

Aus dem Veterinär-Anatomischen Institut  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und

aus dem Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

# Wirkung von Neuropeptid Y auf die Schwellung von Müllerzellen in hypoosmolarem Medium

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Antje Wolf  
aus Freiburg im Breisgau

Leipzig, 2009

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Arwid Dauschies

Betreuer: Prof. Dr. Johannes Seeger  
Prof. Dr. Andreas Reichenbach

Gutachter: Prof. Dr. Johannes Seeger, Veterinär-Anatomisches  
Institut, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig,  
Leipzig  
Prof. Dr. Andreas Reichenbach, Paul-Flechsig-Institut für  
Hirnforschung, Medizinische Fakultät, Universität Leipzig,  
Leipzig  
Prof. Dr. Wolfgang Nörenberg, Rudolf-Boehm-Institut für  
Pharmakologie und Toxikologie, Medizinische Fakultät,  
Universität Leipzig, Leipzig  
Prof. Dr. Dr. Sebastian Wolf, Universitätsklinik für  
Augenheilkunde, Inselspital, Universitätsspital Bern, Bern,  
Schweiz

Tag der Verteidigung: 20. Januar 2009

---

<b><u>1</u></b>	<b><u>Einleitung</u></b>	1
<b><u>2</u></b>	<b><u>Literaturübersicht</u></b>	3
2.1.	Die Retina	3
2.2	Die Müllerzelle	4
2.3	Das Hirn- bzw. Netzhautödem	5
2.4	Retinale Homöostase	6
2.5	Hypotone Schwellung von Müllerzellen	7
2.6	Neurotransmitter der Retina	8
2.7	Neuropeptid Y	9
2.8	Neuropeptid Y-Rezeptorsubtypen	10
2.9	Intrazelluläre Signaltransduktion der NPY-Rezeptorsubtypen	12
2.10	Vorkommen von NPY-Rezeptoren in der Retina	13
2.11	Zielstellung der Arbeit	14
<b><u>3</u></b>	<b><u>Tiere, Material und Methoden</u></b>	15
3.1	Versuchstiere	15
3.2	Verwendete Lösungen und Substanzen	15
3.2.1	Extrazelluläre Lösung	15
3.2.2	Hypotone Testlösung	15
3.2.3	Calciumfreie Testlösung	16
3.2.4	Vitalfarbstoff	16
3.2.5	Lösungen mit Ba <sup>2+</sup>	16
3.2.6	Neuropeptid Y	16
3.2.7	NPY-Rezeptoragonisten	17
3.2.8	Verwendete Testsubstanzen	17
3.3	Ischämiemodell	19
3.4	Versuchsschema	19
3.5	Präparation der Netzhaut	19
3.6	Anfertigen von retinalen Schnittpräparaten	21
3.7	Aufnahme der Müllerzellsomata	23
3.8	Statistische Analyse	23
<b><u>4</u></b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	24
4.1	Schwellungsverhalten von Müllerzellen der postischämischen Netzhaut	24

---

4.2	Wirkung von NPY auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen der postischämischen Netzhaut	24
4.3	Wirkung von NPY auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen der gesunden Netzhaut	26
4.4	An der Wirkung von NPY beteiligte NPY-Rezeptorsubtypen	30
4.5	Untersuchung der Signaltransduktion der Wirkung von NPY	35
<b><u>5</u></b>	<b><u>Diskussion</u></b>	50
5.1	Vitale Anfärbung der Müllerzellen	50
5.2	Y <sub>1</sub> -Rezeptorabhängigkeit der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellen	51
5.3	Zelluläre Signale, die an der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium beteiligt sind	52
5.4	Aktivierung von Adenosin A <sub>1</sub> -Rezeptoren	54
5.5	Mögliche Wirkungen von Adenosin auf Zellebene	55
5.6	Mögliche Ursachen für das Schwellen der Müllerzellen im Rahmen einer Ischämie	58
5.7	Klinische Bedeutung des hier untersuchten Signalweges in der Therapie des Makulaödems	59
<b><u>6</u></b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	62
<b><u>7</u></b>	<b><u>Summary</u></b>	64
<b><u>8</u></b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	66
<b><u>9</u></b>	<b><u>Danksagung</u></b>	87

---

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
ACh	Acetylcholin
Ahx	Aminohexanonsäure
Aib	Aminoisobutyrsäure
Aq. bidest	Aqua bidestillata
AQP	Aquaporin
AQP4	Aquaporin-4
A <sub>1</sub> R	Adenosin A <sub>1</sub> -Rezeptor
AS-Sequenz	Aminosäuresequenz
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA-AM	1,2-Bis(O-aminophenoxy)ethan- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure-acetoxymethylester
BIBP3226	(R)- <i>N</i> <sup>2</sup> -(Diphenylacetyl)- <i>N</i> -[(4-hydroxyphenyl)methyl]-argininamid
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Konzentration
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CPA	<i>N</i> <sup>6</sup> -Cyclopentyladenosin
DAG	Diacylglycerin
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin
EGTA	Ethylenglykolbis(β-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
GABA	γ-Aminobutyrat
GCL	Ganglienzellschicht
GDP	Guanosindiphosphat
Gö6976	3-[1-(3-Dimethylaminopropyl)-5-methoxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl]-4-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-1 <i>H</i> -pyrrol-2,5-dion
G-Protein	guaninnucleotidbindende Proteine
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
ILM	innere limitierende Membran
INL	innere Körnerschicht
InSP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPL	innere plexiforme Schicht
[K <sup>+</sup> ] <sub>e</sub>	extrazelluläre Kaliumionenkonzentration
KGW	Körpergewicht
LY341495	2-Amino-2-(2-carboxycycloprop-1-yl)-3-(xanth-9-yl)propansäure

mGluR	metabotrope Glutamatrezeptoren
MPEP	6-Methyl-2-(phenylethynyl)pyridin
MW	Molekulargewicht
NF	Nervenfaserschicht
NPY	Neuropeptid Y
ONL	äußere Körnerschicht
OPL	äußere plexiforme Schicht
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PP	Pankreatisches Polypeptid
PYY	Peptid YY
RPE	retinales Pigmentepithel
SP	Substanz P
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
ZNS	zentrales Nervensystem

## **1 Einleitung**

Zur Entwicklung eines Hirnödems kann es bei vielen neurologischen Erkrankungen, wie z. B. Schädel-Hirn-Traumata, Hirntumoren oder Hirninfarkten kommen. Das retinale Äquivalent des Hirnödems ist das Makulaödem, das in Folge verschiedener retinaler Erkrankungen wie z. B. im Rahmen eines Diabetes mellitus auftreten kann. Sowohl eine extrazelluläre Flüssigkeitsansammlung (GASS et al. 1985) als auch ein Schwellen der retinalen Gliazellen (YANOFF et al. 1984) tragen zur Entstehung eines Makulaödems bei. Das Schwellen von Gliazellen ist somit eine Ursache der Ödembildung im zentralen Nervensystem. Jedoch ist der zelluläre Mechanismus der Gliazellschwellung bis heute nicht aufgeklärt.

Wie gezeigt wurde (PANNICKE et al. 2004), schwellen die Zellkörper der Müllerzellen in der postischämischen Retina, wenn sie einem hypoosmolaren Medium ausgesetzt werden. Nach einer temporären Ischämie besitzen die Gliazellen eine verminderte  $K^+$ -Leitfähigkeit, die durch eine schwächere Expression ihres Kir4.1-Proteins im Bereich der Blutgefäße und des Glaskörpers erklärt wird. Im Unterschied dazu bleibt die Expression der Aquaporin-4-Wasserkanäle (AQP4) nach einer temporären Ischämie weitestgehend unverändert. Die verminderte  $K^+$ -Leitfähigkeit verhindert die Abgabe von intrazellulär akkumulierten  $K^+$ -Ionen ins Blut oder den Glaskörper. Durch die erhöhte intrazelluläre  $K^+$ -Konzentration kommt es zu einem osmotisch getriebenen Wasserstrom in die Zellen

Die Hypothese, dass eine verminderte  $K^+$ -Leitfähigkeit zu einem veränderten Schwellungsverhalten der Gliazellen führt, konnte durch die Blockierung von  $K^+$ -Kanälen in der gesunden Retina bestätigt werden. Die Müllerzellen der Kontrollnetzhäute schollen in der Anwesenheit von  $Ba^{2+}$ , sobald sie einer hypotonen Lösung ausgesetzt wurden (PANNICKE et al. 2004).

Auch neuroaktive Substanzen besitzen das Potenzial, das Schwellungsverhalten retinaler Gliazellen zu regulieren. So ist bekannt, dass der Neurotransmitter Dopamin das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium verhindern kann (PANNICKE et al. 2004). Eine weitere neuroaktive Substanz ist Neuropeptid Y (NPY), welches im ZNS der Säugetiere weit verbreitet und das am häufigsten vorkommende Neuropeptid im Gehirn ist (DUMONT et al. 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluß von NPY auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellen der Ratte in hypoosmolarem Medium untersucht. Dazu waren die folgenden Arbeitsschritte notwendig: In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob

NPY überhaupt einen Einfluß auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellen hat. Falls eine solche Wechselwirkung zu beobachten wäre, sollten in einem zweiten Schritt der involvierte Rezeptortyp und die durch NPY aktivierten Signalwege charakterisiert werden.



## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Die Retina**

Die Retina ist als Teil des Gehirns zu bezeichnen, da sie während der Embryonalentwicklung aus einer Ausstülpung des Zwischenhirnbodens entsteht. Die Retina bietet gegenüber anderen Teilen des Zentralen Nervensystems (ZNS) den Vorteil, dass sie einfach zugänglich und ihre Organisation weitgehend bekannt ist. Außerdem werden die glialen Aufgaben neben den Astrozyten fast ausschließlich von einem Zelltyp, den Müllerzellen, wahrgenommen. Zur Untersuchung glialer Aufgaben kann die Retina daher als Modellsystem für das Gehirn genutzt werden (REICHENBACH 1999, VON ENGELHARDT u. BREVES 2005, SCHNORR u. KRESSIN 2006). Das Nervengewebe ist aus Neuronen und Gliazellen aufgebaut. Gliazellen sind bedeutsame Partnerzellen der Nervenzellen, die als hochspezialisierte Zellformen so weit differenziert sind, dass sie nicht mehr in der Lage sind, sich eigenständig stoffwechselaktiv zu versorgen. Im ZNS findet man unterschiedliche Gliazellformen. Die Astrozyten sind große, zur Phagocytose befähigte Zellen, die mit ihren zahlreichen Fortsätzen mit Nervenzellen und Blutgefäßen in Verbindung stehen und damit den Stoffaustausch zwischen den Nervenzellen und dem umliegenden Gewebe bzw. den Blutgefäßen regulieren. Desweiteren bilden die Astrozyten die Gliagrenzmembran, die das Hirngewebe an der Oberfläche gegen die Hirnhäute und um die Blutgefäße abgrenzt. Oligodendrozyten sind kleine, gering verzweigte Zellen, die in der grauen Substanz den Nervenzellen direkt anliegen und in der weißen Substanz Myelin bilden. Hortega-Zellen (Mikroglia) sind zur Phagocytose befähigte, mobile und kleine Zellen, die büschelartige, kleine Fortsätze besitzen und im Gegensatz zu den anderen Gliaformen nicht vom Ektoderm, sondern vom Mesoderm abstammen (LIEBICH et al. 2003). Zu den wichtigsten Aufgaben der Gliazellen gehören folgende:

- Übernahme metabolischer Aufgaben für die Nervenzellen,
- Regulation des Stoffaustausches zwischen Nervenzellen und Kapillaren,
- Stützfunktionen und damit Organisation und räumliche Trennung der Neurone,
- Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke,
- Modulation der neuronalen Aktivität,

- extrazelluläre Homöostase (REICHENBACH 1999, LIEBICH et al. 2003, VON ENGELHARDT u. BREVES 2005).

## **2.2 Die Müllerzelle**

Die Müllerzelle durchspannt die gesamte Retina von der inneren zur äußeren limitierenden Membran (MÜLLER 1851). Die Zellkörper der Müllerzellen liegen in der inneren Körnerschicht (INL; Abb. 3B, Seite 22). Damit bilden sie die Grundlage für die strukturelle Organisation der Retina. Neben diesen passiven Eigenschaften sind Müllerzellen auch aktiv an der visuellen Informationsverarbeitung beteiligt. So können die Gliazellen der Retina die neuronale Aktivität modulieren (NEWMAN u. REICHENBACH 1996). Dies geschieht beispielsweise durch das Recycling von Neurotransmittern (LINSER et al. 1984, NEWMAN u. REICHENBACH 1996) und die Aufrechterhaltung der extrazellulären Kaliumhomöostase (NEWMAN u. REICHENBACH 1996, REICHENBACH 1999). Müllerzellen nehmen z. B. Glutamat (EHINGER 1977, BREW u. ATTWELL 1987) oder  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA; EHINGER 1977) auf, und setzen – nach Umwandlung mittels ihrer Glutaminsynthetase – Glutamin frei. Diese Leistungen der Müllerzellen schaffen damit die besten Bedingungen für die visuelle Informationsverarbeitung. Allerdings führen auch gliale Calciumwellen zu einer Modulation der elektrischen Aktivität von Neuronen (NEWMAN u. ZAHS 1997, NEWMAN 2001). Neben diesen Funktionen sind Müllerzellen auch zur Aufrechterhaltung des neuronalen Metabolismus notwendig. Sie versorgen die Nervenzellen mit trophischen Substanzen, z. B. mit Laktat für den neuronalen Citratzyklus (REICHENBACH 1999). Außerdem schützen sie das neuroretinale Gewebe vor oxidativem Stress durch einen hohen Anteil an Glutathion (REICHENBACH 1999).

Um diese vielfältigen Funktionen zeitlich und räumlich koordiniert erfüllen zu können, müssen Müllerzellen sowohl Signale aufnehmen als auch Signale abgeben bzw. weiterleiten können. Dazu exprimieren Müllerzellen Rezeptoren für unterschiedliche Transmitter, z. B. verschiedene Glutamatrezeptorsubtypen (SCHWARTZ 1993; WAKAKURA u. YAMAMOTO 1994, VANDENBRANDEN et al. 2000), purinerge Rezeptoren (LIU u. WAKAKURA 1998, PANNICKE et al. 2000) oder auch GABA-Rezeptoren (MALCHOW et al. 1989, REICHELDT et al. 1996). Außerdem werden intrazelluläre Calciumwellen, die sich innerhalb einzelner Gliazellen sowie im glialen Netzwerk ausbreiten können, als extraneuronaler Signalweg diskutiert.

### **2.3 Das Hirn- bzw. Netzhautödem**

Bei primären Erkrankungen des Gehirns, wie z. B. einem Schlaganfall, Schädel-Hirn-Verletzungen (KIMELBERG 1995) oder Hirntumoren (PAPADOPOULOS et al. 2001) kann ein Hirnödem auftreten. Auch bei Erkrankungen, die sekundär das Gehirn betreffen, wie z. B. einer Sepsis (PAPADOPOULOS et al. 2000) oder einem portosystemischen Shunt (BLEI u. LARSEN 1999, KRAFT u. HIRSCHBERGER 2000) kann es zur Ausbildung eines Gehirnödem kommen. Das Schwellen des Gehirns erhöht den intracranialen Druck, was die Gefäßperfusion beeinträchtigt und zur Ischämie des Gehirns, Herniation und Tod führen kann (PAPADOPOULOS et al. 2002).

Nach KLATZO (1967) unterscheidet man zwei Typen von Ödemen: die vasogenen (extrazellulären) Ödeme und die cytotoxischen (intrazellulären) Ödeme. Ein vasogenes Ödem entsteht, wenn die Blut-Hirn-Schranke durchlässig wird und damit der Einstrom von Plasmaflüssigkeit in das Hirngewebe ermöglicht wird (KIMELBERG 1995, PAPADOPOULOS et al. 2001). Dadurch kommt es zu extrazellulären Flüssigkeitsansammlungen. Auch Hirnödeme, die sich im Rahmen eines Hirntumors bilden, zählen zu den vasogenen Ödemen (PAPADOPOULOS et al. 2001). Cytotoxische (intrazelluläre) Ödeme bilden sich aus einer intrazellulären Wasserakkumulation, die z. B. im Rahmen einer Wasserintoxikation oder nach einem Schlaganfall auftreten kann. Die Astrozyten sind die Zellen im ZNS, die nach einem Trauma oder einer Ischämie am ehesten schwellen (KIMELBERG 1992), wobei vor allem ihre Endfüße an Größe zunehmen (FINE u. BRUCKER 1981, YANOFF et al. 1984).

Vergleichbar mit dem Hirnödem tritt im Auge das Makulaödem auf. An der Pathogenese des Makulaödems sind ischämisch-hypoxische (TSO 1982, YANOFF et al. 1984), vasogene (GASS et al. 1985) wie auch cytotoxische Mechanismen (YANOFF et al. 1984) beteiligt. Eine Form des Makulaödems ist das zystoide Makulaödem. Die dabei entstehenden großen Zysten in den inneren nukleären und äusseren plexiformen Schichten der Makula repräsentieren vermutlich stark geschwollene, absterbende Müllerzellen (FINE u. BRUCKER 1981, YANOFF et al. 1984). In Folge eines Makulaödems kommt es zur Degeneration der Photorezeptorzellen und anderer Neurone der Netzhaut (TSO 1982). Dies wiederum führt zu Heilungskomplikationen bei verschiedenen Erkrankungen der Netzhaut, wie z. B. der diabetischen Retinopathie.

## **2.4 Retinale Homöostase**

Neuronale Aktivität ist stets von einem Anstieg der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration ( $[K^+]_e$ ) begleitet. Für eine reibungslose neuronale Informationsverarbeitung sind jedoch konstante Ionenkonzentrationsgradienten unbedingt notwendig. Die Müllerzellen tragen zur Homöostase der  $[K^+]_e$  bei, indem sie über sogenannte einwärts gleichrichtende („inwardly rectifying“,  $K_{ir}$ )  $K^+$ -Kanäle  $K^+$  aufnehmen, und die überschüssigen  $K^+$ -Ionen ins Blut und den Glaskörper abgeben (NEWMAN u. REICHENBACH 1996, REICHENBACH 1999). Die Müllerzellen exprimieren verschiedene Typen von  $K_{ir}$ -Kanälen (RAAP et al. 2002), wobei das  $K_{ir}4.1$ -Protein vorwiegend an den Membranen exprimiert wird, die in Nachbarschaft zu Blutgefäßen bzw. zum Glaskörper liegen (NAGELHUS et al. 1999, KOFUJI et al. 2000). Neben  $K^+$  wird auch die Konzentrationen anderer Ionen und Moleküle im Extrazellulärraum durch müllerzellabhängige Mechanismen kontrolliert, wie z. B. die Regulation des pH-Wertes oder die extrazelluläre  $Cl^-$ -Konzentration (LINSER et al. 1984, NEWMAN 1994).

Als Folge des hohen Energiebedarfs der Nervenzellen fällt in der Retina sehr viel Wasser an. Zum Einen wird es im Zuge der Aufnahme von Glukose aus dem Blut osmotisch mit in das Gewebe gezogen. Zum Anderen erfordert die neuronale Aktivität einen hohen Energieaufwand, der infolge der oxidativen ATP-Synthese eine hohe intrazelluläre Wasserakkumulation verursacht (KANDEL et al. 1996). Jedoch muss aufgrund der Blut-Retina-Schranke, die eine Barriere für große Moleküle darstellt, der größte Teil des Wassers durch transzellulären Transport ins Blut bzw. den Glaskörper abgegeben werden. In der gesunden Retina werden die inneren Schichten [innere limitierende Membran (ILM) bis äußere plexiforme Schicht (OPL)] der Retina von den Müllerzellen dehydriert (BRINGMANN et al. 2004).

Wasserkanäle, sogenannte Aquaporine (AQP), sind entscheidend an der Regulation des Wasser- und Ionenhaushaltes beteiligt (VERKMAN 2003), wobei die Müllerzellen besonders Aquaporin-4-Moleküle (AQP4) in ihrer Membran exprimieren (VENERO et al. 2001, BADAUT et al. 2002, NICO et al. 2002). Das gleichzeitige Auftreten von  $K_{ir}1.4$  und AQP an Membranen der Müllerzellen, die den Blutgefäßen und dem Glaskörper zugewandt sind, lassen vermuten, dass die Regulation des Wasserhaushaltes in der Retina durch die Müllerzellen mit der des  $K^+$ -Haushaltes verbunden ist (NAGELHUS et al. 1999).

AQP sind aus Proteinen gebildete Poren in Membranen, die für Wasser durchlässig sind. Sie bilden eine Familie von verwandten wassertransportierenden Proteinen, die erst in den letzten Jahren entdeckt wurde (KING u. AGRE 1996, ECHEVARRÍA u. ILUNDÁIN 1998, VERKMAN u. MITRA 2000). Bis heute konnten 13 verschiedene AQPs nachgewiesen werden (VERKMAN u. MITRA 2000), die funktionell in zwei Gruppen eingeteilt werden können (PAPADOPOULOS et al. 2002). AQP1, AQP2, AQP4, AQP5 und AQP8 sind hauptsächlich für Wasser permeabel, während AQP3, AQP6, AQP7 und AQP9 auch für größere Moleküle durchlässig sind (PAPADOPOULOS et al. 2002). Phänotyp-Studien an transgenen Mäusen zeigen, dass die AQPs eine wichtige Rolle im Flüssigkeitshaushalt der unterschiedlichsten Geweben spielen (VERKMAN et al. 2000, VERKMAN u. MITRA 2000), indem sie abhängig vom osmotischen Gradienten und vom hydrostatischen Druck Wasserströme sowohl von extra- nach intrazellulär als auch in umgekehrter Richtung vermitteln können.

AQP1 und AQP4 sind die vorherrschenden AQPs im Gehirn. Im Gehirn der Ratte ist AQP1 an den Zellen des Plexus choroideus lokalisiert (HASEGAWA et al. 1993, MASSEGUIN et al. 2000), während die AQP4 an den Endfüßen der Astrozyten zu finden sind, die benachbart zu Blutgefäßen liegen (NIELSEN et al. 1997, RASH et al. 1998). Bis heute konnten in der Retina AQP1 und AQP4 nachgewiesen werden (PATIL et al. 1997). AQP1 wird vorherrschend von den Zellen in der äußeren Retina, den Photorezeptoren, aber auch von Müllerzellen exprimiert (NAGELHUS et al. 1998, KIM et al. 2002). Vergleichbar mit der Expression im ZNS wird AQP4 von den Müllerzellen an den Membrandomänen, die benachbart zu Blutgefäßen liegen, an Membranen, die dem Glaskörper zugewandt sind und im perisynaptischen Gewebe exprimiert (FRIGERI et al. 1995, PATIL et al. 1997, NAGELHUS et al. 1998).

### **2.5 Hypotone Schwellung von Müllerzellen**

Das Schwellen von Gliazellen ist ein wesentlicher Grund für die Ausbildung eines Ödems in Gehirn und Retina. Der zugrundeliegende zelluläre Mechanismus ist jedoch bis heute nicht bekannt. PANNICKE et al. (2004) zeigten, dass Gliazellen der postischämischen Retina der Ratte, nicht aber jene der gesunden Retina, in hypoosmolarem Medium schwellen. Außerdem wurde gezeigt, dass die Gliazellen der gesunden Retina schwellen, wenn ihre  $K^+$ -Kanäle blockiert werden. Nach einer temporären Ischämie regulieren die Gliazellen ihre  $K^+$ -Leitfähigkeit und die

Expression des  $K_{ir}4.1$ -Proteins an den Grenzflächen zu den Blutgefäßen und dem Glaskörper stark herab. Im Gegensatz dazu bleibt die Expression der glialen AQP4-Wasserkanäle nach einer Ischämie weitestgehend unverändert. Zum Schwellen von Gliazellen in der postischämischen Retina wurde folgender Mechanismus vorgeschlagen: eine Herunterregulation der  $K^+$ -Leitfähigkeit der Müllerzellen verhindert die Abgabe von  $K^+$ -Ionen in den Glaskörper oder das Blut. Da die Kaliumaufnahme durch  $K_{ir}2.1$  Kanäle unverändert bzw. nur schwach reduziert ist, kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation von  $K^+$  und damit zu einer erhöhten intrazellulären  $K^+$ -Konzentration. Dies verursacht einen osmotisch getriebenen Wasserstrom in die Zellen, der durch AQP4 vermittelt wird.

Es wurde beobachtet, dass Dopamin das Schwellen der Müllerzellen der postischämischen Netzhaut in hypoosmolarem Medium hemmen kann (PANNICKE et al. 2004). Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Regulation des Schwellungsverhaltens durch Neurotransmitter.

## **2.6 Neurotransmitter der Retina**

Da im Rahmen dieser Arbeit die mögliche Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium untersucht wurde, soll an dieser Stelle eine Auswahl an Neurotransmittern und deren Rezeptoren der Retina vorgestellt werden.

In der Retina konnte bis heute eine Vielzahl von Rezeptoren für Neurotransmitter nachgewiesen werden, an den Müllerzellen die Expression verschiedenster Rezeptoren für Neurotransmitter, wie z. B. Rezeptoren für Glutamat (SCHWARTZ 1993, WAKAKURA u. YAMAMOTO 1994, PURO u. STUENKEL 1995),  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA; MALCHOW et al. 1989, REICHEL 1996) oder auch Dopamin (REICHENBACH 1999).

Glutamat ist der am häufigsten vorkommende exzitatorische Neurotransmitter im ZNS. In der Retina ist Glutamat der erregende Transmitter für die „Vorwärtsschaltung“ der Signale von den Photorezeptoren an die Neurone höherer Ordnung (MASSEY u. MILLER 1988, MASSEY 1990).

Der klassische hemmende Neurotransmitter GABA ist der hauptsächliche Neurotransmitter der lateralen Hemmung und tritt in den Amakrinzellen und in den Horizontalzellen auf (MARC 1994). Die Amakrinzellen, die nicht GABAerg sind, nutzen Glycin als hemmenden Transmitter (MARC 1994).

Auch Dopamin, das eine Rolle in der Regulation der Funktionsumstellung bei der Hell- bzw. Dunkeladaptation spielt, ist in den Amakrinzellen zu finden (KRAMER 1971). Der schnelle exzitatorische Transmitter des peripheren Nervensystems Acetylcholin (ACh) tritt ebenso wie Serotonin [5-Hydroxytryptamin (5HT); VANEY 1986] in Amakrinzellen der Retina auf (FAMIGLIETTI JR. 1983; MASLAND u. TAUCHI 1986).

Das Purinnukleosid Adenosin konnte mittels Autoradiographie und Immunocytochemie in Zellkörpern der Amakrinzellen und der Ganglienzellschicht nachgewiesen werden (BLAZYNSKI u. PEREZ 1991). Außerdem treten in der Ganglienzellschicht der Neurotransmitter Somatostatin (SAGAR 1987) und in den Amakrinzellen die Substanz P (KOLB et al. 1995), der Corticotropin Releasing Faktor sowie Neuropeptid Y (NPY) auf (MARSHAK 1989).

## **2.7 Neuropeptid Y**

NPY, ein Peptid aus 36 Aminosäuren, ist im Gehirn der Säugetiere weit verbreitet und das am häufigsten vorkommende Neuropeptid im Gehirn (DUMONT et al. 1992). NPY wurde zuerst aus Schweinehirn isoliert (TATEMOTO 1982, TATEMOTO et al. 1982) und gehört zusammen mit den beiden Darmhormonen Peptid YY (PYY) und dem Pankreatischen Polypeptid (PP) zur Familie der Pankreatischen Hormone. Zu den bekanntesten zentral vermittelten Effekten von NPY gehören

- Stimulation der Nahrungsaufnahme (CLARK et al. 1984, LEVINE u. MORLEY 1984),
- Beeinflussung der Thermogenese (LOPEZ-VALPUESTA et al. 1996),
- antikonvulsive Aktivität (ERICKSON et al. 1996; KOPP et al. 1999) und
- Hemmung der Sedation (NAVEILHAN et al. 2001 [a]; NAVEILHAN et al. 2001[b]).

NPY beeinflusst aber auch den Tonus der Blutgefäße bzw. den Blutdruck. FRANCO-CERECEDA u. LISKA (1998) zeigten, dass in sympathischen Nervenendigungen lokalisiertes NPY zu einer Steigerung der Noradrenalin-vermittelten Vasokonstriktion führt, wohingegen zentral appliziertes NPY den arteriellen Blutdruck bei Ratten senkt (MORTON et al. 1999). Es stellt sich darum die interessante Frage, ob NPY auch das Schwellen der Müllerzellen beeinflusst.

In der neurosensorischen Retina wird NPY in Folge von Lichteinstrahlung freigesetzt (BRUUN et al. 1991) und stimuliert die  $Ca^{2+}$ -abhängige Ausschüttung von Neurotransmittern, wie z. B. Acetylcholin oder GABA (BRUUN u. EHINGER 1993). In den Netzhäuten verschiedener Säugetiere, darunter auch Mensch und Ratte, konnte eine NPY-Immunreaktivität in Subpopulationen von Amakrinzellen nachgewiesen werden (BRUUN et al. 1984, TORNQVIST u. EHINGER 1988, STRAZNICKY u. HISCOCK 1989, HUTSLER et al. 1993). In der Retina der Kröte zeigen auch Müllerzellen eine NPY-Immunreaktivität (ZHU u. GIBBINS 1996), während die Müllerzellen der Säugetiere anscheinend kein NPY-Protein exprimieren.

### **2.8 Neuropeptid Y-Rezeptorsubtypen**

Fünf Rezeptoren der Pankreatischen Familie wurden bis heute in Säugetieren kloniert ( $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$  und  $Y_6$ , Tab. 1; LUNDBERG et al. 1996, MUNGLANI et al. 1996, BALASUBRAMANIAM 1997, BLOMQVIST u. HERZOG 1997, MICHEL et al. 1998), außerdem konnte der  $Y_3$ -Rezeptor aufgrund pharmakologischer Ergebnisse postuliert werden (BLOMQVIST u. HERZOG 1997). Die pharmakologische Differenzierung dieser Rezeptoren erfolgte mittels unterschiedlicher Agonisten (Tab. 1). Während NPY und Peptid YY (PYY) mit hoher Affinität an die  $Y_1$ -,  $Y_2$ - und  $Y_5$ -Rezeptorsubtypen binden, bindet Pankreatisches Polypeptid (PP) mit hoher Affinität an den  $Y_4$ -Rezeptorsubtyp (Tab. 1; MICHEL et al. 1998, CERDÁ-REVERTER u. LARHAMMAR 2000). Nur  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$  und  $Y_5$  treten funktionell im Gewebe der Ratte auf (EVA et al. 1990, YAN et al. 1996, BURKHOFF et al. 1998, Parker et al. 1998, VOISIN et al. 2000).

Der  $Y_1$ -Rezeptor ist der am besten untersuchte NPY-Rezeptorsubtyp und besitzt eine Schlüsselrolle bei vielen der zentralen und peripheren Effekte von NPY (LUNDBERG et al. 1996, BALASUBRAMANIAM 1997, BLOMQVIST u. HERZOG 1997). Er war der erste Rezeptor der Pankreatischen Familie, der geklont werden konnte (EVA et al. 1990, LARHAMMAR et al. 1992). Die meisten der vaskulären (GRUNDEMAR u. EKELUND 1996, ZUKOWSKA-GROJEC et al. 1998, CAPURRO u. HUIDOBROTORO 1999) und antinozizeptiven Effekte (ZHANG et al. 2000, NAVEILHAN et al. 2001 [c]) des NPY werden über den  $Y_1$ -Rezeptor vermittelt.

Auch werden die zentral hervorgerufenen vaskulären Wirkungen des NPY wie Senkung des Blutdrucks und der Herzfrequenz hauptsächlich über den  $Y_1$ -Rezeptor vermittelt (MORTON et al. 1999). Weitere zentrale Wirkungen, in die  $Y_1$ -Rezeptoren



involviert sind, sind Minderung von Angst und Depression (NAKAJIMA et al 1998, KASK et al. 2001, REDROBE et al. 2002), Einfluss in die Nahrungsaufnahme (CHENG et al. 1998, KASK et al. 1998, CORP et al. 2001) und Regulation des Alkoholgenusses (KELLEY et al. 2001).

**Tab. 1** (modifiziert nach BUSCHAUER et al. 2000)

Übersicht über die bisher geklonten NPY-Rezeptorsubtypen mit ihrer Differenzierung mittels Agonisten und der von ihnen vermittelten Wirkung des NPY.

Rezeptor-subtyp	Differenzierung mittels Agonisten	Vermittelte Wirkung des NPY
Y <sub>1</sub>	NPY~PYY~[Leu <sup>31</sup> , Pro <sup>34</sup> ]NPY >NPY2-36>NPY3-36 >NPY <sub>≥</sub> PP>NPY13-36	ZNS: - Nahrungsaufnahme ↑ - Anxiolyse - Sedierung Peripherie: - Vasokonstriktion - Blutdruck ↑
Y <sub>2</sub>	NPY <sub>≥</sub> NPY2-36~NPY3-36~ NPY13-36>>[Leu <sup>31</sup> , Pro <sup>34</sup> ]NPY	präsynaptische Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung
Y <sub>4</sub>	PP>PYY <sub>≥</sub> NPY>NPY2-36	gastrointestinale und zentrale Effekte
Y <sub>5</sub>	NPY~PYY~NPY2-36>hPP> [D-Trp <sup>34</sup> ]NPY>NPY13-36>rPP	ZNS: - antikonvulsiv - Nahrungsaufnahme ↑
Y <sub>6</sub>	1) NPY~PYY~[Leu <sup>31</sup> , Pro <sup>34</sup> ]NPY>> PP (WEINBERG et al. 1996) 2) PP>[Leu <sup>31</sup> , Pro <sup>34</sup> ]NPY>NPY ~PYY (GREGOR et al. 1996)	wird bei Primaten nicht in funktionsfähiger Form encodiert; bei Mäusen zentrale Effekte

Der Y<sub>2</sub>-Rezeptor ist hauptsächlich präsynaptisch lokalisiert. Er hemmt als Autorezeptor die Freisetzung von Neurotransmittern (WAHLESTEDT et al. 1986, SMITH-WHITE et al. 2001) und vermittelt auch vaskuläre Wirkungen des NPY

(SMITH-WHITE et al. 2002). Ein spezifischer  $Y_2$ -Agonist in der Niere des Schweines führt zu einer starken Vasokonstriktion (MALMSTRÖM et al. 1998), außerdem ist der  $Y_2$ -Rezeptor in die NPY-vermittelte Angiogenese (ZUKOWSKA-GROJEC et al. 1998) und die NPY-vermittelten Wirkungen auf den circadianen Rhythmus involviert (GOLOMBEK et al. 1996, GRIBKOFF et al. 1998).

Der  $Y_5$ -Rezeptor besitzt im Vergleich zu den anderen Rezeptoren der Pankreatischen Familie eine verlängerte dritte cytoplasmatische Schleife mit 100 Aminosäuren (NAKAMURA et al. 1997, BOROWSKY et al. 1998). Zu den Wirkungen des NPY, die über den  $Y_5$ -Rezeptor vermittelt werden, gehört die Zunahme der Nahrungsaufnahme (STANLEY et al. 1992), die Hemmung der Freisetzung des Lutenisierenden Hormones (LH; RAPOSINHO et al. 2001) sowie die Regulation von Krämpfen und Erregungen im Gehirn (MARSH et al. 1999, GUO et al. 2002).

### **2.9 Intrazelluläre Signaltransduktion der NPY-Rezeptorsubtypen**

Alle bisher bekannten NPY-Rezeptorsubtypen sind über Pertussistoxin-sensitive Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Proteine (G-Proteine) an der Signalübertragung in die Zelle beteiligt (SHEIKH u. WILLIAMS 1990, MICHEL 1991). Die Rezeptoren sind mit sieben Transmembrandomänen in der Plasmamembran verankert. Die Rezeptortätigkeit vermittelt die Wechselwirkung zwischen dem Rezeptor und dem G-Protein an der Innenseite der Zellmembran. Der durch das Hormon aktivierte Rezeptor führt an dem aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit bestehenden G-Protein zum Austausch von GDP gegen GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit sowie zur Dissoziation vom  $\beta\gamma$ -Heterodimer. Abhängig von seiner Isoform kann der GTP- $\alpha$ -Komplex durch intrazelluläre Botenstoffe entweder die Adenylatcyclase aktivieren oder hemmen oder aber die Phospholipase C $\beta$  aktivieren. Als intrazelluläre Botenstoffe entstehen dabei entweder cAMP oder - durch Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat - Inositoltrisphosphat (InSP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG; LEVINE 1999, MORRIS u. MALBON 1999, SCHÖNEBERG et al. 1999). Die drei genannten intrazellulären Botenstoffe haben wiederum eigene biologische Wirkungen. InSP<sub>3</sub> aktiviert den ligandengesteuerten  $Ca^{2+}$ -Kanal des endoplasmatischen Retikulums. Dies führt zu einer Erhöhung der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration. DAG aktiviert die Proteinkinase C, was z. B. die Phosphorylierung von Rezeptoren oder Transkriptionsfaktoren zur Folge hat. Außerdem kann DAG auch Arachidonsäure freisetzen, die über ihre Metaboliten, den Prostaglandinen und

Prostazyklinen, zahlreiche weitere Wirkungen auf den Zellstoffwechsel hat. Freigesetztes cAMP aktiviert die Proteinkinase A, die wiederum von ihr regulierte Enzyme phosphorylieren und damit inaktivieren bzw. aktivieren kann.

Auch das  $\beta\gamma$ -Heterodimer ist in der Lage, die Aktivität von Ionenkanälen, Phospholipasen, Adenylatcyclasen oder Rezeptorkinasen zu beeinflussen. Abhängig vom Typ des G-Proteins können verschiedene Signalwege aktiviert werden. Ein Signalweg, der hier hervorgehoben werden soll, ist der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}]_i$ ). Die Bindung von NPY an seinen Rezeptor führt über ein G-Protein vermittelt zur Aktivierung der Phospholipase  $\text{C}\beta$ . Inositol-(1,4,5)-trisphosphat ( $\text{InsP}_3$ ) ist der intrazelluläre Überträgerstoff, der für die Erhöhung der  $[\text{Ca}]_i$  verantwortlich ist.  $\text{InsP}_3$  entsteht durch Spaltung eines spezifischen Membranphospholipids, des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphats ( $\text{PIP}_2$ ), welches durch zweimalige, ATP-abhängige Phosphorylierung von Phosphatidylinositol durch die Phospholipase  $\text{C}\beta$  gebildet wird. Nach Freisetzung von  $\text{InsP}_3$  kommt es zur Erhöhung von  $[\text{Ca}]_i$ . Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung erfolgt hierbei im Wesentlichen aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern im endoplasmatischen Retikulum. Bei der Spaltung von Phosphoinositiden wird nicht nur  $\text{InsP}_3$  als *second messenger* zur intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung erzeugt. Zusätzlich entsteht Diacylglycerin, welches die Proteinkinase C aktiviert und somit eine wichtige Funktion bei der Signaltransduktion hat (LÖFFLER u. PETRIDES 2003). In einem weiteren möglichen Signalweg kann der NPY-Rezeptor auch an ein Pertussistoxin-sensitives G-Protein gekoppelt sein, das die Adenylatcyclase hemmt (HERZOG et al. 1992). Die Adenylatcyclase bildet aus Adenosintriphosphat (ATP) den intrazellulären Botenstoff cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und steuert so weitere Zellfunktionen.

### **2.10 Vorkommen von NPY-Rezeptoren in der Retina**

Die vorherrschenden NPY-Rezeptorsubtypen im zentralen Nervensystem sind der  $\text{Y}_1$ -,  $\text{Y}_2$ - und der  $\text{Y}_5$ - Rezeptor. Alle drei Rezeptorsubtypen werden von den Zellen des humanen retinalen Pigmentepithels ausgebildet (AMMAR et al. 1998).

Die zelluläre Verteilung der NPY-Rezeptorsubtypen ist in der Retina noch nicht detailliert untersucht worden. Jedoch gibt es einige Hinweise, die zu der Annahme führen, dass NPY über NPY-Rezeptoren in der Retina agiert:

- NPY kann in amakrinen Zellen nachgewiesen werden (MARSHAK 1989).

- Exogene Applikation von NPY stimuliert die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Freisetzung von vielen Neurotransmittern, einschließlich Acetylcholin und  $\gamma$ -Aminobutyrat in der Retina von Kaninchen und Huhn (BRUUN u. EHINGER 1993).
- Nach exogener Applikation von NPY kommt es zu einer Reduzierung der cAMP-Akkumulation in der Retina des Kaninchens. Dies erlaubt die Annahme, dass NPY über G-Protein gekoppelte NPY-Rezeptoren die Adenylatcyclase-aktivität hemmt (BRUUN et al. 1994).

D'ANGELO et al. (2002) untersuchten die zelluläre Expression des  $Y_1$ -Rezeptorsubtyps in der Retina der Ratte. Sie konnten feststellen, dass eine  $Y_1$ -rezeptorartige Immunreaktivität in der neurosensorischen Retina von den Horizontalzellen und den amakrinen Zellen ausgebildet wird. Außerdem stellten CANTÓ SOLER et al. (2002) fest, dass von Gliazellen in der humanen Retina und von periretinalen Membranen in Folge der proliferativen Vitreoretinopathie auch eine  $Y_1$ -rezeptorartige Immunreaktivität ausgebildet wird.

### **2.11 Zielstellung der Arbeit**

Vor dem Hintergrund dieser Daten soll untersucht werden, ob NPY eine Wirkung in der vitalen Netzhaut hat. Insbesondere ist von Interesse, ob NPY das Schwellungsverhalten der Müllerzellen der postischämischen Retina beeinflussen kann, und - wenn dies der Fall ist - über welche möglichen Signalwege NPY seine Wirkung auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellen vermittelt. Diese Punkte werden darum im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

### **3 Tiere, Material und Methoden**

Alle Untersuchungen wurden im Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Abteilung Neurophysiologie, der Universität Leipzig durchgeführt und waren Bestandteil des laufenden Forschungsprogramms dieser Abteilung.

#### **3.1 Versuchstiere**

Die Versuche wurden an adulten Long-Evants-Ratten (250 bis 350 g) durchgeführt, die aus dem Medizinisch-Experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig bezogen wurden. Die Tiere wurden entsprechend des deutschen Tierschutzgesetzes mit einem zwölf Stunden Tag- und Nachtrhythmus gehalten. Die Tiere erhielten Futter und Wasser *ad libitum* und waren klinisch gesund. Insgesamt wurden 50 Tiere untersucht.

#### **3.2 Verwendete Lösungen und Substanzen**

##### **3.2.1 Extrazelluläre Lösung**

Die extrazelluläre Lösung (EZL) diente als Medium während der Präparation der Retina und als Standard-Perfusionslösung.

Die EZL enthielt:

NaCl	136 mM	Carl Roth, Karlsruhe, BRD
KCl	3 mM	Carl Roth, Karlsruhe, BRD
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	Sigma, Steinheim, BRD
CaCl <sub>2</sub>	0.01 mM	Merck, Darmstadt, BRD
HEPES [N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2-ethansulfonsäure]	10 mM	Carl Roth, Karlsruhe, BRD
Glucose	11 mM	Merck, Darmstadt, BRD

Der pH-Wert der Lösung wurde bei 7.4 mit Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS-Base, Carl Roth, Karlsruhe, BRD) eingestellt. Die Lösungen wurden an jedem Versuchstag frisch angesetzt.

##### **3.2.2 Hypotone Testlösung**

Die hypotone Lösung wurde durch Verdünnung der EZL mit Aqua bidestillata (Aq. bidest.) auf 60 V.-% hergestellt.

### 3.2.3 Calciumfreie Testlösung

Die nominell calciumfreie Testlösung enthielt:

NaCl	136 mM	Carl Roth, Karlsruhe, BRD
KCl	3 mM	Carl Roth, Karlsruhe, BRD
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	Sigma, Steinheim, BRD
CaCl <sub>2</sub>	0.01 mM	Merck, Darmstadt, BRD
HEPES	10 mM	Carl Roth, Karlsruhe, BRD
EGTA [Ethylenglykolbis-(β-amino-ethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure]	1 mM	Boehringer Ingelheim, Heidelberg, BRD
Glucose	11 mM	Merck, Darmstadt, BRD

Der pH-Wert der calciumfreien Testlösung wurde bei 7.4 mit TRIS (Carl Roth, Karlsruhe, BRD) eingestellt.

### 3.2.4 Vitalfarbstoff

Um die Müllerzellen der vitalen Retina mit Hilfe des Laser Scanning Mikroskops darstellen zu können, wurde der Farbstoff Mitotracker Orange (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet. Es wurde eine Stocklösung (1 mM) in Dimethylsulfoxid (Sigma, Steinheim, BRD) hergestellt, die in phosphate buffered saline (PBS, Biochrom AG, Berlin, BRD) auf 10 μM verdünnt wurde. Die vitale Retina wurde mit der Färbelösung 5 min vor der jeweiligen Messung inkubiert (UCKERMANN et al. 2004).

### 3.2.5 Lösungen mit Ba<sup>2+</sup>

Ba<sup>2+</sup> lag als Chloridsalz (Sigma, Steinheim, BRD) vor. In Aq. bidest. wurde eine Stocklösung (1 M) hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Perfusionslösungen mit Ba<sup>2+</sup> in einer Konzentration von 1 mM verwendet.

### 3.2.6 Neuropeptid Y

Um den Einfluß von Neuropeptid Y (NPY) auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen zu untersuchen, wurde humanes NPY mit der Sequenz YPSKPDNDGEDAAPAEDMARYYSALRHYINLITRQRY-NH<sub>2</sub> (Calbiochem, Merck Biosciences GmbH, Schwalbach am Taunus, BRD) verwendet. Eine Stocklösung (200 μM) von NPY wurde in Essigsäure (Sigma, Steinheim, BRD) hergestellt. NPY

wurde in der hypotonen Testlösung appliziert bzw. 30 min vor Versuchsbeginn inkubiert.

### 3.2.7 NPY-Rezeptoragonisten

Die spezifischen Agonisten gegen den Y<sub>1</sub>-, Y<sub>2</sub>- und Y<sub>5</sub>-Rezeptor (Tab. 2) wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Anette Beck-Sickinger, Institut für Biochemie, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Universität Leipzig, Leipzig, BRD zur Verfügung gestellt. Aus den jeweiligen Peptiden wurden in Aq. bidest. Stocklösungen (100 µM) hergestellt. Die Rezeptoragonisten wurden in der hypotonen Testlösung appliziert.

**Tab. 2**

Aminosäuresequenz (AS-Sequenz) und Molekulargewicht (MW in g/mol) der NPY-verwandten Peptide, die als selektive NPY-Rezeptoragonisten getestet wurden (Ahx = Aminohexanonsäure und Aib = Aminoisobutyrsäure).

Peptid	AS-Sequenz	MW
Y <sub>1</sub> -Agonist	YPSKPDFPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLITRPRY-NH <sub>2</sub>	4255.8
Y <sub>2</sub> -Agonist	YPSK-Ahx-RHYINLITRQRY-NH <sub>2</sub>	2220.6
Y <sub>5</sub> -Agonist	GPSQPTYPGDNATPEQMARYYSALRRYINMA-Aib-RQRY-NH <sub>2</sub>	4253.7

### 3.2.8 Verwendete Testsubstanzen

Für die Untersuchung des durch NPY aktivierten Signalweges wurden die in Tab. 3 aufgeführten Testsubstanzen verwendet.

**Tab. 3** (nächste Seite)

Bezeichnung, Konzentration (Konz., in µM), Inkubationszeit (t<sub>ink.</sub>, in min) und Wirkung der Testsubstanzen, die zur Untersuchung des durch NPY aktivierten Signalweges verwendet wurden. Außerdem ist aufgeführt, auf welche Art die Substanzen appliziert wurden (Appl., nach Schemata A-E, siehe Abbildung 1).

Testsubstanz	Konz.	t <sub>ink.</sub>	Wirkung	Appl.
<b>Adenosin</b> (Sigma, Steinheim, BRD)	10	-	aktiviert Adenosin-rezeptoren	A
<b>BAPTA-AM</b> [1,2-Bis(O-aminophenoxy)ethan- <i>N,N,N,N</i> -tetraessigsäureacetoxymethylester; Sigma, Steinheim, BRD]	100	45	intrazellulärer Ca <sup>2+</sup> -Chelator	E
<b>BIBP 3226</b> {(R)- <i>N</i> <sup>2</sup> -(Diphenylacetyl)- <i>N</i> -[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamid; Sigma, Steinheim, BRD}	1	10	selektiver Y1 NPY-Rezeptorantagonist	E
<b>CPA</b> ( <i>N</i> <sup>6</sup> -Cyclopentyladenosin; Sigma, Steinheim, BRD)	10/ 100	-	selektiver A <sub>1</sub> -Rezeptoragonist	A
<b>DPCPX</b> (8-Cyclopentyl-1,3-dipropyl-xanthin; Sigma, Steinheim, BRD)	0.1	-	selektive A <sub>1</sub> -Rezeptorantagonist	A
<b>Gö6976</b> {3-[1-(3-Dimethylamino-propyl)-5-methoxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl]-4-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-1 <i>H</i> -pyrrol-2,5-dion; Sigma, Steinheim, BRD}	1	20	hemmt Protein-kinase C	D
<b>L-Glutamat</b> (Sigma, Steinheim, BRD)	1000	-	aktiviert Glutamat-rezeptoren	A
<b>LY341495</b> [2-Amino-2-(2-carboxycycloprop-1-yl)-3-(xanth-9-yl)propansäure; Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK]	100	-	selektiver Ant-agonist der metabotropen Glutamat-rezeptoren 2 und 3	A
<b>MPEP</b> [6-Methyl-2-(phenylethynyl)-pyridin; Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK]	50	-	selektiver Ant-agonist des metabotropen Glutamat-rezeptors 5	A
<b>Staurosporin</b> (Sigma, Steinheim, BRD)	0.01	20	hemmt Proteinkinasen	D
<b>Thimerosal</b> (Na-Ethylmercuritthio-salicylat; ICN Biomedicals GmbH, Eschwege, BRD)	10	-	stimuliert InsP <sub>3</sub> Rezeptor	C



Fortsetzung Tabelle 3

TTX (Tetrodotoxin; Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK)	1	-	selektiver Blocker von spannungsabhängigen Na <sup>+</sup> -Kanäle	A
--	---	---	--	---

### **3.3 Ischämiemodell**

Die Tiere erhielten für zwölf Stunden kein Futter. Anschließend wurde eine Ketamin/Xylazin-Narkose intraperitoneal eingeleitet [100 mg/kg Körpergewicht (KGW) Ketaminhydrochlorid und 15 mg/kg KGW Xylazin]. In die vordere Augenkammer des behandelten Auges wurde von der Pars plana ausgehend eine Infusionsnadel (27 G) eingeführt. Diese Infusionsnadel wurde mit einem Infusionsbeutel verbunden, der physiologische Kochsalzlösung enthielt. Durch Anheben des Infusionsbeutels wurde der intraokuläre Druck für 60 min auf 160 mm Hg erhöht. Die transiente retinale Ischämie wurde nur in einem Auge der Ratten induziert. Das andere Auge blieb unbehandelt und diente zur Kontrolle.

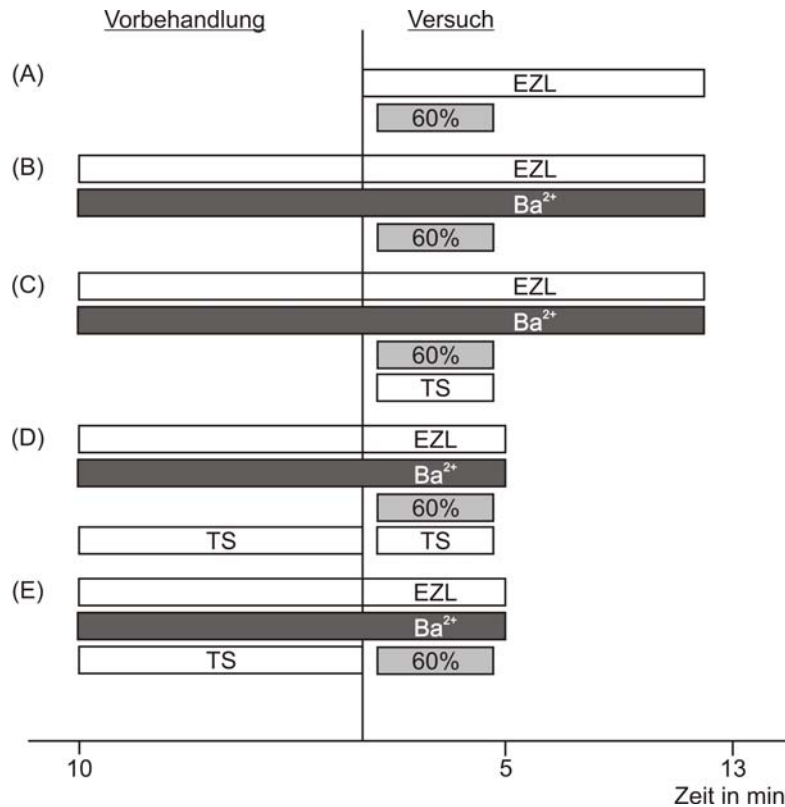
### **3.4 Versuchsschema**

Die einzelnen Untersuchungen wurden entsprechend der Schemata in Abb. 1 (Seite 20) durchgeführt.

### **3.5 Präparation der Netzhaut**

Die Ratten wurden mit Kohlenstoffdioxid unmittelbar vor Versuchsbeginn euthanasiert. Nach Enukleation der Bulbi wurde die Kornea mit der Linse durch einen zirkumferentiellen Schnitt entfernt. Anschließend wurde der verbleibende Augenbecher am Sehnervenstumpf fixiert, der Glaskörper losgelöst und die Netzhaut freipräpariert.

Die Netzhaut wurde auf einen Membranfilter (Schleicher & Schuell, Dassel, BRD) plan aufgebracht, so dass die Netzhaut mit der Schicht der inneren und äußeren Segmente der Photorezeptoren (RS) diesem zugewandt lag. Alle Arbeitsschritte fanden in einer mit extrazellulärer Lösung gefüllten Petrischale statt (Abb. 2A, Seite 21).

**Abb. 1**

## Schemata der Versuchsdurchführung

(A) Ischämie: Die Schnitte der ischämischen Retina wurden nach 30 s für 4 min mit hypotoner Lösung perfundiert. Das anschließende Auswaschen dauerte 8.5 min.

(B) Unbehandelte Retina: Die retinalen Schnitte der gesunden Retina wurden 10 min mit 1 mM  $Ba^{2+}$  inkubiert, bevor die hypotone Lösung 4 min appliziert wurde. Anschließend wurde auch hier 8.5 min ausgewaschen.

(C) Akute Applikation der Testsubstanz mit der hypotonen Perfusionslösung.

(D) Inkubation mit der Testsubstanz und anschließende Applikation mit der hypotonen Perfusionslösung.

(E) Inkubation mit der Testsubstanz vor der anschließenden Perfusion mit hypotoner Perfusionslösung.

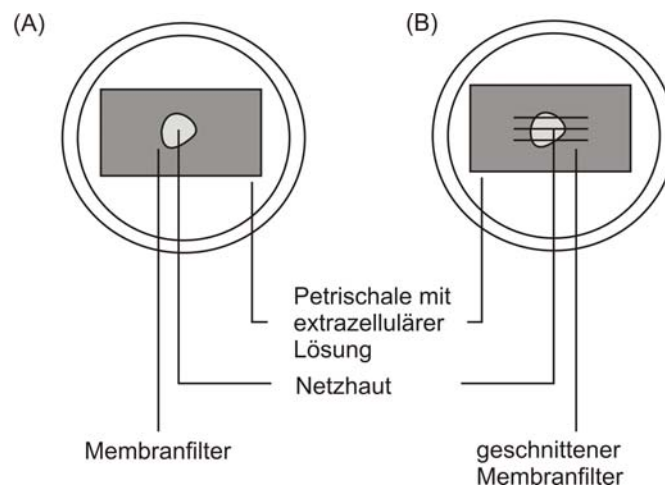
1: Bestimmung der Somafläche vor Applikation der hypotonen Perfusionslösung (= Kontrolle, Somaflächen 100 %).

2: Bestimmung der Somafläche nach vierminütiger Applikation der hypotonen Perfusionslösung.

3: Bestimmung der Somafläche nach Auswaschen der hypotonen Perfusionslösung.

EZL: extrazelluläre Lösung, TS = Testsubstanz, 60 % = hypotone Perfusionslösung.

Die Inkubationsdauer der Testsubstanzen ist in Tab. 3, Seite 18 aufgeführt, soweit sie nicht 10 min beträgt.



### Abb. 2

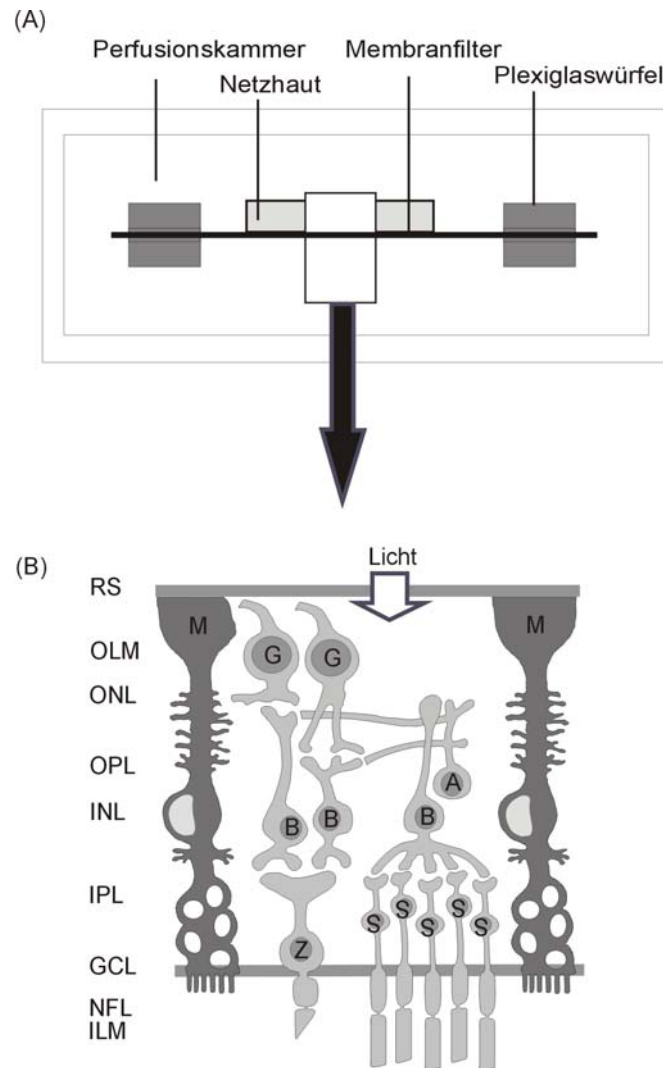
(A) Schematische Darstellung der auf dem Membranfilter fixierten Retina (Aufsicht). Die Netzhaut wird auf dem Membranfilter in der mit extrazellulärer Lösung gefüllten Petrischale fixiert. Dabei ist die Netzhaut auf dem Membranfilter so aufgebracht, dass sie mit der RS diesem zugewandt liegt.

(B) Schematische Darstellung der retinalen Schnittpräparate.

Mit Hilfe einer Schneidemaschine wird die auf dem Membranfilter fixierte Netzhaut in 1 mm dicke Schnitte geschnitten.

### 3.6 Anfertigen von retinalen Schnittpräparaten

Mit Hilfe einer Schneidemaschine wurde die auf dem Filter fixierte Netzhaut in 1 mm dicke Schnitte geschnitten (Abb. 2B). Diese Schnitte wurden für die Untersuchung der Retina in eine Perfusionskammer überführt (Abb. 3A, Seite 22). Diese besteht aus einem Plexiglasrahmen, der auf einem Objektträger aufgeklebt ist. In dieser Kammer wurden die Schnitte in zwei geschlitzten Plexiglaswürfeln fixiert. In Abb. 3B (Seite 22) ist die Lage der Netzhaut in der Perfusionskammer und das daraus resultierende Bild schematisch dargestellt. Während des Versuchs wurde die Kammer kontinuierlich mit den entsprechenden Perfusionslösungen gespült.



### Abb. 3

(A) Schema der Perfusionsskammer mit fixiertem Membranfilter (Aufsicht). In der Perfusionsskammer wird das retinale Schnittpräparat (Membranfilter mit Netzhaut) zwischen den Plexiglaswürfeln fixiert.

(B) Schematische Darstellung der Lage der Netzhaut in der Perfusionsskammer und des daraus resultierenden mikroskopischen Bildes. Die retinalen Schnitte sind so in der Perfusionsskammer fixiert, dass vertikale Schnitte durch die Netzhaut aufgenommen werden können. Dies ermöglicht die Aufnahme der Zellkörper der Müllerzellen (M, dunkelgrau) in der inneren Körnerschicht (INL). ILM: innere limitierende Membran, NFL: Nervenfaserschicht, GCL: Ganglienzellschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, ONL: äußere Körnerschicht, OLM: äußere limitierende Membran, RS: Schicht der inneren und äußeren Segmente der Photorezeptoren, A: Amakrinzelle, B: Bipolarzelle, G: Ganglienzelle, S: Stäbchen, Z: Zapfen (modifiziert nach REICHENBACH 1999).

### **3.7 Aufnahme der Müllerzellsomata**

Alle Versuche wurden mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop LSM 510 META (Zeiss, Oberkochen, BRD) inklusive Image Analysis Software durchgeführt. Der Einsatz der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie ermöglicht die Aufnahme von optischen Schnitten durch ein Präparat. Außerdem wird eine bessere optische Auflösung als bei Verwendung eines konventionellen Lichtmikroskops erreicht, da die nichtfokussierten Areale nicht in die Bildentstehung einfließen. Die von außerhalb der fokussierten Ebene kommenden Strahlen werden durch eine zusätzliche Blende abgefangen.

Der verwendete Farbstoff Mitotracker Orange wurde mit einem Helium Neon Laser bei 543 nm angeregt, die Emission wurde unter Verwendung eines 560 nm Langpassfilters aufgezeichnet. Im Rahmen der Versuche wurde ein Wasserimmersionsobjektiv (Achromplan 40 x 0.75, Zeiss, Oberkochen, BRD) benutzt. Es wurden jeweils Aufnahmen einer Größe von 57.6 x 57.6 µm angefertigt. Bilder der gefärbten Müllerzellsomata in der inneren Körnerschicht (INL) wurden in Intervallen von 1 s aufgenommen. Nach Versuchsende wurden die Querschnittsflächen der mit Mitotracker Orange beladenen Müllerzellsomata ausgemessen. Die Werte wurden vor und 4 min nach Verringerung der Osmolarität bestimmt. Die Werte sind in Prozent gegenüber den Kontrolldaten vor Änderung der Osmolarität angegeben.

### **3.8 Statistische Analyse**

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm Prism (Graphpad Software, San Diego, CA) durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben; n entspricht der Zahl der untersuchten Zellen. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-Tests untersucht.

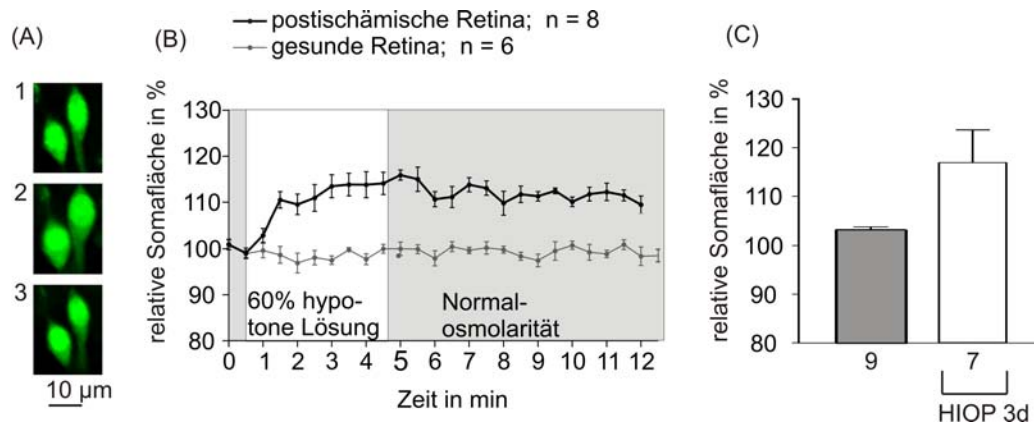
## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Schwellungsverhalten von Müllerzellen der postischämischen Netzhaut**

Zur Untersuchung des Schwellungsverhaltens von Müllerzellen der postischämischen Netzhaut wurde in einem Auge der Ratten für die Dauer einer Stunde eine iatrogene Ischämie erzeugt. Nach drei Tagen Reperfusion wurde das Schwellungsverhalten der Müllerzellen bei hypotoner Stimulation untersucht. Dazu wurden die Müllerzellsomata in der inneren Körnerschicht (INL) mittels einer vitalen Markierung (UCKERMANN et al. 2004) visualisiert und während des gesamten Versuchsverlaufs aufgezeichnet (Abb. 4A, Seite 25). Nach Verringerung der Osmolarität der Perfusionslösung auf 60 % nahm die Somagröße der Müllerzellen der postischämischen Netzhaut zu. Diese Schwellung erwies sich beim Auswaschen als reversibel. Bei Betrachtung der mittleren Somagröße mehrerer Müllerzellen der postischämischen Netzhaut während des Versuchverlaufs (Abb. 4B) zeigte sich, dass die Querschnittsfläche der Müllerzellsomata nach Verringerung der Osmolarität zunächst sprunghaft zunahm (nach 1 min auf  $110 \pm 2$  %) und bei längerer Applikation der hypotonen Lösung die Somafläche noch bis auf 118 % stieg. Setzte man die Müllerzellen im Anschluss wieder der Normalosmolarität aus (= Auswaschen), ging die Schwellung leicht zurück. Zur Kontrolle wurden Netzhäute von gesunden Ratten getestet. Dabei konnte keinerlei Veränderung der Somagrößen der Müllerzellen beobachtet werden. In den folgenden Versuchen wurden die relativen Somaflächen der Müllerzellen nach vierminütiger Perfusion mit hypotoner Lösung bestimmt. Abb. 4C zeigt die mittlere Zunahme der Somagrößen der Müllerzellen der postischämischen Netzhaut in hypoosmolarem Medium auf 118 %, während die Müllerzellen der gesunden Netzhaut ihre Somagrößen beibehielten.

### **4.2 Wirkung von NPY auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen der postischämischen Netzhaut**

Im Folgenden wurde untersucht, ob Neuropeptid Y (NPY) das Schwellen der Müllerzellsomata der postischämischen Netzhaut beeinflussen kann. NPY wurde in einer Konzentration von 20 nM gleichzeitig mit der hypotonen Perfusionslösung appliziert. Wie in Abb. 5 (rot, Seite 26) zu sehen ist, hemmte die Anwesenheit von NPY das Schwellen der Müllerzellsomata der postischämischen Netzhaut in hypoosmolarem Medium. Die Müllerzellsomata schwollen nicht.

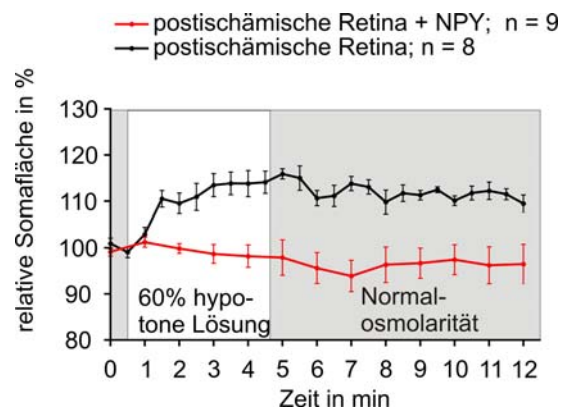
**Abb. 4**

Die Verringerung der Osmolarität der Perfusionslösung führt zu einer Größenzunahme der Müllerzellsomata der postischämischen Netzhaut, nicht aber in der unbehandelten Kontrollnetzhaut. Akut isolierte Schnitte der gesunden (Kontrolle) und der postischämischen Retina der Ratte wurden mit dem Vitalfarbstoff Mitotracker Orange inkubiert, um selektiv Müllerzellen zu färben (UCKERMANN et al. 2004). Nachfolgend wurde die Querschnittsfläche der Müllerzellen bestimmt und ihre prozentuale Veränderung im Vergleich zur Somagröße am Versuchsbeginn ermittelt (relative Somafläche).

(A) Originalaufnahmen von mit Mitotracker Orange gefüllten Müllerzellsomata der postischämischen Netzhaut vor (1), nach (2) Verringerung der Osmolarität (60 % der Kontrollosmolarität) und nach Rückkehr zur Normalosmolarität (3).

(B) Veränderung der Querschnittsfläche der Müllerzellsomata während des Versuchsverlaufs. Nach Verringerung der Osmolarität auf 60 % der Normalosmolarität schwellen die Müllerzellsomata der postischämischen Netzhaut (schwarz) an. Die Schwellung ging während des Auswaschens teilweise zurück. Die Müllerzellsomata der gesunden Netzhaut (grau) behielten ihre Größe über den gesamten Verlauf der Messung bei. Die Werte wurden alle 30 s gemessen und sind relativ gegenüber den Ausgangswerten (100 %) angegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. n = Zahl der untersuchten Zellen.

(C) Schwellung der Müllerzellen der postischämischen Netzhaut (weiß) und der Müllerzellsomata der gesunden Netzhaut, die ihre Größe beibehielten (grau). Die Werte wurden 4 min nach der Perfusion mit hypotoner Lösung gemessen und sind relativ zu den Ausgangswerten (100 %) angegeben. Signifikanter Unterschied gegenüber der gesunden Netzhaut: gepaarter Mann-Whitney Test. HIOP 3d: iatrogene Ischämie vor 3 Tagen. Die Anzahl der untersuchten Zellen ist unterhalb der Balken angegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.



**Abb. 5**

Die Applikation von NPY (rot, 10 nM) gleichzeitig mit der hypotonen Lösung verhinderte das Schwellen der Müllerzellsomata der postischämischen Netzhaut in hypotoner Lösung. Zum Vergleich ist das Schwellungsverhalten der Müllerzellen der postischämischen Retina (schwarz) dargestellt. Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 4B, Seite 25.

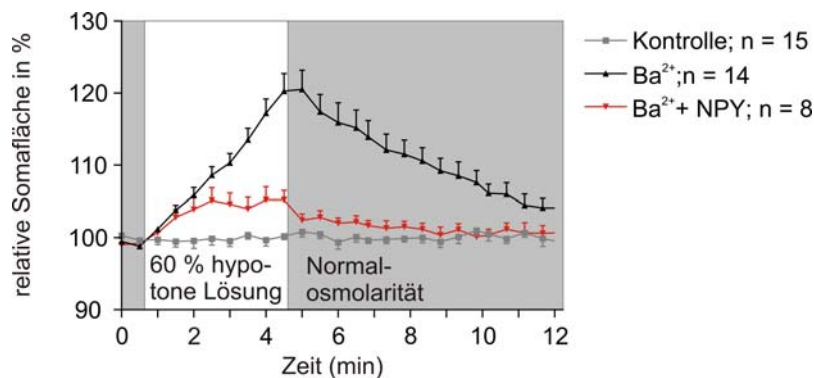
#### **4.3 Wirkung von NPY auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen der gesunden Netzhaut**

Es konnte gezeigt werden, dass NPY das Schwellen der Müllerzellen der postischämischen Netzhaut in hypoosmolarem Medium hemmen kann. Wie von PANNICKE et al. (2004) beschrieben, schwellen die Müllerzellen der gesunden Retina bei Blockierung ihrer Kaliumauswärtsströme in hypoosmolarem Medium. Dies kann u. a. durch Inkubation der Retina mit  $Ba^{2+}$ -Ionen erzielt werden. Im Rahmen dieser Experimente sollte nun untersucht werden, ob die Ergebnisse des Ischämie-Modells auf das  $Ba^{2+}$ -Modell übertragbar sind. Dazu wurden die retinalen Schnitte 10 min lang in 1 mM  $Ba^{2+}$  inkubiert. Während der anschließenden Messung lag  $Ba^{2+}$  ebenso in einer Konzentration von 1 mM vor. Die Verringerung der Osmolarität der Perfusionslösung führte zur Vergrößerung der Müllerzellquerschnitte der gesunden Retina in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  auf 120 % der Ausgangsgröße (Abb. 6, schwarz). In hypoosmolarem Medium ohne  $Ba^{2+}$  zeigten die Müllerzellen der gesunden Netzhaut keine Veränderungen ihrer Zellsomata (Abb. 6, grau).

In Abb. 6 ist die Wirkung von NPY auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellsomata der gesunden Netzhaut in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  dargestellt. NPY wurde in einer Konzentration von 10 nM gleichzeitig mit



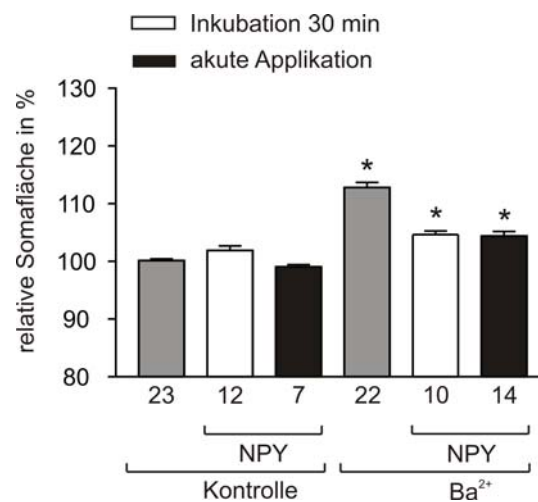
der hypotonen Perfusionslösung appliziert. Nach Verringerung der Osmolarität schwollen die Müllerzellsomata der gesunden Netzhaut in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  und NPY zwar in den ersten 2.5 min leicht an, die Schwellung stagnierte aber bei ca. 105 % der ursprünglichen Querschnittsfläche der Somata. Während des anschließenden Auswaschens gelangten die Müllerzellsomata innerhalb von 6 min nahezu zu ihrer ursprünglichen Größe zurück. Offenbar verhinderte NPY die Schwellung der Müllerzellen in hypotoner Lösung in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  fast vollständig.



**Abb. 6**

Wirkung von NPY auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellen während des Versuchsverlaufs. Bei Blockierung der  $K^+$ -Kanäle der Müllerzellen mit  $Ba^{2+}$  verursachte die hypotone Lösung ein Anschwellen der Müllerzellsomata der unbehandelten Netzhaut (schwarz). NPY (10 nM) wurde gleichzeitig mit der hypotonen Perfusionslösung appliziert und hemmte diese Schwellung der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  (1 mM). Zum Vergleich ist das Schwellungsverhalten der Müllerzellen der gesunden Retina (ohne  $Ba^{2+}$ , grau) dargestellt. Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 4B, Seite 25.

Allerdings konnte das Schwellen der Müllerzellsomata durch die akute Applikation von NPY (10 nM) nicht vollständig gehemmt werden. Aus diesem Grund wurden die frisch isolierten Schnitte 30 min mit NPY (10 nM) inkubiert (Abb. 7). Genauso wie bei der akuten Applikation von NPY schwollen die Somata der Müllerzellen, die zuvor 30 min mit NPY inkubiert worden waren nur leicht an (auf 105 % der Querschnittsfläche).

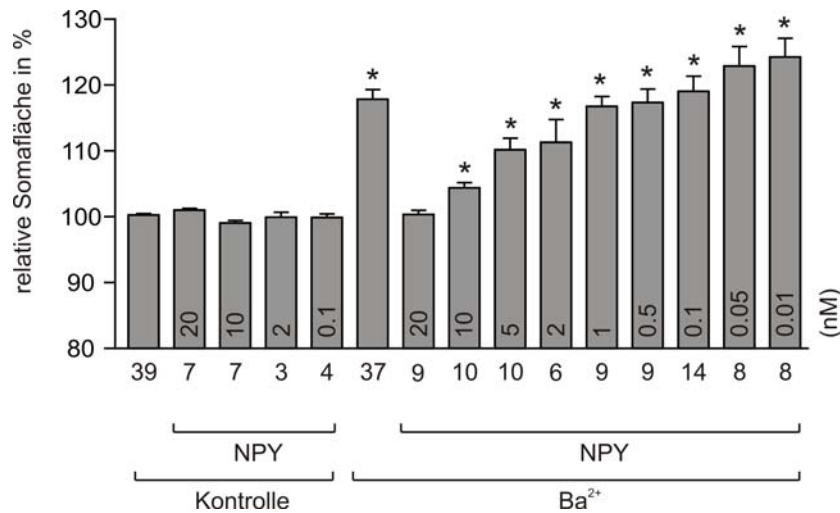


### Abb. 7

NPY hemmt das Schwellen der Querschnittsflächen der Müllerzellsomata von gesunden Netzhäuten in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  (1 mM). Die retinalen Schnitte wurden entweder mit NPY (10 nM) 30 min inkubiert, oder NPY wurde akut mit der hypotonen Perfusionslösung appliziert. Die Schwellung der Müllerzellen wurde unabhängig von der Applikationsform fast vollständig verhindert. Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 4C, Seite 25. Signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (100 %): \*,  $P < 0.001$ .

Diese Ergebnisse zeigten, dass NPY das Schwellen der Müllerzellsomata der gesunden Netzhaut in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  hemmen kann. Jedoch ist sowohl bei akuter Applikation als auch nach Inkubation von NPY die Hemmung unvollständig. Daher wurde bei weiteren Versuchen auf eine Inkubation verzichtet und NPY ausschließlich gemeinsam mit der hypotonen Lösung appliziert. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die hemmende Wirkung von NPY von dessen Konzentration abhängig ist. Dazu wurde NPY in verschiedenen nanomolaren Konzentrationen appliziert. In Abb. 8 ist die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellsomata der gesunden Netzhaut in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  dargestellt. Nach Verringerung der Osmolarität konnte die Schwellung der Somata der Müllerzellen in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  durch NPY in Konzentrationen zwischen 5 nM und 20 nM verhindert werden. Geringere Konzentrationen beeinflussten das Schwellungsverhalten der

Müllerzellen nicht. Ausschließlich bei Verwendung von NPY in einer Konzentration von 20 nM konnte keinerlei Schwellen der Müllerzellen der gesunden Retina in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  beobachtet werden.



**Abb. 8**

Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von NPY.

Gleichzeitig mit der hypotonen Perfusionslösung wurden unterschiedliche Konzentrationen an NPY appliziert. NPY verhinderte konzentrationsabhängig das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$ . Durch 20 nM NPY konnte eine vollständige Verhinderung der Schwellung der Müllerzellsomata erzielt werden, wohingegen 10 nM und 5 nM NPY die Schwellung nur teilweise aufheben konnten. Geringere Konzentrationen von NPY zeigten keine Wirkung. Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 4C, Seite 25. Signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (100 %): \*,  $P < 0.001$ .

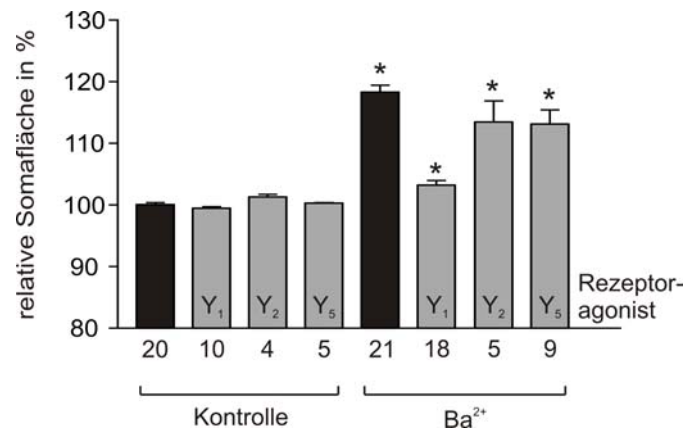
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NPY das Schwellen der Müllerzellsomata der postischämischen Netzhaut in hypoosmolarem Medium verhindern kann. Genauso besitzt NPY eine hemmende Wirkung auf das Schwellen der Müllerzellen der gesunden Netzhaut in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$ . Weitere Untersuchungen zur Wirkung von NPY können somit an unbehandelten Netzhäuten in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  durchgeführt werden. Dieses Modell ist dem Tiermodell der retinalen Ischämie aus folgenden Gründen vorzuziehen: Die

postischämischen Prozesse an der Retina führen morphologisch zu einer Verdünnung der Retina (PANNICKE et al. 2004), erschweren die Präparation der Retina und anschließende notwendige Fixierung auf dem Membranfilter. Dies führt zu einer geringen Ausbeute an mess- und auswertbaren Zellen. Außerdem ist auch aus tierschutzrechtlichen Gesichtspunkten die Verwendung von unbehandelten Tieren, also die Tötung zur Organentnahme, dem Tierversuch vorzuziehen. Daher wurden alle weiteren Untersuchungen zu der Wirkung von NPY auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellen in hypoosmolaren Medium an unbehandelten Netzhäuten in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  durchgeführt. Zu Kontrollzwecken wurde an jedem Versuchstag überprüft, ob die verwendeten Netzhäute intakt waren. Dazu wurde das Schwellungsverhalten der Müllerzellsomata in hypotoner Lösung ohne  $Ba^{2+}$  (keine Schwellung) und in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  (Schwellung) überprüft. Die jeweiligen Ergebnisse sind in den entsprechenden Abbildungen dargestellt.

#### **4.4 An der Wirkung von NPY beteiligte NPY-Rezeptorsubtypen**

Im Folgenden wurde untersucht, welche NPY-Rezeptorsubtypen an der Signaltransduktion der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen beteiligt sind.  $Y_{1-}$ ,  $Y_{2-}$ ,  $Y_{4-}$  und  $Y_{5-}$ -Rezeptorsubtypen treten funktionell im Gewebe der Ratte auf (EVA et al. 1990, YAN et al. 1996, BURKHOFf et al. 1998, PARKER et al. 1998, VOISIN et al. 2000). NPY bindet mit hoher Affinität an die  $Y_{1-}$ ,  $Y_{2-}$  und  $Y_{5-}$ -Rezeptorsubtypen (MICHEL et al. 1998, CERDÁ-REVERTER u. LARHAMMAR 2000), die daher näher untersucht wurden.

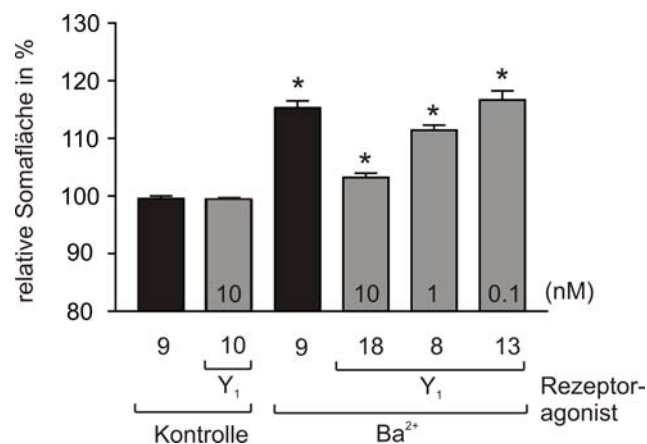
Es wurden NPY-verwandte Peptide getestet, die eine subtypspezifische agonistische Aktivität am Rezeptor besitzen. Die NPY-Rezeptoragonisten wurden, genauso wie NPY, gleichzeitig mit der hypotonen Perfusionslösung in einer Konzentration von 10 nM appliziert. Nach Verringerung der Osmolarität nahm die relative Somafläche der Müllerzellen der gesunden Netzhaut in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  und des  $Y_{2-}$ -Rezeptoragonisten auf 113 %, in Gegenwart von  $Ba^{2+}$  und des  $Y_{5-}$ -Rezeptoragonisten auf 112 % zu (Abb. 9). Weder der  $Y_{2-}$ - noch der  $Y_{5-}$ -Rezeptoragonist konnten somit die Schwellung der Müllerzellsomata verhindern. Hingegen verhinderte der  $Y_{1-}$ -Rezeptoragonist ein Anschwellen der Müllerzellen unter den Versuchsbedingungen fast vollständig.



### Abb. 9

Rezeptorabhängigkeit der Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium. Dargestellt sind die Wirkungen der selektiven Agonisten des Y<sub>1</sub>-, Y<sub>2</sub>- und Y<sub>5</sub>-Rezeptors (10 nM) auf die Querschnittsfläche der Müllerzellsomata in gesunden Netzhäuten in hypoosmolarem Medium in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von Ba<sup>2+</sup> (1 mM). Nur der Y<sub>1</sub>-Rezeptoragonist kann das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von Ba<sup>2+</sup> verhindern. Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 4C, Seite 25. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle (100 %): \*, P < 0.001.

Des Weiteren wurde untersucht, ob der Y<sub>1</sub>-Rezeptoragonist wie NPY eine Konzentrationsabhängigkeit bezüglich seiner hemmenden Wirkung auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von Ba<sup>2+</sup> zeigt (Abb. 10). Dazu wurde der Y<sub>1</sub>-Rezeptoragonist in verschiedenen Konzentrationen gleichzeitig mit der hypotonen Perfusionslösung appliziert. Es konnte gezeigt werden, dass der Y<sub>1</sub>-Rezeptoragonist in einer Konzentration von 10 nM signifikant die Zunahme der Querschnittsfläche der Müllerzellsomata in Anwesenheit von Ba<sup>2+</sup> in hypoosmolarem Medium hemmt. Konzentrationen von 1 nM und 0.1 nM erwiesen sich als wirkungslos.

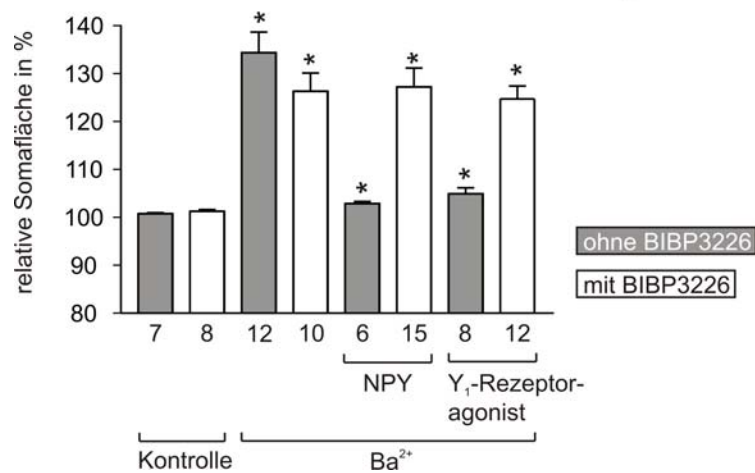


**Abb. 10**

Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung des selektiven  $Y_1$ -Agonisten auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$ . Mit der hypotonen Perfusionslösung wurden unterschiedliche Konzentrationen des Agonisten appliziert. Durch 10 nM des selektiven  $Y_1$ -Rezeptoragonisten konnte eine signifikante Verhinderung der Schwellung der Müllerzellsomata erzielt werden, wohingegen 1 nM des selektiven  $Y_1$ -Rezeptoragonisten die Schwellung nur teilweise aufheben konnten. 0,1 nM des selektiven  $Y_1$ -Rezeptoragonisten zeigen keine Wirkung. Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 4C, Seite 25. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle (100 %): \*,  $P < 0.001$ .

Die potentielle Beteiligung des  $Y_1$ -Rezeptors an der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellen wurde mit Hilfe des selektiven  $Y_1$ -Rezeptorantagonisten BIBP3226 (*R*)-*N*<sup>2</sup>-(Diphenylacetyl)-*N*-[(4-hydroxyphenyl)-methyl]-argininamid weiter untersucht (Abb. 11; RUDOLF et al. 1994). Dazu wurden die retinalen Schnitte 10 min mit BIBP3226 (1  $\mu$ M) inkubiert und NPY (10 nM) sowie der  $Y_1$ -Rezeptoragonist (10 nM) gleichzeitig mit der hypotonen Perfusionslösung appliziert. BIBP3226 selbst veränderte das Schwellungsverhalten der Müllerzellsomata nicht. Die Querschnittsflächen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium schwellen sowohl bei alleiniger Anwesenheit von  $Ba^{2+}$ -Ionen als auch in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  und BIBP3226 an. Dabei nahmen sie in hypoosmolarem Medium nach Inkubation mit BIBP3226 in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  und NPY auf 126 % bzw. im Falle des  $Y_1$ -Rezeptoragonisten auf 124 % zu. Dies

zeigt, dass die Blockierung des  $Y_1$ -Rezeptors die hemmende Wirkung von NPY auf die Müllerzellschwellung verhindert.

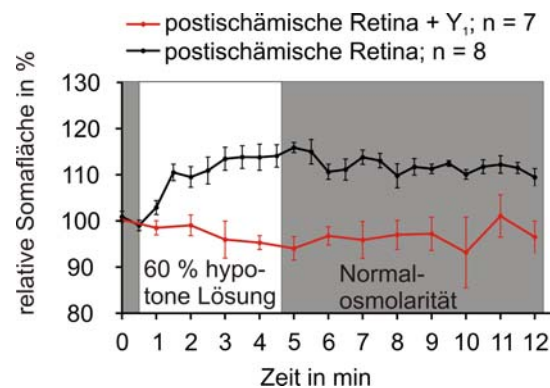


**Abb. 11**

Die Applikation des selektiven  $Y_1$ -Rezeptorantagonisten BIBP3226 (1  $\mu$ M) verhindert die hemmende Wirkung von NPY (10 nM) und des selektiven  $Y_1$ -Rezeptoragonisten (10 nM) auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$ . Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 4C, Seite 25. Signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (100 %): \*,  $P < 0.001$ .

Im Anschluss sollte überprüft werden, ob die erzielten Ergebnisse auf das Ischämie-Tiermodell übertragbar sind. Dazu wurde getestet, ob der  $Y_1$ -Rezeptoragonist auf das Schwellen der Müllerzellsomata der postischämischen Retina in hypoosmolarem Medium ebenso eine hemmende Wirkung besitzt wie auf das Schwellen der Müllerzellen der gesunden Retina in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  (Abb. 9).

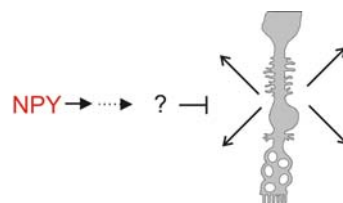
Der  $Y_1$ -Rezeptoragonist (20 nM) wurde dazu akut mit der hypotonen Perfusionslösung appliziert. Wie in Abb. 12 gezeigt ist, hemmte die Anwesenheit des  $Y_1$ -Rezeptoragonisten das Schwellen der Müllerzellsomata der postischämischen Netzhaut in hypoosmolarem Medium. Die Müllerzellsomata schwellen nicht.



**Abb. 12**

Die Applikation des Y<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten (rot, 20 nM) gleichzeitig mit der hypotonen Lösung hemmte das Schwellen der Müllerzellsomata der postischämischen Netzhaut in hypotoner Lösung. Zum Vergleich ist das Schwellungsverhalten der Müllerzellen der postischämischen Retina (schwarz) dargestellt. Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 4B, Seite 25.

Zur Erläuterung des möglichen Signalweges von NPY auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium wird in Abb. 13 eine schematische Darstellung der bisher vorgestellten Ergebnisse eingeführt.



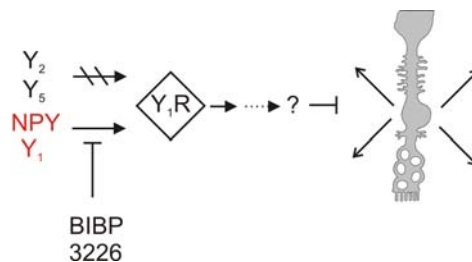
**Abb. 13**

NPY hemmt das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von Ba<sup>2+</sup> durch Aktivierung eines unbekanntes Signalweges. Dargestellt ist der hypothetische Signalweg der hemmenden Wirkung von NPY. Der gestrichelte Pfeil kennzeichnet Zwischenschritte. Die vom Müllerzellsomata wegzeigenden Pfeile stellen das Schwellen der Müllerzellsomata dar. ?: unbekannter Teil des Signalweges.



Die hemmende Wirkung des  $Y_1$ -Rezeptoragonisten in einer Konzentration von 10 nM ist vergleichbar mit der hemmenden Wirkung von NPY in 10 nM auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium. Bei den  $Y_2$ - und  $Y_5$ -Rezeptoragonisten konnten keine signifikanten hemmenden Wirkungen auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium beobachtet werden. Des Weiteren konnten die Wirkungen von NPY und des  $Y_1$ -Rezeptoragonisten durch BIBP3226 verhindert werden. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die hemmende Wirkung von NPY auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen in hypotonem Medium durch eine Aktivierung des  $Y_1$ -Rezeptorsubtypen vermittelt wird (Abb. 14).

Allerdings muss berücksichtigt werden, dass eine Beteiligung von Rezeptorsubtypen, die nicht im Rahmen dieser Untersuchungen getestet wurden, nicht ausgeschlossen werden kann.



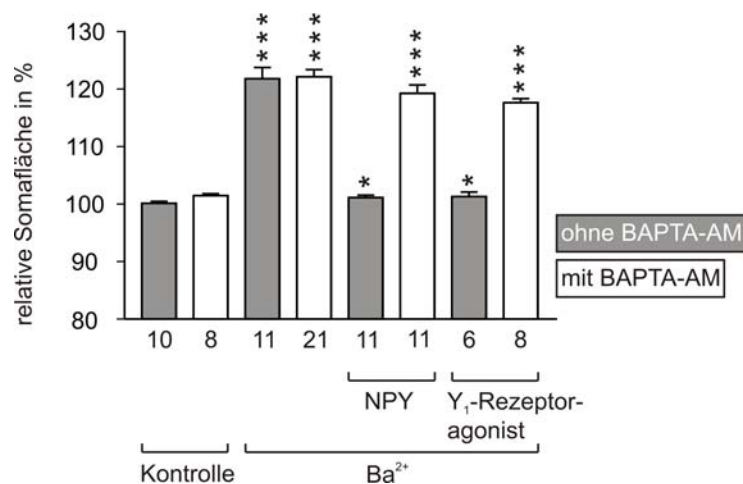
**Abb. 14**

Die hemmende Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen wird vermutlich durch eine Aktivierung des  $Y_1$ -Rezeptors ( $Y_1R$ ) vermittelt. Sowohl NPY selbst als auch ein selektiver  $Y_1$ -Agonist verhindern die Schwellung von Müllerzellen. Die NPY-Rezeptoragonisten  $Y_2$  und  $Y_5$  zeigen hingegen keine Wirkung. Der  $Y_1$ -Rezeptorantagonist BIBP3226 verhindert die hemmende Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$ . Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 13, Seite 34.

#### **4.5 Untersuchung der Signaltransduktion der Wirkung von NPY**

Die Aktivierung des  $Y_1$ -Rezeptors kann zu einem Anstieg der intrazellulären Inositoltrisphosphat-( $InsP_3$ )-Konzentration, einer Mobilisation von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern (AAKERLUND et al. 1990, HERZOG et al. 1992, AMMAR

et al. 1998), zu einer Hemmung der Adenylatcyclase (AAKERLUND et al. 1990, HERZOG et al. 1992), zu einem Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit an der basolateralen Membran (AMMAR et al. 1998), einer Hemmung der cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Synthese (HERZOG et al. 1992, LARHAMMAR et al. 1992) und zu einer Aktivierung von G-Protein-gekoppelten einwärts-gerichteten  $\text{K}^+$ -Kanälen führen (SUN et al. 2001). Um zu untersuchen, ob die hemmende Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation vermittelt wird, wurden die frisch isolierten Schnitte mit dem membranpermeablen  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM [1,2-Bis(O-aminophenoxy)ethan-*N,N,N,N*-tetraessigsäure-acetoxymethylester] in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  für 45 min inkubiert (Abb. 15).



**Abb. 15**

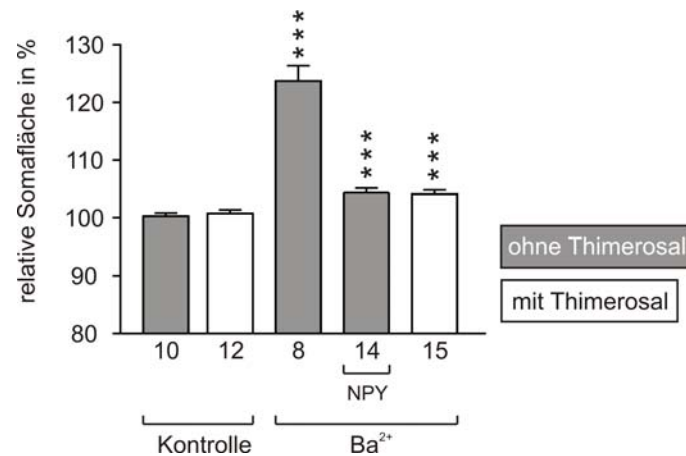
Um eine Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu verhindern, wurden die frisch isolierten Schnitte 45 min mit dem membranpermeablen  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM (100  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Die hemmenden Wirkungen von NPY (10 nM) und des  $\text{Y}_1$ -Rezeptoragonisten (10 nM) auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium wurden aufgehoben. Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 4C, Seite 25. Signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (100 %): \*\*\*,  $P < 0.001$ .

BAPTA ist in der AM-Form verestert und damit lipophil und membrangängig. Intrazellulär wird der Ester durch zelleigene Esterasen hydrolysiert. Das unveresterte BAPTA ist nicht mehr membranpermeabel, auf diese Weise erfolgt während der Inkubation mit BAPTA eine Akkumulation in der Zelle (TSIEN 1980). BAPTA verhindert eine Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration. Nach Inkubation mit BAPTA-AM kam es zur Aufhebung der Hemmung der Müllerzellschwellung durch NPY bzw. den  $Y_1$ -Rezeptoragonisten. Die Querschnittsflächen der Müllerzellsomata vergrößerten sich nach Verringerung der Osmolarität in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  (1 mM) und NPY (10 nM) auf 119 % und in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  (1 mM) und des  $Y_1$ -Rezeptoragonisten (10 nM) auf 117 %. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die hemmende Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium von einer Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) abhängig ist.

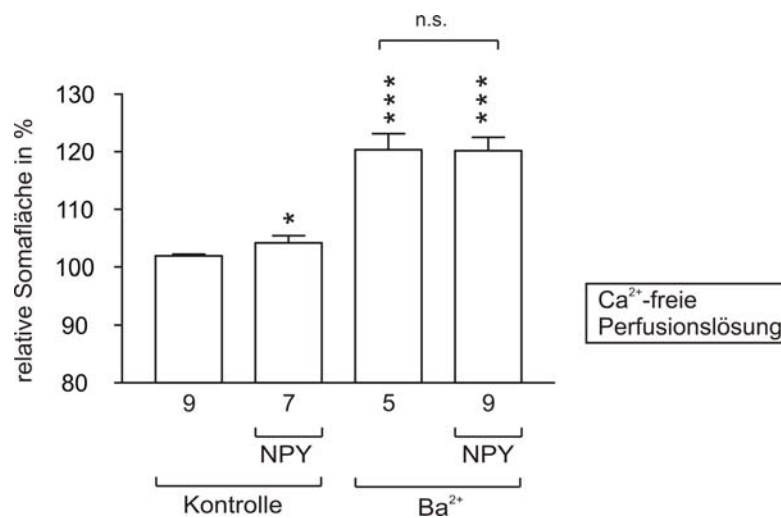
Prinzipiell gibt es zwei mögliche Ursachen für eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Einerseits kann  $Ca^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum durch  $Ca^{2+}$ -permeable Kanäle in die Zellen einströmen. Andererseits kann über intrazelluläre Botenstoffe eine Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern erfolgen. Da der  $Y_1$ -Rezeptor zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört, ist es möglich, dass es bei seiner Aktivierung über ein  $Gq\alpha$ -Protein zur Bildung von  $InsP_3$  und nachfolgender  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung kommt.

Nach SWANN (1991) stimuliert Thimerosal (Na-Ethylmercuritthiosalicylat) intrazelluläre Inositol-(1,4,5)-trisphosphat ( $InsP_3$ )-Rezeptoren und führt zu einer intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Freisetzung. Um die obige Hypothese zu überprüfen, wurde Thimerosal (10  $\mu$ M) an Stelle von NPY in die hypotone Perfusionslösung gegeben (Abb. 16, Seite 38). Die Querschnittsflächen der Müllerzellsomata nahmen nach Verringerung der Osmolarität in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  und Thimerosal kaum zu (102 %).

Nach GIMPL et al. (1993) führt NPY in kultivierten Müllerzellen zu einer Depolarisation der Plasmamembran und zu einem Einstrom von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  in die Zellen. Um zu untersuchen, ob der Einfluss des NPY auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellen in hypotonem Medium zusätzlich über einen transmembranösen  $Ca^{2+}$ -Influx aus dem Extrazellulärraum in die Zellen getragen wird, wurde die Wirksamkeit von NPY (10 nM) in einer  $Ca^{2+}$ -freien Perfusionslösung getestet (Abb. 17, Seite 38).

**Abb. 16**

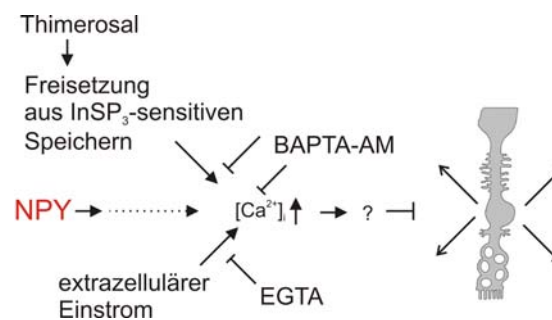
Die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern durch Thimerosal hat ebenso wie NPY eine hemmende Wirkung auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium. Die Stimulation des intrazellulären  $\text{InsP}_3$ -Rezeptors mit Thimerosal ( $10 \mu\text{M}$ ) führt zu einer Hemmung des Schwellens der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $\text{Ba}^{2+}$  ( $1 \text{ mM}$ ). Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 4C, Seite 25. Signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (100 %): \*\*\*.

**Abb. 17**

Die hemmende Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium ist von einem Einstrom von extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen abhängig. In  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium konnte die hemmende Wirkung von NPY ( $10 \text{ nM}$ ) auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $\text{Ba}^{2+}$  ( $1 \text{ mM}$ ) nicht beobachtet werden. Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 4, Seite 25. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle (100 %): \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Diese enthielt den  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator Ethylenglykolbis( $\beta$ -aminoethylether)- $N,N,N',N'$ -tetraessigsäure (EGTA). Das Fehlen von  $\text{Ca}^{2+}$  in der Perfusionslösung führte nach der Verringerung der Osmolarität zu einer Größenzunahme der Müllerzellsomatafläche in Anwesenheit von  $\text{Ba}^{2+}$  und NPY auf 120 %. Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Perfusionslösung verhinderte also die Wirkung von NPY in den durchgeführten Versuchen.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass zum Einen eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und zum Anderen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum in die Zellen für die hemmende Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $\text{Ba}^{2+}$  notwendig ist (Abb. 18).

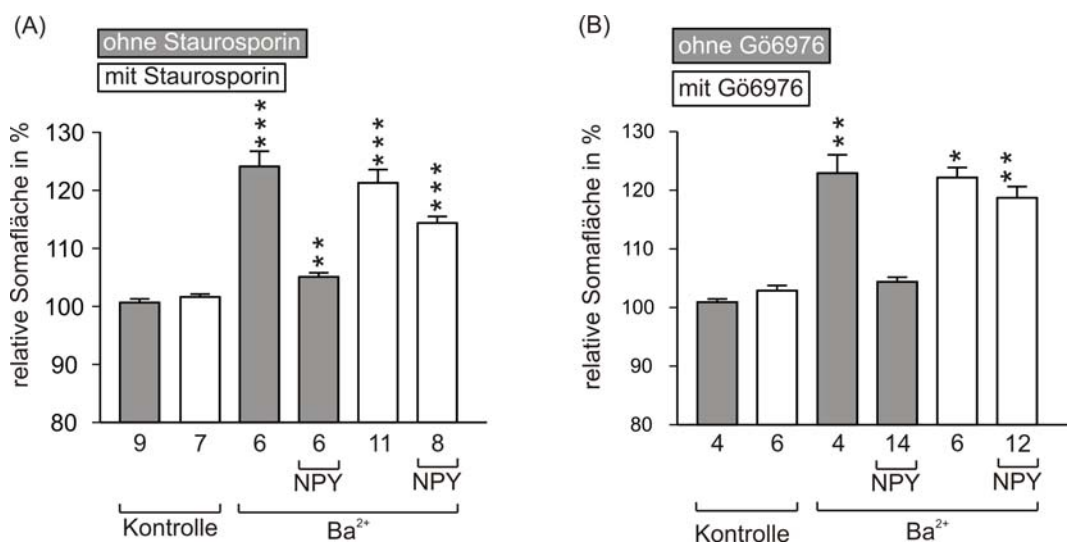


### Abb. 18

Für die hemmende Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $\text{Ba}^{2+}$  ist ein Anstieg der intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  notwendig. BAPTA und EGTA verhindern, Thimerosal stimuliert den Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Fazit daraus: Es ist sowohl ein Einstrom von extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  wie auch eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern notwendig. Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 13, Seite 34.

Die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ist ein intrazelluläres Signal, das zahlreiche Signalwege beeinflusst.  $\text{Ca}^{2+}$  besitzt bei vielen Prozessen der Zellaktivierung, z. B. der Biosynthese und Sekretion von Stoffen, dem transzellulären Transport von Ionen und der Bereitstellung von Glukose eine Signalfunktion, da es Informationen von der Membran der aktivierten Zelle auf Rezeptormoleküle innerhalb der Zelle überträgt

(LÖFFLER u. PETRIDES 2003). Nach AMMAR et al. (1998) kommt es in Folge der Aktivierung des  $Y_1$ -Rezeptors zu einer Stimulierung der Proteinkinase C (PKC). Um als mögliche Folge der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  eine Aktivierung der PKC zu untersuchen, schlossen sich Untersuchungen mit Staurosporin an. Staurosporin ist ein Proteinkinaseinhibitor mit breitem Spektrum. Die frisch isolierten Schnitte wurden mit Staurosporin (10 nM) 20 min inkubiert. Die Inkubation mit Staurosporin beeinflusste die hemmende Wirkung von NPY. Die Querschnittsflächen der Müllerzellsomata vergrößerten sich nach Inkubation mit Staurosporin in hypotonem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  auf 113 % (Abb. 19A). Dieses Ergebnis führt zu der Hypothese, dass die Wirkung von NPY über die Aktivierung einer Proteinkinase vermittelt wird. Um den PKC-Typ weiter zu bestimmen, wurde ein Proteinkinasehemmer mit engerem Spektrum getestet.



**Abb. 19**

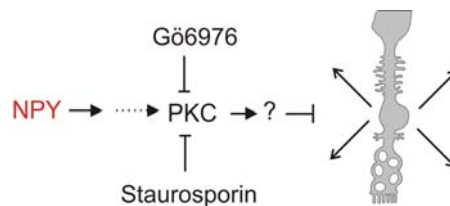
Die hemmende Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium wird über eine Aktivierung der PKC vermittelt.

(A) 20 minütigen Inkubation mit dem Proteinkinaseinhibitor Staurosporine (10 nM) verhindert die hemmende Wirkung von NPY (10 nM) auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  (1 mM).

(B) 20 minütigen Inkubation mit dem Inhibitor der Proteinkinase C Gö6976 (1  $\mu$ M) verhindert die hemmende Wirkung von NPY (10 nM) auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  (1 mM).

Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 4C, Seite 25. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle (100 %): \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Gö6976 {3-[1-(3-Dimethylaminopropyl)-5-methoxy-1*H*-indol-3-yl]-4-(1*H*-indol-3-yl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion} hemmt die Proteinkinase C. Die frisch isolierten Retinaschnitte wurden dazu in Gö6976 (1  $\mu$ M) 20 min inkubiert (Abb. 19B). Ebenso wie die Inkubation mit Staurosporin verhinderte auch die Inkubation mit Gö6976 die hemmende Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$ . Die Querschnittsflächen der Müllerzellsomata nahmen nach der Inkubation mit Gö6976 auf 119 % zu.

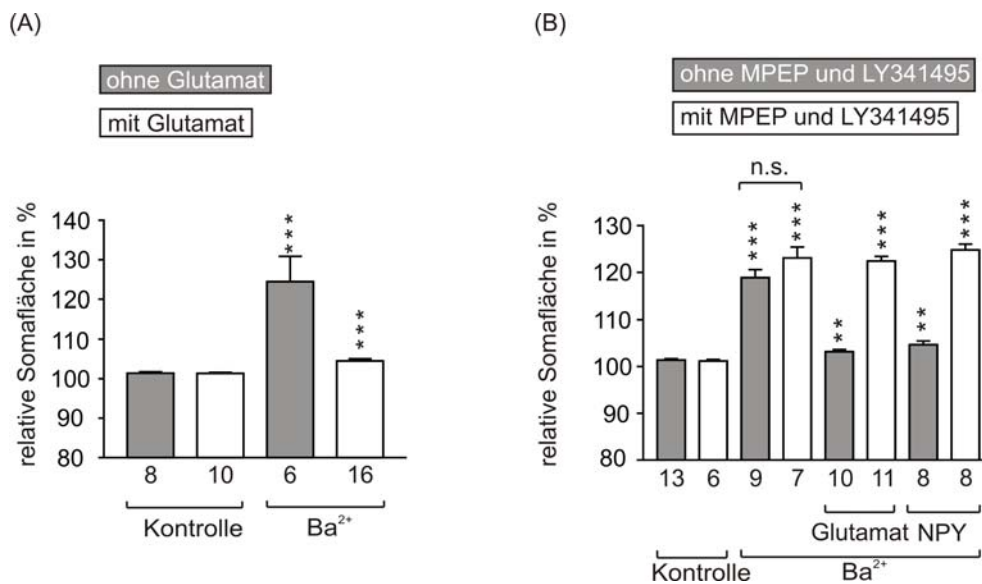


### Abb. 20

Die PKC-Inhibitoren Staurosporin und Gö6976 verhindern die hemmende Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium. Das deutet auf eine Beteiligung der PKC an der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium hin. Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 13, Seite 34.

Nachfolgend sollte nun untersucht werden, welche Folgen die Aktivierung der PKC haben könnte.

In der neurosensorischen Retina stimuliert NPY die  $Ca^{2+}$ -abhängige Freisetzung von Neurotransmittern, wie z. B. Acetylcholin oder  $\gamma$ -Aminobutyrat (GABA; BRUUN und EHINGER 1993). Daher sollte untersucht werden, ob an der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium weitere Neurotransmitter beteiligt sind. Glutamat ist der bedeutendste exzitatorische Neurotransmitter in der Retina und dem gesamten zentralen Nervensystem (ZNS). Glutamat wurde in einer Konzentration von 1 mM gemeinsam mit der hypotonen Lösung appliziert. Die Querschnittsflächen der Müllerzellsomata nahmen nach Verringerung der Osmolarität in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  und Glutamat kaum zu (102 %, Abb. 21A).

**Abb. 21**

Glutamat ist an der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von Ba<sup>2+</sup> beteiligt.

(A) Hemmende Wirkung von Glutamat (1 mM) auf die Vergrößerung der Querschnittsflächen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von Ba<sup>2+</sup> (1 mM).

(B) Die spezifischen Glutamatrezeptorantagonisten MPEP (50 µM) und LY341495 (100 µM) in der Perfusionslösung verhindern die hemmenden Wirkungen von Glutamat (1 mM) und auch von NPY (10 nM) auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von Ba<sup>2+</sup>.

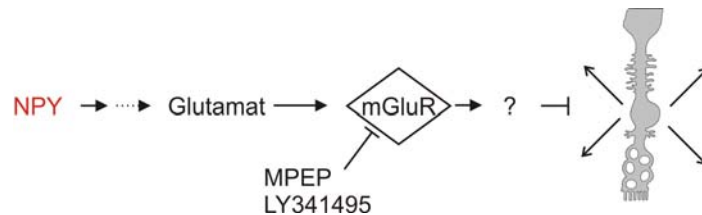
Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 4C, Seite 25. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle (100 %): \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

Glutamat scheint also, genauso wie NPY oder Dopamin (PANNICKE et al. 2004) die Schwellung der Müllerzellsomata zu verhindern. Im Anschluß sollte untersucht werden, durch welche Glutamatrezeptortypen die beschriebene Wirkung von Glutamat vermittelt wird. Dazu wurden der selektive Antagonist der metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs) 2 und 3 LY341495 (100 µM) sowie der selektive Antagonist des mGluR 5 6-Methyl-2-(phenylethynyl)pyridin (MPEP, 50 µM) getestet (GASPARINI et al. 1999, SALT et al. 1999). Die Müllerzellsomata schwollen nach Verringerung der Osmolarität in Anwesenheit von Ba<sup>2+</sup>, Glutamat und der beiden Glutamatrezeptorantagonisten deutlich an (Abb. 21B). Die verwendeten mGluR-Antagonisten konnten die Wirkung von Glutamat auf die Müllerzellschwellung also



aufheben. Die Schwellung der Müllerzellen wurde unter dem Einfluss von LY341495 und MPEP noch verstärkt. Die Querschnitte der Müllerzellsomata vergrößerten sich in hypotoner Lösung in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  auf 119 %, bei zusätzlicher Applikation der mGluR-Antagonisten auf 122 % ( $P > 0.05$ ).

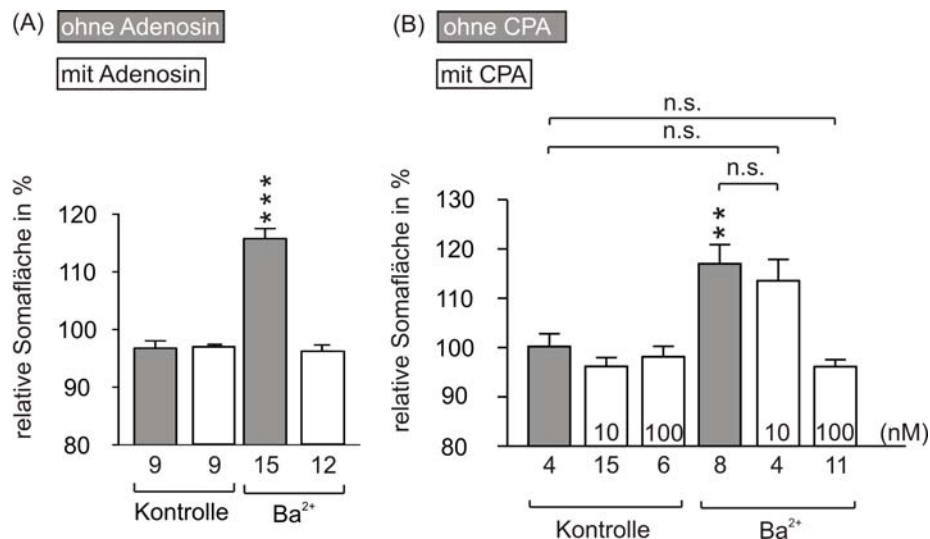
Aus diesen Ergebnissen ergeben sich folgende Möglichkeiten. Einerseits könnte die Hemmung der Müllerzellschwellung einen weiteren eigenständigen Signalweg repräsentieren. Andererseits könnte retinales Glutamat durch NPY freigesetzt werden. Somit wäre die Aktivierung von mGluRs ein Bestandteil der durch NPY-aktivierten Signalkaskade. Um dieses zu untersuchen, wurde die Wirkung von NPY in Anwesenheit der mGluR-Antagonisten überprüft. Es zeigte sich, dass der Effekt von NPY durch LY341495 und MPEP verhindert werden konnte. Die Zellsomata der Müllerzellen vergrößerten sich nach Verringerung der Osmolarität in der Anwesenheit von  $Ba^{2+}$ , NPY (10 nM) und der beiden mGluR-Antagonisten auf 125%. Aufgrund dieser Datenlage wird von einer Beteiligung von Glutamat und einer Aktivierung von mGluRs an der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen in hypotonem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  ausgegangen (Abb. 22).



### Abb. 22

Glutamat hemmt wie NPY das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$ . Die Antagonisten von metabotropen Glutamatrezeptoren verhindern die hemmende Wirkung von Glutamat sowie den Effekt von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen der gesunden Netzhaut in hypoosmolarem Medium. Die Zellsomata schwellen. Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 13, Seite 25.

An die Untersuchungen mit Glutamat anschließend wurde die mögliche Beteiligung von Adenosin an der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium unter der Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  untersucht (Abb. 23).

**Abb. 23**

Adenosin ist an der Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in der Anwesenheit von Ba<sup>2+</sup> beteiligt.

(A) Hemmende Wirkung von Adenosin (10 µM) auf das Schwellen der Querschnittsflächen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von Ba<sup>2+</sup> (1 mM).

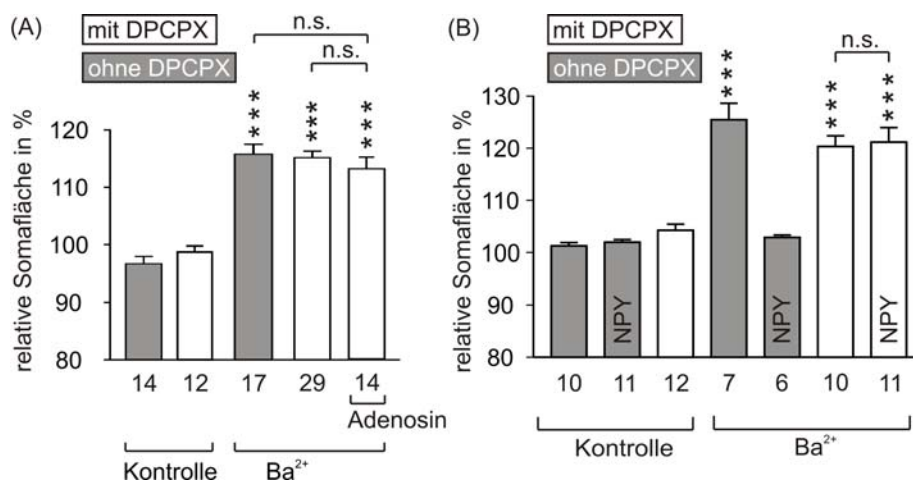
(B) Auch die Anwesenheit des spezifischen A<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten CPA (10 µM/100 µM) in der Perfusionslösung verhinderte das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von Ba<sup>2+</sup> (1 mM). CPA verhinderte in einer Konzentration von 100 µM vollständig die Müllerzellschwellung.

Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 4C, Seite 25. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle (100 %): \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

Adenosin ist Produkt des ATP-Stoffwechsels und ein ubiquitär vorkommender interzellulärer Botenstoff (LÖFFLER u. PETRIDES 2003). Bei Schädigungen der Netzhaut verändert sich die Konzentration des retinalen Adenosins stetig (LI et al. 1999), außerdem wird Adenosin in der Retina nach einer Ischämie rasch freigesetzt (ROTH et al. 1997) und besitzt sowohl gliale und neurale (SCHUBERT et al. 1997) als auch vasodilatatorische Wirkung (ROTH 1995).

Adenosin wurde in einer Konzentration von 10 µM zusammen mit der hypotonen Perfusionslösung appliziert. Die Querschnittsflächen der Müllerzellsomata nahmen in hypotonem Medium in Anwesenheit von Ba<sup>2+</sup> (1 mM) und Adenosin nicht zu. Auch Adenosin scheint also die Schwellung von Müllerzellen unter den getesteten Bedingungen zu verhindern. Im Folgenden wurde untersucht, welcher Rezeptortyp

durch Adenosin aktiviert wird und für die Hemmung der Müllerzellschwellung verantwortlich ist. Dazu wurde der selektive  $A_1$ -Rezeptoragonist  $N^6$ -Cyclopentyladenosin (CPA, 10  $\mu$ M und 100  $\mu$ M; WILLIAMS et al. 1986) getestet, der gleichzeitig mit der hypotonen Perfusionslösung appliziert wurde (Abb. 23B). Bei Verwendung von 10  $\mu$ M CPA stieg die Querschnittsfläche der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  deutlich auf 113 % an, während bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M CPA kein Schwellen der Müllerzellen beobachtet werden konnte. Die potentielle Aktivierung von Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren ( $A_1R$ ) durch Adenosin wurde durch die Verwendung des selektiven  $A_1R$ -Antagonisten 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin (DPCPX) überprüft (LEE u. REDDINGTON 1986). DPCPX (100 nM) und Adenosin (10  $\mu$ M) wurden simultan mit der hypotonen Perfusionslösung appliziert. Die Müllerzellen schwollen nach Verringerung der Osmolarität in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$ , Adenosin und DPCPX deutlich an (114 %, Abb. 24A).



**Abb. 24**

Der selektive  $A_1$ -Rezeptorantagonist 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin (DPCPX) verhindert die hemmende Wirkung von Adenosin und von NPY.

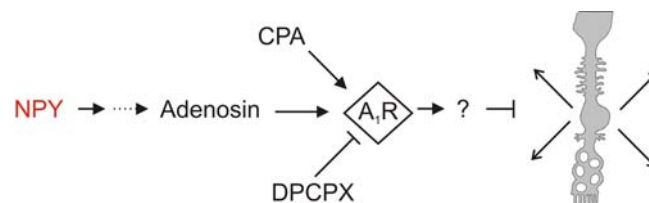
(A) Die Anwesenheit von DPCPX (100 nM) verhindert die hemmende Wirkung von Adenosin auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  (1 mM).

(B) Die Anwesenheit von DPCPX (100 nM) verhindert die hemmende Wirkung von NPY (10 nM) auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  (1 mM).

Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 4C, Seite 25. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle (100 %): \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Weiterhin wurde eine mögliche Beteiligung von Adenosin an der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  untersucht. Dazu wurde überprüft, ob der  $A_1R$ -Antagonist auch den Effekt von NPY auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellen aufheben kann. Unter dem Einfluss von DPCPX konnte NPY (10 nM) das Schwellen der Müllerzellen nach Verringerung der Osmolarität in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  nicht verhindern (Abb. 24 B).

Aufgrund dieser Datenlage wird von einer Beteiligung von Adenosin und einer Aktivierung von  $A_1R$  im Rahmen der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen in hypotonem Medium in den hier durchgeführten Versuchen ausgegangen (Abb. 25).

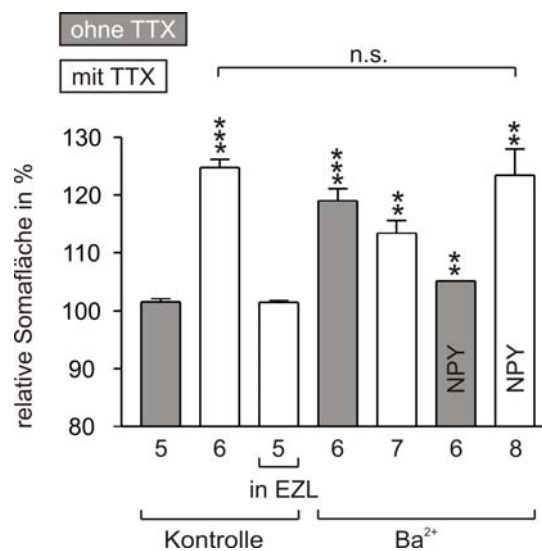


### Abb. 25

Adenosin und der selektive  $A_1$ -Agonist CPA hemmen das Schwellen der Müllerzellen der gesunden Netzhaut in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$ . Der selektive  $A_1$ -Antagonist DPCPX verhindert die hemmende Wirkung von Adenosin auf das Schwellen der Müllerzellen der gesunden Netzhaut in hypoosmolarem Medium. Außerdem hebt DPCPX die hemmende Wirkung von NPY auf. Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 13, Seite 34.

Es konnte festgestellt werden, dass NPY  $Y_1$ -Rezeptoren der Netzhaut aktiviert. Daraufhin kommt es zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ , die sowohl durch eine Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus  $InSP_3$ -sensitiven Speichern als auch durch einen Einstrom von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  verursacht wird. Desweiteren wird die PKC aktiviert. Außerdem wird das Signal von NPY über die Aktivierung von mGluR sowie von  $A_1$ -Adenosinrezeptoren vermittelt. Dadurch wird letztendlich die Schwellung der Müllerzellen in hypoosmolarer Lösung bei Blockierung der glialen  $K^+$ -Kanäle verhindert.

Die Ergebnisse lassen jedoch keinen Rückschluss zu, ob die beteiligten Rezeptoren neuronal oder glial lokalisiert sind. Darum wurde der selektive Blocker der neuronalen, spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanäle Tetrodotoxin (TTX) getestet. Sollte dieser die Wirkung von NPY, Glutamat oder Adenosin verhindern, so wäre dies ein Hinweis auf eine neuronale Lokalisation des entsprechenden Rezeptors. TTX ( $1 \mu\text{M}$ ) wurde mit der hypotonen Lösung appliziert. Unter diesen Bedingungen führte die Applikation von NPY zu einer Schwellung der Müllerzellen nach Verringerung der Osmolarität in Anwesenheit von  $\text{Ba}^{2+}$  (Abb. 26).

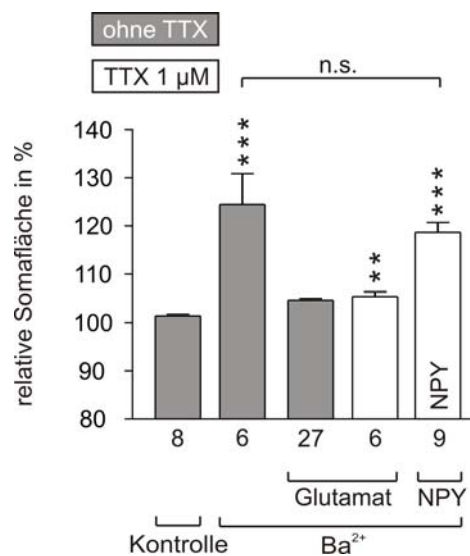


**Abb. 26**

Die Anwesenheit von TTX ( $1 \mu\text{M}$ ) in den Perfusionslösungen verhindert die hemmende Wirkung von NPY ( $10 \text{ nM}$ ) auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $\text{Ba}^{2+}$  ( $1 \text{ mM}$ ). Allerdings führt TTX bereits ohne Anwesenheit von  $\text{Ba}^{2+}$  in hypotoner Lösung zu einer Müllerzellschwellung. Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 1. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle (100 %): \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass an der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellen von Müllerzellen in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $\text{Ba}^{2+}$  spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ -Kanäle beteiligt sind. Dies ist damit ein Hinweis, dass die  $\text{Y}_1$ -Rezeptoren wahrscheinlich auf Neuronen der Retina lokalisiert sind.

Allerdings verursacht TTX an sich (ohne Anwesenheit von  $Ba^{2+}$ ) in hypotoner Lösung bereits eine Zunahme der Querschnittsfläche der Müllerzellsomata auf 125 %. Dieser Wert ist mit der  $Ba^{2+}$ -induzierten Müllerzellschwellung in hypoosmolarem Medium vergleichbar. Nachfolgend wurde die Wirkung von Glutamat auf das Schwellen der Müllerzellsomata bei Blockierung der neuronalen  $Na^+$ -Kanäle durch TTX getestet. Hierfür wurden Glutamat (1 mM) und TTX (1  $\mu$ M) gleichzeitig mit der hypotonen Lösung appliziert (Abb. 27).



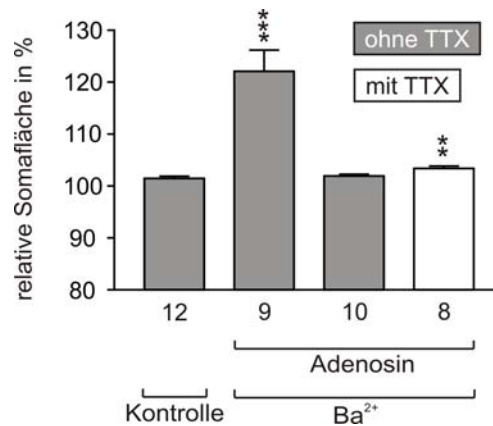
**Abb. 27**

TTX hat keinen Einfluss auf die hemmende Wirkung von Glutamat. Trotz der Anwesenheit von TTX (1  $\mu$ M) in den Perfusionslösungen, kann Glutamat (1 mM) im Gegensatz zu NPY (10 nM) das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  (1 mM) verhindern. Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 1. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle (100 %): \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Trotz der Gegenwart von TTX nahm die Fläche der Zellsomata der Müllerzellen nach Verringerung der Osmolarität in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  und Glutamat lediglich auf 105 % zu. Zur Wirkung von Glutamat ohne TTX bestand keinerlei Unterschied.

Im Anschluss sollte untersucht werden, ob die Wirkung von Adenosin durch TTX verhindert werden kann (Abb. 28). TTX (1  $\mu$ M) und Adenosin (10  $\mu$ M) wurden mit der hypotonen Perfusionslösung verabreicht. Trotz der Gegenwart von TTX nahmen die

Zellsomata der Müllerzellen der gesunden Netzhaut nach Verringerung der Osmolarität in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  und Adenosin kaum zu, der Effekt von Adenosin auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellen blieb annähernd erhalten. Allerdings war die Schwellung unter dem Einfluss von Adenosin und TTX signifikant stärker ausgeprägt.



**Abb. 28**

Tetrodotoxin (TTX) hat keinen Einfluss auf die hemmende Wirkung von Adenosin. Trotz der Anwesenheit von TTX (1  $\mu$ M) in den Perfusionslösungen kann Adenosin (10  $\mu$ M) das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  (1 mM) verhindern. Die Abbildungsform entspricht der in Abb. 4C, Seite 25. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle (100 %): \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Aufgrund der Datenlage kann davon ausgegangen werden, dass der  $Y_1$ -Rezeptor neuronal und der mGluR bzw. der  $A_1R$  glial lokalisiert sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass die hemmende Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium über eine Stimulation von neuronalen  $Y_1$ -Rezeptoren, nachfolgendem Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Ionenkonzentration und Aktivierung der PKC vermittelt wird. Dies zieht eine Freisetzung von Glutamat nach sich, stimuliert gliale mGluRs und führt zur Anregung von  $A_1$ -Adenosin-Rezeptoren. Auf welche Weise die Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren zu einer Hemmung der hypotonen Zellschwellung beiträgt ist unklar und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

## **5 Diskussion**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Regulation des Schwellungsverhaltens retinaler Gliazellen durch neuroaktive Substanzen zu untersuchen. Dazu wurde untersucht, ob Neuropeptid Y (NPY) Einfluß auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellen der Ratte in hypoosmolarem Medium hat. PANNICKE et al. 2004 zeigten, dass die Müllerzellen der postischämischen Retina der Ratte in hypotonem Medium schwellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass NPY die Müllerzellschwellung in hypotonem Medium in der postischämischen Netzhaut verhindert. Die pharmakologische Untersuchung des durch NPY aktivierten Signalweges erfolgte an gesunden Netzhäuten. Hier führt ein hypotones Medium bei gleichzeitiger Blockade der Kaliumkanäle ( $K^+$ -Kanäle) durch  $Ba^{2+}$  zu einer Gliazellschwellung, die mit derjenigen in der postischämischen Retina vergleichbar ist (PANNICKE et al. 2004).

Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass NPY einen neuronalen  $Y_1$ -Rezeptor aktiviert, was zu einer Mobilisierung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern und zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führt. Weiterhin scheint eine von neuronaler Aktivität und  $Ca^{2+}$  abhängige Freisetzung von Glutamat sowie die Aktivierung von (glialen) metabotropen Glutamatrezeptoren (mGlu) zu erfolgen. Letztendlich kommt es vermutlich zur Aktivierung des  $A_1$ -Adenosin-Rezeptors ( $A_1R$ ).

### **5.1 Vitale Anfärbung der Müllerzellen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich Mitotracker Orange zur selektiven Anfärbung der Müllerzellen verwendet. Dieser Vitalfarbstoff ist membrangängig und gelangt passiv in die Zellen (MOLECULAR PROBES, Produktinformation).

Dass die Inkubation von frisch isolierter Retina mit Vitalfarbstoffen, wie z. B. Mitotracker Orange zu einer selektiven Färbung der Müllerzellen führt, wobei sowohl die neuronalen Zellen als auch die Zellen der Mikro- und Astroglia nicht angefärbt werden, ist hinlänglich bekannt (UCKERMANN et al. 2004). Jedoch ist bis heute unklar, worauf die selektive Anfärbbarkeit der Müllerzellen durch die Vitalfarbstoffe basiert. Diskutiert wird, dass die Aufnahme der Farbstoffe durch bestimmte Membraneigenschaften der Müllerzellen begünstigt wird oder aber die Müllerzellen Zellbestandteile besitzen, die die Vitalfarbstoffe binden (UCKERMANN et al. 2004).

Ein weiterer großer Vorteil der Vitalfarbstoffe ist neben der selektiven Anfärbung der Müllerzellen, dass das zu untersuchende Gewebe nicht fixiert werden muß und damit



einer morphologischen Analyse besser zugänglich ist (UCKERMANN et al. 2004). Der Vorteil gegenüber fixierten Geweben der Retina liegt darin, dass Fixierungsartefakte die Gegebenheiten so verändern können, dass die damit erzielten Ergebnisse nicht unbedingt mit der Situation *in situ* vergleichbar sind (REICHENBACH et al. 1991).

Zusammenfassend konnten die Zellsomata der Müllerzellen im Rahmen der Experimente aufgrund ihrer Lage in der inneren Körnerschicht (INL) der Retina, ihrer spezifischen Anfärbung und ihrer charakteristischen Form von den Bipolarzellen bzw. den übrigen Zellen der Retina abgegrenzt werden.

## **5.2 Y<sub>1</sub>-Rezeptorabhängigkeit der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellen**

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass an der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen der postischämischen und der gesunden Retina in Anwesenheit von Ba<sup>2+</sup> in hypotoner Lösung der Y<sub>1</sub>-Rezeptor beteiligt ist.

Funktionell ist der Y<sub>1</sub>-Rezeptor bereits in der Ratte nachgewiesen worden (EVA et al. 1990, YAN et al. 1996, BURKHOFF et al. 1998, PARKER et al. 1998, VOISIN et al. 2000). Jedoch muß bedacht werden, dass in der gesunden neurosensorischen Retina bis jetzt nur eine Y<sub>1</sub>-Immunoreaktivität für Neuronen und nicht für Gliazellen nachgewiesen werden konnte (D'ANGELO et al. 2002). Das würde bedeuten, dass die Y<sub>1</sub>-Rezeptoren entweder nicht auf den Müllerzellen lokalisiert sind oder nur unter bestimmten Umständen exprimiert werden. Tatsächlich ist bekannt, dass Gliazellen der erkrankten Retina Y<sub>1</sub>-Rezeptoren exprimieren (CANTÓ SOLER et al. 2002).

Um den Sachverhalt, ob die Y<sub>1</sub>-Rezeptoren überhaupt glial lokalisiert sind, näher zu untersuchen, schlossen sich Untersuchungen mit dem Na<sup>+</sup>-Kanalblocker Tetrodotoxin an. Die hemmende Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellsomata konnte in Anwesenheit von Tetrodotoxin nicht nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen führten zu dem Schluß, dass der an der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellsomata beteiligte Y<sub>1</sub>-Rezeptor nicht auf den Müllerzellen, sondern neuronal lokalisiert ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NPY einen nicht glialen Y<sub>1</sub>-Rezeptor stimuliert, der über eine bis jetzt unbekannt Signalkaskade das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium verhindert. Jedoch muß berücksichtigt

werden, dass NPY-Rezeptoren, die nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden sind, potentiell an der Signalkaskade beteiligt sein könnten. Da aber nur  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$  und  $Y_5$  funktionell im Gewebe der Ratte auftreten (EVA et al. 1990, YAN et al. 1996, BURKHOFF et al. 1998, Parker et al. 1998, VOISIN et al. 2000) und NPY mit hoher Affinität an die  $Y_1$ -,  $Y_2$ - und  $Y_5$ -Rezeptorsubtypen bindet (MICHEL et al. 1998, CERDÁ-REVERTER u. LARHAMMAR 2000), wurden nur  $Y_1$ -,  $Y_2$ - und  $Y_5$ -Rezeptoren getestet.

Unabhängig davon konnte bei den Untersuchungen mit Tetrodotoxin beobachtet werden, dass auch die alleinige Anwesenheit von Tetrodotoxin unter Kontrollbedingungen zum Schwellen der Müllerzellsomata führte. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass Neuronen, die durch Verringerung des osmolaren Milieus aktiviert werden, Faktoren abgeben, die das Schwellen der Gliazellen hemmen.

### **5.3 Zelluläre Signale, die an der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium beteiligt sind**

In den hier vorliegenden Untersuchungen kommt es nach der Aktivierung des  $Y_1$ -Rezeptors zu einer Mobilisierung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern, einem extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Einstrom und zur Aktivierung der PKC. Des Weiteren erfolgt eine von neuronaler Aktivität und  $Ca^{2+}$  abhängige Freisetzung von Glutamat und die Aktivierung von mGlu. Letztendlich kommt es zur Aktivierung des  $A_1R$ .

Der bis zur Aktivierung der PKC untersuchte Signalweg entspricht allgemein dem der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die Zugehörigkeit des  $Y_1$ -Rezeptors zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist bekannt (BECK-SICKINGER 1996, MICHEL et al. 1998) und geht konform mit der in diesem Rahmen untersuchten Signalkaskade.

Des Weiteren konnte bei den hier durchgeführten Untersuchungen eine Erhöhung der  $[InSP_3]_i$  festgestellt werden. Diese Beobachtungen entsprechen den Betrachtungen von AMMAR et al. (1998): NPY aktiviert G-Protein-gekoppelte  $Y_1$ -Rezeptoren, die wiederum eine Signalkaskade über die Erhöhung der  $[InSP_3]_i$  in Gang setzen. In Folge der weiteren Untersuchungen konnte eine Aktivierung der PKC und ein Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration beobachtet werden. Bereits PERNEY und MILLER (1989) zeigten eine  $InSP_3$ -abhängige Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration nach Aktivierung eines NPY-Rezeptors, jedoch wurde diese Signalkaskade bisher nur an Zellen des humanen RPE und nicht an

Müllerzellen beobachtet (AMMAR et al. 1998). Dieses weist auf die obige These, dass der  $Y_1$ -Rezeptor neuronal und nicht glial lokalisiert ist, hin.

Außerdem kommt es zu einem extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Einstrom, wobei diese Beobachtung mit der Untersuchung von GIMPL et al. 1993 übereinstimmt, in welcher an kultivierten Müllerzellen gezeigt werden konnte, dass NPY einen Einstrom von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  in die Zellen auslösen kann. Jedoch konnten bis heute derartige  $Ca^{2+}$ -Reaktionen bei dem hier untersuchten Signalweg fluormetrisch nicht nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung O. Uckermann). Möglich wäre, dass diese  $Ca^{2+}$ -Ströme zu gering bzw. am Soma oder Fuß der Müllerzellen lokalisiert sind, sodass sie fluormetrisch nicht zugänglich sind.

Im Rahmen der pharmakologischen Untersuchungen zur hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellen konnte bis hier festgestellt werden, dass NPY  $Y_1$ -Rezeptoren der Netzhaut aktiviert. Infolgedessen kommt es zu einer Erhöhung der  $[Ca]_i$ , die sowohl durch eine Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern als auch durch einen extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Einstrom verursacht wird und zur Aktivierung einer PKC führt.

Die Untersuchung der Signalkaskade wurde mit Glutamat fortgeführt, da Glutamat zum Einen einer der bedeutendsten exzitatorischen Neurotransmitter in der Retina und dem gesamten zentralen Nervensystem (ZNS) ist und zum Anderen an Synapsen freigesetzt wird und neurogliale Signale vermittelt (PORTER u. McCARTHY 1996, PASTI et al. 1997, KANG et al. 1998, ZONTA et al. 2003). Außerdem ist bekannt, dass NPY die  $Ca^{2+}$ -abhängige Abgabe von weiteren Neurotransmittern wie Acetylcholin oder GABA in der Retina stimulieren kann (BRUUN et al. 1991, BRUUN u. EHINGER 1993). Im Rahmen der Untersuchungen mit Glutamat zeigte sich, dass Glutamat das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium verhindern kann. Unter der Annahme, dass Glutamat an der Signalkaskade beteiligt ist, ergibt sich folgende mögliche Signalkaskade: Glutamat wird in Anwesenheit von  $Ca^{2+}$  (POTASHNER 1976, HAMBERGER et al. 1978), nach Exocytose von synaptischen Vesikeln (VAN VLIET et al. 1989, MUNDIGL u. De CAMILLI 1994), nach Depolarisation der Plasmamembran (DONNERER 1991) und unter Beteiligung von unterschiedlichen  $Ca^{2+}$ -Kanälen (TERRIAN et al. 1990) freigesetzt. In den sich anschließenden Untersuchungen zeigte sich, dass Glutamat gliale mGluR aktiviert. In der Retina der Ratte sind bereits sieben mGluR nachgewiesen worden (HARTVEIT et al. 1995) und an den Müllerzellen des

Tigersalamanders ist bereits die Expression von mGluRs gezeigt worden (KEIRSTEAD u. MILLER 1997).

Wie in Abb. 22, Seite 43 gezeigt, führt die Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  und der mGluR-Antagonisten in hypotoner Lösung zusätzlich zu einer Vergrößerung der Müllerzellsomata bzw. induzieren die mGluR-Antagonisten eine Schwellung der Müllerzellsomata unter hypotonen Bedingungen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Verringerung der Osmolarität eine Zellpopulation der Retina dazu stimuliert, Glutamat abzugeben, das dann als Signalmolekül an der hemmenden Wirkung auf das Schwellen der Müllerzellsomata beteiligt ist.

Aufgrund dieser Datenlage ergeben sich die Möglichkeiten, dass die Hemmung der Müllerzellschwellung durch Glutamat ein eigenständiger Signalweg ist oder dass NPY retinales Glutamat freisetzt. Letzteres würde bedeuten, dass die Aktivierung der mGluR ein Bestandteil der durch NPY aktivierten Signalkaskade wäre. Um dies zu untersuchen, wurde die hemmende Wirkung von NPY in Anwesenheit der mGluR-Antagonisten untersucht. Es zeigte sich, dass die mGluR-Antagonisten die Wirkung von NPY aufheben. Dies zeigt, dass die Aktivierung der mGluR ein Bestandteil der durch NPY aktivierten Signalkaskade ist.

#### **5.4 Aktivierung von Adenosin $A_1$ -Rezeptoren**

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen zeigte sich, dass Adenosin das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium in der Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  ebenso wie NPY und Glutamat verhindert und dass nachfolgend die Wirkung von Adenosin über einen glialen, purinergen  $A_1$ -Rezeptor vermittelt wird. Zusammenfassend bedeutet das, dass die hemmende Wirkung von NPY und Glutamat über eine Aktivierung von purinergen Rezeptoren nach Stimulierung von glialen mGluRs vermittelt wird. Es ist bereits bekannt, dass nach Stimulierung von purinergen Rezeptoren an Gliazellen in der Retina der Ratte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Signale hervorgerufen werden können (NEWMAN u. ZAHS 1997, NEWMAN 2001).

Die hier untersuchte Signalkaskade könnte sich möglicherweise wie folgt fortsetzen: Glutamat ruft in Gliazellen intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Signale hervor (PORTER u. MCARTHY 1996, PASTI et al. 1997, KANG et al. 1998, ZONTA et al. 2003). Diese  $Ca^{2+}$ -Signale führen wiederum zu einer autokrinen Freisetzung von ATP (WANG et al. 2000). Im Extrazellulärraum wird ATP in Adenosin umgewandelt, das dann weiteren Einfluss auf die neuronale Aktivität hat (NEWMAN 2003). LIU und BENNETT (2003) konnten

bereits zeigen, dass es an Gliazellen zu glutamatvermittelter ATP-Sekretion kommen kann. Ungeachtet dessen ist Adenosin offensichtlich ein wichtiger Transmitter der Retina, besonders während hypoxisch-ischämischer Veränderungen. Bestärkt wird diese These durch die Tatsache, dass Adenosin nach ischämischen Reperusionsverletzungen eine protektive Wirkung an der Retina entfaltet (LARSEN u. OSBORNE 1996, GHIARDI et al. 1999) und außerdem in Folge ischämischer Veränderungen an der Retina rasch freigesetzt wird (ROTH et al. 1997). Auch ist der Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor bereits in der inneren Retina lokalisiert worden (BLAZYNSKI 1990), und im ZNS konnte bereits nachgewiesen werden, dass er nach seiner Stimulierung neuroprotektive Wirkungen gegen die Folgen einer zerebralen Ischämie entfaltet (PHILLIS 1995, SCHUBERT et al. 1997, LI et al. 2000).

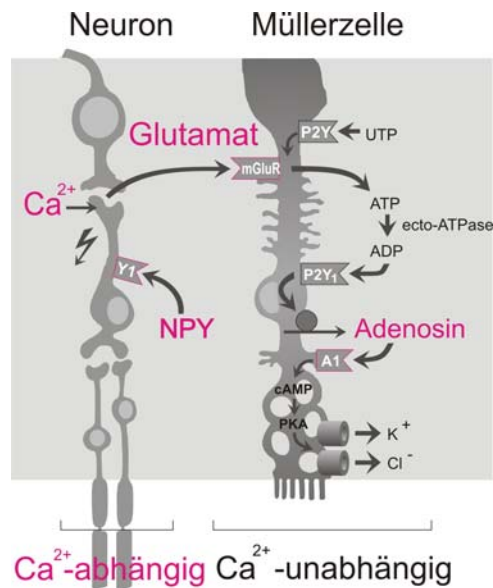
Zusammenfassend stellt sich der untersuchte Signalweg wie folgt dar: Die hemmende Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium wird letztendlich über die Stimulierung von purinergen, glialen Rezeptoren vermittelt. Dabei kommt es nach der endogenen Freisetzung von Glutamat und der Stimulierung von mGluR zur Freisetzung von Adenosin und Aktivierung von Adenosinrezeptoren.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen enden mit den Untersuchungen zu Adenosin. Jedoch ist inzwischen die nachfolgende Signalkaskade weiter aufgeklärt (Abb. 29, Seite 56; UCKERMANN et al. 2006). Nachdem Glutamat gliale mGluRs aktiviert hat, kommt es nachfolgend zu Freisetzung von ATP. ATP wird im Extrazellulärraum in ADP umgewandelt, das wiederum einen P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor stimuliert. Anschließend kommt es zu einer Freisetzung von Adenosin, das dann den A<sub>1</sub>R anregt. Infolgedessen werden die Adenylatcyclase und die Proteinkinase A aktiviert. Schlußendlich werden vermutlich Ionenkanäle geöffnet werden, und dem Ausstrom von K<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> folgt Wasser aus den Zellen.

### **5.5 Mögliche Wirkungen von Adenosin auf Zellebene**

In der gesunden Retina werden die ILM bis OPL der Retina von den Müllerzellen dehydriert (BRINGMANN et al. 2004). AQP sind entscheidend an der Regulation des Wasser- und Ionenhaushaltes beteiligt (VERKMAN 2003). Das gleichzeitige Auftreten von K<sub>ir</sub>1.4 und AQP an Membranen der Müllerzellen, die den Blutgefäßen und dem Glaskörper zugewandt sind, hat zu der Vermutung geführt, dass die

Regulation des Wasserhaushaltes in der Retina durch die Müllerzellen mit der des  $K^+$ -Haushaltes verbunden ist (NAGELHUS et al. 1999).



**Abb. 29**

Zusammenfassend stellt sich der untersuchte Signalweg wie folgt dar (rot markiert). Die hemmende Wirkung von NPY auf das Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium wird letztendlich über die Stimulierung von purinergen, glialen Rezeptoren vermittelt. Dabei kommt es nach der endogenen Freisetzung von Glutamat und der Stimulierung von mGluR zur Freisetzung von Adenosin und Aktivierung von Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren.

Am Ende des hier untersuchten Signalweges steht vermutlich das Öffnen von Ionenkanälen. Einerseits wäre möglich, dass unter hypoosmolaren Bedingungen Ionenkanäle, die keine  $K^+$ -Kanäle sind, in der Zellmembran der Müllerzellen geöffnet werden. Dies hätte zur Folge, dass osmotisch wirksame Substanzen, die Wasser mit sich ziehen, aus den Müllerzellen ausströmen können, und damit das Schwellen der Müllerzellen verhindert wird (JAKAB et al. 2002). Allerdings stände dies in Konkurrenz zu dem sinkenden extrazellulären osmotischen Druck unter hypoosmolaren Bedingungen. Jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass NPY die Ionen- und Wasserclearance der RPE erhöhen kann (AMMAR et al. 1998).

Andererseits bestände die Möglichkeit, dass Adenosin zum Schließen der AQP4 führt, was den Wassereinstrom in die Zellen verhindern würde. Eine cytotoxische

Hirnverletzung, verursacht durch eine akute Wasserintoxikation und einen ischämischen Schlaganfall, führt bei AQP4-defizienten Mäusen zu einer im Vergleich mit den Kontrollmäusen reduzierten Schwellung des Gehirngewebes und neurologischen Ausfällen (MANLEY et al. 2000). Desweiteren führt nach DA u. VERKMAN (2004) eine AQP4-Deletion bei Mäusen zu einer signifikanten Erhaltung der retinalen Funktion nach einer retinalen Ischämie.

Bereits ZELENINA et al. (2002) zeigten, dass das Neuropeptid Dopamin die Wasserleitfähigkeit von AQP4 über eine PKC-abhängige Phosphorylierung beeinflussen kann. Analog zu dem hier untersuchten Signalweg könnte Adenosin über eine PKC-abhängige Phosphorylierung (HAN et al. 1998, NAKAHAMA et al. 1999, YAMAMOTO 2001) oder Protein-Protein-Interaktionen (GUNNARSON et al. 2004) die Aktivität der AQP beeinflussen.

Diese Überlegungen zeigen einen weiteren interessanten Untersuchungsansatz für nachfolgende Arbeiten auf. Zum Einen sind mögliche Ionenkanäle, die keine K<sup>+</sup>-Kanäle sind, auf ihre Beteiligung an der hemmenden Wirkung von NPY bzw. Adenosin auf das Schwellen der Gliazellen zu überprüfen. Zum Anderen ist eine mögliche Änderung der Aktivität der AQP im Rahmen der hemmenden Wirkung von NPY auf das Schwellen der Gliazellen zu untersuchen. Allerdings gibt es bis heute keinen selektiven Antagonisten von AQP4, der eine solche Untersuchung möglich machen würde. Im Gehirn konnte nachgewiesen werden, dass AQP4 an der Auflösung von vasogenen Ödemen beteiligt ist (PAPADOPOULOS et al. 2002). Deshalb ist wohl die Betrachtung der Ionenkanäle der wahrscheinlich erfolgreichere Weg, um das Schwellen der Müllerzellsomata weiter zu untersuchen.

Nachfolgend soll ein möglicher weiterer Signalweg vorgeschlagen werden, wie er sich nach Aktivierung der PKA fortsetzen könnte. Im zentralen Nervensystem kann Arachidonsäure ein vasogenes und/oder cytotoxisches Hirnödem hervorrufen (CHAN et al. 1983) und zum Schwellen von Astrozyten führen (STAUB et al. 1994). An der Entwicklung von retinalen Ödemen sind Arachidonsäuremetaboliten wie z. B. Prostaglandine beteiligt (MIYAKE u. IBARAKI 2002) und seit kurzem ist bekannt, dass Arachidonsäure auch zum Schwellen von Müllerzellen in hypoosmolarem Medium führen kann (PANNICKE et al. 2005).

Die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) spaltet aus arachidonsäurehaltigen Membranphospholipiden Arachidonat (Eikosatetraensäure) ab (LÖFFLER u. PETRIDES 2003). Denkbar wäre nun, dass es im Rahmen der weiteren

Signalkaskade zu einer Blockierung der PLA<sub>2</sub> kommt und damit zu einer verringerten Freisetzung von Arachidonsäure aus den Zellmembranen. Dass die Hemmung der PLA<sub>2</sub> die Entwicklung eines Ödems bei einer iatrogen erzeugten Ischämie verringert, konnte bereits mit Methylprednisolon gezeigt werden (KATAYAMA et al. 1990). Der Signalweg von Triamcinolon im Rahmen eines ischämischen Geschehens ist bis heute nicht vollständig geklärt. Allerdings schlagen neueste Untersuchungen vor, dass die hemmende Wirkung von Triamcinolon auf das Schwellen von Müllerzellen in hypoosmolarem Medium über eine endogene Freisetzung von Adenosin, einer Aktivierung von A<sub>1</sub>-Rezeptoren und nachfolgender Stimulierung einer Adenylatcyclase bzw einer Proteinkinase A vermittelt wird (UCKERMANN et al. 2005). Die Beteiligung von Adenosin konnte sowohl in dem hier untersuchten Signalweg, als auch in den Untersuchungen zu Triamcinolon beobachtet werden (UCKERMANN et al. 2005). Eine mögliche Verbindung dieser beiden Signalwege kann nicht ausgeschlossen werden und ist wiederum ein interessantes Thema nachfolgender Untersuchungen.

### **5.6 Mögliche Ursachen für das Schwellen der Müllerzellen im Rahmen einer Ischämie**

Wie bereits mehrfach erwähnt, hat das gleichzeitige Auftreten von K<sub>ir</sub>1.4 und AQP an Membranen der Müllerzellen zu der Vermutung geführt, dass die Regulation des Wasserhaushaltes in der Retina an die des K<sup>+</sup>-Haushaltes gebunden ist (NAGELHUS et al. 1999). Dies würde bedeuten, dass jede Störung der K<sup>+</sup>-Kanäle zwangsläufig zu einer Störung des Wasserhaushaltes der Müllerzellen führen würde. In der postischämischen Retina können so gut wie keine K<sup>+</sup>-Auswärtsströme gemessen werden (PANNICKE et al. 2004), was folglich die K<sup>+</sup>-Ströme von den Müllerzellen in das Blut hochgradig beeinträchtigt. Noch dazu kommt, dass andere K<sup>+</sup><sub>IR</sub>-Kanäle (K<sub>ir</sub>2.1) nach einer Ischämie unbeeinträchtigt zu sein scheinen und offensichtlich weiter K<sup>+</sup>-Ionen in den Intrazellularraum transportieren (BRINGMANN et al. 2005). Zusammen führt dies zu einer Akkumulation von K<sup>+</sup>-Ionen im Inneren der Zellen und zu einer Verschiebung des osmotischen Gleichgewichts. Durch den gesteigerten osmotischen Druck im Inneren strömt Wasser aus dem Extrazellulärraum in die Zellen und führt zum Schwellen der Müllerzellsomata. Unterstützt wird der erhöhte intrazelluläre osmotische Druck außerdem von einem Na<sup>+</sup>-Einstrom (IZUMI et al. 1996). Die AQP werden im Rahmen der ischämischen



Veränderungen offenbar nicht beeinflusst und tragen den Wasserstrom in die Müllerzellen (PANNICKE et al. 2004, BRINGMANN et al. 2005). Daraus wird gefolgert, dass das Schwellen der Müllerzellen in hypoosmolarem Medium ursächlich mit dem Schließen von  $K^+$ -Kanälen in Verbindung zu setzen ist (PANNICKE et al. 2004). Interessant werden diese Überlegungen, wenn sie mit den hier vorliegenden Untersuchungen zusammengebracht werden. Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass das Schwellen der Müllerzellen über eine Stimulierung eines neuronalen  $Y_1$ -Rezeptors mit anschließender Aktivierung einer glialen purinergen Rezeptorkaskade, der sich vermutlich am Ende das Öffnen von Ionenkanälen anschließt, gehemmt werden kann. In Bezug auf die Veränderungen an der ischämischen Retina könnte sich ein therapeutischer Ansatz folgendermaßen darstellen: pharmakologische Stimulierung eines Rezeptors, der selektiv an Müllerzellen ausgebildet wird. Die dadurch ausgelöste Signalkaskade führt zu einem Öffnen von  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Kanälen an den Müllerzellen, wodurch diese Ionen ins Blut abgegeben werden können und nachfolgend Wasserströme nachziehen (NAGELHUS et al. 1999; BRINGMANN et al. 2005). Erste Schritte eines solchen möglichen Szenarios konnten bereits hinsichtlich des osmotischen Gleichgewichts zwischen subretinalem Raum und dem RPE gemacht werden (MAMINISHKIS et al. 2002, MEYER et al. 2002).

In der Zukunft liegt die Therapie eines cytotoxischen Retinaödems über die mögliche pharmakologische Beeinflussung der Ionen- und Wasserströme der Müllerzellen. Dabei ist aber zu beachten, dass nicht nur das Schwellen der Müllerzellen ein entscheidendes Ereignis in der Entwicklung eines Makulaödems darstellt, sondern auch andere Pathomechanismen wie die erhöhte Durchlässigkeit der Blutgefäße ihren Beitrag leisten.

### **5.7 Klinische Bedeutung des hier untersuchten Signalweges in der Therapie des Makulaödems**

Das Makulaödem, das in Folge verschiedener retinaler Erkrankungen wie z. B. im Rahmen eines Diabetes mellitus, Bluthochdruck oder arterieller Erkrankungen der Retina auftreten kann (OSBORNE et al. 2004), soll hier im Zusammenhang mit dem untersuchten Signalweg näher betrachtet werden. Zu einem Makulaödem kommt es im Rahmen einer Entzündung genauso wie im Rahmen einer Hypoxie bzw. Ischämie. Unabhängig davon geht der Bildung eines extrazellulären Ödems immer das

Schwellen der Gliazellen in der Makula voraus (YANOFF et al. 1984). Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass das Schwellen der Müllerzellen über eine Stimulierung eines neuronalen  $Y_1$ -Rezeptors mit anschließender Aktivierung einer glialen purinergen Rezeptorkaskade, der sich vermutlich am Ende das Öffnen von Ionenkanälen anschließt, gehemmt werden kann. Besonders interessant ist hierbei das Öffnen der Ionenkanäle aus folgenden Gründen:

- 1) Neueste Untersuchungen zeigen, dass es im Rahmen einer diabetischen Erkrankung einerseits zu einer veränderten Ausbildung von  $K^+$ - und AQP-Kanälen an Müllerzellen kommt. Andererseits wird das Schwellungsverhalten der Müllerzellen durch den Einfluss von Arachidonsäure und oxidativem Stress maßgeblich verändert. Beide Faktoren tragen vermutlich entscheidend zur Ausbildung eines retinalen Ödems bei (UCKERMANN et al. 2006).
- 2) Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass es bei einer künstlich induzierten Uveoretinitis auch zu einer herabgesetzten Ausbildung von  $K^+$ -Kanälen der Müllerzellen und zum Schwellen der Müllerzellsomata in hypoosmolarem Medium kommt. Außerdem konnte im Rahmen entzündlicher Erkrankungen der Retina eine veränderte Ausbildung an  $K^+$ -Kanälen nachgewiesen werden (PANNICKE et al. 2005).

Ein großes Problem ist offensichtlich die veränderte Ausbildung der  $K^+$ -Kanäle und das damit veränderte Schwellungsverhalten der Müllerzellen. Bei beiden Pathomechanismen würde das Öffnen von Ionenkanälen und der damit verbundene Ionenaustausch bzw. nachfolgende Flüssigkeitsaustausch die Ausbildung eines retinalen Ödems wahrscheinlich verhindern.

Therapeutisch werden derzeit retinale Ödeme mit antiinflammatorischen Corticosteroiden, wie z. B. Triamcinolon (9 $\alpha$ -Fluor-16 $\alpha$ -hydroxyprednisolon) versorgt (IP et al. 2003, MASSIN et al. 2004). Triamcinolon führt innerhalb sehr kurzer Zeit dazu, dass sich das Retinaödem zurückbildet (MIYAMOTO et al. 2005). Unabhängig davon ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt, wie Triamcinolon die Folgen eines Retinaödems reguliert. Neueste Untersuchungen schlagen die Stimulierung von endogenen  $A_1R$  vor (UCKERMANN et al. 2005). Demnach führt Triamcinolon zu einer endogenen Freisetzung von Adenosin, einer Aktivierung von  $A_1R$ s und nachfolgender Stimulierung einer Adenylatcyclase bzw. einer Proteinkinase A (UCKERMANN et al. 2005). Am Ende wiederum kommt es zum Öffnen von  $K^+$ -

Ionenkanälen an den Müllerzellendfüßen und damit zu einem Ionenaustausch bzw. nachfolgenden Flüssigkeitsaustausch. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Beeinflussung der Ionenkanäle offensichtlich ein wichtiges Ereignis ist, um dem Schwellen der Müllerzellsomata und nachfolgend vielleicht auch dem Makulaödem vorzubeugen.

Auch wenn der hier untersuchte Signalweg nur ein kleiner Baustein im Rahmen des Signalweges von Triamcinolon (UCKERMANN et al. 2005) oder anderer Substanzen ist, so ist er doch in Bezug auf die Entwicklung neuer Therapieansätze im Hinblick auf die Therapie inflammatorischer oder ischämisch-hypoxischer Netzhautalterationen unerlässlich.

Unabhängig davon darf natürlich nicht vernachlässigt werden, dass alle Untersuchungen am Tiermodell durchgeführt wurden und sich somit bis zum Einsatz im klinischen Alltag noch eine Reihe von Untersuchungen anschließen müssen.

## **6 Zusammenfassung**

Antje Wolf

### **Wirkung von Neuropeptid Y auf die Schwellung von Müllerzellen in hypoosmolarem Medium**

Veterinär-Anatomisches Institut, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig  
und

Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Abteilung Neurophysiologie, Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im August 2008

65 S., 29 Abb., 3 Tab., 195 Lit.

Schlüsselwörter: NPY, postischämisch, Retina, Rezeptor, Signal

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob der Neurotransmitter Neuropeptid Y (NPY) Einfluss auf das Schwellungsverhalten retinaler Gliazellen der Ratte in hypoosmolarem Medium hat. Des Weiteren war von besonderem Interesse, welche Rezeptortypen und welche intrazellulären Signalwege in die Wirkung von NPY involviert sein könnten.

Verwendet wurden 50 adulte Long-Evants-Ratten. Zuerst wurde bei einem Teil der Ratten eine transiente retinale Ischämie in einem Auge der Ratten induziert. Das andere Auge blieb unbehandelt und diente zur Kontrolle. Drei Tage post op wurden die Ratten euthanasiert. Nach Enukleation der Bulbi wurde die Netzhaut auf einen Membranfilter aufgebracht und Schnitte (1 mm) angefertigt. Um die Müllerzellen der vitalen Retina mit Hilfe des Laser Scanning-Mikroskops darstellen zu können, wurde der Farbstoff Mitotracker Orange verwendet (UCKERMANN et al. 2004).

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Müllerzellen der postischämischen Retina der Ratte in hypotonem Medium schwellen (PANNICKE et al. 2004). Dazu wurden die akut isolierten retinalen Schnitte einer hypotonen Lösung ausgesetzt (60 % der Kontrollosmolarität).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NPY die Müllerzellschwellung in hypotonem Medium in der postischämischen Netzhaut verhindert. Die pharmakologische Untersuchung des durch NPY aktivierten Signalweges erfolgte an gesunden Netzhäuten. Hier führt ein hypotones Medium bei gleichzeitiger Blockade der Kaliumkanäle ( $K^+$ -Kanäle) durch  $Ba^{2+}$  zu einer Gliazellschwellung, die mit derjenigen in der postischämischen Retina vergleichbar ist (PANNICKE et al. 2004).

NPY hemmt konzentrationsabhängig das Schwellen der Gliazellen der gesunden Netzhaut in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von  $Ba^{2+}$ . Die gleiche Wirkung konnte mit dem selektiven  $Y_1$ -Rezeptoragonisten hervorgerufen werden, während die  $Y_2$ - und  $Y_5$ -Rezeptoragonisten keine Wirkung zeigten. Außerdem hatte NPY in der Anwesenheit des selektiven  $Y_1$ -Rezeptoragonisten BIBP3226 keine Wirkung.

Inkubation mit dem membranpermeablen  $Ca^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM kehrte die Wirkung des NPY um, ebenso wie die Inkubation mit den Proteinkinase C (PKC)-Inhibitoren Staurosporin und Gö6976. Die Neurotransmitter Glutamat und Adenosin zeigten eine dem NPY vergleichbare hemmende Wirkung auf das Schwellen der Müllerzellsomata. Außerdem konnte eine Stimulierung von metabotropen Glutamatrezeptoren (mGlu) und Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren ( $A_1R$ ) nachgewiesen werden. Jedoch hob der selektiven  $Na^+$ -Kanalblocker Tetrodotoxin die hemmende Wirkung von NPY auf.

Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass NPY einen neuronalen  $Y_1$ -Rezeptor aktiviert, was zu einer Mobilisierung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern und zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führt. Weiterhin erfolgt eine von neuronaler Aktivität und  $Ca^{2+}$  abhängige Freisetzung von Glutamat und die Aktivierung von (glialen) mGlu. Letztendlich kommt es vermutlich zur Aktivierung des  $A_1R$ .

Resümierend könnten diese Ergebnisse wichtig sein für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien zur Vermeidung von postischämischen und posttraumatischen Gliazellschwellungen.

## **7 Summary**

Antje Wolf

### **Effect of neuropeptide Y on swelling of Müller cells in hypoosmolar medium**

Department of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig and

Paul Flechsig Institute of Brain Research, Department of Neurophysiology, Faculty of Medicine, University of Leipzig

Submitted in August 2008

65 pp., 29 figures, 3 tables, 195 references

Key words: NPY, postischemic, retina, receptor, signal

The aim of the present study was to determine whether neuropeptide Y (NPY) has an effect on hypotonic glia cell swelling from the retina of the rat. Furthermore, the special interest was to determine which receptor subtypes and which intracellular pathways are involved in the effect of NPY.

50 adult Long-Evans-rats were taken. Transient retinal ischemia was induced in one eye of the rats, while the other eye remained untreated and served as control. Three days after reperfusion, the animals were killed. After enucleation of the bulbi, the isolated retina was fixed on a membrane filter and 1 mm thick slices were produced. The acutely isolated slices were loaded with the vital dye Mitotracker Orange in order to selectively stain Müller glial cells (UCKERMANN et al. 2004). The slices were examined using a confocal laser scanning microscope. As shown recently (PANNICKE et al. 2004), the somata in postischemic retinas corresponded with swelling after changing the extracellular perfusate into a hypotonic solution which contained 60 % of the control ionic strength.

NPY significantly decreased the hypotonic glia cell swelling in postischemic retinas. The following experiments for the pharmacological examination of the NPY pathway were made with untreated rats. Cell somata in control retinas showed an increase of their volume during hypotonic stress when the K<sup>+</sup>-channel blocker Ba<sup>2+</sup> was present in the extracellular solution; this swelling is comparable with the swelling of glia cells in postischemic retina (PANNICKE et al. 2004). Cell somata in control retinas showed an increase of their volume during hypotonic stress when the K<sup>+</sup>-channel blocker Ba<sup>2+</sup> was present in the extracellular solution (PANNICKE et al. 2004). NPY significantly decreased the hypotonic glia cell swelling in control retinas in the presence of Ba<sup>2+</sup>.

NPY displayed a dose-dependent swelling effect. The Y<sub>1</sub>-receptor agonist inhibited dose-dependently the hypotonic glial cell swelling, while agonists for Y<sub>2</sub>- and Y<sub>5</sub>-receptors were largely ineffective.

Incubation with the membrane permeable Ca<sup>2+</sup>-chelator BAPTA-AM reversed the swelling inhibiting effect of NPY, just as incubation with PKC-inhibitors staurosporine and Gö6976 did. A dependence of the NPY effect on release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores is also suggested by the effect of thimerosal. Glutamate and adenosine also decreased the hypotonic glia cell swelling in control retinas in the presence of Ba<sup>2+</sup>. In addition, glutamate stimulates metabotropic glutamate receptors (mGluR) and adenosine activates purinergic receptors. However, the selective Na<sup>+</sup>-channel blocker tetrodotoxin (TTX) reversed the inhibiting effect of NPY on swelling, but not of glutamate and adenosine.

The data suggest that NPY inhibits hypotonic glia cell swelling by activation of neuronal Y<sub>1</sub>-receptors via Ca<sup>2+</sup>-dependent release of glutamate. This effect is mediated by subsequent stimulation of glial glutamergic and purinergic receptors in Müller cells.

The results may have importance for the development of new therapeutic strategies for inhibition of postischemic and posttraumatic glial cell swelling.

**8 Literaturverzeichnis**

Aakerlund L, Gether U, Fuhlendorff J, Schwartz TW, Thastrup O. Y<sub>1</sub> receptors for neuropeptide Y are coupled to mobilization of intracellular calcium and inhibition of adenylate cyclase. *FEBS Lett.* 1990; 260: 73-8.

Ammar DA, Hughes BA, Thompson DA. Neuropeptide Y and the retinal pigment epithelium: receptor subtypes, signaling, and bioelectrical responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39: 1870-8.

Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, Regli L. Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002; 22: 367-78.

Balasubramaniam AA. Neuropeptide Y family of hormones: receptor subtypes and antagonists. *Peptides.* 1997; 18: 445-57.

Beck-Sickinger AG. Structural characterization and binding sites of G-protein coupled receptors. *Drug Discov Today.* 1996; 1: 502-13.

Blazynski C. Discrete distributions of adenosine receptors in mammalian retina. *J Neurochem.* 1990; 54: 648-55.

Blazynski C, Perez MT. Neuroregulatory functions of adenosine in the retina. *Prog Ret Res.* 1991; 11: 293-332.

Blei AT, Larsen FS. Pathophysiology of cerebral edema in fulminant hepatic failure. *J Hepatol.* 1999; 31: 771-6.

Blomqvist AG, Herzog H. Y-receptor subtypes - how many more? *Trends Neurosci.* 1997; 20: 294-8.

Borowsky B, Walker MW, Bard J, Weinshank RL, Laz TM, Vaysse P, et al. Molecular biology and pharmacology of multiple NPY Y5 receptor species homologs. *Regul Pept.* 1998; 75-76: 45-53.



Brew H, Attwell D. Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. *Nature*. 1987; 327: 707-9.

Bringmann A, Reichenbach A, Wiedemann P. Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res*. 2004; 36: 241-9.

Bringmann A, Uckermann O, Pannicke T, Landiev I, Reichenbach A, Wiedemann P. Neuronal versus glial cell swelling in the ischaemic retina. *Acta Ophthalmol Scand*. 2005; 83: 528-38. Comment in: *Acta Ophthalmol Scand*. 2005; 83: 523-5.

Bruun A, Edvinsson L, Ehinger B. Neuropeptide Y inhibits adenylyl cyclase activity in rabbit retina. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1994; 72: 326-31.

Bruun A, Ehinger B. NPY-induced neurotransmitter release from the rabbit and chicken retina. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1993; 71: 590-6.

Bruun A, Ehinger B, Ekman R. Characterization of neuropeptide Y-like immunoreactivity in vertebrate retina. *Exp Eye Res*. 1991; 53: 539-43.

Bruun A, Ehinger B, Sundler F, Tornqvist K, Uddman R. Neuropeptide Y immunoreactive neurons in the guinea-pig uvea and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1984; 25: 1113-23.

Buschauer A, Bernhardt G, Dove S. Neuropeptid Y - NPY-Rezeptoren als Zielstrukturen für neue Arzneistoffe. *Pharm Ztg*. 2000; 24: 11-18.

Burkhoff A, Linemeyer DL, Salon JA. Distribution of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor gene and its absence in rat. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998; 53: 311-6.

Cantó Soler MV, Gallo JE, Dodds RA, Hökfelt T, Villar MJ, Suburo AM. Y<sub>1</sub> receptor of neuropeptide Y as a glial marker in proliferative vitreoretinopathy and diseased human retina. *Glia*. 2002; 39: 320-4.

Capurro D, Huidobro-Toro JP. The involvement of neuropeptide Y Y<sub>1</sub> receptors in the blood pressure baroreflex: studies with BIBP 3226 and BIBO 3304. *Eur J Pharmacol.* 1999; 376: 251-5.

Cerdá-Reverter JM, Larhammar D. Neuropeptide Y family of peptides: structure, anatomical expression, function, and molecular evolution. *Biochem Cell Biol.* 2000; 78: 371-92.

Chan PH, Fishman RA, Caronna J, Schmidley JW, Prioleau G, Lee J. Induction of brain edema following intracerebral injection of arachidonic acid. *Ann Neurol.* 1983; 13: 625-32.

Cheng X, Broberger C, Tong Y, Yongtao X, Ju G, Zhang X, et al. Regulation of expression of neuropeptide Y Y<sub>1</sub> and Y<sub>2</sub> receptors in the arcuate nucleus of fasted rats. *Brain Res.* 1998; 792: 89-96.

Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology.* 1984; 115: 427-9.

Corp ES, McQuade J, Krasnicki S, Conze DB. Feeding after fourth ventricular administration of neuropeptide Y receptor agonists in rats. *Peptides.* 2001; 22: 493-9.

D'Angelo I, Oh SJ, Chun MH, Brecha NC. Localization of neuropeptide Y<sub>1</sub> receptor immunoreactivity in the rat retina and the synaptic connectivity of Y<sub>1</sub> immunoreactive cells. *J Comp Neurol.* 2002; 454: 373-82.

Da T, Verkman AS. Aquaporin-4 gene disruption in mice protects against impaired retinal function and cell death after ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45: 4477-83.

Donnerer J. Depolarization-evoked release of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid from rat dorsal spinal cord slices does not originate from capsaicin-sensitive neurons. *Brain Res.* 1991; 555: 332-4.

Dumont Y, Martel JC, Fournier A, St-Pierre S, Quirion R. Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues. *Prog Neurobiol.* 1992; 38: 125-67.

Echevarría M, Ilundáin AA. Aquaporins. *J Physiol Biochem.* 1998; 54: 107-18.

Ehinger B. Glial and neuronal uptake of GABA, glutamic acid, glutamine and glutathione in the rabbit retina. *Exp Eye Res.* 1977; 25: 221-34.

Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD. Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature.* 1996; 381: 415-21. Comment in: *Nature.* 1996; 382: 113. *Nature.* 1996; 381: 377-8.

Eva C, Keinänen K, Monyer H, Seeburg P, Sprengel R. Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor that may belong to the neuropeptide receptor family. *FEBS Lett.* 1990; 271: 81-4.

Famiglietti EV Jr. 'Starburst' amacrine cells and cholinergic neurons: mirror-symmetric on and off amacrine cells of rabbit retina. *Brain Res.* 1983; 261: 138-44.

Fine BS, Brucker AJ. Macular edema and cystoid macular edema. *Am J Ophthalmol.* 1981; 92: 466-81.

Franco-Cereceda A, Liska J. Neuropeptide Y Y<sub>1</sub> receptors in vascular pharmacology. *Eur J Pharmacol.* 1998; 349: 1-14.

Frigeri A, Gropper MA, Turck CW, Verkman AS. Immunolocalization of the mercurial-insensitive water channel and glycerol intrinsic protein in epithelial cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 4328-31.

Gasparini F, Lingenhöhl K, Stoehr N, Flor PJ, Heinrich M, Vranesic I, et al. 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Neuropharmacology.* 1999; 38: 1493-503.

Gass JD, Anderson DR, Davis EB. A clinical, fluorescein angiographic, and electron microscopic correlation of cystoid macular edema. *Am J Ophthalmol.* 1985; 100: 82-6.

Ghiardi GJ, Gidday JM, Roth S. The purine nucleoside adenosine in retinal ischemia-reperfusion injury. *Vision Res.* 1999; 39: 2519-35.

Gimpl G, Kirchhoff F, Lang RE, Kettenmann H. Identification of neuropeptide Y receptors in cultured astrocytes from neonatal rat brain. *J Neurosci Res.* 1993; 34: 198-205.

Golombek DA, Biello SM, Rendon RA, Harrington ME. Neuropeptide Y phase shifts the circadian clock in vitro via a Y2 receptor. *Neuroreport.* 1996; 7: 1315-9.

Gregor P, Feng Y, DeCarr LB, Cornfield LJ, McCaleb ML. Molecular characterization of a second mouse pancreatic polypeptide receptor and its inactivated human homologue. *J Biol Chem.* 1996; 271: 27776-81.

Gribkoff VK, Pieschl RL, Wisialowski TA, van den Pol AN, Yocca FD. Phase shifting of circadian rhythms and depression of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus by neuropeptide Y: mediation by different receptor subtypes. *J Neurosci.* 1998; 18: 3014-22.

Grundemar L, Ekelund M. Effects of the neuropeptide Y (NPY)-receptor antagonist BIBP3226 on vascular NPY-receptors with different ligand requirements. *Pharmacol Toxicol.* 1996; 79: 266-9.

Gunnarson E, Zelenina M, Aperia A. Regulation of brain aquaporins. *Neuroscience.* 2004; 129: 947-55.

Guo H, Castro PA, Palmiter RD, Baraban SC. Y5 receptors mediate neuropeptide Y actions at excitatory synapses in area CA3 of the mouse hippocampus. *J Neurophysiol.* 2002; 87: 558-66.

Hamberger A, Cummins JT, Keller E, Cotman CW. Glutamate secretion and NAD(P)H levels during calcium-dependent depolarization of slices of the dentate gyrus. *Brain Res.* 1978; 156: 253-64.

Han Z, Wax MB, Patil RV. Regulation of aquaporin-4 water channels by phorbol ester-dependent protein phosphorylation. *J Biol Chem.* 1998; 273: 6001-4.

Hartveit E, Brandstätter JH, Enz R, Wässle H. Expression of the mRNA of seven metabotropic glutamate receptors (mGluR1 to 7) in the rat retina. An in situ hybridization study on tissue sections and isolated cells. *Eur J Neurosci.* 1995; 7: 1472-83.

Hasegawa H, Zhang R, Dohrman A, Verkman AS. Tissue-specific expression of mRNA encoding rat kidney water channel CHIP28k by in situ hybridization. *Am J Physiol.* 1993; 264: C237-45.

Herzog H, Hort YJ, Ball HJ, Hayes G, Shine J, Selbie LA. Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 5794-8.

Hutsler JJ, White CA, Chalupa LM. Neuropeptide Y immunoreactivity identifies a group of gamma-type retinal ganglion cells in the cat. *J Comp Neurol.* 1993; 336: 468-80.

Ip M, Kahana A, Altaweel M. Treatment of central retinal vein occlusion with triamcinolone acetonide: an optical coherence tomography study. *Semin Ophthalmol.* 2003; 18: 67-73.

Izumi Y, Kirby-Sharkey CO, Benz AM, Mennerick S, Labruyere J, Price MT, et al. Swelling of Müller cells induced by AP3 and glutamate transport substrates in rat retina. *Glia.* 1996; 17: 285-93.

Jakab M, Fürst J, Gschwentner M, Bottà G, Garavaglia ML, Bazzini C, et al. Mechanisms sensing and modulating signals arising from cell swelling. *Cell Physiol Biochem.* 2002; 12: 235-58.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. *Neurowissenschaften: eine Einführung.* 1st ed. Heidelberg-Berlin-Oxford: Spektrum Akademischer Verlag; 1996.

Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci.* 1998; 1: 683-92.

Kask A, Nguyen HP, Pabst R, Von Hörsten S. Neuropeptide Y Y<sub>1</sub> receptor-mediated anxiolysis in the dorsocaudal lateral septum: functional antagonism of corticotropin-releasing hormone-induced anxiety. *Neuroscience.* 2001; 104: 799-806.

Kask A, Rägo L, Harro J. Evidence for involvement of neuropeptide Y receptors in the regulation of food intake: studies with Y<sub>1</sub>-selective antagonist BIBP3226. *Br J Pharmacol.* 1998; 124: 1507-15.

Katayama Y, Shimizu J, Suzuki S, Memezawa H, Kashiwagi F, Kamiya T, et al. Role of arachidonic acid metabolism on ischemic brain edema and metabolism. *Adv Neurol.* 1990; 52: 105-8.

Keirstead SA, Miller RF. Metabotropic glutamate receptor agonists evoke calcium waves in isolated Müller cells. *Glia.* 1997; 21: 194-203.

Kelley SP, Nannini MA, Bratt AM, Hodge CW. Neuropeptide-Y in the paraventricular nucleus increases ethanol self-administration. *Peptides.* 2001; 22: 515-22.

Kim IB, Lee EJ, Oh SJ, Park CB, Pow DV, Chun MH. Light and electron microscopic analysis of aquaporin 1-like-immunoreactive amacrine cells in the rat retina. *J Comp Neurol.* 2002; 452: 178-91.

Kimelberg HK. Astrocytic edema in CNS trauma. *J Neurotrauma.* 1992; 9: S71-81.

Kimelberg HK. Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. *J Neurosurg.* 1995; 83: 1051-9.

King LS, Agre P. Pathophysiology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Physiol.* 1996; 58: 619-48.

Klatzo I. Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1967; 26: 1-14.

Kofuji P, Ceelen P, Zahs KR, Surbeck LW, Lester HA, Newman EA. Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci.* 2000; 20: 5733-40.

Kolb H, Fernández E, Ammermüller J, Cuenca N. Substance P: a neurotransmitter of amacrine and ganglion cells in the vertebrate retina. *Histol Histopathol.* 1995; 10: 947-68.

Kopp J, Nanobashvili A, Kokaia Z, Lindvall O, Hökfelt T. Differential regulation of mRNAs for neuropeptide Y and its receptor subtypes in widespread areas of the rat limbic system during kindling epileptogenesis. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999; 72: 17-29.

Kraft W, Hirschberger J. *Kleintierkrankheiten Bd.1 : Innere Medizin.* 3rd ed. Stuttgart: UTB für Wissenschaft; 2000.

Kramer SG. Dopamine: A retinal neurotransmitter. I. Retinal uptake, storage, and light-stimulated release of H<sup>3</sup>-dopamine in vivo. *Invest Ophthalmol.* 1971; 10: 438-52.

Larhammar D, Blomqvist AG, Yee F, Jazin E, Yoo H, Wahlestedt C. Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. *J Biol Chem.* 1992; 267: 10935-8.

Larsen AK, Osborne NN. Involvement of adenosine in retinal ischemia. Studies on the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37: 2603-11.

Lee KS, Reddington M. 1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX) inhibition of [3H]N-ethylcarboxamido-adenosine (NECA) binding allows the visualization of putative non-A1 adenosine receptors. *Brain Res.* 1986; 368: 394-8.

LeVine H 3rd. Structural features of heterotrimeric G-protein-coupled receptors and their modulatory proteins. *Mol Neurobiol.* 1999; 19: 111-49.

Levine AS, Morley JE. Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides.* 1984; 5: 1025-9.

Li B, Rosenbaum PS, Jennings NM, Maxwell KM, Roth S. Differing roles of adenosine receptor subtypes in retinal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Exp Eye Res.* 1999; 68: 9-17.

Li B, Yang C, Rosenbaum DM, Roth S. Signal transduction mechanisms involved in ischemic preconditioning in the rat retina in vivo. *Exp Eye Res.* 2000; 70: 755-65.

Liebich HG, Böck P, Budras KD. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 4th ed. Stuttgart-New York: Schattauer; 2003.

Linser PJ, Sorrentino M, Moscona AA. Cellular compartmentalization of carbonic anhydrase-C and glutamine synthetase in developing and mature mouse neural retina. *Brain Res.* 1984; 315: 65-71.

Liu GJ, Bennett MR. ATP secretion from nerve trunks and Schwann cells mediated by glutamate. *Neuroreport.* 2003; 14: 2079-83.

Liu Y, Wakakura M. P1-/P2-purinergic receptors on cultured rabbit retinal Müller cells. *Jpn J Ophthalmol.* 1998; 42: 33-40.

Löffler G, Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie. 7th ed. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Medizin Verlag; 2003.



Lopez-Valpuesta FJ, Nyce JW, Griffin-Biggs TA, Ice JC, Myers RD. Antisense to NPY-Y1 demonstrates that Y1 receptors in the hypothalamus underlie NPY hypothermia and feeding in rats. *Proc Biol Sci.* 1996; 263: 881-6.

Lundberg JM, Modin A, Malmström RE. Recent developments with neuropeptide Y receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci.* 1996; 17: 301-4.

Malchow RP, Qian HH, Ripps H.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA)-induced currents of skate Muller (glial) cells are mediated by neuronal-like GABA<sub>A</sub> receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86: 4326-30.

Malmström RE, Hökfelt T, Björkman JA, Nihlén C, Byström M, Ekstrand AJ, et al. Characterization and molecular cloning of vascular neuropeptide Y receptor subtypes in pig and dog. *Regul Pept.* 1998; 75-76: 55-70.

Maminishkis A, Jalickee S, Blaug SA, Rymer J, Yerxa BR, Peterson WM, et al. The P2Y<sub>2</sub> receptor agonist INS37217 stimulates RPE fluid transport in vitro and retinal reattachment in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 3555-66.

Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med.* 2000; 6: 159-63.

Marc RE. Visualizing amino acids in the retina. In *The First Great Basin Symposium on Visual Science, 1994; Salt Lake City, USA.* Salt Lake City: U Utah Press; 1994; 1: p. 58-68.

Marsh DJ, Baraban SC, Hollopeter G, Palmiter RD. Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 13518-23.

Marshak DW. Peptidergic neurons of the macaque monkey retina. *Neurosci Res Suppl.* 1989; 10: S117-30.

Masland RH, Tauchi M. The cholinergic amacrine cell. *Trends Neurosci.* 1986; 9: 218-33.

Masseguin C, Corcoran M, Carcenac C, Daunton NG, Güell A, Verkman AS, et al. Altered gravity downregulates aquaporin-1 protein expression in choroid plexus. *J Appl Physiol.* 2000; 88: 843-50.

Massey SC. Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res.* 1990; 9: 399-425.

Massey SC, Miller RF. Glutamate receptors of ganglion cells in the rabbit retina: evidence for glutamate as a bipolar cell transmitter. *J Physiol.* 1988; 405: 635-55.

Massin P, Aubert JP, Erginay A, Bourovitch JC, Benmehidi A, Audran G, et al. Screening for diabetic retinopathy: the first telemedical approach in a primary care setting in France. *Diabetes Metab.* 2004; 30: 451-7.

Meyer CH, Hotta K, Peterson WM, Toth CA, Jaffe GJ. Effect of INS37217, a P2Y<sub>2</sub> receptor agonist, on experimental retinal detachment and electroretinogram in adult rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 3567-74.

Michel, MC. Receptors for neuropeptide Y: multiple subtypes and multiple second messengers. *Trends Pharmacol Sci.* 1991; 12: 389-94. Erratum in: *Trends Pharmacol Sci.* 1991; 12: 448.

Michel MC, Beck-Sickinger A, Cox, H, Doods HN, Herzog H, Larhammar D, et al. XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol Rev.* 1998; 50: 143-50.

Miyake K, Ibaraki N. Prostaglandins and cystoid macular edema. *Surv Ophthalmol.* 2002; 47: S203-18.

Miyamoto O, Sumitani K, Takahashi M, Hirakawa H, Kusakabe T, Hayashida Y, et al. Vascular changes in the rat brain during chronic hypoxia in the presence and absence of hypercapnia. *Acta Med Okayama*. 2005; 59: 135-43.

Morris AJ, Malbon CC. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev*. 1999; 79: 1373-430. Erratum in: *Physiol Rev*. 2000; 80: followi.

Morton KD, McCloskey MJ, Potter EK. Cardiorespiratory responses to intracerebroventricular injection of neuropeptide Y in anaesthetised dogs. *Regul Pept*. 1999; 81: 81-8.

Müller H. Zur Histologie der Netzhaut. *Z Wiss Zool*. 1851; 3: 234-7.

Mundigl O, De Camilli P. Formation of synaptic vesicles. *Curr Opin Cell Biol*. 1994; 6: 561-7.

Munglani R, Hudspith MJ, Hunt SP. The therapeutic potential of neuropeptide Y. Analgesic, anxiolytic and antihyper-tensive. *Drugs*. 1996; 52: 371-9.

Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, et al. Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia*. 1999 Mar; 26: 47-54.

Nagelhus EA, Veruki ML, Torp R, Haug FM, Laake JH, Nielsen S, et al. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Müller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci*. 1998; 18: 2506-19.

Nakahama K, Nagano M, Fujioka A, Shinoda K, Sasaki H. Effect of TPA on aquaporin 4 mRNA expression in cultured rat astrocytes. *Glia*. 1999; 25: 240-6.

Nakajima M, Inui A, Asakawa A, Momose K, Ueno N, Teranishi A, et al. Neuropeptide Y produces anxiety via Y2-type receptors. *Peptides*. 1998; 19: 359-63.

Nakamura M, Yokoyama M, Watanabe H, Matsumoto T. Molecular cloning, organization and localization of the gene for the mouse neuropeptide Y-Y5 receptor. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1328: 83-9.

Naveilhan P, Canals JM, Valjakka A, Vartiainen J, Arenas E, Ernfors P. Neuropeptide Y alters sedation through a hypothalamic Y1-mediated mechanism. *Eur J Neurosci*. 2001; 13: 2241-6. [a]

Naveilhan P, Canals JM, Arenas E, Ernfors P. Distinct roles of the Y1 and Y2 receptors on neuropeptide Y-induced sensitization to sedation. *J Neurochem*. 2001; 78: 1201-7. [b]

Naveilhan P, Hassani H, Lucas G, Blakeman KH, Hao JX, Xu XJ, et al. Reduced antinociception and plasma extravasation in mice lacking a neuropeptide Y receptor. *Nature*. 2001; 409: 513-7. [c]

Newman EA. A physiological measure of carbonic anhydrase in Müller cells. *Glia*. 1994; 11: 291-9.

Newman EA. Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells. *J Neurosci*. 2001; 21: 2215-23.

Newman EA. Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci*. 2003; 23: 1659-66.

Newman EA, Reichenbach A. The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci*. 1996; 19: 307-12.

Newman EA, Zahs KR. Calcium waves in retinal glial cells. *Science*. 1997; 275: 844-7.

Nico B, Ribatti D, Frigeri A, Nicchia GP, Corsi P, Svelto M, et al. Aquaporin-4 expression during development of the cerebellum. *Cerebellum*. 2002; 1: 207-12.

Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci.* 1997; 17: 171-80.

Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res.* 2004; 23: 91-147.

Pannicke T, Fischer W, Biedermann B, Schädlich H, Grosche J, Faude F, et al. P2X7 receptors in Müller glial cells from the human retina. *J Neurosci.* 2000; 20: 5965-72.

Pannicke T, Iandiev I, Uckermann O, Biedermann B, Wiedemann P, Wolburg H, et al. A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina. *Mol Cell Neurosci.* 2004; 26: 493-502.

Pannicke T, Uckermann O, Iandiev I, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A. Ocular inflammation alters swelling and membrane characteristics of rat Müller glial cells. *J Neuroimmunol.* 2005; 161: 145-54.

Papadopoulos MC, Davies DC, Moss RF, Tighe D, Bennett ED. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit Care Med.* 2000; 28: 3019-24.

Papadopoulos MC, Krishna S, Verkman AS. Aquaporin water channels and brain edema. *Mt Sinai J Med.* 2002; 69: 242-8.

Papadopoulos MC, Saadoun S, Davies DC, Bell BA. Emerging molecular mechanisms of brain tumor oedema. *Br J Neurosurg.* 2001; 15: 101-8.

Parker EM, Babij CK, Balsubramaniam A, Burrier RE, Guzzi M, Hamud F, et al. GR231118 (1229U91) and other analogues of the C-terminus of neuropeptide Y are potent neuropeptide Y Y1 receptor antagonists and neuropeptide Y Y4 receptor agonists. *Eur J Pharmacol.* 1998; 349: 97-105.

Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci.* 1997; 17: 7817-30.

Patil RV, Saito I, Yang X, Wax MB. Expression of aquaporins in the rat ocular tissue. *Exp Eye Res.* 1997; 64: 203-9.

Perney TM, Miller RJ. Two different G-proteins mediate neuropeptide Y and bradykinin-stimulated phospholipid breakdown in cultured rat sensory neurons. *J Biol Chem.* 1989; 264: 7317-27.

Phillis JW. The effects of selective A1 and A2a adenosine receptor antagonists on cerebral ischemic injury in the gerbil. *Brain Res.* 1995; 705: 79-84.

Porter JT, McCarthy KD. Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci.* 1996; 16: 5073-81.

Potashner SJ. Ca<sup>2+</sup>-dependence of the evoked release from guinea pig cerebral cortex slices of endogenous <sup>14</sup>C-labelled amino acids, labelled via D-[U-<sup>14</sup>C]glucose. *Can J Physiol Pharmacol.* 1976; 54: 953-6.

Puro DG, Stuenkel EL. Thrombin-induced inhibition of potassium currents in human retinal glial (Müller) cells. *J Physiol.* 1995; 485: 337-48.

Raap M, Biedermann B, Braun P, Milenkovic I, Skatchkov SN, Bringmann A, et al. Diversity of Kir channel subunit mRNA expressed by retinal glial cells of the guinea-pig. *Neuroreport.* 2002; 13: 1037-40.

Raposo PD, Pierroz DD, Broqua P, White RB, Pedrazzini T, Aubert ML. Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle of C57BL/6J male mice produces an obesity syndrome including hyperphagia, hyperleptinemia, insulin resistance, and hypogonadism. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 185: 195-204.

Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 11981-6.

Redrobe JP, Dumont Y, Fournier A, Quirion R. The neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor subtype mediates NPY-induced anti-depressant-like activity in the mouse forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*. 2002; 26: 615-24.

Reichenbach A. Neuroglia - das andere zelluläre Element im Nervensystem: Die Müllersche Gliazelle. 1st ed. Wessobrunn: Socio-medico Verlagsgesellschaft mbH Medizin + Wissenschaft; 1999.

Reichenbach A, Schnitzer J, Friedrich A, Knothe AK, Henke A. Development of the rabbit retina: II. Müller cells. *J Comp Neurol*. 1991; 311: 33-44.

Reichelt W, Hernandez M, Damian RT, Kisaalita WS, Jordan BL. GABA<sub>A</sub> receptor currents recorded from Müller glial cells of the baboon (*Papio cynocephalus*) retina. *Neurosci Lett*. 1996; 203: 159-62.

Roth S. Post-ischemic hyperemia in the cat retina: the effects of adenosine receptor blockade. *Curr Eye Res*. 1995; 14: 323-8.

Roth S, Rosenbaum PS, Osinski J, Park SS, Toledano AY, Li B, et al. Ischemia induces significant changes in purine nucleoside concentration in the retina-choroid in rats. *Exp Eye Res*. 1997; 65: 771-9.

Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Wieland HA, Willim KD, Entzeroth M, et al. The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide Y Y1 receptor antagonist: BIBP3226. *Eur J Pharmacol*. 1994; 271: R11-3.

Sagar SM. Somatostatin-like immunoreactive material in the rabbit retina: immunohistochemical staining using monoclonal antibodies. *J Comp Neurol*. 1987; 266: 291-9.

Salt TE, Binns KE, Turner JP, Gasparini F, Kuhn R. Antagonism of the mGlu5 agonist 2-chloro-5-hydroxyphenylglycine by the novel selective mGlu5 antagonist 6-methyl-2-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) in the thalamus. *Br J Pharmacol.* 1999; 127: 1057-9.

Schnorr B, Kressin M. *Embryologie der Haustiere.* 6th ed. Stuttgart: Enke; 2006.

Schöneberg T, Schultz G, Gudermann T. Structural basis of G protein-coupled receptor function. *Mol Cell Endocrinol.* 1999; 151: 181-93.

Schubert P, Ogata T, Marchini C, Ferroni S, Rudolphi K. Protective mechanisms of adenosine in neurons and glial cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1997; 825: 1-10.

Schwartz EA. L-glutamate conditionally modulates the K<sup>+</sup> current of Müller glial cells. *Neuron.* 1993; 10: 1141-9.

Sheikh SP, Williams JA. Structural characterization of Y1 and Y2 receptors for neuropeptide Y and peptide YY by affinity cross-linking. *J Biol Chem.* 1990; 265: 8304-10.

Smith-White MA, Hardy TA, Brock JA, Potter EK. Effects of a selective neuropeptide Y Y2 receptor antagonist, BIIE0246, on Y2 receptors at peripheral neuroeffector junctions. *Br J Pharmacol.* 2001; 132: 861-8.

Smith-White MA, Herzog H, Potter EK. Role of neuropeptide Y Y<sub>2</sub> receptors in modulation of cardiac parasympathetic neurotransmission. *Regul Pept.* 2002; 103: 105-11.

Stanley BG, Magdalin W, Seirafi A, Nguyen MM, Leibowitz SF. Evidence for neuropeptide Y mediation of eating produced by food deprivation and for a variant of the Y1 receptor mediating this peptide's effect. *Peptides.* 1992; 13: 581-7.



Staub F, Winkler A, Peters J, Kempfski O, Kachel V, Baethmann A. Swelling, acidosis, and irreversible damage of glial cells from exposure to arachidonic acid in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994; 14: 1030-9.

Straznicky C, Hiscock J. Neuropeptide Y-like immunoreactivity in neurons of the human retina. *Vision Res.* 1989; 29: 1041-8.

Sun QQ, Akk G, Huguenard JR, Prince DA. Differential regulation of GABA release and neuronal excitability mediated by neuropeptide Y1 and Y2 receptors in rat thalamic neurons. *J Physiol.* 2001; 531: 81-94.

Swann K. Thimerosal causes calcium oscillations and sensitizes calcium-induced calcium release in unfertilized hamster eggs. *FEBS Lett.* 1991; 278: 175-8.

Tatemoto K. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79: 5485-9.

Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y - a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature.* 1982; 296: 659-60.

Terrian DM, Dorman RV, Gannon RL. Characterization of the presynaptic calcium channels involved in glutamate exocytosis from rat hippocampal mossy fiber synaptosomes. *Neurosci Lett.* 1990; 119: 211-4.

Tornqvist K, Ehinger B. Peptide immunoreactive neurons in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988; 29: 680-6.

Tsien RY. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry.* 1980; 19: 2396-404.

Tso MO. Pathology of cystoid macular edema. *Ophthalmology.* 1982; 89: 902-15.

Uckermann O, Iandiev I, Francke M, Franze K, Grosche J, Wolf S, et al. Selective staining by vital dyes of Müller glia cells in retinal wholemounts. *Glia*. 2004; 45: 59-66.

Uckermann O, Kutzera F, Wolf A, Pannicke T, Reichenbach A, Wiedemann P, et al. The glucocorticoid triamcinolone acetonide inhibits osmotic swelling of retinal glial cells via stimulation of endogenous adenosine signaling. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 315: 1036-45.

Uckermann O, Wolf A, Kutzera F, Kalisch F, Beck-Sickinger AG, Wiedemann P, et al. Glutamate release by neurons evokes a purinergic inhibitory mechanism of osmotic glial cell swelling in the rat retina: activation by neuropeptide Y. *J Neurosci Res*. 2006; 83: 538-50.

Van Vliet BJ, Sebben M, Dumuis A, Gabrion J, Bockaert J, Pin JP. Endogenous amino acid release from cultured cerebellar neuronal cells: effect of tetanus toxin on glutamate release. *J Neurochem*. 1989; 52: 1229-39.

Vandenbranden CA, Kamphuis W, Nunes Cardozo B, Kamermans M. Expression and localization of ionotropic glutamate receptor subunits in the goldfish retina - an in situ hybridization and immunocytochemical study. *J Neurocytol*. 2000; 29: 729-42.

Vaney DI. Morphological identification of serotonin-accumulating neurons in the living retina. *Science*. 1986; 233: 444-6.

Venero JL, Vizuet ML, Machado A, Cano J. Aquaporins in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 2001; 63: 321-36.

Verkman AS. Role of aquaporin water channels in eye function. *Exp Eye Res*. 2003; 76: 137-43.

Verkman AS, Mitra AK. Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000; 278: F13-28.

Verkman AS, Yang B, Song Y, Manley GT, Ma T. Role of water channels in fluid transport studied by phenotype analysis of aquaporine knockout mice. *Exp Physiol.* 2000; 85: 233S-41S.

Voisin T, Goumain M, Lorinet AM, Maoret JJ, Laburthe M. Functional and molecular properties of the human recombinant Y4 receptor: resistance to agonist-promoted desensitization. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 292: 638-46.

von Engelhardt W, Breves G. *Physiologie der Haustiere.* 2nd ed. Stuttgart: Enke; 2005.

Wahlestedt C, Yanaihara N, Håkanson R. Evidence for different pre- and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides. *Regul Pept.* 1986; 13: 307-18.

Wakakura M, Yamamoto N. Cytosolic calcium transient increase through the AMPA/kainate receptor in cultured Müller cells. *Vision Res.* 1994; 34: 1105-9.

Wang Z, Haydon PG, Yeung ES. Direct observation of calcium-independent intercellular ATP signaling in astrocytes. *Anal Chem.* 2000; 72: 2001-7.

Weinberg DH, Sirinathsinghji DJ, Tan CP, Shiao LL, Morin N, Rigby MR, et al. Cloning and expression of a novel neuropeptide Y receptor. *J Biol Chem.* 1996; 271: 16435-8.

Williams M, Braunwalder A, Erickson TJ. Evaluation of the binding of the A-1 selective adenosine radioligand, cyclopentyladenosine (CPA), to rat brain tissue. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1986; 332: 179-83.

Yamamoto T. The dawn of neuroprotective therapy for glaucomatous optic neuropathy. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* 2001; 105: 866-83.

Yan H, Yang J, Marasco J, Yamaguchi K, Brenner S, Collins F, et al. Cloning and functional expression of cDNAs encoding human and rat pancreatic polypeptide receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 4661-5.

Yanoff M, Fine BS, Brucker AJ, Eagle RC Jr. Pathology of human cystoid macular edema. *Surv Ophthalmol*. 1984; 28: 505-11.

Zelenina M, Zelenin S, Bondar AA, Brismar H, Aperia A. Water permeability of aquaporin-4 is decreased by protein kinase C and dopamine. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002; 283: F309-18.

Zhang Y, Lundberg T, Yu L. Involvement of neuropeptide Y and Y1 receptor in antinociception in nucleus raphe magnus of rats. *Regul Pept*. 2000; 95: 109-13.

Zhu BS, Gibbins I. Müller cells in the retina of the cane toad, *Bufo marinus*, express neuropeptide Y-like immunoreactivity. *Vis Neurosci*. 1996; 13: 501-8.

Zonta M, Sebelin A, Gobbo S, Fellin T, Pozzan T, Carmignoto G. Glutamate-mediated cytosolic calcium oscillations regulate a pulsatile prostaglandin release from cultured rat astrocytes. *J Physiol*. 2003; 553: 407-14.

Zukowska-Grojec Z, Karwatowska-Prokopczuk E, Rose W, Rone J, Movafagh S, Ji H, et al. Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circ Res*. 1998; 83: 187-95.

## **9 Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Andreas Reichenbach dafür, dass er mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt und diese Arbeit optimal betreut hat.

Herrn Prof. Dr. Johannes Seeger danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Frau Dr. Ortrud Uckermann danke ich sehr für die Unterstützung und die wertvollen Hinweise und Ratschläge bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Andreas Bringmann danke ich für hilfreiche Hinweise bei der Planung der Versuche.

Ferner möchte ich den folgenden Personen danken:

Frau Prof. Dr. Anette Beck-Sickinger für die Synthese der  $Y_{1-}$ ,  $Y_{2-}$  und  $Y_{5-}$ -Rezeptor-agonisten.

Herrn Dr. Jens Grosche für die Einweisung in die Benutzung des Laserscanning-Mikroskops.

Frau Jana Krenzlin für die technische Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

Herrn Dr. Jörn Wolf für die penible Korrektur dieser Arbeit.

Schließlich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meiner Großmutter und meinem Freund für jegliche Unterstützung während meines Studiums und der Promotionszeit.