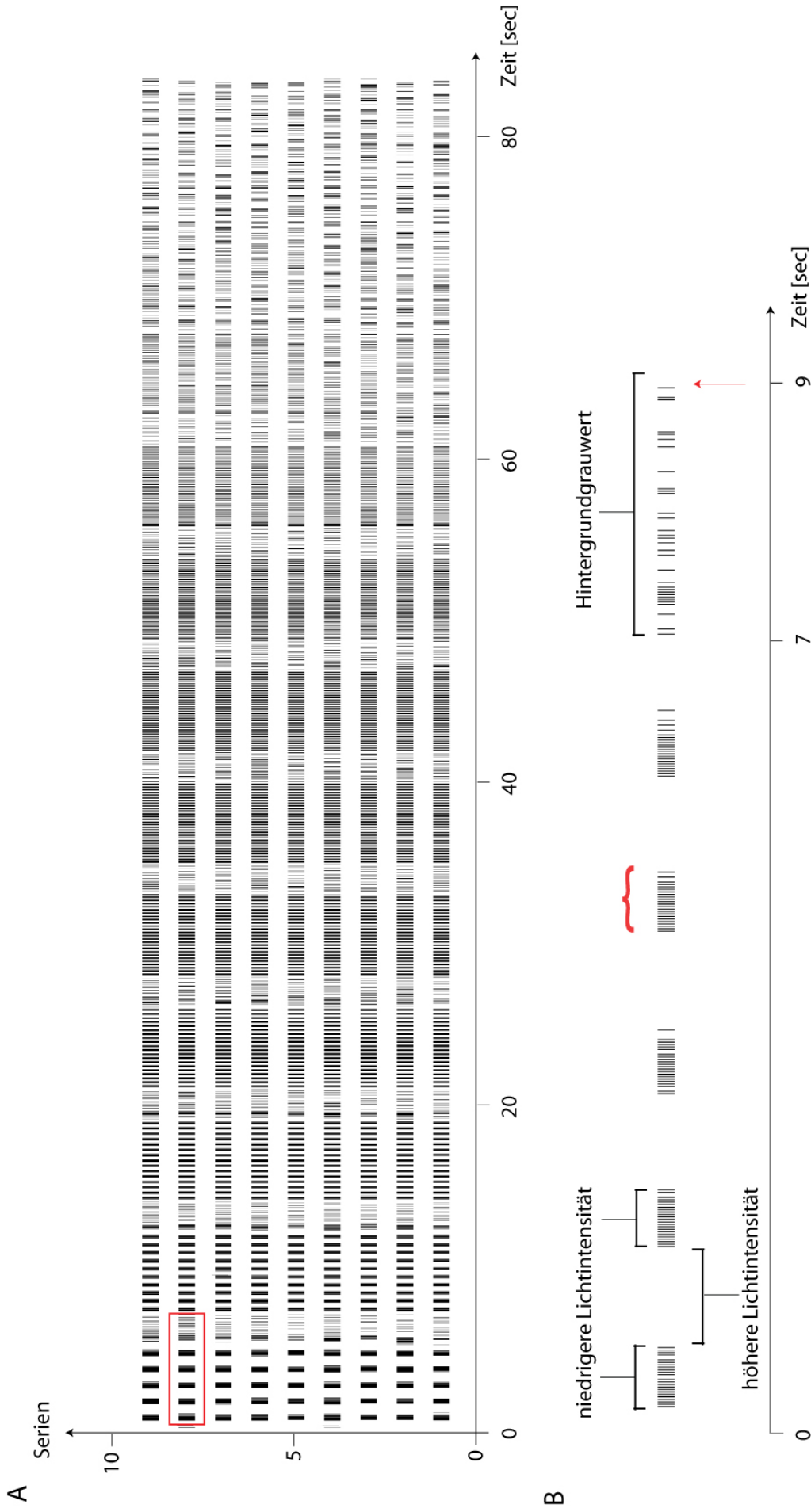


Abbildung 17 Rasterplot der Antwortsignale einer OFF-Zelle als Reaktion auf den Frequenzstimulus (erste Aufnahme, vor Ivabradin)

A Rasterplot aller Serien: Jedes Aktionspotential, das in den Serien (y-Achse) über die Zeit des Frequenzstimulus (x-Achse) generiert wurde, ist als ein Strich dargestellt. **B Ausschnitt aus A:** Die Vergrößerung aus A (roter Kasten) stellt die einzelnen Aktionspotentiale besser dar. Bei niedrigeren Lichtintensitäten (relativ auf den Hintergrundgrauwert bezogen) feuert die OFF-Ganglienzelle Salven an Aktionspotentialen (rote Klammer). Man erkennt in dieser Abbildung die periodische Antwort der Ganglienzelle auf den sinusoidalen Frequenzstimulus anhand der periodischen Zunahme der Feuerrate bei Lichtintensitätsabsenkungen. Die Pausen zwischen den Salven entsprechen der Einblendung hoher Lichtintensitäten. Nach den periodischen Stimuli wird der Hintergrundgrauwert eingeblendet, auf den die OFF-Ganglienzelle spontan einzelne Spikes (roter Pfeil) generiert.

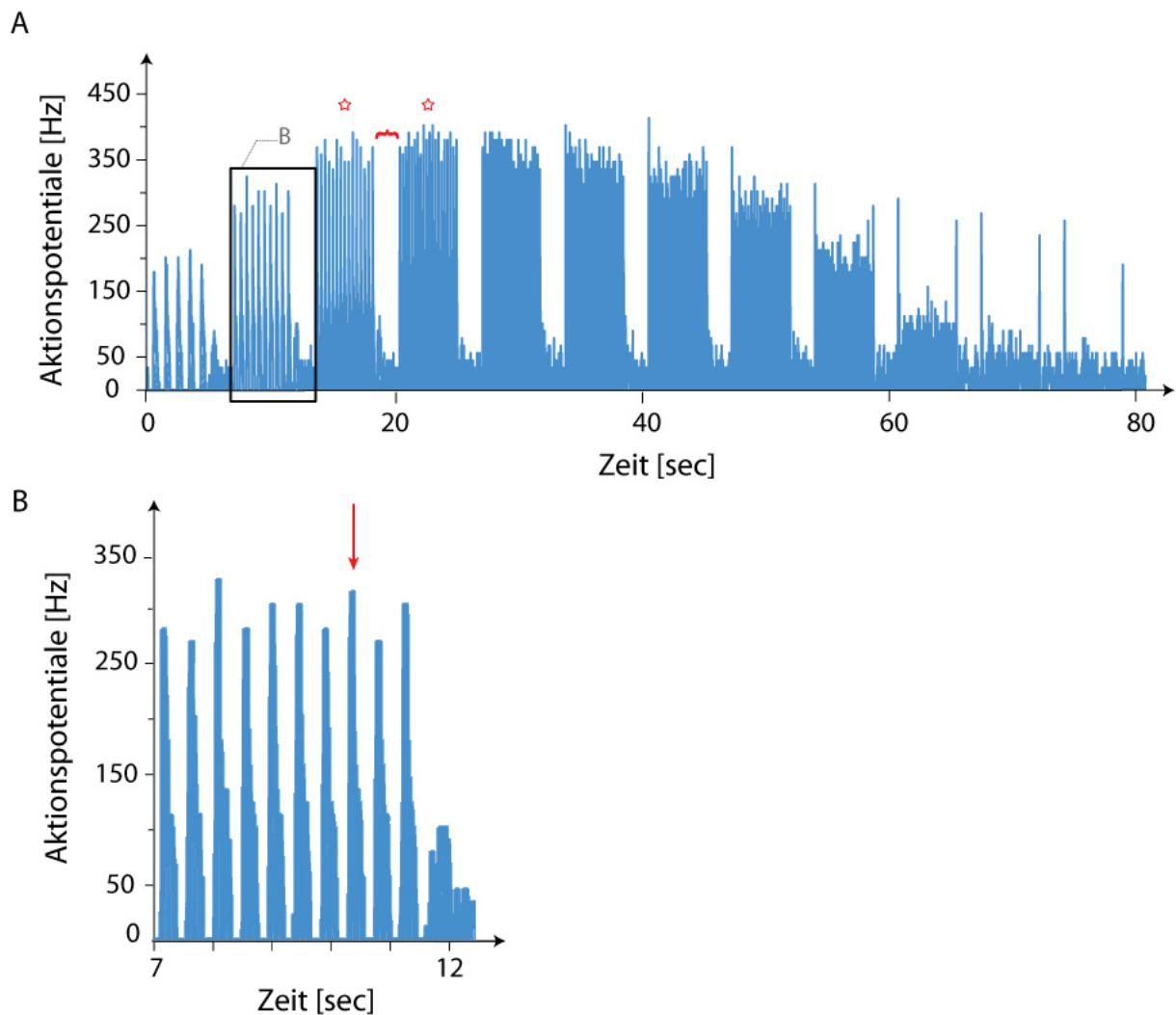


Abbildung 18 Peri-Stimulus-Time-Histogram (PSTH) einer OFF-Ganglienzelle

A Der Datensatz aus dem Rasterplot (Abbildung 17) wird als PSTH dargestellt. Während der Einblendung des sinusoidalen Stimulus generiert die OFF-Ganglienzelle besonders viele Aktionspotentiale, dies spiegelt sich in der Zunahme der Feuerrate wider (Sterne). Als Reaktion auf den Hintergrundgrauwert nimmt die Rate abrupt ab und fluktuiert unterhalb von 50 *Spikes* pro Sekunde (Klammer). Hier wird deutlich, dass die Ganglienzelle phasengekoppelt auf den Stimulus reagiert und besonders sensitiv für die mittleren Frequenzen ist (sie erreicht ihre höchste Feuerrate), während ab 60 Sekunden, bei höheren Frequenzen, die Anzahl an Aktionspotentialen abrupt abnimmt und nur wenig höher liegt als bei Einblendung des Hintergrundgrauwertes. **B Ausschnitt aus A.** Die periodische Antwort auf den Stimulus wird in der Erhöhung der Aktionspotentialrate sichtbar (Pfeil), dazwischen liegen kurze Pausen, da die OFF-Ganglienzelle nicht auf die Erhöhung der Lichtintensität reagiert.

Eine weitere Darstellung der Zellreaktion liefert ein **Periodenhistogramm (PH)**. Im Periodenhistogramm werden die gemittelten Aktionspotentiale einer Testreihe abhängig von ihrem zeitlichen Auftreten innerhalb einer Periode der Hell-Dunkel-Wechsel wiedergegeben. Dadurch wird sichtbar, wie die generierten Aktionspotentiale der Ganglienzelle in Bezug zur Phase des sinusoidalen Stimulus stehen. Reagiert die Ganglienzelle immer in einer bestimmten Phase der Auslenkung des sinusoidalen Stimulus, wird dieses periodische Antwortverhalten als Phasenkopplung bezeichnet (Baden et al. 2011). Zur besseren Vergleichbarkeit der Zellreaktion auf die unterschiedlichen Frequenzen des Stimulus, wurde der sinusoidale Stimulus in 40 Abschnitte (Phasen) unterteilt (Abbildung 19 A). Reagiert die Ganglienzelle phasengekoppelt, so nehmen ihre Aktionspotentiale in einer bestimmten

Phase zu und im PH wird eine steil modulierte Kurve mit einer maximalen Feuerrate sichtbar (Abbildung 19 B).

Für jede der zwölf Frequenzen wird ein Periodenhistogramm erstellt (Abbildung 19 C). Anhand der maximalen Feuerrate bei unterschiedlichen Frequenzen wird sichtbar, bis zu welcher Frequenz die Ganglienzelle ihre Phasensynchronizität behält und dem Stimulus folgen kann. Von dem Moment an, ab dem sie keine systematische Antwort mehr zeigt, ist ihre Frequenzschwelle überschritten. In dem Beispiel der Abbildung 19 liegt dieser Fall bei etwa 11-12 Hz vor. In der Abbildung 19 C fällt auf, dass das Kurvenmaximum der Beispielizele nicht konstant über alle Frequenzen hinweg in ein und derselben Periode auftritt. Die maximale Feuerrate der Ganglienzelle ist relativ zur Einblendung des Stimulus verschoben. Dies kommt zustande, da bei einer Frequenzerhöhung die Stimulusphasen in immer kürzerer Zeit präsentiert werden, die Informationsüberleitung von den Photorezeptoren zu den Ganglienzellen jedoch eine gewisse Zeit benötigt. Auch die in den Ganglienzellen stattfindende Generierung von Aktionspotentialen sowie andere zelluläre Ursachen verzögern das Auftreten der Aktionspotentiale. Diese Phasenverschiebung der Zellantworten beeinträchtigt allerdings nicht die Ermittlung der Frequenzauflösung, weshalb hier nicht weiter darauf eingegangen wird.

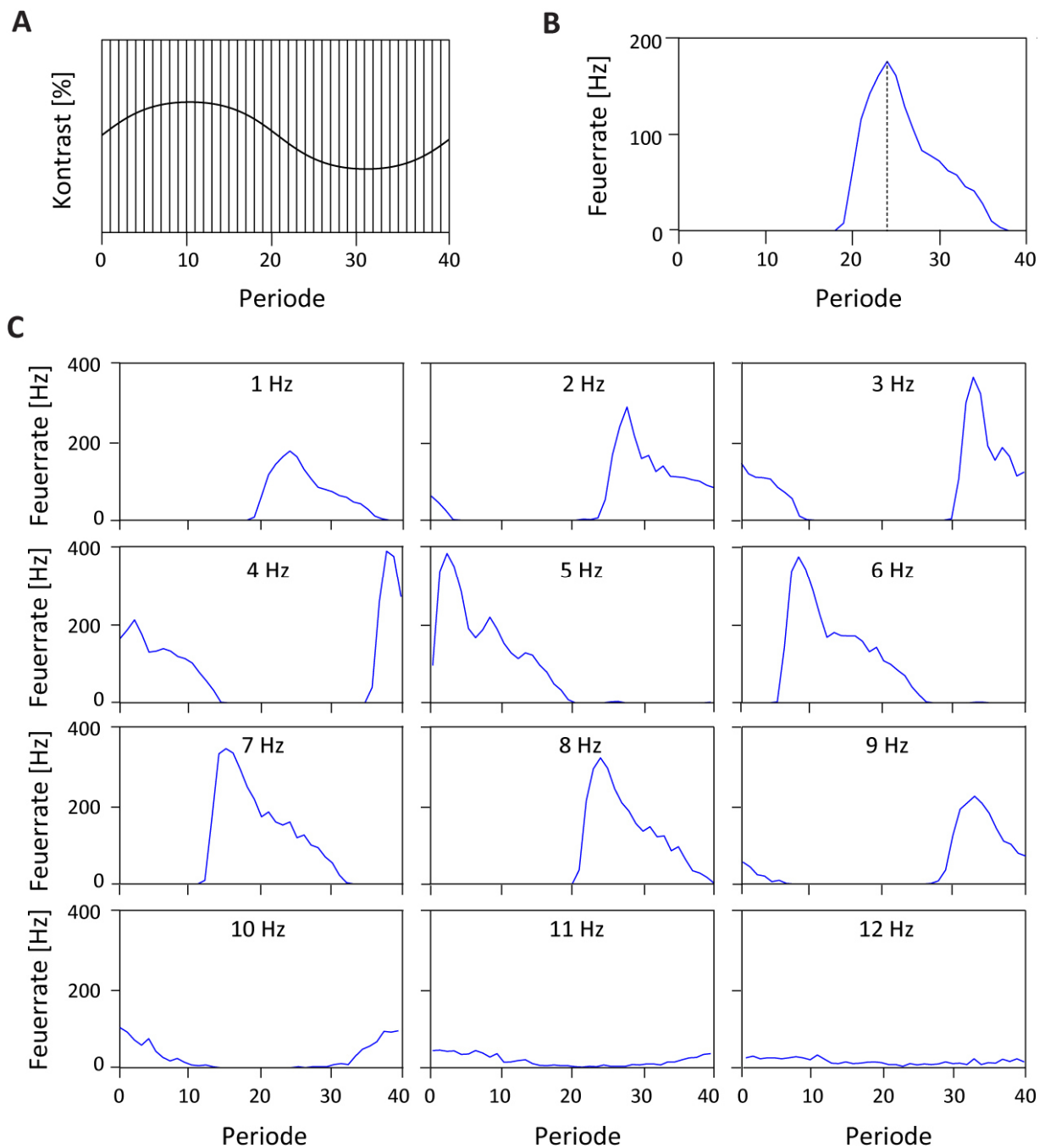


Abbildung 19 Periodenhistogramm (PH) für eine OFF-Ganglienzelle, erste Testreihe (vor Ivabradin)

Das PH zeigt die Anzahl der über eine Testreihe gemittelten Aktionspotentiale (y-Achse) pro Sekunde (Feuerrate), in Bezug zur Periode des Stimulus (x-Achse). Für jede der 12 Frequenzen wird jeweils ein PH erstellt (siehe C). **A Einteilung des Stimulus in 40 Abschnitte (Schema)**. Die sinusoidale Veränderung der Lichtintensität wird hier der Übersicht halber in 40 Abschnitte (Perioden) eingeteilt. **B Detail aus C, Antwort der OFF-Ganglienzelle bei einer Stimulusfrequenz von 1 Hz**. Das PH zeigt die gemittelten Aktionspotentiale als Antwort auf den Stimulus. Die Feuerrate (Anzahl der Aktionspotentiale pro Sekunde) erreicht ihr Maximum in einer bestimmten Periode der sinusoidal modulierten Kontrastveränderungen. Der zeitliche Zusammenhang zwischen dem Stimulus und der Feuerrate der Aktionspotentiale wird als Phasenkopplung bezeichnet. In diesem Beispiel feuert die Ganglienzelle am stärksten während der 24. Periode (gestrichelte Linie). **C PH einer OFF-Zelle für alle Frequenzen**. Hier wird die Phasenkopplung bei verschiedenen Frequenzen visualisiert. In diesem Beispiel zeigt sich, dass die OFF-Ganglienzelle ihre Phasensynchronizität bis zu den höheren Frequenzen beibehält. Ab einer Frequenz von 10 Hz flachen die Feuerratenmaxima ab. Bei 11 und 12 Hz generiert die OFF-Ganglienzelle nur noch wenige Aktionspotentiale, sie kann dem Stimulus nicht mehr folgen.

Wie aus den Periodenhistogrammen der Abbildung 19 C hervorgeht, kann die OFF-Ganglienzelle dem Frequenzstimulus bis zu einer bestimmten Frequenz phasensynchron folgen. Die Aktionspotentiale fallen in eine bestimmte Phase des sinusoidalen Stimulus und sind demnach phasengekoppelt (Schema in Abbildung 20 A). Ein Maß für die Stärke dieser Phasensynchronizität ist der Synchronizitäts-Index, der die zeitliche Kopplung der Aktionspotentiale an die Stimulusphase angibt und Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann. Dabei steht 1 für eine perfekte Phasenkopplung der Zellantworten und 0 für unabhängig vom Reiz auftretende Aktionspotentiale. Der Wert 1 kommt zustande, wenn alle Aktionspotentiale in dieselbe Phase des sinusoidalen Stimulus fallen. Der Synchronizitäts-Index wird auch als Vektorstärke bezeichnet (Goldberg und Brown 1969), da sich die Berechnung anhand eines Einheitskreises von 360° visualisieren lässt (Abbildung 20 B). Der Kreis entspricht einem vollständigen Zyklus des sinusförmigen Stimulus, auf dem die Aktionspotentiale als Vektoren einer Einheitslänge abgebildet werden. Je nachdem in welcher Phase des periodischen Stimulus sie auftreten, weisen die Vektoren in bestimmte Richtungen des Kreises. Während der wiederholten Stimulus-Darbietung innerhalb der 14-minütigen Testreihe treten - bei einer phasengekoppelten Antwort - viele Aktionspotentiale zum selben Zeitpunkt auf, sodass die einzelnen Vektoren in dieselbe Richtung des Kreises weisen. Aus der Summe aller Einzelvektoren ergibt sich der Gesamtvektor, aus dessen Länge, nach Normierung mit der Gesamtanzahl an Aktionspotentialen, der Synchronizitäts-Index resultiert. Feuert die Ganglienzelle nicht phasengekoppelt, d. h. unabhängig vom Stimulus, so treten die Aktionspotentiale über die Periode des Stimulus verteilt auf. Die einzelnen Vektoren weisen dann auf dem Einheitskreis in unterschiedliche Richtungen, sodass durch Summation und Normierung der Gesamtvektor gegen 0 geht.

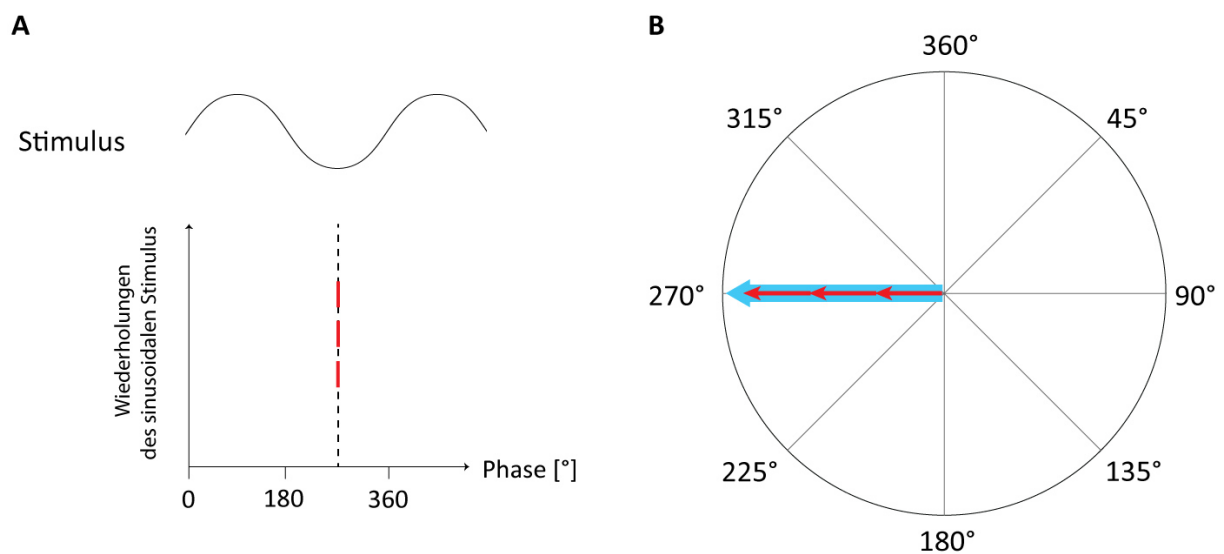


Abbildung 20 Berechnung eines Gesamtvektors aus den Zellantworten (schematisch und vereinfacht)

A Phasenkopplung der Aktionspotentiale. Der Stimulus ist hier ausschnittsweise gezeigt. Die untersuchte Ganglienzelle generiert hier beispielhaft bei drei Wiederholungen des sinusoidalen Stimulus ihre Aktionspotentiale (rote Striche) in jeweils derselben Stimulusphase. Dies bedeutet, dass die Ganglienzelle phasensynchron feuert. **B Darstellung der Vektoren in einem Einheitskreis.** Trägt man diese drei Spikes wie im Text beschrieben als Vektoren in einem Einheitskreis auf (rote Pfeile) und summiert diese, erhält man einen Gesamtvektor (dicker, blauer Pfeil). Normiert durch die Gesamtanzahl der generierten Aktionspotentiale erhält man die Vektorstärke (nicht gezeigt).

Für diese Analyse müssen zwei Umstände beachtet werden, unter denen die Berechnung der Vektorstärke verfälscht werden kann. Zum einen kann trotz hochgradiger Phasenkopplung eine geringe Vektorstärke resultieren und fälschlicherweise als ungenügende Phasensynchronizität bewertet

werden, wenn die Ganglienzelle im sinusoidalen Helligkeitsverlauf ihre maximale Feuerrate sowohl im steigenden als auch im fallenden Bereich der Kurve erreicht. Dann zeigen die Vektoren auf dem Einheitskreis in entgegengesetzte Richtungen und heben sich durch die Vektoraddition im ausgeprägtesten Fall auf - dann ginge die Vektorstärke gegen null. Diese Beobachtung konnte jedoch nur bei wenigen Ganglienzellen gemacht werden. Umgekehrt kann eine artifiziell hohe Vektorstärke berechnet werden, wenn nur sehr wenige *Spikes* generiert wurden und damit die Analyse verzerren. Zur Überprüfung, ob die gemessene Vektorstärke (Abbildung 21 A) tatsächlich im Zusammenhang mit dem Stimulus steht und nicht aus statistischen Fluktuationen entstanden ist, wurde aus ihrer Anzahl an Aktionspotentialen eine Zufalls-Vektorstärke berechnet und mit der tatsächlichen Vektorstärke verglichen. Durch hundertfache Randomisierung der zeitlichen Abfolge der Aktionspotentiale ergab sich die Zufalls-Vektorstärke mit einem bestimmten Mittelwert und einer Standardabweichung (Abbildung 21 B). Für jede Stimulusfrequenz wurde untersucht, ob sich die tatsächliche Vektorstärke mehr oder weniger als zwei Standardabweichungen von dem Mittelwert der randomisierten Standardabweichungen unterscheidet. Im letzten Schritt wurden die beiden benachbarten Frequenzen ermittelt, die direkt ober- und unterhalb der zwei Standardabweichungen liegen (Abbildung 21 C). Durch Interpolierung dieser beiden Werte ergab sich die Frequenz, bei der die Grenze der zwei Standardabweichungen überschritten wird – diese Frequenz stellt die Frequenzschwelle der untersuchten Ganglienzelle dar.

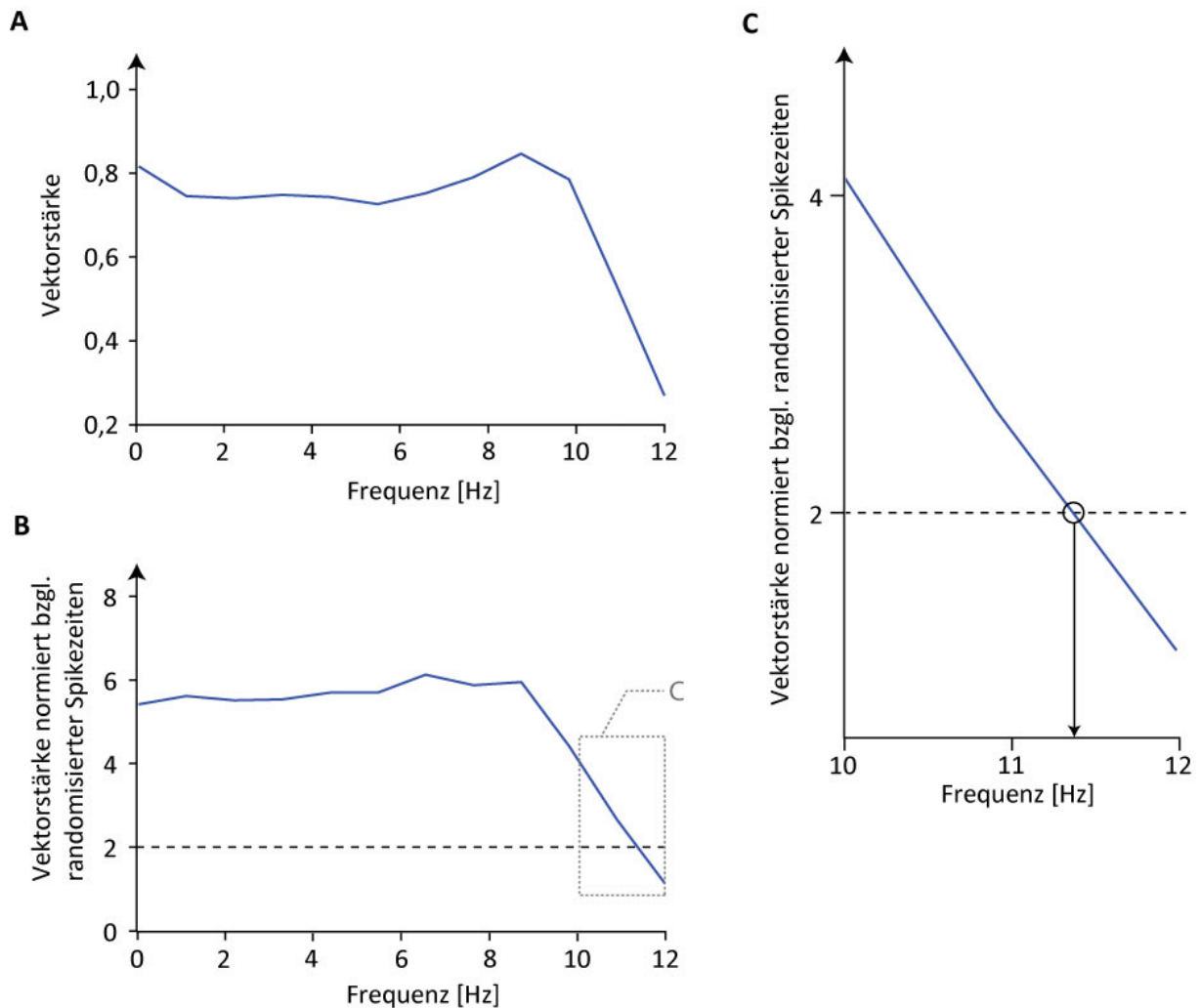


Abbildung 21 Vektorstärke, normierte Vektorstärke und die daraus folgende Berechnung der Frequenzschwelle
 Der Grad der Phasenkopplung der Ganglienzelle an den Stimulus wird als Vektorstärke quantifiziert. Ihr Wert liegt zwischen null (die Ganglienzelle feuert unabhängig vom Stimulus) und eins (die Aktionspotentiale werden perfekt phasensynchron generiert). **A Vektorstärke.** Es ist die berechnete Vektorstärke (y-Achse) für jede Frequenz (x-Achse) gezeigt. **B Normierte Vektorstärke.** Durch den Vergleich der tatsächlichen mit einer Zufalls-Vektorstärke ergibt sich eine normierte Vektorstärke (siehe dazu auch Beschreibung im Textteil), die gestrichelte Linie liegt bei 2 Standardabweichungen. **C Erhebung der Schwellwerte für die Frequenzauflösung.** Die beiden Werte, die jeweils ober- bzw. unterhalb von zwei Standardabweichungen auf der Geraden liegen (hier dargestellt als Schnittpunkt des Graphen mit der gestrichelten Linie) wird interpoliert und stellt den Frequenzschwellwert dar, bis zu dem die Ganglienzelle phasensynchron feuert. Die ermittelte Frequenzschwelle für die OFF-Ganglienzelle beträgt in dieser Testreihe 11,48 Hz.

3.6 Statistische Methoden

In diesem Abschnitt werden die statistischen Tests zur Überprüfung der erhobenen Datensätze kurz erläutert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden sowohl für die Kontrast- als auch für die Frequenzsensitivität dieselben graphischen Darstellungsarten und statistischen Methoden angewendet. Die statistische Analyse erfolgte durch die Software MatLab (The MathWorks®, Inc.) und Statistica (Statsoft GmbH). Die Graphiken wurden anschließend im Bildbearbeitungsprogramm Adobe Illustrator® optimiert.

Bei der Durchführung der Experimente wurde berücksichtigt, dass sich interindividuelle Unterschiede zwischen den Versuchstieren im Sinne von statistischen Fluktuationen auf die Ergebnisse auswirken können. Um diesen Einfluss zu minimieren, wurde eine ausreichende Anzahl von Netzhäuten und Ganglienzellen für die Datensätze von Ivabradin- und Kontrollgruppen abgeleitet. Das Auftreten von

statistikbedingten Fehlern in der Auswertung soll durch die Anwendung mehrerer Testverfahren verhindert werden. Hierbei kommen je nach der zu überprüfenden Fragestellung sowohl parametrische als auch nicht-parametrische Testverfahren zum Einsatz. Die parametrischen Verfahren umfassen den t-Test und die Varianzanalyse (kurz: ANOVA von engl. *Analysis of Variance*), die für die statistische Testung größerer Datenmengen eingesetzt wurden, wie dem Vergleich aller Schwellwerte zwischen den Kontroll- und den Versuchsgruppen. Mittels Q-Q-Plot wurde zuvor die für die parametrischen Tests notwendige Normalverteilung bestätigt (Daten hier nicht gezeigt). Die Anwendung der nicht-parametrischen Tests, wie dem Mann-Whitney-U-Test und dem Wilcoxon-Test, kamen für die Analyse kleinerer, unabhängiger Stichproben zum Einsatz, z. B. zur Überprüfung der an einzelnen Versuchstieren abgeleiteten Werte. Nicht-parametrische Tests setzen keine Annahmen zur Wahrscheinlichkeitsverteilung der Werte voraus.

Als p-Wert wurde für alle statistischen Analysen das Signifikanzniveau von $\alpha=0.05$ festgelegt. Demnach ist bei einem unter dem Signifikanzniveau liegenden p-Wert von einem signifikanten Ergebnis auszugehen, d. h. das Ergebnis ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht durch einen Zufall, sondern durch einen tatsächlichen Effekt der HCN-Kanalblockade mit Ivabradins entstanden.

Sowohl für das Kontrast- als auch das Frequenzexperiment wurde zunächst untersucht, ob es unter der Anwendung von Ivabradin im Verlauf der Testreihen 1 bis 5 tatsächlich zu einer signifikanten Veränderung der Schwellwerte gekommen ist. Dazu verglich die Varianzanalyse die arithmetischen Mittelwerte aller Testreihen aus der Versuchs- und Kontrollgruppe miteinander und überprüfte, ob sie in ihrer Grundgesamtheit übereinstimmen. Führte Ivabradin zu einer ausreichend starken Änderung der Schwellwerte, die sich in den Mittelwerten der Testreihen widerspiegelt, so ergibt sich im Test ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe.

Die Varianzanalyse kann jedoch nicht ermitteln, welche der Stichproben (d. h. welche der fünf Testreihen) für einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und Versuchsgruppe ausschlaggebend ist. Zur Beantwortung dieser Frage war es daher notwendig, die einzelnen Testreihen von der Kontroll- und Versuchsgruppe jeweils einzeln gegenüber zu stellen und auf signifikante Abweichungen zu überprüfen. Hierzu wurde der t-Test angewendet, der den Mittelwert der ersten Testreihe aus der Ivabradin-Gruppe mit dem Mittelwert der ersten Testreihe aus der Kontrollgruppe verglich, etc.

Nachdem auf diese Weise die Gesamtheit der abgeleiteten ON- bzw. OFF-Ganglienzellen statistisch überprüft worden waren, wurden die Ganglienzellen jedes einzelnen Versuchstieres in getrennten Boxplots dargestellt und die einzelnen Testreihen für jedes Tier separat untersucht. Dies ermöglicht es, interindividuelle Unterschiede in den Netzhäuten der Versuchstiere darzustellen und die variable Stärke des Ivabradineffektes (Schwankungsbreite, Veränderungstendenz) auf die Kontrast- und Frequenzschwellen jedes einzelnen Tieres zu beurteilen. Es wurde statistisch überprüft, ob einerseits eine signifikante Abweichung zwischen der ersten und einer der jeweils nachfolgenden Testreihen besteht und andererseits, ob eine signifikante Änderung im Verlauf der Testreihen festzustellen ist (Vergleich einer Testreihe mit der jeweils vorangehenden). Für die statistische Überprüfung kam der Wilcoxon-Test zur Anwendung, da er für die kleinere Datenmenge der einzelnen Versuchstiere ein zuverlässiges Ergebnis liefert. Der Test prüft, ob die Daten aus den zu vergleichenden Gruppen aus einer gemeinsamen Verteilung stammen können.

In einer weiteren Analyse wurde die Differenz der Schwellwerte (in Prozent) von der ersten zur dritten Testreihe zwischen Kontroll- und Ivabradin-Gruppe verglichen. Dazu kam der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz, der die beiden Datensätze auf signifikante Unterschiede in ihrer Verteilung testete.

Das nächste Kapitel stellt die Auswertung im Einzelnen dar.

4 Ergebnisse

4.1 Kontrastsensitivität

Die Kontrastsensitivität der Retina wurde mithilfe eines Stimulus ermittelt, bei dem ausgehend von einer konstanten Hintergrundbeleuchtung eine stufenweise Veränderung der Lichtintensität erfolgte (als Kontrastschritt bezeichnet). Die Aktionspotentiale der Ganglienzellen wurden abgeleitet und ihre funktionelle Einteilung in ON und OFF bei der anschließenden Analyse berücksichtigt. Ob eine Ganglienzelle den jeweiligen Kontrastschritt detektieren konnte, wurde aus der Anzahl der Aktionspotentiale und ihrem zeitlichen Auftreten in Bezug zum Stimulus ermittelt. Dazu verglich ein für das Experiment konzipiertes Programm in MatLab die Feuerrate vor und während eines Kontrastschritts miteinander. Registrierte die Ganglienzelle die Kontraständerung, sollte dies idealerweise mit einer deutlichen Veränderung der Feuerrate einhergehen. Der Kontrastwert, bei dem die Detektionswahrscheinlichkeit der Ganglienzelle bei 80% lag, wurde als ihre Kontrastschwelle definiert.

Insgesamt wurden 92 ON- und 123 OFF-Ganglienzellen von 17 Retinae zehn verschiedener Mäuse abgeleitet und ihre individuellen Kontrastschwellen berechnet, wie beispielhaft an einer Ganglienzelle im Methodenteil erklärt wurde. Im Folgenden werden die gesamten Daten aller Experimente zur Ermittlung der Kontrastsensitivität der Netzhaut präsentiert. Die Kontrastschwellen der Ganglienzellen von Ivabradin- und den Kontrollgruppen werden gegenübergestellt. Zur Veranschaulichung wird derselbe Datensatz in verschiedenen Graphiken dargestellt und anschließend mit mehreren Tests statistisch überprüft, um signifikante Veränderungen der Kontrastschwellen in den Ivabradin- sowie Unterschiede zu den Kontrollgruppen zu bestätigen.

4.1.1 Streudiagramme

Die berechneten Kontrastschwellen sind in Streudiagrammen zusammengefasst (Abbildung 24), in denen jeder Punkt eine Ganglienzelle repräsentiert. Die Lage des Punktes innerhalb des Koordinatensystems visualisiert die Veränderung ihrer Kontrastschwellen im Verlauf der Testreihen: Die x-Achse gibt dabei stets den Ausgangswert vor dem Einspülen der Ivabradin-haltigen Pufferlösung, die y-Achse die Kontrastschwelle derselben Ganglienzelle in einer der nachfolgenden Testreihen wieder. So lässt sich anhand der Lage des Punktes im Koordinatensystem ablesen, wie sich die Kontrastschwellen im Vergleich zur ersten Testreihe verändert haben. Dies ist beispielhaft anhand einer ON-Ganglienzelle in Abbildung 22 dargestellt. Ob sich die Kontrastschwelle einer Ganglienzelle von der ersten Testreihe zu einer folgenden Testreihe verändert hat, wird aus der Lage des Punktes zur Winkelhalbierenden des Koordinatensystems ersichtlich. Befindet sich ein Punkt direkt auf oder sehr nah an der Diagonalen, dann besteht kein bzw. kaum ein Unterschied der Kontrastschwelle in der gemessenen Testreihe im Vergleich zum Ausgangswert (Wert der ersten Testreihe, vor Ivabradin). Ein Punkt, der deutlich ober- oder unterhalb der Diagonalen liegt, zeigt eine im Vergleich zum Ausgangswert veränderte Kontrastschwelle an, sie ist dann entsprechend gestiegen bzw. abgesunken. Dabei verhält sich die Kontrastschwelle umgekehrt proportional zur Kontrastsensitivität der Ganglienzelle, d. h. eine hohe Kontrastschwelle ist gleichzusetzen mit einer niedrigen Kontrastsensitivität und *vice versa*.

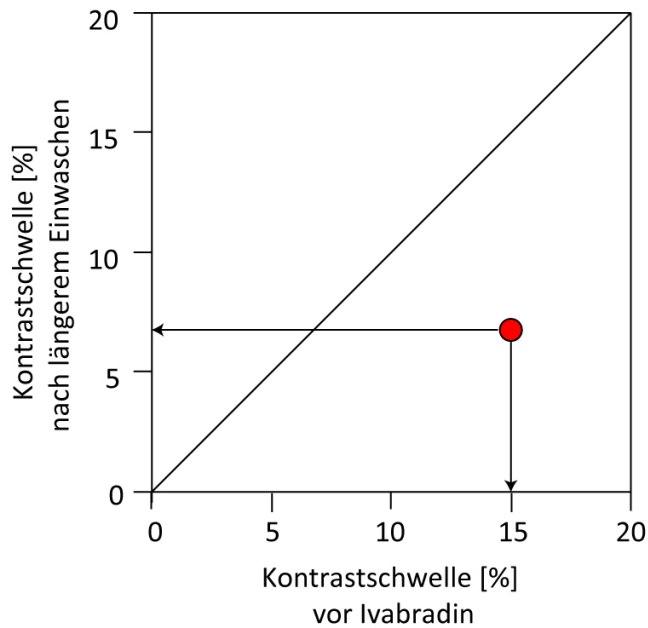


Abbildung 22 Darstellung der Veränderung der Kontrastschwellen einer ON-Ganglienzelle vor Ivabradin und nach längerem Einwaschen

Die Ganglienzelle hat vor dem Einwaschen von Ivabradin (x-Achse) eine Kontrastschwelle von etwa 15%. Nach längerem Einwaschen beträgt die Schwelle nur noch etwa 7%. Ivabradin hat zu einer Absenkung der Kontrastschwelle geführt, wie sich an dem unterhalb der Diagonalen liegenden Punkt zeigt.

In den Streudiagrammen der Ivabradin-Gruppen (Abbildung 23) liegt die Punktwolke tendenziell unterhalb der Diagonalen, sodass nach Einspülen der Ivabradinlösung eine systematische Veränderung der Kontrastschwellen zu niedrigeren Werten eingetreten ist. Dies bedeutet, dass die Ganglienzellen geringere Kontraste detektieren können (d. h. die Sensitivität der Zellen ist unter Ivabradin gestiegen). Dieser Befund ist in der Gruppe der ON-Ganglienzellen deutlicher zu sehen, hier ist der Effekt bereits kurz nach dem Einwaschen des HCN-Kanalblockers erkennbar („kurz nach Einwaschen“). Am stärksten ausgeprägt ist der Effekt nach längerem Einwirken der Substanz („längeres Einwaschen“). Dies ist nicht verwunderlich, da Ivabradin an der intrazellulär befindlichen Seite des HCN-Kanals bindet (Kapitel 2.3.2) und daher erst nach Aktivierung und Öffnung der HCN-Kanäle in das Zellinnere diffundieren und seine Wirkung entfalten kann. Diese im Englischen als *use-dependency* bezeichnete Eigenschaft von Ivabradin bedingt seine gesteigerte Wirksamkeit nach vorangegangener Lichtstimulation der Netzhautzellen (Bucchi et al. 2006). Für die weitere Auswertung des Ivabradineffektes ist daher insbesondere die dritte Testreihe („längeres Einwaschen“) ausschlaggebend, in der die Substanz seine inhibitorische Wirkung auf die HCN-Kanäle der Ganglienzellen entwickeln konnte.

Nach dem Ausspülen des Blockers („kurz nach Ausspülen“ und „nach längerem Ausspülen“) sind die Kontrastschwellen zwar weiterhin etwas niedriger als vor Ivabradineinwirkung, jedoch nähern sie sich wieder der Diagonalen an, was für die in der Literatur erwähnte Teilreversibilität der HCN-Kanal-Inhibition spricht (Della Santina et al. 2010; Demontis et al. 2009).

Auch in der Gruppe der OFF-Ganglienzellen sinken die Kontrastschwellen unter Ivabradineinfluss ab. Die Wirkung des HCN-Kanalblockers ist in den Streudiagrammen allerdings weniger ausgeprägt als bei den ON-Ganglienzellen. Dies könnte daran liegen, dass die OFF-Ganglienzellen generell eine höhere Kontrastsensitivität besitzen, wie sich anhand der insgesamt niedrigeren Kontrastschwellen sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe zeigt. Eine weitere Steigerung der Sensitivität durch Ivabradin ist daher schwieriger zu bewirken bzw. zu messen. Im weiteren Verlauf, nach Ausspülen der Substanz, verhalten sich die Kontrastschwellen ähnlich wie bei den ON-Ganglienzellen und steigen wieder an.

Um das Ausmaß der Veränderung über die Testreihen beurteilen zu können und einen tatsächlichen Ivabradineffekt nachzuweisen, sind die Daten der Ivabradinexperimente denen der Kontrollexperimente in separaten Streudiagrammen gegenübergestellt. In den Kontrollgruppen liegen die Kontrastschwellen über alle Testreihen hinweg dicht an der Diagonalen. Dies bedeutet, dass die Kontrastschwellen der Kontrollgruppen im Laufe der Testreihen stabil bleiben. Dennoch zeigt sich im Verlauf eine leichte, sukzessive Verschiebung der Punktwolken zu tendenziell niedrigeren Werten, was auch hier für eine dezente Zunahme der Kontrastsensitivität spräche. Diese Veränderung ist im Vergleich zu den Ivabradin-Gruppen allerdings wesentlich schwächer ausgeprägt und nicht systematisch, da einige Ganglienzellen in den Kontrollgruppen auch höhere Kontrastschwellen annehmen. Der Befund ließe sich mit den Stoffwechselprozessen der Photorezeptoren erklären: Zur Aufrechterhaltung der Phototransduktion muss das Sehpigment erneuert werden, das durch die eintreffenden Photonen in seiner Konformation verändert und inaktiv wird. Die Reaktivierung findet im Pigmentepithel statt, verläuft allerdings bei länger andauernder Beleuchtung weniger effizient. Als Folge verändert sich die Sensitivität der Photorezeptoren - man spricht von deren Ausbleichen (Baumann 1972). Dieser physiologische Prozess beeinflusst die Kontrastschwellen der Ganglienzellen jedoch nur geringfügig und hat keine negativen Folgen für die Aussagekraft des Experiments, wie sich auch in der statistischen Auswertung zeigt.

Die in den Streudiagrammen beobachteten Veränderungen der Kontrastschwellen von ON- und OFF-Ganglienzellen unter Ivabradineinfluss konnten durch statistische Überprüfung als signifikant bestätigt werden. Sowohl die Abnahme der Kontrastschwellen innerhalb der Ivabradin-Gruppen als auch ihr Vergleich mit den Kontrollgruppen liefern in der ANOVA einen p-Wert von $<0,01$. Dies legt nahe, dass Ivabradin tatsächlich eine Änderung der Kontrastschwellen hervorgerufen hat.

Die Varianzanalyse kann nicht ermitteln, in welcher der Testreihen der signifikante Unterschied besteht. Daher wurden die Testreihen aus den Ivabradin-Gruppen mit denen der Kontrollgruppen einzeln verglichen, d. h. die erste Testreihe aus der Ivabradin-Gruppe der ON-Ganglienzellen mit der ersten Testreihe der Kontrollgruppe der ON-Ganglienzellen etc. Bei den ON-Ganglienzellen besteht bereits direkt nach dem Einwaschen von Ivabradin (zweite Testreihe) ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Ihre Kontrastschwellen bleiben in allen Testreihen, auch nach dem Ausspülen (fünfte Testreihe), signifikant verändert. Die erste Testreihe (vor der Zugabe von Ivabradin) zeigt hingegen keinen Unterschied zur Kontrollgruppe, folglich sind die Kontrastschwellen der ON-Ganglienzellen von Versuchs- und Kontrollgruppe zu Beginn der Experimente ähnlich und bestätigen damit den Ivabradineinfluss als Ursache für die Veränderungen in der Ivabradin-Gruppe.

Auch in der Gruppe der OFF-Ganglienzellen ist ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe in der dritten Testreihe nachweisbar. Im Gegensatz zu den ON-Ganglienzellen besteht nach längerem Ausspülen (fünfte Testreihe) kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrollgruppe ($p = 0,1$). Dies spricht für eine Teilreversibilität des Ivabradineffekts bei den OFF-Ganglienzellen, wie sie bereits in den Streudiagrammen beobachtet wurde.

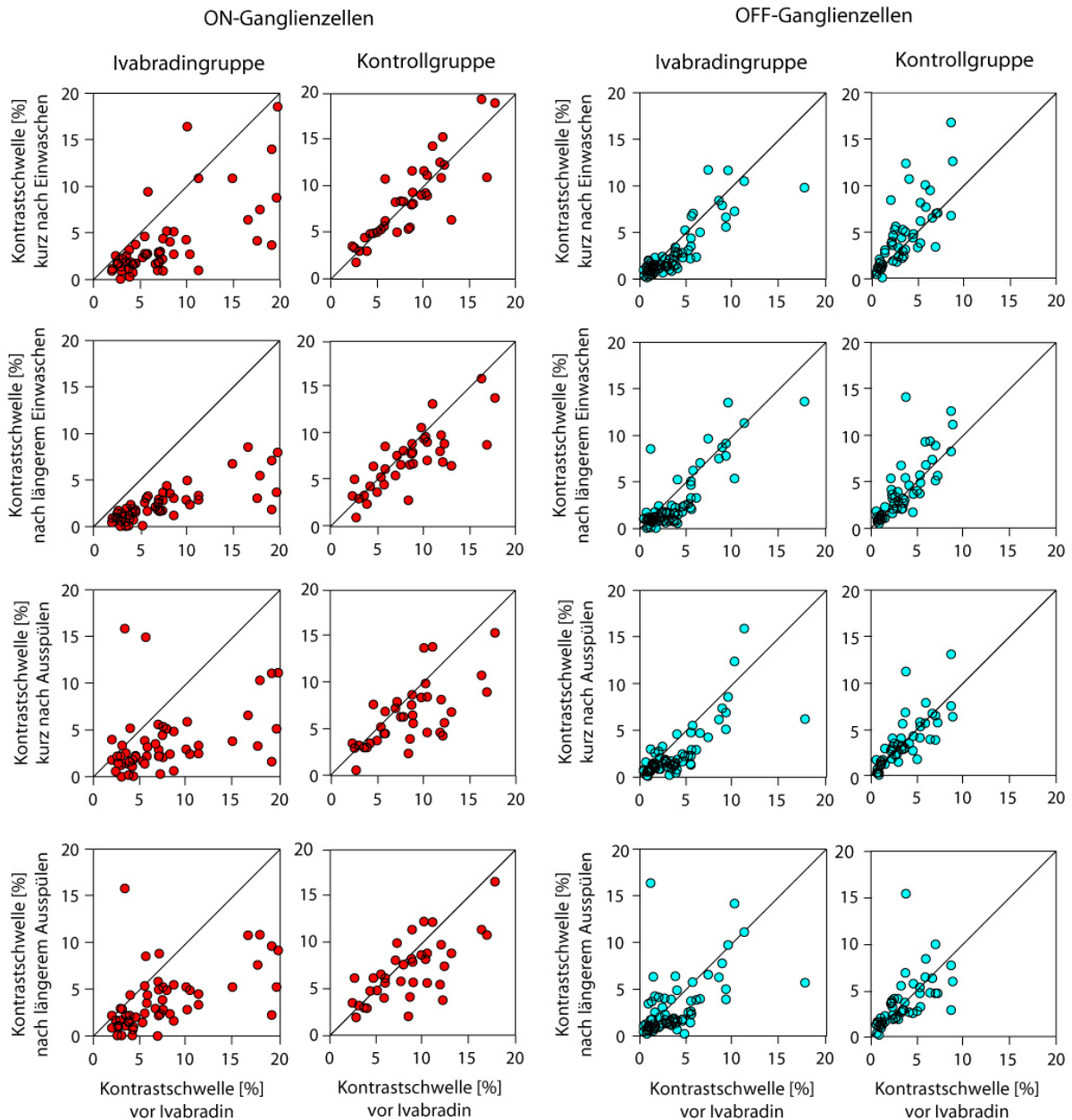


Abbildung 23 Streudiagramme zur Darstellung der Kontrastschwellen der Ganglienzellen

Dargestellt sind die Kontrastschwellen (als Abweichung von der Hintergrundbeleuchtung in %, jeweils von 0-20%) der ON- und OFF-Ganglienzellen sowohl der Ivabradin- als auch der Kontrollgruppen über die verschiedenen Testreihen. Die Daten aus den Testreihen zwei bis fünf (y-Achse) werden mit der ersten Testreihe vor Ivabradineinfluss (x-Achse) in Zusammenhang gebracht: Jeder Punkt repräsentiert die Kontrastschwellen einer Ganglienzelle in der jeweiligen Testreihe, verglichen mit der ersten Messung. Die Punkteverteilung in den Diagrammen ergibt eine Punktwolke, deren Form und Lage zur Diagonale die Veränderung der Kontrastschwellen visualisiert. In der Kontrollgruppe verteilen sich die Punkte nah um die Diagonale, somit verändern sich die Kontrastschwellen der Kontrollgruppe kaum. Erst in den späteren Testreihen ist eine leichte Abweichung der Punkte von der Diagonalen zu sehen, die mit der zeitbedingten Abschwächung der Zellen zu erklären ist (Erläuterung siehe Text). In den Ivabradin-Experimenten ist hingegen eine stärkere Veränderung der Kontrastschwellen zu sehen. Insbesondere bei den ON-Ganglienzellen ist eine eindeutige Tendenz der Punkte darstellbar, die fast alle unterhalb der Diagonalen liegen. Dies ist vor allem in der zweiten Testreihe („nach längerem Einwaschen“) sichtbar, hier liegt die Punktwolke deutlich unterhalb der Diagonalen, d. h. die Kontrastschwellen nehmen ab (die Ganglienzellen werden sensitiver). In der Gruppe der OFF-Ganglienzellen ist der Ivabradineffekt weniger gut darstellbar, da ihre Kontrastschwellen bereits ohne Ivabradineinfluss niedrig sind. Die Kontrastschwellen liegen unter Ivabradineinfluss insgesamt näher an der Diagonalen und sinken weniger stark ab. Dennoch ist im Vergleich zu der Kontrollgruppe ein Effekt von Ivabradin auch bei den OFF-Ganglienzellen festzustellen.

4.1.2 Boxplots

Um die Veränderung der Kontrastschwellen in den fünf Testreihen auf andere Weise graphisch zu beurteilen, wird der Datensatz in Boxplots dargestellt. Aus den Boxplots gehen die Verteilung, der Median, das Minimum und Maximum sowie die Streuung des Datensatzes hervor. Die Box (Rechteck) umfasst den Bereich, in dem 50% der Daten liegen und wird von dem oberen und unteren Quartil begrenzt (25% und 75% der Daten). Die Länge der Box entspricht dem Interquartilsabstand (ein Maß für die Streuung). Der Median ist als ein kleines Rechteck innerhalb der Box eingezeichnet. Das Minimum und Maximum der Kontrastschwellen werden jeweils durch die Länge der Antennen (Striche) angegeben, dabei wurden die extremsten Werte (die kleinsten und größten fünf Prozent aller Werte) der Übersicht halber nicht dargestellt. Zur besseren Veranschaulichung wird derselbe Datensatz in drei Boxplots dargestellt:

- Der erste Boxplot (Abbildung 24) fasst die Daten der einzelnen Testreihen zusammen, um eine Veränderung im Verlauf der Aufnahmen zu untersuchen.
- Der zweite Boxplot (Abbildung 25) zeigt die Kontrastschwellen der Ganglienzellen, die von den einzelnen Versuchstieren abgeleitet wurden und verdeutlicht die individuellen Schwankungen des Ivabradineffekts, die durch Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren sein könnte.
- Der dritte Boxplot (Abbildung 26) stellt die prozentuale Veränderung der Kontrastschwellen zwischen der ersten und dritten Testreihe im Vergleich zur Kontrollgruppe dar, um das Ausmaß der Veränderung durch Ivabradin zu veranschaulichen.

Der erste Boxplot (Abbildung 24) fasst die Kontrastschwellen der einzelnen Testreihen in jeweils einem Boxplot zusammen. Hier wird der Effekt von Ivabradin sowohl bei den ON- als auch bei den OFF-Ganglienzellen als deutliche Absenkung der Kontrastschwelle sichtbar, insbesondere nach längerer Einwirkzeit der Substanz (Testreihe 3). Die Signifikanz dieser Unterschiede wurde mithilfe des t-Tests ermittelt und ist mit einem Sternchen (*) oberhalb des Boxplots markiert. Nach Ausspülen des HCN-Kanalblockers steigen die Kontrastschwellen wieder sukzessive an, erreichen jedoch nicht ihren Ausgangswert. Im Vergleich dazu schwanken die Kontrastschwellen der Kontrollgruppen nur geringfügig, wie bereits in den Streudiagrammen sichtbar wurde. Jedoch ist auch in dieser Darstellung keine drastische oder systematische Veränderung der Werte in den Kontrollgruppen sichtbar.

Im zweiten Boxplot (Abbildung 25) werden die erhobenen Kontrastschwellen der einzelnen Tiere gezeigt, um den Ivabradineffekt auf die ON- und OFF-Ganglienzellen der einzelnen Individuen zu untersuchen. Tatsächlich ist eine leichte Variabilität in der Ivabradinwirkung auf die einzelnen Mäuse erkennbar, jedoch kann auch hier ein Absinken der Kontrastschwellen von ON- und OFF-Ganglienzellen verzeichnet werden. Nach längerem Einwirken der Substanz ist der Ivabradineffekt besonders deutlich (dritte Testreihe, orange), und in fast allen Tieren signifikant. Lediglich bei den Tieren, von denen nur wenige Zellen abgeleitet werden konnten, ist keine Signifikanz feststellbar, was wahrscheinlich durch die geringe Datenmenge bedingt ist. Im Vergleich zur ersten Ableitung (vor Ivabradineinfluss), nimmt der Interquartilsabstand (die Kastenlänge) in der dritten Testreihe (nach längerem Einwirken) deutlich ab, folglich ist die Streuung der Werte unter Ivabradin geringer als die der Ausgangswerte.

Nach dem Ausspülen der Substanz (Testreihen 4, grün, und 5, violett) ist in fast allen Versuchstieren ein leichter Anstieg der Kontrastschwellen zu verzeichnen, wie durch die Verschiebung der Boxen nach oben sichtbar wird. Auch der Interquartilsabstand nimmt wieder zu, als mögliche Teilreversibilität der HCN-Kanal-Inhibition. Auch in dieser Darstellung kommen die im Vergleich zu den ON-Ganglienzellen insgesamt niedriger liegenden Kontrastschwellen der OFF-Ganglienzellen zur Geltung.

Wie aus den Streudiagrammen und den Boxplots hervorgeht, ist der Ivabradineffekt am stärksten nach längerem Einwirken der Substanz ausgeprägt (Testreihe 3). Um das Ausmaß der Schwellwert-

Veränderung graphisch darzustellen, wird die prozentuale Veränderung der Werte vor und nach längerem Einwirken (Testreihen 1 und 3) in einem zusätzlichen Boxplot hervorgehoben (Abbildung 26). Der gesamte Boxplot der ON-Ganglienzellen in der Ivabradin-Gruppe liegt im negativen Bereich, die Box erstreckt sich zwischen -77% und -52% Veränderung. Folglich hat die HCN-Kanalblockade zu einer deutlichen Absenkung der Kontrastschwellen bei einem Großteil der ON-Ganglienzellen geführt. In der Gruppe der OFF-Ganglienzellen liegen die Kontrastschwellen nach Ivabradineinfluss ebenfalls niedriger, auch hier liegt die Box im negativen Bereich.

In den Kontrollgruppen bestätigen sich die bereits in den vorherigen Graphiken dargestellten nur geringfügigen Veränderungen. Hier liegt der Median nahe 0% Veränderung. Sowohl für die ON- als auch für die OFF-Ganglienzellen der Ivabradin-Gruppen ist die prozentuale Veränderung im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant (t-Test: $p < 0,05$, Überprüfung mittels Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,01$).

4.1.3 Zusammenfassung

Die graphische Auswertung zeigt einen deutlichen Effekt von Ivabradin auf die Kontrastsensitivität, der sowohl bei ON- als auch bei OFF-Ganglienzellen statistisch als signifikant bestätigt werden konnte. Durch die HCN-Kanalblockade werden die Kontrastschwellen zu niedrigeren Werten verschoben, demnach reagieren die Ganglienzellen sensitiver auf Kontraste und können bereits kleinere Kontrastabweichungen detektieren. Die HCN-Kanal-Inhibition ist sowohl in den ON- als auch in den OFF-Ganglienzellen nach längerem Einwirken von Ivabradin am stärksten ausgeprägt und bestätigt den in anderen Studien beobachteten verzögerten Wirkungseintritt von HCN-Kanalblockern (Bucchi et al. 2002; Cangiano et al. 2007; Demontis et al. 2009; Harris und Constanti 1995).

Ivabradin verändert die Schwellwerte für die Kontrastauflösung in der Gruppe der ON-Ganglienzellen drastischer als bei den OFF-Ganglienzellen. Letztere haben allerdings bereits vor der Zufuhr des HCN-Kanalblockers eine niedrige Kontrastschwelle, sodass möglicherweise aus diesem Grund der Effekt von Ivabradin graphisch weniger deutlich wird. Bei beiden Ganglienzelltypen steigen die Kontrastschwellen nach dem Ausspülen der Substanz wieder an. Diese Teil-reversibilität des Ivabradineffekts ist nur bei den OFF-Ganglienzellen statistisch signifikant.

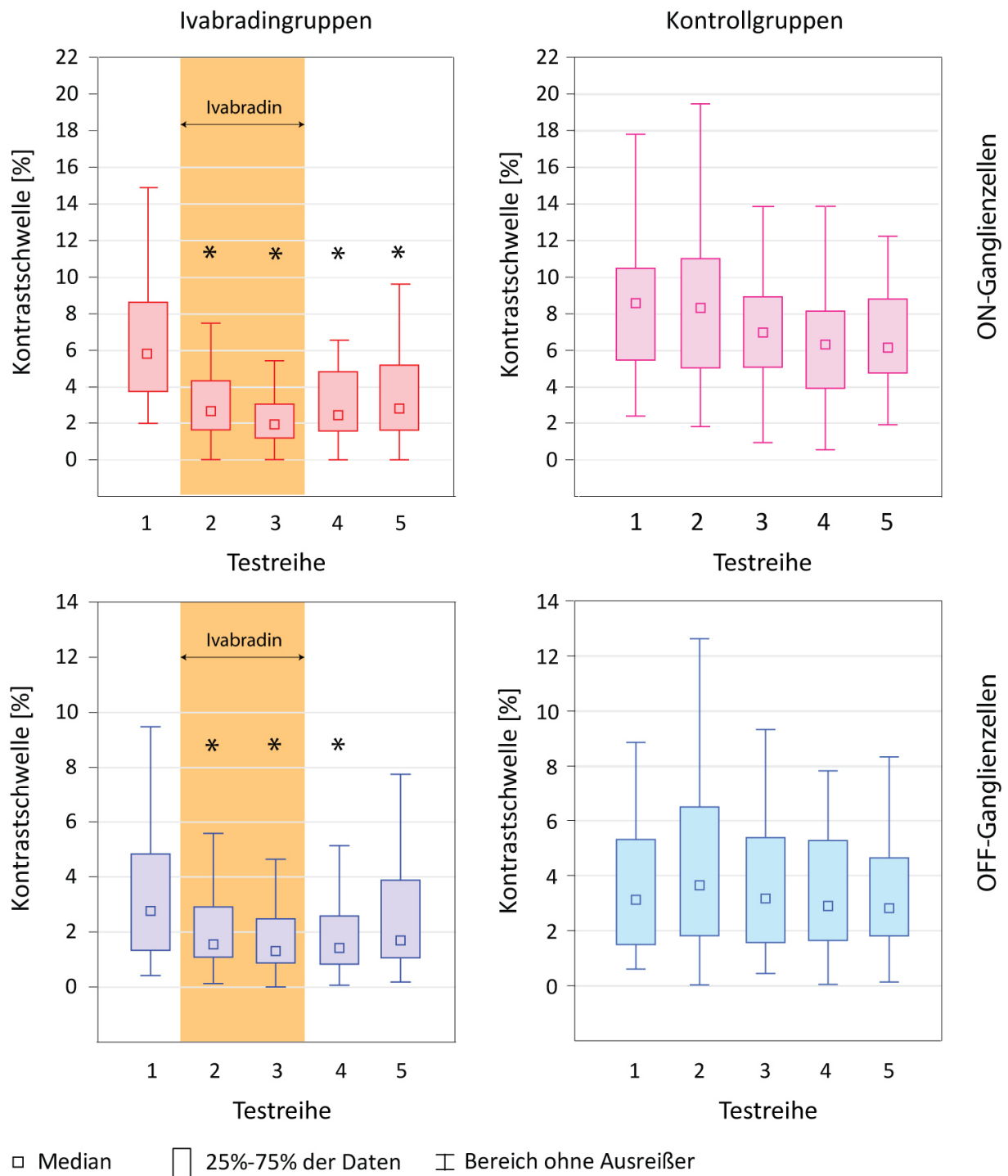
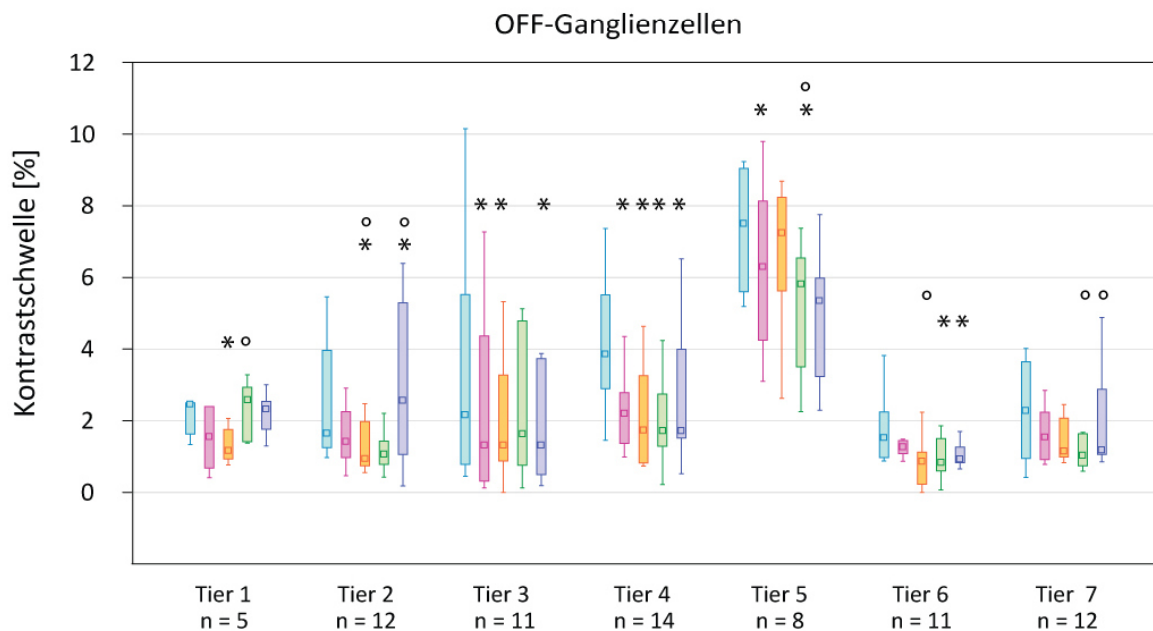
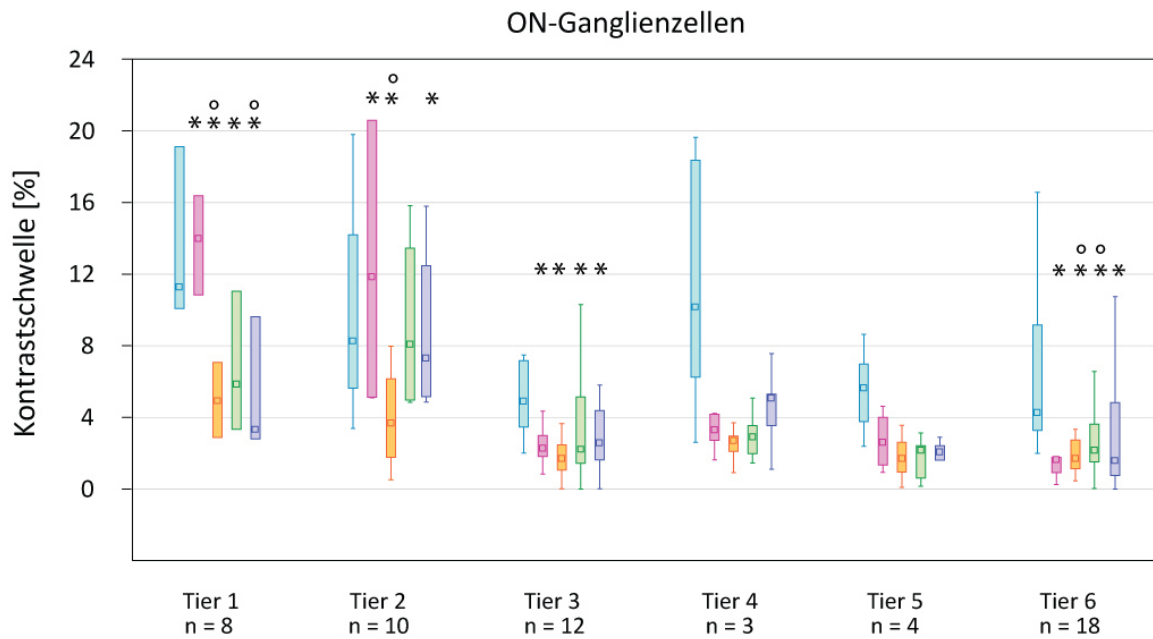


Abbildung 24 Darstellung der Kontrastschwellen aus allen Testreihen

Dargestellt sind die Werte der Kontrastschwellen (x-Achse), aller abgeleiteten ON- und OFF-Ganglienzellen von Ivabradin- und Kontrollgruppen. Die orange Hinterlegung der Boxplots hebt die Testreihen hervor, die unter Ivabradineinfluss abgeleitet wurden. Der Median ist durch ein kleines Kästchen innerhalb der Box angegeben, die die Werte zwischen 25%-75% umfasst. Die Antennen begrenzen Minimum und Maximum unter Ausschluss von extremsten Werten (siehe Text zur weiteren Erläuterung). * kennzeichnet den signifikanten Unterschied der jeweiligen Testreihe zwischen Ivabradin- und Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Für die statistische Auswertung wurde der t-Test eingesetzt. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der Boxplots von ON- und OFF-Ganglienzellen: die Kontrastschwellen der OFF-Ganglienzellen liegen niedriger als die der ON-Ganglienzellen.



Testreihen:

- vor Ivabradin ■ nach Einwaschen ■ während Ivabradin ■ nach Auswaschen ■ längeres Auswaschen

Abbildung 25 Darstellung der Kontrastschwellen der einzelnen Versuchstiere

Dargestellt sind die Kontrastschwellen (y-Achse), die aus verschiedenen Mäuse-Retinae (x-Achse) erhoben wurden. Aus Tier 7 konnten nur OFF-Ganglienzellen abgeleitet werden. Die Daten der Testreihen 2 (magenta) und 3 (orange) wurden unter Einwirkung von Ivabradin erhoben. Ein Sternchen (*) über den Boxplots weist auf einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zur ersten Testreihe (vor Ivabradineinfluss) hin; ein Kreis (°) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu der vorherigen Testreihe ($p < 0,05$). Für die statistische Auswertung wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Test eingesetzt, da er für die an den einzelnen Mäusen erhobenen Datenmengen am besten geeignet ist.

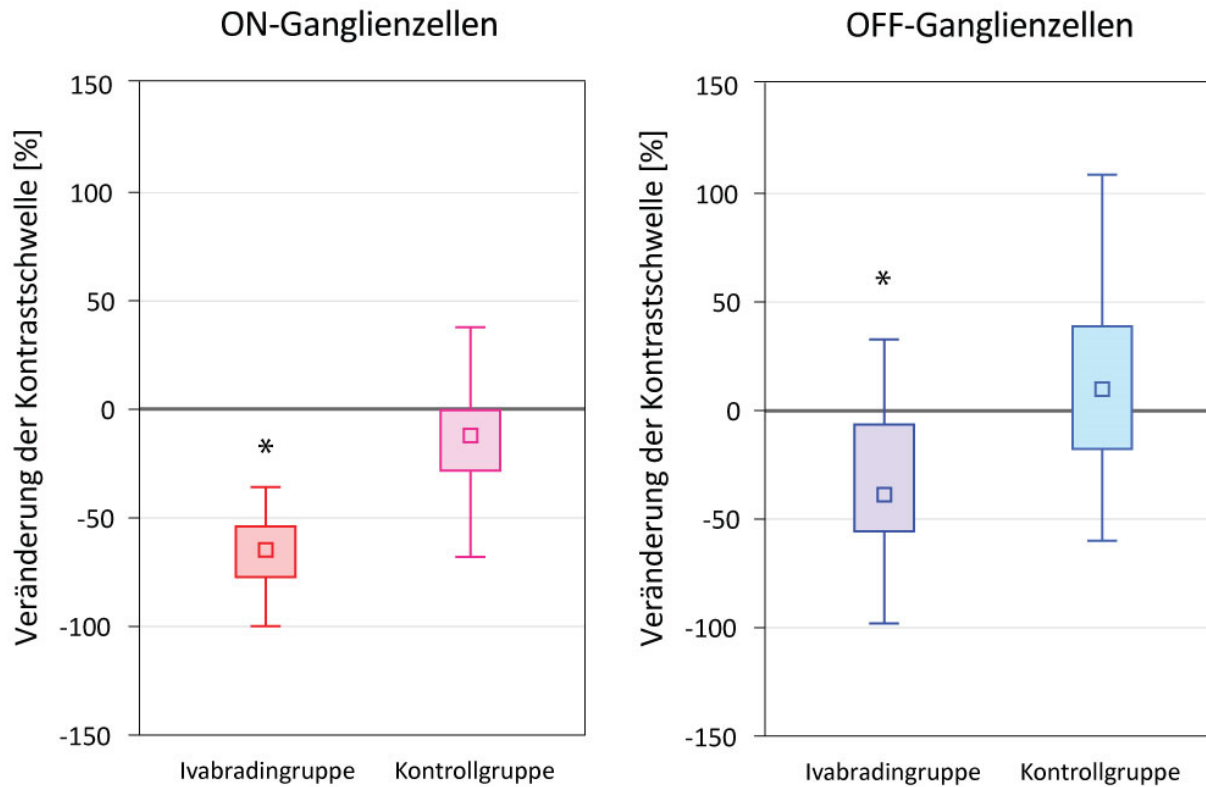


Abbildung 26 *Prozentuale Veränderung der Kontrastschwellen vor und nach Ivabradin-Einwirkung*

Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der Kontrastschwelle (y-Achse) von der ersten Testreihe (ohne Ivabradin) zur dritten Testreihe (nach längerer Einwirkzeit des Blockers). Ein Sternchen (*) weist auf einen signifikanten Unterschied zwischen Ivabradin- und Kontrollgruppe hin, angewendet wurden t-Test ($p < 0,05$) und Mann-Whitney-U-Test ($p < 0,01$). Näheres siehe Text.

4.2 Frequenzauflösung

In dem zweiten Teil der Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwiefern sich die Frequenzauflösung der Netzhaut durch Inhibition der HCN-Kanäle mit Ivabradin beeinflussen lässt. Die Frequenzauflösung definiert sich über die Frequenzschwelle, bis zu der eine Ganglienzelle schnell wechselnde Lichtimpulse noch als einzelne Lichtreize registriert. Je höher die Frequenzschwelle einer Ganglienzelle liegt, desto höher ist demnach ihre Frequenzauflösung. Zur Stimulation der Netzhaut mit verschiedenen Frequenzen wurde ein Stimulus eingesetzt, der aus sinusoidal modulierter Beleuchtung mit Frequenzen von 1 Hz bis 12 Hz bestand, d. h. kontinuierliche Hell-Dunkel-Wechsel der Lichtintensität. Diese Art von Stimulus ist in der Sinnesphysiologie des Sehsystems geläufig und beruht auf der Beobachtung, dass Ganglienzellen auf die Lichtintensitätsänderungen phasensynchron mit Aktionspotentialen reagieren (Lachaux et al. 1999). Das bedeutet, dass das Maximum ihrer Feuerrate immer in eine bestimmte Stimulusphase fällt, weshalb die Beziehung zwischen Feuerrate und Stimulus auch als Phasenkopplung bezeichnet wird. Die Stärke der Phasenkopplung an den Stimulus wird durch den Synchronisations-Index beschrieben, der für jede der zwölf Frequenzen berechnet wurde. Die maximale Frequenz, bis zu der die Ganglienzelle noch phasengekoppelt ihre Aktionspotentiale generiert, wurde als ihre individuelle Frequenzschwelle definiert (Kapitel 3.5.2.2). Durch die Ableitung der Ganglienzellen vor, während und nach Ivabradineinfluss wurde untersucht, wie sich der HCN-Kanalblocker auf die Frequenzschwelle der Ganglienzellen (d. h. auf ihre Frequenzauflösung) auswirkt.

Für die Untersuchung der Frequenzauflösung wurden 61 ON-Ganglienzellen und 88 OFF-Ganglienzellen von elf Retinae zehn verschiedener Versuchstiere erhoben. Die Daten werden im

Folgenden, analog dem Versuchsansatz zur Untersuchung der Kontrastsensitivität, in Streudiagrammen und Boxplots dargestellt und statistisch geprüft.

4.2.1 Auswertung des Periodenhistogramms

Im Kapitel 3.5.2 wurden die einzelnen Schritte zur Analyse der Frequenzauflösung anhand einer Beispielzelle beschrieben und die abgeleiteten Aktionspotentiale der ersten Testreihe als Periodenhistogramm (Abbildung 19) graphisch dargestellt. Diese Analyse wurde auch mit den anschließenden vier Testreihen durchgeführt, um die Reaktion der Ganglienzelle im Verlauf der Ableitungen unter und nach Ivabradineinfluss zu beurteilen. In der Abbildung 27 sind die Antworten der Beispielzelle aus den Ableitungen vor, nach längerem Einwirken und nach Ausspülen von Ivabradinhaltiger Pufferlösung in einem Periodenhistogramm gezeigt. Diese drei Ableitungen haben, wie bereits zuvor erläutert, für die Analyse des Ivabradineffekts die größte Aussagekraft, weshalb der Übersicht halber nicht alle fünf Ableitungen dargestellt werden.

Im Periodenhistogramm (Abbildung 27) werden zwei Effekte durch Ivabradin sichtbar, die je nach Frequenz des Stimulus mehr oder weniger stark ausgeprägt sind: Einerseits treten die Maxima der Feuerraten nach Kontakt mit Ivabradin verzögert ein, andererseits verändert sich auch die absolute Anzahl der Aktionspotentiale (d. h. die Maxima sind unterschiedlich ausgeprägt). Diese beiden Aspekte sind in dem Beispiel besonders gut bei einer Frequenz von 8 Hz sichtbar: die Maxima der Feuerrate der drei Ableitungen (vor, nach längerer Einwirkzeit und nach Ausspülen der Substanz) verschieben sich entlang der x-Achse, d. h. jeweils in eine andere Phase des Stimulus. Ivabradin verzögert demnach die Reaktion der OFF-Ganglienzelle auf den sinusoidalen Stimulus. Gleichzeitig wird auch deutlich, dass die Maxima der Feuerrate nach Zugabe von Ivabradin sukzessive niedriger werden. Selbst nach dem Ausspülen des Blockers (grüne Kurve) nehmen die Aktionspotentiale bei 8 Hz ab. Die Inhibition der HCN-Kanäle scheint hier einen langanhaltenden Effekt auf die OFF-Ganglienzelle auszuüben, die auch nach dem Ausspülen des HCN-Kanalblockers weiter fortbesteht.

Des Weiteren wird im Periodenhistogramm deutlich, dass die o.g. Effekte durch Ivabradin abhängig von der Stimulusfrequenz unterschiedlich stark ausgeprägt sind: Bei etwa 9 Hz nehmen die Zellantworten in allen drei Testreihen deutlich ab. Bei 10, 11 und 12 Hz werden nur noch wenige Aktionspotentiale generiert. Bei 11 und 12 Hz sind keine *Peaks* mehr vorhanden und die oben beschriebene Synchronisation der Zellantworten mit dem Stimulus geht verloren. Dies spricht für ein Überschreiten der Frequenzschwelle der Ganglienzelle.

Bei niedrigen Frequenzen wirkt sich Ivabradin hingegen weniger stark auf die Anzahl der Aktionspotentiale aus: Zwischen 3 und 7 Hz scheint die Feuerrate unter Ivabradin sogar leicht anzusteigen (die rote Kurve hat teilweise höhere Maxima als die blaue Kurve).

Da auch bei anderen Ganglienzellen eine Veränderung der Feuerrate unter Ivabradin zu beobachten war, stellte sich die Frage, inwiefern die HCN-Kanalblockade die Anzahl der Aktionspotentiale verändert. Aus diesem Grund schloss sich der hier beschriebenen Frequenzanalyse eine Analyse der Feuerraten an, auf die in Kapitel 4.3 separat eingegangen wird.

Neben Durchsicht der Periodenhistogramme wurde für jede Ganglienzelle ein Synchronizitäts-Index berechnet. Bei der Beispielganglienzelle zeigt sich unter Ivabradin eine deutliche Abnahme der Frequenzschwellen (Abbildung 28). Anders ausgedrückt nimmt die Frequenzauflösung durch Ivabradin ab und die OFF-Ganglienzelle wird weniger sensitiv für die Auflösung hoher Frequenzen.

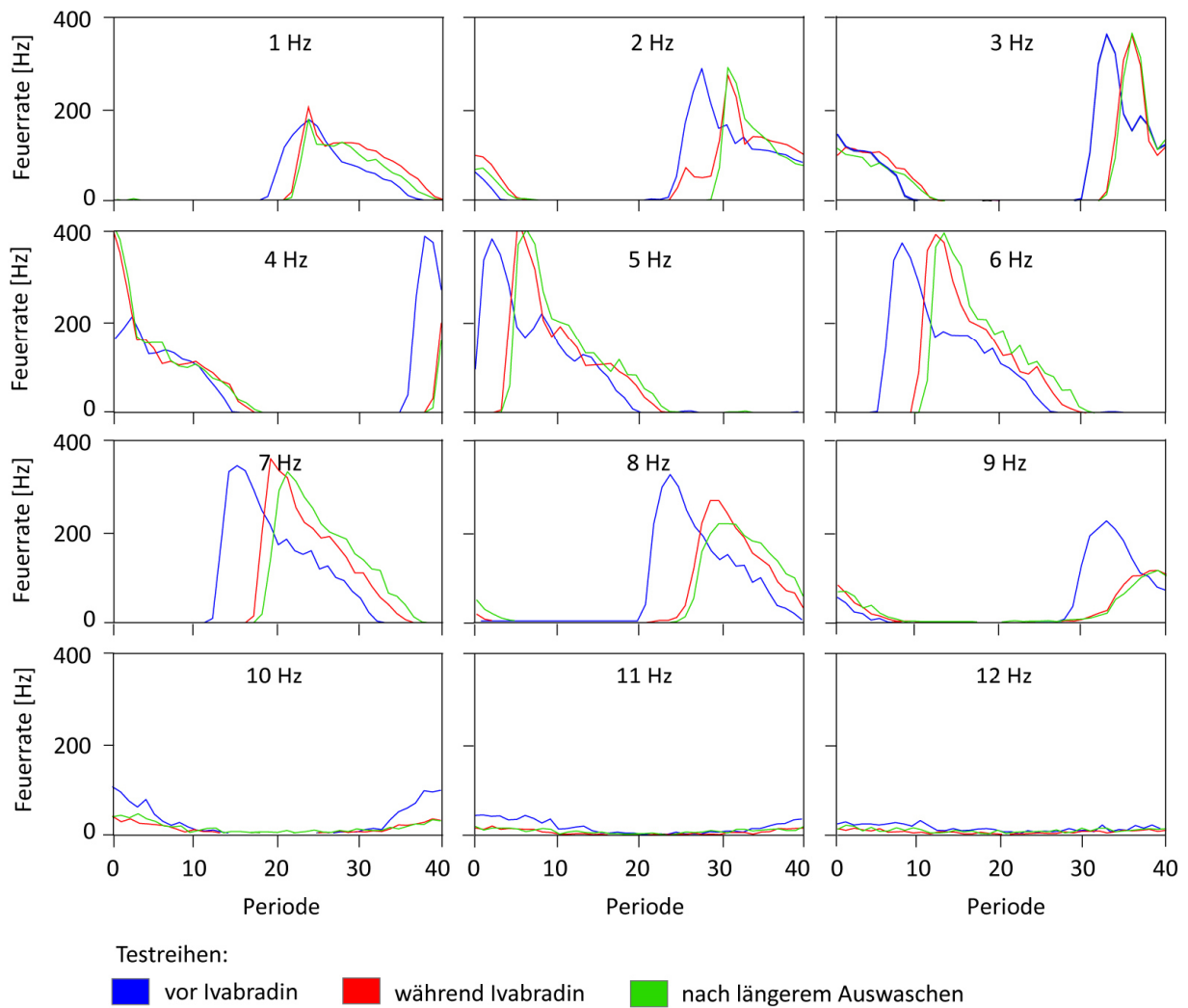


Abbildung 27 Periodenhistogramme (PH) einer OFF-Ganglienzelle für die Ableitungen vor, während und nach Ivabradin

In dieser Ansicht sind die Antworten der OFF-Ganglienzelle der drei Testreihen pro Stimulusfrequenz in jeweils einem Histogramm zusammen dargestellt. Nach längerer Einwirkzeit (rote Kurve), tritt die Zellantwort (y-Achse, Feuerrate) bereits deutlich verzögert auf, wie sich anhand der nach rechts verschobenen Maxima zeigt, die sich trotz Ausspülen der Substanz (grüne Kurve) noch verstärkt. Bei einer Stimulusfrequenz von 8 Hz fällt auf, dass die Ganglienzelle nach Einwirken des HCN-Kanalblockers deutlich weniger Aktionspotentiale generiert. Die Feuerrate nimmt bei noch höheren Frequenzen ab. Bei 11 und 12 Hz sind keine Peaks mehr eindeutig erkennbar, die OFF-Ganglienzelle generiert nur noch wenige Aktionspotentiale.

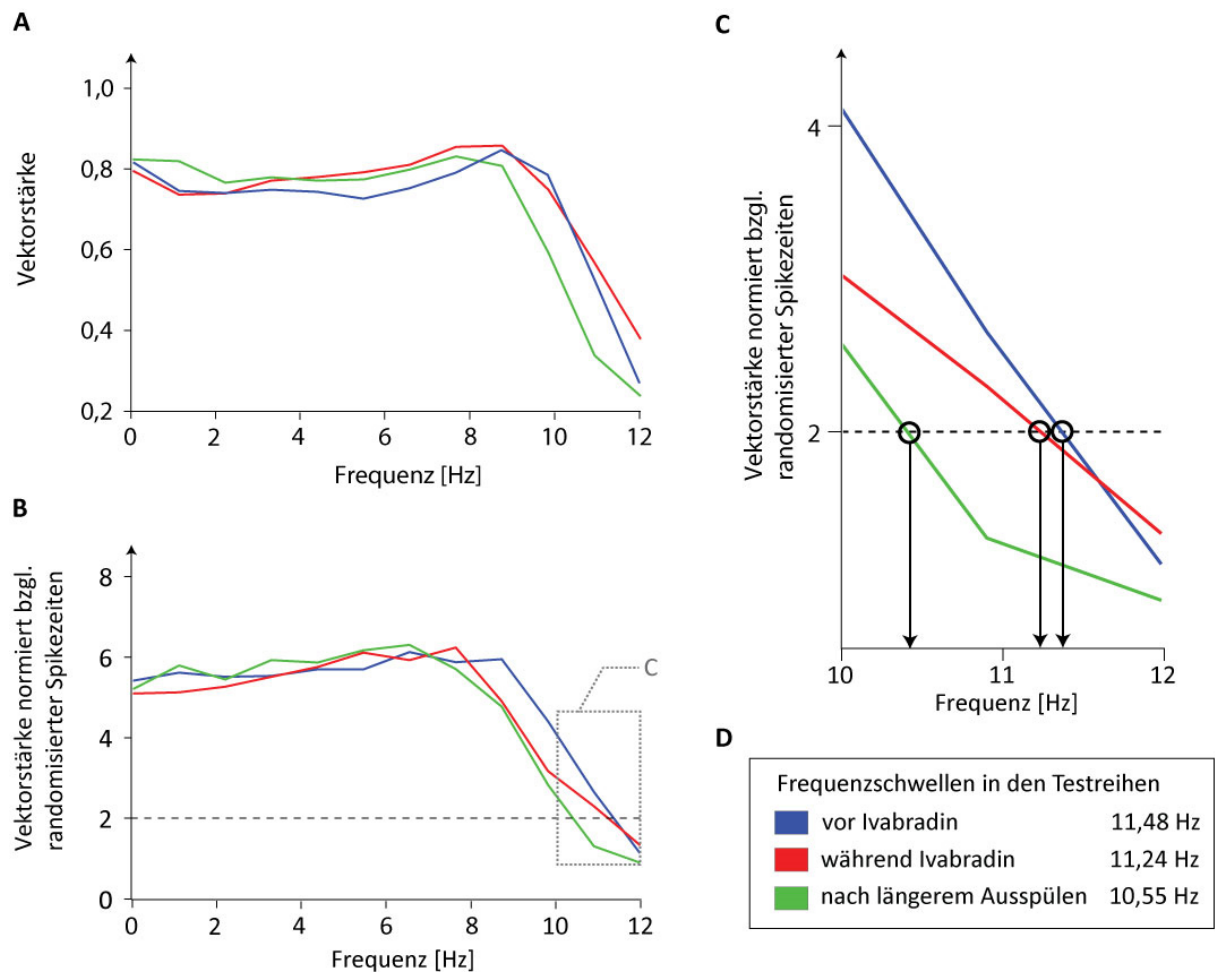


Abbildung 28 Berechnung der Frequenzschwelle

A Vektorstärke, **B** Standardabweichung der Vektorstärke und **C** Berechnung der Frequenzauflösung. Erläuterungen zur Berechnung der Frequenzschwelle siehe Kapitel 3.5.2.2 („Datenanalyse“) **D** Ermittelte Frequenzschwellenwerte für die OFF-Ganglienzelle aus **C**. Die Frequenzschwelle der Ganglienzelle nimmt in den folgenden Testreihen ab, d. h. nach längerer Einwirkzeit von Ivabradin wird die Zelle weniger sensitiv für hohe Frequenzen. Dieser Effekt hält trotz längerem Ausspülen der Substanz an, die Frequenzschwelle sinkt noch etwas mehr ab.

4.2.2 Streudiagramme

Im Folgenden werden die Frequenzschwellen der Ganglienzellen analog zum Kontrastexperiment als Streudiagramme dargestellt, um die Veränderungstendenz über die verschiedenen Testreihen zu veranschaulichen (Abbildung 29). Auch in diesen Streudiagrammen werden die Frequenzschwellen von der ersten Testreihe (ohne Ivabradin, x-Achse) zu allen weiteren Testreihen (y-Achse) in Beziehung gesetzt. In den Streudiagrammen fällt eine besonders starke Wirkung von Ivabradin auf die OFF-Ganglienzellen auf, deren Punktwolke und damit Frequenzschwellen bereits kurz nach dem Einspülen der Substanz deutlich absinken. Dies bedeutet, dass die OFF-Ganglienzellen unter der HCN-Kanalblockade nur noch den niedrigen Frequenzen folgen können. Der hier sichtbare Einfluss der HCN-Kanal-Inhibition auf die OFF-Ganglienzellen wird durch die ANOVA als statistisch signifikant bestätigt ($p < 10^{-3}$). Auch ist ein im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikanter Unterschied nachzuweisen. Eine (Teil-)Reversibilität des Ivabradineffekts im Sinne eines Anstiegs der Frequenzschwellen nach Ausspülen des Blockers ist weder graphisch noch statistisch nachzuweisen.

Die Gruppe der ON-Ganglienzellen reagiert auf Ivabradin anders als die OFF-Ganglienzellen. Die Datenpunkte liegen etwas stärker gestreut um die Diagonale, der Effekt ist jedoch nicht besonders

ausgeprägt. Einige der ON-Ganglienzellen können hohe Frequenzen besser, ein anderer Teil hohe Frequenzen schlechter detektieren. Insgesamt weicht die Streuung der ON-Ganglienzellen in der Ivabradin-Gruppe jedoch nicht signifikant von der Streuung der ON-Kontrollgruppe ab, wie sich in der Überprüfung mittels ANOVA bestätigt ($p=0,06$). Auch im direkten Vergleich der einzelnen Testreihen zwischen Ivabradin- und Kontrollgruppe ergibt die statistische Auswertung mittels t-Test nur für die fünfte Testreihe (nach Ausspülen von Ivabradin) einen signifikanten Unterschied ($p<10^{-3}$), siehe dazu auch die Darstellung als Boxplots (Abbildung 30).

Die Frequenzschwellen in den Kontrollgruppen sind sowohl bei den ON- als auch bei den OFF-Ganglienzellen stabil, und ihre Kontrastschwellen liegen in allen Testreihen relativ dicht an der Diagonalen.

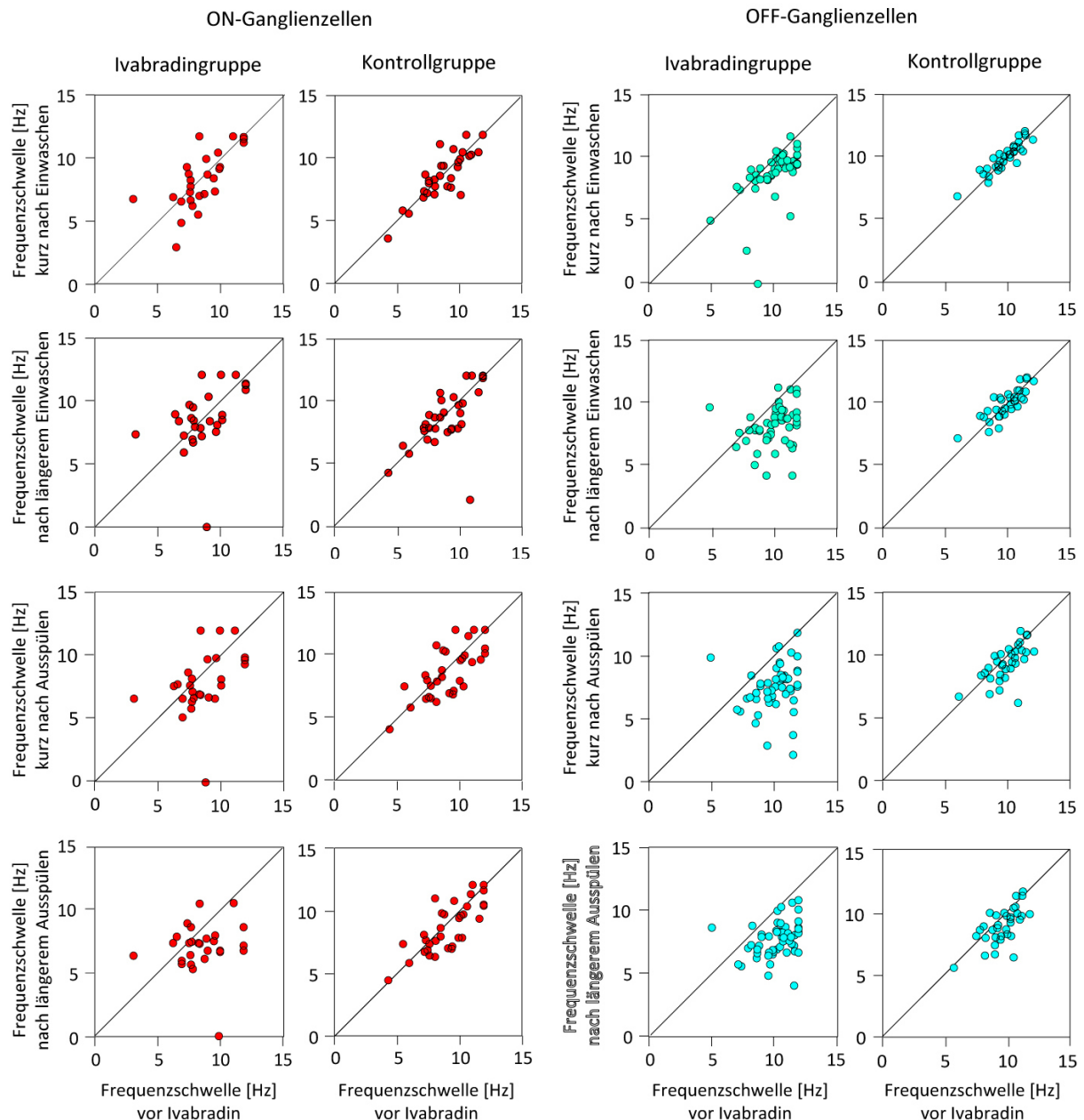


Abbildung 29 Streudiagramme zur Darstellung der Frequenzschwellen der Ganglienzellen

Die Darstellung erfolgt analog dem Kontrastexperiment (siehe Abbildung 23). In der Gruppe der ON-Ganglienzellen nimmt die Streuung der Frequenzschwellen unter Ivabradin in beide Richtungen zu, wohingegen sich die Werte der Kontrollgruppe über die Zeit weniger stark verändern. Die Frequenzschwellen der OFF-Ganglienzellen nehmen unter Ivabradin deutlich ab, nach dem Ausspülen („nach längerem Ausspülen“) zeigt sich wieder eine dezente Zunahme der Werte, sodass eine Teilreversibilität angenommen werden kann.

4.2.3 Boxplots

Die Abbildung 30 stellt die im Frequenzexperiment erhobenen Daten in Form von Boxplots dar. In der Gruppe der OFF-Ganglienzellen ist die in den Streudiagrammen (Abbildung 29) bereits beobachtete sukzessive Abnahme der Frequenzschwellen über die Testreihen ebenfalls sichtbar: Mediane, Boxen, Minima und Maxima der Boxplots verschieben sich zu geringeren Werten. Bei den ON-Ganglienzellen zeigt sich in der zweiten Testreihe (unter Ivabradineinfluss) eine Zunahme der Streuung, wobei sich die Box und das Minimum dezent in Richtung geringerer Werte ausdehnt. In der fünften Testreihe (nach Ausspülen von Ivabradin) nimmt die Streuung der Frequenzschwellen signifikant ab (t-Test: $p < 0,05$).

Die Kontrollgruppen beider Zellklassen zeigen hingegen weitestgehend stabile Frequenzschwellen im Verlauf der Testreihen. Sowohl die Streuung als auch die Mediane verändern sich nur unwesentlich. Der t-Test ergibt für die ON-Ganglienzellen der Kontrollgruppe jedoch keine signifikante Veränderung im Verlauf ($p > 0,05$). Die einzige Ausnahme hiervon bildet die letzte Testreihe (Testreihe 5), die im Vergleich zur ersten Testreihe signifikant abweicht ($p = 0,03$), was durch zeitbedingte Einflüsse auf die Zellantwort zurückgeführt werden kann. Die in der Kontrollgruppe der OFF-Ganglienzellen dezent veränderte Frequenzschwellen ließe sich ebenfalls durch den Zeitverlauf erklären.

In den einzelnen Versuchstieren (Abbildung 31) ist der Einfluss von Ivabradin variabel ausgeprägt. In der Gruppe der OFF-Ganglienzellen nimmt die Frequenzauflösung bei fast allen Mäusen ab. Lediglich bei Versuchstier 4 steigen die Frequenzschwellen in der dritten Testreihe etwas an, sinken aber anschließend ebenfalls. Diese Schwankung könnte jedoch an der geringen Anzahl an abgeleiteten OFF-Ganglienzellen des Versuchstier 4 liegen und auch der Grund für ihre fehlende statistische Signifikanz dieser Veränderungen sein. Auch bei Tier 6 konnten nur wenige OFF-Ganglienzellen abgeleitet werden und es ergibt sich ebenfalls keine statistische Signifikanz unter Ivabradin.

Die Auswirkung von Ivabradin auf die ON-Ganglienzellen manifestiert sich in den Versuchstieren eher schwach und ist auch kaum signifikant – auch hier könnte möglicherweise eine zu geringe Anzahl abgeleiteter ON-Ganglienzellen pro Versuchstier die Ursache sein. Am ehesten ist ein Effekt bei Tier 2 zu vermuten, bei dem die Frequenzschwellen nach dem Einwaschen der Substanz sinken.

In einem weiteren Boxplot (Abbildung 32) wird die prozentuale Veränderung zwischen den Testreihen 1 und 3, d. h. vor und nach Ivabradineinwirkung veranschaulicht. In den Ivabradin-Gruppen fällt auf, dass die Streuung der ON- und OFF-Ganglienzellen in beide Richtungen zunimmt. In der Gruppe der OFF-Ganglienzellen wird, wie bereits zuvor in den Streudiagrammen dokumentiert, eine tendenzielle Abnahme der Frequenzschwellen sichtbar, die im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant ist (t-Test: $p < 0,05$).

Die Mediane der Boxplots in den Kontrollgruppen liegen zwischen 0% und -10%, d. h. die Werte verändern sich im Wesentlichen kaum und streuen deutlich geringer als in den Ivabradin-Gruppen.

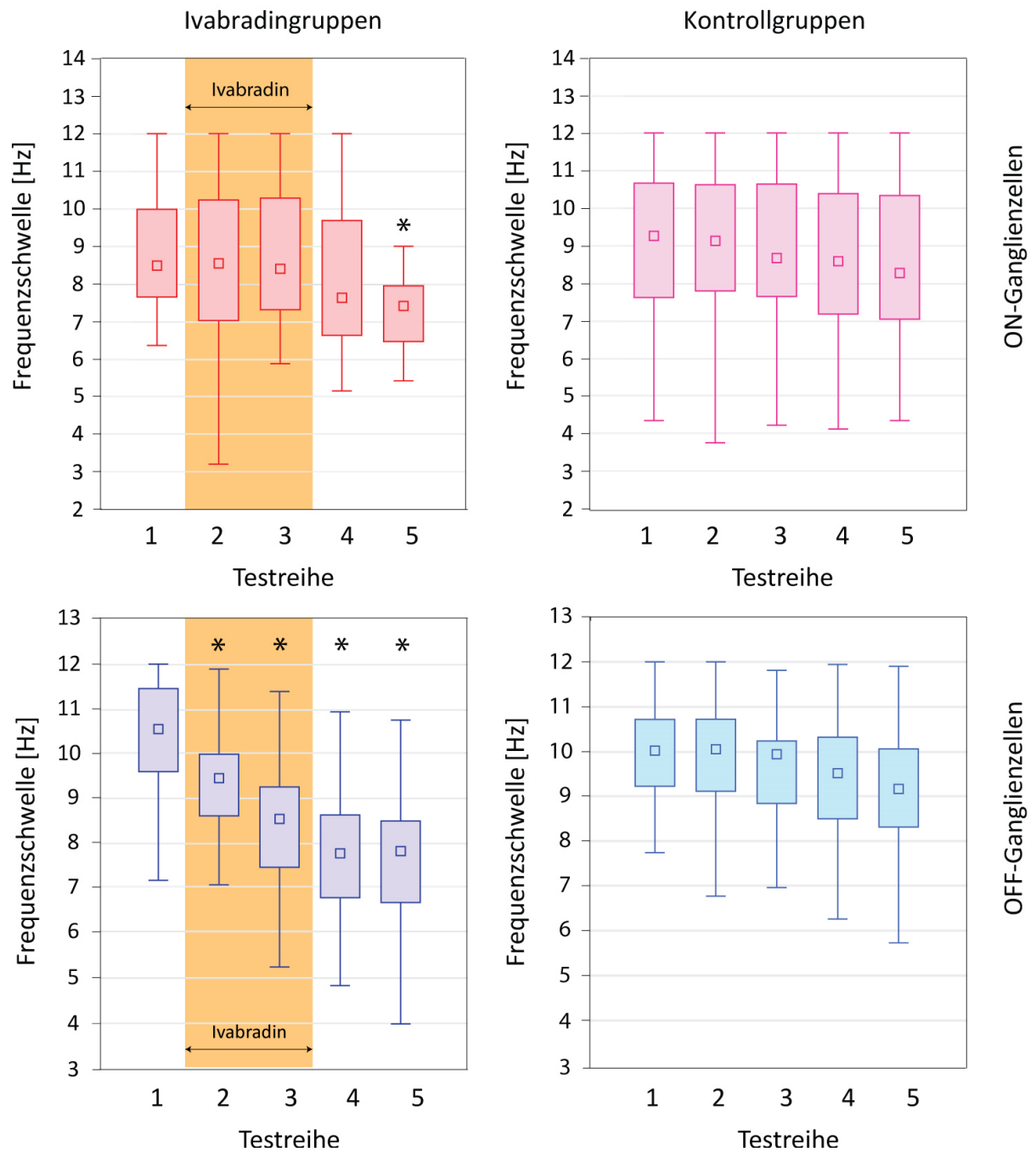
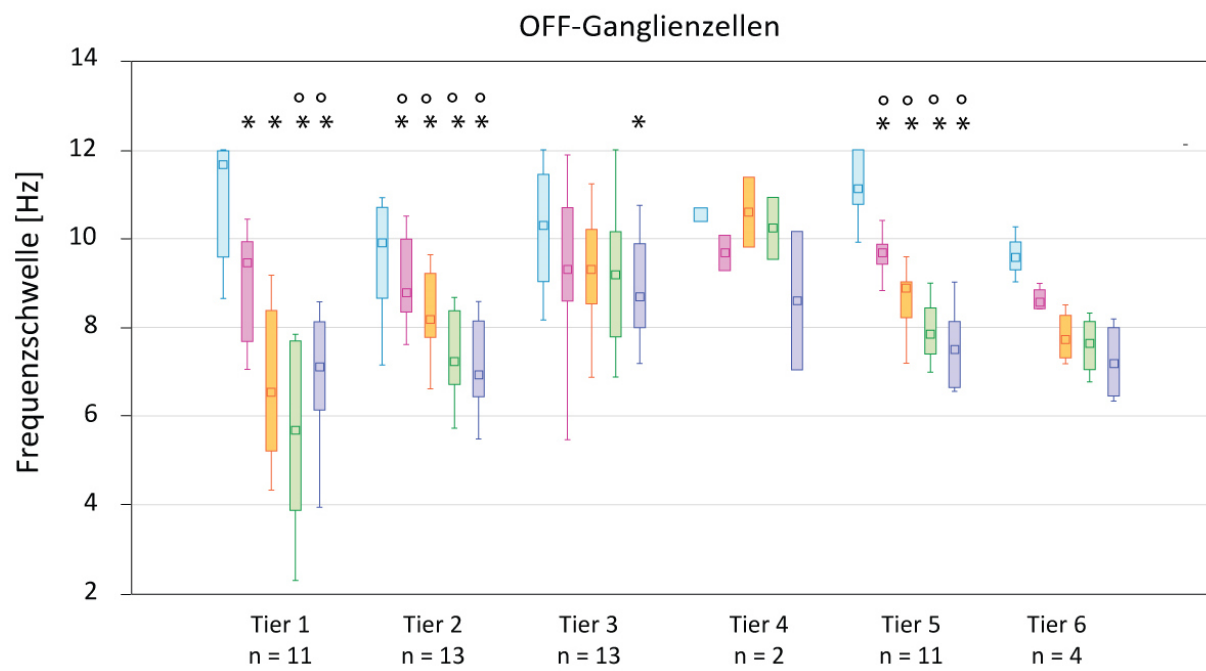
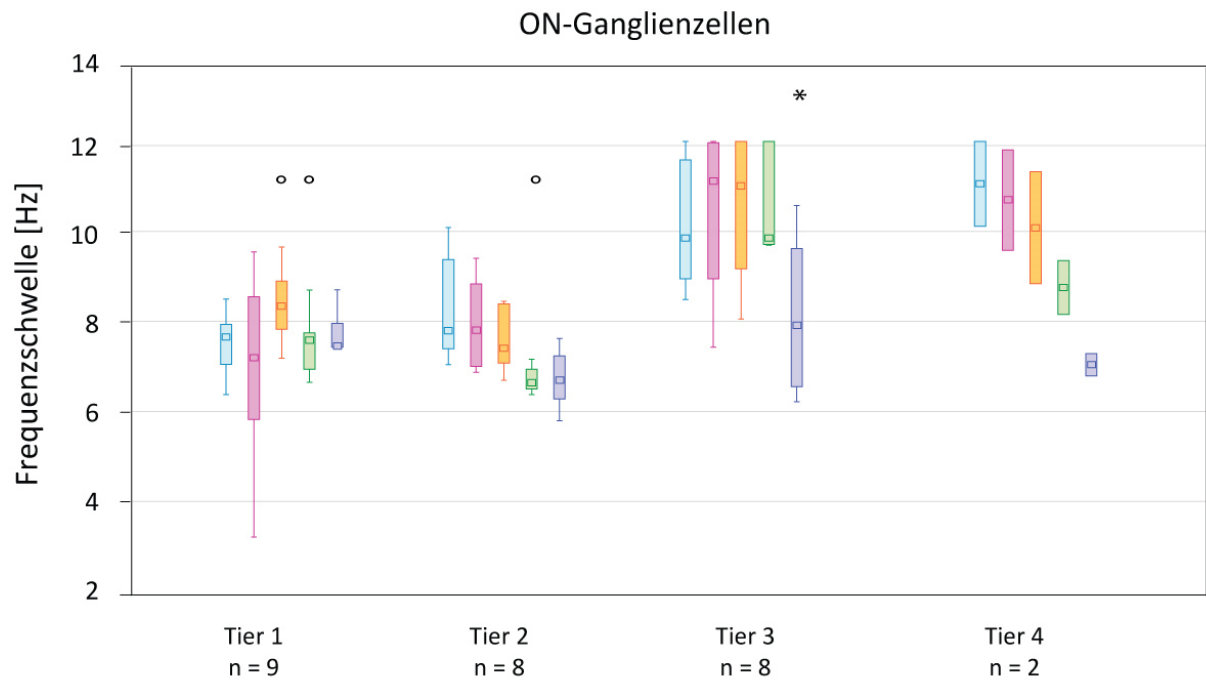


Abbildung 30 Frequenzschwellen der ON- und OFF-Ganglienzellen von Ivabradin- und Kontrollgruppen

Die Daten aus den Experimenten sind in den Boxplots zusammengefasst. Auf der y-Achse befinden sich die Testreihen, auf der x-Achse die Schwellwerte der Frequenzauflösung. * bedeutet einen signifikanten Unterschied der Testreihen zwischen Ivabradin- und Kontrollgruppe ($p < 0,05$; statistische Auswertung mittels t-Test). Bei dieser Darstellung wird deutlich, dass sich die Frequenzschwellen der OFF-Ganglienzellen unter Ivabradin signifikant von denen der Kontrollgruppe veränderten. Der Ivabradineffekt auf die ON-Ganglienzellen ist bis auf die letzte Testreihe nicht signifikant; es ist hier vor allem eine leichte Schwankung in der Streubreite der Frequenzschwellen zu sehen.



Testreihen:

- vor Ivabradin ■ nach Einwaschen ■ während Ivabradin ■ nach Ausspülen ■ längeres Ausspülen

Abbildung 31 Darstellung der Frequenzschwellen der einzelnen Versuchstiere

Die Boxplots zeigen die Schwellwerte für die Frequenzauflösung (y-Achse), die aus verschiedenen Maus-Retinae (x-Achse) erhoben wurden. Einteilung in ON- und OFF-Ganglienzellen. Die Daten der Testreihen 2 (magenta) und 3 (orange) wurden unter Einwirkung von Ivabradin erhoben. * bedeutet einen signifikanten Unterschied zur Testreihe 1 ($p < 0,05$), ° bedeutet einen signifikanten Unterschied zu der vorherigen Testreihe ($p < 0,05$). Für die statistische Auswertung wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Test eingesetzt.

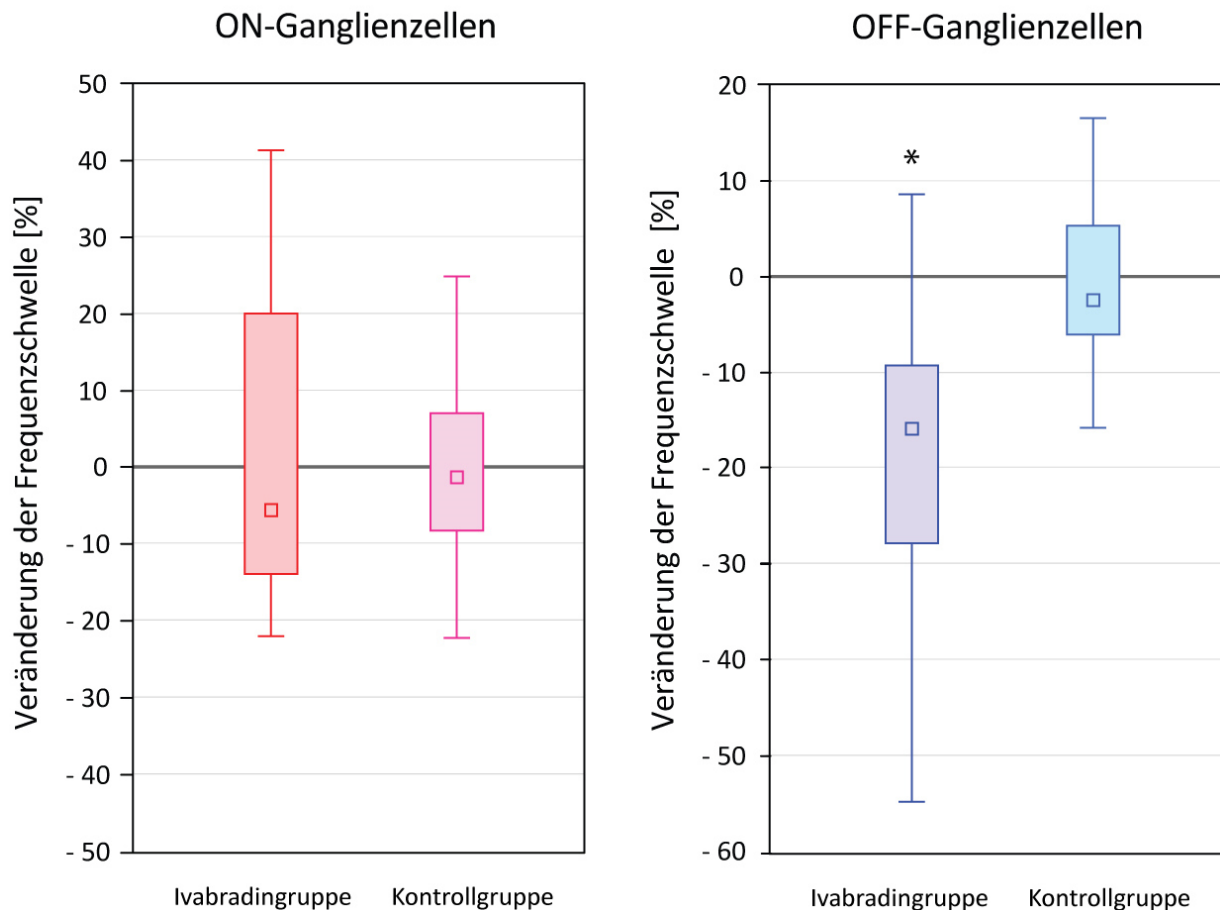


Abbildung 32 Prozentuale Veränderung der Frequenzschwellen vor und nach Ivabradineinfluss

Die Veränderung der Frequenzschwellen zwischen den Testreihen 1 und 3 (x-Achse) in Prozent Veränderung (y-Achse). * bedeutet einen signifikanten Unterschied zwischen Ivabradin- und Kontrollgruppe ($p < 0,05$); statistische Auswertung mittels t-Test.

4.2.4 Zusammenfassung

Die Frequenzauflösung der ON- und OFF-Ganglienzellen wird durch Ivabradin in unterschiedlicher Weise beeinflusst. In der Gruppe der OFF-Ganglienzellen sinkt die Frequenzauflösung deutlich ab und lässt sich statistisch signifikant bestätigen (Testung mittels ANOVA und t-Test). Die Frequenzschwellen der OFF-Ganglienzellen sinken unmittelbar nach dem Einspülen der Substanz ab und bleiben auch nach dem Ausspülen des Blockers im Bereich niedriger Frequenzschwellen, sodass hier keine Reversibilität des Ivabradineffektes nachgewiesen werden kann. In der Gruppe der ON-Ganglienzellen deutet sich anhand der graphischen Auswertung eine dezente Zunahme der Streuung in beide Richtungen unter Ivabradin an, die Veränderungen sind jedoch statistisch nicht signifikant. Dies könnte neben einem tatsächlich zu geringem Einfluss von Ivabradin auch daran liegen, dass die statistischen Tests (ANOVA, t-Test) aufgrund ihres Prüfverfahrens (der Ermittlung signifikanter Änderungen im Mittelwert) die Zunahme der Streuung in beide Richtungen nicht erfassen können.

4.3 Feuerraten

Nachdem ein Einfluss von Ivabradin auf die Kontrast- und Frequenzschwellen der Ganglienzellen bestätigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob diese Effekte möglicherweise auf eine veränderte Feuerrate der Ganglienzellen zurückzuführen sind. Diese Hypothese ist insofern von Interesse, da sich bereits kleine Änderungen des Membranpotentials auf die Generierung von Aktionspotentialen in den Ganglienzellen auswirken können (Zaghloul et al 2003). In der Tat wurde bereits eine veränderte (Spontan-)Aktivität der Ganglienzellen unter Ivabradin beschrieben (Bemme et al. 2017).

Motiviert wurde diese Analyse weiterhin dadurch, dass in den Periodenhistogrammen der Frequenzanalyse (Abbildung 27) unterschiedlich hohe Feuerraten (Maxima) nach Ivabradineinwirkung beobachtet wurden. Aus diesen Gründen wird in diesem Teil der Arbeit auf die Untersuchung der Feuerraten vor, während und nach Ivabradin eingegangen.

Zunächst wurden die Feuerraten der Ganglienzellen für jede Testreihe des Frequenzexperiments gemittelt und in Streudiagrammen dargestellt (Abbildung 33). Auf der x-Achse befindet sich der Ausgangswert der Feuerrate vor dem Einspülen von Ivabradin, die y-Achse gibt jeweils die Feuerrate aus einer der darauffolgenden Ableitungen wieder (unter Ivabradin, nach Ausspülen, etc.). Es zeigt sich, dass Ivabradin die Feuerrate sowohl von ON- als auch von OFF-Ganglienzellen beeinflusst. In beiden Gruppen ist eine breitere Streuung der Feuerraten bereits kurz nach dem Einspülen von Ivabradin zu verzeichnen. Die OFF-Ganglienzellen feuern jedoch tendenziell mehr, während die ON-Ganglienzellen insgesamt eher geringere Feuerraten haben. Die gemittelten Feuerraten der OFF-Ganglienzellen liegen durchschnittlich bei etwa 35 Aktionspotentialen/Sekunde und somit höher als die der ON-Ganglienzellen mit etwa 15 Aktionspotentialen/Sekunde.

Die Feuerraten der Kontrollgruppen von ON- und OFF-Ganglienzellen bleiben hingegen im Verlauf der Testreihen relativ stabil, wie anhand der auf oder dicht an der Diagonalen liegenden Punktwolke sichtbar ist.

In den Boxplots (Abbildung 34) wurde die Differenz der Feuerraten von Testreihe 1 zu 3 zwischen den Ivabradin- und den Kontrollgruppen gegenübergestellt. In der Gruppe der OFF-Ganglienzellen fällt unter Ivabradin die deutliche Streuung der Feuerraten auf (Box und Antennen erstrecken sich über einen weiten Wertebereich). Tendenziell ist eine dezente Abnahme der Feuerrate zu verzeichnen, wie sich anhand der Lage des Medians und des Großteils der Box unter null zeigt. Die Aktionspotentiale der ON-Ganglienzellen nehmen unter Ivabradin etwas zu; sowohl die Box als auch der Median liegen im Bereich positiver Werte.

Die Kontrollgruppen zeigen in Übereinstimmung mit den Streudiagrammen relativ stabile Feuerraten zwischen der ersten und dritten Testreihe. Der Median liegt hier fast exakt bei 0 und die Streuung ist weniger ausgeprägt als in den Ivabradin-Gruppen.

Die statistische Überprüfung zwischen Ivabradin- und Kontrollgruppen ergibt trotz graphisch gut darstellbaren Unterschieden in der statistischen Überprüfung jedoch keine Signifikanz, vermutlich, weil die Zunahme der Streuung der Daten durch die statistischen Tests nicht erfasst werden kann.

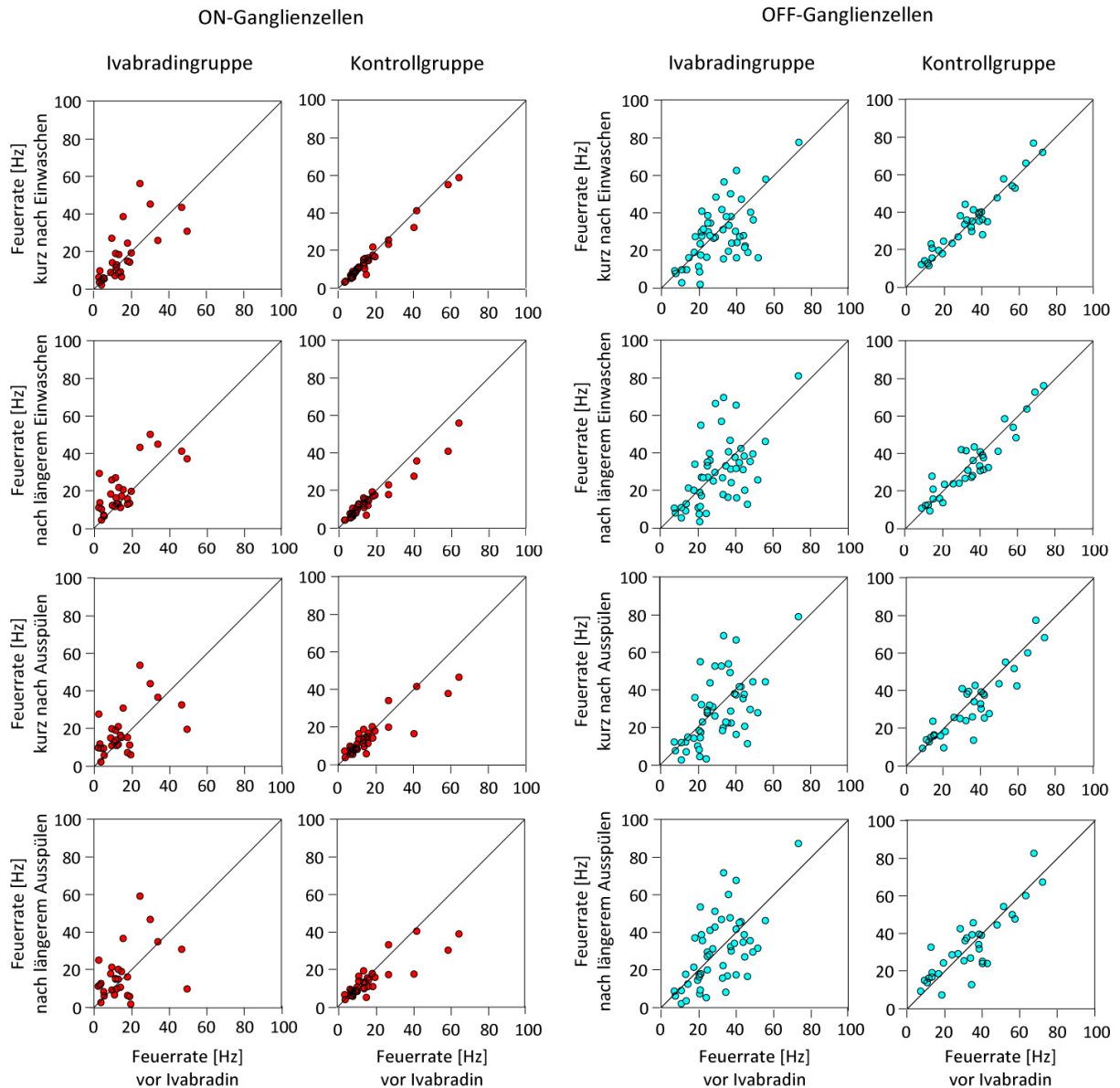


Abbildung 33 Streudiagramme zur Darstellung der Feuerraten der Ganglienzellen

Jeder Punkt steht für die Feuerraten einer individuellen Ganglienzelle, die während des Frequenzexperiments in den Testreihen gemessen wurden. Die Lage des Punktes ergibt sich durch die Feuerrate vor Ivabradin (x-Achse) und der Feuerrate in einer der folgenden Testreihen (y-Achse). Hier wird deutlich, wie sich die Feuerraten im Laufe der Testreihen verändern: Eine Lage des Punktes unterhalb der Diagonalen bedeutet eine im Vergleich zur ersten Testreihe abnehmende Feuerrate. Während in den Kontrollgruppen die Anzahl an Aktionspotentialen relativ konstant bleibt (Lage der Punkte dicht an/auf der Diagonalen), zeigt sich in den Ivabradin-Gruppen von ON- und OFF-Ganglienzellen eine zunehmende Streuung der Punkte. Das bedeutet, dass bei einem Teil der Ganglienzellen die Feuerrate zu-, bei dem anderen Teil der Zellen abnimmt.

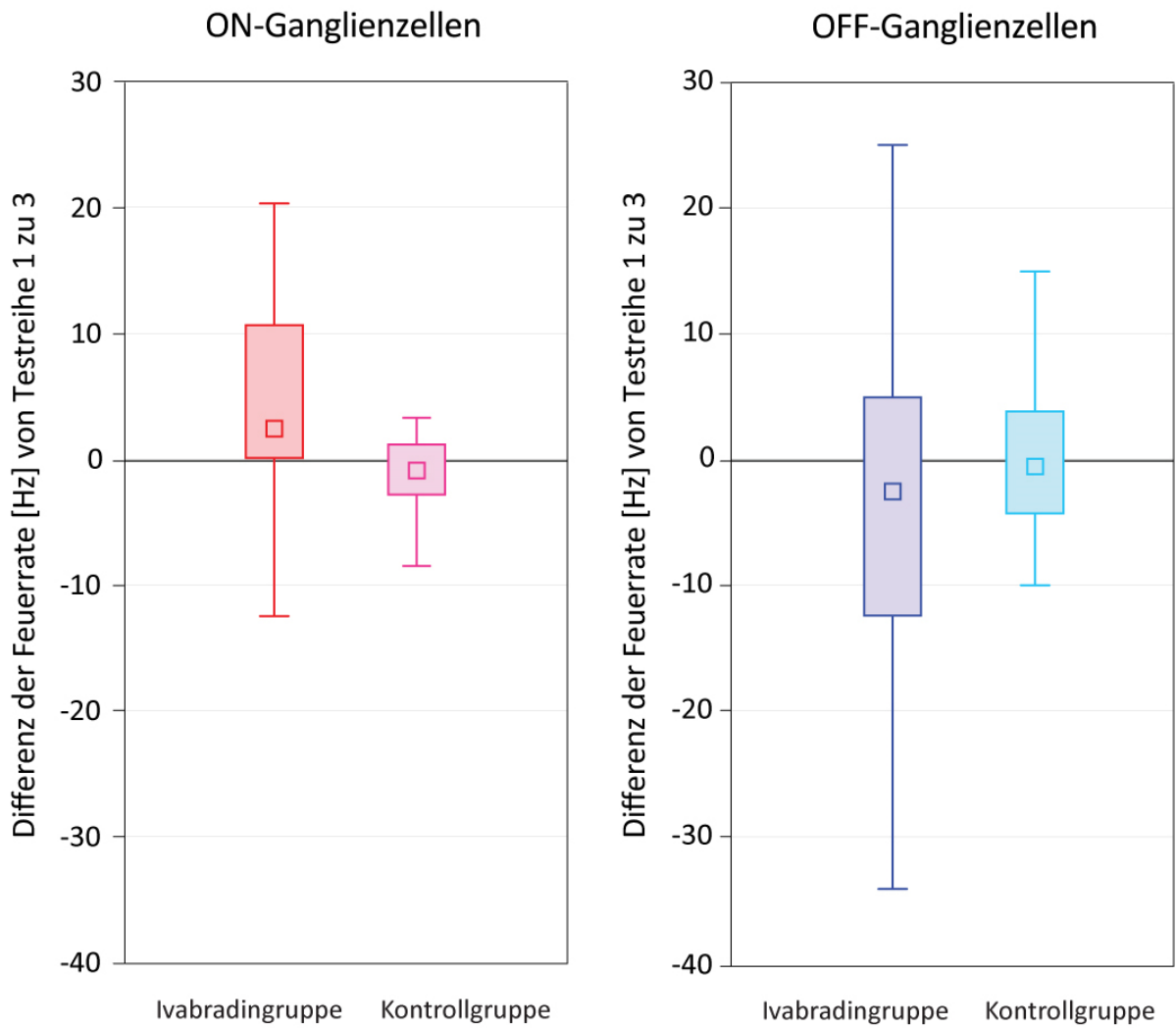


Abbildung 34 Boxplots zur Darstellung der Veränderung der Feuerraten durch Ivabradin

Die absolute Veränderung der Feuerrate von der ersten Testreihe zur dritten Testreihe, d. h. vor Ivabradineinfluss und nach längerem Einwirken der Substanz. Es fällt bei den ON-Ganglienzellen eine deutliche Zunahme der Feuerrate unter Ivabradineinfluss auf, wohingegen Feuerraten der OFF-Ganglienzellen unter Ivabradin in beide Richtungen streuen und tendenziell dezent abnehmen (der größere Anteil der Box liegt unter 0).

5 Diskussion

In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Einfluss der HCN-Kanalblockade durch die Substanz Ivabradin auf die Signalcodierung der Netzhaut nachgewiesen werden. Ivabradin führte bei den ON- und OFF-Ganglienzellen einheitlich zu einer deutlich erhöhten Kontrastsensitivität. Die Auswirkung auf die Frequenzauflösung war hingegen zwischen ON- und OFF-Ganglienzellen unterschiedlich. OFF-Ganglienzellen zeigen eine signifikante, systematische Verringerung ihrer Frequenzschwelle - d. h. sie verlieren die Fähigkeit, schnell aufeinanderfolgende Reize zu codieren und reagieren bei hohen Frequenzen wie auf einen durchgängigen Lichtreiz. In der Gruppe der ON-Ganglienzellen bewirkt Ivabradin einen weniger ausgeprägten, nicht signifikanten Effekt, der zudem uneinheitlich ist: bei einem Teil der Zellen nimmt die Frequenzsensitivität zu und bei einem anderen Teil ab. Die Feuerraten der Ganglienzellen, die während des Frequenzstimulus abgeleitet wurden, streuen unter und nach Ivabradineinfluss deutlich stärker in beide Richtungen.

Die Ergebnisse dieser Studie liefern damit neue Erkenntnisse über den Einfluss von Ivabradin auf die Signalcodierung in der Netzhaut und sollen, anschließend an die kritischen Überlegungen in diesem Kapitel, weiter beleuchtet werden.

5.1 Kritische Überlegungen zum Experiment

Die Experimente zur Untersuchung der Kontrastsensitivität und Frequenzauflösung unter Ivabradineinfluss wurden an explantierten Netzhäuten von Mäusen durchgeführt. Mäuse besitzen als Versuchstier mehrere Vorteile, die im Kapitel 3.1.1 bereits ausgeführt wurden. Insbesondere ist die Vergleichbarkeit zu anderen Studien über HCN-Kanäle hervorzuheben, da alle in dieser Arbeit zitierten Studien zu HCN-Kanälen an Säugetieren durchgeführt wurden; die meisten von ihnen waren Nagetiere wie Ratten und Mäuse. Die hier gewählte extrazelluläre Ableitmethode mittels Multielektroden-Arrays (MEA) bietet einige Vorzüge gegenüber anderen Techniken zur Aufzeichnung zellulärer Signale. Die invasiven Einzelzelleitungen wie die *Patch-Clamp*-Technik, mit denen ein Großteil der bisherigen Daten zu den HCN-Kanälen gewonnen wurden, gehen mit einer Perforation der Zellmembran einher, sodass das Membranpotential der Zellen durch Verlust oder Einströmen von Ionen über Membranlecks verfälscht werden kann (Cangiano et al. 2007). Multielektroden-Arrays hingegen leiten die Spannungsänderungen, die während eines Aktionspotentials entstehen, extrazellulär ab und bewahren die Intaktheit der Zellen. Darüber hinaus können mittels MEAs eine Vielzahl an Ganglienzellen gleichzeitig abgeleitet werden, wodurch Ganglienzellpopulationen einzelner Versuchstiere miteinander verglichen werden können. Es ist daher von einer hohen Validität der Ergebnisse auszugehen. MEAs können jedoch nicht, zumindest nicht ohne weiterführende Analysen, die einzelnen Subtypen an Ganglienzellen charakterisieren, wofür wiederum Einzelzelleitungen präferiert werden. Es ist daher bei der Interpretation der hier vorgestellten Ergebnisse nicht möglich, Einflüsse durch Subtypspezifische Besonderheiten der Signalverarbeitung genau zu beurteilen. Dies schränkt jedoch nicht die Aussage zum generellen Effekt von Ivabradin auf die Signalcodierung der Netzhaut ein, da hier die Veränderungstendenz im Mittelpunkt der Analyse steht.

Ableitungen an explantiertem Gewebe setzen den Erhalt seiner Vitalität voraus, die eine zügige und schonende Präparation verlangt. Die Technik, die zur Gewinnung der Retina angewendet wurde, ist vielfach erprobt und hat sich für die Ableitung mittels MEAs bewährt. Durch Erlangen der Feinmotorik und Anpassung des Präparationsbestecks an die individuellen Bedürfnisse konnten die Gewebestücke routinemäßig präpariert und stabile Zellantworten abgeleitet werden (Details siehe Kapitel 3.1.2). Bis die ersten erfolgreichen Experimente durchgeführt werden konnten, vergingen mehrere Monate, da bereits kleinste Fehler (z. B. Verletzungen des Gewebes) zu instabilen und daher unbrauchbaren Ableitungen führten.

Neben der Vitalität des Gewebes spielt auch das Puffermilieu eine wichtige Rolle für die Kinetik der HCN-Kanäle. Es wurde nachgewiesen, dass sich Temperaturänderungen (Cangiano et al. 2007) und der Ionengehalt des extrazellulären Milieus (Frace et al. 1992) auf die Kinetik der HCN-Kanäle auswirkt. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, wurde der Puffer standardisiert, unmittelbar vor Durchführung der Experimente hergestellt und seine Temperatur und Durchflussrate während der Versuchsreihen kontinuierlich kontrolliert (Details siehe 2.1.3). Die Temperatur des Raumes, in denen die Experimente stattfanden, wurde durch eine Klimaanlage stabil gehalten und über ein Thermometer überprüft, damit von Beginn der Präparation bis zur Beendigung der Ableitung eine konstante Temperatur herrschte. Die saisonalen Schwankungen der Außentemperatur (insbesondere die Aufwärmung der Räume im Sommer) erschwerte die Konstanzhaltung der Raum- und somit Puffertemperatur, sodass eine nicht unerhebliche Menge an Experimenten ohne erfolgreiche Ableitung endete.

Aufgrund der extremen Empfindlichkeit der Netzhaut auf äußere Einflüsse führten schon geringe Abweichungen von den notwendigen Standardbedingungen zu instabilen Ableitungen, die sich in den Testreihen als abrupt abbrechende Zellaktivität äußerten (siehe dazu auch Kapitel 3.5.1.2). Diese Zellen flossen nicht in die Ergebnisauswertung ein, sodass für die Analysen ausschließlich Datensätze aus qualitativ guten Zelleitungen berücksichtigt wurden, deren Voraussetzung besonders stabile experimentelle Bedingungen sind. Daher ist davon auszugehen, dass der hier nachgewiesene Einfluss der HCN-Kanalblockade auf einem tatsächlichen Ivabradineffekt beruht und nicht auf äußere Umstände zurückzuführen ist.

Durch in Vorexperimenten gesammelten Erfahrungen der Forschungsgruppe und Erlangen einer eigenen Routine konnten gute experimentelle Voraussetzungen für die Ableitungen geschaffen und anhand eines Versuchsprotokolls für jede einzelne Ableitung standardisiert durchgeführt werden. Alle Versuche fanden in Dunkelheit statt, da der Stoffwechsel der Photorezeptoren durch den Kontaktverlust zum retinalen Pigmentepithel zeitlich limitiert ist und daher vor Lichteinfluss geschützt werden muss. Um eine maximale Leistungsfähigkeit der lichtempfindlichen Zellen zu gewährleisten, wurden die Versuchstiere vor der Gewebsexplantation lang genug in Dunkelheit gehalten, damit die Netzhautzellen dunkeladaptieren. Auch die Präparation erfolgte in Dunkelheit, lediglich unter Einsatz einer schwachen Rotlichtlampe, da die Netzhaut der dichromaten Mäuse weniger empfindlich gegenüber Rotlicht ist und dies ein Ausbleichen der Photorezeptoren unwahrscheinlich macht (siehe Kapitel 4.1.1).

Die Lichtstimulation erfolgte unter mesopischen Lichtverhältnissen, um beide Photorezeptortypen zu aktivieren. Es wäre daher interessant, die hier durchgeführten Experimente in derselben Weise unter jeweils skotopischen Lichtbedingungen (überwiegende Stäbchenaktivität) und photopischen Lichtverhältnissen (überwiegend Zapfenaktivität) zu wiederholen und miteinander zu vergleichen.

Die Lichtstimuli, mit denen die Netzhaut zum Feuern angeregt wurde, zählen zu den gängigen Stimulationsmustern des visuellen Systems für die Analyse von Kontrasten und Frequenzen. Sie wurden unter Berücksichtigung der bekannten Auflösungsgrenzen der murinen Retina erstellt. Jedoch kann durch den Einsatz experimenteller Stimuli immer nur ein gewisser Teilaspekt der komplexen Signalverarbeitung in der Netzhaut untersucht werden. Der Einsatz von Stimulationsmustern im experimentellen Rahmen beruht daher auf dem Kompromiss zwischen möglichst naturgetreuer Imitation einer Lichtsituation und deren Abstraktion für das Experiment (Gollisch und Meister 2010). Beispielsweise wird bei der Analyse der zeitlichen Auflösung unter Verwendung von sinusoidalen Stimuli vor allem die lineare Komponente der Signalverarbeitung analysiert. Nichtlineare Einflüsse, die z. B. durch Adaptation entstehen können, werden hingegen durch andere Stimuli (z. B. weißes Rauschen) und Analysemethoden (z. B. Fourier Analyse) besser erfasst (Chichilnisky und Kalmar 2002; Stein et al. 1972).

Um Adaptationseffekte der Netzhautzellen auf den Kontrast- bzw. Frequenzstimulus weitestgehend zu verringern bzw. von der Analyse auszuschließen, wurden mehrere Vorkehrungen getroffen. Diese

betrafen den Entwurf der Stimuli (durch Einblendung der Hintergrundbeleuchtung zwischen den einzelnen Lichtimpulsen), die Durchführung der Ableitungen (mit Pausen zwischen den einzelnen Testreihen) und abschließend die Analyse der Zellantworten (durch Ausschluss der ersten Serien pro Ableitung von der Ergebnisauswertung).

In den Ergebnissen fiel auf, dass der Ivabradineinfluss auf die Kontrast- und Frequenzauflösung nach längerer Einwirkzeit des HCN-Kanalblockers am deutlichsten ausgeprägt war, d. h. in jeweils der dritten Testreihe der Experimente, nachdem in der zweiten Testreihe bereits eine Lichtstimulation unter Ivabradineinfluss erfolgte. Diese Beobachtung deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen zeit- und stimulationsabhängigen Entfaltung der inhibitorischen Wirkung von HCN-Kanalblockern (Bucchi et al. 2002; Cangiano et al. 2007; Demontis et al. 2009; Harris und Constanti 1995). Da HCN-Kanalblocker an einer intrazellulär liegenden Domäne der HCN-Kanäle binden (siehe Kapitel 2.3.2), müssen sie zunächst in das Zellinnere gelangen, was erst nach Aktivierung der HCN-Kanäle mit Öffnung ihrer Porenregion möglich ist. Daher gibt die dritte Testreihe den inhibitorischen Effekt durch Ivabradin am besten wieder und wurde in der Ergebnisauswertung durch separate graphische und statistische Beurteilung hervorgehoben (z. B. durch die Darstellung in einem Boxplot, um die Wertedifferenz zwischen der ersten und dritten Testreihe zu verdeutlichen, d. h. vor und nach längerer Einwirkzeit von Ivabradin). Eine Wirkungsverstärkung durch längere Einwirkzeit bzw. weitere Lichtstimulation konnte in Vorexperimenten nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch war eine Verlängerung der Experimente mit Ableitung zusätzlicher Testreihen aufgrund der zeitlich begrenzten Vitalität des Gewebes nicht sinnvoll (die Antwortreaktion der Ganglienzellen wurde instabiler und ließ keine zuverlässige Aussage mehr zu). Daher kann die Frage nach der vollständigen Reversibilität des Ivabradineffekts nicht endgültig beantwortet werden.

Die zeitbedingten Veränderungen im Verlauf der Ableitungen zeigen sich tatsächlich auch in den Kontrollgruppen durch leichte Abweichungen in den aufeinanderfolgenden Testreihen. Dies beruht vermutlich auf dem sogenannten Ausbleichen der Photopigmente, die durch die intensive Stimulation und den experimentellen Bedingungen weniger effizient regeneriert werden (ausführlicher erklärt in Kapitel 4.1.1). Auch eine Adaptation an die Lichtintensität ist aufgrund der intensiven Stimulation nicht vollständig auszuschließen, obwohl in dem Versuchsprotokoll präventiv Stimulationspausen zwischen der Präsentation der Lichtimpulse eingeplant wurden. Wie sich aufgrund der insgesamt stabilen Zellableitungen zeigte, führten diese Effekte jedoch nicht zu einer Beeinträchtigung der Analyse oder Aussagekraft der Experimente.

Die statistische Auswertung erfolgte nach beratender Rücksprache mit den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen. Die Auswahl der statistischen Tests richtete sich an der Datenmenge und -verteilung, die abhängig von der zu untersuchenden Fragestellung etwas anders ausfiel (z. B. Vergleich des gesamten Datensatzes von Kontroll- und Ivabradin-Gruppen oder Betrachtung der an einzelnen Versuchstieren erhobenen Daten untereinander). Um statistische Verzerrungen zu minimieren, wurden die Ergebnisse sowohl anhand parametrischer als auch nicht-parametrischer Tests untersucht.

5.2 Ergebnisdiskussion: Der Einfluss von Ivabradin auf die Signalcodierung der Retina

5.2.1 Einfluss auf die Kontrastsensitivität

Im ersten Teil der Arbeit konnte ein signifikanter Einfluss von Ivabradin auf die Kontrastsensitivität der Ganglienzellen nachgewiesen werden. Damit liegen erstmals Daten zur Auswirkung von Ivabradin auf die Kontrastsensitivität in der Netzhaut vor. Sowohl bei ON- als auch bei OFF-Ganglienzellen sanken die Kontrastschwellen ab, d. h. die Zellen wurden empfindlicher gegenüber Kontrastunterschieden. Ivabradin scheint die Kontrastsensitivität der ON-Ganglienzellen stärker zu beeinflussen, da ihre Kontrastschwellen drastischer absinken als die der OFF-Ganglienzellen. Jedoch haben die OFF-Ganglienzellen sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Ivabradin-Gruppe vor dem Kontakt mit der

Substanz vergleichsweise niedrigere Kontrastschwellen (Abbildung 31), wodurch der Ivabradineffekt vermutlich weniger zur Geltung kommt. Die unter HCN-Kanal-Inhibition erhöhte Netzhautsensitivität auf normalerweise unterschwellige Reize lässt vermuten, dass die Antwortbereitschaft der Ganglienzellen auf Lichtreize steigt. Tatsächlich ist eine Zunahme der Spontanaktivität von ON-Ganglienzellen unter Ivabradin bereits nachgewiesen worden (Bemme et al. 2017). Dies könnte mit einer verbesserten Sensitivität der Photorezeptoren auf Lichtreize zu erklären sein, da das Membranpotential der Photorezeptoren durch den fehlenden Einfluss des Ih-Ionenstroms länger hyperpolarisiert bleibt (Barrow und Wu 2009; Della Santina et al. 2012; Demontis et al. 2009). Bei schwachen Kontrasterhöhungen käme es dann zu einer unverhältnismäßig starken Antwort in den Sinneszellen mit einer Fortleitung bis zu den ON-Ganglienzellen.

Überträgt man diese Hypothese auf den OFF-Signalweg, so müsste sich die verlängerte Hyperpolarisation der Photorezeptoren hemmend auf die OFF-Bipolarzellen und somit OFF-Ganglienzellen auswirken. Dafür spräche die unter Ivabradin nachgewiesene erhöhte Aktivierungsschwelle und herabgesetzte Spontanaktivität der OFF-Ganglienzellen (Bemme et al. 2017). Trotzdem weisen die vorliegenden Ergebnisse eine unter Ivabradin erhöhte Kontrastempfindlichkeit nach. Wie ist dies zu erklären? Denkbar wäre, dass durch eine herabgesetzte Spontanaktivität der OFF-Ganglienzellen die Diskriminierung zwischen zufälligen und reizbedingten Signalen verbessert wird. In der Analyse der Detektionswahrscheinlichkeit spiegelt sich dies in einer erhöhten Kontrastsensitivität wider. Unter Ivabradin salvenartig auftretende Entladungen von Aktionspotentialen, wie sie bei den OFF-Ganglienzellen beobachtet wurden (Bemme et al. 2017), könnte Ausdruck einer überwundenen hohen Aktivierungsschwelle sein und zu der erhöhten Detektionswahrscheinlichkeit schwacher Kontraste beitragen.

5.2.2 Einfluss auf die Frequenzauflösung

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Ivabradin auf die Frequenzauflösung untersucht. Die Ergebnisse bestätigen vorausgegangene Studien, in denen sowohl unter pharmakologischer Inhibition als auch bei *Knock-Out* der HCN-Kanäle eine Veränderung der Frequenzsensitivität der Retina zu beobachten ist (Barrow und Wu 2009; Bemme et al. 2017; Cangiano et al. 2007; Demontis et al. 2009; Seeliger et al. 2011). Während in der Literatur einheitlich eine herabgesetzte Frequenzauflösung in Photorezeptoren und Bipolarzellen beschrieben wurde, weist die vorliegende Arbeit Unterschiede in der Frequenzsensitivität zwischen den ON- und OFF-Ganglienzellen nach. Während bei OFF-Ganglienzellen die Frequenzauflösung unter Ivabradineinfluss signifikant abnimmt, zeigen sich in der Gruppe der ON-Ganglienzellen uneinheitliche Veränderungen. Ein Teil der ON-Ganglienzellen verliert, ein anderer Teil gewinnt an Auflösungsfähigkeit für hohe Frequenzen. Die Veränderungen der ON-Ganglienzellen sind im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch nicht signifikant, was möglicherweise an der Zunahme der Streuung liegt, die durch die statistischen Tests nicht erfasst wird.

Als Ursache für die Abnahme der Frequenzauflösung von Photorezeptoren und Bipolarzellen unter HCN-Kanal-Inhibition oder *-Knock-Out* wird die oben erwähnte verlängerte Hyperpolarisation der Photorezeptoren diskutiert. Bei fehlendem Ih-Ionenstrom erreichen insbesondere die hochsensitiven Stäbchen ihr Ruhemembranpotential langsamer als normalerweise und verbleiben daher länger in der Hyperpolarisation (Della Santina et al. 2010; Della Santina et al. 2012; Demontis et al. 2009). Dadurch können sie Lichtstimuli hoher Frequenzen nicht mehr folgen und verlieren die Fähigkeit, adäquat auf Lichtintensitätswechsel zu reagieren. Konsekutiv kommt es zu einer prolongierten Aktivierung der ON-Bipolarzellen bzw. Deaktivierung der OFF-Bipolarzellen (Knop et al. 2008; Seeliger et al. 2011) und es resultiert eine verminderte Frequenzauflösung (Cangiano et al. 2007; Della Santina et al. 2012). Diese Resultate lassen sich gut mit den in der vorliegenden Arbeit dokumentierten niedrigeren Frequenzschwellen der OFF-Ganglienzellen vereinbaren. Es bleibt jedoch die Frage offen, warum hingegen einige ON-Ganglienzellen eine verbesserte Frequenzauflösung zeigen. Eine mögliche Ursache könnte darin bestehen, dass Ivabradin die Feuerraten einiger ON-Ganglienzellen derart beeinflusst, dass ihre

Reaktion auf den Frequenzstimulus verbessert wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden diejenigen Feuerraten, die während des Frequenzexperiments abgeleitet wurden, in einer weiteren Analyse untersucht.

5.2.3 Einfluss auf die Feuerrate

In einer separaten Analyse konnte ein Effekt von Ivabradin auf die Feuerraten der Ganglienzellen nachgewiesen werden. Bei den OFF-Ganglienzellen nahm die Streuung graphisch deutlich in beide Richtungen zu, während bei den ON-Ganglienzellen tendenziell ein Anstieg der Feuerraten zu beobachten war. Ein systematischer Zusammenhang zwischen den veränderten Feuerraten der Ganglienzellen und ihren Frequenzschwellen konnte jedoch nicht festgestellt werden. Es bleibt daher weiterhin unklar, warum sich Ivabradin unterschiedlich auf die Frequenzsensitivität und Feuerraten von ON- und OFF-Ganglienzellen auswirkt. Möglicherweise käme hier die unter HCN-Kanalblockade erhöhte Kontrastsensitivität als weiterer Faktor in Betracht. Je nachdem, wie stark sich die individuelle Kontrastschwelle einer Ganglienzelle verändert, könnte ihre Sensitivität für die sinusoidalen Kontrastabweichungen des Frequenzstimulus beeinflusst werden. Hier wären weitere Analysen wünschenswert, die den Bezug zwischen Kontrast- und Frequenzsensitivität im Hinblick auf die Feuerrate unter Ivabradin weiter untersuchen.

5.2.4 Unterschiedliche Auswirkung von Ivabradin auf ON- und OFF-Ganglienzellen

Während die Kontrastsensitivität unter Ivabradin sowohl bei ON- als auch bei OFF-Ganglienzellen stieg, zeigten sich wie bereits erwähnt unterschiedliche Auswirkungen des Blockers auf die Frequenzsensitivität und Feuerraten. Diese Unterschiede sind vermutlich nicht allein auf die Inhibition der HCN-Kanäle in den Photorezeptoren zurückzuführen, da aufgrund der hohen Signalkonvergenz im nachfolgenden Netzwerk weitere Einflüsse auf die Signalcodierung anzunehmen sind. Eine Möglichkeit für die Variabilität des Ivabradineffekts könnte z. B. die Expression verschiedener HCN-Isoformen der Bipolarzell- und Ganglienzell-Subtypen sein, deren Inhibition sich dann unterschiedlich auf die Signalverarbeitung in den Ganglienzellen auswirken würde.

Es ist bereits bekannt, dass sich die mehr als 30 Ganglienzell-Subtypen der murinen Retina in ihrer Frequenzselektivität unterscheiden (Baden et al. 2016) und dass die vorangeschalteten Bipolarzellen maßgeblich die Frequenzauflösung beeinflussen, da sie die Funktion eines Bandpassfilters übernehmen (Barrow und Wu 2009; Cangiano et al. 2007; Della Santina et al. 2012). Allein in der Mäusenetzhaut existieren 15 verschiedene Bipolarzell-Subtypen (Tsukamoto und Omi 2017) mit individueller Expression von HCN-Kanälen (Hellmer et al. 2016; Muller et al. 2003), die zu ihrer unterschiedlichen Sensitivität für Frequenzen und Lichtreize beitragen (Ichinose et al. 2014). Es ist daher anzunehmen, dass der HCN-Kanalblocker Ivabradin variable Effekte in den Bipolarzell-Subtypen und den mit ihnen verschalteten Ganglienzellen bewirkt.

Unterschiede zwischen den ON- und OFF-Signalwegen, die durch Diversität der zellulären Verschaltungen zustande kommen, werden in der Literatur mit dem Begriff der Kontrastasymmetrie beschrieben (Chichilnisky und Kalmar 2002; Zaghoul et al. 2003). Neben den Bipolarzellen spielen hier auch die AII-Amakrinzellen eine Rolle, die im Stäbchen-Signalweg die Signalübertragung zwischen Stäbchen-Bipolarzellen und Ganglienzellen dirigieren (siehe Kapitel 2.1.4). Ein weiterer Subtyp, die A17-Amakrinzelle, wirkt sich über modulatorischen Feedback auf die Frequenzauflösung der Stäbchen aus (Dong und Hare 2003). Dies dient dem Zweck, die Sensitivität der Netzhaut zu regulieren und Übersättigung der Signalwege zu verhindern (Sothilingam et al. 2016). Da Amakrinzellen ebenfalls HCN-Kanäle exprimieren (Koizumi et al. 2004), könnte Ivabradin die Signalweitergabe zwischen Amakrinzellen und OFF-Ganglienzellen beeinflussen und zur unterschiedlichen Frequenzauflösung von ON- und OFF-Ganglienzellen beitragen.

Diese Hypothesen zeigen auf, dass aufgrund der Komplexität der Retina weitere Experimente notwendig wären, um die Auswirkungen der HCN-Kanalblockade auf die Signalcodierung besser zu

verstehen. Dazu wäre z. B. die Durchführung der hier getätigten Experimente an identifizierten Amakrinzell-, Bipolarzell- und Ganglienzell-Subtypen wünschenswert.

5.2.5 Reversibilität des Ivabradineffekts

Der Einfluss von Ivabradin auf die Kontrastsensitivität, Frequenzauflösung und Feuerraten war durch Ausspülen der Substanz nicht vollständig reversibel. In den Testreihen zur Kontrastsensitivität konnte zumindest eine Teilreversibilität nach längerem Ausspülen mit normaler Pufferlösung erreicht werden. Die OFF-Ganglienzellen erholten sich anscheinend schneller von der Ivabradinwirkung und ihre Kontrastschwellen stiegen deutlicher an als bei den ON-Ganglienzellen. HCN-Kanalblocker sind bekannterweise schwierig auszuwaschen (Bemme et al. 2017; Bucchi et al. 2002; Demontis et al. 2009) und es ist daher anzunehmen, dass der Ivabradineffekt durch längeres Ausspülen vollständig reversibel sein könnte. Dafür spräche, dass die unter Ivabradineinnahme auftretenden visuellen Nebenwirkungen nach dessen Absetzen relativ rasch und ohne weitere Beeinträchtigungen sistieren (Borer et al. 2003; Savelieva und Camm 2006) und bisher keine morphologischen Zellveränderungen nach Kontakt mit Ivabradin nachgewiesen werden konnten (Borer et al. 2003; Della Santina et al. 2010; Gargini et al. 1999). Das weitere Ausspülen von Ivabradin mit anschließenden Ableitungen wurde in der vorliegenden Studie ausprobiert, jedoch nicht weiter fortgeführt, da die Vitalität der explantierten Retinae abnahm (Daten nicht gezeigt).

5.3 Schlussfolgerungen: Bedeutung der HCN-Kanäle, Phosphene bei Ivabradintherapie

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Veränderungen der Ganglienzellantworten unter Ivabradin ergänzen die bisherigen Befunde zum Beitrag der HCN-Kanäle auf die Signalcodierung in der Netzhaut. Erstmals konnte nachgewiesen werden, dass die pharmakologische Inhibition der HCN-Kanäle mit Ivabradin zu teils deutlichen Veränderungen der Sensitivität für Kontraste, Frequenzen sowie der Feuerraten der Ganglienzellen führte. Da Ganglienzellen die Information aus der Retina an das Gehirn übermitteln, könnte die Fortleitung ihrer veränderten Signale zu einer anderen Sehwanehmung führen. Dieser Zusammenhang wird auch zur Erklärung für die visuellen Nebenwirkungen bei Einnahme von Ivabradin vermutet, da Ivabradin zwar nicht die Blut-Gehirn-Schranke passieren kann, wohl aber zu einem gewissen Teil über die Blut-Retina-Schranke diffundiert (Savelieva und Camm 2006). Es ist bekannt, dass die in der Netzhaut befindlichen HCN-Kanäle aufgrund ihrer kinetischen Eigenschaften die Rückführung des Membranpotentials nach intrazellulären Spannungsänderungen beschleunigen und dadurch die normale Funktion der Retina auf Reize gewährleisten (Cangiano et al. 2007; Sothilingam et al. 2016). Durch die pharmakologische Inhibition mit Ivabradin konnte hier eine deutliche Herabsetzung der Kontrastschwellen in den Ganglienzellen nachgewiesen werden, sodass als Konsequenz normalerweise unterschwellige Reize registriert und fortgeleitet werden können. Im Umkehrschluss lässt sich daraus folgern, dass die HCN-Kanäle durch die Aufrechterhaltung von ausreichend hohen Kontrastschwellen dazu beizutragen, die für den Seheindruck weniger relevanten Signale zugunsten notwendiger Information zu selektieren. Unterschwellige Reize beinhalten Störfractionen, die häufig bei physiologischen Prozessen in der Netzhaut entstehen, wie beispielsweise Fluktuationen des Membranpotentials durch Spontanaktivierung von Sehpigment (Baylor et al. 1980; Baylor et al. 1984; Rieke und Baylor 1996). Werden unter der HCN-Kanalblockade nun die Kontrastschwellen der Ganglienzellen herabgesetzt und dadurch Störsignale fortgeleitet, könnte dies als mögliche Ursache für die unter Einnahme von Ivabradin beobachteten visuellen Nebenwirkungen (Phosphene) angenommen werden.

Die Begrenzung der Netzhautsensitivität auf ein notwendiges Maß wirkt zudem einer Übersättigung der Signalwege entgegen. Übersättigung entsteht z. B. dann, wenn die Reaktionsfähigkeit der Retina auf Reize durch eine unverhältnismäßig starke Signalantwort in den Netzhautzellen reduziert wird (Seeliger et al. 2011). Der Zusammenhang zwischen inhibierten HCN-Kanälen und einer herabgesetzten Frequenzauflösung in Photorezeptoren und Bipolarzellen wurde in mehreren Arbeiten postuliert (Della

Santina et al. 2010; Della Santina et al. 2012; Knop et al. 2008; Seeliger et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde ein ähnlicher Befund nun auch an Ganglienzellen erhoben. Bei allen OFF-Ganglienzellen und zumindest einem Teil der ON-Ganglienzellen sank die Frequenzsensitivität unter Ivabradineinfluss und sie erfassten schnell aufeinander folgende Lichtreize nicht mehr als separate Stimuli, sondern reagierten wie auf einen konstanten Lichtreiz. Interessanterweise zeigten einige ON-Ganglienzellen bei HCN-Kanalblockade jedoch eine verbesserte Frequenzauflösung. Uneinheitliche Veränderungen betrafen auch die Feuerraten von ON- und OFF-Ganglienzellen (diskutiert in 5.2.4). Diese Befunde könnten darauf hinweisen, dass durch HCN-Kanal-Inhibition ein Ungleichgewicht in den ON- und OFF-Signalwegen entsteht. Werden diese weitergeleiteten Signale vom Gehirn missinterpretiert, könnte dies eine weitere potenzielle Erklärung für die bei Ivabradintherapie auftretenden Phosphene sein.

Warum die visuellen Nebenwirkungen bei der Therapie mit Ivabradin interindividuell unterschiedlich ausgeprägt sind, ist bisher nicht bekannt. Während das Medikament mit einer hohen Erfolgsrate zur gewünschten Herzfrequenzabsenkung führt, berichten nur etwa 15% der Patienten von Sehstörungen. Diese sind mild bis moderat und nur bei wenigen Patienten derart stark, dass die Therapie vorzeitig beendet werden muss (Borer et al. 2003). Auch warum bei 70% der Betroffenen die visuellen Nebenwirkungen im Verlauf der Therapie sistieren, obwohl die Dosierung und die Wirkung auf die Herzfrequenz gleichbleiben, kann derzeit nur spekuliert werden. Möglicherweise liegen den interindividuellen Unterschieden genetische Polymorphismen zugrunde. Diese könnten beispielsweise die Diffusionskapazität der Blut-Retina-Schranke betreffen und damit die zur Retina diffundierende Menge an Ivabradin beeinflussen. Andererseits ist auch eine unterschiedliche Expression von HCN-Kanälen an den Netzhautzellen denkbar, denn die Affinität der HCN-Kanäle zu Ivabradin unterscheidet sich je nach HCN-Kanal-Subtyp und -Zusammensetzung (Bucchi et al. 2006; Cervetto et al. 2007).

Es existieren daher noch ungeklärte Fragen, die den Zusammenhang zwischen der HCN-Kanalblockade, ihren Auswirkungen für die Signalcodierung in der Netzhaut und den Folgen für die visuelle Wahrnehmung weiter erklären könnten.

6 Ausblick

Visuelle Scheinwahrnehmungen, die als unerwünschte Nebenwirkung bei der therapeutischen Anwendung von Ivabradin auftreten können, sind möglicherweise die Folgen des hier nachgewiesenen Einflusses auf die Kontrast- und Frequenzauflösung der Netzhaut. Um die Auswirkungen der HCN-Kanalblockade auf die Signalcodierung vollumfänglich zu verstehen, fehlt jedoch derzeit das Wissen über die einzelnen Subtypen der Netzhautzellen und die Gesamtheit ihrer exprimierten Ionenkanäle. Eine Charakterisierung und Untersuchung der Netzhautzellen mittels Einzelzellableitungen könnte weiteren Aufschluss über den Beitrag ihrer HCN-Kanäle zur Signalverarbeitung bringen.

Zur Beurteilung, ob neben den passager auftretenden Sehstörungen auch die generelle Leistungsfähigkeit des Sehens unter pharmakologischer HCN-Kanalblockade beeinträchtigt wird, wären klinische Untersuchungen an Patienten wünschenswert. Funktionelle Tests zur Überprüfung des Kontrastsehens (z. B. an der Tafel der Firma Vistec Ag) und der Flimmerfusionsfrequenz (u. a. durch Flimmerperimetrie, Frequenzverdopplungsperimetrie) erlauben die diagnostische Abklärung der subjektiven visuellen Wahrnehmung (Schiefer et al. 2008). Durch ergänzende elektrophysiologische Untersuchungsverfahren wie dem Elektroretinogramm (ERG) oder über Ableitung visuell evozierter Potentiale (VEP) ließe sich die visuelle Funktion zusätzlich objektivieren und ein Vergleich zu den Tiermodellen unter HCN-Kanalblockade bzw. HCN-*Knock-Out* ziehen.

Scheinwahrnehmungen, die durch eine veränderte Aktivität der HCN-Kanäle entstehen, sind auch in anderen sensorischen Systemen bekannt, wie dem Hörsinn und der Schmerzwahrnehmung (Nozizeption). Die hier befindlichen Neurone exprimieren ebenfalls HCN-Kanäle, die an der Steuerung der Zellerregbarkeit sowie Generierung, Übertragung und Modulation der Nervenzellsignale beteiligt sind (Baruscotti et al. 2010; DiFrancesco und DiFrancesco 2015; Koepsell et al. 2010). Bereits kleinste Änderungen ihrer Aktivität, Zusammensetzung der Untereinheiten oder Lokalisation in der Zellmembran stehen in Zusammenhang mit der Pathogenese komplexer chronischer Krankheitsbilder (DiFrancesco und DiFrancesco 2015; Postea und Biel 2011), wie der Ausbildung neuropathischer Schmerzen (Bernal und Roza 2018) oder der Entstehung von Tinnitus (Li et al. 2015). Die Prävalenz dieser Erkrankungen ist mit weltweit 10% respektive 10-30% hoch (Atik 2014; Colloca et al. 2017; McCormack et al. 2016). Trotz vielfältiger Therapiemethoden ist ein Großteil der Patienten mit den derzeitigen therapeutischen Möglichkeiten nur schwer behandelbar (Baguley et al. 2013; Hesse 2016; Kwan et al. 2011). Die gesundheitliche Beeinträchtigung mindert die Lebensqualität der Betroffenen oftmals erheblich (Langguth et al. 2013; O'Connor 2009) und verursacht jährlich hohe Kosten im Gesundheitssystem (Berger et al. 2007; Berger et al. 2009; Berger et al. 2012; Binder et al. 2014; Maes et al. 2013; Stockdale et al. 2017). Der Pathomechanismus beider Erkrankungen beruht auf der Hypersensibilität der Neurone gegenüber schwachen Reizen und/oder der andauernden Signalfortleitung ohne äußere Stimuli. Typische Symptome sind beispielsweise die Wahrnehmung von brennenden Schmerzen bzw. „Ohrenklingeln“ (Tinnitus) ohne kausale Ursache. Die wahrgenommenen Missempfindungen entstehen in Folge einer unphysiologisch gesteigerten Zellaktivität der afferenten Neurone (Alshelh et al. 2016; Li et al. 2015), die sich nach Nervenschädigungen aller Art entwickeln kann, wie z. B. nach Barotrauma, Tumoren, Stoffwechselerkrankungen, Virusinfektionen oder Entzündungen (Xu et al. 2016). Durch die Läsion der sensorischen Nervenzellen der Schmerzwahrnehmung bzw. des auditiven Systems kommt es, aus noch nicht abschließend geklärten Gründen, zu einer Defektheilung mit gesteigerter Synthese diverser Proteine einschließlich spannungsabhängiger Ionenkanäle (Costigan et al. 2009; Hwang et al. 2011). Zu Letzteren zählen auch HCN-Kanäle, die durch das Aufrechterhalten einer andauernden Zellaktivität allmählich zu zentralen Veränderungen in den sensorischen Zentren des Gehirns führen, aus denen die Phantomwahrnehmungen resultieren (Emery et al. 2011; Li et al. 2015; Tetteh et al. 2017).

Eine vielversprechende Strategie zur Unterbindung der pathologischen Signalweiterleitung ist die in der Grundlagenforschung bereits erprobte Modulation der HCN-Kanal-Aktivität. In einem HCN2-*Knock-Out*-Modell konnte die Ausbildung neuropathischer Schmerzen erfolgreich unterdrückt werden, ohne dabei jedoch die zum Schutz notwendige physiologische Schmerzempfindung zu beeinflussen (Emery et al. 2011). Auch eine pharmakologische Herangehensweise durch Mikroinjektion von Ivabradin in die sensible Nervenzellwurzel des N. Trigemini führte zu einer erfolgreichen Aktivitätsminderung der schmerzleitenden Neurone (Young et al. 2014).

Der therapeutische Ansatz, durch medikamentöse Beeinflussung der HCN-Kanäle die Wahrnehmung von Sinnesreizen zu verändern, ist im Begriff ein neues Feld in der Behandlung verschiedener Erkrankungen zu eröffnen (Postea und Biel 2011). Neben der Unterdrückung der Zellaktivität zur Verhinderung von Fehlwahrnehmungen werden HCN-Kanalblocker auch für die gewünschte Generierung von Zellsignalen erprobt, um Blinden zukünftig die Perzeption visueller Reize zu ermöglichen (Marc et al. 2014; Tochitsky et al. 2014).

Die Grundlagenforschung an den HCN-Kanälen hat, fast fünfzig Jahre nach ihrer Entdeckung, an ungeahnter Aktualität gewonnen und die klinische Relevanz dieser Ionenkanäle in verschiedenen medizinischen Bereichen hervorgehoben. Zukünftige Studien, die wie die vorliegende Arbeit die Auswirkung pharmakologischer Interventionen an HCN-Kanälen untersuchen, könnten möglicherweise weiteren Aufschluss über die Bedeutung der HCN-Kanäle liefern. Ihren Beitrag zur Pathogenese von Scheinwahrnehmungen zu verstehen, wäre ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung therapeutischer Interventionen.

7 Zusammenfassung

HCN-Kanäle (*Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channels*) sind spannungsgesteuerte Ionenkanäle, die sich u. a. im Reizleitungssystem des Herzes, im Skelettmuskel und im zentralen Nervensystem (ZNS) befinden und dort an der Steuerung wichtiger physiologischer Funktionen beteiligt sind. Auch in der Netzhaut, die einen Teil des ZNS darstellt, werden HCN-Kanäle exprimiert. Die Erkenntnisse über ihren Beitrag zur Signalcodierung in der Netzhaut sind jedoch noch lückenhaft. Durch die Einführung des HCN-Kanalblockers Ivabradin, einem Medikament zur Behandlung der chronisch stabilen Angina pectoris, wurde das Interesse an HCN-Kanälen in der Netzhaut befeuert. Ivabradin ruft als häufigste Nebenwirkung bei circa 15% der Patienten eine passagere Scheinwahrnehmung von Licht (Phosphene) hervor, die insbesondere bei abrupten Wechseln der Lichtintensität auftritt. Ihr Entstehungsmechanismus ist bisher noch nicht gänzlich geklärt und man nimmt als plausible Ursache die Interaktion von Ivabradin mit den HCN-Kanälen in der Retina an. Es ist nur wenig darüber bekannt, wie sich die pharmakologische Blockade der HCN-Kanäle auf die Signalverarbeitung in der Netzhaut und das Sehvermögen auswirkt.

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, diesen Zusammenhang näher zu beleuchten. Es wurde untersucht, wie sich die zwei wesentlichen Eigenschaften der Netzhaut, ihre Kontrast- und Frequenzsensitivität, unter HCN-Kanalblockade mit Ivabradin veränderten. Für die Experimente wurden die Signale von Ganglienzellen explantierter Mäuseretinae mittels Multielektroden-Arrays extrazellulär abgeleitet. Ganglienzellen stellen die letzten Neurone im Netzwerk der Retina dar und liefern das Endergebnis der retinalen Signalverarbeitung. Unter Lichtstimulation mit spezifischen Reizmustern (Stimuli) wurden der Netzhaut verschiedene Kontraste bzw. Frequenzen präsentiert, um eine Bandbreite von in der Natur befindlichen Lichtverhältnissen zu imitieren und ON- und OFF-Ganglienzellen zu stimulieren. Die Lichtintensität lag im mesopischen Bereich, damit sowohl Stäbchen als auch Zapfen (die Sinnesrezeptoren der Netzhaut) angeregt wurden. Das Reizmuster für Kontraste (als Kontraststimulus bezeichnet) bestand aus einer Abfolge von kurzen Erhöhungen und Erniedrigungen der Lichtintensität relativ zur Hintergrundbeleuchtung. Zur Simulation von Frequenzen wurden sinusoidal modulierte Änderungen der Lichtintensität (Hell-Dunkel-Änderungen) mit schrittweiser Frequenzerhöhung angewendet (Frequenzstimulus). Die Antwortreaktion der Ganglienzellen auf die Stimuli wurde jeweils einmal vor, zweimal während und zwei weitere Male nach Kontakt mit einer Ivabradin-haltigen Pufferlösung aufgezeichnet. Die insgesamt fünf Testreihen wurden anschließend offline mit speziell auf die Stimuli angepasster Software in dem Computerprogramm MatLab analysiert. Für jede einzelne Ganglienzelle wurde ermittelt, welcher minimale Kontrast bzw. welche maximale Frequenz eine Antwortreaktion auslöst. Dieser Wert wurde als ihre individuelle Kontrast- respektive Frequenzschwelle definiert.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Ivabradin die Ganglienzellsignale beeinflusst und zu Veränderungen ihrer Kontrastsensitivität und ihres zeitlichen Auflösungsvermögens führt. Sowohl bei den ON- als auch OFF-Ganglienzellen sanken die Kontrastsschwellen durch HCN-Kanalblockade statistisch signifikant ab, d. h. sie reagierten empfindlicher auf geringe Kontrastabweichungen. Die Herabsetzung der Kontrastsschwellen lässt vermuten, dass auch irrelevante, normalerweise unterschwellige Signale nicht mehr herausgefiltert, sondern von der Netzhaut an das Gehirn weitergeleitet würden. Dies könnte zu visuellen Störungen führen, so wie sie unter Ivabradintherapie beobachtet wurden. OFF-Ganglienzellen zeigten zudem signifikant herabgesetzte Frequenzschwellen, da sie unter Ivabradineinfluss schlechter auf höhere Frequenzen reagierten. Bei den ON-Ganglienzellen veränderten sich die Frequenzschwellen in beide Richtungen: ein Teil der ON-Ganglienzellen konnte hohe Frequenzen besser, der andere Teil schlechter erfassen. Unter der Fragestellung, ob die Änderungen der Frequenzschwellen mit einer veränderten Feuerrate einhergehen, wurden weitere Analysen angeschlossen. Die Feuerraten der Ganglienzellen streuten unter Ivabradin stärker. Während

sich bei den ON-Ganglienzellen eine tendenzielle Zunahme zeigte, nahmen die Feuerraten der OFF-Ganglienzelle dezent ab. Einen eindeutigen Zusammenhang zwischen den veränderten Feuerraten und Frequenzschwellen ließ sich nicht nachweisen. Offenbar kommt es durch Ivabradin zu uneinheitlichen Veränderungen der Frequenzsensitivität und Antwortreaktion von ON- und OFF-Ganglienzellen. Die Übermittlung des Ungleichgewichts zwischen ON- und OFF-Ganglienzellen an das Gehirn könnte eine Fehlinterpretation der visuellen Information bewirken und eine weitere potenzielle Erklärung für die Entstehung von Phosphenen bei der therapeutischen Einnahme von Ivabradin darstellen.

Aufgrund der hohen Signalkonvergenz in der Netzhaut und ihren unterschiedlichen Zelltypen wären weitere Untersuchungen wünschenswert, um Aufschluss für die hier nachgewiesenen Unterschiede zwischen den ON- und OFF-Ganglienzellen zu geben. Dazu eignen sich z. B. Einzelzelleitungen nach Typisierung der einzelnen Zellsubtypen. Ein besseres Verständnis über den Beitrag der HCN-Kanäle zur Signalgenerierung und ihrer pathophysiologischen Relevanz in der Netzhaut könnte zur Entwicklung therapeutischer Ansätze beitragen - so werden bereits pharmakologische Interventionen mit Ivabradin an retinalen HCN-Kanälen erprobt, um Ganglienzellsignale in blinden Netzhäuten zu evozieren.

8 Anhang: Hard- und Software, Materialien, Chemikalien

Hardware

Multielektroden-Array	Modell MEA 60 I, Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen
Einlass-Heizer	Modell PH01, Multi Channel Systems
Heizer unterhalb des MEAS	Modell MEA1060INV, Multi Channel Systems
Konverter für die analogen Signale	MC_Card, Multi Channel Systems
Nachtsichtgerät, Model PS-14	ATN Corporation, San Francisco, USA
Infrarot LEDs	ThorLabs, Modell M940L2
Stereo Zoom Mikroskop	Model SZX7 Olympus, Japan
OLED Monitor	eMagin

Software

Software zur MEA-Ableitung	MC_Rack Multi Channel Systems
Generierung der Stimuli	Visual C++ und OpenGL libraries
MatLab (The MathWorks®, Inc.)	Software für die Analyseprogramme
Generierung der Stimuli	Open Graphics Library, basierend auf Visual C++, Microsoft
Igor Pro 6.03A	WaveMetrics, Lake Oswego, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation
Microsoft Words	Microsoft Corporation
Igor Pro 6.03A	WaveMetrics, Lake Oswego, USA

Materialien

D-Flo Infusionsgerät mit Infusionsregler	Dahlhausen & Co GmbH
Tygon Application Specific Tubing	Saint-Gobain Performance Plastics
Parafilm	Pechiney Plastic France
10-ml-Spritzen	Henke Sass Wolf GmbH
1-ml-Pipetten	VWR International
Filterpapier 90 mm und 110 mm Durchmesser	Whatman, Schleicher&Schuell
Pinzetten, Skalpell, und Skalpellklingen	World Precision Instruments Inc

Mini Mag-Lite AA	Mag Instruments California
alpha-D-Glucose Monohydrat	Carl Roth GmbH
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA
200- μ l-Pipette	Gilson
5-ml-Pipette	Hirschmann EM Techcolor Germany
Messbecher 25, 100, 150, 250, 500 ml	VWR, IsoLab, KIMAX, Schott AG
Messbecher 1000 ml	Schott AG
Messbecher 2000 ml	Hirschmann EM Techcolor Germany
Stoppuhr	

Substanzen/Chemikalien

Ivabradin: Procoralan® Tabletten	Servier
Ames Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Utensilien für die Reinigung der Materialien und der Multielektroden-Arrays

Precision Wipes	Kimberly-Clark Professional
Zitronensäure, Trypsin, Ethanol	Carl Roth GmbH

9 Literaturverzeichnis

- Ahmad KM, Klug K, Herr S, Sterling P, Schein S (2003): Cell density ratios in a foveal patch in macaque retina. *Vis Neurosci* 20, 189-209
- Alshelh Z, Di Pietro F, Youssef AM, Reeves JM, Macey PM, Vickers ER, Peck CC, Murray GM, Henderson LA (2016): Chronic neuropathic pain: It's about the rhythm. *J Neurosci* 36, 1008-1018
- Ames A, 3rd, Nesbett FB (1981): In vitro retina as an experimental model of the central nervous system. *J Neurochem* 37, 867-877
- Andermann Mark L, Kerlin Aaron M, Roumis Demetris K, Glickfeld Lindsey L, Reid RC (2011): Functional Specialization of Mouse Higher Visual Cortical Areas. *Neuron* 72, 1025-1039
- Araki T, Ito M, Oshima T (1961): Potential changes produced by application of current steps in motoneurons. *Nature* 191, 1104-1105
- Atik A (2014): Pathophysiology and treatment of tinnitus: an elusive disease. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 66, 1-5
- Badea TC, Nathans J (2004): Quantitative analysis of neuronal morphologies in the mouse retina visualized by using a genetically directed reporter. *J Comp Neurol* 480, 331-351
- Baden T, Esposti F, Nikolaev A, Lagnado L (2011): Spikes in retinal bipolar cells phase-lock to visual stimuli with millisecond precision. *Curr Biol* 21, 1859-1869
- Baden T, Berens P, Franke K, Roman Roson M, Bethge M, Euler T (2016): The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse. *Nature* 529, 345-350
- Baguley D, McFerran D, Hall D (2013): Tinnitus. *Lancet* 382, 1600-1607
- Banks MI, Pearce RA, Smith PH (1993): Hyperpolarization-activated cation current (I_h) in neurons of the medial nucleus of the trapezoid body: voltage-clamp analysis and enhancement by norepinephrine and cAMP suggest a modulatory mechanism in the auditory brain stem. *J Neurophysiol* 70, 1420-1432
- Barlow HB, Hill RM, Levick WR (1964): Retinal ganglion cells responding selectively to direction and speed of image motion in the rabbit. *J Physiol* 173, 377-407
- Barrow AJ, Wu SM (2009): Low-conductance HCN1 ion channels augment the frequency response of rod and cone photoreceptors. *J Neurosci* 29, 5841-5853
- Baruscotti M, Bottelli G, Milanesi R, DiFrancesco JC, DiFrancesco D (2010): HCN-related channelopathies. *Pflugers Arch* 460, 405-415
- Baumann C (1972): Kinetics of slow thermal reactions during the bleaching of rhodopsin in the perfused frog retina. *J Physiol* 222, 643-663
- Baylor DA, Matthews G, Yau KW (1980): Two components of electrical dark noise in toad retinal rod outer segments. *J Physiol* 309, 591-621
- Baylor DA, Nunn BJ, Schnapf JL (1984): The photocurrent, noise and spectral sensitivity of rods of the monkey *Macaca fascicularis*. *J Physiol* 357, 575-607
- Bemme S, Weick M, Gollisch T (2017): Differential effects of HCN channel block on on and off pathways in the retina as a potential cause for medication-induced phosphene perception. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58, 4754-4767

Berger A, Kramarz P, Kopperud GS, Edelsberg J, Oster G (2007): Economic impact of shifting the locus of care for neuropathic pain from specialists to general practitioners. *Eur J Health Econ* 8, 245-251

Berger A, Toelle T, Sadosky A, Dukes E, Edelsberg J, Oster G (2009): Clinical and economic characteristics of patients with painful neuropathic disorders in Germany. *Pain Pract* 9, 8-17

Berger A, Sadosky A, Dukes E, Edelsberg J, Oster G (2012): Clinical characteristics and patterns of healthcare utilization in patients with painful neuropathic disorders in UK general practice: a retrospective cohort study. *BMC Neurol* 12, 8

Bernal L, Roza C (2018): Hyperpolarization-activated channels shape temporal patterns of ectopic spontaneous discharge in C-nociceptors after peripheral nerve injury. *Eur J Pain* 22, 1377-1387

Berson D: Retinal ganglion cell types and their central projections. In: Basbaum A, Kaneko A, Shepherd G, Westheimer G (Hrsg.): *The senses: a comprehensive reference*. 1. Auflage; Academic Press, Cambridge 2008, 491-520

Biel M, Ludwig A, Zong X, Hofmann F (1999): Hyperpolarization-activated cation channels: a multi-gene family. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 136, 165-181

Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X (2009): Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev* 89, 847-885

Binder A, Tomforde M, Baron R: Neuropathischer Schmerz. In: Baron R, Koppert W, Strumpf M, Willweber-Strumpf A (Hrsg.): *Praktische Schmerzmedizin: Interdisziplinäre Diagnostik - Multimodale Therapie*. 3. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2013, 363-378

Bois P, Bescond J, Renaudon B, Lenfant J (1996): Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol* 118, 1051-1057

Borer JS, Fox K, Jaillon P, Lerebours G (2003): Antianginal and antiischemic effects of ivabradine, an I(f) inhibitor, in stable angina: a randomized, double-blind, multicentered, placebo-controlled trial. *Circulation* 107, 817-823

Bowen RW, Pokorny J, Smith VC (1989): Sawtooth contrast sensitivity: decrements have the edge. *Vision Res* 29, 1501-1509

Boycott B, Wässle H (1999): Parallel processing in the mammalian retina: the proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1313-1327

Britten KH, Shadlen MN, Newsome WT, Movshon JA (1992): The analysis of visual motion: a comparison of neuronal and psychophysical performance. *J Neurosci* 12, 4745-4765

Bryant CD (2011): The blessings and curses of C57BL/6 substrains in mouse genetic studies. *Ann N Y Acad Sci* 1245, 31-33

Bucchi A, Baruscotti M, DiFrancesco D (2002): Current-dependent block of rabbit sino-atrial node I(f) channels by ivabradine. *J Gen Physiol* 120, 1-13

Bucchi A, Tognati A, Milanesi R, Baruscotti M, DiFrancesco D (2006): Properties of ivabradine-induced block of HCN1 and HCN4 pacemaker channels. *J Physiol* 572, 335-346

Caldwell JH, Daw NW (1978): New properties of rabbit retinal ganglion cells. *J Physiol* 276, 257-276

Cangiano L, Gargini C, Della Santina L, Demontis GC, Cervetto L (2007): High-pass filtering of input signals by the I_h current in a non-spiking neuron, the retinal rod bipolar cell. *PLoS One* 2, e1327

Cervetto L, Demontis GC, Gargini C (2007): Cellular mechanisms underlying the pharmacological induction of phosphenes. *Br J Pharmacol* 150, 383-390

Chen S, Wang J, Siegelbaum SA (2001): Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol* 117, 491-504

Cheng L, Kinard K, Rajamani R, Sanguinetti MC (2007): Molecular mapping of the binding site for a blocker of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-modulated pacemaker channels. *J Pharmacol Exp Ther* 322, 931-939

Chichilnisky EJ (2001): A simple white noise analysis of neuronal light responses. *Network* 12, 199-213

Chichilnisky EJ, Kalmar RS (2002): Functional asymmetries in ON and OFF ganglion cells of primate retina. *J Neurosci* 22, 2737-2747

Cleland BG, Levick WR (1974): Properties of rarely encountered types of ganglion cells in the cat's retina and an overall classification. *J Physiol* 240, 457-492

Colin P, Ghaleh B, Monnet X, Su J, Hittinger L, Giudicelli JF, Berdeaux A (2003): Contributions of heart rate and contractility to myocardial oxygen balance during exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284, H676-682

Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup NB, et al. (2017): Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17002

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1414_Rods_and_Cones_-_ru.svg, Wikimedia Commons, Creative Commons Lizenz (CC BY-SA 4.0), Zugriff am 27.01.2019.

Coombs J, van der List D, Wang GY, Chalupa LM (2006): Morphological properties of mouse retinal ganglion cells. *Neuroscience* 140, 123-136

Costigan M, Scholz J, Woolf CJ (2009): Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 32, 1-32

Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE (1990): Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol* 292, 497-523

Cuttle MF, Rusznak Z, Wong AY, Owens S, Forsythe ID (2001): Modulation of a presynaptic hyperpolarization-activated cationic current (I_h) at an excitatory synaptic terminal in the rat auditory brainstem. *J Physiol* 534, 733-744

Dacey DM, Lee BB (1994): The 'blue-on' opponent pathway in primate retina originates from a distinct bistratified ganglion cell type. *Nature* 367, 731-735

De Lange Dzn H (1954): Relationship between critical flicker-frequency and a set of low-frequency characteristics of the eye. *J Opt Soc Am* 44, 380-389

Della Santina L, Bouly M, Asta A, Demontis GC, Cervetto L, Gargini C (2010): Effect of HCN channel inhibition on retinal morphology and function in normal and dystrophic rodents. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 1016-1023

Della Santina L, Piano I, Cangiano L, Caputo A, Ludwig A, Cervetto L, Gargini C (2012): Processing of retinal signals in normal and HCN deficient mice. *PLoS One* 7, e29812

Demb JB, Sterling P, Freed MA (2004): How retinal ganglion cells prevent synaptic noise from reaching the spike output. *J Neurophysiol* 92, 2510-2519

Demontis GC, Longoni B, Barcaro U, Cervetto L (1999): Properties and functional roles of hyperpolarization-gated currents in guinea-pig retinal rods. *J Physiol* 515 (3), 813-828

Demontis GC, Moroni A, Gravante B, Altomare C, Longoni B, Cervetto L, DiFrancesco D (2002): Functional characterisation and subcellular localisation of HCN1 channels in rabbit retinal rod photoreceptors. *J Physiol* 542, 89-97

Demontis GC, Gargini C, Paoli TG, Cervetto L (2009): Selective Hcn1 channels inhibition by ivabradine in mouse rod photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 1948-1955

https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Retina_layers.svg, Peter Hartmann und Marc Gabriel Schmid, Creative Commons Lizenz (CC BY-SA 3.0), Zugriff am 25.01.2019

Diaz-Coranguez M, Ramos C, Antonetti DA (2017): The inner blood-retinal barrier: Cellular basis and development. *Vision Res* 139, 123-137

DiFrancesco D, Tortora P (1991): Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351, 145-147

DiFrancesco JC, DiFrancesco D (2015): Dysfunctional HCN ion channels in neurological diseases. *Front Cell Neurosci* 6, 174

Dong CJ, Hare WA (2003): Temporal modulation of scotopic visual signals by A17 amacrine cells in mammalian retina in vivo. *J Neurophysiol* 89, 2159-2166

Dowling JE, Dubin MW: The vertebrate retina. In: Terjung R (Hrsg.): *Comprehensive physiology*. John Wiley & Sons, New Jersey 2011, 317-339

Emery EC, Young GT, Berrocoso EM, Chen L, McNaughton PA (2011): HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain. *Science* 333, 1462-1466

Fain GL, Quandt FN, Bastian BL, Gerschenfeld HM (1978): Contribution of a caesium-sensitive conductance increase to the rod photoresponse. *Nature* 272, 466-469

Fox K, Ford I, Steg PG, Tendra M, Robertson M, Ferrari R (2009): Relationship between ivabradine treatment and cardiovascular outcomes in patients with stable coronary artery disease and left ventricular systolic dysfunction with limiting angina: a subgroup analysis of the randomized, controlled BEAUTIFUL trial. *Eur Heart J* 30, 2337-2345

Frace AM, Maruoka F, Noma A (1992): Control of the hyperpolarization-activated cation current by external anions in rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 453, 307-318

Fraunfelder FT, Fraunfelder FW, Chambers WA: *Drug-induced ocular side effects*. 7. Auflage; Saunders, Philadelphia 2015

Fyk-Kolodziej B, Pourcho RG (2007): Differential distribution of hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels in cone bipolar cells of the rat retina. *J Comp Neurol* 501, 891-903

Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T (1995): Acute and chronic cardiac and regional haemodynamic effects of the novel bradycardic agent, S16257, in conscious rats. *Br J Pharmacol* 115, 579-586

Gargini C, Demontis GC, Bisti S, Cervetto L (1999): Effects of blocking the hyperpolarization-activated current (I_h) on the cat electroretinogram. *Vision Res* 39, 1767-1774

Ghosh KK, Martin PR, Grunert U (1997): Morphological analysis of the blue cone pathway in the retina of a New World monkey, the marmoset *Callithrix jacchus*. *J Comp Neurol* 379, 211-225

Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, Feigenspan A, Wassle H (2004): Types of bipolar cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 469, 70-82

Goldberg JM, Brown PB (1969): Response of binaural neurons of dog superior olivary complex to dichotic tonal stimuli: some physiological mechanisms of sound localization. *J Neurophysiol* 32, 613-636

Gollisch T, Meister M (2010): Eye smarter than scientists believed: neural computations in circuits of the retina. *Neuron* 65, 150-164

Grabner CP, Ratliff CP, Light AC, DeVries SH (2016): Mechanism of high-frequency signaling at a depressing ribbon synapse. *Neuron* 91, 133-145

Harris NC, Constanti A (1995): Mechanism of block by ZD 7288 of the hyperpolarization-activated inward rectifying current in guinea pig substantia nigra neurons in vitro. *J Neurophysiol* 74, 2366-2378

Hartline HK (1940): The receptive fields of optic nerve fibers. *Am J Physiol* 130, 690-699

He C, Chen F, Li B, Hu Z (2014): Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations. *Prog Neurobiol* 112, 1-23

Hecht S, Schlaer S (1936): Intermittent stimulation by light: V. The relation between intensity and critical frequency for different parts of the spectrum. *J Gen Physiol* 19(6), 965-977

Heflin SJ, Cook PB (2007): Narrow and wide field amacrine cells fire action potentials in response to depolarization and light stimulation. *Vis Neurosci* 24, 197-206

Hellmer CB, Zhou Y, Fyk-Kolodziej B, Hu Z, Ichinose T (2016): Morphological and physiological analysis of type-5 and other bipolar cells in the mouse retina. *Neuroscience* 315, 246-258

Hesse G (2016): Evidence and evidence gaps in tinnitus therapy. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg* 15, Doc04

Hirasawa H, Kaneko A (2003): pH changes in the invaginating synaptic cleft mediate feedback from horizontal cells to cone photoreceptors by modulating Ca²⁺ channels. *J Gen Physiol* 122, 657-671

<http://histology.medicine.umich.edu/resources/eye#electron-micrographs>; Regents of the University of Michigan, 2008, Creative Commons Lizenz (CC BY-NC-SA 3.0), Zugriff am 17.05.2018

Hodgkin AL, Huxley AF (1952): The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J Physiol* 116, 473-496

Hoffman DM, Karasev VI, Banks MS (2011): Temporal presentation protocols in stereoscopic displays: Flicker visibility, perceived motion, and perceived depth. *J Soc Inf Disp* 19, 271-297

Huberman AD, Niell CM (2011): What can mice tell us about how vision works? *Trends Neurosci* 34, 464-473

Hutcheon B, Yarom Y (2000): Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends Neurosci* 23, 216-222

Hwang JH, Chen JC, Yang SY, Wang MF, Liu TC, Chan YC (2011): Expression of COX-2 and NMDA receptor genes at the cochlea and midbrain in salicylate-induced tinnitus. *Laryngoscope* 121, 361-364

Ichinose T, Fyk-Kolodziej B, Cohn J (2014): Roles of ON cone bipolar cell subtypes in temporal coding in the mouse retina. *J Neurosci* 34, 8761-8771

Ingram SL, Williams JT (1996): Modulation of the hyperpolarization-activated current (I_h) by cyclic nucleotides in guinea-pig primary afferent neurons. *J Physiol* 492 (1), 97-106

Ishida AT (1995): Ion channel components of retinal ganglion cells. *Prog Retin Eye Res* 15, 261-280

Ishii TM, Takano M, Ohmori H (2001): Determinants of activation kinetics in mammalian hyperpolarization-activated cation channels. *J Physiol* 537, 93-100

Ito M, Oshima T (1965): Electrical behaviour of the motoneurone membrane during intracellularly applied current steps. *J Physiol* 180, 607-635

Ivanova E, Muller F (2006): Retinal bipolar cell types differ in their inventory of ion channels. *Vis Neurosci* 23, 143-154

Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH (1998): The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 18, 8936-8946

Kamermans M, Fahrenfort I, Schultz K, Janssen-Bienhold U, Sjoerdsma T, Weiler R (2001): Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. *Science* 292, 1178-1180

Kawai F, Horiguchi M, Ichinose H, Ohkuma M, Isobe R, Miyachi E (2005): Suppression by an h current of spontaneous Na⁺ action potentials in human cone and rod photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 390-397

Kim IB, Lee EJ, Kang TH, Chung JW, Chun MH (2003): Morphological analysis of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel 1 (HCN1) immunoreactive bipolar cells in the rabbit retina. *J Comp Neurol* 467, 389-402

Knop GC, Seeliger MW, Thiel F, Mataruga A, Kaupp UB, Friedburg C, Tanimoto N, Muller F (2008): Light responses in the mouse retina are prolonged upon targeted deletion of the HCN1 channel gene. *Eur J Neurosci* 28, 2221-2230

Koepsell K, Wang X, Hirsch JA, Sommer FT (2010): Exploring the function of neural oscillations in early sensory systems. *Front Neurosci* 4, 53

Koizumi A, Jakobs TC, Masland RH (2004): Inward rectifying currents stabilize the membrane potential in dendrites of mouse amacrine cells: patch-clamp recordings and single-cell RT-PCR. *Mol Vis* 10, 328-340

Kolb H (1994): The architecture of functional neural circuits in the vertebrate retina. The proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 2385-2404

Kolb H, Nelson R (1993): OFF-alpha and OFF-beta ganglion cells in cat retina: II. Neural circuitry as revealed by electron microscopy of HRP stains. *J Comp Neurol* 329, 85-110

Kong JH, Fish DR, Rockhill RL, Masland RH (2005): Diversity of ganglion cells in the mouse retina: unsupervised morphological classification and its limits. *J Comp Neurol* 489, 293-310

Koutalos Y, Yau KW (1996): Regulation of sensitivity in vertebrate rod photoreceptors by calcium. *Trends Neurosci* 19, 73-81

Kouyama N, Marshak DW (1992): Bipolar cells specific for blue cones in the macaque retina. *J Neurosci* 12, 1233-1252

Kuffler SW (1953): Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J Neurophysiol* 16, 37-68

Kwan P, Schachter SC, Brodie MJ (2011): Drug-resistant epilepsy. *N Engl J Med* 365, 919-926

Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J, Varela FJ (1999): Measuring phase synchrony in brain signals. *Hum Brain Mapp* 8, 194-208

Langguth B, Kreuzer PM, Kleinjung T, De Ridder D (2013): Tinnitus: causes and clinical management. *Lancet Neurol* 12, 920-930

Larsson HP (2010): How is the heart rate regulated in the sinoatrial node? Another piece to the puzzle. *J Gen Physiol* 136, 237-241

Levin LA, Nilsson SFE, Hoeve JV, Wu S, Kaufman PL, Alm A (Hrsg.). In: Adler's Physiology of the Eye. 11. Auflage; Saunders, Edinburgh 2011 (E-Book)

Lewicki MS (1998): A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. *Network* 9, R53-78

Li S, Kalappa BI, Tzounopoulos T (2015): Noise-induced plasticity of KCNQ2/3 and HCN channels underlies vulnerability and resilience to tinnitus. *Elife* 4, e07242

Light AC, Zhu Y, Shi J, Saszik S, Lindstrom S, Davidson L, Li X, Chiodo VA, Hauswirth WW, Li W, et al. (2012): Organizational motifs for ground squirrel cone bipolar cells. *J Comp Neurol* 520, 2864-2887

Liu M-G, Chen X-F, He T, Li Z, Chen J (2012): Use of multi-electrode array recordings in studies of network synaptic plasticity in both time and space. *Neurosci Bull* 28, 409-422

Maes IH, Cima RF, Vlaeyen JW, Anteunis LJ, Joore MA (2013): Tinnitus: a cost study. *Ear Hear* 34, 508-514

Marc R, Pfeiffer R, Jones B (2014): Retinal prosthetics, optogenetics, and chemical photoswitches. *ACS Chem Neurosci* 5, 895-901

Marshel J H, Garrett ME, Nauhaus I, Callaway EM (2011): Functional specialization of seven mouse visual cortical areas. *Neuron* 72, 1040-1054

Masland RH (2001): The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 4, 877-886

Masland RH (2011): Cell populations of the retina: the proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 4581-4591

Masland RH (2012a): The neuronal organization of the retina. *Neuron* 76, 266-280

Masland RH (2012b): The tasks of amacrine cells. *Vis Neurosci* 29, 3-9

Mathis T, Vignot S, Leal C, Caujolle JP, Maschi C, Mauget-Faysse M, Kodjikian L, Baillif S, Herault J, Thariat J (2017): Mechanisms of phosphenes in irradiated patients. *Oncotarget* 8, 64579-64590

McCormack A, Edmondson-Jones M, Somerset S, Hall D (2016): A systematic review of the reporting of tinnitus prevalence and severity. *Hear Res* 337, 70-79

McGillem GS, Dacheux RF (2001): Rabbit cone bipolar cells: correlation of their morphologies with whole-cell recordings. *Vis Neurosci* 18, 675-685

Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2001): Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem* 268, 1646-1652

Muller F, Scholten A, Ivanova E, Haverkamp S, Kremmer E, Kaupp UB (2003): HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals. *Eur J Neurosci* 17, 2084-2096

<http://multichannelsystems.com>, Multi Channel Systems, MCS GmbH, Reutlingen, Zugriff am 14.05.2017

Naarendorp F, Esdaille TM, Banden SM, Andrews-Labenski J, Gross OP, Pugh EN (2010): Dark light, rod saturation, and the absolute and incremental sensitivity of mouse cone vision. *Journal of Neuroscience* 30, 12495-12507

Nawy S, Jahr CE (1990): Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells. *Nature* 346, 269-271

Nawy S, Jahr CE (1991): cGMP-gated conductance in retinal bipolar cells is suppressed by the photoreceptor transmitter. *Neuron* 7, 677-683

Nelson R, Kolb H, Freed MA (1993): OFF-alpha and OFF-beta ganglion cells in cat retina. I: Intracellular electrophysiology and HRP stains. *J Comp Neurol* 329, 68-84

Niell CM (2011): Exploring the next frontier of mouse vision. *Neuron* 72, 889-892

Noma A, Irisawa H (1976): Membrane currents in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method. *Pflugers Arch* 364, 45-52

O'Connor AB (2009): Neuropathic pain: quality-of-life impact, costs and cost effectiveness of therapy. *Pharmacoeconomics* 27, 95-112

Oi H, Partida GJ, Lee SC, Ishida AT (2008): HCN4-like immunoreactivity in rat retinal ganglion cells. *Vis Neurosci* 25, 95-102

Okano T, Kojima D, Fukada Y, Shichida Y, Yoshizawa T (1992): Primary structures of chicken cone visual pigments: vertebrate rhodopsins have evolved out of cone visual pigments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5932-5936

Pape HC (1996): Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58, 299-327

Parker AJ, Newsome WT (1998): Sense and the single neuron: probing the physiology of perception. *Annu Rev Neurosci* 21, 227-277

Postea O, Biel M (2011): Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 10, 903-914

Pouzat C, Mazor O, Laurent G (2002): Using noise signature to optimize spike-sorting and to assess neuronal classification quality. *J Neurosci Methods* 122, 43-57

Prusky GT, Douglas RM (2004): Characterization of mouse cortical spatial vision. *Vision Res* 44, 3411-3418

Rieke F, Baylor DA (1996): Molecular origin of continuous dark noise in rod photoreceptors. *Biophys J* 71, 2553-2572

Ruzylo W, Tendera M, Ford I, Fox KM (2007): Antianginal efficacy and safety of ivabradine compared with amlodipine in patients with stable effort angina pectoris: a 3-month randomised, double-blind, multicentre, noninferiority trial. *Drugs* 67, 393-405

Sanes JR, Masland RH (2015): The types of retinal ganglion cells: current status and implications for neuronal classification. *Annu Rev Neurosci* 38, 221-246

Santoro B, Tibbs GR (1999): The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci* 868, 741-764

Santoro B, Grant SG, Bartsch D, Kandel ER (1997): Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14815-14820

Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR (1998): Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93, 717-729

- Satoh TO, Yamada M (2000): A bradycardiac agent ZD7288 blocks the hyperpolarization-activated current (I_h) in retinal rod photoreceptors. *Neuropharmacology* 39, 1284-1291
- Savelieva I, Camm AJ (2006): Novel I_f current inhibitor ivabradine: safety considerations. *Adv Cardiol* 43, 79-96
- Schiefer U, Pätzold J, Krapp E, Dannheim F, Artes PH: Perimetrie. In: Kroll P, Kühle M, Kühle HJ (Hrsg): *Augenärztliche Untersuchungsmethoden*. 3., vollständig überarb. und erweiterte Auflage; Thieme, Stuttgart 2008, 112-137
- Seeliger MW, Brombas A, Weiler R, Humphries P, Knop G, Tanimoto N, Müller F (2011): Modulation of rod photoreceptor output by HCN1 channels is essential for regular mesopic cone vision. *Nat Commun* 2, 532
- Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB (1999): Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9391-9396
- Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D, Cohen IS (1999): Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res* 85, e1-6
- Smith RG, Dhingra NK (2009): Ideal observer analysis of signal quality in retinal circuits. *Prog Retin Eye Res* 28, 263-288
- Sothilingam V, Michalakakis S, Garcia Garrido M, Biel M, Tanimoto N, Seeliger MW (2016): HCN1 channels enhance rod system responsivity in the retina under conditions of light exposure. *PLoS One* 11, e0147728
- Stein RB, French AS, Holden AV (1972): The frequency response, coherence, and information capacity of two neuronal models. *Biophys J* 12, 295-322
- Stockdale D, McFerran D, Brazier P, Pritchard C, Kay T, Dowrick C, Hoare DJ (2017): An economic evaluation of the healthcare cost of tinnitus management in the UK. *BMC Health Serv Res* 17, 577
- Stradleigh TW, Ogata G, Partida GJ, Oi H, Greenberg KP, Krempely KS, Ishida AT (2011): Colocalization of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel subunits in rat retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 519, 2546-2573
- Strettoi E, Masland RH (1995): The organization of the inner nuclear layer of the rabbit retina. *J Neurosci* 15, 875-888
- Strettoi E, Novelli E, Mazzoni F, Barone I, Damiani D (2010): Complexity of retinal cone bipolar cells. *Prog Retin Eye Res* 29, 272-283
- Sulfi S, Timmis AD (2006): Ivabradine - the first selective sinus node I_f channel inhibitor in the treatment of stable angina. *Int J Clin Pract* 60, 222-228
- Sun W, Li N, He S (2002): Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 451, 115-126
- Tardif JC, Ford I, Tendera M, Bourassa MG, Fox K (2005): Efficacy of ivabradine, a new selective I_f inhibitor, compared with atenolol in patients with chronic stable angina. *Eur Heart J* 26, 2529-2536
- Tetteh H, Lee M, Lau CG, Yang S (2017): Tinnitus: Prospects for Pharmacological Interventions With a Seesaw Model. *Neuroscientist* 24, 353-367
- Tinsley JN, Molodtsov MI, Prevedel R, Wartmann D, Espigule-Pons J, Lauwers M, Vaziri A (2016): Direct detection of a single photon by humans. *Nat Commun* 7, 12172

Tochitsky I, Polosukhina A, Degtyar VE, Gallerani N, Smith CM, Friedman A, Van Gelder RN, Trauner D, Kaufer D, Kramer RH (2014): Restoring visual function to blind mice with a photoswitch that exploits electrophysiological remodeling of retinal ganglion cells. *Neuron* 81, 800-813

Tolhurst DJ, Movshon JA, Dean AF (1983): The statistical reliability of signals in single neurons in cat and monkey visual cortex. *Vision Res* 23, 775-785

Tsai TI, Joachimsthaler A, Kremers J (2017): Mesopic and photopic rod and cone photoreceptor-driven visual processes in mice with long-wavelength-shifted cone pigments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58, 5177-5187

Tse S, Mazzola N (2015): Ivabradine (Corlanor) for heart failure: The first selective and specific If inhibitor. *P T* 40, 810-814

Tsukamoto Y, Omi N (2017): Classification of mouse retinal bipolar cells: type-specific connectivity with special reference to rod-driven All amacrine pathways. *Front Neuroanat* 11, 92

Ulrich D (2002): Dendritic resonance in rat neocortical pyramidal cells. *J Neurophysiol* 87, 2753-2759

Umino Y, Solessio E, Barlow RB (2008): Speed, spatial, and temporal tuning of rod and cone vision in mouse. *Journal of Neuroscience* 28, 189-198

Van Essen DC, Drury HA (1997): Structural and functional analyses of human cerebral cortex using a surface-based atlas. *J Neurosci* 17, 7079-7102

Volgyi B, Chheda S, Bloomfield SA (2009): Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *J Comp Neurol* 512, 664-687

Wang J, Chen S, Siegelbaum SA (2001): Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions. *J Gen Physiol* 118, 237-250

Wang WT, Wan YH, Zhu JL, Lei GS, Wang YY, Zhang P, Hu SJ (2006): Theta-frequency membrane resonance and its ionic mechanisms in rat subicular pyramidal neurons. *Neuroscience* 140, 45-55

Wassle H (2004): Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 5, 747-757

Wassle H, Boycott BB (1991): Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev* 71, 447-480

Wassle H, Puller C, Muller F, Haverkamp S (2009): Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. *J Neurosci* 29, 106-117

Wei W, Elstrott J, Feller MB (2010): Two-photon targeted recording of GFP-expressing neurons for light responses and live-cell imaging in the mouse retina. *Nat Protoc* 5, 1347-1352

Wong RO, Meister M, Shatz CJ (1993): Transient period of correlated bursting activity during development of the mammalian retina. *Neuron* 11, 923-938

Wu SM (2010): Synaptic organization of the vertebrate retina: general principles and species-specific variations: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 1263-1274

Xu L, Zhang Y, Huang Y (2016): Advances in the Treatment of Neuropathic Pain. *Adv Exp Med Biol* 904, 117-129

Xue WN, Wang Y, He SM, Wang XL, Zhu JL, Gao GD (2012): SK- and h-current contribute to the generation of theta-like resonance of rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons at hyperpolarized membrane potentials. *Brain Struct Funct* 217, 379-394

y Cajal SFR: La Retine des Vertebres. In: Carnoy JB (Hrsg.): La Cellule: Recueil de cytologie et d'histologie générale. Band 9; Forgotten Books, London 2018

Young GT, Emery EC, Mooney ER, Tsantoulas C, McNaughton PA (2014): Inflammatory and neuropathic pain are rapidly suppressed by peripheral block of hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated ion channels. *Pain* 155, 1708-1719

Young RW (1971): The renewal of rod and cone outer segments in the rhesus monkey. *J Cell Biol* 49, 303-318

Zaghloul KA, Boahen K, Demb JB (2003): Different circuits for ON and OFF retinal ganglion cells cause different contrast sensitivities. *J Neurosci* 23, 2645-2654

Zaghloul KA, Manookin MB, Borghuis BG, Boahen K, Demb JB (2007): Functional circuitry for peripheral suppression in Mammalian Y-type retinal ganglion cells. *J Neurophysiol* 97, 4327-4340

Danksagung

Meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. Tim Gollisch möchte ich für die Vergabe des Dissertationsthemas an mich sowie die große Unterstützung und Geduld sehr danken. Ich habe bei ihm immer ein offenes Ohr, Antworten auf meine Fragen und Hilfestellung bei Problemen gefunden. Sein Engagement und Interesse an meiner Arbeit waren maßgeblich am Gelingen dieser Dissertation beteiligt.

Ein großer Dank gilt den Mitarbeitern des „Gollisch Lab Teams“ des Jahres 2012, das mich herzlich aufgenommen und im Labor begleitet hat: Mohammad Khani, Vidhyasankar Krishnamoorthy, Fernando Rozenblit, Michael Weick, Norma Kühn, Sebastian Bemme und Daisuke Takeshita. Sebastian, Mohammad, Michael und Vidhya haben mich in die Labortechnik und Gewebepräparation eingeführt und standen mir bei Schwierigkeiten aufgrund ihrer großen Erfahrung mit Rat zur Seite. Die ansteckende Begeisterung für die Retinaforschung hat uns oft bis spät abends Zeit im Labor verbringen lassen. Für diese Motivation und den Rückhalt im Team bin ich außerordentlich dankbar.

Herrn Prof. Dr. Hoerauf, Herrn Prof. Dr. Feltgen und dem Ärzteteam der Augenklinik danke ich neben ihrer Zugewandtheit den Studenten gegenüber für die hervorragende Lehre, die zu meiner Wahl einer Dissertation mit ophthalmologischem Thema beigetragen hat.