

1.	Einleitung	4
1.1	Aufgabenstellung	5
2.	Material und Methoden	6
2.1	Anatomie der Netzhaut und neurale Signalverarbeitung.....	6
2.2	Das Elektretinogramm.....	10
2.2.1	Ursprung der A-Welle.....	11
2.2.2	Ursprung der B-Welle.....	12
2.2.3	Ursprung der C-Welle.....	13
2.2.4	Oszillatorische Potentiale.....	13
2.3	Versuchstiere.....	14
2.4	Geräte und Versuchsanordnung.....	14
2.4.1	Versuchsdurchführung.....	16
2.5	Datenauswahl.....	18
2.5.1	Basis-ERG.....	18
2.5.2	A-Welle.....	19
2.5.3	C-Welle.....	20
2.5.4	Oszillatorische Potenziale.....	21
2.6	Spezielle Auswertungen.....	22
2.6.1	Statistische Auswertung des Basis- ERG.....	22
2.6.2	Statistische Auswertung durch Boxplot-Diagramme.....	23
2.7	Histologie.....	25

3.	Ergebnisse	26
3.1.	Statistische Analyse.....	26
3.1.1.	A-Wellen-Amplituden Mausstamm AMOG.....	26
3.1.1.	A-Wellen-Amplituden Mausstamm OLA.....	28
3.1.1.	A-Wellen-Amplituden AMOG vs. OLA.....	29
3.1.2.	A-Wellen-Latenzen Mausstamm AMOG.....	30
3.1.2.	A-Wellen-Latenzen Mausstamm OLA.....	32
3.1.2.	A-Wellen-Latenzen AMOG vs. OLA	33
3.1.3.	B-Wellen-Amplituden Mausstamm AMOG.....	34
3.1.3.	B-Wellen-Amplituden Mausstamm OLA.....	36
3.1.3.	B-Wellen-Amplituden AMOG vs. OLA.....	38
3.1.4.	B-Wellen-Latenzen Mausstamm AMOG.....	39
3.1.4.	B-Wellen-Latenzen Mausstamm OLA.....	42
3.1.4.	B-Wellen-Latenzen AMOG vs. OLA.....	43
3.1.5.	Oszillatorische Potenziale Mausstamm AMOG.....	44
3.1.5.	Oszillatorische Potenziale Mausstamm OLA.....	46
3.1.5.	Oszillatorische Potenziale AMOG vs. OLA.....	46
3.1.6.	Oszillatorische Potenziale Latenzzeit Mausstamm AMOG.....	47
3.1.6.	Oszillatorische Potenziale Latenzzeit Mausstamm OLA.....	49
3.1.6.	Oszillatorische Potenziale Latenzzeit AMOG vs. OLA.....	49
3.1.7.	C-Wellen-Amplituden Mausstamm AMOG.....	50
3.1.7.	C-Wellen-Amplituden Mausstamm OLA.....	52
3.1.7.	C-Wellen-Amplituden AMOG vs. OLA.....	53
3.1.8.	C-Wellen-Latenzen Mausstamm AMOG.....	54
3.1.8.	C-Wellen-Latenzen Mausstamm OLA.....	56
3.1.8.	C-Wellen-Latenzen Mausstamm AMOG vs. OLA.....	57

3.2.	Histologie.....	58
4.	Diskussion.....	62
4.1.	Fragestellung.....	62
4.2.	Ergebnisse.....	62
4.3.	Diskussion.....	63
4.4.	Ausblick.....	64
5.	Zusammenfassung	65
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	67
7.	Literaturverzeichnis	68
8.	Danksagung.....	72
9.	Lebenslauf.....	73
10.	Eidesstattliche Erklärung.....	74

1. Einleitung

1. Einleitung

Das Elektretinogramm (Abb.1) ist die Aufzeichnung von elektrischen Spannungsschwankungen, die man nach Belichtung der Netzhaut, zwischen Auge und Schläfe ableiten kann. Die Methode ist klinisch und als Methode zur Forschung etabliert. Sie beruht auf der elektrischen Antwort zahlreicher neuronaler und nicht-neuronaler Zellen in der Netzhaut auf den Lichtreiz und ermöglicht Rückschlüsse auf die funktionelle Integrität und die Physiologie der Netzhaut bzw. einzelner ihrer Elemente. Die Begründer des Elektretinogramms sind Holmgren (1870), sowie Dewar (1877) und McKendrick (1873).

Der $\beta 1/\beta 2$ ki/ki AMOG-Mausstamm (siehe unten) entstand durch genetische Modifikation der Na, K-ATPase, um deren Funktion näher zu charakterisieren. Bei der Untersuchung der Mäuse wurden Außer einer Degeneration der Netzhaut keine weiteren phänotypischen Abnormalitäten festgestellt(1).

Die Na, K-ATPase ist eine ubiquitär vorhandene Ionenpumpe innerhalb der Plasmamembran (1). Biochemisch ist Sie eine ATPase, d.h. ein Enzym, das unter Energieverbrauch Adenosintriphosphat in Adenosindiphosphat und Phosphat spaltet. Sie reguliert den Fluss von Natrium- und Kaliumionen durch die Plasmamembran und beeinflusst so durch Veränderung von Ionengradienten Zellaktivitäten wie Größe und Volumen (1). Weiterhin ermöglicht Sie im Rahmen der Reizleitung im ZNS, die Entstehung von Aktionspotentialen in Nervenzellen (1). Weitere Aufgaben sind sekundär aktivierte Transportsysteme, wodurch die Aufnahme von z.B. Kohlenhydraten im Duodenum ermöglicht wird (1).

Die Na, K-ATPase ist ein Heterodimer (1). Sie besteht aus 3 α - ($\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$) und 3 β -Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 3$). Die α -Untereinheit umfasst die katalytischen und die Transportaktivitäten der ATPase (1). Die Rolle der β -Untereinheit ist noch nicht abschließend geklärt. Die benannten Untereinheiten der Na, Ka-ATPase zeigen ein spezifisches Verteilungsmuster im Organismus.

Die $\alpha 1$ -Untereinheit ist in allen Geweben vertreten. Die $\alpha 2$ -Untereinheit ist hauptsächlich in der Sklettmuskelatur, Herz sowie im Gehirn und die $\alpha 3$ -Untereinheit ist nur im Herzen und Gehirn vertreten (1).

Die $\beta 1$ -Untereinheit kommt fast im gesamten Nervengewebe vor, speziell in Neuronen und Astrocyten (1). Die $\beta 2$ -Untereinheit der Na, Ka-ATPase findet man überwiegend in Gliazellen vom ZNS, in Körnerzellen der Kleinhirnrinde sowie in Photorezeptoren der Netzhaut und die $\beta 3$ -Untereinheit in der menschlichen Plazenta (1).

1987 beschrieb Antonicek (36), dass die $\beta 2$ -Untereinheit der Na, Ka-ATPase als Haftungsmolekül auf Gliazellen des ZNS (Adhesion Molecule on Glia = AMOG) vorkommt. So vermittelt sie die Haftung zwischen Neuronen und Astrocyten (1).

In Vitro Versuche von Müller-Husmann et al. 1993 (35) wiesen darauf hin, dass nur die $\beta 2$ -Untereinheit, jedoch nicht die $\beta 1$ -Untereinheit der Na, Ka-ATPase, das Nervenwachstum fördert (1). Gloor konnte zeigen, dass ein monoklonaler Antikörper gegen die $\beta 2$ -Untereinheit die Haftung von Neuronen an Astrocyten blockiert (1). Hieraus resultierte eine gesteigerte Aktivität der Na, K-ATPase von Astrocyten.

Es wird angenommen, dass die Funktionen der $\beta 2$ -Untereinheit Zellerkennung, Ionentransport und die Steuerung des Ionenmilieus sind (1).

1. Einleitung

Die $\beta 2$ -0-Mutant-Mäuse, welche die $\beta 2$ Untereinheit nicht besitzen, zeigen 15 Tage nach der Geburt fehlende motorische Koordination. Weiterhin zeigen die Mäuse Lähmungen und einen Tremor der Extremitäten (1). Sie sterben am 17. und 18. Tag nach der Geburt. Die morphologische Analyse des Zentralnervensystems von 17 Tage alten $\beta 2$ -0-Mutant-Mäusen ergab das Vorhandensein von vergrößerten Herzkammern und verdickten Astrocyten im Hirnstamm, Thalamus und dem Rückenmark. Zusätzlich hierzu, wurden degenerierende Photorezeptoren in der Netzhaut gefunden (1). Diese morphologischen Abnormitäten führten zu dem Schluss, dass sie entweder durch die Abwesenheit der Pumpaktivität bzw. der Haftungsfunktion oder durch beide Defekte verursacht werden (1).

Um zwischen diesen Möglichkeiten unterscheiden zu können, entstanden über homologe Rekombination von embryonalen Stammzellen, die $\beta 2/\beta 1$ -ki/ki-Mäuse, auch AMOG-Mäuse genannt. In diesen Tieren wurde die $\beta 2$ -Untereinheit durch die $\beta 1$ -Untereinheit ersetzt (1).

Im Gegensatz zu den $\beta 2$ -0-Mutant-Mäusen, haben die AMOG-Mäuse eine normale Lebensspanne und zeigen sowohl in der Motorik als auch in der Morphologie des ZNS keinerlei Auffälligkeiten (1). Darüber hinaus haben die AMOG-Mäuse, im Vergleich zu den $\beta 2$ -0-Mutant-Mäusen eine geringer ausgeprägte Dystrophie von Photorezeptoren. Das macht sie für die Augenheilkunde interessant, da die Netzhautdegeneration mittels Elektoretinographie näher charakterisiert werden kann. Durch das Elektoretinogramm (ERG) lässt sich ggf ein vorhandener Defekt auf die einzelnen Netzhautebenen eingrenzen. Durch ERG-Verlaufsuntersuchungen kann die zeitliche Entwicklung der Funktionsstörung beschrieben werden (3-7).

1.1 Aufgabenstellung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die elektoretinografische Charakterisierung der $\beta 2/\beta 1$ -ki/ki-AMOG-Mäuse. Die retinale Phänotypisierung der AMOG-Mäuse erlaubt es, ihre Netzhautveränderungen als Modell für menschliche Netzhautdystrophien zu nutzen. Darüber hinaus ist es denkbar, durch die Charakterisierung dieses Mausmodells die Rolle der Na-K-ATPase für Netzhautfunktion beim Menschen und ihre mögliche Relevanz für humane Netzhautdystrophien zu erkennen. Die erblichen Netzhautdystrophien beim Menschen umfassen eine Vielzahl von Erkrankungen, die sich hinsichtlich ihres zugrunde liegenden Gendefekte, ihrer Funktionsstörung sowie ihrer phänotypischen Erscheinung unterscheiden.

Es stellt sich die Frage, ob es Hinweise gibt, dass die Na-K-ATPase eine Rolle bei erblichen Netzhautdegenerationen des Menschen spielt. Schließlich soll versucht werden, die Rolle der Na-K-ATPase für die Netzhautfunktion besser zu verstehen..

Aus dieser Aufgabenstellung entwickeln sich folgende Fragen:

1) Welche qualitativen und quantitativen Unterschiede der Netzhautfunktion lassen sich durch elektrophysiologische Untersuchungen zwischen $\beta 2/\beta 1$ -ki/ki-AMOG-Mäuse und $\beta 2/\beta 1$ +/-OLA-Mäuse (Kontrollen) darstellen?

2) Welche Rolle spielt die Ersetzbarkeit der $\beta 2$ -Untereinheit durch die $\beta 1$ -Untereinheit der Na-Ka-ATPase in der Retina?

3) Wie lassen sich die histologischen und elektoretinographischen Befunde deuten?

2. Material und Methoden

2.1 Anatomie der Netzhaut und neurale Signalverarbeitung

Das Licht wird in der Netzhaut von Wirbeltieren durch zwei verschiedene Rezeptorsysteme verarbeitet. Die sehr lichtsensitiven Stäbchenrezeptoren ermöglichen das Sehen bei geringer Lichtstärke und die Zapfenrezeptoren sind für das Sehen bei Licht höherer Intensität, wie zum Beispiel das Tageslicht, verantwortlich. Beide Rezeptoren der Retina reagieren auf Lichtreiz mit einer Hyperpolarisation.

Diese beruht auf der Aktivierung des Sehfärbstoffes Rhodopsin, welcher sich in den Außensegmenten der Rezeptoren befindet. Das aktivierte Rhodopsin reagiert mit einem G-Protein, dem Transducin. Dabei wird GDP- zu GTP-Transducin katalysiert. Aktiviertes Transducin (GTP^*T) wiederum aktiviert die Phosphodiesterase (GTP^*T^*PDE), die cyclisches GMP (cGMP) zu GMP hydrolysiert. Die damit einsetzende Abnahme der cGMP-Konzentration, verursacht das Schließen von Ionen-Kanälen in der Zellmembran der Außensegmente.

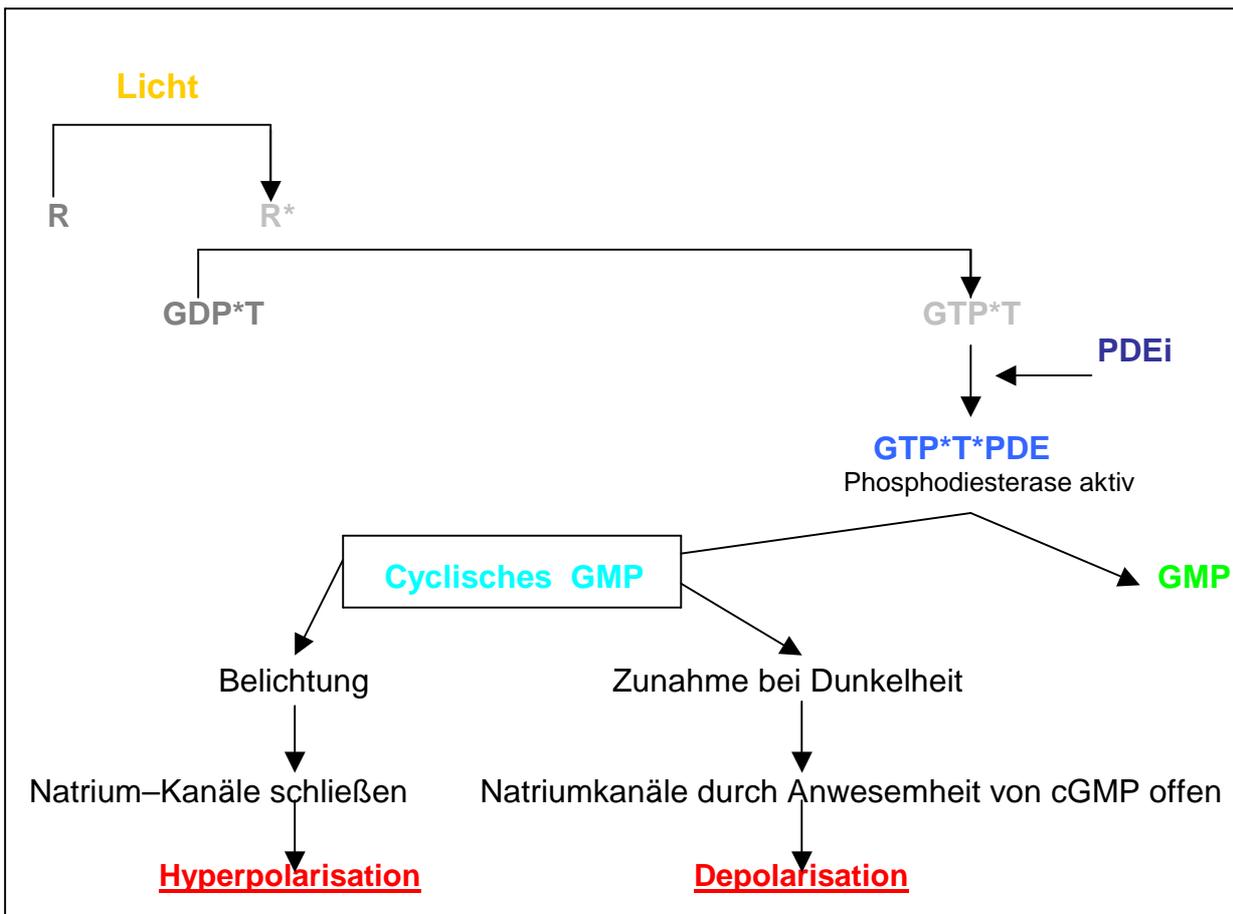


Abb. 1: Phototransduktion

R= Rhodopsin; R*= aktiviertes Rhodopsin; GDP= Guanosindiphosphat;
T= Transducin; GTP= Guanosintriphosphat; PDEi= inaktivierte Phosphodiesterase ;
PDE= aktivierte; Phosphodiesterase; GMP= Guanosinmonophosphat
cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat

2. Material und Methoden

Das Ergebnis ist eine Hyperpolarisation der Rezeptoren und eine reduzierte Ausschüttung des Transmitters Glutamat an den Synapsen. In Dunkelheit sind diese Ionen-Kanäle durch die Anwesenheit von cGMP offen. Die Folge sind Depolarisation und Freisetzung des Transmitters Glutamat. In der darauffolgenden Signalverarbeitung unterscheiden sich beide Photorezeptoren der Retina voneinander (Abb. 1).

Zwanzig bis hundert **Zapfen** bilden Synapsen mit drei bis fünfzehn On- bzw. Off-Bipolarzellen, die wiederum jeweils mit einer On- bzw. Off-Ganglienzelle verbunden sind (Abb. 2a/b). Aufgrund verschiedener Chemorezeptoren an den Synapsen reagieren die beiden Bipolarzelltypen auf den Transmitter Glutamat mit unterschiedlicher elektrischer Antwort. Es kommt zur Depolarisation von On-Bipolarzellen, da die Anwesenheit von Glutamat an den metabotropen Rezeptoren (mGluR6) der Synapsen zum Schluß von Kationen-Kanälen an ihrer Zellmembran führt.

Bei Off-Bipolarzellen jedoch trifft Glutamat auf ionotrope Rezeptoren in den Synapsen (iGluR) und bewirkt die Öffnung von Kationen-Kanälen *an der Zellmembran*. Sie geben somit das Signal der Photorezeptoren gleichsinnig weiter und hyperpolarisieren.

Während also die Erregung der Zapfen schon durch die Bipolaren eine OFF/ON-Differenzierung erfährt, welche direkt zu den OFF- bzw. ON-Ganglien weitergeleitet wird, erreicht die Erregung der **Stäbchen** über metabotrope Glutamat-Rezeptoren die Stäbchen-Bipolaren (=ON-Bipolare), und über vor allem zwei Amakrinzelltypen (A11 und A17) die OFF- bzw. ON-Ganglienzellen (Abb. 2a/b; 3).

Eine einzelne ON-Ganglienzelle erhält somit neben den Signalen von 3 bis 15 Zapfen-ON-Bipolaren die Signale von 5 A11-Amakrinzellen (Abb.2b), welche über etwa 100 Stäbchen-Bipolarzellen mit ca. 21000 Stäbchen in Verbindung stehen (Kleinfeld-ON-Ganglienzelle). In einer einzelnen Großfeld-OFF-Ganglienzelle dagegen laufen die Informationen von 250 A17-Amakrinzellen zusammen, welche insgesamt 75000 Stäbchen repräsentieren. Dazu kommen Signale von den Großfeld-A17-Amakrinzellen (Abb. 2b), welche in der inneren plexiformen Schicht mit allen Zellen in Verbindung stehen (29).

2. Material und Methoden

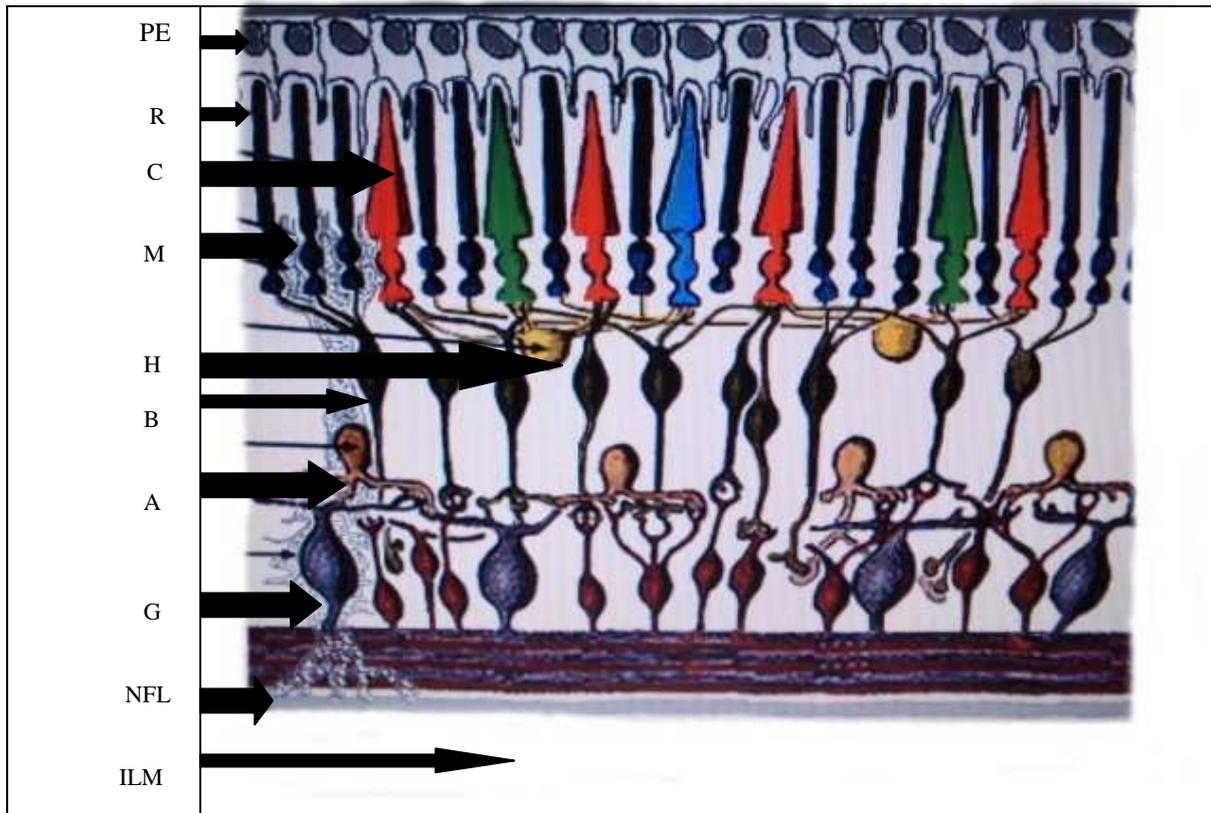


Abb. 2a: Schematische Aufbau der Netzhaut (29; 33)

ILM= Membrana limitans interna
 NFL= Nervenfaserschicht
 G= Ganglienzellen; A= Amakrinzellen; M= Müllerzellen = Ganglienzellschicht
 B= Bipolarzellen = Innere Plexiforme Schicht
 H= Horizontale Zellen; C= Zapfenrezeptoren; R= Stäbchenrezeptoren = Innere Körnerschicht
 PE= Pigmentepithelzellen

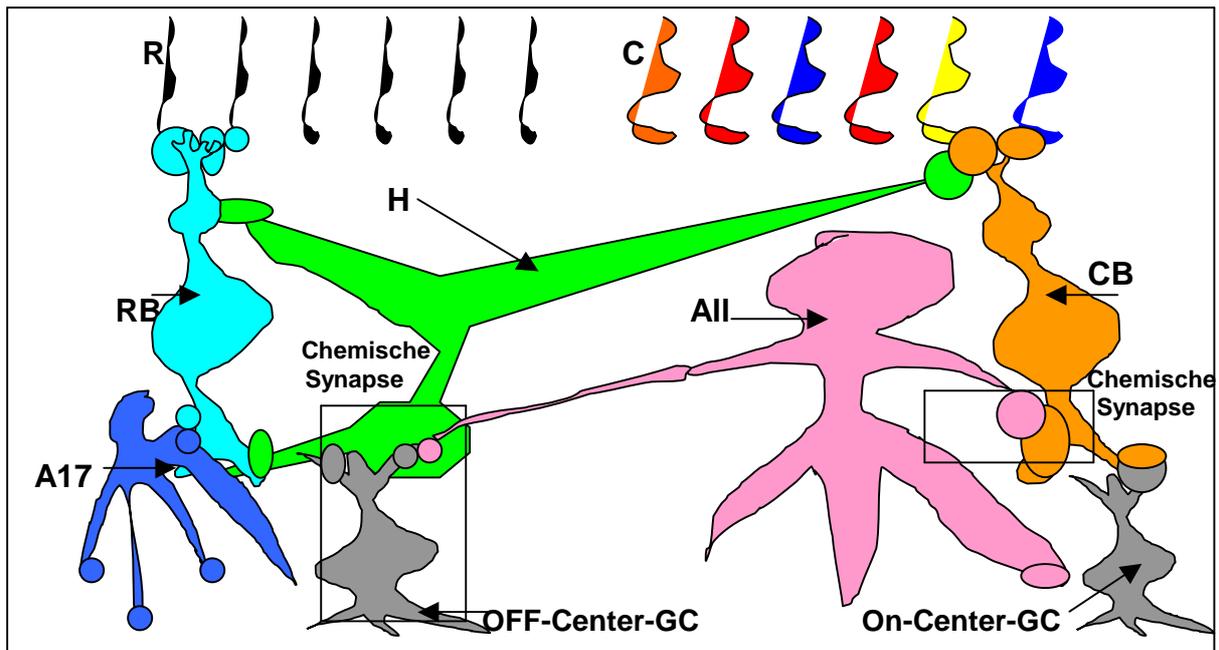


Abb. 2b: Unterschiede in der Erregungsfortleitung zwischen Stäbchen und Zapfen(33):
 R= Stäbchen; C= Zapfen; RB= Bipolarzellen der Stäbchen; CB= Bipolarzellen der Zapfen;
 H= Horizontale Zelle; A17/All= Amakrinzelltypen; OCG= Off-Ganglienzelle; OGC= On-Ganglienzelle

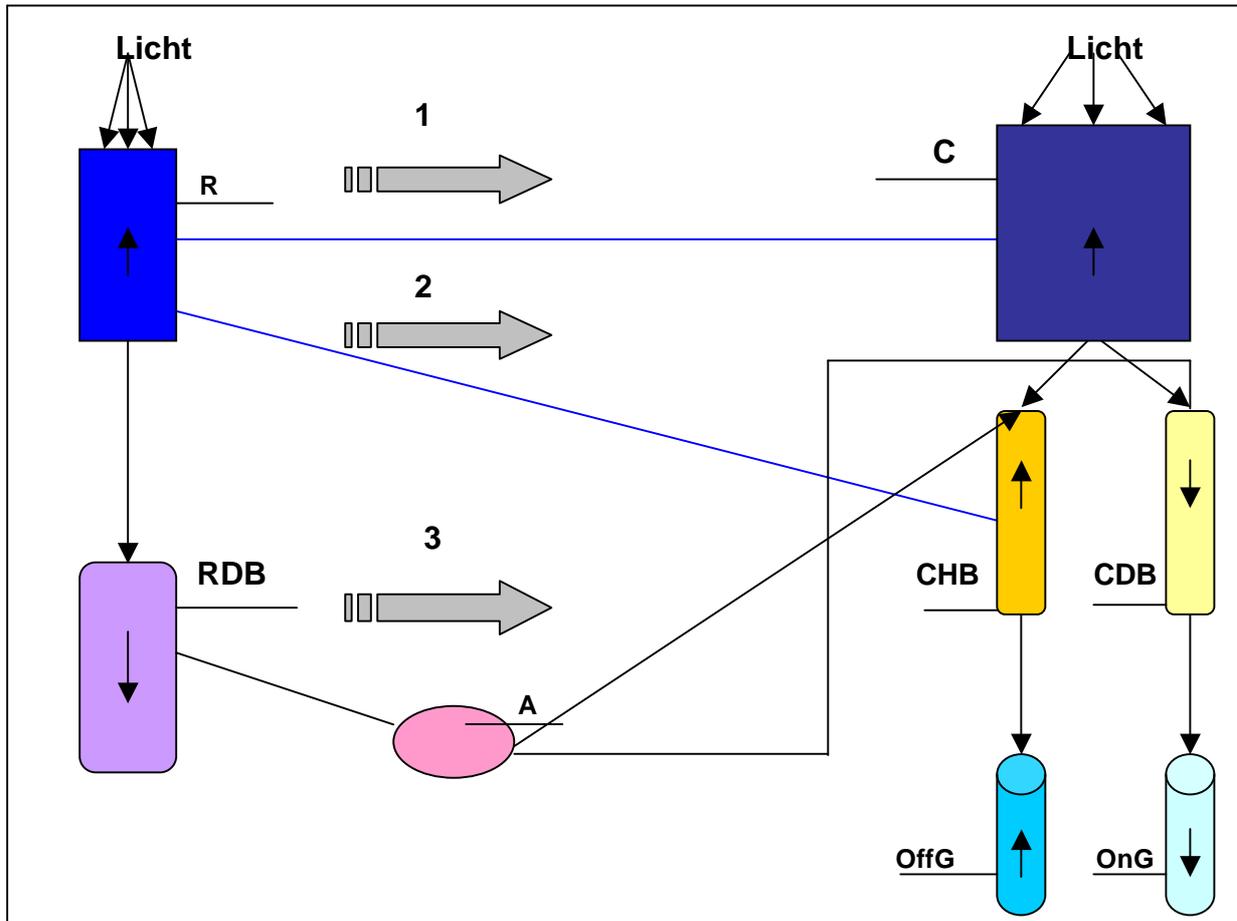


Abb. 3: Signaltransduktionswege der Stäbchenrezeptoren

R= Stäbchenrezeptor; C= Zapfenrezeptor;
 RDB= depolarisierende Stäbchen-Bipolarzelle; A= Amakrinzellen;
 CHB= hyperpolarisierende Zapfen-Bipolarzelle;
 CDB= depolarisierende Zapfen-Bipolarzelle
 OffG= Off-Ganglienzellen; OnG=On-Ganglienzellen

2.2 Das Elektretinogramm

Das Elektretinogramm (Abb.4) ist die Aufzeichnung von elektrischen Spannungsschwankungen (5; 9), die man bei Belichtung der Netzhaut zwischen Auge und Schläfe ableiten kann. Es beruht auf der elektrischen Antwort zahlreicher neuronaler und nicht-neuronaler Zellen(5; 8; 9) in der Netzhaut auf den Lichtreiz.

Bei Helladaptation der Netzhaut (photopisches ERG) prüft man die Zapfen-Funktion und bei Dunkeladaptation (skotopisches ERG) die Stäbchen-Funktion.

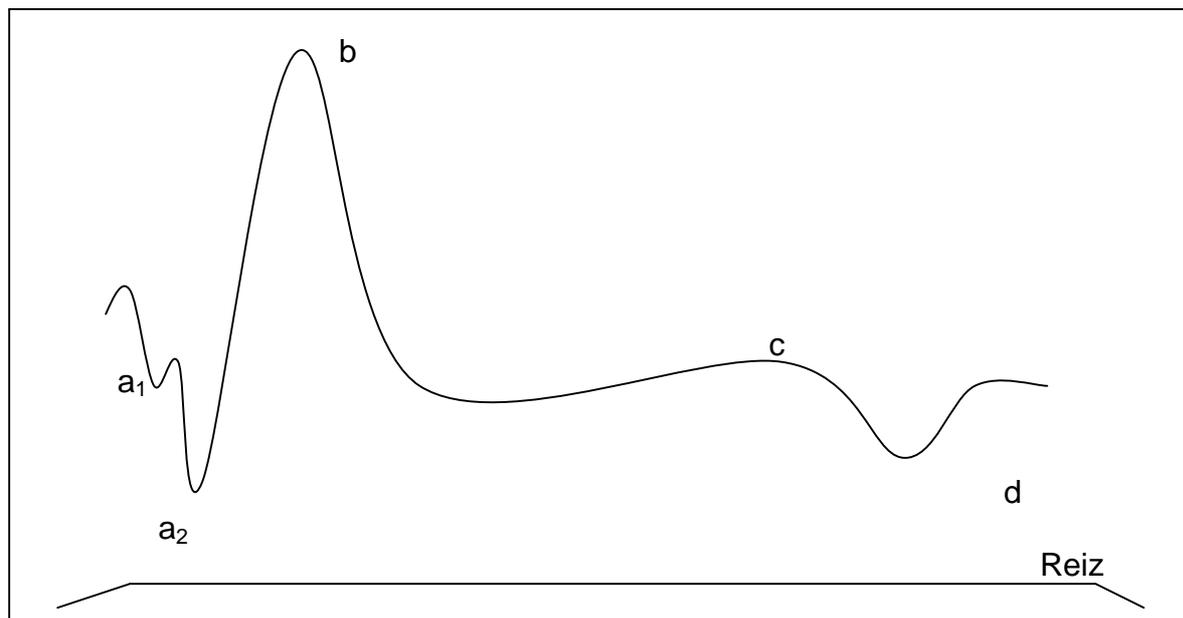


Abb. 4: Schematische Abbildung der ERG-Kurvenkomponenten a1, a2, b, c und d

Durch deren radiäre Anordnung innerhalb der Retina und der darauf basierenden Richtung der transretinalen Ionenströme entstehen Feldpotentiale von charakteristischem, polyphasischen Verlauf.

Im normalen ERG unterscheidet man verschiedene Abschnitte, die zeitlich aufeinander folgen, nämlich die A-, B-, C-, und D-Welle (Einthofen1908).

Der Ursprung der **A-Welle** liegt im Bereich der Photorezeptoren. Sie lässt sich in einen schnelleren Anteil a_1 sowie einen langsameren Anteil a_2 unterteilen.

Die Zapfenrezeptoren, die schneller reagieren, sind für den Anteil a_1 , und die Stäbchenrezeptoren, die langsam adaptieren, für den Anteil a_2 verantwortlich.

Die folgende positive **B-Welle** repräsentiert die Aktivität der den Photorezeptoren nachgeschalteten Bipolarzellen. Auf die B-Welle folgt die langsamere positive **C-Welle**, deren Verlauf die Aktivität des Pigmentepithels wiedergibt. Die D-Welle stellt eine Off-Antwort der Bipolarzellen und wahrscheinlich auch der Photorezeptoren dar, die jedoch erst nach langandauernden Lichtreizen erkennbar wird(10; 11).

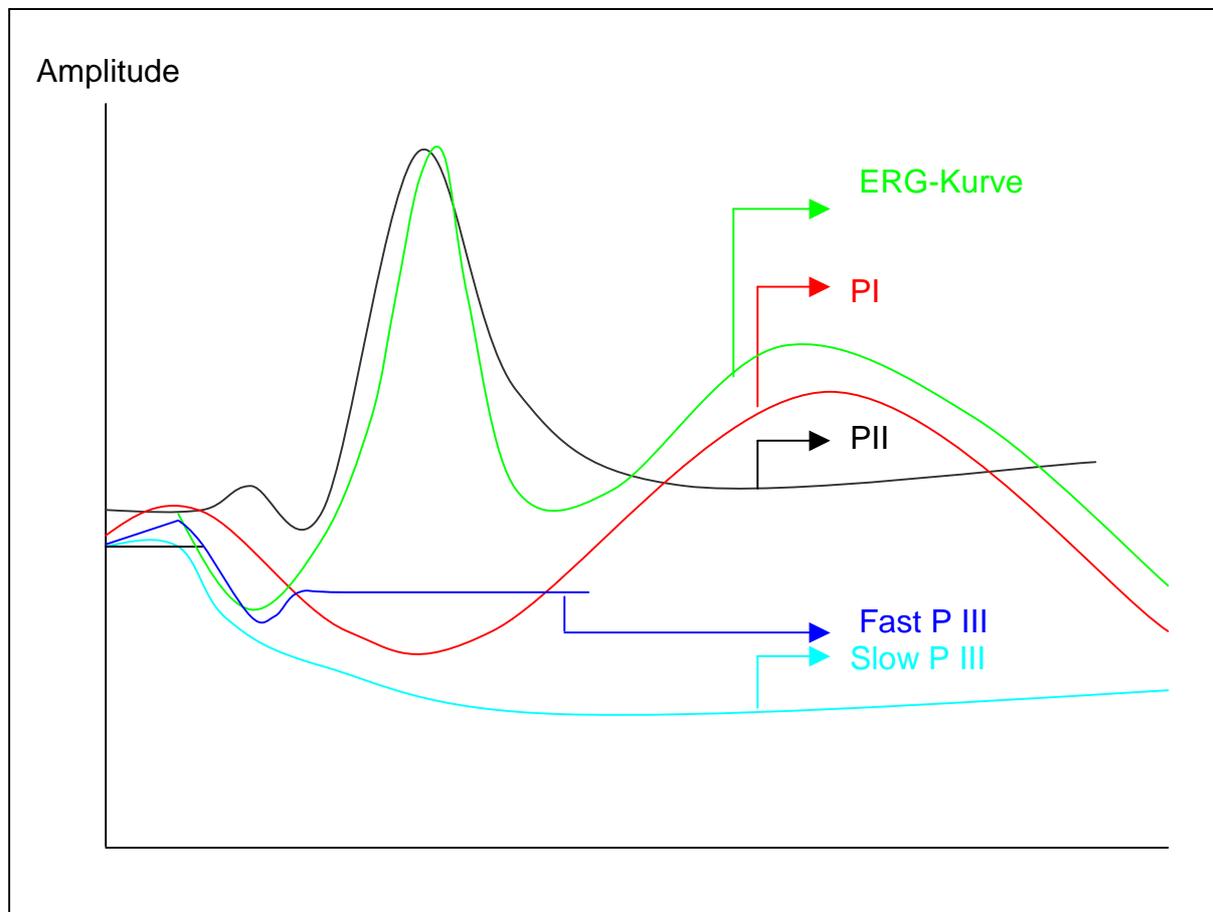


Abb. 5: Kurvenverlauf des ERGs als Summation von PI, PII und PIII (156)

1933 hat Granit erstmals durch invasive Messtechniken (an Katzenaugen) die originären Potenziale der verschiedenen Zellgruppen aufgezeigt. Sie werden PI, PII und PIII entsprechend der C-, B- und A-Welle genannt. Die PIII-Komponente wird zusätzlich in zwei Phasen aufgeteilt: schnelles PIII (fast PIII) als Rezeptorpotential für die A-Welle und langsames PIII (slow PIII) als zweite Komponente der C-Welle (Abb. 5). Erst durch die äußere Ableitung von Schläfe und Cornea verschmelzen die Komponenten zu der typischen ERG-Kurvenform.

2.2.1 Ursprung der A-Welle

Der Vorgang, der in den Photorezeptoren durch Lichtreiz zu einer Änderung des Membranpotenzials führt, wird Phototransduktion genannt (vgl. Abb. 5). Diese also durch Licht generierte Potentialänderung geht als Kornea-negative PIII-Komponente (fast PIII) in die ERG-Ableitung ein. Die anfängliche maximale Negativität wird als „Leading-Edge“ oder „A-Wellen-Vorderkante“ bezeichnet und entspricht der Aktivität der Photorezeptoren.

2.2.2 Ursprung der B-Welle

Lange Zeit sah man in der Aktivität der Müller-Zellen den Ursprung der B-Welle, weil man Ihnen zuschrieb, den Anstieg der extrazellulären Kaliumionen-Konzentration zu bewirken, die nach Lichteinwirkung im Bereich der beiden plexiformen Schichten beobachtet wurde. Diese Theorie war nicht mehr haltbar:

1. nachdem man Mäuse untersuchen konnte, denen der metabotrope Glutamat-Rezeptor mGluR6 an den ON-Bipolaren fehlte. Im ERG dieser Mäuse fehlte auch die B-Welle.

2.) Werden die Müller-Zellen experimentell elektrisch blockiert, ist trotzdem eine B-Welle ableitbar. Heute wird also angenommen, dass die der B-Welle zugrunde liegenden Feldpotentiale durch depolarisierende Bipolarzellen direkt generiert werden (29; 32).

Eine wesentliche Funktion der Müllerzellen ist die Ionen-Homöostasis (29; 32).

Sie besitzen wie andere Gliazellen eine hohe Variabilität an spannungsgesteuerten Ionenkanälen. Für Kalium bedeutet dies, dass es in Höhe der äußeren plexiformen Schicht einströmen kann (Abb.6), um am inneren Fußpunkt wieder auszutreten.

Innerhalb der Müllerzelle entsteht also ein Strom von Kalium-Ionen in Richtung des Glaskörpers, was zu einer lokalisierten Depolarisation führt. Im Extrazellulärraum verläuft der Ionenstrom in in entgegengesetzter Richtung (Abb. 6).

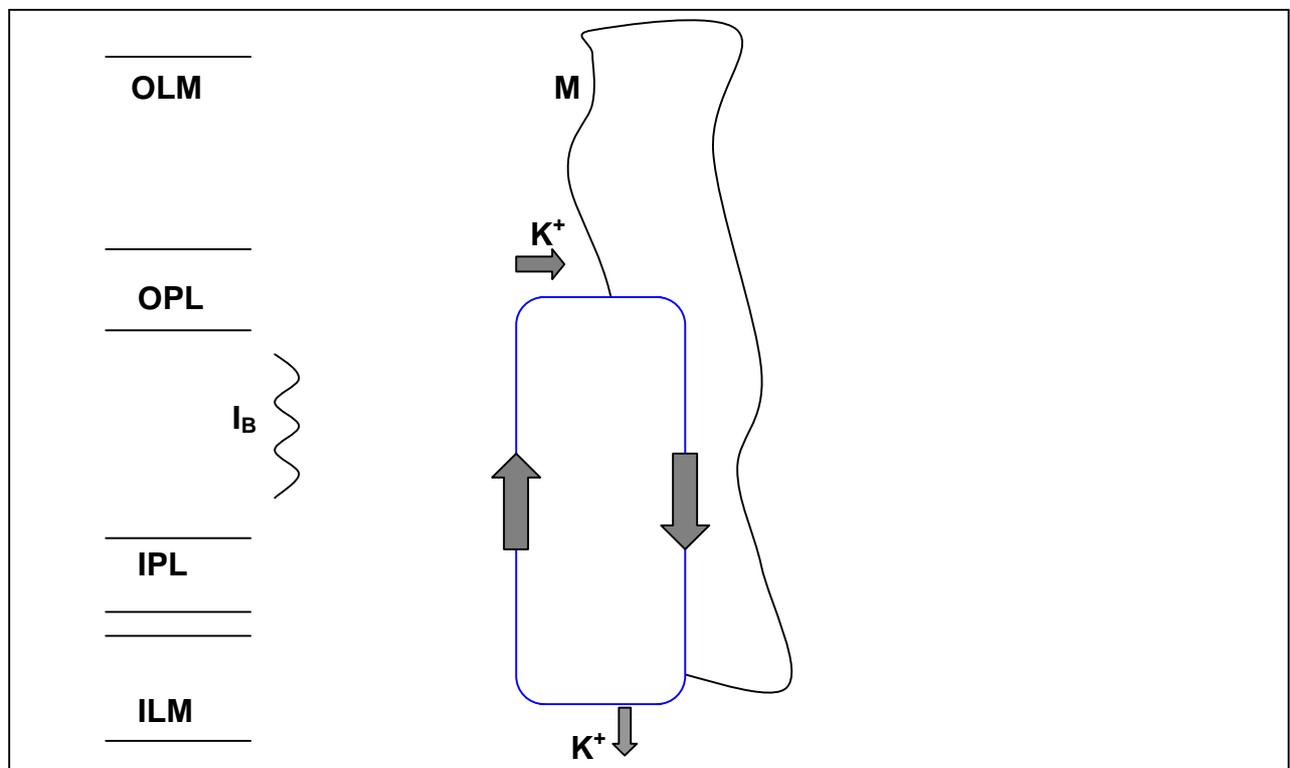


Abb. 6: Schema des Ionenflusses der B-Welle gemäß der Kalium-Müllerzellen-Hypothese (29; 32; 34)
M= Müllerzelle; K⁺=Kalium; I_B= Ionenfluß der B-Welle; OLM= Membrana limitans externa;
OPL= Äußere Plexiforme Schicht; IPL= Innere plexiforme Schicht;
ILM= Membrana limitans interna

2.2.3 Ursprung der C-Welle

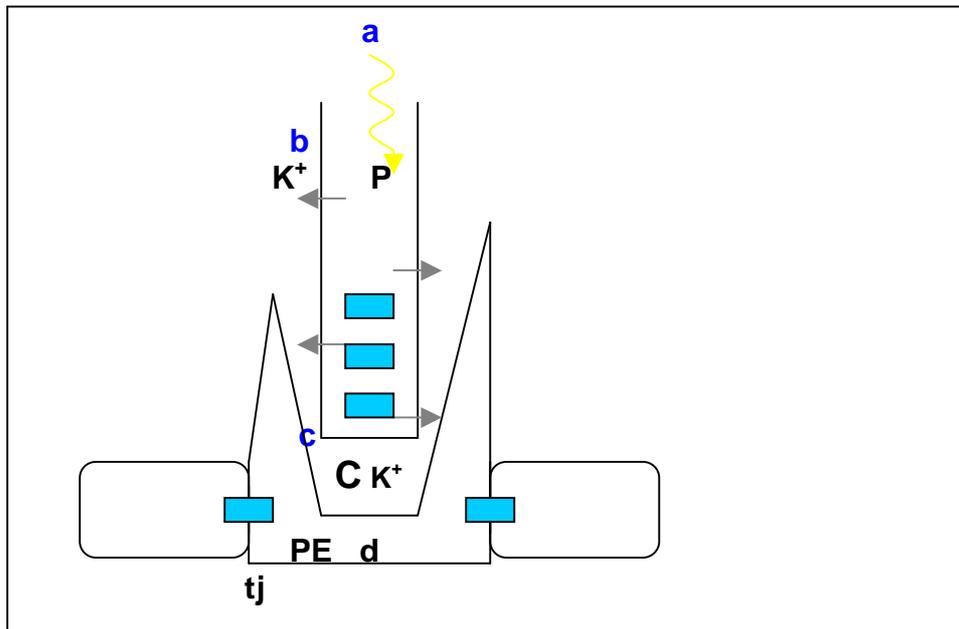


Abb. 7: Modell der Hyperpolarisation des Pigmentepithels durch Lichtreiz.
P= Photorezeptor; PE = Pigmentepithel; tj = Tight junction; K⁺=Kalium;
C_{K⁺} = Kaliumkonzentration (a,b,c,d siehe Text)

Die kornea-positive C-Welle ist die Summe eines großen positiven Potentials, nach Granit PI genannt, und eines kleineren negativen Potentials, nach Granit slow PIII(12; 13; 34). Die C-Welle stellt die Funktion des retinalen Pigmentepithels dar und bedarf aufgrund ihrer verzögerten Antwortcharakteristik auf Lichtreize besondere Ableitungsbedingungen. Die C-Welle erfordert aufgrund der langen Aufzeichnungszeit eine stabile Ableitung mit speziellen nicht polarisierbaren Elektroden, sowie eine DC-Verstärkung bzw. eine sehr niedrigfrequente AC Verstärkung(14; 34).

Allgemein wird angenommen, dass eine Reduzierung der extrazellulären Kaliumkonzentration im Bereich der Photorezeptoren das positive Potential des Pigmentepithels (PI) sowie das negative Potential der Müllerzellen (slow PIII) verursacht (12; 14; 15; 16; 17; 34).

Das Pigmentepithel der Netzhaut ist aufgrund seiner Tight junctions im Zellverband, welche die apikale retinale von der basalen choroidalen Membran funktionell separieren, polarisiert (18; 34).

2.2.4 Oszillatorische Potentiale

Lichtreize, die eine hohe Intensität besitzen, verursachen im ansteigenden Schenkel der B-Welle im ERG vergleichsweise hochfrequent Potentiale, die Oszillatorischen Potentiale. Diese besitzen eine kleine Amplitude und haben eine Frequenz von 100-160 Hz. Sie werden sowohl durch die Stäbchen als auch durch die Zapfen erzeugt. Der Ursprung der oszillatorischen Potentiale wird in der inneren plexiformen Schicht vermutet.

2.3 Versuchstiere

PD Dr. Udo Bartsch, Universitäts-Klinikum-Eppendorf, Augenklinik, generierte die $\beta 2/\beta 1(ki/ki)$ -Mäuse (AMOG-Mäuse) durch homologe Rekombination der embryonalen Stammzellen von $\beta 2/\beta 1(+/+)$ -Mäusen (OLA-Mäuse) und übernahm auch die Zucht der AMOG-Linie. Die AMOG-Mäuse stellen die Mutanten und die OLA-Mäuse den Wildtyp dar(1; 2). Die Zucht der AMOG-Linie und auch der OLA-Linie wurde vom Autor weitergeführt und ausgeweitet. Die Zucht der $\beta 2/\beta 1(ki/ki)$ -Mäuse (AMOG-Mäuse) sichert einerseits die AMOG-Linie, und andererseits gewährt sie eine ausreichend große Anzahl an Versuchstieren für die folgenden Studien. Dies machte es möglich, dass jedes Tier möglichst nur in einer Versuchsreihe vertreten ist, damit keine Verfälschungen der Ergebnisse durch eine zu große Belastung der Tiere entstehen können.

Alle durchgeführten Handlungen an und mit den Mäusen hielten sich an die Bestimmungen des deutschen Tierschutzes und an die Richtlinien der ARVO (The Association for Research in Visual and Ophthalmology) für das Verwenden von Tieren in der augenheilkundlichen Forschung und der Forschung auf dem Gebiet des visuellen Systems. Vor Beginn der Untersuchungen lag ein genehmigter Tierversuchsantrag vor (Hamburg, Juni 2001, Aktenzeichen: G8151/591-00.33).

Die Haltung der Tiere erfolgte in dem Tierstall des Universitäts-Klinikum-Eppendorf's. Das Klima im Tierstall wurde mit einer Temperatur von 25 Grad Celsius konstant gehalten. Weiterhin wurde ein 24-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus mit einer 12- stündigen Hellphase von ca. 300 Lux erzeugt. Das Futter und das Wasser der Tiere waren standardisiert (ad libitum).

In einem Käfig wurden bis zu 6 Tiere gehalten. Aus diesem Grunde mussten sie gekennzeichnet werden. Diesem Zweck diente eine chirurgische Cooper-Schere, mit der die Ohren der Mäuse mit einer Kerbe versehen wurden.

Bei sehr jungen Tieren wurde eine farbliche Kennzeichnung am Schwanz vorgenommen, da die jungen Tiere zu klein waren, um sie am Ohr mit einer Kerbe zu versehen.

2.4 Geräte und Versuchsanordnung

Die ERG-Ableitung erfolgte mit dem Multiliner Vision der Firma Toennies (97204 Höchberg). Im wesentlichen besteht das Gerät aus folgenden Komponenten (Abb. 8): dem Stimulator, über den die Lichtreize auf das Auge einwirken, den Elektroden am Auge mit dem Verstärker und dem Computer, über den sowohl die Programme der verschiedenen Lichtreizserien gesteuert als auch deren Antworten aus dem Verstärker übernommen und ausgewertet werden. Es kamen zwei Formen von Stimulatoren zum Einsatz, der Ganzfeld- und der LED-Stimulator. Im Ganzfeldstimulator, einer weiß gefärbten Hohlkugel, wird der Lichtblitz in einen diffusen Lichtreiz verwandelt, welcher dann im gesamten Gesichtsfeld bzw. auf alle Netzhautstellen des Auges mit gleicher Intensität wirken kann. Der LED-Stimulator dagegen ist eine rote Leuchtdiode, die 0,5 cm vor dem Auge installiert wird und dieses direkt beleuchtet (34).

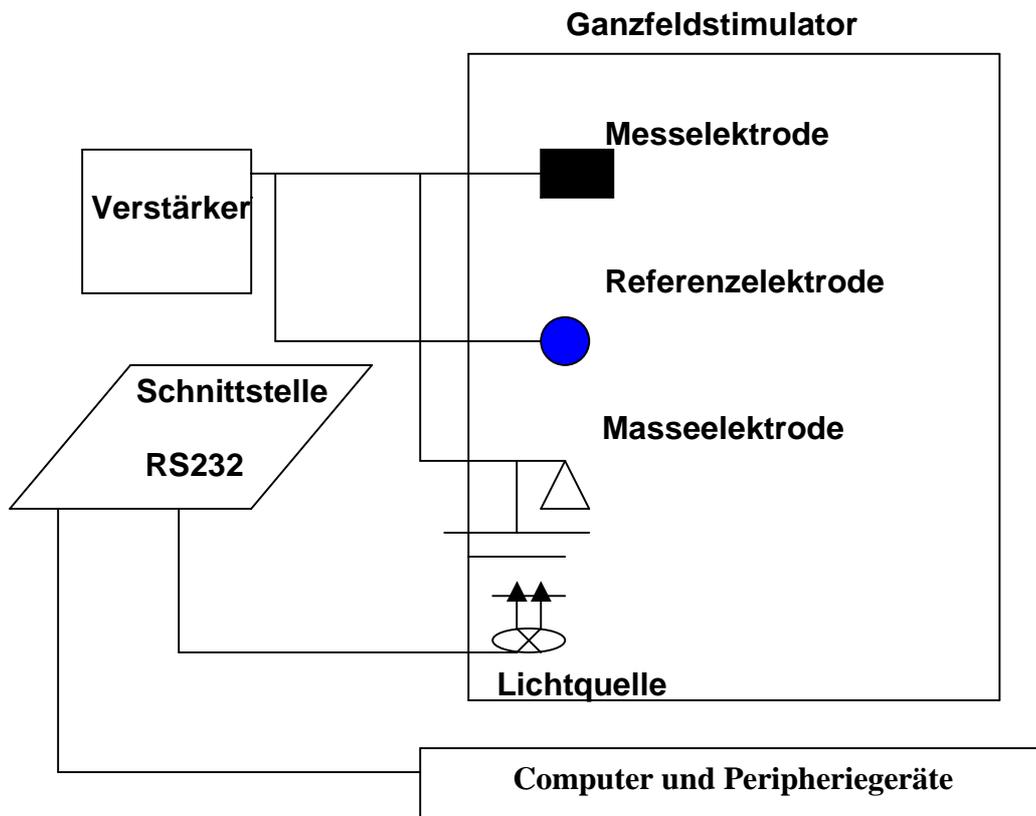


Abb. 8: Schematischer Versuchsaufbau

Der Ganzfeldstimulator kann Blitzintensitäten von $5 \cdot 10^{-5}$ bis ca. 900 cds/m^2 bei einer Blitzdauer von $50 \mu\text{sec}$ erzeugen. Durch optische Filter ist es möglich, die Intensität um weitere 3 logarithmische Einheiten abzuschwächen. Die Blitzfrequenz kann zwischen $0,05 \text{ Hz}$ und 100 Hz bei $0,05\text{-Hz}$ -Schritten variieren. Die Potenziale werden durch einen 2-Kanal-AC/DC-Verstärker verstärkt. Der Messbereichsendwert reicht von $10 \mu\text{V}$ bis 50 mV , wobei der Frequenzgang von DC bis 20 KHz reichte. Über die Schnittstelle RS232 wird die Verbindung zum PC hergestellt. Die Multiliner-Visions-Software auf dem PC ermöglicht eine eigene Konfiguration von Ableitprotokollen und die Archivierung der Versuchsdaten. Über den Anschluss von anderen Hardware-Geräten ist es möglich, die entsprechend gemessenen Kurven auszudrucken oder Daten mit anderen Programmen auszutauschen.

Der Versuch "Basis-ERG" erfolgte mit den o.g. Komponenten. Zur Ableitung der C-Welle des ERG's ist es erforderlich, langandauernde Blitze zu erzeugen (88). Dazu musste der Ganzfeldstimulator, mit dem nur Blitze von $50 \mu\text{sec}$ Dauer möglich waren, durch einen LED-Stimulator (Reti-Strobe®, Roland Consult, Wiesbaden) für diese Messung ersetzt werden. Mit diesem Gerät konnte man Blitze von 50 msec bis zu 300 msec erzeugen. Der Anschluss des LED-Stimulators an das Multiliner-System erfolgte über die Schnittstelle RS232 und ließ sich dann über den Computer ansteuern.

2.4.1 Versuchsdurchführung

Wie schon erläutert, wurden die Versuchstiere im zentralen Tierstall gehalten. Zur Untersuchung mussten sie zunächst in das elektrophysiologische Labor der Augenklinik des Universitäts-Klinikum-Hamburg-Eppendorf gebracht werden. Dort wurden die Tiere zur exakten Errechnung der Dosis des Narkotikums gewogen.

Im Anschluss daran, stellte man die betreffenden Tiere in eine Dunkelkammer, um die Dunkeladaptation zu erreichen. Es wurde eine Dunkeladaptationsphase von 2 Stunden gewählt, da die Erfahrung gezeigt hatte, dass diese Zeitdauer zur Erzielung einer maximalen skotopischen ERG-Antwort ausreichend ist.

Um eine Orientierung zu ermöglichen, wurde der Versuchsplatz des Labors während der Vorbereitungen sowie der gesamten Dauer der Versuche schwach rot beleuchtet. Anderes Licht konnte ins Labor nicht eindringen. Zur Dilatation der Pupillen applizierte man den Mäusen nach der Dunkeladaptation in das zu untersuchende Auge zwei verschiedene Mydriatika. Zuerst einen Tropfen 1%iges Atropinsulfat (Atropin 1% Dispersa®, Dispersa GmbH, Germering) und eine Minute später einen Tropfen 0,5 %iges Tropicamids (Mydriatikum Stulln®, Pharma Stulln GmbH, Nabburg). Beide Mydriatika sind Muskarinrezeptor-Antagonisten, wodurch sie zu einer Entspannung des Musculus Sphinkter pupillae führen. Tropicamid soll eine sofortige Wirkung und Atropin eine lang anhaltende Wirkung erzielen.

Ca. 20 Minuten, nachdem die Tropfen appliziert worden waren, erfolgte die Injektion des Anästhetikums, welches aus einem Gemisch von Xylazin (Rompun® 2%ig, Bayer AG Leverkusen) und Ketamin (Ketanest 50®, Parke-Davis) bestand. 4 Minuten später war die Narkosewirkung zu beobachten. Während dieser Zeit wurde der Untersuchungsplatz präpariert. Dieser bestand aus einer Holzplatte, welche mit einem warmen Gelkissen und einigen Lagen Zellstoff gepolstert war. Nach der Akinese wurden die Mäuse in Bauchlage auf dieser Platte gelagert, und die Barthaare wurden entfernt, um die Einflüsse auf die Messelektrode zu minimieren. Hiernach erfolgte die Positionierung der Elektroden.

Für die Messungen sind eine Referenz- und eine Masselektrode erforderlich. Es wurden Silber-Nadel-Elektroden verwendet. Der Einstich der Referenzelektrode erfolgte 2 Millimeter unterhalb des zu messenden Auges. Die Nadelspitze wurde subkutan, etwa 7 Millimeter kaudal von der Einstichstelle in Position gebracht. Die Positionierung musste ohne Knochenkontakt erfolgen, da es sonst zur Verfälschung des ERG's geführt hätte. Die Masselektrode wurde zwischen den Ohren, am Occipitum gestochen und war ebenfalls 7 Millimeter subkutan gelegen. Über Leukoplast® Klebestreifen wurden die Elektrodenkabel in der entsprechenden Position fixiert.

Eine monopolare Kontaktlinsenelektrode wurde bei Standard-ERG-Ableitung und bei der Messung der C-Welle als aktive Elektrode eingesetzt. Diese hat einen Durchmesser von 5 Millimetern. Die konkave Kunststofflinse war transluzent und besaß einen eingearbeiteten Drahring von ca. 3 Millimeter Durchmesser an ihrer Innenfläche. Die Kontaktlinsenelektrode ist im Durchmesser um ca. 1mm größer, als der Augapfel der Maus. Die Elektrode wurde mit der Innenfläche direkt an das zu messende Auge geführt. Zur besseren elektrischen Leitfähigkeit wurde zwischen Auge und Elektrode ein Tropfen Methylcellulose (Methocel-Dispersa, Dispersa®, Dispersa GmbH, Germering) getropft.

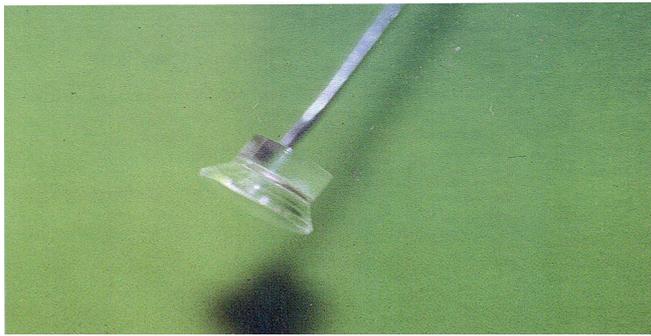


Abb. 9: Kontaktlinsenelektrode

Die Ableitung der A-Welle machte aufgrund der hohen Blitzintensitäten den Einsatz einer Fadenelektrode erforderlich, da bei Verwendung der Kontaktlinsenelektrode Lichtartefakte zu beobachten waren. Auch hier wurde die Elektrode direkt an das zu untersuchende Auge gebracht, und man positionierte den Faden direkt auf der Hornhautmitte. Es musste sicher gestellt werden, dass der Faden ansonsten keinerlei anderen Kontakt mit der Maus erhielt. Hier wurde eine DTL-Elektrode (nach Dawson, Trick und Litzkow 1978) eingesetzt. Die DTL-Faser ist eine fein verdrehte, mit Silber beschichtete Nylonfaser, welche direkt auf die Hornhaut gelegt wird und dort vollständig von Tränenflüssigkeit umgeben ist.

Die Holzplatte, auf der die Maus lag, wurde innerhalb der Ganzfeldkugel horizontal angebracht. Dies erlaubte es, die Messvorrichtung zu platzieren.

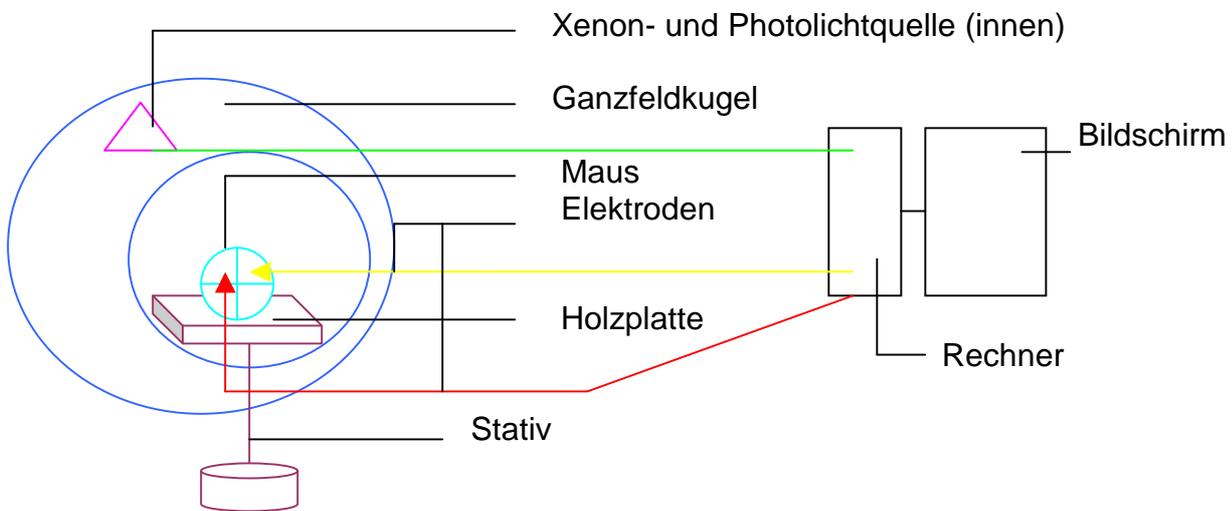


Abb. 10: Schematischer Versuchsaufbau mit der Ganzfeldkugel

Die Augen der Maus waren dann im Zentrum der Kugel positioniert. Die Versuchsvorbereitung schloss ab mit der Messung des Übergangswiderstands (Impedanz-Messung) zwischen Elektroden und Gewebe (Abb. 10). Hierdurch ließ sich der Sitz der Elektroden korrigieren bzw. optimieren. Ein Widerstand von $10\text{ K}\Omega$ darf in der Versuchsanordnung nicht überschritten werden. Die Ableitung konnte beginnen, wenn alle Werte und Einstellungen korrekt waren.

2. Material und Methoden

2.5 Datenauswahl

Insgesamt standen der Augenklinik des Universitäts-Klinikum-Eppendorf 70 AMOG-Mäuse und 30 OLA-Mäuse zur Verfügung. Alle Mäuse haben jeweils die Versuche Basis-ERG, Oszillatorische Potenziale, A-Welle, C-Welle und Zapfen durchlaufen. Aus jedem der beiden Mausstämme wurden von 5 Tieren verschiedenen Alters Augen für die histologische Untersuchung entnommen.

Alter der Mäuse in Tagen						
14	30	60	90	120	150	360

Tab. 3: Untersuchungszeitpunkte der Basis-ERG-Ableitung

2.5.1 Basis-ERG

Es erfolgten 4 Ableitungen, je zweimal das Protokoll „Skotopisch 1“ und „Skotopisch 2“ (vgl. Tab. 4), welche der Darstellung der skotopischen A- und B-Welle dienen. Dazwischen wurden jeweils die oszillatorischen Potenziale (OP) abgeleitet.

Nach einer Abfolge von „Skotopisch“, „OP“, erfolgte die Ableitung der photopischen Antwort. Hierbei wurde eine Hintergrundbeleuchtung von 30cd/m² eingestellt. Nach ca. 10 Min Adaptationszeit an die Hintergrundbeleuchtung wurden zuerst mit einer Frequenz von 30 Hz 15 Blitze mit einer Reizintensität von 2,5 cds/m² angeboten und darauf folgend noch einmal 6 Blitze mit einer Intensität von 15 cds/m² bei einer Frequenz von 1 Hz. Die erhaltenen Potenziale wurden hiernach gemittelt.

Die Blitze waren weiß, ihre Dauer betrug ca. 50 µsec. Die Filtereinstellungen des Verstärkers lagen hier zwischen 1 und 300 Hz.

Im Anschluss an die Ableitung des ERG´s ermöglichte die Software des PCs durch das Positionieren von Markern auf dem Potenzialverlauf einer ERG-Kurve das Ablesen der Amplitude, sowie der Latenz einzelner Kurvenkomponenten. Die Amplitude der Oszillatorischen Potenziale ergibt sich aus der Differenz dieser Messpunkte. Die Messung der Latenzzeit erfolgte zwischen dem Stimulusbeginn und dem zweiten Messpunkt (Abb. 16).

2. Material und Methoden

Blitzreihenfolge	Blitzintensität/ Anzahl/ Frequenz Skotopisch
1	$4 \cdot 10^{-4}$ cds/m² / 5 / 0,5Hz
2	$1 \cdot 10^{-3}$ cds/m² / 5 / 0,5Hz
3	$4 \cdot 10^{-3}$ cds/m² / 5 / 0,5Hz
4	$1 \cdot 10^{-2}$ cds/m² / 5 / 0,5Hz
5	$4 \cdot 10^{-2}$ cds/m² / 5 / 0,5Hz
6	$1 \cdot 10^{-1}$ cds/m² / 5 / 0,5Hz
7	1 cds/m² / 2 / 0,2Hz
8	2,5 cds/m² / 2 / 0,2Hz

Tab. 4: Ableitprotokoll Skotopisch

2.5.2 A-Welle

Die Untersuchung der A-Welle war ebenso wie die der C-Welle eine Querschnittsuntersuchung. Bis zu einer Intensität von 30 cds/m² wurden die Blitze mit einer Xenon-Lichtquelle generiert. Für die Registrierung der höheren Blitzintensitäten, die der Analyse der A-Welle dienen, kam eine Photoblitzlampe zur Anwendung. Im Gegensatz zu dem Basis-ERG-Versuch mit 2-stündiger Dunkeladaptation erfolgte bei diesem Versuch eine 12-stündige Dunkeladaptation vor Versuchsbeginn. Zur Ableitung wurden Lichtblitze in aufsteigender Intensität angeboten.

Die elf verwendeten Blitzintensitäten waren:

2,5, 7,5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, und 135 cds/m². Die Blitze mit 2,5 und 7,5 cds/m² wurden zweimal mit einer Frequenz von 0,05 Hz angeboten und danach gemittelt. Zwischen jeder Blitzintensität betrug das ISI 140 Sekunden.

Die ERG-Antwort zeichnete man über 40 ms mit einer Auflösung von 512 Kurvenpunkten auf. Der Filterbereich der Verstärkung lag zwischen 1 und 100 Hz.

Die erzielten Potenzialverläufe wurden im Gegensatz zu normalen ERG-Auswertungen nicht durch das setzen von Markern ausgewertet, sondern als Rohkurven einem Analyseprogramm zugeführt.

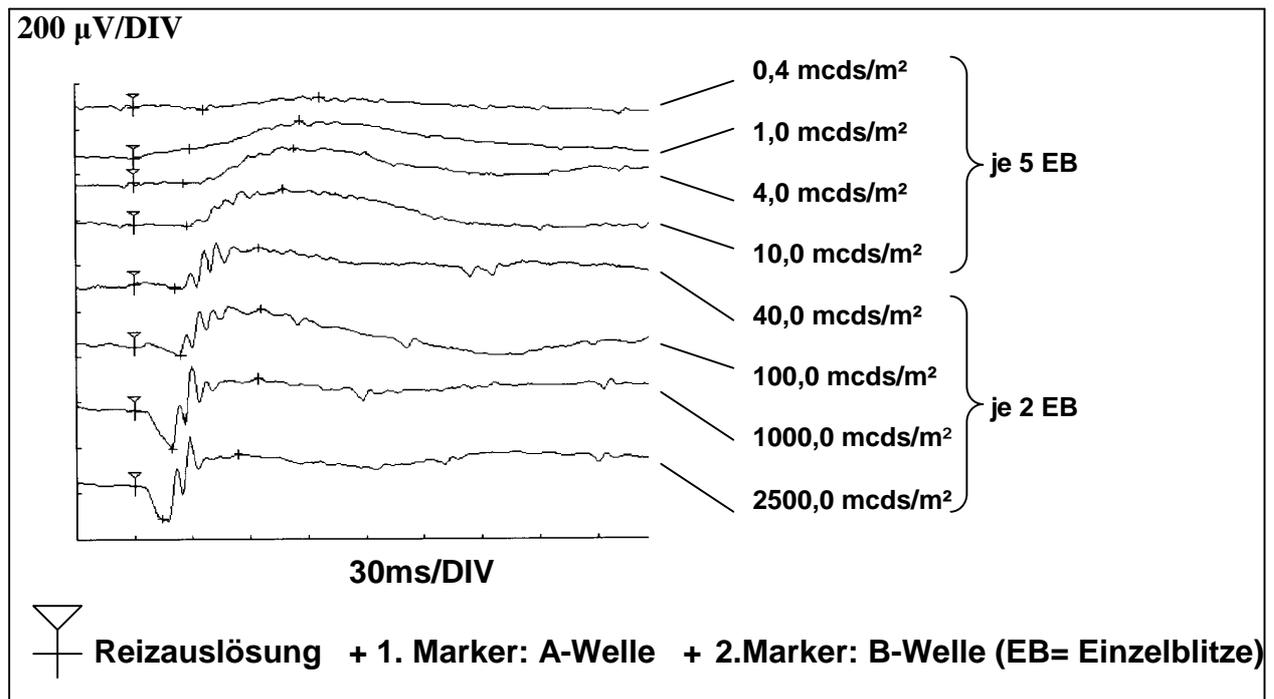


Abb. 15: Marker A- und B-Welle des Elektretinogramms

Die B-Welle wurde den selben Ableitungskurven entnommen wie die A-Wellen. Somit galt für sie das gleiche Ableitungsprotokoll.

2.5.3 C-Welle

Der Ablauf der C-Wellen-Ableitung entsprach dem Schema, wie es bei der Basis-ERG-Ableitung Anwendung fand. Die Tiere wurden zuerst dunkeladaptiert, erhielten die Mydriatika, die Anästhesie und die gleiche Lokalisierung der Elektroden. Der einzige Unterschied im Versuchsaufbau bestand in der Verwendung des Reti-Strobe® anstelle des Ganzfeldstimulators. Aus diesem Grunde konnte die Untersuchung auf dem Labortisch erfolgen. An einem Laborstativ wurde an das Reti-Strobe®, eine rote LED, fixiert und ca. 0,5 cm vor dem zu untersuchenden Tierauge platziert. Die Laborraumbelichtung war für die Ableitung der C-Welle dunkel. Die Lichtreize wurden in aufsteigender Reihenfolge dargeboten. Folgende drei Blitzintensitäten kamen zur Verwendung: 84, 164 und 252cds/m² bei einer Blitzdauer von 250 ms. Für jede Blitzintensität mittelte man 4 aufeinander folgende Einzelreize bei einer Blitzfrequenz von 1Hz. Jede Reizintensität mit vier Einzelreizen wurde zweimal abgeleitet, sodass insgesamt sechs ERG-Kurven entstanden (vgl. Abb. 16) (34).

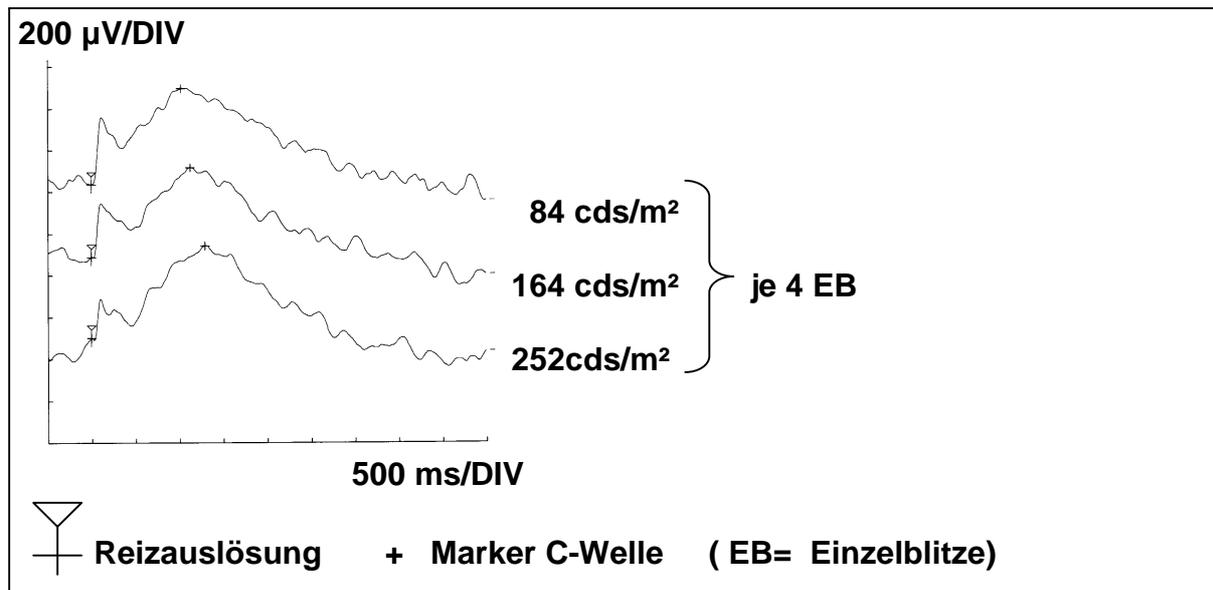


Abb. 16: C-Wellen Marker des ERG

Die ISI (Interstimulus- Intervall) betragen ca. 20 Sekunden und die Messzeit Betrag pro Blitz 5 Sekunden. Die Verstärkung erfolgte mit einer Filtereinstellung von 0,08 bis 20 Hz (34). Die Auswertung der C-Wellen Amplitude und Latenz erfolgte durch das setzen von Markern, wie es bei der Basis-ERG-Untersuchung erfolgte (Abb. 16).

2.5.4 Oszillatorische Potenziale

„OP“-Blitzreihenfolge	Intensität	ISI
1	2,5 cds/m^2	15 Sec
2	2,5 cds/m^2	15 Sec

Tab. 4a): Ableitprotokoll „ Oszillatorische Potenziale“. ISI = Interstimulus-Intervall

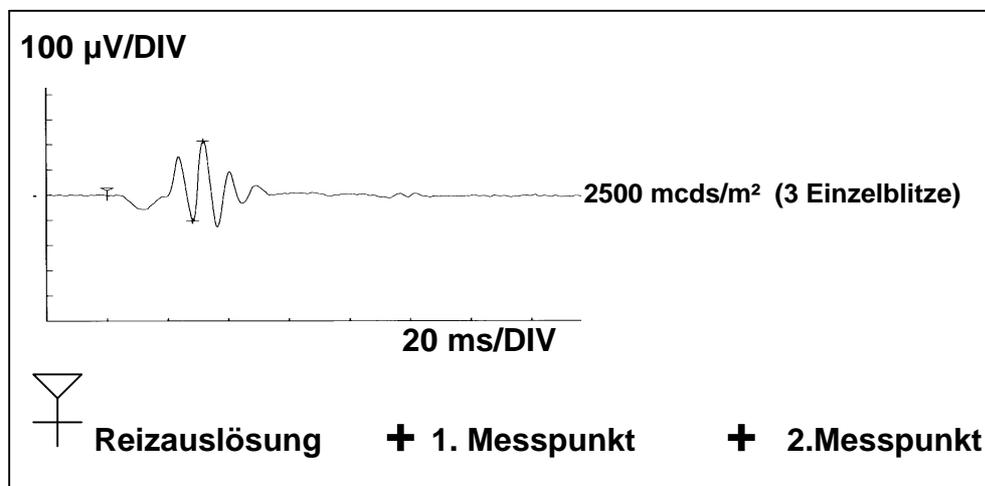


Abb. 17: Marker Oszillatorische Potenziale des Elektretinogramms

Die Ableitung der Oszillatorischen Potenziale erfolgte zweizeitig (vgl. Abb. 17; Tab. 4a). Das Ableitprotokoll für die Oszillatorischen Potenziale besteht aus 3 Einzelblitze, die jeweils 15 sec andauern.

2.6 Spezielle Auswertungen

2.6.1 Statistische Auswertung des Basis- ERG

Zum Vergleich mehrerer Stichproben, wurde im Basis-ERG-Versuch der Friedman-Test durchgeführt. Der Friedman-Test gilt als ein parameterfreies Verfahren. Er wurde angewandt, da, auch wenn die Werte in der Population mutmaßlich normalverteilt sind, aufgrund der Messwerte nicht sicher auf eine Normalverteilung der Parameter geschlossen werden kann. Auch bei vergleichbaren Varianzen (Varianzhomogenität) der Messungen der einzelnen Zeitpunkte sind die jeweiligen Streuungen der Messwerte um ihren Mittelwert (die Standardabweichungen) relativ groß. Dieses Verfahren dient dazu, Unterschiede der Messwerte im Verlauf eines Messzeitraumes herauszuarbeiten (19).

Der Friedman-Test vergleicht mehrere verbundene Stichproben hinsichtlich ihrer zentralen Tendenz, dient also dem Vergleich der Messwerte jeweils innerhalb eines Mausstammes. Die Alternativ-Hypothese bei Annahme eines signifikanten Unterschiedes lautet, es zeigen sich mindestens zwei unterschiedliche Effekte unter den verglichenen Gruppen (Messzeitpunkten).

Für jede Intensität wurde ein isolierter Friedman-Test angewendet.

Grundsätzlich wird im Rahmen der Dissertation eine explorative Datenanalyse experimenteller Daten durchgeführt. Es gilt nicht, eine einzelne im Vorfeld spezifizierte sowie durch eine Fallzahlplanung validierte Hypothese zu testen, sondern anhand des Datenpools eine Reihe von Beobachtungen nach unterschiedlichen Gesichtspunkten miteinander deskriptiv zu vergleichen.

Die P-Werte sämtlicher Tests sind zweiseitig kalkuliert und die Interpretation erfolgt nominal, was bedeutet, dass keine Adjustierung bzgl. des multiplen Testens stattfindet. Ein einzelnes Ergebnis wird als statistisch signifikant betrachtet, wenn ein P-Wert $< 0,05$ (Alpha) vorliegt.

Eine Anpassung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni(20; 21) könnte im Rahmen des multiplen Testens für alle Tests, die im Rahmen der Auswertung des gesamten Datenpools zur Anwendung gekommen sind, durchgeführt werden (Alpha/n=Anzahl sämtlicher durchgeführter Tests bezogen auf alle Parameter).

Da jedoch aufgrund der großen Vielzahl einzelner Tests im Rahmen einer explorativen Datenanalyse das Signifikanzniveau sehr niedrig werden würde (z. B. bei 30 Tests bereits 0,00167), wird in der Regel darauf verzichtet und die Ergebnisse rein deskriptiv interpretiert. Das bedeutet, wenn ein signifikanter Unterschied auf der Basis von Alpha = 0,05 vorliegt, welches in den Diagrammen als F* gekennzeichnet ist, wird dieser Unterschied rein deskriptiv bewertet, also innerhalb des eigenen Datenpools beschrieben und interpretiert, jedoch aufgrund der geringen Fallzahl dieses Ergebnis nicht verallgemeinert.

2. Material und Methoden

Es gibt Messungen nach 14, 30, 60 und 90 sowie nach 120, 150 oder 360 Tagen als Langzeitmessung. Die Ausgangsdaten und die Daten unterschiedlicher späterer Zeitpunkte werden miteinander verglichen.

Da nicht alle Messreihen komplett vorliegen, könnten grundsätzlich Messzeitpunkte zusammengefasst werden, z. B. jeweils die frühen Messungen miteinander und die späten Messungen. Dies erscheint jedoch nicht sinnvoll, da bereits einzelne dieser Zeitpunkte sich bei einigen Reizintensitäten voneinander unterscheiden (siehe z. B. Parameter B-Wellen-Latenz, sowohl innerhalb der AMOG als auch innerhalb der OLA Gruppe: Tag 14 vs. Tag 30).

Es werden für alle Parameter einmal alle verfügbaren Zeitpunkte innerhalb der Gruppen miteinander verglichen und dann stufenweise Zeitpunkte, beginnend mit den späten Messungen, ausgeschlossen, um festzustellen, wann eine Änderung der Potentiale zu beobachten ist.

Für den Vergleich der beiden Mausstämme miteinander (AMOG vs. OLA) ist der Mann-Whitney-U-Test verwendet worden. Hierbei vergleicht man die Werte aller Mäuse einer Gruppe mit allen Mäusen der anderen Gruppe, jeweils bezogen auf die einzelnen Untersuchungszeitpunkte und für jede Reizintensität getrennt. Diese Methode dient dazu herauszustellen, ob sich Unterschiede bei den Reizantworten zwischen den AMOG- und OLA-Stamm zeigen.

Die beschriebenen statistischen Methoden beziehen sich auf die Auswertung *aller* gemessenen Parameter. Alle Parameter werden anhand der absoluten Messwerte zwischen den einzelnen Messzeitpunkten, soweit vorliegend, verglichen und interpretiert, eine Normalisierung der Daten ist nicht angewendet worden.

Um die Daten auswerten zu können und eine statistische Analyse durchführen zu können, kam das Softwarepaket "Statistical Package for the Social Sciences" (SPSS) zur Anwendung.

2.6.2 Statistische Auswertung durch Boxplot-Diagramme

Die Darstellung und Vergleich, sowie die Verteilung von Werten mehrerer Gruppen (Vergleich AMOG und OLA) erfolgt in Form von Boxplot-Diagrammen, weil Sie sich hierfür als besonders sinnvoll erwiesen haben.

Der **Boxplot** (auch Box-Whisker-Plot oder deutsch Kastengrafik) ist ein Diagramm, das zur graphischen Darstellung einer Reihe numerischer Daten verwendet wird. Er fasst verschiedene Maße der zentralen Tendenz , Streuung und Schiefe in einem Diagramm zusammen. Alle Werte der Fünf-Punkte-Zusammenfassung, also der Median, die zwei Quartile und die beiden Extremwerte, sind dargestellt (28; 30). Grundsätzlich enthält ein Boxplot die wichtigsten Parameter einer univariaten Verteilung:

Ein **Box** besteht aus einem Rechteck, welches durch das obere und untere Quartil begrenzt wird. Die Box umfasst 50% der Daten. Durch die Länge der Box ist der Interquartilsabstand (engl. interquartile range, IQR) abzulesen. Dies ist ein Maß der Streuung, welches durch die Differenz des oberen und unteren Quartils bestimmt ist. Als weiteres Quartil ist der Median in der Box eingezeichnet, welcher durch seine Lage innerhalb der Box einen Eindruck von der Schiefe der den Daten zugrunde liegenden Verteilung vermittelt (28; 30).

Als „**Whisker**“, „Fühler“ oder „Antennen“ werden die horizontalen oder vertikalen Linien seitlich (siehe Abb. 18) der Box bezeichnet, durch die die nicht innerhalb der Box liegenden Werte dargestellt werden. Um mögliche Ausreißer zu kennzeichnen, wird die Länge der Whisker auf maximal das 1,5-fache des Interquartilsabstands ($1,5 \times \text{IQR}$) beschränkt. Als Ende der Whisker wird der Wert aus den Daten dargestellt, der noch innerhalb dieser Grenze liegt. Die Länge der Whisker wird also durch die Datenwerte und nicht allein durch den Interquartilsabstand bestimmt. Gibt es keine Werte außerhalb der Grenze von $1,5 \times \text{IQR}$, wird die Länge der Whisker durch den maximalen und minimalen Wert festgelegt. Andernfalls werden die Werte außerhalb der Whisker separat in das Diagramm eingetragen. Von diesen Werten wird vermutet, dass es sich um Ausreißer handelt (28; 30).

Ausreißer, die zwischen $1,5 \times \text{IQR}$ und $3 \times \text{IQR}$ liegen, werden als „milde“ Ausreißer bezeichnet und mit einem **Kreis O** gekennzeichnet.

Die Werte, die über $3 \times \text{IQR}$ liegen, werden als „extreme“ Ausreißer mit einem **Stern *** gekennzeichnet (28; 30).

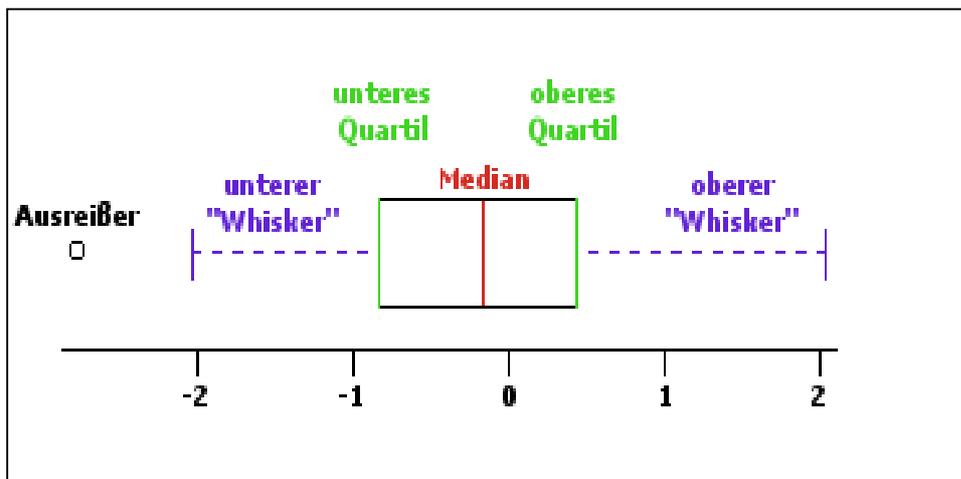


Abb. 18 : Schematische Darstellung vom Boxplot (28; 30)
Darstellung des Boxplots über ein Zahlenstrahl

Ein Boxplot vermittelt einen Eindruck davon, ob eine Verteilung symmetrisch oder Schief ist. Der wesentliche Vorteil eines Boxplots besteht im raschen Vergleich der Verteilung in verschiedenen Untergruppen. Ein Boxplot ist eindimensional, so dass sich leicht mehrere nebeneinander auf derselben Skala darstellen lassen (28; 30).

2.7 Histologie

PD Dr. Udo Bartsch (Zentrum für molekulare Neurobiologie, Universität-Hamburg, Deutschland) übernahm die histologische Untersuchung der Netzhäute.

Die Netzhäute der $\beta 2/\beta 1$ knock-in-Mäuse sind im Alter von 14, 30, 60, 90, 120, 150, sowie 270 Tagen lichtmikroskopisch und transmissionselektronenmikroskopisch untersucht worden.

Während tiefer Anästhesie der Mäuse wurden zur Präparation der Netzhäute die Augen der Tiere enokuliert. Anschließend wurden die Tiere durch Genickbruch getötet. Danach erfolgte die Eröffnung der Augen entlang der ora serrata zur Entnahme des Glaskörpers, sowie der Linse und der Hornhaut. Der verbleibende Rest des Auges mit noch anhaftender und kompletter Netzhaut wurde darauf in eine eiskühle Fixierlösung, bestehend aus 2%iger Paraformaldehyd, 2,5 %iger Glutaraldehyd in einem 0,05-molaren Phosphatpuffer, für eine Stunde gelegt.

Mit 1%igem Osmiumtetroxid erfolgte eine zweite Fixierung für 30 Minuten.

Für die Lichtmikroskopie wurden, die in Epon eingebetteten Netzhäute, durch radiale halbdünne Schnitte (0,6 μm) präpariert und mit Toluidin-Blau gefärbt. Erst die Anfertigung ultradünner Schnitte (60 nm) mittels eines Diamanten, machte transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen möglich. Der notwendige Kontrast der Schnitte, erreichte man durch die Behandlung der Schnitte mit Uranylacetat und Bleizitrat.

3. Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1. Statistische Analyse

3.1.1 A-Wellen-Amplituden Mausstamm AMOG

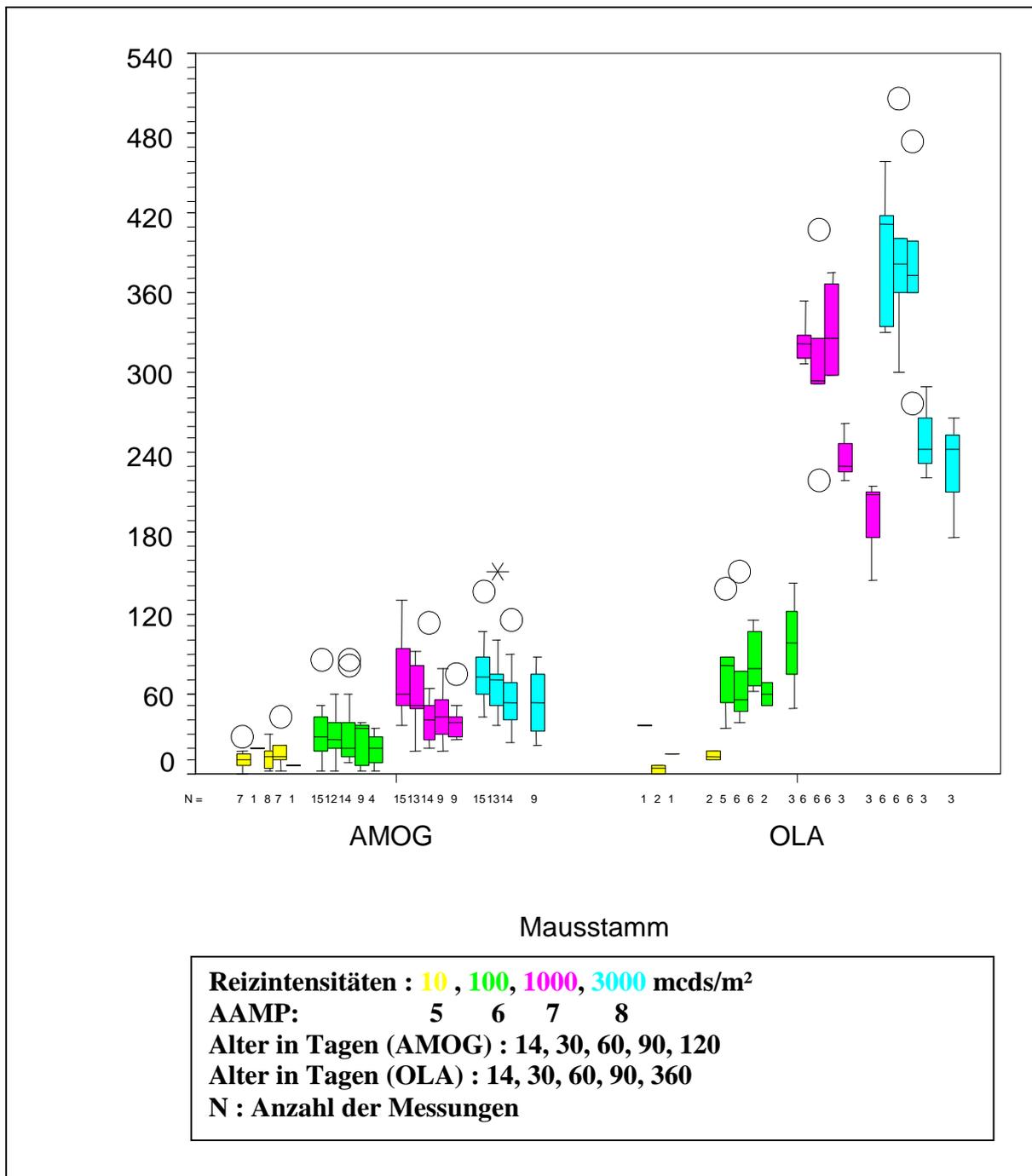


Diagramm 1: Boxplots der A-Wellen-Amplituden der Mausstämm AMOG und OLA

O = Ausreißer; — = Median; * Stern = extreme Ausreißer;

Ordinate (Y-Achse): **Amplitude A-Welle (μV)**

3. Ergebnisse

Zur statistischen Analyse der A-Wellenamplituden der AMOG-Mäuse wurde für die Reizintensitäten 1000 und 3000 mcDs/m² jeweils ein isolierter **Friedman-Test** angewendet (s. Kapitel 2.6.1.), um die A-Welle bei 14, 30, 60, 90 und 120 Tage alten Tieren zu vergleichen.

Es gibt keine auswertbaren Fälle für die Altersgruppen 120 und 360 Tage (AAMP 5,6,7,8).

Bei der Intensität von 10 mcDs/m² (AAMP 5) und von 3000 mcDs/m² (AAMP 8) gibt es keine gültigen Fälle für die Altersgruppen 90 Tage. Die Statistiken können für diese Altersgruppen nicht berechnet werden und werden daher weggelassen.

Der Friedman-Test ergab signifikante Unterschiede der A-Wellen-Amplitudenwerte innerhalb des genannten Untersuchungszeitraumes. Und zwar wurde statistisch deutlich, dass bei 1000 und 3000 mcDs/m² die A-Wellen-Amplituden mit dem Alter der AMOG-Mäuse signifikant abnahmen (Tab. 5a; 5b).

Als **Signifikanzniveau** wurde ein P-Wert < 0,05 festgelegt (20; 21).

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
AAMP7_14	4,25	Anzahl der Mäuse (N)	8
AAMP7_30	3,50	Chi-Quadrat	10,100
AAMP7_60	2,25	df	4
AAMP7_90	2,88	Asymptotische Signifikanz	,039
AAMP7_120	2,13	Exakte Signifikanz	,032
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,002
		Friedman-Test	

Tab. 5a) Isolierter Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 1000 mcDs/m²

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
AAMP8_14	2,50	Anzahl der Mäuse (N)	16
AAMP8_30	2,08	Chi-Quadrat	7,167
AAMP8_60	1,42	df	2
		Asymptotische Signifikanz	,028
		Exakte Signifikanz	,027
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,008
		Friedman-Test	

Tab. 5b) Isolierter Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 3000 mcDs/m².

3. Ergebnisse

Im Gegensatz zum Friedman-Test wurden für die **Erstellung der Boxplots** auch Ergebnisse anderer Altersgruppen herangezogen. Bei der höchsten Reizintensität von 3000 mcDs/m² standen nur 14, 30, 60 und 120 Tage Alte Mäuse zur Verfügung. Das Diagramm 1 veranschaulicht die genannten Ergebnisse.

3.1.1 A-Wellen-Amplituden Mausstamm OLA

Bei den OLA-Mäusen konnten dem **Friedman-Test** die Ergebnisse der Altersstufen von 14, 30, 60, 90 und 360 Tagen zugrunde gelegt werden.

Es gibt keine gültigen Fälle für die Altersgruppe 120 Tage. Die Statistiken können für diese Altersgruppe nicht berechnet werden und werden daher weggelassen.

Es ergaben sich signifikante Unterschiede der Amplituden innerhalb der Untersuchungszeiträume. Die Tabellen 6a; 6b; 6c und 6d zeigen deutlich, dass bei den höheren Reizintensitäten (1000 und 3000 mcDs/m²) die A-Wellen-Amplituden mit dem Alter der OLA-Mäuse signifikant abnehmen, was bei einer Reizintensität von 100 mcDs/m² nicht zum Ausdruck kommt (vgl. Diag. 1).

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang	Anzahl der Mäuse (N)	
AAMP7_14	4,33	Chi-Quadrat	9,867
AAMP7_30	4,00	df	4
AAMP7_60	3,67	Asymptotische Signifikanz	,043
AAMP7_90	2,00	Exakte Signifikanz	,015
AAMP7_360	1,00	Punkt-Wahrscheinlichkeit	,007
		Friedman-Test	

Tab. 6a) Isolierter Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 1000 mcDs/m²

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang	Anzahl der Mäuse (N)	
AAMP8_14	4,33	Chi-Quadrat	9,867
AAMP8_30	4,33	df	4
AAMP8_60	3,33	Asymptotische Signifikanz	,043
AAMP8_90	1,67	Exakte Signifikanz	,015
AAMP8_360	1,33	Punkt-Wahrscheinlichkeit	,007
		Friedman-Test	

Tab. 6b) Isolierter Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 3000 mcDs/m²

3. Ergebnisse

3.1.1 A-Wellen-Amplituden AMOG vs OLA

Der Vergleich der A-Wellen-Amplituden der beiden Mausstämme untereinander, erfolgte mit dem **Mann-Whitney-U-Test** (vgl. Kapitel 2.6.1). Dieser Test ergab, dass die A-Wellen-Amplituden der AMOG- und OLA-Mäuse sich bei den Reizintensitäten ab 100 mcds/m², in allen Altersstufen (14; 30; 60; 90 Tage) signifikant unterscheiden.

Bei der höchsten Reizintensität (3000 mcds/m²) war nur die Altersspanne von 14 bis 60 Tagen auswertbar, der Unterschied der A-Wellen-Amplituden aber ebenso signifikant (vgl. Tab. 7).

Vergleich der A-Wellen-Amplituden: Mann-Whitney-U-Test				
AMOG und OLA				
INTENSITÄT 100 mcds/m ²	14	30	60	90
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,008	,004	,002	,036
INTENSITÄT 1000mcds/m ²	14	30	60	90
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,00004	,0001	,0001	,009
INTENSITÄT 3000mcds/m ²	14	30	60	
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,00004	,0001	,0005	

Tab. 7: Mann-Whitney-U-Test der A-Wellen-Amplituden
(Signifikanzniveau **P** < 0,05)

Vergleicht man die Boxplots der beiden Mausstämme, ist deutlich zu erkennen, dass der AMOG-Stamm bei gleicher Reizintensität und gleichem Alter immer geringere A-Wellen-Amplituden produziert, als der OLA-Stamm, vor allem bei den Reizintensitäten ab 1000 mcds/m² (vgl. Diagr. 1).

3. Ergebnisse

3.1.2 A-Wellen-Latenzen
Mausstamm AMOG

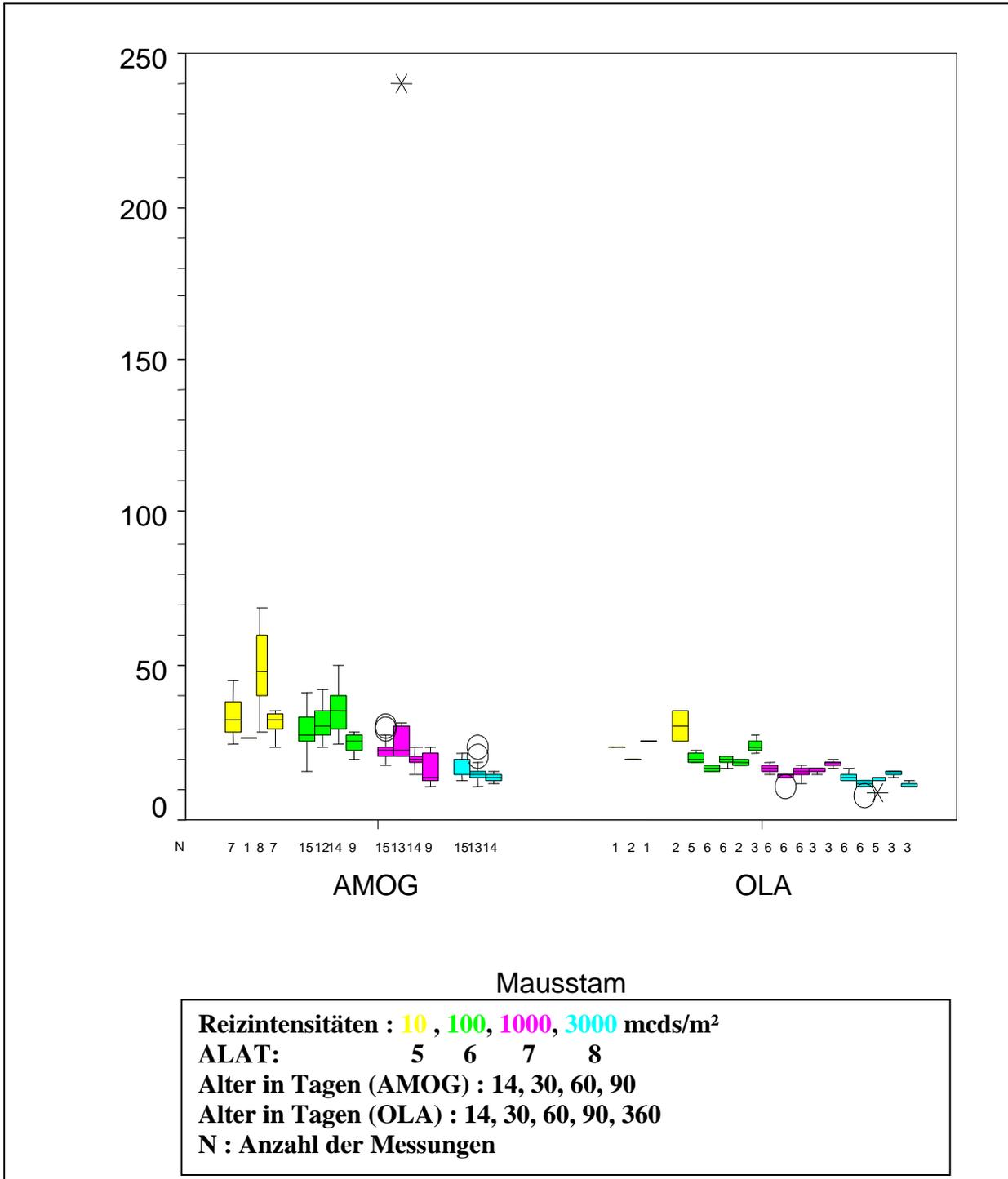


Diagramm 2: Boxplots der A-Wellen-Latenzzeit der Mausstämme AMOG und OLA
O = Ausreißer; **—** = Median; *** Stern** = extreme Ausreißer;
 Ordinate (Y-Achse): **Latenzzeit A-Welle (ms)**

3. Ergebnisse

Für den Friedman-Test wurden 14, 30, 60, 90 und 120 Tage Alte AMOG-Mäuse untersucht.

Es gibt keine gültigen Fälle für die Altersgruppen 360 Tage. Die Statistiken können für diese Altersgruppen nicht berechnet werden und werden daher weggelassen. Bei der Intensität von 10 mcDs/m² (ALAT5) und von 3000 mcDs/m² (ALAT8) gibt es keine gültigen Fälle für die Altersgruppen 90 Tage und werden daher ebenfalls weggelassen.

In den Tabellen 8a und 8b wird deutlich, dass bei einer Intensität von z.B. 1000 mcDs/m² die A-Wellen-Latenzen, mit dem Alter der AMOG-Mäuse signifikant abnehmen. Aus diesen Tabellen wird ersichtlich, dass bei einer Reizintensität von 1000 bzw. 3000 mcDs/m² die A-Wellen-Latenzen, mit zunehmendem Alter der AMOG-Mäuse signifikant abnahmen, während Sie sich gleichzeitig mit zunehmender Reizintensität verkürzten. Die Darstellung dieser Ergebnisse mittels Boxplots in Diagramm 2 zeigt diese Ergebnisse anschaulich.

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
ALAT7_14	3,31	Anzahl der Mäuse (N)	8
ALAT7_30	4,00	Chi-Quadrat	10,641
ALAT7_60	1,88	df	4
ALAT7_90	2,25	Asymptotische Signifikanz	,031
ALAT7_120	3,56	Exakte Signifikanz	,024
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000
		Friedman-Test	

Tab. 8a) Isolierter Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 1000 mcDs/m²

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
ALAT8_14	2,58	Anzahl der Mäuse (N)	16
ALAT8_30	1,88	Chi-Quadrat	6,936
ALAT8_60	1,54	df	2
		Asymptotische Signifikanz	,031
		Exakte Signifikanz	,030
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,003
		Friedman-Test	

Tab. 8b) Isolierter Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 3000 mcDs/m²

3. Ergebnisse

3.1.2 A-Wellen-Latenzen Mausstamm OLA

Die Tabelle 9a, 9b und Diagram 2 verdeutlichen, dass nur bei den Reizintensitäten von 1000 und 3000 mcDs/m² die A-Wellen-Latenz zwischen dem 14. und 30. Lebenstag signifikant abnimmt.

Für die Erstellung der Boxplots wurden die A-Wellen-Latenzen verwendet, die am 14., 30., 60., 90. und 360. Lebenstag bei den OLA- Mäusen mit Reizintensitäten von 100, 1000 und 3000 mcDs/m² zu erheben waren.

Bei der niedrigsten Intensität von 10 mcDs/m² wurden lediglich 14, 30,60 und 90 Tage alte Tiere einbezogen.

BEI INTENSITÄT : 1000 mcDs/m ² = 7 OLA ALAT7_14 bis 60 = A-Wellen-Latenzzeit; 14 bis 60 Tage Alte Mäuse			
Ränge		Statistik für Test(a)	
		Anzahl der Mäuse (N)	6
	Mittlerer Rang	Chi-Quadrat	6,000
ALAT7_14	2,00	df	1
ALAT7_30	1,00	Asymptotische Signifikanz	,014
		Exakte Signifikanz	,031
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,031
		Friedman-Test	

Tab. 9a) Isolierter Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 1000 mcDs/m²

BEI INTENSITÄT : 3000 mcDs/m ² = 8 OLA ALAT8_14 bis 60 = A-Wellen-Latenzzeit; 14 bis 60 Tage Alte Mäuse			
Ränge		Statistik für Test(a)	
		Anzahl der Mäuse (N)	6
	Mittlerer Rang	Chi-Quadrat	6,000
ALAT8_14	2,00	df	1
ALAT8_30	1,00	Asymptotische Signifikanz	,014
		Exakte Signifikanz	,031
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,031
		Friedman-Test	

Tab. 9b) Isolierter Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 3000 mcDs/m²

3. Ergebnisse

3.1.2 A-Wellen-Latenzen AMOG vs OLA

Der **Mann-Whitney-U-Test** (vgl. Kapitel 2.6.1.) ergab, dass die Latenzen der A-Welle von **AMOG- und OLA-Mäusen** bei der Reizintensität 100 mcds/m², am 14. 30. 60. und 90.Tag signifikant differieren (vgl. Tab. 10). Bei 1000 mcds/m² ist dies nur noch am 14., 30. und 60. Tag, und bei 3000 mcds/m² ist die Signifikanz nur noch bei den jüngeren Tieren (14 und 30 Tage alt) feststellbar (Tab. 10). Im AMOG-Stamm ist die A-Wellen-Latenz bei allen Intensitäten länger, als bei der OLA-Linie (vgl. Diag. 2).

Vergleich der A-Wellen-Latenzzeit: Mann-Whitney-U-Test				
AMOG und OLA				
INTENSITÄT 100 mcds/m ²	14	30	60	90
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,003	,0001	,0001	,036
INTENSITÄT 1000 mcds/m ²	14	30	60	90
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,0001	,00004	,0005	
INTENSITÄT 3000 mcds/m ²	14	30	60	90
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,033	,001		

Tabelle 10: Mann-Whitney-U-Test der A-Wellen-Latenzzeit
(Signifikanzniveau **P** < 0,05)

3. Ergebnisse

3.1.3 B-Wellen-Amplituden Mausstamm AMOG

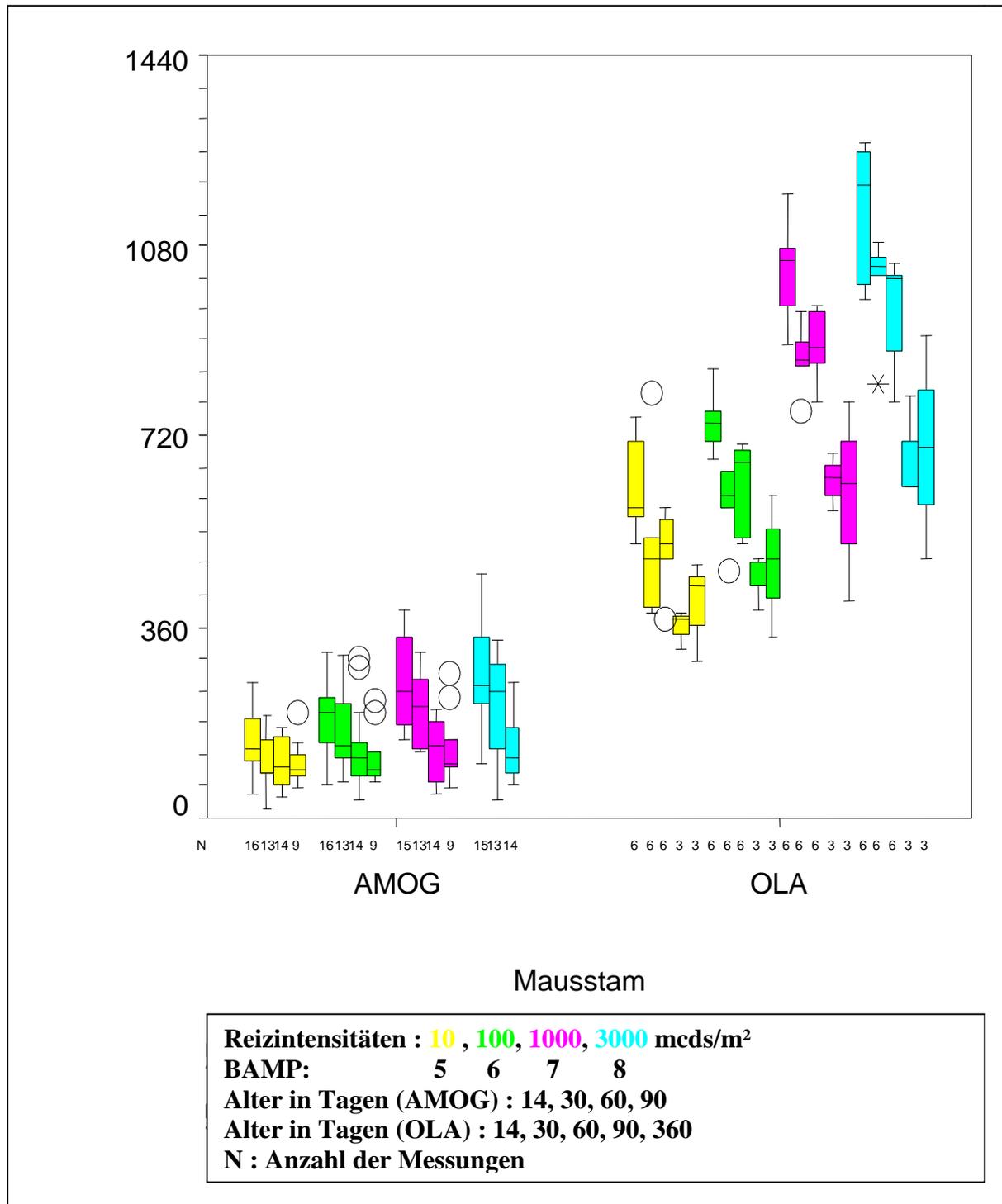


Diagramm 3: Boxplots der B-Wellen-Amplituden der Mausstämme AMOG und OLA

O = Ausreißer; — = Median; * Stern = extreme Ausreißer;
Ordinate(Y-Achse): **Amplitude B-Welle (μV)**

3. Ergebnisse

Bei der Statistischen Analyse der B-Wellen-Amplituden wurde für jede Intensität ein isolierter **Friedman-Test** angewendet (vgl. Kapitel 2.6.1.).

Als **Signifikanzniveau** wurde ein **P-Wert < 0,05** festgelegt. (20; 21).

Für den **Friedman-Test** wurden 14, 30, 60, 90 und 120 Tage alte AMOG-Mäuse untersucht. Es gibt keine gültigen Fälle für die Altersgruppe 360 Tage. Bei der Intensität von 3000 mcds/m² (ALAT8) gibt es keine gültigen Fälle für die Altersgruppen 90 Tage. Die Statistiken können für diese Altersgruppen nicht berechnet werden und werden daher weggelassen. Bei der höchsten Reizintensität von 3000 mcds/m² gibt es nur für 14, 30, und 60 Tage alte Mäuse statistisch auswertbare Fälle. Es ergaben sich signifikante Unterschiede der Amplituden innerhalb der Untersuchungszeiträume, die in den Tabellen 11a; 11b und 11c dargestellt sind. Danach nahmen bei den höheren Reizintensitäten von 100, 1000 und 3000 mcds/m² die B-Wellen-Amplituden mit dem Alter der AMOG-Mäuse in allen Altersabschnitten signifikant ab (vgl. Diag. 3 und Tab. 11a; 11b; 11c).

Zur **Erstellung der Boxplots** konnten nur Daten herangezogen werden, die bis zum Alter von 90 Tagen erhoben worden waren. Mit der höchsten Reizintensität von 3000 mcds/m² wurden nur 14, 30, und 60 Tage alte Mäuse untersucht (vgl. Diag. 3).

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
BAMP6_14	3,67	Anzahl der Mäuse (N)	9
BAMP6_30	4,11	Chi-Quadrat	10,311
BAMP6_60	2,11	df	4
BAMP6_90	2,56	Asymptotische Signifikanz	,036
BAM6_120	2,56	Exakte Signifikanz	,029
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,001
		Friedman-Test	

Tab. 11a) Isolierter Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 100 mcds/m²

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
BAMP7_14	4,13	Anzahl der Mäuse (N)	8
BAMP7_30	4,25	Chi-Quadrat	16,800
BAMP7_60	1,63	df	4
BAMP7_90	2,38	Asymptotische Signifikanz	,002
BAM7_120	2,63	Exakte Signifikanz	,001
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000
		Friedman-Test	

Tab. 11b) Isolierter Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 1000 mcds/m²

3. Ergebnisse

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang	Anzahl der Mäuse (N)	12
BAMP8_14	2,50	Chi-Quadrat	8,667
BAMP8_30	2,17	df	2
BAMP8_60	1,33	Asymptotische Signifikanz	,013
		Exakte Signifikanz	,011
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,003
		Friedman-Test	

Tab. 11c) Isolierter Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 3000 mcDs/m²

3.1.3 B-Wellen-Amplituden Mausstamm OLA

Für den Friedman-Test wurden 14, 30, 60, 90 und 360 Tage alte **OLA-Mäuse** untersucht. Die Statistiken für 120 Tage Alte OLA-Mäuse fehlen komplett, da es für diese Altersgruppe keine gültigen Fälle gibt. In den Tabellen 12a; 12b; 12c und 12d wird statistisch deutlich, dass bei allen Reizintensitäten (10, 100, 1000 und 3000 mcDs/m²) die B-Wellen-Amplituden, mit dem Alter der OLA-Mäuse signifikant abnehmen (vgl. Diag. 3 und Tab. 12a; 12b; 12c; 12d).

Hier zeigen der AMOG- und der OLA-Stamm bzgl. der B-Wellen-Amplitude die gleiche Tendenz.

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang	Anzahl der Mäuse (N)	3
BAMP5_14	5,00	Chi-Quadrat	9,867
BAMP5_30	3,00	Df	4
BAMP5_60	3,67	Asymptotische Signifikanz	,043
BAMP5_90	1,33	Exakte Signifikanz	,015
BAMP5_360	2,00	Punkt-Wahrscheinlichkeit	,007
		Friedman-Test	

Tab. 12a) Isolierter Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 10 mcDs/m²

3. Ergebnisse

BEI INTENSITÄT : 100 mcDs/m ² = 6 OLA BAMP6_14 bis 360 = B-Amplitude 100 mcDs/m ² ; 14 bis 360 Tage Alte Mäuse			
Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
BAMP6_14	4,67	Anzahl der Mäuse (N)	3
BAMP6_30	2,67	Chi-Quadrat	10,133
BAMP6_60	4,33	df	4
BAMP6_90	1,33	Asymptotische Signifikanz	,038
BAM6_360	2,00	Exakte Signifikanz	,008
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,003
		Friedman-Test	

Tab. 12b) Isolierter Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 100 mcDs/m²

BEI INTENSITÄT : 1000 mcDs/m ² = 7 OLA BAMP7_14 bis 360 = B-Amplitude 1000 mcDs/m ² ; 14 bis 360 Tage Alte Mäuse			
Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
BAMP7_14	5,00	Anzahl der Mäuse (N)	3
BAMP7_30	3,00	Chi-Quadrat	11,467
BAMP7_60	4,00	df	4
BAMP7_90	1,33	Asymptotische Signifikanz	,022
BAM7_360	1,67	Exakte Signifikanz	,001
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,001
		Friedman-Test	

Tab. 12c) Isolierter Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 1000 mcDs/m²

BEI INTENSITÄT : 3000 mcDs/m ² = 8 OLA BAMP8_14 bis 360 = B-Amplitude 3000 mcDs/m ² ; 14 bis 360 Tage Alte Mäuse			
Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
BAMP8_14	4,33	Anzahl der Mäuse (N)	3
BAMP8_30	4,33	Chi-Quadrat	9,867
BAMP8_60	3,33	df	4
BAMP8_90	1,33	Asymptotische Signifikanz	,043
BAM8_360	1,67	Exakte Signifikanz	,015
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,007
		Friedman-Test	

Tab. 12d) Isolierter Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 3000 mcDs/m²

3. Ergebnisse

3.1.3 B-Wellen-Amplituden AMOG vs OLA

Der Vergleich der o.g. Mausstämmen untereinander, erfolgte mit dem **Mann-Whitney-U-Test** (vgl. Kapitel 2.6.1.).

Dieser Test ergab, dass die Abnahme der B-Wellen-Amplituden der **AMOG- und OLA-Linie**, bei den Intensitäten 10, 100, 1000 mcds/m², nur in den Alterszeitpunkten (14; 30; 60; 90) Signifikant sind.

Bei der höchsten Intensität (3000 mcds/m²) ist die Signifikanz der B-Wellen-Amplituden lediglich bei den Alterszeitpunkten (14, 30 und 60) vorhanden (vgl. Diagr. 3 und Tabelle 13).

Vergleich der B-Wellen-Amplituden: Mann-Whitney-U-Test				
AMOG und OLA				
INTENSITÄT 10 mcds/m ²	14	30	60	90
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,00003	,00007	,00005	,009
INTENSITÄT 100 mcds/m ²	14	30	60	90
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,00003	,00007	,00005	,009
INTENSITÄT 1000mcds/m ²	14	30	60	90
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,00004	,00007	,00005	,009
INTENSITÄT 3000mcds/m ²	14	30	60	
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,00004	,00007	,00005	

Tabelle 13: Mann-Whitney-U-Test der B-Wellen-Amplituden
(Signifikanzniveau **P** < 0,05)

3. Ergebnisse

3.1.4 B-Wellen-Latenzen
Mausstamm AMOG

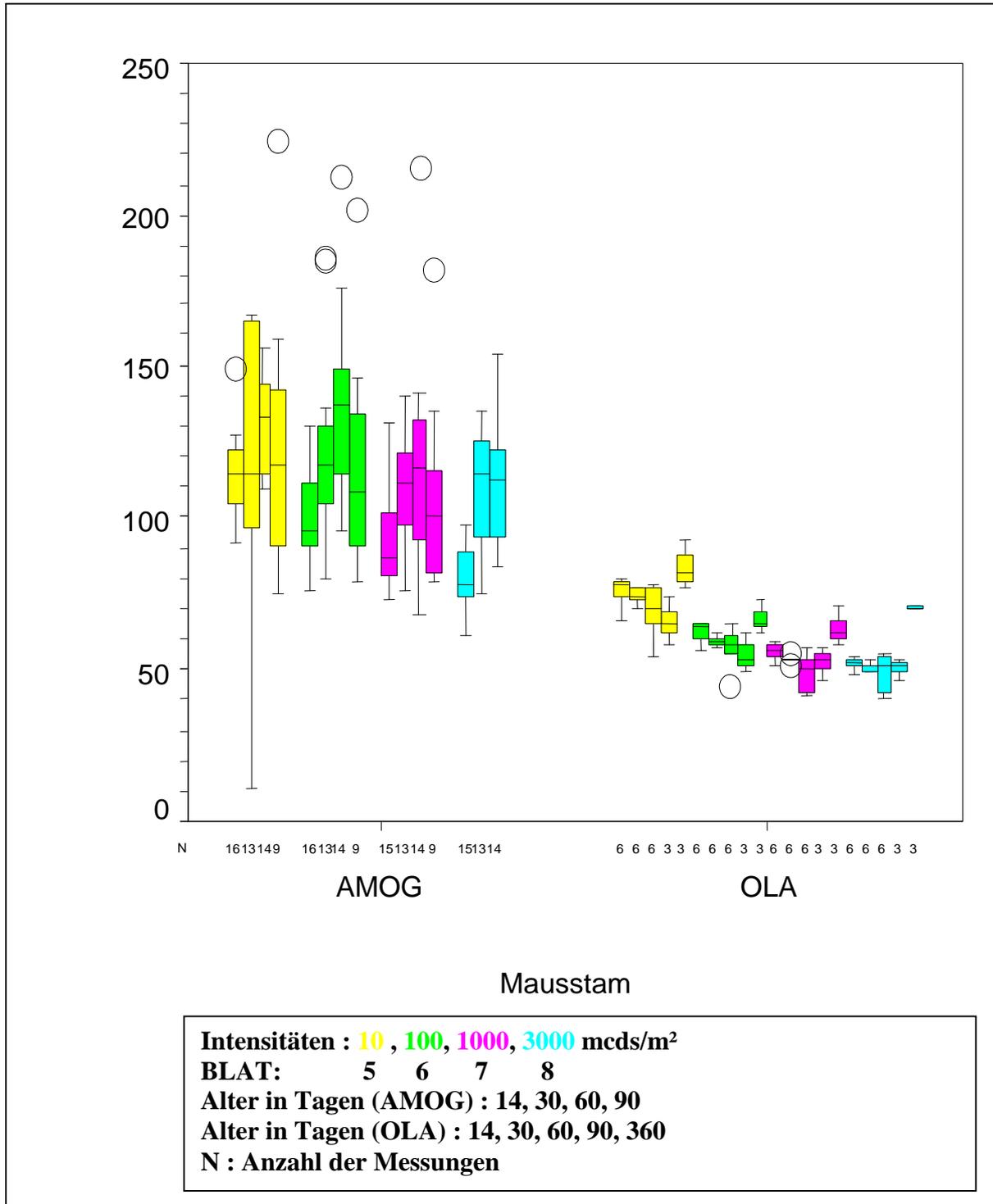


Diagramm 4: Boxplots der B-Wellen-Latenzzeit der Mausstämme AMOG und OLA
O = Ausreißer; **—** = Median; * **Stern** = extreme Ausreißer;
 Ordinate(Y-Achse): **Latenzzeit B-Welle (ms)**

3. Ergebnisse

Bei der Statistischen Analyse der B-Wellen-Latenzen wurde für jede Intensität ein isolierter **Friedman-Test** angewendet (vgl. Kapitel 2.6.1.).

Als **Signifikanzniveau** wurde ein **P-Wert < 0,05** festgelegt. (20; 21).

Für den **Friedman-Test** wurden 14, 30, 60, 90 und 120 Tage alte **AMOG-Mäuse** untersucht. Es gibt keine gültigen Fälle für die Altersgruppe 360 Tage. Bei der Intensität von 3000 mcDs/m² (BLAT8) gibt es keine gültigen Fälle für die Altersgruppen 90 Tage. Die Statistiken können für diese Altersgruppen nicht berechnet werden und werden daher weggelassen.

Bei der höchsten Reizintensität von 3000 mcDs/m² wurden nur 14, 30, 60 und 120 Tage Alte Mäuse untersucht.

Der Friedman-Test ergab signifikante Unterschiede der Amplitudenwerte innerhalb der Untersuchungszeiträume. In den Tabellen 14a; 14b; 14c und 14d wird statistisch deutlich, dass bei einer Intensität (z.B. 1000 mcDs/m²) die B-Wellen-Latenzen mit dem Alter der AMOG-Mäuse signifikant zunehmen. Bei 90 Tage Alten AMOG-Mäuse ist diese Tendenz rückläufig und die B-Wellen-Latenz nimmt ab. Betrachtet man jedoch die B-Wellen-Latenzen der verschiedenen Untersuchungszeiträume in Abhängigkeit von der Reizintensität, ist mit zunehmender Intensität eine Abnahme der B-Wellen-Latenz zu beobachten (vgl. Diag. 4 und Tab. 14a; 14b; 14c; 14d).

Im Gegensatz zum Friedman-Test wurden für die **Erstellung der Boxplots** des AMOG-Stammes nur die 14, 30, 60 und 90 Tage alten Tiere einbezogen. Bei der höchsten Reizintensität von 3000 mcDs/m² wurden nur 14, 30, und 60 Tage Alte Mäuse untersucht (vgl. Diag. 4).

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
BLAT5_14	1,89	Anzahl der Mäuse (N)	9
BLAT5_30	2,33	Chi-Quadrat	8,600
BLAT5_60	3,56	df	3
BLAT5_90	2,22	Asymptotische Signifikanz	,035
		Exakte Signifikanz	,032
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,004
		Friedman-Test	

Tab. 14a) Isolierter Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 10 mcDs/m²

3. Ergebnisse

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
BLAT6_14	1,46	Anzahl der Mäuse (N)	13
BLAT6_30	2,00	Chi-Quadrat	7,538
BLAT6_60	2,54	df	2
		Asymptotische Signifikanz	,023
		Exakte Signifikanz	,025
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,009
		Friedman-Test	

Tab. 14b) Isolierter Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 100 mcDs/m²

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
BLAT7_14	2,00	Anzahl der Mäuse (N)	8
BLAT7_30	3,13	Chi-Quadrat	11,000
BLAT7_60	3,63	df	4
BLAT7_90	2,13	Asymptotische Signifikanz	,027
BLA7_120	4,13	Exakte Signifikanz	,020
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,001
		Friedman-Test	

Tab. 14c) Isolierter Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 1000 mcDs/m²

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
BLAT8_14	1,11	Anzahl der Mäuse (N)	9
BLAT8_30	2,78	Chi-Quadrat	14,200
BLAT8_60	3,11	df	3
BLA8_120	3,00	Asymptotische Signifikanz	,003
		Exakte Signifikanz	,001
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000
		Friedman-Test	

Tab. 14d) Isolierter Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 3000 mcDs/m²

3. Ergebnisse

3.1.4 B-Wellen-Latenzen Mausstamm OLA

Für den Friedman-Test wurden 14, 30, 60, 90 und 360 Tage alte OLA-Mäuse untersucht. Es gibt keine gültigen Fälle für die Altersgruppen 120 Tage. Bei der Intensität von 3000 mcDs/m² (BLAT8) gibt es keine gültigen Fälle für die Altersgruppen 90 Tage. Die Statistiken können für diese Altersgruppen nicht berechnet werden und werden daher weggelassen. In den Tabellen 9a; 9b und 9c wird statistisch deutlich, dass bei fast allen Reizintensitäten (100, 1000 und 3000 mcDs/m²) die B-Wellen-Latenzen, mit dem Alter der OLA-Mäuse signifikant abnehmen. Diese Tendenz ist bei 360 Tage alten OLA-Mäuse rückläufig, d.h. die Latenzzeit nimmt bei allen Intensitäten wesentlich zu (vgl. Diag. 4 und Tab. 15a; 15b; 15c).

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
BLAT6_14	3,50	Anzahl der Mäuse (N)	3
BLAT6_30	1,67	Chi-Quadrat	7,552
BLAT6_60	3,50	df	3
BLAT6_90	1,33	Asymptotische Signifikanz	,056
		Exakte Signifikanz	,038
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,014
		Friedman-Test	

Tab. 15a) Isolierter Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 100 mcDs/m²

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
BLAT7_14	4,00	Anzahl der Mäuse (N)	3
BLAT7_30	1,83	Chi-Quadrat	9,966
BLAT7_60	2,33	df	4
BLAT7_90	1,83	Asymptotische Signifikanz	,041
BLA7_360	5,00	Exakte Signifikanz	,011
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,002
		Friedman-Test	

Tab. 15b) Isolierter Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 1000 mcDs/m²

3. Ergebnisse

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
BLAT8_14	3,00	Anzahl der Mäuse (N)	3
BLAT8_30	1,50	Chi-Quadrat	11,018
BLAT8_60	3,83	df	4
BLAT8_90	1,67	Asymptotische Signifikanz	,026
BLA8_360	5,00	Exakte Signifikanz	,002
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,001
		Friedman-Test	

Tab. 15c) Isolierter Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 3000 mcDs/m²

3.1.4 B-Wellen-Latenzen AMOG vs OLA

Der **Mann-Whitney-U-Test** (vgl. Kapitel 2.6.1.), ergab, dass die B-Wellen-Latenzen der **AMOG- und OLA-Linie**, bei den Intensitäten 10, 100, 1000 mcDs/m², nur in den Alterszeitpunkten (14; 30; 60; 90) signifikant differieren.

Im AMOG-Stamm steigt innerhalb einer Reizintensität die B-Wellen-Latenz bis zum 60. Lebenstag. Im OLA-Stamm nimmt Sie bis zum 90. Lebenstag ab.

Im AMOG-Stamm nimmt die B-Wellen-Latenz ab dem 90. Lebenstag ab, wobei Sie bei den OLA-Mäusen, ab dem 360. Lebenstag zunimmt. Bei der höchsten Intensität (3000 mcDs/m²) ist der Unterschied der B-Wellen-Latenzen beider Mausstämmen lediglich bei den 14, 30 und 60-Tage alten Tiere signifikant (vgl. Diagr. 4 und Tabelle 16).

Vergleich der B-Wellen-Latenzzeit: Mann-Whitney-U-Test				
AMOG und OLA				
INTENSITÄT 10 mcDs/m ²	14	30	60	90
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,00003	,002	,00005	,009
INTENSITÄT 100 mcDs/m ²	14	30	60	90
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,00003	,00007	,00003	,009
INTENSITÄT 1000 mcDs/m ²	14	30	60	90
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,00004	,00007	,00005	,009
INTENSITÄT 3000 mcDs/m ²	14	30	60	
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,00004	,00007	,00005	

Tabelle 16: Mann-Whitney-U-Test der B-Wellen-Latenzzeit
(Signifikanzniveau **P** < 0,05)

3. Ergebnisse

3.1.5 Oszillatorische Potenziale Mausstamm AMOG

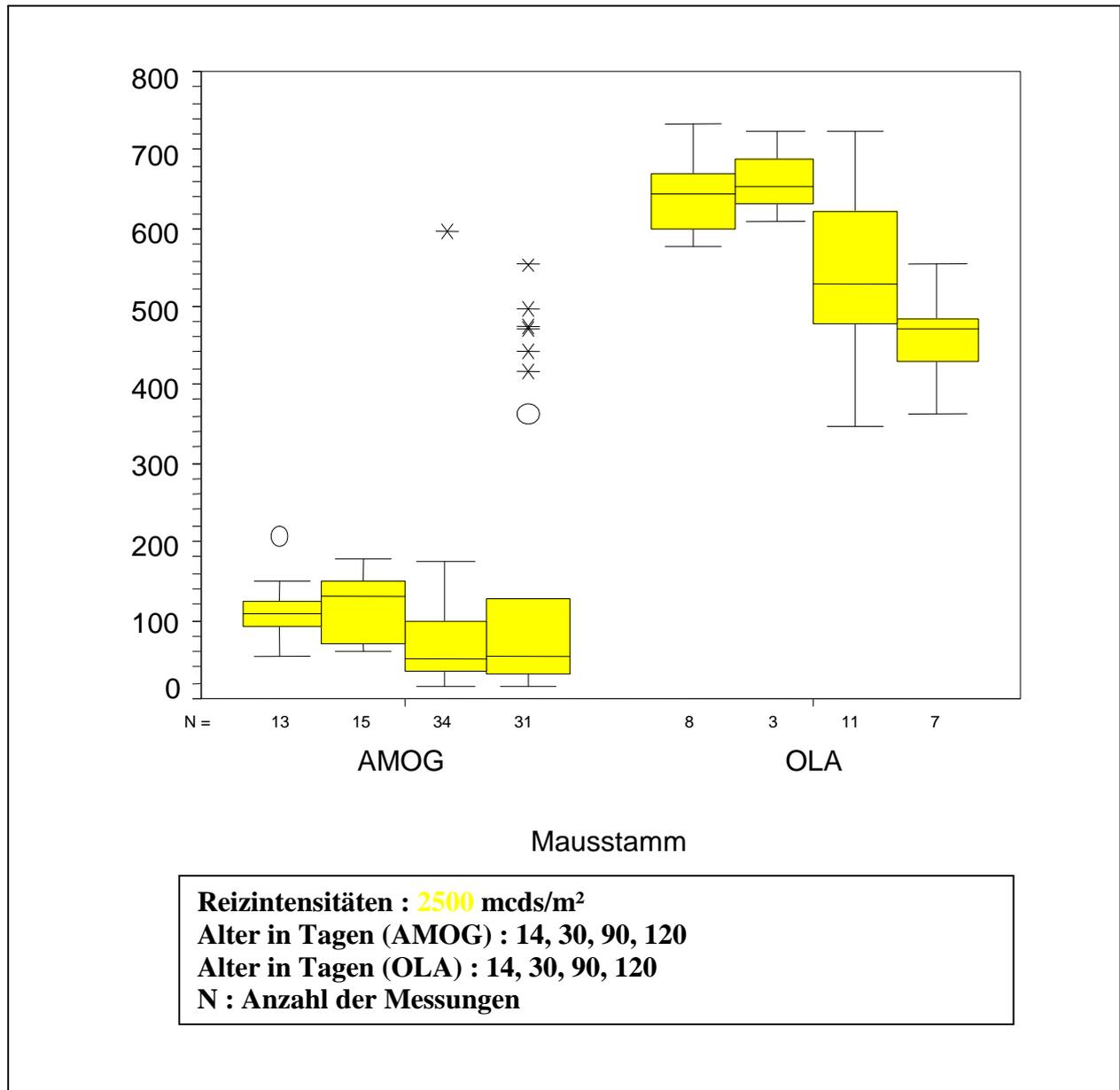


Diagramm 5: Boxplots der Oszillatorischen Potenziale der Mausstämme AMOG und OLA
O = Ausreißer; — = Median; * Stern = extreme Ausreißer;
Ordinate(Y-Achse): **Oszillatorische Amplitude (µV)**

3. Ergebnisse

Zur statistischen Analyse der oszillatorischen Potenziale wurde ein Friedman-Test nur für die Intensität von 2500 mcDs/m² angewendet (vgl. Kapitel 2.6.1.).

Als Signifikanzniveau galt ein P-Wert von < 0,05. (20; 21).

Die Auswertung erfasste die Ergebnisse von 14, 30, 60, 90, 120 und 150 Tage alten AMOG-Mäusen. Es gibt keine gültigen Fälle für die Altersgruppen 360 Tage.

Die Statistiken können für diese Altersgruppen nicht berechnet werden und werden daher weggelassen.

Es zeigte sich, dass die unipolare Stromstärke der oszillatorischen Potenziale mit dem Alter der Tiere signifikant abnahm (vgl. Tab. 17a; 17b).

Die Boxplots wurden auf der Grundlage der Ergebnisse der 14, 30, 90 und 120 Tage alten Tiere erstellt und verdeutlichen den Sachverhalt ebenfalls.

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
OAMP1_14	4,88	Anzahl der Mäuse (N)	8
OAMP1_30	4,75	Chi-Quadrat	24,643
OAMP1_60	2,50	df	5
OAMP1_90	2,63	Asymptotische Signifikanz	,000
OAMP1120	1,50	Exakte Signifikanz	,00001
OAMP1150	4,75	Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000
		Friedman-Test	

Tab. 17a) Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 2500 mcDs/m²

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
OAMP1_14	2,23	Anzahl der Mäuse (N)	13
OAMP1_30	2,54	Chi-Quadrat	12,154
OAMP1_60	1,23	df	2
		Asymptotische Signifikanz	,002
		Exakte Signifikanz	,001
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000
		Friedman-Test	

Tab. 17b) Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 2500 mcDs/m²

3. Ergebnisse

3.1.5 Oszillatorische Potenziale Mausstamm OLA

Mit dem Friedman-Test wurden die Amplituden der oszillatorischen Potentiale von 14, 30, 90 und 120 Tage alten **OLA-Mäuse** untersucht. Es gibt keine gültigen Fälle für die Altersgruppen 360 Tage. Die Statistiken können für diese Altersgruppen nicht berechnet werden und werden daher weggelassen.

Tab.18 und Diagramm 5 zeigen, dass die Amplituden der oszillatorischen Potentiale bei der Reizintensität von 2500 mcDs/m² mit dem Alter innerhalb der Untersuchungszeiträume, signifikant abnehmen.

BEI INTENSITÄT : 2500 mcDs/m ² / OLA																									
0AMP1_90 bis 120 = O-Amplitude 2500 mcDs/m ² ; 90 bis 120 Tage Alte Mäuse																									
<table border="1" style="display: inline-table; margin-right: 20px;"> <thead> <tr> <th colspan="2">Ränge</th> </tr> <tr> <th></th> <th>Mittlerer Rang</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>OAMP1_14</td> <td>2,00</td> </tr> <tr> <td>OAMP1120</td> <td>1,00</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="display: inline-table;"> <thead> <tr> <th colspan="2">Statistik für Test(a)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Anzahl der Mäuse (N)</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>Chi-Quadrat</td> <td>7,000</td> </tr> <tr> <td>df</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Asymptotische Signifikanz</td> <td>,008</td> </tr> <tr> <td>Exakte Signifikanz</td> <td style="background-color: #90EE90;">,016</td> </tr> <tr> <td>Punkt-Wahrscheinlichkeit</td> <td>,016</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Friedman-Test</td> </tr> </tbody> </table>		Ränge			Mittlerer Rang	OAMP1_14	2,00	OAMP1120	1,00	Statistik für Test(a)		Anzahl der Mäuse (N)	7	Chi-Quadrat	7,000	df	1	Asymptotische Signifikanz	,008	Exakte Signifikanz	,016	Punkt-Wahrscheinlichkeit	,016	Friedman-Test	
Ränge																									
	Mittlerer Rang																								
OAMP1_14	2,00																								
OAMP1120	1,00																								
Statistik für Test(a)																									
Anzahl der Mäuse (N)	7																								
Chi-Quadrat	7,000																								
df	1																								
Asymptotische Signifikanz	,008																								
Exakte Signifikanz	,016																								
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,016																								
Friedman-Test																									

Tab. 18) Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 2500 mcDs/m²

3.1.5 Oszillatorische Potenziale AMOG vs OLA

Der **Mann-Whitney-U-Test** (vgl. Kapitel 2.6.1.), mit dem die oszillatorischen Potentiale der **AMOG- und OLA-Linie** untereinander verglichen wurden, ergab, dass diese nur zu den Alterszeitpunkten (30 und 120-Tage) signifikant differieren (vgl. Tab. 19). Vergleicht man dies mit Diagramm 5, erscheint diese Aussage nicht plausibel. Dieses Missverhältnis der Ergebnisse kommt dadurch zustande, dass für den Friedmann-Test auch Tiere anderen Alters (zusätzlich auch 60 und 150 Tage) verwendet wurden (vgl. Tab. 17a; 17b). Für die Boxplots jedoch nur 14; 30; 90; 120-Tage alte Tiere. Weiterhin gibt es bei 120 Tage alten AMOG Mäusen viele Ausreißer und extreme Ausreißer(vgl. Diagr. 5).

AMOG und OLA				
INTENSITÄT 2500 mcDs/m ²	14	30	90	120
Exakte Signifikanz (2-seitig)	9,83	,002	9,35	,001

Tabelle 19: Mann-Whitney-U-Test der Oszillatorischen Potenzialen (Signifikanzniveau **P** < 0,05)

3. Ergebnisse

3.1.6 Oszillatorische Potenziale - Latenzzeit Mausstamm AMOG

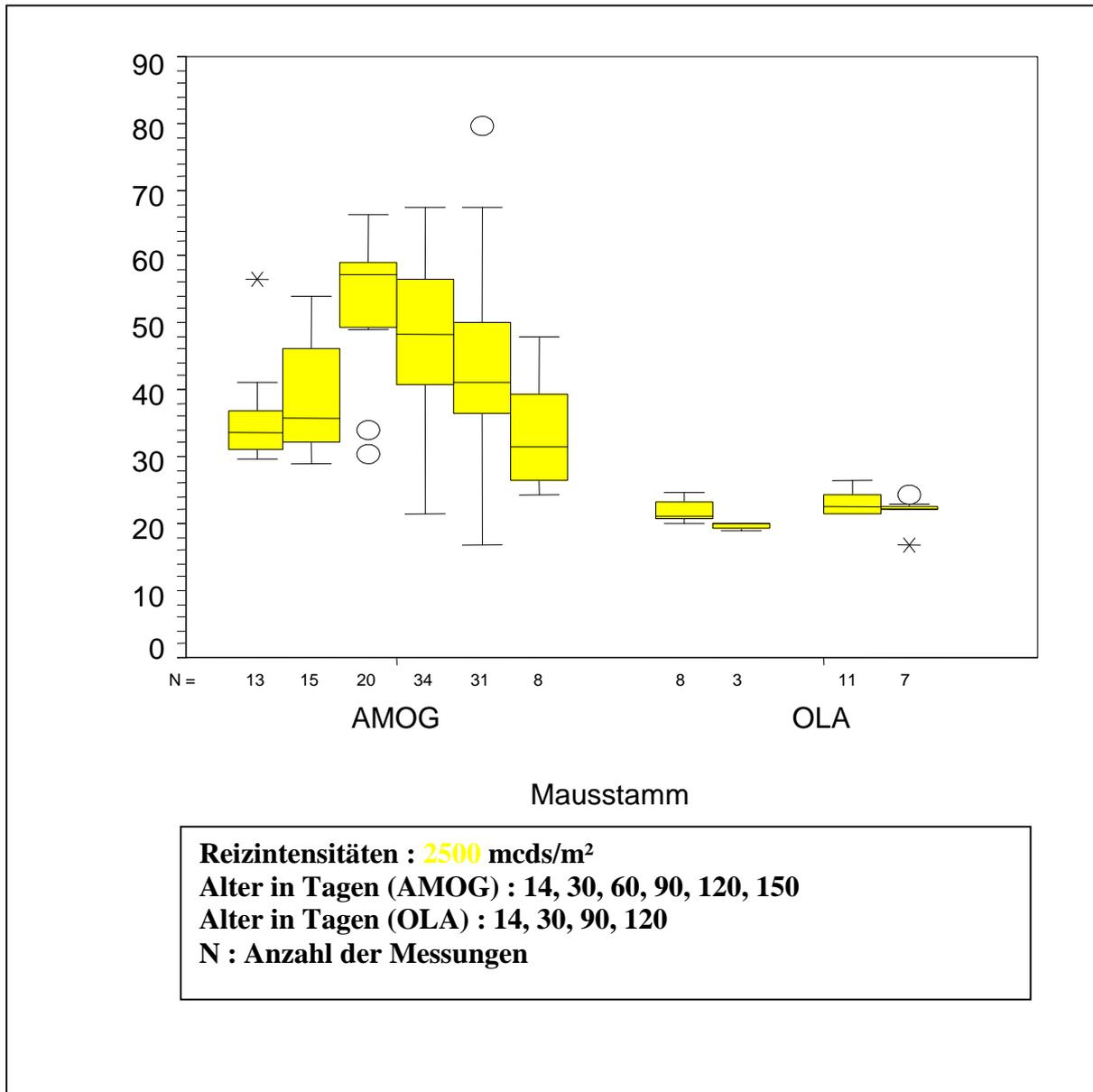


Diagramm 6: Boxplots der Latenzzeit Oszillation der Mausstämme AMOG und OLA
O = Ausreißer; — = Median; * Stern = extreme Ausreißer;
Ordinate(Y-Achse): Latenzzeit Oszillation (ms)

3. Ergebnisse

Bei der Statistischen Analyse der Latenzzeit Oszillation wurde nur für die Intensität 2500 mcDs/m² ein Friedman-Test angewendet (vgl. Kapitel 2.6.1.).

Als Signifikanzniveau wurde ein **P-Wert < 0,05** festgelegt. (20; 21).

Für den Friedman-Test wurden 14, 30, 60, 90, 120 und 150 Tage Alte **AMOG-Mäuse** untersucht. Es gibt keine gültigen Fälle für die Altersgruppen 360 Tage. Die Statistiken können für diese Altersgruppen nicht berechnet werden und werden daher weggelassen.

Der Friedman-Test ergab, dass die Latenzzeit der Oszillation bis zum 90.Tag signifikant zunimmt und ab dem 120.Tag signifikant wieder abzunehmen (vgl. Diag. 6; Tab. 20a; 20b).

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
OLAT1_14	1,50	Anzahl der Mäuse (N)	8
OLAT1_30	3,25	Chi-Quadrat	28,929
OLAT1_60	5,13	df	5
OLAT1_90	4,88	Asymptotische Signifikanz	,000
OLAT1120	4,50	Exakte Signifikanz	,0000001
OLAT1150	1,75	Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000
		Friedman-Test	

Tab. 20a) Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 2500 mcDs/m²

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
OLAT1_14	2,23	Anzahl der Mäuse (N)	13
OLAT1_30	2,54	Chi-Quadrat	12,154
OLAT1_60	1,23	df	2
		Asymptotische Signifikanz	,002
		Exakte Signifikanz	,001
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000
		Friedman-Test	

Tab. 20b) Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 2500 mcDs/m²

3. Ergebnisse

3.1.6 Oszillatorische Potenziale - Latenzzeit Mausstamm OLA

Für den Friedman-Test wurden 14, 30, 90 und 120 Tage alte **OLA-Mäuse** untersucht. Auch hier gibt es statistisch, keine gültigen Fälle. 60, 150 und 360 Tage Alte OLA-Mäuse werden daher weggelassen.

Der Friedman-Test ergab keine signifikante Unterschiede der Latenzen innerhalb der Untersuchungszeiträume (vgl. Diag. 6 und Tab. 21).

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang	Anzahl der Mäuse (N)	
OLAT1_14	3,00	Chi-Quadrat	5,893
OLAT1_30	1,50	df	3
OLAT1_90	3,67	Asymptotische Signifikanz	,117
OLAT1120	1,83	Exakte Signifikanz	,153
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,056
		Friedman-Test	

Tab. 21) Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 2500 mcDs/m²

3.1.6 Oszillatorische Potenziale - Latenzzeit AMOG vs OLA

Der **Mann-Whitney-U-Test** (vgl. Kapitel 2.6.1.) ergab, dass die Latenzzeit der Oszillationen bei der Intensität 500 cds/m² nur zu den Alterszeitpunkten 14; 30 und 120-Tage bei den **AMOG- Mäusen** signifikant länger war als bei den **OLA-Mäusen** (Tab. 22).

AMOG und OLA				
INTENSITÄT 2500 mcDs/m ²	14	30	90	120
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,00000983	,002	1,70	,001

Tabelle 22: Mann-Whitney-U-Test der Latenzzeit Oszillation
(Signifikanzniveau **P** < 0,05)

3. Ergebnisse

3.1.7 C-Wellen-Amplituden Mausstamm AMOG

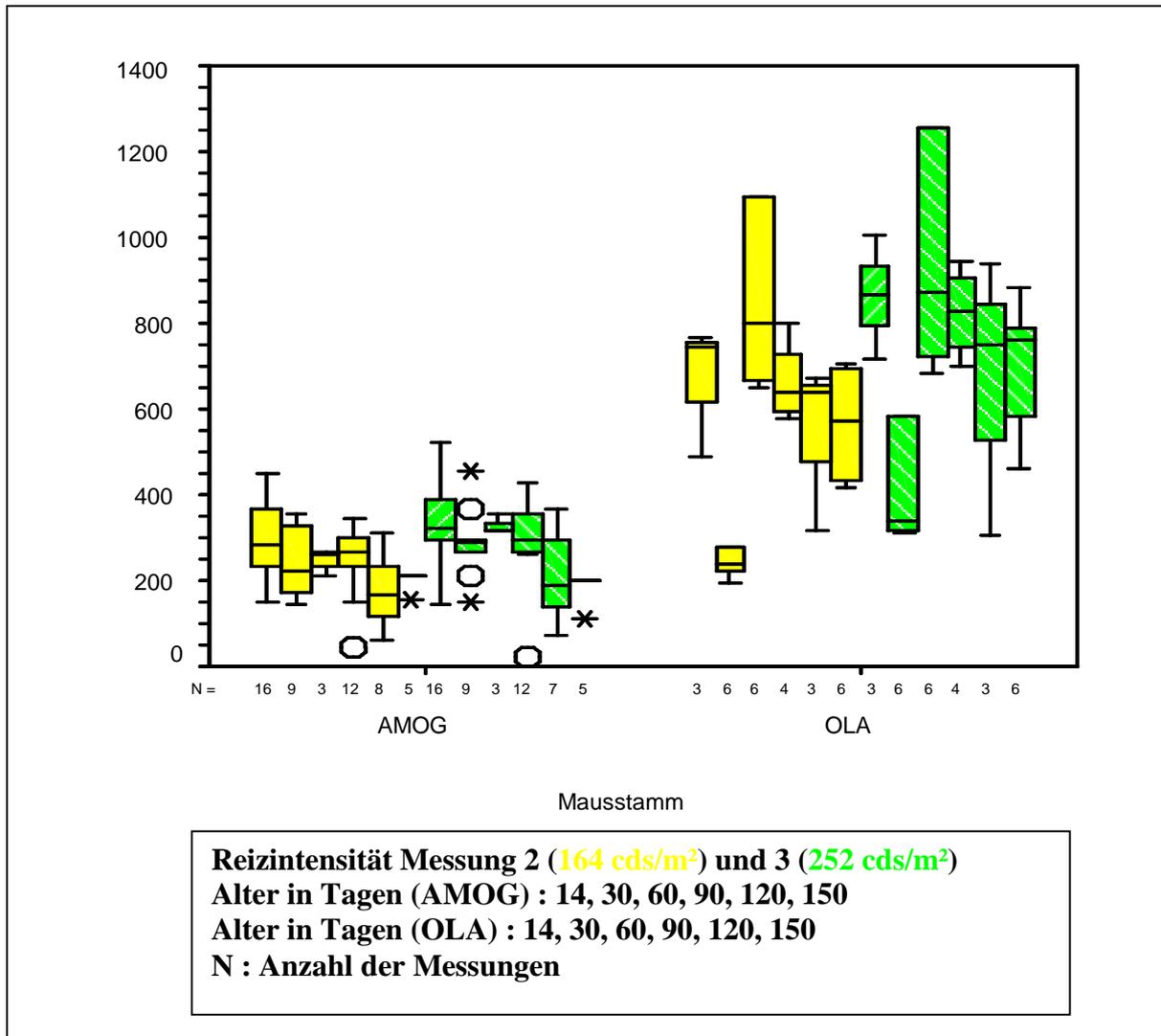


Diagramm 7: Boxplots der C-Wellen-Amplitude der Mausstämme AMOG und OLA
O = Ausreißer; — = Median; * Stern = extreme Ausreißer;
Ordinate(Y-Achse): = Amplitude C-Welle(µV)

3. Ergebnisse

Die bei den Reizintensitäten von 164 und 252 mcds/m² erhaltenen C-Wellen Amplituden wurden jeweils einem isolierten Friedman-Test unterzogen (vgl. Kapitel 2.6.1.).

Als **Signifikanzniveau** wurde ein **P-Wert < 0,05** festgelegt. (20; 21).

Die AMOG-Mäuse waren 14, 30, 60, 90, 120 und 150 Tage alt. Auch hier gibt es statistisch keine gültigen Fälle für 360 Tage alte AMOG-Mäuse. Sie werden daher komplett weggelassen.

Der Friedman-Test ergab, dass die C-Wellen-Amplituden innerhalb der Untersuchungszeiträume mit dem Alter der AMOG-Mäuse signifikant abnahmen (vgl. Tab. 23a; 23b).

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
CAMP2_14	5,00	Anzahl der Mäuse (N)	3
CAMP2_30	2,00	Chi-Quadrat	11,952
CAMP2_60	4,67	df	5
CAMP2_90	5,33	Asymptotische Signifikanz	,035
CAMP2120	1,67	Exakte Signifikanz	,008
CAMP2150	2,33	Punkt-Wahrscheinlichkeit	,002
		Friedman-Test	

Tab. 23a) Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 164 cds/m²

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
CAMP3_14	5,00	Anzahl der Mäuse (N)	3
CAMP3_30	3,00	Chi-Quadrat	11,190
CAMP3_60	5,00	df	5
CAMP3_90	4,67	Asymptotische Signifikanz	,048
CAMP3120	2,00	Exakte Signifikanz	,018
CAMP3150	1,33	Punkt-Wahrscheinlichkeit	,004
		Friedman-Test	

Tab. 23b) Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 252 cds/m²

3. Ergebnisse

3.1.7 C-Wellen-Amplituden Mausstamm OLA

Die OLA-Mäuse waren 14, 30, 60, 90, 120 und 150 Tage alt. untersucht. Aus den bereits genannten Gründen, fehlen 360 Tage Alte OLA-Mäuse Komplet. Der Friedman-Test ergab eine signifikante Abnahme der C-Wellen-Amplitude innerhalb der Untersuchungszeiträume mit zunehmendem Alter (vgl. Diag. 7 und Tab. 24a, 24b).

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
CAMP2_14	4,00	Anzahl der Mäuse (N)	3
CAMP2_30	1,00	Chi-Quadrat	12,333
CAMP2_60	6,00	df	5
CAMP2_90	4,00	Asymptotische Signifikanz	,030
CAMP2_120	2,33	Exakte Signifikanz	,005
CAMP2_150	3,67	Punkt-Wahrscheinlichkeit	,002
		Friedman-Test	

Tab. 24a) Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 164 cds/m²

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
CAMP3_14	3,33	Anzahl der Mäuse (N)	3
CAMP3_30	1,33	Chi-Quadrat	10,238
CAMP3_60	6,00	df	5
CAMP3_90	4,00	Asymptotische Signifikanz	,069
CAMP3_120	2,67	Exakte Signifikanz	,036
CAMP3_150	3,67	Punkt-Wahrscheinlichkeit	,004
		Friedman-Test	

Tab. 24b) Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 252 cds/m²

3.1.7 C-Wellen -Amplituden AMOG vs OLA

Der **Mann-Whitney-U-Test** (vgl. Kapitel 2.6.1.) wies nach, dass die C-Wellen- Amplituden der **AMOG- Mäuse** bei der Intensität 164 cds/m² nur zu den Alterszeitpunkten 14; 60; 90; 120 und 150-Tage signifikant kleiner waren als bei der **OLA-Linie**. Bei der Reizintensität von 252 cds/m² war dieses Ergebnis in allen Altersstufen signifikant (vgl.Tab. 25).

Vergleich der C-Wellen-Amplitude: Mann-Whitney-U-Test						
AMOG und OLA						
INTENSITÄT 164 cds/m ²	14	30	60	90	120	150
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,002	,797	,024	,001	,012	,004
INTENSITÄT 252 cds/m ²	14	30	60	90	120	150
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,002	,023	,024	,001	,067	,004

Tabelle 25: Mann-Whitney-U-Test der C-Wellen-Amplitude
(Signifikanzniveau **P** < 0,05)

3. Ergebnisse

3.1.8 C-Wellen -Latenzen Mausstamm AMOG

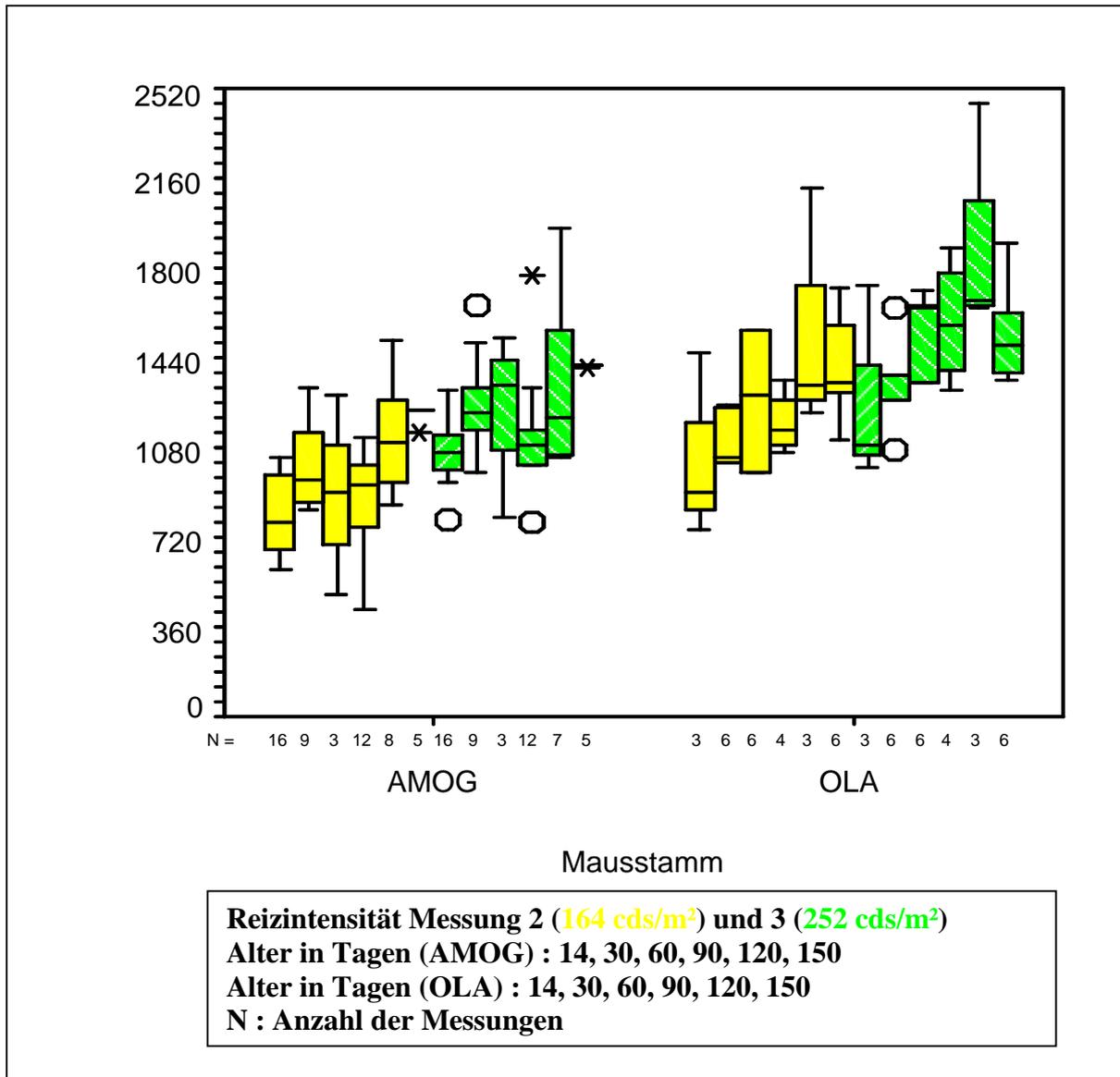


Diagramm 8: Boxplots der Latenzzeit C-Welle der Mausstämme AMOG und OLA
O = Ausreißer; — = Median; * Stern = extreme Ausreißer;
Ordinate(Y-Achse): **Latenzzeit C-Welle (ms)**

3. Ergebnisse

Bei der Statistischen Analyse der Latenzzeit der C-Welle wurde für jede Intensität ein isolierter **Friedman-Test** angewendet (vgl. Kapitel 2.6.1.).

Als **Signifikanzniveau** wurde ein **P-Wert < 0,05** festgelegt. (20; 21).

Für den **Friedman-Test** wurden 14, 30, 90, 120 und 150 Tage Alte AMOG-Mäuse herangezogen.

Der Friedman-Test zeigte, dass innerhalb der Untersuchungszeiträume nur bei der Intensität 164 cds/m² (Messung 2) die C-Wellen-Amplituden mit dem Alter der AMOG-Mäuse signifikant zunahmen (Tab. 26a; 26b).

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang	Anzahl der Mäuse (N)	9
CLAT2_14	1,00	Chi-Quadrat	9,000
CLAT2_30	2,00	df	1
		Asymptotische Signifikanz	,003
		Exakte Signifikanz	,004
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,004
		Friedman-Test	

Tab. 26a) Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 164 cds/m²

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang	Anzahl der Mäuse (N)	5
CLAT2_90	1,00	Chi-Quadrat	7,600
CLAT2120	2,40	df	2
CLAT2150	2,60	Asymptotische Signifikanz	,022
		Exakte Signifikanz	,024
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,015
		Friedman-Test	

Tab. 26b) Friedman-Test AMOG-Stamm bei Reizintensität 164 cds/m²

3. Ergebnisse

3.1.8 C-Wellen -Latenzen Mausstamm OLA

Die C-Wellen-Latenz wurde bei **OLA-Mäusen** am 14., 30., 60., 90., 120. und 150. Lebensstag untersucht. 360 Tage alte OLA-Mäuse fehlen komplett. Der Friedman-Test ergab keine signifikante Unterschiede der C-Wellen-Latenzen innerhalb der Untersuchungszeiträume (vgl. Diag. 8 und Tab. 27a; 27b).

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
CLAT2_14	2,33	Anzahl der Mäuse (N)	3
CLAT2_30	3,00	Chi-Quadrat	7,788
CLAT2_60	2,33	df	5
CLAT2_90	3,00	Asymptotische Signifikanz	,168
CLAT2120	4,83	Exakte Signifikanz	,157
CLAT2150	5,50	Punkt-Wahrscheinlichkeit	,006
		Friedman-Test	

Tab. 27a) Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 164 cds/m²

Ränge		Statistik für Test(a)	
	Mittlerer Rang		
CLAT3_14	3,00	Anzahl der Mäuse (N)	3
CLAT3_30	2,83	Chi-Quadrat	4,519
CLAT3_60	3,00	df	5
CLAT3_90	3,00	Asymptotische Signifikanz	,477
CLAT3120	5,50	Exakte Signifikanz	,533
CLAT3150	3,67	Punkt-Wahrscheinlichkeit	,016
		Friedman-Test	

Tab. 27b) Friedman-Test OLA-Stamm bei Reizintensität 252 cds/m²

3. Ergebnisse

3.1.8 C-Wellen -Latenzen AMOG vs OLA

Der **Mann-Whitney-U-Test** (vgl. Kapitel 2.6.1.) ergab, dass die C-Wellen-Latenzen der **AMOG-Mäuse** sowohl bei der Reizintensität von 164 cds/m², als auch bei der Intensität von 252 cds/m² nur am 90. Lebenstag signifikant kürzer sind als diejenigen der **OLA-Mäuse**(vgl. Tab. 28).

Vergleich der C-Wellen-Latenz: Mann-Whitney-U-Test						
AMOG und OLA						
INTENSITÄT 164 cds/m²	14	30	60	90	120	150
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,314	,136	,131	,003	,127	,069
INTENSITÄT 252 cds/m²	14	30	60	90	120	150
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,663	,259	,095	,012	,167	1,0

Tabelle 28: Mann-Whitney-U-Test der C-Wellen-Latenz
(Signifikanzniveau **P** < 0,05)

3.2. Histologie

Die Netzhaut der Maus weist wie die Netzhaut des Menschen einen charakteristischen Aufbau auf (vgl. Abb 29a). Histopathologien sind oftmals bereits auf der Übersichtsdarstellung zu erkennen, wenn der charakteristische schichtartige Aufbau verändert ist.

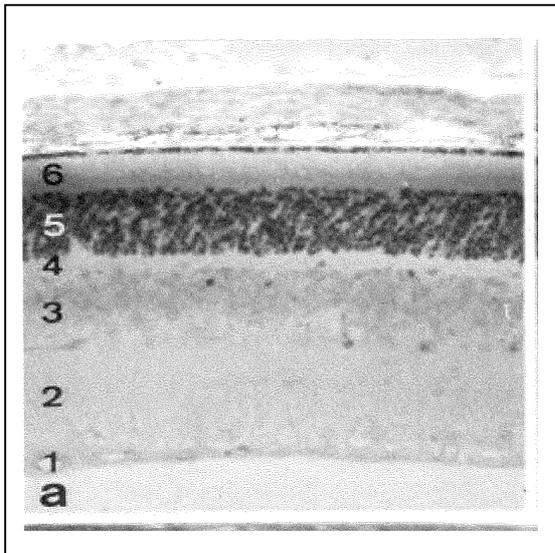


Abb. 29a: Histologische Aufbau der Netzhaut einer gesunden Maus
1: Ganglien- und Nervenfaserschicht
2: Innere plexiforme Schicht
3: Innere Kernschicht
4: Äussere plexiforme Schicht
5: Äussere Kernschicht
6: Innere- und äussere Segmente der Photoempfängerzellen

3. Ergebnisse

Der Vergleich der Netzhautmorphologie von AMOG- und CHL1/OLA- Mäusen zeigt diese schnell erkennbaren Unterschiede. Man kann bei den 4 Monate und 9 Monate alten AMOG-Mäusen eine Reduzierung der Dicke der äußeren Körnschicht und eine Reduzierung der Länge der inneren- und der äußeren Segmente der Photorezeptorzellen beobachten (vgl. Abb. 29b).

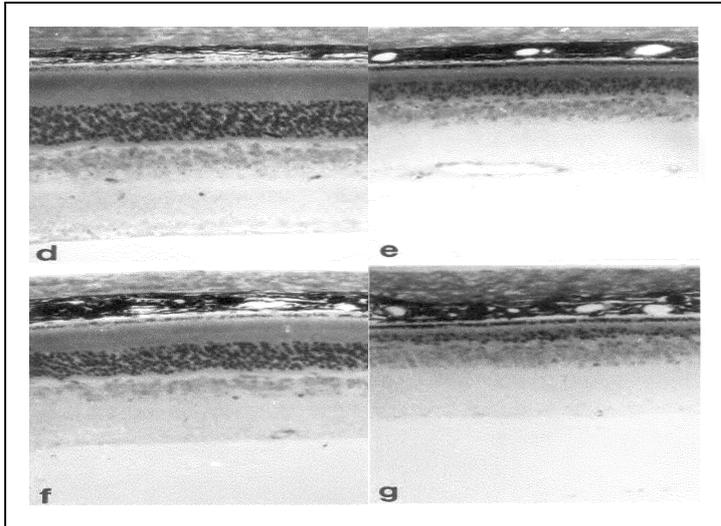


Abb. 29b: Histologische Analyse der Netzhaut von CHL1/OLA-Mäuse im Vergleich zu AMOG-Mäusen
d: 4 Monate Alte OLA-Mäuse e: 4 Monate Alte AMOG-Mäuse
f: 9 Monate Alte OLA-Mäuse g: 9 Monate Alte AMOG-Mäuse

Die elektronenmikroskopische Analyse der Photorezeptoren von 4 Monate alten AMOG- und CHL1/OLA-Mäusen zeigt, dass die Länge der Innen- und Außen-Segmente bei AMOG-Mäusen bedeutend reduziert ist (vgl. Abb 30).

3. Ergebnisse

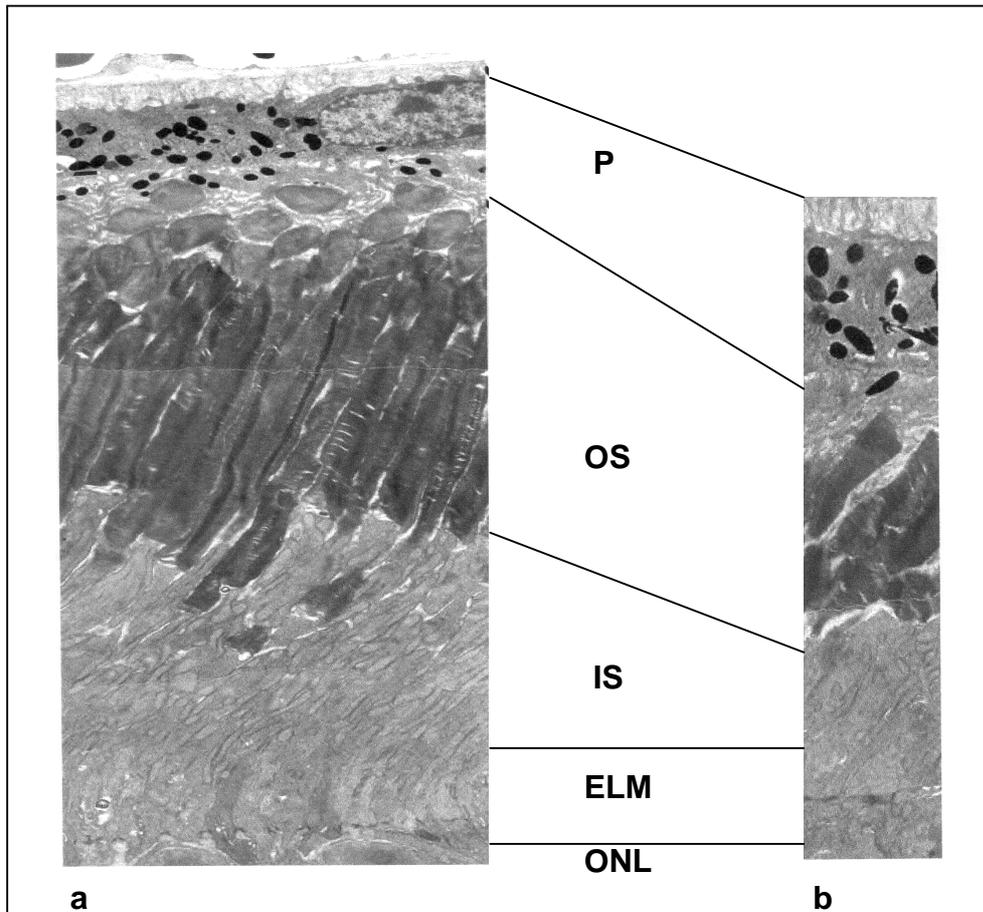


Abb. 30: Elektronenmikroskopische Analyse von Photorezeptorzellen
a: 4 Monate alte CHL1/OLA-Mäuse b: 4 Monate alte AMOG-Mäuse
P= Pigment Epithel;
OS= Außensegmente der Photorezeptorzellen
IS= Innensegmente der Photorezeptorzellen
ELM= Extern Limitierende Membran
ONL= Äußere Körnerschicht

3. Ergebnisse

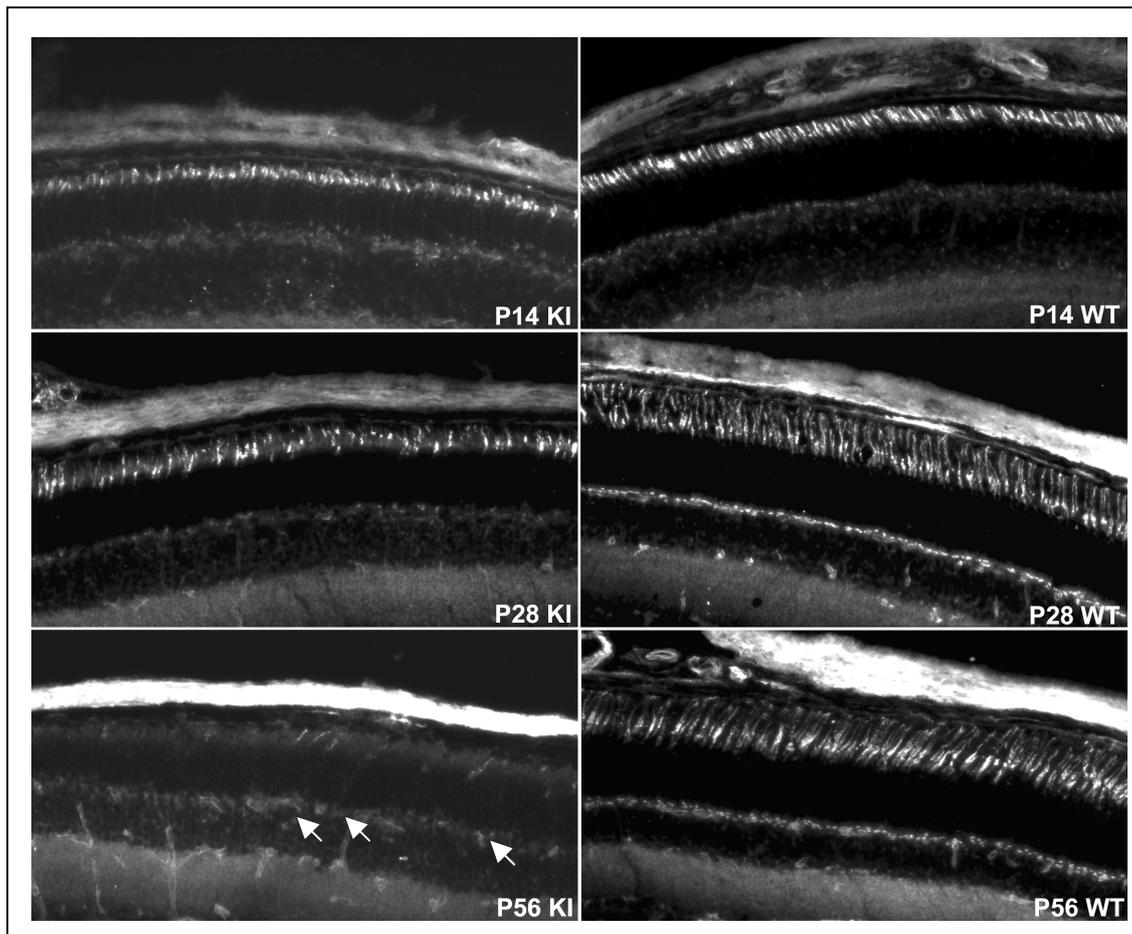


Abb. 31: Visualisierung der Degeneration von Photorezeptoren bei der AMOG-Maus

P14 KI= Photorezeptor 14 Tage Alter AMOG-Maus

P28 KI= Photorezeptor 28 Tage Alter AMOG-Maus

P56 KI= Photorezeptor 56 Tage Alter AMOG-Maus

P14 WT= Photorezeptor 14 Tage Alter CHL1/OLA-Maus

P28 WT= Photorezeptor 28 Tage Alter CHL1/OLA-Maus

P56 WT= Photorezeptor 56 Tage Alter CHL1/OLA-Maus

Die Visualisierung der Photorezeptoren erfolgt mit Hilfe von Lecitin Stain (Agglutinin), wodurch die Interphotoreptomatrix weiß markiert wird. Bezüglich Anzahl und Morphologie der Photorezeptoren gibt es keine Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen im Alter von 14 Tagen. Bei 28 und 56 Tage alten AMOG-Mäusen war im Gegensatz zu den OLA-Mäusen eine zunehmende Degeneration von Photorezeptoren erkennbar. In Abb. 31 sind die äußeren Segmente mit weißen Pfeilen markiert, wobei sich zeigt, wie wenig Photorezeptoren nach 56 Tagen bei AMOG-Mäusen übrig geblieben sind.

4. Diskussion

4.1. Fragestellung

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Netzhautfunktionsstörung eines gentechnisch veränderten Mausstammes, der $\beta 2/\beta 1$ -ki/ki-AMOG-Maus, elektoretinografisch zu charakterisieren. Bei diesem Mausstamm ist über homologe Rekombination die $\beta 2$ -Untereinheit der Na-K-ATPase durch die $\beta 1$ -Untereinheit ersetzt worden. Die betroffenen Mäuse haben eine normale Lebensspanne, und ihre Anomalie scheint sich auf die Netzhaut zu beschränken.

Die retinale Phänotypisierung der AMOG-Mäuse ist im Rahmen der Suche nach einem Modell für menschliche Netzhautdystrophien zu sehen und stellt einen von vielen experimentellen Schritten dar. Darüber hinaus können sich neue Hinweise auf die Rolle der $\beta 2$ -Untereinheit der Na-K-ATPase für die Netzhautfunktion ergeben. Den elektoretinografischen Ergebnissen wurden morphologische gegenüber gestellt. Sowohl diese als auch die Ergebnisse des ERGs wurden mit den entsprechenden Befunden bei einem netzhautgesunden Mausstamm verglichen, den $\beta 2/\beta 1^{+/-}$ -OLA-Mäusen.

4.2. Ergebnisse

Das Hauptmerkmal der Retinopathie der $\beta 2/\beta 1$ -ki/ki-AMOG-Mäuse ist, dass im skotopischen ERG die Photorezeptoren (A-Welle), das Pigmentepithel (C-Welle) und die Bipolarzellen (B-Welle) eine deutliche Veränderung der jeweiligen Potentiale aufwiesen. Die Veränderungen betrafen sowohl die Gipfelzeiten als auch die Amplitudenhöhe. Im photopischen ERG konnten zu keinem Untersuchungszeitpunkt Potentiale abgeleitet werden, was auf eine gravierende Zapfenfunktionsstörung deutet. Betrachtet man die skotopischen ERG-Potentiale über den gesamten Untersuchungszeitraum, so konnte nicht für alle ERG-Komponenten eine signifikante Abnahme der Amplituden mit steigendem Lebensalter beobachtet werden.

Histologisch und elektronenmikroskopisch konnte nachgewiesen werden, dass am 14. Lebenstag die Photorezeptoren bei den $\beta 2/\beta 1$ -ki/ki-AMOG-Mäusen deutlich kürzer waren als bei den OLA-Mäusen, und dass bis zum 56. Tag ihre Anzahl bzw. ihre Markierbarkeit mit Agglutinin (lecitin stain) drastisch abgenommen hatte.

4.3. Diskussion

Betrachtet man nur die Ergebnisse des ERG's, so ist nicht hinreichend zu klären, ob es sich bei den $\beta 2/\beta 1$ -ki/ki-AMOG-Mäusen um eine stationäre Verminderung der Photorezeptorfunktion handelt oder um eine progressive Degeneration.

Die morphologischen Befunde legen eine Degeneration nahe.

Diese Degeneration könnte Folge der Funktionsminderung der $\beta 2$ -Untereinheit der Na-K-ATPase in den Photorezeptoren sein. Nämlich das Fehlen der $\beta 2$ -Untereinheit zugeschriebenen Wachstumsförderung (vgl. Kap. 1), könnte die primäre Dystrophie, der Photorezeptoren bei den AMOG-Mäusen, erklären.

Die Na-K-ATPase reguliert den Fluss von Natrium- und Kaliumionen durch die Plasmamembran und beeinflusst so durch Veränderung von Ionengradienten Zellaktivitäten wie Größe und Volumen (1). Weitere Aufgaben sind sekundär aktivierte Transportsysteme, wodurch die Aufnahme von Nährstoffen ermöglicht wird (1; vgl. Kap. 1.). Gleichzeitig dürfte bei Fehlen der $\beta 2$ -Untereinheit der Na-K-ATPase durch die Störung des Ionentransports (vgl. Kap.1.), die Erregungsüberleitung auf Bipolar-Zellen mindestens beeinträchtigt sein.

Folgende Aspekte sind im Zusammenhang mit dem **Fehlen der Zapfenpotenziale** zu diskutieren:

1. Die schnelle Degeneration der Rezeptoren: Antero- und retrograde Degeneration neuronaler Zellverbände konnten schon in verschiedenen Tiermodellen beobachtet werden (22; 23; 24). Dagegen spricht hier jedoch, dass die Zapfen-Antworten innerhalb des gesamten Untersuchungszeitraums gänzlich fehlen. Die schnelle Degeneration ist unwahrscheinlich, da typische, histologisch-degenerative Merkmale der nachfolgenden Zellen der photopischen Reizverarbeitung (Vakuolen und pyknisch veränderte Zellkerne) fehlen (vgl. 26).

2. Fehlende synaptische Kontakte und das Fehlen eines Strukturproteins, welches sowohl in den Zapfen als auch in der Struktur der Synapsen vorkommt, könnten zu einer Entwicklungshemmung von funktionsfähigen Zapfen führen.

3. Die spezifische Anatomie und Physiologie der Mausnetzhaut : In der Retina von Mäusen sind im Verhältnis zur Anzahl der Stäbchen weniger Zapfen als in der menschlichen Netzhaut(25). Hinzu kommt, dass die photopische Antwort bei der Maus vorwiegend postrezeptoral generiert wird. Beide Faktoren machen das Zapfensystem speziell bei der Maus besonders anfällig für Veränderungen.

Der selektive Verlust von Photorezeptoren bei den $\beta 2/\beta 1$ -ki/ki-AMOG-Mäusen lässt die Frage entstehen, ob es sich um eine Modell für die humane Netzhauterkrankung Retinitis Pigmentosa (RP) handelt. Mutationen in den Genen Rhodopsin, Peripherin und cGMP-Phosphodiesterase, die beim Menschen zur RP führen, sind bereits in verschiedenen Maus Modellen identifiziert worden (37; 38; 39). In diesen drei Mausmodellen wurde ein apoptotischer Zelltod nachgewiesen (40).

Finlay konnte 1992 nachweisen, dass Photorezeptoren nicht nur aufgrund von Veränderungen in der Zelle selbst apoptotisch untergehen können, sondern auch aufgrund abnormer synaptischer Stimuli(41). Die fragliche Progression der Stäbchen-dysfunktion sowie das Fehlen von Zapfenantworten in jedem Lebensalter bei den $\beta 2/\beta 1$ -ki/ki-AMOG-Mäusen unterscheiden sich grundlegend von der RP, so dass es sich nicht um ein Modell für diese Erkrankung handelt.

Zusätzlich kann die intrazelluläre Calcium Konzentration die Apoptose beeinflussen. Insbesondere die Endonuclease, welche DNA Fragmente nach dem Zelltod abbaut, kann durch die Calcium-Ion-Konzentration beeinflusst werden. Dieser Mechanismus wurde bereits für die Netzhautdegeneration eines Mausstammes von Chang diskutiert (40).

Die Na-K-ATPase kann direkt die intrazelluläre Calcium-Ionen Konzentration über die Na-Ca-Austauscher beeinflussen. In den $\beta 2/\beta 1$ -ki/ki-AMOG-Mäusen kann eine Dysfunktion der Na-K-ATPase die intrazelluläre Ionenkonzentration so verändern, dass es ebenfalls zur Induktion der Aktivität der Endonuclease und somit zum Zelltod kommt. Um die Frage zu beantworten, ob bei den betroffenen Mäusen das Pigmentepithel betroffen ist, erfolgte die **Ableitung der C-Welle**. Das Potenzial der C-Welle wird hauptsächlich durch den extrazellulären Kalium-Ionen-Gradienten im Bereich der Photorezeptoren und der Müllerzellen generiert (12; 14; 15; 16; 17). Eine Veränderung der Ionen-Homöostase durch eine der beiden Zellen führt zu einer Modulation der C-Welle. Hierdurch erlaubt die C-Welle nicht nur eine Aussage über die Funktion der Pigmentepithelzellen, sondern auch über die Müller- und Photorezeptorzellen, da sie einen wichtigen Beitrag zur Regulation der extrazellulären Kaliumkonzentration leisten.

Wie bereits erwähnt, ist die C-Welle bei den $\beta 2/\beta 1$ -ki/ki-AMOG-Mäusen reduziert. Diese Erkenntnis bestätigt wiederum die Annahme, dass aus der fehlerhaften Regulation der extrazellulären Kalium-Konzentration die intrazelluläre Calcium Konzentration beeinflusst werden kann, welches wiederum über die Endonuclease zum Zelltod der Müller- und Photorezeptoren führen kann.

4.4. Ausblick

Die vorliegende Arbeit wurde mit der Vorstellung begonnen, ein Tiermodell für humane Netzhautdegenerationen zu identifizieren. Bei dem AMOG-Mausstamm konnte nur zum Teil geklärt werden, welchen Einfluss die Na-K-ATPase auf die Elektrophysiologie und Morphologie der Netzhaut hat.

Der beschriebene Phänotyp des AMOG-Stammes deutet primär auf einen degenerativen Prozess hin, bei dem die Funktion der Netzhaut noch nicht abschließend erforscht ist. Weitergehende elektronenmikroskopische und histochemische Analysen der Veränderungen an den Photorezeptoren und Bipolaren waren im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Sie könnten den Degenerationsprozess näher beschreiben. Weitergehende Untersuchungen könnten den intrazellulären Konzentrationsanstieg der Calcium-Ionen und der Endonuclease belegen. Modifizierte ERG-Protokolle könnten das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein von Zapfenpotenzialen abschließend klären. So könnte dieser Mausstamm die Möglichkeit bieten, einen tieferen Einblick in die Netzhautphysiologie zu gewinnen.

Das **Tiermodell** Maus besitzt eine große Bedeutung bei der Erforschung der Netzhautphysiologie und der pathologischen Grundlagen erblicher Netzhauterkrankungen. Es werden im Wesentlichen zwei verschiedene Arten von Tiermodellen unterschieden. Einerseits lassen es moderne molekulargenetische Techniken zu, genveränderte Tiere herzustellen, andererseits können natürlich vorkommende Mauslinien mit Gendefekt durch Genanalyse mit menschlichen Erkrankungen korreliert werden.

Motivation der vorliegenden Arbeit war es, den **$\beta 2/\beta 1$ -ki/ki-AMOG-Mausstamm** elektrophysiologisch und morphologisch zu charakterisieren.

Bei den elektrophysiologischen Screenings konnte beim AMOG-Stamm eine Reduzierung der B-Welle im Elektretinogramm beobachtet werden.

Durch die Charakterisierung des Mausstammes AMOG soll versucht werden, möglicherweise ein Tiermodell für menschliche Netzhaut-erkrankungen zu entdecken, aber auch Aufschlüsse über dessen Pathophysiologie.

Zu diesem Zweck wurden die elektrophysiologischen und morphologischen Eigenschaften der AMOG-Mäuse mit dem Wildtyp (OLA-Mäuse) verglichen.

Zur Beschreibung der Funktion der einzelnen Zellverbände innerhalb der Netzhaut erfolgte im Untersuchungszeitraum von einem Jahr die Ableitung der A- und B-Welle, sowie der oszillatorischen Potenziale des Elektretinogramms. Daneben erfolgte zusätzlich die Ableitung der C-Welle. Ziel war es, einerseits die Netzhaut-funktionsstörung zu lokalisieren und andererseits im Verlauf der Zeit die Entwicklung des Funktionsdefektes zu beobachten. Die elektrophysiologischen Ergebnisse konnten mit morphologischen Untersuchungen alterskorrelierter Tiere verglichen werden.

Unterstützung fand die Annahme, dass die betroffenen Tiere sowohl eine Veränderung der Funktion der Pigmentepithel-, Müller-, als auch der Photorezeptorzellen hatten. Diese Tatsache führt zu stark erniedrigte A-Wellen-, B-Wellen- und C-Wellen-Amplituden. Die genannten Ergebnisse fanden auch Bestätigung in den morphologischen Untersuchungen. Sie sind im Vergleich zum Wildtyp deutlich verändert.

Das **signifikant veränderte skotopische** ERG, mit den reduzierten A-, B- und C-Wellen-Amplituden, können zu diesem Zeitpunkt nicht abschließend erklärt werden. Man kann vermuten, dass die ERG-Veränderungen einerseits durch die Abwesenheit der Pump-Aktivität der Na-K-ATPase, andererseits durch die fehlende Haftung zwischen den Neuronen und Astrocyten oder durch beides in Summation bedingt sind. Die Funktion der Na-K-ATPase (als Haftungsmolekül und als Pumpe) ist nur in den Zellen suffizient, wo eine Ionen Homeostase gegeben ist.

Der selektive Verlust von Photorezeptoren in den $\beta 2/\beta 1$ -ki/ki-AMOG-Mäusen erfolgt nach Finlay nicht nur durch die Apoptose (programmierter Zelltod), sondern auch aufgrund abnormer synaptischer Stimuli (29). Zusätzlich, kann die intrazelluläre Calcium-Konzentration, die Apoptose indirekt beeinflussen. Die Endonuclease, welche DNA Fragmente nach dem Zelltod abbaut, kann durch die Calcium-Ionen-Konzentration beeinflusst werden. Dieser Mechanismus wurde bereits für die Netzhautdegeneration in einem anderen Mausmodell diskutiert (31).

Die Na-K-ATPase kann direkt die intrazelluläre Calcium-Ionen Konzentration über die Na-Ca-Austauscher beeinflussen.

Bei den $\beta 2/\beta 1$ -ki/ki-AMOG-Mäusen kann eine Dysfunktion der Na-K-ATPase die intrazelluläre Ionen-Konzentration so verändern, dass es ebenfalls zur Induktion der Aktivität der Endonuclease und somit zum Zelltod kommt.

Die C-Welle ist ein Äquivalent für die Funktion des Pigmentepithels, aber auch der Müller- und Photorezeptorzellen. Die C-Welle ist bei den AMOG-Mäusen reduziert. Diese Erkenntnis bestätigt wiederum die Annahme, dass aus der fehlerhaften Regulation der extrazellulären Kalium-Konzentration, die intrazelluläre Calciumkonzentration beeinflusst werden kann, welches wiederum über die Endonuclease zum Zelltod der Müller- und Photorezeptoren führen kann.

Das **Fehlen der Zapfen-Antworten**, muss noch abschließend untersucht und geklärt werden. Zu diesem Zeitpunkt, ist eine Erklärung für das Fehlen der Zapfenantworten bei den AMOG-Mäusen nicht direkt ersichtlich. Um das Fehlen der Zapfenantworten abschließend zu klären, sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Die Hauptfragestellung hierbei sollte klären, ob die Zapfenrezeptorzelle selbst betroffen (Phototransduktionskaskade) oder das Rezeptorpotenzial im Elektroretinogramm nicht ableitbar ist, weil die postrezeptorale Überleitung nicht funktioniert, wo bei der Maus das ERG vorwiegend generiert wird. So kann eine eventuell intakte Rezeptorfunktion durch das ERG nicht erfasst werden. Der in den elektrophysiologischen und morphologischen Untersuchungen beschriebene Phänotyp des AMOG-Stammes, deutet primär auf einen degenerativen Prozess hin.

Möglicherweise ist die Ursache eine Summation aller genannten Möglichkeiten. Wenn die erforderlichen Nachuntersuchungen abgeschlossen sind, wird es möglich sein, den Einfluss der Na-K-ATPase, die Zusammenstellung und Funktion seiner Untereinheiten vollständig zu verstehen. Auch der Einfluss der Pigmentzellen, Müller- und Photorezeptoren auf die Ionenhomeostasis und die Endonuclease, wird besser zu deuten sein.

Durch die in der vorliegenden Arbeit beschriebene systematische Charakterisierung dieser Netzhautfunktionsstörung ist die Voraussetzung für die Klärung ihrer Pathophysiologie geschaffen worden. Nach Abschluss der ggf. weiterführenden Untersuchungen wird es möglich sein, die Rolle der Na-K-ATPase bei erblichen Netzhautdegenerationen des Menschen, sowie seine Rolle für die Netzhautfunktion näher zu klären. Darüber hinaus kann durch die Charakterisierung dieses Mausmodells die Rolle der Na-K-ATPase für Netzhautfunktion beim Menschen und ihre mögliche Relevanz für humane Netzhautdystrophien verifiziert werden.

6. Abkürzungsverzeichnis

ADRP	Autosomal dominante Retinitis Pigmentosa
AMOG	Adhesion Molecule on Glia
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CSNB	“Congenital stationary night blindness” = Angeborene stationäre Nachtblindheit
ERG	Elektroretinogramm
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
ILM	“Inner limiting membran” = membrana limitans interna
INL	“Inner nuclear layer” = innere Körnerschicht
IPL	“Inner plexiforme layer” = innere plexiforme Schicht
IS	Innere Photorezeptorsegmente
ISI	Interstimulus-Intervall
Latenz	Gipfelzeit
Neg	Elektronegatives ERG
OLA	Wildtyp (Gesunde Maus)
OLM	„Outer limiting membran“ = membrana limitans externa
ONL	„Outer nuclear layer“ = äußere Körnerschicht
OPL	„Outer plexiforme layer“ = äußere plexiforme Schicht
OS	Oszillatorische Potenziale
OS	Äußere Photorezeptorsegmente
P	Pigmentepithel
PCR	„Polymerase chain reaction“ = Polymerasekettenreaktion
RD	„Retinal degeneration“ = retinale Degeneration
RDB	„Rod driven bipolar cells“ = Stäbchen depolarisierende Bipolarzellen
RP	Retinitis Pigmentosa
S	Sensitivitätsparameter

7. Literaturverzeichnis

- (1) Weber P, Bartsch U, Schachner M, Montag D, Na, Ka-ATPase Subunit $\beta 1$ knock-in Prevents Lethality of $\beta 2$ Deficiency in Mice, *The Journal of Neuroscience*, 1998, 18(22):9192-9203
- (2) Matthiessen E.T., Bartsch UD, Zolmajd B.R., Linke S., Schachner ME. Retinal function in Na, K-ATPase Subunit $\beta 2/\beta 1$ knock-in mice. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, 5-10 May, 2002, Fort Lauderdale, Florida, USA, 2002, 209:1779-1789.
- (3) Arden GB, Carter RM, Hogg CR et al. A modified ERG technique and the results obtained in X-linked retinitis Pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 1983 July; 67 (7) :419-30.
- (4) Berson EL. Electroretinographic findings in retinitis pigmentosa. *Jpn J Ophthalmol* 1987; 31 (3):327-48.
- (5) Fishman GA. Electrophysiology and inherited retinal disorders. *Doc Ophthalmol* 1985 Aug. ; 60 (2):107-19
- (6) Marmor MF. An international standard for electroretinography. *Doc Ophthalmol* 1989 Dec.; 73 (4): 299-302.
- (7) Weleber RG. The dystrophic retina in multisystem disorders: the electroretinogramm in neural ceroid lipofuscinoses. *Eye* 1998; 12 (Pt 3b): 580-90
- (8) Alexandridis E, Krastel H. Zur Physiologie und Untersuchungsmethodik der visuellen Elektropotentiale. In: Alexandridis E, Krastel H, editors. *Elektrodiagnostik in der Ophthalmologie*. Berlin-Heidelberg: Springer, 1997: 3-49.
- (9) Fishman GA. The Electroretinogram in Retinal Disorders. In: Fishman GA, Sokol S, editors. *Electrophysiologic Testing*. San Francisco: American Academy of Ophthalmology, 1990:1-87.
- (10) Kawasaki K, Yonemura D, Nakazato H et al. , Analysis of Rapid off-Response in electroretinogram major participation of receptor potential *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1980 Oct.; 84(10):1574-80.
- (11) Stockton RA, Slaughter MM. B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *J Gen Physiol* 1989 Jan. ; 93(1):101-22.
- (12) Hanitzsch R. Comparison between the slow cornea.negative PIII Component of the ERG and potassium changes in the isolated rabbit Retina. *Doc Ophthalmol* 1993; 84(3):267-78.

7. Literaturverzeichnis

- (13) Nilsson SE. Electrophysiology in pigment epithelial changes. *Acta Ophthalmol Suppl* 1985; 173:22-7
- (14) Nilsson SE, Andersson BE. Corneal D.C. recordings of slow ocular Potential changes such as the ERG c-wave and the light peak in Clinical work. Equipment and examples of results[(published erratum appears in *Doc Ophthalmol* 1988 Dec; 70(4):following 401)]. *Doc Ophthalmol* 1988 Mar.; 68(3-4):313-25.
- (15) Lurie M, Marmor MF. Similarities between the c-wave and slow PIII in The rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980 Sept. ; 19(9) :1113-7.
- (16) Oakley B, Green DG. Correlation of light-induced changes in retinal Extracellular potassium concentration with c-wave of the electroretinogram. *J Neurophysiol* 1976 Sept. ; 39(5) :1117-33.
- (17) Tomita T. Electrophysiological studies of retinal cell function. *Invest Ophthalmol* 1976 Mar.; 15(3):171-87.
- (18) Steinberg RH, Miller S. Transport and membrane properties of the retinal Pigment epithelium. In: Zinn K, Marmor MF, editors. *The retinal pigment Epithelium*. Cambridge: Harvard University Press, 1979:205-25.
- (19) Lozà JL, Kausch H, *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler.2., überarbeitete und erg. Aufl., Berlin, Parey,1998.*
- (20) Sachs L. *Angewandte Statistik .7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 1992.*
- (21) Krause B, Metzler, P. *Angewandte Statistik. 1. Aufl. Berlin; Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1983.*
- (22) Ghetti B, Horoupian DS, Wisiniewski HM. Transsynaptic response of the lateral geniculate nucleus and the pattern of degeneration of the nerve terminals in the rhesus monkey after eye enucleation. *Brain Res* 1972; 45:31-48.
- (23) Pinching AJ, Powell TPS. Ultrastructural features of transneuronal cell degeneration in the olfactory system. *J Cell Sci* 1971; 8:253-287.
- (24) Triarhou LC, Norton J, Ghetti B. Anterograde transsynaptic degeneration in the deep cerebellar nuclei of Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. *Exp Brain Res* 1987; 66:577-588.
- (25) Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH. The Major Cell Populations of the Mouse Retina. *J Neurosci* 1998; (21):8936-8946.
- (26) Newman NM; Stevens RA, Heckenlively JR. Nerve fibre layer loss in diseases of the outer retinal layer. *Br J Ophthalmol* 1987; 71.21-26.

7. Literaturverzeichnis

- (27) Farrar et al., Mclaughlin et al., Dryja et al., Degeneration der Stäbchen. Mutationen in den Genen Rhodopsin, Peripherin und cGMP-Phosphodiesterase.
- (28) Chang et al. und Portera-Cailliau et al. Apoptotische Zelltod.
- (29) Finlay et al. Apoptotische Zelltod aufgrund abnormer Stimuli
- (30) John W. Tukey : Exploratory data analysis. Addison-Wesley 1977 ISBN 0-201-07616-0 ([http:// de. Wikipedia.org/wiki/Boxplot](http://de.wikipedia.org/wiki/Boxplot)); Aktualisiert 21.02.2009.
- (31) Chang et al : Netzhaut Degenerations Maus Invest Ophthalmol Vis Sci 2000 Oct ; 41 (11) :3268-3277
- (32) Herkunft der B-Welle:
(Accessed March 4, 2005, at <http://webvision.med.utah.edu>).
- (33) Neuhauss, ST
Biochemie der Zapfen Bioforum 02/2008, S. 38–40, GIT VERLAG GmbH & Co. KG, Darmstadt (Accessed February, 2008, at <http://gitverlag.com>; www.pRO-4-pRO.com).
- (34) Matthiessen, ET
Elektrophysiologische Charakterisierung einer neu entdeckten Netzhautfunktionsstörung im Mausstamm C57BL/10, 12.2002
- (35) Müller-Husmann, G., Gloor S. and Schachner M. J. Biol. Chem. 268 Functional characterization of beta isoforms of murine Na,K-ATPase. The adhesion molecule on glia (AMOG) 1993, pp. 26260–26267. View Record in Scopus | Cited By in Scopus (43)
- (36) Antonicek, H, Schachner, M. The Journal of Neuro. Sci. 8(8) The Adhesion Molecule on Glia (AMOG) Department of Neurobiology, University of Heidelberg, August 1988; 2961-2966
- (37) Berson, EL, Sandberg, MA and Dryja, TP
Autosomal dominant retinitis pigmentosa with rhodopsin, valine-345-methionine. Berman-Gund Laboratory for the Study of Retinal Degenerations, Harvard Medical School, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston. Trans Am Ophthalmol Soc. 1991; 89: 117–130. PMID: PMC1298619
- (38) Farrar G J; Kenna P; Jordan S A; Kumar-Singh R; Humphries P
Experimental eye research 2008;87(6):529-34. 2008.

7. Literaturverzeichnis

(39) Al-Magthteh, M, Gregory, C. Inglehearn, C.,McLaughlin, ME,
Experimental Eye Research, Cone function, 13: 241-246

(40) Quaggin, M Alozenge,LA Runt, G Chang, X
Transcription factors in eye development : a gorgeous mosaic, Genes & Dev
1997, 11: 2023-2028.

(41) Finlay BL, Wikler KC, Sengelaub DR:
Apoptosis: a different type of cell death. FASEB J. 1992 Apr;6(7):2450–2455
(PubMed).

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit geholfen haben.

Mein besonderer Dank für die sehr gute Betreuung und Überlassung des Themas gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Rüther.

Herrn Dr. Eike Tobias Matthiessen möchte ich danken für die gute Zusammenarbeit in dem elektrophysiologischen Labor der Universität-Hamburg.

Weiterhin, möchte Ich mich bei PD Dr. Wolfgang Schröder bedanken, der mir als Lektorat sehr geholfen hat, weil Deutsch nicht meine Muttersprache ist.

Als letztes, möchte Ich mich bei Fr. Sigrid Boczor bedanken, die mich bzgl. der Statistik beraten hat.

Herzlich bedanken möchte ich mich hier auch bei meinen Eltern. Sie haben mir das Studium der Zahnmedizin ermöglicht und mich während der gesamten medizinischen Weiterbildung tatkräftig unterstützt.

„ Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

Publikationsliste:

Matthiessen E.T., Bartsch UD, Zolmajd B.R., Linke S., Schachner ME, Richard, G., Ruether, K. :

Retinal function in Na, K-ATPase Subunit $\beta 2/\beta 1$ knock-in mice. Annual Meeting of the Association for Research in Vision und Ophthalmology, 5-10 May, 2002, Fort Lauderdale, Florida, USA.

10. Erklärung an Eides statt

„Ich, Reza Zolmajd, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Elektroretinografische Charakterisierung der AMOG-Mäuse, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“Für die Statistik, habe Ich mich von Fr. Sigrid Boczor beraten lassen.

Als Lektorat fungierte PD Dr. Wolfgang Schröder.

Hamburg, den 28.11.2009