

**Aus der Augenklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**Altersabhängiger Einfluss der
endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) auf die Anzahl
der Neurone in der retinalen Ganglienzellschicht am Mausmodell**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Marie-Luise Göbel
aus Potsdam

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Adrian Gericke, FEBO

2. Gutachter:



Tag der Promotion: 18. November 2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	2
2.1 Anatomische Grundlagen	2
2.1.1 Aufbau des Auges und der Retina	2
2.1.2 Retinale Ganglienzellen	3
2.1.3 Amakrine Zellen	4
2.1.4 Gefäßversorgung des Auges	5
2.2 Stickstoffmonoxid-Synthasen	6
2.3 NO-Synthese	6
2.4 NO-Wirkung als Neurotransmitter	8
2.5 physiologische Rolle von NO im Körper	9
2.5.1 nNOS	9
2.5.2 iNOS	10
2.5.3 eNOS	10
2.6 Vorkommen der NOS in den Zellen der Retina	10
2.7 Signalverarbeitung in der Retina durch NO	11
2.8 Regulation des Gefäßtonus in der Retina	11
2.9 Rolle von NO bei pathophysiologischen Prozessen	12
2.9.1 oxidativer Stress	12
2.9.2 nitrosativer Stress	14
2.10 Potentielle Rolle von NO und NOS in der Embryonalentwicklung und postnatale Veränderungen der Retina und Sehbahn	15
2.10.1 Retinale Ganglienzellen	15
2.10.2 Retinale Angiogenese	16
2.11 Alterung	16
2.12 Hypothesen der vorliegenden Arbeit	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Material	19
3.2 Methoden	21
3.2.1 Auswahl der verwendeten Methodik	21
3.2.2 Versuchstiere	21
3.2.3 Augeninnendruckmessung	22
3.2.4 Färbungen von retinalen Ganzpräparaten mittels Kresylviolett und Auszählen von Zellen in der retinalen Ganglienzellschicht	22
3.2.4.1 Anfertigung retinaler Ganzpräparate	22
3.2.4.2 Färbung retinaler Ganzpräparate mit Kresylviolett	23

3.2.4.3	Zellzählungen an den retinalen Ganzpräparaten	24
3.2.5	Färbungen von Sehnervenquerschnitten mit Toluidinblau und Auszählung von Axonen.....	25
3.2.5.1	Anfertigung von Sehnervenquerschnitten und Färbung mit Toluidinblau ...	25
3.2.5.2	Axonzählungen an Sehnervenquerschnitten	26
3.2.6	Untersuchung der Gefäßreaktion mittels Videomikroskopie	26
3.2.6.1	Vorbereiten der A. ophthalmica und der Perfusionskammer	26
3.2.6.2	Gefäßreaktion auf Acetylcholin und Nitroprussid	28
3.2.7	Statistik	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Augeninnendruckmessung.....	30
4.2	Färbungen von retinalen Ganzpräparaten mittels Kresylviolett und Auszählen von Zellen in der retinalen Ganglienzellschicht	31
4.3	Färbungen von Sehnervenquerschnitten mit Toluidinblau und Auszählung von Axonen.....	32
4.4	Untersuchung der Gefäßreaktion mittels Videomikroskopie.....	33
5	Diskussion	35
5.1	Erkenntnisgewinn aus den durchgeführten Versuchen	35
5.2	Der Augeninnendruck ist vergleichbar zwischen eNOS-Knockout- und Wildtyp-Mäusen unabhängig vom Alter.....	35
5.3	Physiologischer Zellverlust im Alter in der Retina	36
5.4	Ältere eNOS-Knockout-Mäuse weisen eine geringere Anzahl an Nervenzellen in der retinalen Ganglienzellschicht der Netzhaut auf als jüngere	36
5.5	Mögliche Mechanismen, die zur verminderten Anzahl von Nervenzellen in der retinalen Ganglienzellschicht bei älteren eNOS-Knockout-Mäusen beitragen könnten.....	38
5.6	Die Anzahl an retinalen Endothelzellen der eNOS-Knockout-Mäuse und der Wildtyp-Mäuse ist vergleichbar	40
5.7	Vergleichbare Endothelfunktion der A. ophthalmica bei jungen und alten eNOS-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen	41
5.8	Fehlerdiskussion	43
6	Zusammenfassung	44
6.1	Fazit	44
6.2	Ausblick	44
7	Literaturverzeichnis	47
8	Danksagung	61
9	Tabellarischer Lebenslauf	63

Abkürzungsverzeichnis

AC	Amakrine Zelle
ACh	Acetylcholin
BH ₄	5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O	α-D(+)-Glucose Monohydrat
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Kalziumchlorid-Dihydrat
CAM	Calmodulin
cGMP	3'-5'-zyklisches Guanosin-Monophosphat
CH ₂ O	Formaldehyd
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
EDHF	endotheliale hyperpolarisierende Faktoren
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	Extracellular-signal regulated Kinases
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasserstoffoxid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IOD	Augeninnendruck
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MLKP	Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase
Myosin-P	phosphoryliertes Myosin
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitritionen
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NPY	Neuropeptid Y
O ₂	Sauerstoff
OH ⁻	Hydroxyl-Radikale
ONOO ⁻	Peroxinitrit-Anionen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PGI ₂	Prostazyklin
RGC	Retinale Ganglienzelle
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Die Retina ist ein komplexes Sinnesorgan, das der sensorischen Wahrnehmung von Lichtreizen dient. Verschiedene spezialisierte Nervenzellen bilden hier ein neuronales Netzwerk. Die Photorezeptoren nehmen die einkommenden Lichtreize auf. Am Ende der Verschaltung stehen die retinalen Ganglienzellen (RGCs), deren Axone den Nervus opticus und den Beginn der Sehbahn bilden. Die Abgänge der Arteria ophthalmica versorgen die Retina mit Blut. Die Regulation des Gefäßtonus der retinalen Blutgefäße in Physiologie und Pathologie ist noch immer Gegenstand der Forschung. Stickstoffmonoxid (NO) wirkt als wichtiger Vasodilatator und wird im Endothel durch die Enzymgruppe der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) erzeugt. Außer die durch vasodilatatorische Effekte vermutete Neuroprotektion werden auch antiatherosklerotische Effekte durch NO beschrieben. Des Weiteren ist NO ein Neurotransmitter, der für neuronale Plastizität im Rahmen der Embryonalentwicklung eine Rolle spielt. Im Rahmen der NO-Synthese durch die NOS fallen in geringem Ausmaß auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) an. Durch ROS bedingter oxidativer und nitrosativer Stress spielt bei der Pathophysiologie diverser Erkrankungen des Auges, wie dem Glaukom, der diabetischen Retinopathie und der altersbedingten Makuladegeneration eine Rolle. Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) eine der drei NOS-Isoformen, wurde in den vaskulären Endothelzellen der Retina nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die eNOS neuroprotektiv auf retinale Neuronen in der Ganglienzellschicht wirkt. Weiterhin wurde analysiert, inwieweit die eNOS wichtig für den Erhalt der Endothelfunktion okulärer Blutgefäße im Alter ist. Nach einer Zusammenfassung des anatomischen und histologischen Aufbaus der Retina, bisherige Erkenntnisse über Vorkommen, Funktionsweise der NOS, Entstehung und Auswirkungen von ROS sowie Alterungsprozesse folgt eine Beschreibung der durchgeführten Experimente. Alle Versuche wurden an jungen und alten eNOS-Knockout-Mäusen sowie Wildtyp- (WT)-Kontrollgruppen durchgeführt. An Methoden wurden neben Augeninnendruckmessungen und Zellzählungen der Retina und Axone des Sehnervens auch die Gefäßreaktion der A. ophthalmica per Videomikroskopie durchgeführt.

2. Literaturdiskussion

2.1 Anatomische Grundlagen

2.1.1 Aufbau des Auges und der Retina

Die Retina befindet sich im hinteren Augenabschnitt und ist ein anatomisch nach peripher verlagerter Teil des Diencephalons. Die Retina ist in verschiedene Schichten eingeteilt (s. Abbildung 1). Die Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen), die Lichtreize aufnehmen, befinden sich in der äußersten Schicht. Ihre Zellsomata bilden die äußere Körnerschicht. Über bipolare Zellen, Horizontalzellen und amakrine Zellen (ACs) in der inneren Körnerschicht werden diese Reize an die RGCs weitergegeben. Die RGCs bilden also das 3. Neuron in der Sehbahn und liegen an der Innenseite der Retina. Ihre Axone ziehen zum Mittelpunkt der Retina, der Papille, und bilden von dort an den N. opticus. Temporal der Papille liegt die Fovea, an der sich die meisten Photorezeptoren befinden und die somit die Stelle des schärfsten Sehens darstellt. Horizontalzellen verschalten die Photorezeptoren untereinander und verstärken Lichtadaptation und das Kontrastsehen. ACs sorgen ebenfalls für eine laterale Verschaltung, allerdings auf Höhe der Bipolar- und Ganglienzellen. Müller-Zellen, Astrozyten und Mikrogliazellen sind die Gliazellen der Retina, wobei Müller-Zellen die am häufigsten vorkommenden Gliazellen der Retina sind und sich senkrecht durch alle Schichten der Retina erstrecken. Sie dienen als Stützzellen der Verankerung der Netzhaut und sind ebenso an der Regulierung der extrazellulären Ionenkonzentration im Rahmen von elektrischen Reizen beim Sehvorgang beteiligt. (1)

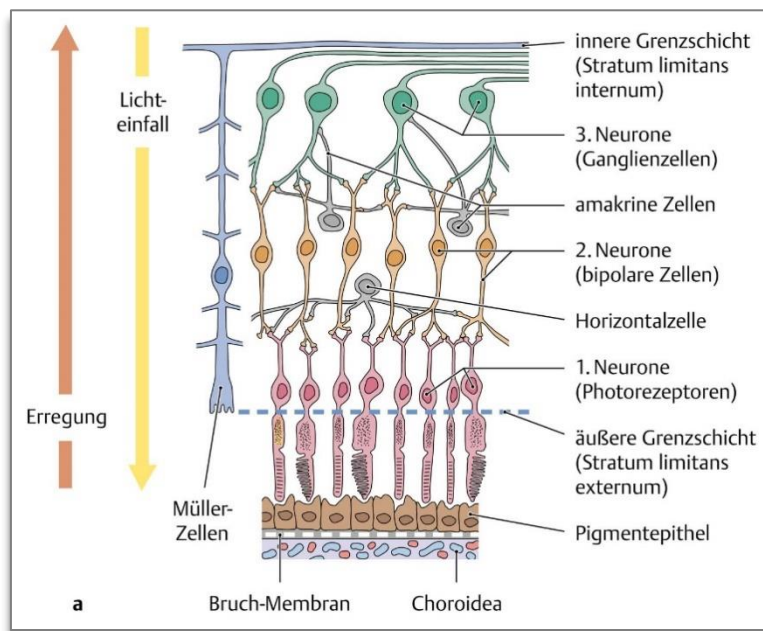


Abbildung 1: Aufbau der Retina: Schema der ersten drei Projektionsneurone der Sehbahn und ihrer Verschaltung (2)

2.1.2 Retinale Ganglienzellen

Die Somata der RGC bilden die innerste Schicht der Retina. Zusätzlich wurden auch ektopye Ganglienzellen beschrieben („displaced RGC“), deren Somata sich in der inneren Körnerschicht befinden. Während zu humanen Retinae noch keine entsprechenden Untersuchungen vorliegen, machen diese bei der Maus einen Anteil von ca. 1-2% an der Gesamtheit aller RGCs aus. Bei der Maus sind die ektopyen RGCs hauptsächlich in der Peripherie der Retina zu finden. (3). E.H. Buhl und J.F. Dann vermuteten, dass die ektopyen Ganglienzellen möglicherweise während der Embryonalentwicklung durch zu dichtes Zellwachstum in der inneren Körnerschicht zurückbleiben (4).

Die absolute Anzahl an retinalen Ganglienzellen variiert je nach Spezies und ist auch innerhalb verschiedener Mausstämmen sehr verschieden. Abweichungen von der natürlichen Variation an der Neuronenanzahl können sowohl genetisch als auch durch Umweltfaktoren und developmental noise bedingt sein (5). M. Salinas-Navarro et al. fanden heraus, dass die Gesamtzahl an RGCs auch bei pigmentierten im Vergleich zu Albino-Ratten verschieden ist.

Pigmentierte Ratten haben durchschnittlich mehr RGCs, was von den Autoren auf genetische Unterschiede zurückgeführt wurde. (6).

In der Retina befinden sich die meisten RGCs zentral und temporal, die Zelldichte nimmt nach peripher und nasal hin ab, wobei zentral ca. viermal so viele Ganglienzellen zu finden sind wie peripher (3). Bei Ratten liegt das Maximum der Zelldichte an RGCs bei ca. 1mm oberhalb des Sehnervenaustrittes (6) und auch bei Mäusen wurde die höchste Dichte an RGCs im oberen temporalen Quadranten festgestellt (3, 7). Die Variabilität der Zellgröße, Dendritenlänge und -verzweigung nimmt nach peripher hin zu. Bei Nagetieren ist dieser Unterschied auf Grund der kleinen Retina jedoch nicht sehr ausgeprägt (8).

Jeder retinalen Ganglienzelle wird ein rezeptives Feld zugeordnet. Dieses beschreibt einen Bereich an Photorezeptoren, der über Interneurone auf die jeweilige Ganglienzelle verschaltet ist. Fallen Lichtreize auf das Zentrum des rezeptiven Feldes wird eine ON-Zentrum-Ganglienzelle erregt. Lichtreize auf die Peripherie des rezeptiven Feldes hemmen eine ON-Zentrum-Ganglienzelle. Bei OFF-Zentrum-Ganglienzellen ist der gegenteilige Effekt zu beobachten. Diese Art der Signalweiterleitung dient der Wahrnehmung von Änderung in der Helligkeit eines Lichtreizes und Kontrastsehen (9, 10). Des Weiteren gibt es ON-OFF-Ganglienzellen, die Bewegung innerhalb ihres rezeptiven Feldes wahrnehmen können. (11, 12) Photosensitive RGCs machen ca. ein Prozent aller RGCs aus und vermitteln Signale an den für den Tag-Nacht-Rhythmus verantwortlichen N. suprachiasmaticus im Hypothalamus. (13)

RGCs können nach ihren physiologischen Eigenschaften und Aufgaben (11, 14, 15), Zielstrukturen im zentralen Nervensystem (16, 17), ihrer Dendritenverzweigung (18, 19) sowie molekularen Markern (20, 21) unterschieden werden. Bei der Maus wurden mehr als 40 verschiedene RGC-Subtypen identifiziert. (22–24) Ziel der Erstellung dieser Cluster ist es, die physiologischen Funktionen der RGCs sowie deren Unterschiede bei pathologischen Zuständen besser zu verstehen. Durch Nachweis verschiedener Genexpressionsmuster an RGCs untersuchten Tran et al. beispielsweise das Vorhandensein von molekularen Markern, die die Widerstandfähigkeit einer RGC bei pathologischen Zuständen, wie z.B. Läsion des N. opticus, anzeigen. (24)

2.1.3 Amakrine Zellen

Die Somata der ACs befinden sich weitestgehend in der inneren Körnerschicht. Sie bilden Verschaltungen in der Sehbahn zwischen den Bipolar- und Ganglienzellen. (1) Es wird zwischen ACs unterschieden, die sich entweder durch die Ausschüttung von Gamma-Aminobuttersäure (GABA) oder aber Glycin als Neurotransmitter kennzeichnen. Die

GABAergen Zellen haben lange dendritische Verzweigungen und bilden weitestgehend laterale Verschaltungen („wide field amacrine cell“), die glycinergen Zellen hingegen weisen kurze dendritische Verzweigungen mit hauptsächlich vertikalen Verschaltungen auf („narrow field amacrine cell“). (25, 26) Morphologisch sind ACs auch innerhalb der bereits genannten Gruppen sehr heterogen: es wurden knapp 30 unterschiedliche Subtypen beschrieben. (27, 28) Bei einigen GABAergen ACs wurde zusätzlich cholinerge Aktivität festgestellt („starburst amacrine cells“). (29, 30) Weiterhin konnte in anderen Zellen zusätzlich die Ausschüttung weiterer Neurotransmitter und Neuromodulatoren wie beispielsweise Dopamin, Substanz P, Somatostatin, Neuropeptid Y (NPY), Serotonin, Vasoaktives intestinales Peptid und Endokannabinoide nachgewiesen werden. (31–37)

Die Somata atypisch gelegener ACs befinden sich in der Ganglienzellschicht und sind GABAerg. Die gesamte Anzahl an atypisch gelegenen ACs ist je nach Spezies verschieden, so machen sie beim Menschen ca. 50% aller Neurone in der Ganglienzellschicht aus (38) und bei der Maus mit 59% eine ähnliche Anzahl. (39) Da die Anzahl der RGCs von zentral nach peripher in der Retina abnimmt, nimmt der Anteil der atypisch gelegenen ACs an der Gesamtzahl an Neuronen in der Peripherie der Retina deutlich zu. (40) Bei der Maus wurden zehn (41) und beim Menschen sechs verschiedene morphologische Subtypen an atypisch gelegenen ACs gefunden. (42) Die morphologische Vielfalt lässt auch hier verschiedenartige Funktionen der einzelnen Subtypen vermuten.

2.1.4 Gefäßversorgung des Auges

Die Blutversorgung von Orbita und Bulbus oculi stammt aus der A. ophthalmica, dem ersten Abgang der A. carotis interna. Die Retina selbst wird durch die A. centralis retinae versorgt. Diese gewährleistet die Blutversorgung der inneren Schichten bis einschließlich der inneren Körnerschicht und verläuft zentral im N. opticus in Richtung Retina, in der sie sich trichterförmig verzweigt und endständig die Netzhautarteriolen bildet. Die Netzhautvenolen nehmen das sauerstoffarme Blut der Retina auf, vereinigen sich zur im N. opticus verlaufenden V. centralis retinae und münden in die V. ophthalmica superior und schließlich in den Sinus cavernosus.

Die Aa. choroideae versorgen die äußeren Anteile der Retina und bilden die Lamina choriocapillaris. Sie entspringen aus den Aa. ciliares posteriores breves, die nahe des N. opticus durch die Sklera treten, um sich in der Choroidea zu verzweigen. Der venöse Abfluss erfolgt über die Vortexvenen. (1)

2.2 Stickstoffmonoxid-Synthasen

Es sind drei Isoformen der NOS in Säugetieren bekannt, die auf drei verschiedenen Genen lokalisiert sind (43). Die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) wird kontinuierlich in Neuronen und anderen Zellen gebildet. Die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) kommt in fast allen Zellarten vor und kann durch Zytokine und andere Substanzen induziert werden. Die eNOS wird kontinuierlich in Gefäßendothelzellen, kardialen Myozyten, perivaskulärem Fettgewebe und Pyramidenzellen im Hippocampus gebildet.(44–46) Die eNOS ist u.a. in gut vaskularisiertem Gewebe wie Leber, Milz und Niere zu finden sowie in den Mitochondrien des Skelettmuskels. Während die nNOS und die eNOS zur NO-Produktion auf kurzfristige pulsatile Calciumausschüttungen angewiesen sind und demzufolge kurzlebigen Stoffwechselumsatz über einige Stunden erbringen, ist die iNOS ein calciumunabhängiges, kontinuierlich arbeitendes high-output-Enzym, welches größere Mengen NO auch über Tage produziert (43, 47).

Alle drei NOS-Isoformen besitzen Bindungsstellen für Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), Flavine und Calmodulin (CAM), über die die NO-Freisetzung reguliert wird (47, 48). Weitere Cofaktoren zur NO-Synthese sind 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH₄) und Häm. Sowohl eNOS als auch nNOS sind auf CAM und Calcium-Freisetzung in Form eines Calcium-Transienten von ca. >100 nM angewiesen. Die iNOS hingegen arbeitet calciumunabhängig, da sie bereits bei einem Calcium-Transienten von ca. 39nM, also unterhalb der Calciumkonzentration von 70-100 nM in den meisten Zellen, einen festen Komplex mit CAM bildet (43, 49, 50). Die Regulation der iNOS-Ausschüttung erfolgt schließlich durch die Translation aus der mRNA (49, 50). In verschiedenen Zellarten konnten Lipopolysaccharide sowie verschiedene Zytokine, z.B. Interferon γ und Interleukin-1 β , als Induktoren nachgewiesen werden (51, 52).

2.3 NO-Synthese

Die NOS sind intrazellulär gelegene Homodimere, die aus zwei identischen Untereinheiten bestehen. Drei Cosubstrate werden für die NO-Synthese benötigt: L-Arginin, NADPH und O₂. Die fünf benötigten Cofaktoren bzw. prosthetischen Gruppen sind Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN), CAM, BH₄ und Häm (49). Die N-terminale Oxydase-Domäne beinhaltet Häm und BH₄, die C-terminale Reduktase-Domäne enthält FAD, FMN und eine Bindestelle für NADPH. An jeder der beiden Untereinheiten gibt es eine Bindestelle für CAM zwischen der Oxygenase- und Reduktase-Domäne. NOS sind nur in Dimer-Form katalytisch aktiv, da nur in dieser Formation die Bindung an BH₄ erfolgen kann (53). Abbildung 2 stellt ein Dimer der iNOS mit seinen Cofaktoren und prosthetischen Gruppen dar.

In Abbildung 2 wird der Elektronenfluss innerhalb der iNOS dargestellt. Die Bindung von CAM an nNOS und eNOS beschleunigt die Elektronenübertragung von NADPH auf die Häm-Gruppe, die ohne die Anwesenheit von CAM unterdrückt wird. CAM als Cofaktor wird erst durch Anwesenheit von Ca^{2+} , welches eine Konformationsänderung an CAM hervorruft und es aktiviert, bindungsfähig. Die NO-Produktion der eNOS und nNOS wird demnach durch Mechanismen induziert, die die intrazelluläre Calcium-Konzentration entweder durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern oder durch Öffnung von membrangebundenen Calcium-Kanälen erhöht. Da die iNOS bereits einen festen Komplex mit CAM gebildet hat, ist es nicht auf die externe Calciumkonzentration angewiesen (54–58).

2.4 NO-Wirkung als Neurotransmitter

NO ist mit 30 Dalton Molekülmasse eines der kleinsten und einfachsten Moleküle. Es hat eine extrem kurze biologische Halbwertszeit von <5 Sekunden und wirkt daher in geringen Konzentrationen nicht toxisch. (58) NO wird anders als die meisten Neurotransmitter nicht in Vesikeln ausgeschüttet und hat keinen postsynaptischen Rezeptor. Der häufigste Signalweg von NO als Transmitter ist die cGMP-Signalkaskade. Abbildung 4 stellt diese beispielhaft für eine glatte Muskelzelle dar. NO bindet an ein Häm- Fe^{2+} -Ion der zytosolischen Guanylat-Cyclase und aktiviert diese. In Folge katalysiert die Guanylat-Cyclase die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in 3'-5'-zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP). (58, 59) In glatten Muskelzellen kommt es über eine Proteinkinase G-vermittelte Signalkaskade und Aktivierung der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLKP) zur Relaxation. (60, 61) CGMP wird durch die Phosphodiesterase zu Guanosinmonophosphat (GMP) abgebaut. (62)

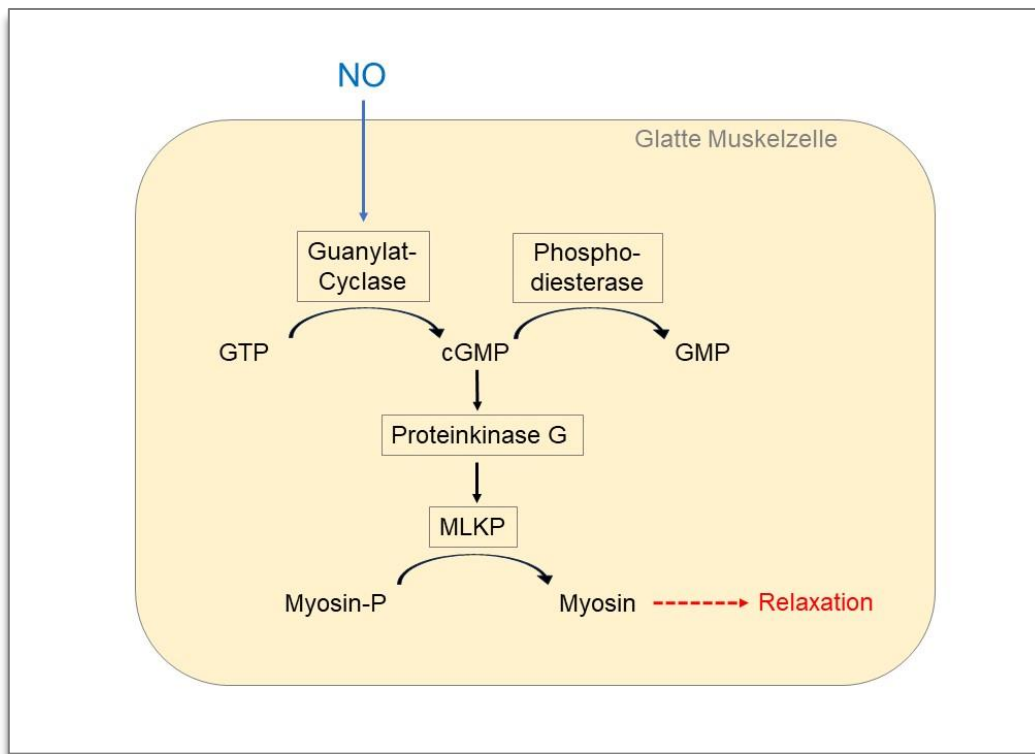


Abbildung 4: Stickstoffmonoxid-vermittelte intrazelluläre Signalkaskade in einer glatten Muskelzelle, die zur Muskelrelaxation führt. Dephosphorylierung von Myosin führt zu niedrigerer Calcium-Sensitivität der Myofilamente und vermindert somit deren Kontraktilität. NO: Stickstoffmonoxid, GTP: Guanosintriphosphat, cGMP: 3'-5'-zyklisches Guanosin-Monophosphat, GMP: Guanosinmonophosphat, MLKP: Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase, Myosin-P: phosphoryliertes Myosin

2.5 physiologische Rolle von NO im Körper

Analog zu ihren oben beschriebenen Regulationsmechanismen unterscheiden sich die drei NOS-Isoformen auch in ihren physiologischen Aufgaben. Folgende verschiedenartige Funktionen der NOS-Isoformen konnten nachgewiesen werden:

2.5.1 nNOS

NO im zentralen Nervensystem spielt eine Rolle bei Lernvorgängen und neuronaler Plastizität. Im Rahmen von Langzeitpotenzierungen fungiert es als retrograder Signalvermittler (63). Von der nNOS im zentralen Nervensystem produziertes NO ist als Inhibitor des sympathischen Nervensystems sowie durch parakrine Relaxation glatter Muskelzellen an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Glatte Muskelzellen im Endothel und auch an anderen Lokalisationen der Peripherie werden durch nitrerger Neurone innerviert, die eine physiologische Vasodilatation bzw. Relaxation der glatten Muskelzellen bewirken (47, 64, 65).

2.5.2 iNOS

Das in Makrophagen durch die iNOS produzierte NO macht einen großen Teil deren Zytotoxizität aus. NO ist affin zu proteingebundenem Eisen und kann daher eine Vielzahl von eisenhaltigen Enzymen deaktivieren. Des Weiteren ist es in der Lage, Strangbrüche an der DNA sowie DNA-Fragmentierung zu erzeugen (47).

2.5.3 eNOS

Aus peripheren Endothelzellen freigesetztes NO wirkt vasodilatatorisch über Erhöhung von cGMP und damit Aktivierung der MLKP in glatten Muskelzellen und Relaxierung des Gefäßtonus. Es wirkt als Gegenspieler zu sympathischen und durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System induzierten vasokonstriktorisches Reizen (47).

NO hemmt zudem die Plättchenaggregation und -adhäsion im Blutgefäß. Es interagiert mit CD11/CD18 an der Oberfläche von Leukozyten und wirkt somit auf deren Adhäsion am Endothel im Frühstadium der Atherosklerose entgegen (47, 66).

Durch NO wird die Proliferation von glatten Muskelzellen gehemmt, am ehesten über den cGMP-Signalweg. Da diese die Matrixproteine von atherosklerotischen Plaques produzieren, ist dies ebenfalls ein antiatherosklerotischer Effekt (47, 67, 68).

2.6 Vorkommen der NOS in den Zellen der Retina

Die eNOS kommt in der Retina in Endothelzellen, Müllerzellen, Horizontalzellen und möglicherweise auch ACs vor. Das Vorkommen der eNOS in Müllerzellen, die Anschluss an das Gefäßsystem der Retina haben, lässt vasodilatatorische Kompetenzen der Müllerzellen vermuten (69). Sowohl in den Arteriolen der Retina als auch im Gehirn von Mäusen wurde per PCR die mRNA von allen drei NOS-Isoformen nachgewiesen, wobei nNOS quantitativ am meisten im Gehirn und eNOS am meisten in der Retina vertreten ist. Die iNOS wurde in geringster Menge nachgewiesen (70).

In aus zwei Tage alten Ratten gewonnenen Zellkulturen sowie in Retinae menschlicher Feten wurde eNOS in RGCs sowie ACs in der retinalen Ganglienzellschicht und in der inneren Körnerschicht nachgewiesen. (71, 72) Bei bis zu zwei Wochen alten Ratten wurden alle drei NOS-Isoformen in RGCs nachgewiesen. (71, 73) In der adulten Retina bei Hühnern wurde eNOS in RGCs und ACs der inneren Körnerschicht, nicht aber bei ACs in der retinalen Ganglienzellschicht nachgewiesen. (74) Bei adulten Ratten wurde NOS-Aktivität in RGCs sowie ACs der inneren Körnerschicht sowie der retinalen Ganglienzellschicht nachgewiesen. (75, 76) Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die verschiedenen NOS-

Isoformen in den einzelnen Zellarten der Retina nachzuweisen und ggf. speziestypische Unterschiede in der Verteilung der NOS-Isoformen zu erkennen.

2.7 Signalverarbeitung in der Retina durch NO

NO ist als Neurotransmitter in allen Neuronen der Retina vertreten und hat komplexe Funktionen in den Schaltmechanismen der Verarbeitung von Seheindrücken. In den Zapfen der Photorezeptoren beeinflusst NO über Aktivierung der Guanylatzyklase cGMP-abhängige Calcium-Kanäle und moduliert über diesen Mechanismus die Exozytose des Neurotransmitters Glutamat. (77) Auch in Bipolarzellen und retinalen Ganglienzellen existieren über NO und den cGMP-Signalweg aktivierte, durch zyklische Nukleotide gesteuerte Ionenkanäle (77, 78). In Bipolarzellen wird cGMP-vermittelt die Leitfähigkeit der Zellmembran erhöht und somit die Reaktion der von den Photorezeptoren eingehenden Signale der Lichtdimmung verstärkt. (79) NO moduliert über den cGMP-Signalweg die Gap-Junctions zwischen den Horizontalzellen. Dies hat zu Folge, dass sie empfindlicher auf einkommende Signale von Photorezeptoren ihres eigenen rezeptiven Feldes und unempfindlicher auf benachbarte rezeptive Felder reagieren. (80) NO verstärkt die GABA-Freisetzung und hemmt die Glycin-Freisetzung in Horizontalzellen, wodurch die Hyperpolarisation der Horizontalzellen auf umliegende Photorezeptoren zunimmt. (57, 81) In ACs vermindert NO über den cGMP-Signalweg und Proteinkinase G-vermittelte Phosphorylierung den Ionenfluss an GABA_A-Rezeptoren. Synergistisch wird gleichzeitig durch die Aktivierung der Phosphodiesterase der intrazelluläre cAMP-Gehalt reduziert. NO wirkt hier als Gegenspieler zu den Aktivatoren der Adenylatcyclase, die den cAMP-Spiegel in ACs und somit die GABA-Freisetzung erhöhen. (82) NO dämpft die Entladungsrate von retinalen ON- und OFF-Zentrum-Ganglienzellen. (83)

2.8 Regulation des Gefäßtonus in der Retina

Die Regulation des Gefäßtonus in der Retina erfolgt zum großen Teil durch die Endothelzellen. Die endothelvermittelte Vasodilatation in der A. ophthalmica wird hauptsächlich durch den Neurotransmitter NO, in geringerem Ausmaß jedoch auch durch Prostazyklin (PGI₂) und endotheliale hyperpolarisierende Faktoren (EDHF) hervorgerufen. (84–86) Die Ausschüttung dieser Neurotransmitter wird durch Acetylcholin (ACh), Gewebshormone wie Bradykinin sowie mechanische Beanspruchung des Gefäßmuskels induziert. In den retinalen Arteriolen wird die ACh-vermittelte Vasodilatation hauptsächlich über die eNOS bewirkt. (70) ACh wirkt über Muskarin-Rezeptoren am Endothel vasodilatatorisch, in dem es die Freisetzung von NO und anderen Vasodilatoren anstößt. Die Rezeptoren M₁, M₃ und M₅ triggern über Aktivierung der Phospholipase C β die intrazelluläre Calciummobilisation. Durch die dadurch entstehende

Komplexbildung mit Calmodulin wird NOS aktiviert und nachfolgend NO produziert. An der A. ophthalmica sowie den retinalen Arteriolen wird die cholinerge Vasodilatation hauptsächlich über den M₃-Rezeptor vermittelt. (87, 88). ACh in der Retina wird von cholinergen ACs und möglicherweise aus den Blutgefäßen selbst ausgeschüttet (89, 90). NO leistet als Vasodilatator einen bedeutenden Beitrag zur Regulierung der normalen Gefäßfunktion in okulären Blutgefäßen der Retina, nachweislich in der A. ophthalmica, retinalen Arteriolen, Aa. ciliares und Aa. choroideae (91–94). Die basale NO-Ausschüttung in der A. ophthalmica, die eine konstante Vasodilatation hervorruft, kann durch ACh, Bradykinin und Histamin verstärkt werden. Histamin erzeugt über einen H₁-Rezeptor die vermehrte Freisetzung von NO, über den H₂-Rezeptor kommt es auf direktem Wege zur Vasodilatation. An den Perizyten boviner retinaler Kapillaren wurde sowohl das Vorhandensein der nNOS, als auch eine Kontraktilität durch NO nachgewiesen. Somit ist anzunehmen, dass ein Autoregulationsmechanismus der Perizyten besteht, in dem diese durch nNOS produziertes NO ausschütten. Hierdurch kommt es zu einer Regulation des Gefäßtonus in den retinalen Kapillaren sowie möglicherweise auch in den zentralen retinalen Gefäßen zusätzlich zu den endothelialen Wirkmechanismen. (95)

Während einige Autoren keinen Nachweis zur Innervation der intraokulären Blutgefäße durch das autonome Nervensystem erbringen konnten (96), ergab eine weitere Untersuchung bei Hunden das Vorhandensein eines nitrogenen Nervenplexus mit vom Ganglion pterygopalatinum absteigenden Nervenfasern in der Adventitia und Media der A. centralis retinae. (94)

Die physiologische katecholaminvermittelte Vasokonstriktion wird über den adrenergen α_1 -Rezeptor vermittelt (97, 98), in der A. ophthalmica über den α_{1A} -Adrenozeptor-Subtyp. (99) Auch Endothelin-1 sorgt an der A. ophthalmica sowie an Perizyten kleinerer Gefäße für eine Vasokonstriktion (91, 100).

2.9 Rolle von NO bei pathophysiologischen Prozessen

2.9.1 Oxidativer Stress

Neben den weiter oben beschriebenen physiologischen Funktionen des durch NOS produzierten NO sind die NOS auch an pathologischen Zuständen im Organismus beteiligt. Bei der Entkopplung der NOS von der NO-Produktion entstehen ROS, die an der Pathophysiologie diverser Herz-Kreislaufkrankungen beteiligt sind. ROS werden im Körper überwiegend durch die folgenden vier Enzyme generiert: NADPH-Oxidasen, Xanthin-Oxidasen, Enzyme der Atmungskette in Mitochondrien und entkoppelte eNOS. In den Endothelzellen und glatten Muskelzellen des Körpers scheint hauptsächlich die NADPH-Oxidase für die ROS-Produktion verantwortlich zu sein (101, 102), die bei verschiedenen Krankheitszuständen wie Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie oder Hypercholesterinämie

vermehrt synthetisiert wird. (103–106) Auch Xanthin-Oxidasen können ROS hervorrufen. Deren Rolle in den oben genannten Pathologien ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. (107)

Der für die NO-Produktion notwendige Elektronenfluss von der Reduktase- zur Oxygenase-Region innerhalb der NOS ist ein schrittweise durchgeführter Vorgang, s. Abbildung 2. Liegt beispielsweise kein BH_4 vor, so werden die vorhandenen Elektronen letztlich nicht auf L-Arginin, sondern auf molekularen Sauerstoff übertragen und somit anstatt NO O_2^- -Radikale gebildet. Die NOS wird also von der NO-Produktion entkoppelt. Die im Rahmen der NO-Produktion oxygenierte prosthetische Häm-Gruppe der NOS ist zu instabil und setzt Hyperoxide wie Dioxid(1-)-Anionen (O_2^-) frei, die durch das Enzym Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) weiter umgesetzt werden. Diese Vorgänge finden statt, wenn es nicht schnell genug zur Elektronenübertragung von BH_4 auf die Häm-Gruppe kommt oder nicht ausreichend L-Arginin als Substrat zur Verfügung steht. Dieser Stoffwechselweg konnte für alle drei NOS-Isoformen nachgewiesen werden. (54, 108–112) Bei hypertensiven Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass Oxidation von BH_4 durch NADPH-Oxidase und somit verringerte BH_4 -Verfügbarkeit für den Elektronentransport zu Entkopplung der eNOS führt. (113) In Zellkulturen cerebellärer Körnerzellen wurde nachgewiesen, dass Aktivierung von NMDA-Rezeptoren durch Glutamat in Neuronen über vermehrten Calcium-Einstrom die nNOS aktiviert und bei Fehlen von L-Arginin nach ca. 10-15 Minuten zunehmend O_2^- gebildet wurde und es zu Zelltod kam. (114) In Makrophagen trägt Cytokin-induziert neben deren NO-vermittelten Immunantwort durch iNOS produziertes O_2^- und ONOO^- zu deren physiologischer Zytotoxizität bei. (115)

Bei allen oben genannten kardiovaskulären Erkrankungen wird vermehrt O_2^- gebildet. ROS sind durch Oxygenierung von Lipoproteinen, Aktivierung von proinflammatorischen Genen und Wachstumsstimulation von glatten Muskelzellen an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt. Hinzu kommt der Wegfall des antiatherosklerotischen Effekts von NO, da dieses bei der Reaktion mit O_2^- verbraucht wird. Bei der Verbindung von O_2^- mit NO entstehen Peroxinitrit-Anionen (ONOO^-). ONOO^- oxidiert BH_4 noch wirksamer als O_2^- , weshalb vermutet wird, dass im Rahmen der Hypertonie gekoppelte und entkoppelte eNOSs parallel arbeiten. (113) ONOO^- wirkt als starkes Oxidans für Lipide, DNA, Proteine sowie Thiole und nitriert Tyrosine. (116, 117) ONOO^- zerfällt zu hochreaktiven Hydroxyl-Radikalen (OH^\cdot). Diese können im Rahmen der Lipidperoxidation Zellmembranproteine oxidieren, wobei sich kontinuierlich freie Fettsäuren und in einer Kettenreaktion immer neue freie Radikale bilden. Letztlich führt dieser Vorgang zur Zerstörung der Zellmembran und Zelltod. (43) Es konnte gezeigt werden, dass Ascorbat protektiv gegen oxidativen Stress wirkt. Die Oxidierung von BH_4 kann durch

Ascorbat nicht verhindert werden, allerdings hält es den BH_4 -Level konstant, in dem es das durch Oxidation entstandene BH_3^- wieder zurück zu BH_4 reduziert. (116)

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) hat eine neutrale Ladung, ist daher eine relativ stabile reaktive Sauerstoffspezies, kann frei diffundieren und hat dabei eine bivalente Wirkung auf das Gefäßsystem. Über Aktivierung einer Katalase und in Folge von cGMP einerseits sowie über seine Wirkung als EDHF wirkt H_2O_2 vasodilatatorisch (118, 119). Andererseits bewirkt es über multiple intrazelluläre Signalwege Wachstum und Hypertrophie von glatten Muskelzellen (120, 121). Der Abbau von H_2O_2 erfolgt über Katalase und Glutathion-Peroxidase.

2.9.2 Nitrosativer Stress

NO ist ein relativ stabiles Radikal und kann Proteine nicht irreversibel nitrieren. ONOO^- hingegen ist in der Lage, mit Tyrosin-Gruppen zu reagieren und diese zu nitrieren. Dabei entsteht 3-nitro-Tyrosin. Beim Abbau von NO entstehende Nitritionen (NO_2^-) sind ebenfalls in der Lage, Tyrosin zu nitrieren. (122–124) Zudem entsteht durch Oxidierung von NO_2^- durch Peroxidasen Stickstoffdioxid (NO_2), eine weitere reaktive Stickstoffspezies, die zur Entstehung von 3-nitro-Tyrosin führen kann. (125) Nitrierung von Tyrosinresten ist ein weitestgehend irreversibler Vorgang und bringt die betroffenen Enzyme in eine inaktive Form. Durch die Tyrosinnitrierung wird die Tyrosin-Phosphorylierung blockiert, wodurch zelluläre Signalwege nicht mehr ausgeübt werden können, z.B. am Insulinrezeptor oder am PDGF (Thrombozytenwachstumsfaktor)-Rezeptor. (126, 127)

Nitrierte und oxidierte Proteine sammeln sich über die Zeit langsam in sich teilendem Gewebe, wie zum Beispiel Skelettmuskeln, an. An diesem Gewebe lässt sich folglich die Balance zwischen Proteinoxidierung/-nitrierung und Beseitigung dieser Stoffwechselprodukte feststellen. (122) Die Proteinnitrierung ist meist irreversibel. Jedoch wurde in menschlichen und murinen Endothelzellen, Lungengewebe sowie Makrophagen und in murinem Milzgewebe eine Denitrase identifiziert. Da diese Denitrase nicht in jedem Gewebe nachgewiesen werden konnte, wird vermutet, dass es sich um ein nicht ubiquitär vorkommendes, sondern gewebespezifisches Enzym handeln könnte. Die Denitrase-Aktivität war in Lungengewebe von Patienten mit COPD reduziert. Weitere Forschung zur Charakterisierung und Regulierung der Denitrase ist notwendig, um deren Bedeutung für die Proteinreparaturmechanismen zu verstehen. (128–130)

2.10 Potentielle Rolle von NO und NOS in der Embryonalentwicklung und postnatale Veränderungen der Retina und Sehbahn

2.10.1 Retinale Ganglienzellen

Es gibt Hinweise dafür, dass NO als prä- und postsynaptischer Signalvermittler eine Rolle in der Embryonalentwicklung des zentralen Nervensystems spielt. (131, 132) Tsumamoto et al. vermuten, dass NO auch an der embryonalen und postnatalen Synaptogenese in der Retina beteiligt ist. (73) In der Embryonalentwicklung bei Ratten entstehen die retinalen Ganglienzellen zwischen Tag 14 und Tag 20 des Embryonalstadiums (E14 bis E20). (133) Postnatal stirbt innerhalb der ersten postnatalen Tage (P0 bis P4) ca. die Hälfte der ursprünglichen Ganglienzellzahl wieder ab. (134, 135) An E14 ist die eNOS immunhistochemisch in allen Zellen der embryonalen Retina nachweisbar. In der weiteren embryonalen und postnatalen Entwicklung kann eNOS nur noch in den inneren retinalen Schichten nachgewiesen werden. Bei der adulten Ratte (Pw20) konnte die eNOS nur noch in der inneren Körnerschicht sowie der Ganglienzellschicht nachgewiesen werden. Neben der eNOS konnte auch die nNOS während der Embryonalentwicklung und postnatal unter anderem in den retinalen Ganglienzellen nachgewiesen werden. In den Ganglienzellen der Retina wurde bis zwei Wochen postnatal NOS-Aktivität festgestellt. (73) In diesem Zeitraum findet auch die Synaptogenese in der inneren Retina statt. (136) Huang et al. fanden heraus, dass nNOS-Knockout-Mäuse keine Gedächtnis- oder Verhaltensauffälligkeiten im Vergleich zu WT-Mäusen zeigten, und fanden auch in der histologischen Untersuchung der Retina und des ZNS keine Unterschiede. Aufgrund dieser Beobachtungen wird vermutet, dass ein Alternativmechanismus wie z.B. die NO-Produktion durch die eNOS das Fehlen der nNOS kompensiert. (137) Auch in einer Untersuchung von Laspas et al. gab es keine Unterschiede in der Anzahl retinaler Ganglienzellen in der Retina von ca. 8-10 Monate alten eNOS-, nNOS- und iNOS-Knockout-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen. Auch hier könnten Kompensationsmechanismen bei Fehlen einer NOS-Isoform durch die jeweils anderen NOS-Isoformen eine Rolle spielen. (138) NO scheint außerdem eine Rolle bei der postnatalen Entwicklung der Sehbahn zu spielen und trägt zur neuronalen Plastizität bei. Neben den physiologisch sinnvollen retinalen Afferenzen bestehen unmittelbar postnatal auch fehlangelegte Axone, die zu ungewünschten Zielstrukturen führen oder hinsichtlich der Menge überschüssig sind. Untersuchungen der retinotektalen Afferenzen bei WT-Ratten zeigten einen postnatalen Rückgang der Anzahl vor allem der zum ipsilateralen Colliculus superior projizierenden Axonen innerhalb der ersten 10 Lebenstage auf die Axonzahl von adulten Versuchstieren. Bei diesen bilden die nach ipsilateral projizierenden Axone im Vergleich zu den kontralateralen Projektionen nur einen kleinen Anteil an der Gesamtheit der Axone. (139) Bei Untersuchungen an eNOS/nNOS-Double-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass

die Rückbildung der überschüssigen ipsilateralen retinotektalen Afferenzen zwar stattfindet, aber stark verzögert auftritt und erst am ca. 90. postnatalen Tag die normale Axonzahl erreicht wird. (140) NO trägt also zur neuronalen Plastizität der Sehbahn bei, auch wenn die genauen Mechanismen noch nicht hinreichend erforscht sind.

2.10.2 Retinale Angiogenese

Die Angiogenese der Retina unterliegt unter anderem dem Vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF). (141, 142) Ziche et al. vermuten, dass der VEGF-Ausschüttung ein über NO und cGMP-vermittelter Signalweg nachgeschaltet ist. (143) Bei Langzeitexposition mit VEGF kommt es bei humanen Endothelzellen in vitro zu einer vermehrten Expression von eNOS. Das vermehrt gebildete NO vermittelt die angiogenetische und proliferative Wirkung von VEGF. (144) Al-Shabrawey et al. haben herausgefunden, dass in vivo der Zeitpunkt der pränatal stattfindenden Angiogenese sowie die Morphologie des Gefäßsystems bei eNOS-Knockout-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen nicht verändert ist. Vermutet wird, dass die kompensatorische Aktivierung der nNOS bei eNOS-Knockout-Mäusen das Fehlen der eNOS ausgleicht, da NO bei beiden Tieren in gleicher Menge produziert wird. (145) Des Weiteren könnten NO-unabhängige Mechanismen, wie z.B. die ebenfalls in der Retina nachgewiesenen Fibroblastenwachstumsfaktor und Transformierender Wachstumsfaktor β eine Rolle spielen. (146) Die Blutdrücke bei drei und sechs Monate alten eNOS-Knockout-Mäusen waren erhöht, was auf eine unvollständige Kompensation der eNOS durch die nNOS im Gefäßsystem schließen lässt. Retinale Gefäßverschlüsse konnten jedoch nicht beobachtet werden. (145)

2.11 Alterung

Alterung ist ein natürlicher Prozess bei lebenden Organismen, bei dem es durch Abnahme von physiologischen Funktionen auf zellulärer und molekularer Ebene zu verschiedenen Morbiditäten kommt. Alterungsprozesse lassen sich grundsätzlich in zwei Kategorien einteilen: Zum einen sind dies genetisch vorgegebene Prozesse wie z.B. zelluläre Seneszenz. Dies bedeutet, dass eine somatische Zelle eine maximale Anzahl an Mitosen durchführen kann, bevor sie die Zellteilungen einstellt. Auch die neuroendokrinen und immunologischen Funktionen des Körpers verändern sich im Alter. Dem gegenüber stehen zufällige Zellschäden, die durch somatische Mutationen oder oxidativen Stress hervorgerufen werden können. (147)

Viele Erkrankungen, deren Inzidenzen mit dem Alter zunehmen, sind mit oxidativem Stress assoziiert. Hierzu gehören unter anderem neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, kardiovaskuläre Erkrankungen, Malignome und Apoplex. Sie sind geprägt von den

bereits beschriebenen biomolekularen Veränderungen, die durch oxidativen und nitrosativen Stress hervorgerufen werden. Oxidativer Stress durch freie Radikale kommt auch wie oben beschrieben physiologisch vor, wobei ein Überschuss an freien Radikalen durch die physiologischen Antioxidantien wie Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion verhindert wird. (147) Grundsätzlich ist es auf Grund des im gesunden Organismus vorkommenden oxidativen und nitrosativen Stresses schwierig, zwischen altersbedingten und erkrankungsbedingten Veränderungen zu unterscheiden. (122, 148) Im Alter werden vermehrt ROS gebildet, sodass sich ein Ungleichgewicht zugunsten des oxidativen Stresses im Verhältnis zu den physiologischen Antioxidantien einstellt. (149) Bereits 1928 beobachtete R. Pearl, dass die Lebensdauer von Organismen umgekehrt proportional zu deren Stoffwechselaktivität ist. (149) 1956 veröffentlichte D. Harman die Theorie der freien Radikale, in der Alterungsprozesse und degenerative Erkrankungen in Zusammenhang mit Gewebeschäden durch in aeroben Organismen entstehende freie Radikale gebracht wurden. (150) Oxidativer oder nitrosativer Stress verändert Lipide, Proteine und Nukleinsäuren, Fehlfunktionen von Signalkaskaden und Zellschäden sind die Folge. (147) ROS blockieren die Reparaturmechanismen der DNA, wodurch es langfristig zu genomischer Instabilität kommt. (151) ROS sind ebenso an der Zellseneszenz beteiligt, indem sie die Autophagozytose von Zellen hemmt. Dies führt zu mitochondrialer Dysfunktion sowie einem Teufelskreis gleich zur Ansammlung von oxidierten Proteinen und anderen Zellbestandteilen. (152)

2.12 Hypothesen der vorliegenden Arbeit

1. Wir haben die Hypothese getestet, dass die eNOS essenziell für das Überleben retinaler Ganglienzellen im Verlauf des Alterungsprozesses ist.
2. Wir haben die Hypothese überprüft, dass die eNOS im Alterungsprozess wichtig ist für die Aufrechterhaltung der endothelabhängigen Vasodilatation.

Die eNOS spielt eine wichtige Rolle in der NO-vermittelten Vasodilatation der retinalen Gefäße. Durch Gewährleistung einer konstanten und bedarfsadaptierten Sauerstoffversorgung der retinalen Ganglienzellen und weiterer Neurone der Retina wird vermutet, dass das Vorhandensein der eNOS einen neuroprotektiven Effekt hat. Dem gegenüber steht die zellen- und gewebeschädigende Wirkung von oxidativem und nitrosativem Stress in der Retina, der zumindest anteilig durch entkoppelte eNOS hervorgerufen werden kann. Daher wurde untersucht, ob die eNOS wichtig ist für das Überleben von retinalen Neuronen und insbesondere retinalen Ganglienzellen. Des Weiteren wurde anhand der Gefäßreaktion auf ACh und Nitroprussid die Gefäßfunktion der A. ophthalmica untersucht sowie der Augeninnendruck (IOD) bei den Versuchstieren gemessen. Im Falle von im Alter eingetretenen Abweichungen im IOD oder der physiologischen Gefäßreaktion müssten diese in inhaltlichen Zusammenhang zu den neuronalen Zellzahlen gesetzt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Nachfolgend sind die für die in dieser Arbeit vorkommenden Experimente verwendeten Chemikalien (s. Tabelle 1), Arbeitsgeräte und Verbrauchsmaterial (s. Tabelle 2) sowie Technische Geräte und Software (s. Tabelle 3) zusammengefasst.

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acetylcholinchlorid, EC-Nr.: 200-468-8	Sigma-Aldrich, München
Agar 100 Harz	Plano GmbH, Wetzlar
α -D(+)-Glucose Monohydrat ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol (C_2H_6O)	Sigma-Aldrich, München
Eukitt® Schnelleinschlussmittel	Sigma-Aldrich, München
Formaldehyd (CH_2O)	VWR, West Chester, PA, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kalziumchlorid-Dihydrat ($CaCl_2 \cdot 2 H_2O$)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kohlenstoffdioxid (CO_2)	Universitätsmedizin Mainz
2%ige Kresylviolettlösung	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumtetraborat ($Na_2B_4O_7$)	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natrium-Nitroprussiddihydrat, EC-Nr.: 238-373-9	Sigma-Aldrich, München
2% Osmiumtetroxid-Lösung	Sigma-Aldrich, München
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Proparacain 0,5% Augentropfen	Ursapharm Arzneimittel GmbH, Saarbrücken

(R)-(-)-Phenylephrinhydrochlorid, EC-Nr.: 200-517-3	Sigma-Aldrich, München
Toluidinblau	Sigma-Aldrich, München
Xylen (C ₆ H ₄ (CH ₃) ₂)	Sigma-Aldrich, München

Tabelle 2: Arbeitsgeräte und Verbrauchsmaterialien

Arbeitsgeräte und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Augenschere	Geuder AG, Heidelberg
Mikropinzetten	Dumont, Montignez, Schweiz
Mikroschere	Geuder AG, Heidelberg
Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen	VWR International GmbH, Darmstadt
Objektträger	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Deckgläser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glaskapillaren	Drummond Scientific Company, Broomall, PA, USA
Nylon Black Monofilament 10-0 Nahtmaterial	Alcon, Freiburg
Toshiba Sattelite Laptop	Toshiba, Minato, Tokyo, Japan
Perfusionskammer	Jim's Instruments MFG.IC., Iowa City, USA
Peristaltikpumpe Cyclo II	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tabelle 3: Technische Geräte und Software

Technische Geräte und Software	Hersteller
CCD-Kamera	Hitachi, Düsseldorf
Diskus Software	Carl H. Hilgers, Königswinter
Icare® Tonolab rebound-Tonometer	Bon Optic, Lübeck
Image J Cell Counter plugin	Wayne Rasband, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
Inverses Phasenkontrast-Lichtmikroskop	Leica DM IL, Wetzlar
Khoros Software	Khoral Research, Inc., Albuquerque, NM, USA
PixelWindow Version 1.1	Cantrell Media Company, Virginia Beach, USA
TK-C1381 Videokamera	JVC Deutschland GmbH, Bad Vilbel
Ultracut E Ultramikrotom	Leica, Bensheim
Vanox-T Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg

3.2 Methoden

3.2.1 Auswahl der verwendeten Methodik

Der Nachweis von NO gestaltet sich auf Grund der Kurzlebigkeit des Moleküls als schwierig. Um die Bedeutung der NOS-Isoformen in Physiologie und Pathologie zu erforschen, hat sich einerseits der Einsatz von NOS-Inhibitoren bewährt, andererseits die Untersuchungen an NOS-Knockout-Tierstämmen. Da es bei der vorliegenden Fragestellung um die Erforschung der kurz- und langfristigen Auswirkungen des Fehlens der eNOS ging, wurde mit eNOS-Knockout-Tieren zu gearbeitet. Es wurde mit dem Mausmodell gearbeitet, da die Versuchstiere einen kurzen Reproduktionszyklus und eine kurze Lebensdauer haben, sodass dieses Modell geeignet ist, um junge mit alten Tieren zu vergleichen und die Erforschung der kurz- und langfristigen Auswirkungen des Fehlens der eNOS ermöglichte. Die Experimente wurden an jungen und alten WT- sowie eNOS- Knockout-Mäusen durchgeführt, um durch Fehlen der eNOS hervorgerufene altersbedingte retinale Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erfassen.

3.2.2 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit acht und achtzehn Monate alten homozygoten eNOS-Knockout-Mäusen sowie mit acht und achtzehn Monate alten WT-Mäusen in den Kontrollgruppen

durchgeführt. Es wurden WT-Mäuse vom C57BL/6J-Stamm sowie B6.129P2-NOS3^{tm1Unc/J} eNOS-Knockout-Mäuse eingesetzt, die beide von The Jackson Laboratory, Bar Harbour, ME, USA, bezogen wurden und im Translational Animal Research Center der Universitätsmedizin Mainz gezüchtet wurden. Die Tierhaltung hielt sich an die Vorgaben der europäischen Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere von 2010. Die Versuchstiere wurden bis zur Tötung und Organentnahme in der zentralen Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Mainz gehalten. Ein Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden wurde eingehalten. Die Tiere hatten durchgängig Zugang zu Futter und Wasser. Es wurde ausschließlich mit männlichen Versuchstieren gearbeitet, um zyklusbedingte hormonelle Einflüsse auf die Versuchsergebnisse auszuschließen. Alle Versuche wurden durch die Tierschutzkommission des Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt. Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe war n=8.

3.2.3 Augeninnendruckmessung

Für die IOD-Messung wurde das Icare® Tonolab rebound-Tonometer verwendet. Zunächst wurde in jedes Auge ein Tropfen Proparacain 0,5% Augentropfen gegeben. Danach erfolgte die wiederholte IOD-Messung, die pro Auge zwölf Mal durchgeführt wurde. Dabei wurde auf die korrekte Anwendung gemäß Herstellerangaben des explizit für Mäuse und Ratten zugelassenen Tonometers geachtet. Das Tonometer wurde vor das Auge des Versuchstieres positioniert, wobei darauf geachtet wurde, dass bei Auslösen des Tonometers der hervorschnellende Stift in horizontaler Position die zentrale Cornea berührt, um korrekte Messergebnisse zu erzielen. Die Messung des IOD wird durch das Tonometer in der Einheit mmHg angegeben. Aus den zwölf Messungen wurde jeweils ein Mittelwert pro Auge und Maus ermittelt.

3.2.4 Färbungen von retinalen Ganzpräparaten mittels Kresylviolett und Auszählen von Zellen in der retinalen Ganglienzellschicht

3.2.4.1 Anfertigung retinaler Ganzpräparate

Zur histologischen Darstellung der retinalen Ganglienzellen wurden retinale Ganzpräparate hergestellt. Die E nukleation wurde nach einem bereits erprobten Verfahren durchgeführt (153): Die Versuchstiere wurden durch CO₂-Inhalation getötet. Unmittelbar danach wurde die Maus mit einer Stahlschere dekapitiert, der Schädel sagittal in zwei Hälften geschnitten sowie Haut und Gehirn mit einer Augenschere entfernt. Nach Entfernung der Schädelknochen ausgenommen der knöchernen Orbita, ebenfalls mit der Augenschere, wurde die Orbita in eine Dissektionsschale mit eiskalter Krebs-Henseleit-Pufferlösung gelegt.

Der Krebs-Henseleit-Puffer wurde aus folgenden Komponenten hergestellt: 118,3mM NaCl, 4,7mM KCl, 2,5mM CaCl₂, 1,2mM MgSO₄, 1,2mM KH₂PO₄, 25mM NaHCO₃ und 11mM Glucose. Die Ionenkonzentrationen der Krebs-Henseleit-Lösung entsprechen annähernd dem physiologischen extrazellulären Milieu. Zudem enthält sie einen Bicarbonatpuffer, um den pH-Wert konstant zu halten sowie Glucose als Energieträger. (154) Mit der Augenschere wurde die knöcherne Orbita eröffnet und der Augapfel und das orbitale Gewebe behutsam mit der Präzisionspinzette sowie einer Mikroschere entfernt. Anschließend wurde die Hardersche Drüse, Bindegewebe und extraokuläre Muskeln mit einer Präzisionspinzette und einer Kapsulotomieschere unter Schonung der A. ophthalmica und des N. opticus entfernt. Mit 10-0 Nylon-Fäden wurden orbitale Äste der A. ophthalmica sowie deren Hauptast proximal ligiert. Der Augapfel wurde mit einer Präzisionspinzette für zehn Sekunden in eine Petrischale mit 70% Ethanol gelegt, was zu einer Weißfärbung der Cornea führt, und anschließend wieder in frische Krebs-Henseleit-Pufferlösung gelegt. Die Cornea wurde mit einer 30 Gauge Nadel peripher punktiert und mit einer Kapsulektomie-Schere disseziert. Iris, Choroidea, Glaskörper und Sklera wurden ebenfalls mit der Kapsulektomie-Schere entfernt. (153)

Nach Dissektion der A. ophthalmica vom restlichen Gewebe wurde dieses 60 Minuten lang in 4% wässriger Lösung Formaldehyd in einer Petrischale fixiert. Danach wurde das Gewebe in PBS in einer weiteren Petrischale überführt. Hier erfolgte nach Abtrennung des N. opticus die Präparation der retinalen Ganzpräparate mittels spitzer Pinzette und Mikroschere unter dem Lichtmikroskop nach einem ebenfalls in der Literatur beschriebenen Verfahren. (155) Von lateral nach zentral wurden vier Einschnitte in die Retina gemacht, die in etwa auf halber Distanz zur Papille endeten und die Retina in vier Quadranten teilten. Die Retina wurde nun vorsichtig mit der Pinzette vom Pigmentepithel gelöst und schließlich mit der Ganglienzellseite nach oben auf einen Glasobjektträger aufgebracht.

3.2.4.2 Färbung retinaler Ganzpräparate mit Kresylviolett

Zur Einfärbung der retinalen Ganzpräparate wurde ein standardisiertes Protokoll verwendet. (138) Die Ganzpräparate wurden auf einen Objektträger aufgebracht und zur De- und Rehydrierung für jeweils drei Minuten in 70%, 95%, 100%, 95% und erneut 70%iges Ethanol gelegt und anschließend für drei Minuten in destilliertes Wasser überbracht. Danach erfolgte die Färbung mit 2%iger Kresylviolettlösung über fünfzehn Minuten bei 60°C im Wärmeschrank. Nach erfolgter Färbung wurden die Ganzpräparate für drei Minuten in destilliertes Wasser gelegt, dann wieder zur Dehydrierung in Ethanol in aufsteigender Konzentration für jeweils drei Minuten (70%, 95% und 100%). Im Anschluss daran wurden die Ganzpräparate für zwei mal fünf Minuten in Xylen überbracht und abschließend mit Eukitt® Schnelleinschlussmittel auf dem Objektträger fixiert und mit einem Deckglas abgedeckt.

3.2.4.3 Zellzählungen an den retinalen Ganzpräparaten

Die Auswertung an den eingefärbten Ganzpräparaten erfolgte ebenfalls durch ein erprobtes Verfahren: (138) Um Fotos von den Ganzpräparaten machen zu können, wurde eine Hitachi CCD-Kamera an das Vanox-T Lichtmikroskop montiert, welches mit der Diskus Software ausgestattet war. Von jedem der vier Quadranten der Retina wurden vier Fotos aufgenommen, jeweils zwei aus dem zentralen Bereich der Retina und zwei aus der Peripherie. Insgesamt wurden also 16 Fotos pro Ganzpräparat aufgenommen. Der Bildausschnitt aus der Retina betrug pro Foto $150\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ (Höhe x Breite). Die Lokalisation der Fotos aus der Retina wurde genau definiert: Die Distanz zwischen Papille und nach zentral zeigendem Rand der zentralen Fotos betrug $0,75\text{mm}$, also die fünffache Höhe eines Fotos. Die Distanz zwischen der nach peripher zeigenden Seite der zentralen Fotos und der nach zentral zeigenden Seite der peripheren Fotos betrug ebenfalls $0,75\text{mm}$, siehe Abbildung 5A. (138, 156)

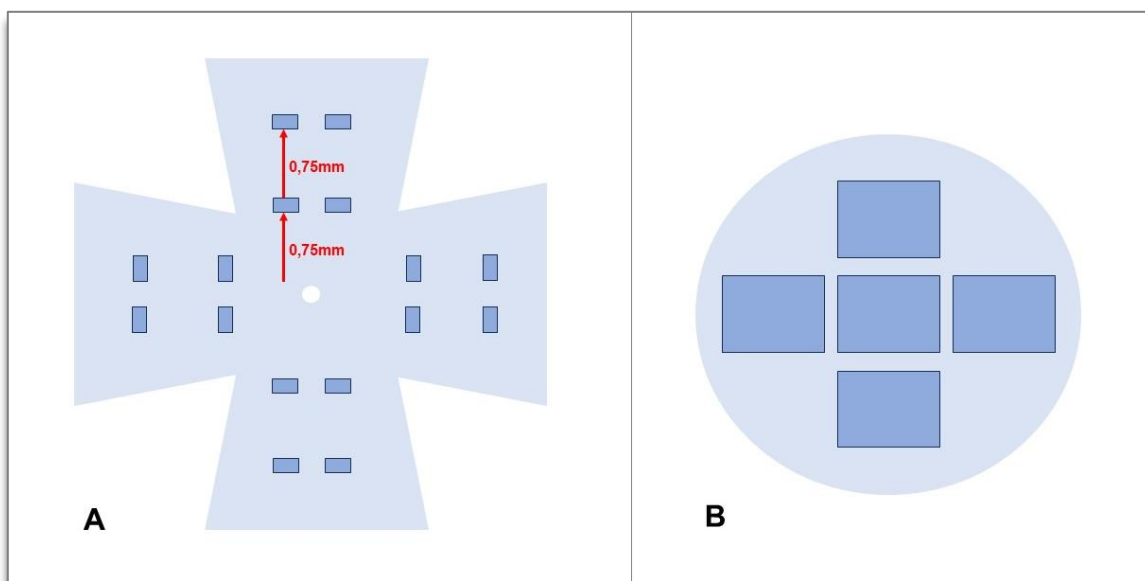


Abbildung 5: **A:** Schematische Darstellung eines retinalen Ganzpräparates mit Anordnung der für die Zellzählungen benötigten Fotos. Pro Quadrant wurde von zwei zentralen und zwei peripheren Retinabereichen Fotos erstellt. Der Abstand von der Papille zum zentralen sowie zwischen den zentralen und peripheren Retinabereichen betrug jeweils $0,75\text{mm}$. **B:** Schematische Darstellung eines Sehnervenquerschnittes mit Anordnung der für die Axonzählungen benötigten Fotos. Es wurde ein Foto im Zentrum des Sehnervs sowie von vier peripheren Sehnervenbereichen Fotos erstellt.

Die Zellen auf den Fotos wurden mit der Software Image J ausgezählt. Hierfür wurde das Cell Counter plugin für die Software Image J verwendet. Mit der Kresylviolett-Färbung lassen sich unter morphologischen Aspekten drei Zelltypen unterscheiden: Neuronen, Gliazellen und Endothelzellen. (138, 157) Neuronen haben einen runden oder ovalen Zellkern, der sich violett anfärbt. Um den Nukleus herum ist auch das Zytoplasma sichtbar, da basophile Substanzen wie Kresylviolett die Nissl-Substanz, also das schollenartig angeordnete raue Endoplasmatische Retikulum im Cytoplasma von Neuronen anfärbt. An Neuronen sind in der Ganglienzellschicht abgesehen von RGCs auch atypisch gelegen ACs zu finden. Da das Zytoplasma von Gliazellen nicht mit angefärbt wird, kann man nur ihren Zellkern erkennen, der meist dunkler gefärbt ist als bei Neuronen. In der retinalen Ganglienzellschicht sind an Gliazellen fast ausschließlich Mikrogliazellen zu finden. Deren Nukleus kann rund oder länglich sein, manchmal auch eine polylobuläre Form haben. Die Endothelzellen der Blutgefäße sind leicht an ihrer länglichen Form zu erkennen. Ihr Nukleus erscheint ebenfalls rechteckig mit abgerundeten Ecken. (157) Die Zellzählungen mit Image J wurden einfach verblindet durchgeführt. Die auf den Fotos dargestellten Zellen wurden manuell in eine der drei Kategorien eingeteilt und markiert. Mit Hilfe des Cell Counter plugins wurde die Gesamtzellzahl der markierten Zellen pro Foto für jede Kategorie ermittelt. Die Anzahl der auf allen 16 Fotos eines Ganzpräparates ausgezählten Zellen wurde nun bezogen auf die Oberfläche der 16 Fotos insgesamt als Zelldichte in Zellzahl / mm² angegeben. Die Gesamtoberfläche jedes Ganzpräparates wurde ebenfalls mit der Software Image J berechnet. Multipliziert mit der ermittelten Zelldichte pro Ganzpräparat konnte so die Gesamtzellzahl pro Zellkategorie für jedes Ganzpräparat ermittelt werden.

3.2.5 Färbungen von Sehnervenquerschnitten mit Toluidinblau und Auszählung von Axonen

3.2.5.1 Anfertigung von Sehnervenquerschnitten und Färbung mit Toluidinblau

Die Entnahme von retrobulbärem Gewebe, inklusive des N. opticus, erfolgte im Rahmen der oben beschriebenen Eukleation. (158, 159) Hierbei wurde der N. opticus ca. 2 mm vom Chiasma opticum entfernt durchtrennt. Nach Fixierung des Gewebes in 4% wässriger Lösung Formaldehyd in einer Petrischale über 60 Minuten erfolgte die Überführung in PBS in einer weiteren Petrischale. Hier wurde der N. opticus mittels spitzer Pinzette und Mikroschere unter dem Lichtmikroskop aus dem retrobulbären Gewebe herauspräpariert. Nach Postfixierung in 2% wässriger Lösung Osmiumtetroxid über weitere 60 Minuten in einer Petrischale wurden die Sehnerven in Agar 100 Resin eingebettet. Aus den Sehnerven wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms semidünne Querschnitte angefertigt, die auf Glasobjektträger aufgebracht wurden.

Die Sehnervenquerschnitte wurden mit 1%iger Toluidinblau-Lösung gefärbt gemäß einem erprobten Protokoll. (159) Zur Herstellung dieser Lösung wurden 2g Natriumtetraborat in 100ml destilliertem Wasser gelöst und 1g Toluidinblau zugegeben und gelöst. Mit einer Pipette wurde jeweils ein Tropfen der 1% Toluidinblau-Lösung auf die Sehnervenquerschnitte gegeben. Nach 30 Sekunden erfolgte das Auswaschen der überschüssigen Farbe in destilliertem Wasser über drei mal drei Minuten in drei verschiedenen Petrischalen. Die Sehnervenquerschnitte wurden auf dem Objektträger über 15 Minuten bei 60°C im Wärmeschrank getrocknet und anschließend mit Eukitt® Schnelleinschlussmittel auf dem Objektträger fixiert und mit einem Deckglas abgedeckt.

3.2.5.2 Axonzählungen an Sehnervenquerschnitten

Die Auswertung der eingefärbten Sehnervenaxone erfolgte ebenfalls durch ein bereits erprobtes Verfahren (159): Analog zu den Fotos von den Flatmounts wurden auch von den Sehnervenquerschnitten Fotos mit einer an ein Lichtmikroskop montierten Kamera gemacht. Von jedem Sehnerv wurden fünf Fotos von jeweils 60µm x 80µm Größe (Höhe x Breite) gemacht, jeweils eines im Zentrum des Sehnervs und in jedem Quadranten ein Foto des peripheren Bereiches (siehe Abbildung 5B). Die von den Oligodendrozyten gebildeten Myelinscheiden eines jeden Axons färben sich mit Toluidinblau an, das axonale Zytoplasma erscheint hingegen hell. (160) Jedes Axon in den Sehnerven wurde einfach verblindet manuell markiert und mit dem Cell Counter plugin für Image J die Gesamtzahl an Axonen ermittelt. Auch hier wurde die Axondichte pro Fläche der fünf Fotos zusammengenommen in Axone pro mm² berechnet. Die Gesamtfläche der Sehnerven wurde mit Image J bestimmt und mit der Axondichte multipliziert, um die Gesamtaxonzahl pro Sehnervenquerschnitt zu ermitteln. Da jedes Axon im N. opticus eine retinale Ganglienzelle in der Retina repräsentiert, kann von der Axonzahl auf die Anzahl der retinalen Ganglienzellen rückgeschlossen werden. (159)

3.2.6 Untersuchung der Gefäßreaktion mittels Videomikroskopie

3.2.6.1 Vorbereiten der A. ophthalmica und der Perfusionskammer

Die Präparation der A. ophthalmica erfolgte wie bereits oben beschrieben. Nach Entnahme der Arterie wurde diese in Segmente von 2-3mm Länge geteilt. Die Segmente der A. ophthalmica wurden in eine zuvor vorbereitete, mit kaltem Krebs-Henseleit-Puffer gefüllte Perfusionskammer überführt und beide Enden mit gläsernen Mikropipetten kanüliert. Die Enden der aufgespannten Arterie wurden mit zuvor vorbereiteten Schlaufen aus einer monofilen 10-0 Naht aus Nylon an dem Mikropipetten fixiert. Dieser Versuchsaufbau wurde bereits erfolgreich für Versuche an Arterien verschiedener Gefäßsysteme erprobt. (88, 161)

Auf die Arterien wurde über die Mikropipetten unter Verwendung zweier seitlich angebrachter, mit Krebs-Henseleit-Lösung gefüllter Flüssigkeitsreservoirs durch konstante Perfusion ein intravasaler Druck von 50mmHg unter no-flow-Bedingungen ausgeübt, um den physiologischen mittleren Blutdruck der Maus zu simulieren. Die Perfusionskammer wurde über eine Pumpe durchgängig mit Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid versetzter Krebs-Henseleit-Lösung mit einem pH-Wert von 7,4 und einer Temperatur von 37,0°C perfundiert, die das Gefäß in der Perfusionskammer somit von außen umspülte. Über diesen Zufluss wurden auch die nachfolgend beschriebenen Pharmaka zugegeben. Als offenes System verfügte die Perfusionskammer über einen Abfluss, über den die Lösung aus der Perfusionskammer abgeleitet und in ein Becherglas verworfen wurde. Auf diesem Weg wurden die verwendeten Pharmaka über nachfließenden Krebs-Henseleit-Puffer wieder konsekutiv verdünnt und ausgespült. Abbildung 6 verdeutlicht in einer schematischen Darstellung den Aufbau der Perfusionskammer.

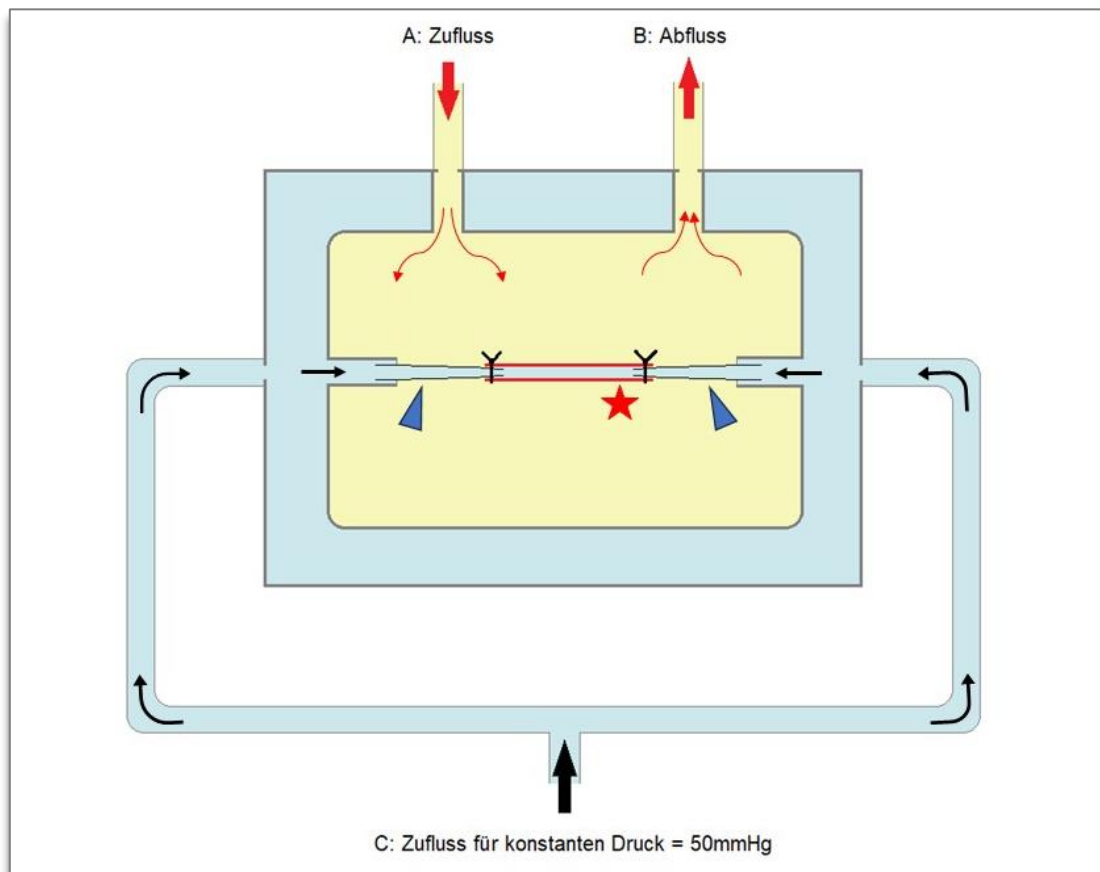


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Perfusionskammer (Draufsicht). Über Zufluss A wird die A. ophthalmica mit Krebs-Henseleit-Pufferlösung umspült (37°C, pH 7,4), die über Abfluss B die Organkammer wieder verlässt. Über Zufluss C wird durch Spülung mit Krebs-Henseleit-Lösung in der A. ophthalmica über die zwei Mikropipetten ein Druck von 50mmHg aufrechterhalten. Blaue Pfeile: Mikropipetten. Roter Stern: A. ophthalmica.

Die nachfolgenden Versuche wurden durchgeführt, nachdem die Arterien über 60 Minuten in der Perfusionskammer aufgespannt waren, sich an das Milieu in der Perfusionskammer anpassten und den Gefäßdurchmesser betreffend einen Gleichgewichtszustand erreichten. Dieser Gefäßdurchmesser im Ruhezustand wurde ausgemessen und als Ausgangswert notiert. Zur Visualisierung dieser und der nachfolgend beschriebenen Gefäßreaktionen wurde eine Videokamera an ein inverses Phasenkontrast-Lichtmikroskop angebracht, durch welches die Gefäße durch den Glasboden der Perfusionskammer beobachtet werden konnten. Die aufgenommenen Videosequenzen wurden zur weiteren Auswertung und Analyse mit Hilfe der Khoros Imaging Software auf einen Computer übertragen. (88) Die Ausmessung des Gefäßdurchmessers erfolgte am Computer mit einem Bildschirmlineal in dem Programm PixelWindow.

3.2.6.2 Gefäßreaktion auf Acetylcholin und Nitroprussid

Zunächst wurde die Kontraktilität des Arteriensegments geprüft. Durch Spülung des Gefäßes in der Perfusionskammer mit 100 mM KCl wurde eine Membrandepolarisation an den glatten Muskelzellen der Arterie erzeugt, aufgrund dessen kam es zur Vasokonstriktion. Wenn die gemessene Vasokonstriktion mindestens 50% des Gefäßdurchmessers in Ruhe betrug, wurde das Gefäß für die weiteren Versuche in Bezug auf seine Kontraktilität als geeignet betrachtet und die nachfolgenden Versuche durchgeführt. (88) Durch weitere Spülung mit Krebs-Henseleit-Lösung erreichte das Arteriensegment wieder seinen zuvor gemessenen Durchmesser im Ruhezustand.

Für die nachfolgenden Versuche wurde mittels des α_1 -Sympathomimetikums Phenylephrin eine durch Aktivierung des α_1 -Adrenorezeptors vermittelte Vasokonstriktion der Gefäße auf 50-60% des Gefäßdurchmessers in Ruhe erzeugt, um vergleichbare Ausgangsbedingungen für die nachfolgend gemessenen Gefäßreaktionen zu herzustellen. (99) Phenylephrin wurde in titrierter Dosierung eingesetzt ($c = 10^{-7}$ bis 10^{-4}) mit Intervallen von zwei Minuten zwischen den Konzentrationserhöhungen, bis der gewünschte Gefäßdurchmesser erreicht war.

Im Anschluss wurde eine kumulative Konzentrations-Wirkungskurve für ACh erstellt. Hierfür wurden die Gefäße mit ACh aufsteigender Konzentrationen von 10^{-9} M bis 10^{-4} M mit Intervallen von zwei Minuten zwischen den Konzentrationserhöhungen gespült und die hierdurch erzeugte Vasodilatation über die Videoaufzeichnung registriert. In der im Anschluss an das Experiment aus den ermittelten Daten graphisch erstellten Konzentrations-Wirkungskurve wurde der Zusammenhang zwischen Konzentration von ACh und der Differenz des Gefäßdurchmessers vor und nach Gabe von ACh dargestellt. Die Konzentration von ACh

wurde als molare Konzentration in der Organkammer angegeben. ACh wirkt über den muskarinischen M_3 -Rezeptor an den Endothelzellen der A. ophthalmica vasodilatatorisch. (88)

Im Anschluss wurden die Gefäße mit Nitroprussid aufsteigender Konzentrationen von 10^{-9} M bis 10^{-4} M gespült, wiederum mit zweiminütigen Konzentrationserhöhungen. Nach dem gleichen Prinzip wie bei der Gefäßreaktion auf ACh wurde auch hier eine Konzentrations-Wirkungskurve für Nitroprussid und die jeweilige Differenz des Gefäßdurchmessers erstellt. Nitroprussid entfaltet seine vasodilatatorische Wirkung als NO-Donor endothelunabhängig über den dem M_3 -Rezeptor nachgeschaltete Mechanismen. (162, 163)

3.2.7 Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Anzahl n ist die Anzahl der Mäuse pro Gruppe. Bei den Versuchen zur Vasokonstriktion der A. ophthalmica wurde die Vasokonstriktion als Gefäßantwort auf Phenylephrin-Gabe in prozentualer Änderung des Gefäßdurchmessers im Vergleich zum Gefäßdurchmesser im Ruhezustand angegeben. Die vasodilatatorische Gefäßantwort auf ACh und Nitroprussid wurde in prozentualer Änderung des Gefäßdurchmessers im Vergleich zum zuvor durch Phenylephrin erzeugten Ausgangswert des Gefäßdurchmessers angegeben. Der Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven erfolgte mittels Zweiweg-ANOVA für wiederholte Messungen mit anschließendem Tukey-Test. Bei der Auswertung des IOD und der Zell- und Axonzählungen wurde der ungepaarte T-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt, ein Wert wurde folglich als signifikant definiert bei einem p-Wert von $< 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1 Augeninnendruckmessung

Verglichen wurden die Mittelwerte der IOD-Messungen in den vier Versuchsgruppen: jeweils acht und achtzehn Monate alte WT- und eNOS-Knockout-Mäuse, s. Abbildung 7. Hierbei zeigte sich, dass die Mittelwerte der jeweils gleichaltrigen Versuchstiere vergleichbar waren. Achtmonatige WT-Mäuse hatten einen durchschnittlichen Augeninnendruck von $11,68 \pm 0,53$ mmHg und eNOS-Knockout-Mäuse von $11,86 \pm 0,83$ mmHg. Bei den 18-monatigen WT-Mäusen betrug der Augeninnendruck im Mittel $12,36 \pm 0,42$ mmHg und bei den 18-monatigen eNOS-Knockout-Mäusen $12,73 \pm 0,57$ mmHg. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen.

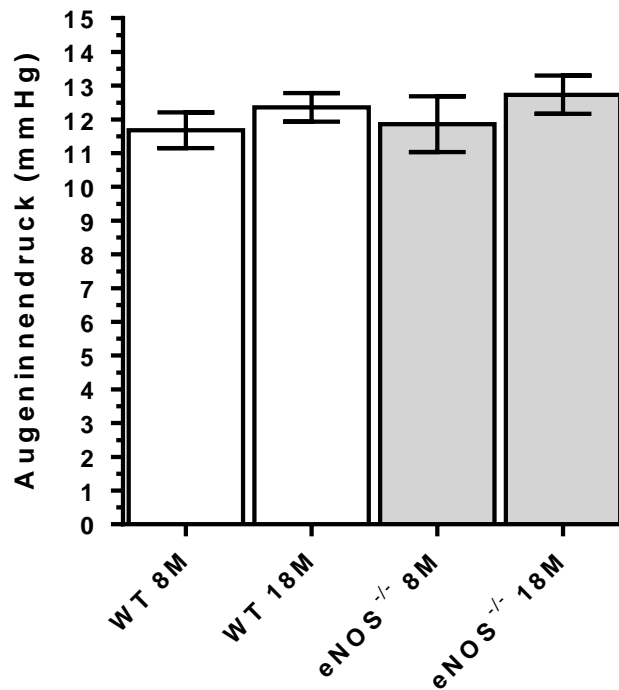


Abbildung 7: Augeninnendruckmessung bei jeweils acht und achtzehn Monate alten eNOS-Knockout und Wildtyp-Mäusen. Angaben in mmHg \pm SEM (n=8 pro Gruppe). ENOS^{-/-}: eNOS-Knockout. WT: Wildtyp.

4.2 Färbungen von retinalen Ganzpräparaten mittels Kresylviolett und Auszählen von Zellen in der retinalen Ganglienzellschicht

Die Ergebnisse der Zellzahlen an retinalen Ganzpräparaten sind in Abbildung 8 zusammengefasst. In der Auswertung fällt auf, dass bei den achtzehnmonatigen im Vergleich zu den achtmonatigen eNOS-Knockout-Mäusen deutlich weniger Neuronen ausgezählt wurden. Die achtmonatigen Mäuse hatten in der eNOS-Knockout-Gruppe durchschnittlich 112.695 ± 4.345 neuronale Zellen, während bei den achtzehnmonatigen Mäusen der gleichen Gruppe nur noch 81.745 ± 4.250 Neuronen gezählt wurden. Diese Auffälligkeit unterscheidet die eNOS-Knockout-Gruppe von der WT-Gruppe, in der kein signifikanter Abfall der neuronalen Zellen festzustellen war (von 109.467 ± 2.870 bei jungen Mäusen der WT-Gruppe auf 106.477 ± 2.693 im Alter). Die Anzahl an Neuronen bei den achtmonatigen Mäusen beider Gruppen war vergleichbar.

Bei den Endothelzellen gab es sowohl bei den eNOS-Knockout-Mäusen, also auch bei den WT-Mäusen einen geringgradigen Abfall der Zellzahl bei den achtzehnmonatigen Mäusen im Vergleich zu den achtmonatigen Mäusen. Bei den alten Mäusen der eNOS-Knockout-Gruppe sank die Endothelzellenzahl im Alter von 9.044 ± 539 auf 8.604 ± 434 Zellen, in der WT-Gruppe von 9.531 ± 456 auf 8.534 ± 609 Zellen. Der Abfall an Zellen kann als geringfügig betrachtet werden und ist nicht statistisch signifikant. Auch hier bewegt sich die Zellanzahl der eNOS-Knockout-Mäuse in einem vergleichbaren Bereich wie die der WT-Mäuse. Es ist auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen.

Die Mikrogliazellen zeigen weder mit zunehmendem Alter noch im Vergleich zwischen der eNOS-Knockout-Gruppe mit der WT-Gruppe relevant unterschiedliche Zellzahlen.

Insgesamt betrachtet spiegelt sich nur die verminderte Anzahl an neuronale Zellen bei alten eNOS-Knockout-Mäusen in der Betrachtung der Gesamtzellzahl wider. Diese beträgt 120.020 ± 2.742 bzw. 122.639 ± 4.637 bei jungen WT- und eNOS-Knockout-Mäusen, 116.088 ± 2.828 bei alten WT-Mäusen und 91.412 ± 4.247 bei alten eNOS-Knockout-Mäusen.

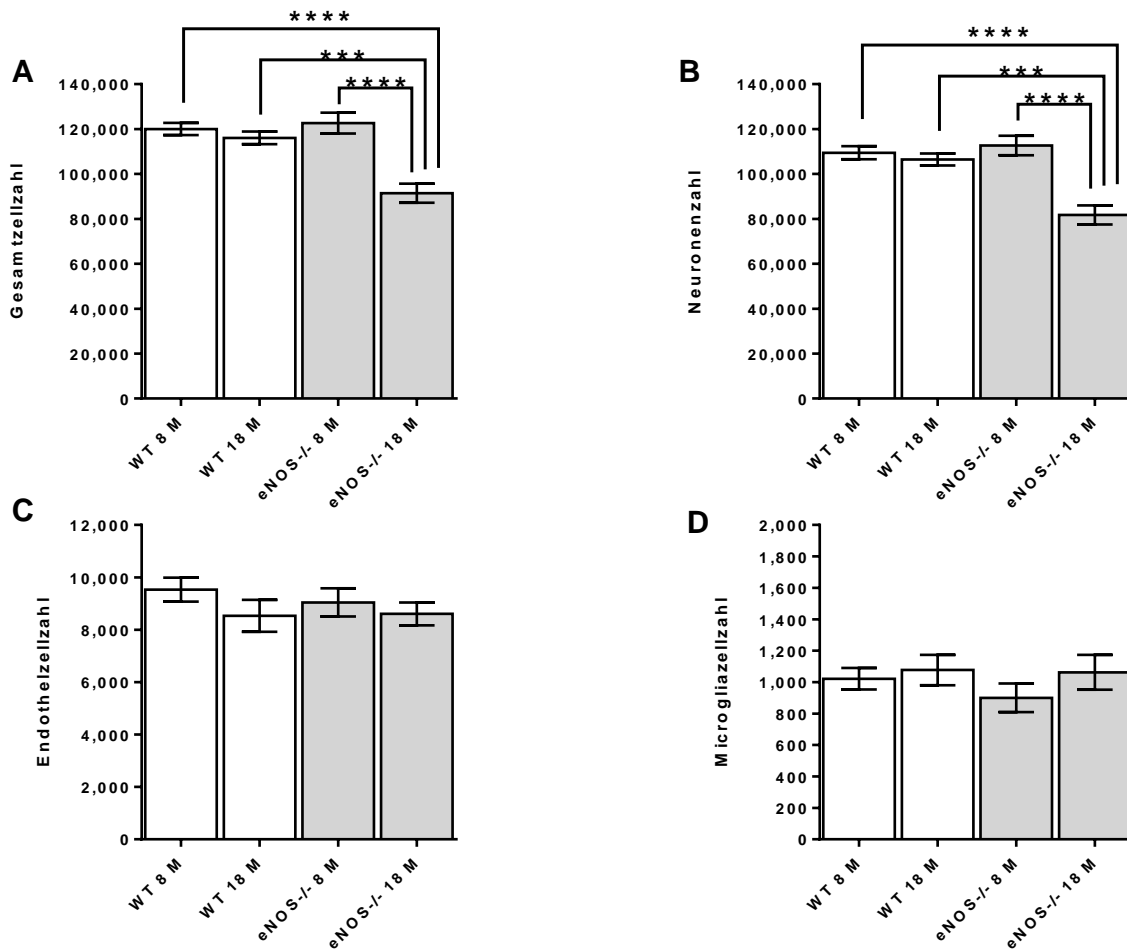


Abbildung 8: Zellzahlen in der retinalen Ganglienzellschicht. Oben links: Gesamtzellzahl. Oben rechts: Neuronenzahl. Unten links: Endothelzellzahl. Unten rechts: Microgliazellzahl. Angaben jeweils in Zellen/mm² ± SEM (n=8 pro Gruppe). ENOS -/-: eNOS-Knockout. WT: Wildtyp. *** p<0,0001; **** p<0,00001.

4.3 Färbungen von Sehnervenquerschnitten mit Toluidinblau und Auszählung von Axonen

Die Ergebnisse der Axonzahlen an Sehnervenquerschnitten, durch die man auf die Anzahl der Ganglienzellen in der Retina schließen kann, sind in Abbildung 9 zusammengefasst. Es ergaben sich fast identische Ausgangswerte bei den jungen Mäusen in beiden Versuchsgruppen mit 56.724 ± 3.411 bzw. 55.307 ± 2.055 Axonen (WT bzw. eNOS-Knockout). Bei den achtzehn Monate alten Mäusen wurden in beiden Gruppen weniger Axone gezählt: 51.024 ± 2.424 bei den eNOS-Knockout-Mäusen und 54.875 ± 2.975 bei den WT-Mäusen. Die niedrigere Axonzahl im Alter kann als geringfügig eingestuft werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der eNOS-Knockout-Gruppe verglichen mit den WT-Mäusen. Aus diesem Ergebnis kann rückgeschlossen werden, dass der im zweiten Versuch beobachtete Abfall an neuronalen Zellen nicht die Ganglienzellen betrifft.

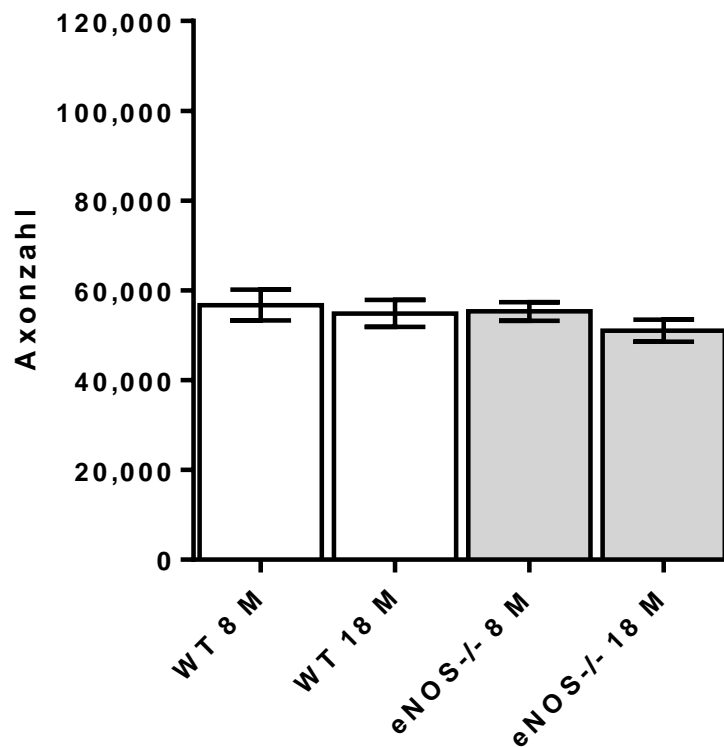


Abbildung 9: Axonzahl im Sehnervenquerschnitt. Angaben jeweils in Axon/Sehnerv \pm SEM ($n=8$ pro Gruppe). eNOS -/-: eNOS-Knockout. WT: Wildtyp.

4.4 Untersuchung der Gefäßreaktion mittels Videomikroskopie

Phenylephrin erzeugte bei den Aa. ophthalmicae in allen vier Gruppen von Versuchstieren eine Vasokonstriktion in vergleichbarem Ausmaß. Die endothelabhängige Vasodilatation durch ACh in aufsteigenden Konzentrationen fiel in allen 4 Gruppen annähernd gleich aus. Anschließend erfolgte die Untersuchung der endothelunabhängigen Gefäßreaktion mit Nitroprussid als NO-Donor in gesteigerten Konzentrationen. Hier zeigte sich eine verminderte Vasodilatation bei den achtzehnmonatigen WT-Mäusen im Vergleich zu den achtmonatigen WT-Mäusen. Bei den jungen und alten eNOS-Knockout-Mäusen zeigte sich hingegen kein Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die Untersuchungen zeigen, dass die Endothelfunktion bei den eNOS-Knockout-Mäusen im Alter nicht wesentlich verändert ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

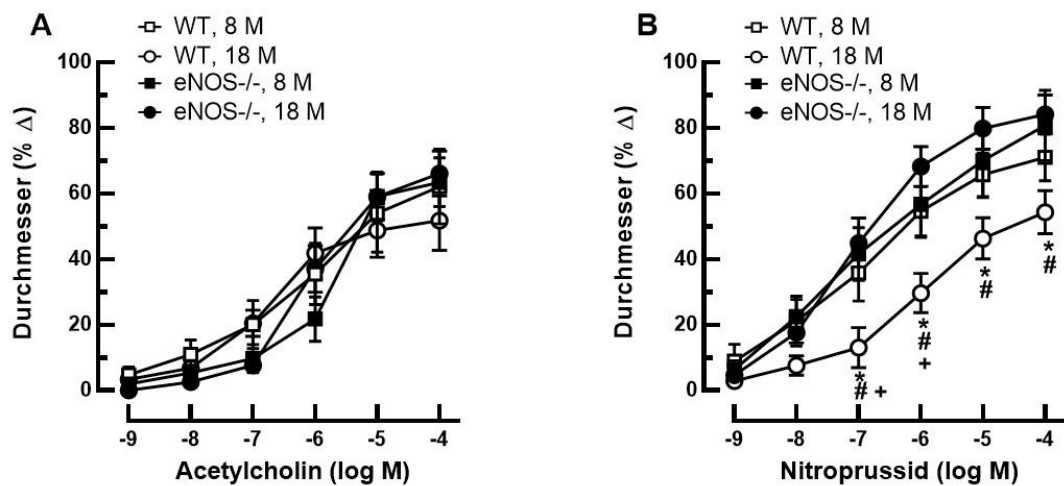


Abbildung 10: Gefäßreaktion der *A. ophthalmica* in der Videomikroskopie. Links: endothelabhängige Vasodilatation auf Acetylcholin. Rechts: endothelunabhängige Vasodilatation auf Nitroprussid. Angaben der Gefäßdurchmesserdifferenz %Δ nach Acetylcholin-/Nitroprussidapplikation im Vergleich zum Ausgangswert ± SEM (n=8 pro Gruppe). ENOS^{-/-}: eNOS-Knockout, WT: Wildtyp. + p<0,05 WT 18 M vs. WT 8 M; * p<0,05 WT 18 M vs. eNOS^{-/-} 18 M; # p<0,05 WT 18 M vs. eNOS^{-/-} 8 M.

5. Diskussion

5.1 Erkenntnisgewinn aus den durchgeführten Versuchen

1. Bei alten eNOS-Knockout-Mäusen ist die Neuronenanzahl in der retinalen Ganglienzellschicht signifikant vermindert.
2. Bei dieser verminderten Neuronenanzahl handelt es sich nicht um RGCs, da deren Axone im Sehnerv nicht vermindert sind, sondern wahrscheinlich um atypisch gelegene ACs.
3. Sowohl Augeninnendruck als auch die Endothelfunktion der A. ophthalmica ist bei alten eNOS-Knockout-Mäusen im Alter nicht wesentlich verändert.

5.2 Der Augeninnendruck ist vergleichbar zwischen eNOS-Knockout- und Wildtyp-Mäusen unabhängig vom Alter

Die Messung des IOD war ein wichtiger Schritt vor den anschließenden Experimenten, um grundsätzliche Unterschiede in den vier Gruppen der Versuchstiere auszuschließen. Die IOD-Messung wurde zur jeweils gleichen Tageszeit durchgeführt. Ein signifikant erhöhter IOD wäre als Störfaktor auf die nachfolgenden Experimente zu werten gewesen und hätte zum Ausschluss des Tieres an der Versuchsreihe geführt. Ein chronisch erhöhter IOD führt im Alter zu glaukomatösen Pathologien an der Retina, insbesondere Degeneration des N. opticus und Verlust der retinalen Ganglienzellen. (164–166) Ein bei eNOS-Knockout- und WT-Mäusen gleicher IOD ist demzufolge notwendig, um auszuschließen, dass der Neuronenverlust durch einen vergleichsweise erhöhten IOD zustande kommt und nicht durch Veränderungen in der Ausprägung der eNOS. Keines der Versuchstiere wies einen signifikant erhöhten IOD auf. Auch Laspas et al. konnten bei 8 Monate alten eNOS-Knockout-Mäusen keinen erhöhten IOD im Vergleich zur WT-Gruppe feststellen. (138)

Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den Untersuchungen durch Y. Lei et al. (167) In deren Versuchsreihe zur IOD-Messung bei acht bis zehn Monate alten eNOS-Knockout-Mäusen konnte ein signifikant erhöhter IOD im Vergleich zu den WT-Mäusen in der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Autoren vermuten, dass die eNOS das dominante NOS-Isoenzym in Zellen des Schlemm-Kanal und Zellen des Trabekelwerk ist und dass es bei dessen Fehlen zu einer Abflussbehinderung des Kammerwassers mit konsekutiver Erhöhung des Augeninnendruckes kommt. Konträr hierzu ist, dass in humanem Gewebe in Zellen des Trabekelwerks, Endothelzellen des Schlemmkanals sowie des Ziliarmuskels alle drei Isoformen der NOS nachgewiesen werden konnten. (168)

In den Kapillaren des Sehnervenkopfes bei WT-Ratten wurde nNOS in den Perizyten und eNOS in den Endothelzellen nachgewiesen. In den Astrozyten nachgewiesene nNOS sowie in reaktiven Astrozyten produziertes iNOS konnte bei chronisch erhöhtem IOD nach 3 Monaten vermehrt nachgewiesen werden. (95, 169, 170) Die eNOS in den Endothelzellen wurde jedoch bei chronisch erhöhtem IOD nicht vergleichsweise vermehrt exprimiert. Die Autoren dieser Untersuchung vermuten, dass glaukomatöse Spätfolgen mit Verlust von RGCs und Degeneration des N. opticus durch die vermehrte NO-Produktion durch nNOS und iNOS zustande kommen. (169, 170)

Das Ergebnis unserer IOD-Messung mit vergleichbaren Werten bei WT-Mäusen und eNOS-Knockout-Mäusen wird gestützt durch die Tatsache, dass in den retinalen Zellzählungen kein Ganglienzellverlust bei älteren eNOS-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden konnte, welcher bei chronisch erhöhtem IOD als glaukomatöse Spätfolge zu erwarten gewesen wäre.

5.3 Physiologischer Zellverlust im Alter in der Retina

Durch das Phänomen der Zellseneszenz ist die Anzahl der maximalen Zellteilungen in allen somatischen Zellen begrenzt. Mit zunehmendem Alter der Versuchstiere macht sich dieser Effekt an der insgesamt abnehmenden Zellzahl bemerkbar. Auch oxidativer und nitrosativer Stress, der in jedem aeroben Organismus physiologisch vorkommt, kann zu Zellschädigung und in Folge zu Zelltod führen. Im Verlauf des Lebens kumulieren diese Zellschäden, was ebenfalls zu einer Abnahme der Anzahl an somatischen Zellen führt. (147) In den vorliegenden Versuchsergebnissen spiegeln sich diese altersbedingten Veränderungen wider: In der Gruppe der WT-Mäuse zeigen die Ergebnisse der Zellzählungen an retinalen Ganzpräparaten eine Abnahme der Gesamtzellzahl im Alter. Auch in jeder Subtypisierung der Zellarten lässt sich diese verminderte Zellzahl nachvollziehen. Die Zahl der Endothelzellen weist die höchste Differenz in der Zellzahl zwischen jungen und alten Mäusen in der WT-Gruppe auf. Dies kann dadurch erklärt werden, dass sich Endothelzellen im Vergleich zu Neuronen häufiger teilen und somit die Zellalterung betreffenden Effekte hier mehr ins Gewicht fallen.

5.4 Ältere eNOS-Knockout-Mäuse weisen eine geringere Anzahl an Nervenzellen in der retinalen Ganglienzellschicht der Netzhaut auf als jüngere

In einer Untersuchung zu den verschiedenen NOS-Isoformen hat P. Laspas et al. die Neuronenanzahl in der retinalen Ganglienzellschicht an retinalen Ganzpräparaten bei acht bis zehn Monate alten eNOS-, iNOS- und nNOS-Knockout-Mäusen jeweils im Vergleich zu einer gleichaltrigen WT-Kontrollgruppe verglichen. Die Neuronenanzahl unterschied sich in keiner der genannten Gruppen signifikant. (138) Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit bei den acht

Monate alten eNOS-Knockout-Mäusen im Vergleich zur gleichaltrigen WT-Gruppe reproduziert werden. Ein Grund für die gleiche Neuronenzahl bei jungen eNOS-Knockout-Mäusen könnte sein, dass das Fehlen der eNOS durch die anderen NOS-Isoformen kompensiert wird oder dass die eNOS nicht essentiell für das Überleben von Neuronen in der Retina ist. Untersuchungen an humanen Koronararterien sowie murinen Aorten belegen die Beteiligung der nNOS an der Regulation des Gefäßtonus. (171, 172) Auch wenn die eNOS im Tiermodell mit Ratten während der Embryonalentwicklung und der ersten Lebensstage eine Rolle bei der Differenzierung von RGCs, Synaptogenese und neuronaler Plastizität in der retinalen Ganglienzellschicht zu spielen scheint (73, 136), hat das chronische Fehlen der eNOS nach acht Monaten keine verminderte Neuronenzahl zur Folge, scheint für die neuronale Entwicklung also nicht essentiell zu sein.

Als Fortführung dieser Überlegungen wurden in dieser Arbeit nun auch ältere eNOS-Knockout-Mäuse untersucht und ein Neuronenverlust in der alten eNOS-Knockout-Gruppe festgestellt. Die Zellzählungen wurden an mit der Kresylviolett-Färbung aufgearbeiteten retinalen Ganzpräparaten durchgeführt. Es zeigte sich ein Neuronenverlust bei den achtzehn Monate alten Versuchstieren in der eNOS-Knockout-Gruppe im Vergleich zu den gleichaltrigen Versuchstieren in der WT-Vergleichsgruppe. In der retinalen Ganglienzellschicht kommen neben Gliazellen und Endothelzellen hauptsächlich neuronale Zellen vor. Es finden sich neben RGCs auch atypisch gelegene ACs. Um weiterführend zu untersuchen, ob es sich bei dem Neuronenverlust bei alten eNOS-Knockout-Mäusen um RGCs handelt, wurden zusätzlich mit der Toluidin-Färbung bearbeitete Sehnervenquerschnitte untersucht. Mit dieser Methode können Axone gezählt werden und retrograd auf die Anzahl der retinalen Ganglienzellen rückgeschlossen werden, da jedes Axon eine Ganglienzelle in der Retina repräsentiert. (173)

Die Untersuchung der Sehnervenquerschnitte ergab keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Axone in beiden Altersgruppen sowie in der eNOS-Knockout-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe. Die Schlussfolgerung ist, dass es sich bei dem Nervenzellverlust in der Retina bei alten eNOS-Knockout-Mäusen nicht um retinale Ganglienzellen, sehr wahrscheinlich also um atypisch gelegene ACs handeln muss. Eine weitere Überlegung aus den vorliegenden Ergebnissen ist, dass der Grund für die Reduzierung der ACs möglicherweise ein kumulativer neurotoxischer Effekt ist, da die Reduzierung erst bei alten eNOS-Knockout-Mäusen auftritt. Alternativ könnte ein neuroprotektiver Mechanismus, der bei jungen eNOS-Knockout-Mäusen den Zelltod von ACs verhindert, im Alter nachlassen und einen vermehrten Zelltod von atypisch gelegenen ACs zur Folge haben.

5.5 Mögliche Mechanismen, die zur verminderten Anzahl von Nervenzellen in der retinalen Ganglienzellschicht bei älteren eNOS-Knockout-Mäusen beitragen könnten

Die Hochregulation von eNOS wurde als Kompensationsmechanismus beschrieben, um durch Vasodilatation der retinalen Gefäße und konsekutiv verbesserte Blutversorgung am N. opticus Pathologien wie beispielsweise der glaukomatösen Optikusneuropathie oder diabetischer Retinopathie entgegen zu wirken. (174–176) Bei diabetischen eNOS-Knockout-Mäusen konnten im Vergleich zu WT-Mäusen ausgeprägtere okuläre Gefäßschäden festgestellt werden. (177) Zusammenfassend sind dies Hinweise für eine zyto- und neuroprotektive Funktion der eNOS. Es kann also angenommen werden, dass bei chronischem Fehlen der eNOS durch endotheliale Dysfunktion im retinalen Gefäßbett Neuronen der Retina zugrunde gehen. Bei jungen eNOS-Knockout-Mäusen könnte die NO-vermittelte Vasodilatation wie oben bereits erwähnt durch nNOS-vermittelte NO-Produktion kompensiert werden. Zudem entfällt der zytotoxische Effekt durch oxidativen und nitrosativen Stress infolge entkoppelter eNOS. Im Alter könnte die vermutete Kompensation durch nNOS durch bisher ungeklärte Mechanismen nachlassen und zu vermehrten Zellschäden der retinalen Neurone führen.

Eine weitere mögliche Erklärung für die veränderte Anzahl an Neuronen in der retinalen Ganglienzellschicht im Alter bei eNOS-Knockout-Mäusen könnten durch NPY vermittelte neuroprotektive und zytotoxische Effekte sein. Bei eNOS-Knockout-Mäusen wurde eine vermehrte Expression von NPY in der Aorta nachgewiesen. Durch NPY wurde eine vaskuläre Entzündungsreaktion durch Chemotaxis von Makrophagen hervorgerufen, einem Atherosklerose begünstigender Prozess. (178) Das Vorkommen von NPY in den okulären Gefäßen wurde bisher erst wenig untersucht. Allerdings konnte in den vorliegenden Versuchen zur Gefäßfunktion der A. ophthalmica in keiner Versuchsgruppe eine verminderte Vasodilatation als Hinweis auf eine vorliegende Atherosklerose festgestellt werden.

NPY ist ein im zentralen Nervensystem häufig vorkommendes Neuropeptid. In zwei verschiedenen Typen von ACs in der inneren Körnerzellschicht und in der Ganglienzellschicht wurde bei verschiedenen Spezies der Neurotransmitter NPY nachgewiesen, das zudem am häufigsten vorkommende Neuropeptid in den ACs. (35, 179, 180) Die Verteilung dieser NPY-positiven ACs in der Retina ist sehr gleichmäßig, was die Autoren eine Beteiligung an der Weiterleitung oder Modifikation von räumlichen Details an visuellen Informationen vermuten lässt. (35) Auch in Endothelzellen sowie Gliazellen wie Astrozyten und Müller-Zellen und Mikrogliazellen wurde NPY nachgewiesen. Des Weiteren gelang auch der Nachweis von den NPY-Rezeptoren Y_1 , Y_2 , Y_4 und Y_5 in der Retina von Ratten. (181) Alle Y-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. (182)

NPY ist ein Modulator der Zellproliferation. Es inhibiert die Proliferation humaner Pigmentepithelzellen (183) und fördert unter anderem die Proliferation von Müller-Zellen über

den Y₁-Rezeptor, Endothelzellen über Y₁, Y₂ und Y₅-Rezeptoren sowie in der Zellkultur neuronale Zellen der Retina über Y₁, Y₂ und Y₅-Rezeptoren. (184–186) Durch Bindung an Y₁, Y₂ und Y₅-Rezeptoren kommt es zur Aktivierung von NOS. Über durch NO aktivierte lösliche Guanylylcyclase wird cGMP gebildet, welches die Extracellular-signal regulated Kinases (ERK) 1/2 aktiviert. ERK 1/2 kann auch direkt über NPY-Rezeptoren phosphoryliert und aktiviert werden. (186) ERK 1/2 phosphoryliert als Serin/Threonin-Kinase Transkriptionsfaktoren, wodurch über vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen Zellproliferation stimuliert wird. (187) Bisher wurde nicht untersucht, durch welche der NOS-Isoformen ERK1/2 aktiviert wird. Sollte es sich um die eNOS handeln, könnte ein Fehlen der eNOS durch einen im Alter kumulativen Effekt der verminderten Zellproliferation eine verminderte Anzahl der atypisch gelegenen ACs zur Folge haben.

Der Y₁-Rezeptor ist postsynaptisch gelegen. (188) Der Y₂-Rezeptor befindet sich an der Präsynapse und fungiert als inhibitorischer Autorezeptor, der die Ausschüttung von NPY und anderen Neurotransmittern reguliert. (189) Im zentralen Nervensystem spielt NPY eine Rolle als neuroprotektiver Neurotransmitter. Es reduziert beispielsweise im Hippocampus über den Y₂-Rezeptor die Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern sowie Glutamat (190–192), welches bei exzessiver NMDA- und AMPA-Rezeptor-Aktivierung über Exzitotoxizität zu Apoptose von Neuronen führen kann. Untersuchungen der Y-Rezeptor-Subtyp-Expression in RGCs und ACs der retinalen Ganglienzellschicht könnten Aufschluss über die vermuteten NPY-vermittelten proliferativen sowie neuroprotektiven Mechanismen in der Retina geben sowie Unterschiede in der unterschiedlichen Zellzahl von RGCs und atypisch gelegenen ACs im Alter bei eNOS-Knockout-Mäusen erklären.

Das Vorkommen von NOS-Aktivität wurde in RGCs und ACs in der inneren Körnerzellschicht sowie retinalen Ganglienzellschicht nachgewiesen. Unklar ist jedoch, welche der NOS-Isoformen in den verschiedenen Zellarten vorkommen. Die Gruppe der ACs, inklusive der atypisch gelegenen, ist zudem inhomogen und könnte je nach Subtyp und Funktion verschiedene NOS-Isoformen exprimieren. Je nach Verteilungsmuster der eNOS und nNOS könnte auf die Auswirkung des chronischen Fehlens der eNOS und die möglichen Kompensationsmechanismen durch nNOS geschlossen werden, was weitere Untersuchungen notwendig macht.

Tran et al. untersuchten, ob bestimmte genetische Marker die Widerstandsfähigkeit von RGCs bei pathologischen Zuständen vorhersagen können. Nach Läsion des N. opticus gab es Subgruppen der RGCs, die fast gänzlich oder aber deutlich weniger zugrunde gingen als andere RGC-Cluster. Auch wenn kein Gen gefunden wurde, welches die Widerstandskraft einer bestimmten RGC voraussagen konnte, wurden Gene gefunden, die ausschließlich in den widerstandsfähigeren RGCs exprimiert wurden. (24) Aus diesen Untersuchungen lässt sich

schließen, dass es verschiedene Strategien der zelleigenen Neuroprotektion in den verschiedenen Subgruppen der RGCs geben könnte. Die ACs sind ebenfalls eine heterogene Neuronengruppe. Untersuchungen der Genexpression der im Alter oder bei pathologischen Zuständen verbleibenden vitalen ACs könnte Aufschluss geben über deren neuroprotektive zelleigene Mechanismen.

5.6 Die Anzahl an retinalen Endothelzellen der eNOS-Knockout-Mäuse und der Wildtyp-Mäuse ist vergleichbar

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eNOS als auch in geringerem Ausmaß auch iNOS in der Retina eine Rolle bei der VEGF-vermittelten Angiogenese spielt. (193, 194) Bezüglich der Angiogenese in der postnatalen Entwicklung bei eNOS-Knockout-Mäusen kommen verschiedene Autoren zu unterschiedlichen Ergebnissen. Ha et al. beobachteten bei sechs Tage alten eNOS-Knockout-Mäusen eine Wachstumsretardierung sowie eine verzögerte Angiogenese in der Retina. (194) In einer weiteren Untersuchung von eNOS-Knockout-Mäusen im Alter von einem Tag bis zu sechs Monaten zeigte sich eine im Vergleich zur WT-Gruppe normale Angiogenese sowie eine zusätzliche Expression der nNOS auch an kleineren Blutgefäßen bei eNOS-Knockout-Mäusen, die bei WT-Mäusen nicht nachgewiesen werden konnte. (145) Auch in humanen fetalen retinalen Endothelzellen wurde eine präpartale Expression von sowohl eNOS als auch nNOS nachgewiesen. (195) Die Endothelzellzahl war in der vorliegenden Arbeit bei acht Monate alten sowie achtzehn Monate alten eNOS-Knockout-Mäusen mit der Zellzahl der jeweiligen WT-Kontrollgruppe vergleichbar. Sollte die Angiogenese bei eNOS-Knockout-Mäusen postpartal zunächst verzögert ablaufen, scheint sich dieser Effekt im Laufe der weiteren Entwicklung auszugleichen. Kompensationsmechanismen durch andere NOS-Isoformen, könnten hier eine Rolle spielen. Des Weiteren könnten auch NO-unabhängige Wachstumsfaktoren, wie z.B. der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 bei Fehlen der eNOS die postnatale Angiogenese begünstigen. (146, 196).

5.7 Vergleichbare Endothelfunktion der A. ophthalmica bei jungen und alten eNOS-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen

Die durchgeführte Methodik zur Messung der Gefäßreaktion ist bereits mehrfach beschrieben worden, gut erprobt und ein mittlerweile etabliertes Verfahren. (88, 138)

Die Experimente zeigen, dass die Endothelfunktion der A. ophthalmica bei alten Mäusen, nicht schlechter ist als bei jungen Mäusen, insbesondere in der eNOS-Knockout-Gruppe. Aus diesem Ergebnis lassen sich zwei Rückschlüsse ziehen.

Erstens zeigt es, dass das chronische Fehlen der eNOS an der A. ophthalmica auch bei älteren Versuchstieren nicht die Gefäßfunktion beeinflusst. Hinweise darauf gibt es bereits durch eine Versuchsreihe von Laspas et al., der die Gefäßreaktion der A. ophthalmica auf Nitroprussid und ACh bei eNOS-, iNOS- und nNOS-Knockout-Mäusen untersucht hat. (138) Eine andere Untersuchung der retinalen Arteriolen bei iNOS-Knockout-Mäusen sowie WT-Mäusen mit selektiven und unselektiven NOS-Inhibitoren zeigte, dass die ACh-vermittelte Vasodilatation an den Arteriolen am ehesten durch eNOS erzeugt wird. (70) Dies konnte eine weitere Untersuchung an den retinalen Arteriolen von drei bis sechs Monate alten eNOS-Knockout-Mäusen bestätigen. (197) Die vasodilatatorischen Mechanismen sind demzufolge abhängig vom jeweiligen Gefäßbett. Das Alter der Versuchstiere in den ersten beiden beschriebenen Studien betrug jeweils 260 ± 8 Tage bzw. sieben bis acht Monate, ist also mit der Gruppe der acht Monate alten Knockout-Mäuse in dieser Arbeit vergleichbar. Die Endothelfunktion bei alten Knockout-Mäusen wurde bisher jedoch noch nicht untersucht.

Die zweite Erkenntnis aus den vorliegenden Ergebnissen ist, dass die verminderte Anzahl neuronaler Zellen im zweiten Versuch unabhängig von der Durchblutung der A. ophthalmica zu sein scheint. In der oben genannten Untersuchung an drei bis sechs Monate alten eNOS-Knockout-Mäusen konnte jedoch eine Endotheldysfunktion an retinalen Arteriolen gezeigt werden. Diese wurde zudem teilweise durch nNOS und Metaboliten der Cyclooxygenase-2 (COX-2), zu denen auch PGI₂ gehört, kompensiert. (197) Eine chronische Endotheldysfunktion durch Fehlen von eNOS könnte im Alter zu Schäden an retinalen Neuronen führen. Ergänzend zu der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung zur Gefäßfunktion der A. ophthalmica bleibt die Frage offen, inwiefern sich die gestörte Endothelfunktion an den retinalen Arteriolen bei alten im Vergleich zu jungen eNOS-Knockout-Mäusen weiter verschlechtert und ob die oben genannten Kompensationsmechanismen durch nNOS und COX-2 im Alter nachlassen.

Die Gefäßdilataion auf Nitroprussid ist bei alten im Vergleich zu jungen WT-Mäusen reduziert bei gleichzeitig erhaltener Vasodilatation durch ACh. Nitroprussid nimmt als NO-Donor in der Signalkaskade der vaskulären Dilatation in der A. ophthalmica eine dem cholinergen M₃-

Rezeptor nachgeschaltete Funktion ein, es handelt sich also um eine endothelunabhängige Vasodilatation. Dieses Ergebnis ist kongruent zu den Erkenntnissen von Kim et al. sowie N. Cuprita et al., deren Versuchsergebnisse ebenfalls eine verminderte Vasodilatation der Aorta durch Nitroprussid bei alten im Vergleich zu jungen Ratten bzw. Kaninchen zeigte. (198, 199) Versuche an anderen Gefäßen wie der zuführenden Arterie des M. soleus kamen zum gegenteiligen Ergebnis. (200) Mit zunehmendem Alter kommt es zu einer Zunahme der Elastokalzinose in den Gefäßwänden der Arterien. Diese Kalzifizierung betrifft die Tunica Media, in der sich glatte Muskelzellen, elastische und kollagene Bindegewebsfasern befinden, und führt zu einer Abnahme der Gefäßelastizität im Alter. Eine Abnahme der Vasodilatation durch Nitroprussid könnte die Folge sein. Die zunehmende Gefäßversteifung durch Elastokalzinose im Alter ist ausgeprägter bei großlumigeren und zentraleren Arterien. (201) Die unterschiedlichen Ergebnisse der Gefäßreaktion auf Nitroprussid in den oben genannten Studien könnten bedingt sein durch die unterschiedliche Größe der untersuchten Gefäße.

Eine Untersuchung von M. Delp, die die Gefäßreaktion von ACh an den Segmenten der Aorta abdominalis bei jungen und alten Ratten vergleicht, beschreibt eine verminderte Vasodilatation durch ACh sowie Nitroprussid-Natrium bei alten Versuchstieren. (202) Autoren mit ähnlichen Beobachtungen vermuten, dass die verfügbare Menge von intrazellulärem cGMP in der Zelle im Alter nachlässt. Gründe hierfür könnten eine vermehrte Verstoffwechslung von cGMP durch erhöhte Phosphodiesterase-Aktivität oder eine verringerte cGMP-Erzeugung auf Grund von verminderter Guanylatcyclase-Aktivität sein. (202–204) Ein alternativer Mechanismus könnte eine Veränderung der dem cGMP nachgeschalteten Proteinkinase-Signalweg sein. (202) Y. Dohi et al. fanden heraus, dass bei Mesenterialarterien von Ratten mit zunehmendem Alter die endotheliale NO-Produktion nachlässt und die Menge an vasokonstriktorisch wirkendem Endothelin-1 zunimmt. (205, 206)

Zusammenfassend sprechen die vorliegenden Ergebnisse der verminderten Vasodilatation bei alten WT-Mäusen am ehesten für ein bei der Messung entstandenes Artefakt. Gründe, die gegen die Wertigkeit dieser Messung sprechen, sind, dass erstens die A. ophthalmica ein sehr kleines Gefäß ist und die Elastokalzinose eine untergeordnete Rolle spielen sollte. Zweitens ist die Vasodilatation durch Nitroprussid ein der M₃-Rezeptor-Aktivierung durch ACh nachgeschalteter Mechanismus und in der vorliegenden Untersuchung wurde gezeigt, dass dieser endothelabhängige Mechanismus bei alten WT-Mäusen erhalten geblieben ist. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Messung der Gefäßreaktion auf Nitroprussid die letzte der durchgeführten Messungen darstellt. Während der zuvor durchgeführten Messungen am gleichen Gefäß mit wiederholten Veränderungen des Gefäßdurchmessers durch elektrochemische Manipulationen könnte es bei dem möglicherweise durch erhöhtes Alter vulnerablen Gefäßes zu mikroskopischen Schäden an der Gefäßwand jenseits des Endothels,

beispielsweise der muskulären Anteile der Tunica media gekommen sein, die eine adäquate Gefäßreaktion nicht mehr möglich machen.

5.8 Fehlerdiskussion

In der vorliegenden Versuchsreihe wurden retinale Ganzpräparate verwendet, um Zellzählungen durchzuführen. Die Zellzählung erfolgte manuell und verblindet. Alternativ gibt es auch die Möglichkeit zur automatischen Zellzählung mit spezialisierter Software. M. Salinas-Navarro beschreibt eine automatische Zellzählung an retinalen Ganzpräparaten. Die Ganglienzellen wurden in der Studie mit einer Fluorogold-Färbung markiert, es gab also nur eine auszuzählende Zellart. (6, 7) Da bei dieser Methode das gesamte retinale Ganzpräparat ausgezählt wird, sind auch genauere quantitative Angaben zur Zellzahl möglich und der Zeitaufwand ist deutlich geringer. (6) Unser Experiment machte die Färbung des retinalen Ganzpräparates mit Kresylviolett notwendig, um auch andere Zelltypen in der retinalen Ganglienzellschicht unterscheiden zu können. Ob eine automatische Zellzählung mit zufriedenstellendem Ergebnis hinsichtlich Fehleranfälligkeit auch mit der Kresylviolett-Färbung möglich ist, bleibt derzeit noch offen. Mit der manuellen Zählmethode werden ausreichend genaue Ergebnisse der Zellzahl ermittelt.

Eine Fehlerquelle bei der Axonzählung sind kleine efferente Axone mit dünnen Myelinscheiden, die einen ähnlichen Querschnitt wie die Afferenzen der retinalen Ganglienzellen aufweisen. Daher wird empfohlen, eine axonspezifische Färbung am Sehnervenquerschnitt durchzuführen. (207) Die Färbung mit Toluidinblau ist als lange erprobtes Verfahren zur Färbung von histologischem Gewebe vielseitig einsetzbar. An Sehnervenquerschnitten werden die Myelinscheiden blau gefärbt, während das Zellplasma weitestgehend ungefärbt bleibt. Mit der Toluidinblau-Färbung wird bei semidünnen Gewebeschnitten eine scharfe Randbegrenzung der Myelinscheiden sichtbar, sodass die Dicke der Myelinscheide optisch gut einzuordnen ist. Obwohl die Toluidinblau-Färbung nicht axonspezifisch ist, bildet sie auf Grund der guten Darstellbarkeit der axonalen Strukturen sowie der einfachen Durchführbarkeit das Verfahren der Wahl bei der Aufarbeitung von Sehnervenquerschnitten für die Lichtmikroskopie. (160)

Beim Präparieren der A. ophthalmica wurde sorgfältig darauf geachtet, Endothelschäden zu vermeiden. Dennoch aufgetretene Endothelschäden hätten eine verminderte Vasodilatation durch ACh gezeigt, da es wie bereits bekannt seine vasodilatatorische Wirkung an der A. ophthalmica endothelabhängig über den M₃-Rezeptor entfaltet. (88, 162)

6. Zusammenfassung

6.1 Fazit

Das chronische Fehlen der eNOS bewirkt eine Reduktion der Neuronenzahl in der retinalen Ganglienzellschicht, nicht jedoch der Ganglienzellen im Alter. Diese Reduktion ist offensichtlich IOD- und durchblutungsunabhängig. Mögliche Ursachen für die verminderte Neuronenzahl können in der fehlenden zytoprotektiven vasodilatatorischen Wirkung von durch eNOS gebildetem NO liegen. Des Weiteren könnten NPY-vermittelte neuromodulatorische Effekte durch ERK1/2 oder NPY-vermittelte neuroprotektive Effekte eine Rolle spielen. Bei jungen eNOS-Knockout-Mäusen gab es keine Unterschiede bezüglich der Endothelzellichte im Vergleich zur WT-Gruppe. Eine gestörte Angiogenese durch präpartales Fehlen der eNOS ist somit unwahrscheinlich. Es wird vermutet, dass andere NOS-Isoformen, wie z.B. die nNOS, das chronische Fehlen der eNOS kompensieren.

6.2 Ausblick

Durch die Färbung von retinalen Ganzpräparaten wurden Neurone der retinalen Ganglienzellschicht angefärbt. Durch die nachfolgende Axonzählungen an mit Toluidinblau gefärbten Sehnervenquerschnitten konnte auf die Anzahl der RGCs geschlossen werden. Der beobachtete Zellverlust betraf mutmaßlich nicht die RGCs, sondern atypisch gelegene ACs der retinalen Ganglienzellschicht. Um diese Hypothese abschließend zu bestätigen, sollte eine direkte Färbung von atypisch gelegenen ACs in der Retina bei jungen und alten eNOS-Knockout-Mäusen sowie einer WT-Kontrollgruppe erfolgen.

Weiterhin unklar bleibt die Auswirkung von oxidativem und nitrosativem Stress bei alten eNOS-Knockout-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe. In weiterführenden Experimenten könnten oxidierte und nitrierte Proteine im Gewebe alter eNOS-Knockout-Mäuse im Vergleich zur WT-Gruppe nachgewiesen werden. Auf diese Weise könnte das Ausmaß an über die Zeit kumuliertem oxidativem und nitrosativem Stress verglichen werden und auf deren vermutete Auswirkungen auf Zellsterben rückgeschlossen werden.

Um die Ursache der verminderten Anzahl an atypisch gelegenen ACs bei alten eNOS-Knockout-Mäusen besser zu verstehen, sind weiterführende Untersuchungen zum Vorkommen der verschiedenen NOS-Isoformen in den einzelnen Zellarten der Retina notwendig. Auch eine Analyse zur Y-Rezeptor-Subtyp-Expression in RGCs und ACs der Retina könnte Aufschluss über die vermuteten NPY-vermittelten proliferativen Mechanismen in der Retina geben. Ebenfalls unklar ist bisher, durch welche NOS-Isoform ERK1/2 aktiviert

wird und ob ein Zusammenhang mit der verminderten Anzahl an Neuronen im vorliegenden Experiment besteht.

Schließlich sollte sich eine Untersuchung der Endothelfunktion der retinalen Arteriolen bei alten eNOS-Knockout-Mäusen anschließen. Hierdurch könnten der Frage nachgegangen werden, welche Langzeit-Auswirkungen durch möglicherweise verminderte Vasodilatation beim chronischen Fehlen der eNOS entstehen.

7. Literaturverzeichnis

1. Grehn F. Augenheilkunde. 30., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2008. (Springer-Lehrbuch). Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-75275-2>.
2. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker KH. Prometheus Lernatlas - Kopf, Hals und Neuroanatomie. 2., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2009. Verfügbar unter: https://eref.thieme.de/referenz-webapp/ebooks/868855#/ebook_868855_SL8562378.
3. Dräger U, Olsen JF. Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981; 3(20):285–93.
4. Buhl EH, Dann JF. Morphological Diversity of Displaced Retinal Ganglion Cells in the Rat: A Lucifer Yellow Study. *J Comp Neurol* 1988; 269(2):210–8. doi: 10.1002/cne.902690206.
5. Williams RW, Strom RC, Rice DS, Goldowitz D. Genetic and Environmental Control of Variation in Retinal Ganglion Cell Number in Mice. *J. Neurosci.* 1996; 16(22):7193–205.
6. Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Holmes TM, Lund RD et al. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res* 2009; 49(1):115–26. doi: 10.1016/j.visres.2008.09.029.
7. Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Mayor S et al. Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: A computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Res* 2009; 49(6):637–47. doi: 10.1016/j.visres.2009.01.010.
8. Jelinek HF, Ristanović D, Milošević NT. The morphology and classification of alpha ganglion cells in the rat retinae: A fractal analysis study. *J Neurosci Methods* 2011; 201(1):281–7. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.07.027.
9. Hartline HK. The response of single optic nerve fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina. *The American Journal of Physiology* 1937; 121(2):400–15.
10. Kuffler SW. Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J Neurophysiol* 1951; 16(1):37–68.
11. Barlow HB, Hill RM, Levick WR. Retinal ganglion cells responding selectively to direction and speed of image motion in the rabbit. *J Physiol* 1964; 173(3):377–407.
12. Weng S, Sun W, He S. Identification of ON-OFF direction-selective ganglion cells in the mouse retina. *J Physiol* 2005; 562(3):915–23. doi: 10.1113/jphysiol.2004.076695.
13. Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 2002; 295(5557):1065–70. doi: 10.1126/science.1069609.
14. Cleland BG, Levick WR. Properties of rarely encountered types of ganglion cells in the cat's retina and an overall classification. *J Physiol* 1974; 240(2):457–92.
15. Troy JB, Shou T. The receptive fields of cat retinal ganglion cells in physiological and pathological states: where we are after half a century of research. *Prog Retin Eye Res* 2002; 21(3):263–302.

16. Simpson JI. The Accessory Optic System. *Annual Review of Neuroscience* 1984; 7:13–41.
17. Rodieck RW, Watanabe M. Survey of the Morphology of Macaque Retinal Ganglion Cells That Project to the Pretectum, Superior Colliculus, and Parvicellular Laminae of the Lateral Geniculate Nucleus. *J Comp Neurol* 1993; 338(2):289–3030.
18. Amthor FA, Oyster CW, Takahashi ES. Morphology of on-off direction-selective ganglion cells in the rabbit retina. *Brain Research* 1984; 298(1):187–90.
19. Boycott BB, Wässle H. The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J Physiol* 1974; 240(2):397–419.
20. Kim I-J, Zhang Y, Yamagata M, Meister M, Sanes JR. Molecular identification of a retinal cell type that responds to upward motion. *Nature* 2008; 452(7186):478–82. doi: 10.1038/nature06739.
21. Siegert S, Scherf BG, Del Punta K, Didkovsky N, Heintz N, Roska B. Genetic address book for retinal cell types. *Nat Neurosci* 2009; 12(9):1197–204. doi: 10.1038/nn.2370.
22. Baden T, Berens P, Franke K, Román Rosón M, Bethge M, Euler T. The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse. *Nature* 2016; 529(7586):345–50. doi: 10.1038/nature16468.
23. Bae JA, Mu S, Kim JS, Turner NL, Tartavull I, Kemnitz N et al. Digital museum of retinal ganglion cells with dense anatomy and physiology. *Cell* 2018; 173(5):1293-1306.e19. doi: 10.1016/j.cell.2018.04.040.
24. Tran NM, Shekhar K, Whitney IE, Jacobi A, Benhar I, Hong G et al. Single-cell profiles of retinal ganglion cells differing in resilience to injury reveal neuroprotective genes. *Neuron* 2019; 104(6):1039-1055.e12. doi: 10.1016/j.neuron.2019.11.006.
25. Pourcho RG, Goebel DJ. Neuronal Subpopulations in Cat Retina Which Accumulate the GABA agonist, (³H)Muscimol: A Combined Golgi and Autoradiographic Study. *J Comp Neurol* 1983; 219(1):25–35. doi: 10.1002/cne.902190104.
26. Menger N, Pow DV, Wässle H. Glycinergic Amacrine Cells of the Rat Retina. *J Comp Neurol* 1998; 401(1):34–46. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19981109)401:1<34::AID-CNE3>3.0.CO;2-P.
27. MacNeil MA, Masland RH. Extreme Diversity among Amacrine Cells: Implications for Function. *Neuron* 1998; 20(5):971–82.
28. Wright LL, Vaney DI. The fountain amacrine cells of the rabbit retina. *Vis Neurosci* 2000; 17(1):1145R-1156R. doi: 10.1017/s0952523800171160.
29. Masland RH, Livingstone CJ. Effect of Stimulation With Light on Synthesis and Release of Acetylcholine by an Isolated Mammalian Retina. *J Neurophysiol* 1976; 39(6):1210–9.
30. Voigt T. Cholinergic Amacrine Cells in the Rat Retina. *J Comp Neurol* 1986; 248(1):19–35. doi: 10.1002/cne.902480103.
31. Karten HJ, Brecha N. Localisation of substance P immunoreactivity in amacrine cells of the retina. *Nature* 1980; 283(5742):87–8.
32. Frederick JM, Rayborn ME, Laties AM, Lam DM, Hollyfield JG. Dopaminergic Neurons in the Human Retina. *J Comp Neurol* 1982; 210(1):65–79. doi: 10.1002/cne.902100108.

33. Osborne NN, Nesselhut T, Nicholas DA, Patel S, Cuello AC. Serotonin-Containing Neurons in Vertebrate Retinas. *Journal of Neurochemistry* 1982; 39(6):1519–28. doi: 10.1111/j.1471-4159.1982.tb07984.x.
34. Terubayashi H, Tsuto T, Fukui K, Obata HL, Okamura H, Fujisawa H et al. VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide)-like Immunoreactive Amacrine Cells in the Retina of the Rat. *Exp Eye Res* 1982; 36(5):743–9.
35. Hutsler JJ, Chalupa LM. Neuropeptide Y Immunoreactivity Identifies a Regularly Arrayed Group of Amacrine Cells Within the Cat Retina. *J Comp Neurol* 1994; 346(4):481–9. doi: 10.1002/cne.903460402.
36. Yazulla S, Studholme KM, McIntosh HH, Deutsch DG. Immunocytochemical Localization of Cannabinoid CB1 Receptor and Fatty Acid Amide Hydrolase in Rat Retina. *J. Comp. Neurol.* 1999; 415(1):80–90. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19991206)415:1<80::AID-CNE6>3.0.CO;2-H.
37. Cristiani R, Fontanesi G, Casini G, Petrucci C, Viollet C, Bagnoli P. Expression of Somatostatin Subtype 1 Receptor in the Rabbit Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(10):3193–9.
38. Lee SCS, Weltzien F, Madigan MC, Martin PR, Grünert U. Identification of All Amacrine, Displaced Amacrine, and Bistratified Ganglion Cell Types in Human Retina With Antibodies Against Calretinin. *J Comp Neurol* 2016; 524(1):39–53. doi: 10.1002/cne.23821.
39. Jeon C-J, Strettoi E, Masland RH. The Major Cell Populations of the Mouse Retina. *The Journal of neuroscience* 1998; 18(21):8936–46.
40. Wässle H, Grünert U, Röhrenbeck J, Boycott BB. Retinal ganglion cell density and cortical magnification factor in the primate. *Vision Res* 1990; 30(11):1897–990.
41. Pérez De Sevilla Müller L, Shelley J, Weiler R. Displaced Amacrine Cells of the Mouse Retina. *J Comp Neurol* 2007; 505(2):177–89. doi: 10.1002/cne.21487.
42. Kolb H, Linberg KA, Fisher SK. Neurons of the Human Retina: A Golgi Study. *J Comp Neurol* 1992; 318(2):147–87. doi: 10.1002/cne.903180204.
43. Goldstein IM, Ostwald P, Roth S. Nitric Oxide: A Review of Its Role in Retinal Function and Disease. *Vision Res* 1996; 36(18):2979–94.
44. Zembowicz A, Hecker M, Macathur H, Sessa WC, Vane JR. Nitric oxide and another potent vasodilator are formed from N-hydroxy-L-arginine by cultured endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(24):11172–6.
45. Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramid cells: Implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(10):4214–8.
46. Xia N, Horke S, Habermeier A, Closs EI, Reifenberg G, Gericke A et al. Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36(1):78–85.
47. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I et al. Nitric Oxide Synthase Isozymes: Characterization, Purification, Molecular Cloning, and Functions. *Hypertension* 1994; 23(6 Pt 2):1121–31.

48. Mayer B, John M, Heinzel B, Werner ER, Wachter H, Schultz G et al. Brain nitric oxide synthase is a biopterin - and flavin - containing multi - functional oxido - reductase. *FEBS Letters* 1991; 288(1,2):187–91.
49. Nathan C, Xie Q-w. Nitric Oxide Synthases: Roles, Tolls, and Controls. *Cell* 1994; 78(6):915–8. doi: 10.1016/0092-8674(94)90266-6.
50. Cho HJ, Xie Q-w, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD et al. Calmodulin Is a Subunit of Nitric Oxide Synthase from Macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 1992; 176(2):599–604.
51. Perella MA, Yoshizui M, Fen Z, Tsai J-C, Hsieh C-M, Kourembanas S et al. Transforming Growth Factor- β 1, but Not Dexamethasone, Down-regulates Nitric-oxide Synthase mRNA after Its Induction by Interleukin-1 β in Rat Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem* 1994; 269(20):14595–600.
52. Kunz D, Mühl H, Walker G, Pfeilschifter J. Two distinct signaling pathways trigger the expression of inducible nitric oxid synthase in rat renal mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(12):5387–91.
53. Venema RC, Ju H, Zou R, Ryan JW, Venema VJ. Subunit Interactions of Endothelial Nitric-oxide Synthase: Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem* 1997; 272(2):1276–82.
54. Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen Reduction by Nitric-oxide Synthases. *J Biol Chem* 2001; 276(18):14533–6. doi: 10.1074/jbc.R100011200.
55. Zhang M, Abrams C, Wang L, Gizzi A, He L, Lin R et al. Structural basis for calmodulin as a dynamic calcium sensor. *Structure* 2012; 20(5):911–23. doi: 10.1016/j.str.2012.03.019.
56. Adak S, Sharma M, Meade AL, Stuehr DJ. A conserved flavin-shielding residue regulates NO synthase electron transfer and nicotinamide coenzyme specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(12):13516–21.
57. Eldred WD, Blute TA. Imaging of nitric oxide in the retina. *Vision Res* 2005; 45(28):3469–86. doi: 10.1016/j.visres.2005.07.033.
58. Müller-Esterl W, Brandt U. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Korrigierter Nachdruck 2009 der 1. Aufl. 2004.* Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2009.
59. Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Kadowitz PJ, Ignarro LJ. Coronary Arterial Relaxation and Guanylate Cyclase Activation by Cigarette Smoke, N'-Nitrososornicotine and Nitric Oxide. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1980; 214(1):9–15.
60. Lincoln TM, Komalavilas P, Cornwell TL. Pleiotropic Regulation of Vascular Smooth Muscle Tone by Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase. *Hypertension* 1994; 23(6):1141–7.
61. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, Jonge HR de. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends in Biochemical Sciences* 1997; 22(8):307–12.
62. McClellan GB, Winegrad S. Cyclic Nucleotide Regulation of the Contractile Proteins in Mammalian Cardiac Muscle. *Journal of General Physiology* 1980; 75(8):283–95.

63. O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: Evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 88(24):11285–9.
64. Li CG, Rand MJ. Evidence that part of the NANC relaxant response of guinea-pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1991; 102(1):91–4.
65. Man JG de, Pelckmans PA, Boeckstaens GE, Bult H, Oosterbosch L, Herman AG et al. The role of nitric oxide in inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in the canine lower oesophageal sphincter. *Br J Pharmacol* 1991; 103(1):1092–6.
66. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(11):4651–5.
67. Uttam CG, Hassid A. Nitric oxide-generating Vasodilators and 8-Bromo-Cyclic Guanosine Monophosphate Inhibit Mitogenesis and Proliferation of Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Clinical Investigation* 1989; 83(5):1774–7.
68. Hogan M, Cerami A, Bucala R. Advanced Glycosylation Endproducts Block the Antiproliferative Effect of Nitric Oxide. *Journal of Clinical Investigation* 1992; 90(3):1110–5.
69. Haverkamp S, Kolb H, Cuenca N. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is localized to Müller cells in all vertebrate retinas. *Vision Res* 1999; 39(14):2299–303. doi: 10.1016/S0042-6989(99)00007-3.
70. Gericke A, Goloborodko E, Sniatecki JJ, Steege A, Wojnowski L, Pfeiffer N. Contribution of nitric oxide synthase isoforms to cholinergic vasodilation in murine retinal arterioles. *Exp Eye Res* 2013; 109:60–6. doi: 10.1016/j.exer.2013.01.012.
71. Kashiwagi K, Iizuka Y, Mochizuki S, Tsumamoto Y, Mishima HK, Araie M et al. Differences in nitric oxide production: a comparison of retinal ganglion cells and retinal glial cells cultured under hypoxic conditions. *Molecular Brain Research* 2003; 112(1-2):126–34. doi: 10.1016/S0169-328X(03)00058-5.
72. Li S, Tay D, Shu S, Bao X, Wu Y, Wang X et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Is Expressed in Amacrine Cells of Developing Human Retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(5):2141–9. doi: 10.1167/iovs.04-1202.
73. Tsumamoto Y, Yamashita K, Takumida M, Okada K, Mukai S, Shinya M et al. In situ localization of nitric oxide synthase and direct evidence of NO production in rat retinal ganglion cells. *Brain Research* 2002; 933(2):118–29.
74. Tekmen-Clark M, Gleason E. Nitric oxide production and the expression of two nitric oxide synthases in the avian retina. *Vis Neurosci* 2013; 30(3):91–103. doi: 10.1017/S0952523813000126.
75. Sharma RK, Warfvinge K, Ehinger B. Expression of Nitric Oxide Synthase during the Development of RCS Rat Retinas. *Ophthalmologica* 2001; 215(3):222–8.
76. Neufeld AH, Shareef S, Pena J. Cellular Localization of Neuronal Nitric Oxide Synthase (NOS-1) in the Human and Rat Retina. *J. Comp. Neurol.* 2000; 416(2):269–75. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(20000110)416:2<269::AID-CNE11>3.0.CO;2-2.
77. Savchenko A, Barnes S, Kramer RH. Cyclic-nucleotide-gated channels mediate synaptic feedback by nitric oxide. *Nature* 1997; 390(6661):694–8. doi: 10.1038/37803.

78. Ahmad I, Leinders-Zufall T, Kocsis JD, Shepherd GM, Zufall F, Barnstable CJ. Retinal Ganglion cells express a cGMP-gated cation conductance activatable by nitric oxide donors. *Neuron* 1994; 12(1):155–65.
79. Snellman J, Nawy S. cGMP-Dependent Kinase Regulates Response Sensitivity of the Mouse On Bipolar Cell. *J Neurosci* 2004; 24(29):6621–8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1474-04.2004.
80. Lu C, McMahon DG. Modulation of hybrid bass retinal gap junctional channel gating by nitric oxide. *Journal of Physiology* 1997; 499(Pt. 3):689–99.
81. Yu D, Eldred WD. Nitric Oxide Stimulates γ -Aminobutyric Acid Release and Inhibits Glycine Release in Retina. *J Comp Neurol* 2005; 483(3):278–91.
82. Wexler E, Stanton PK, Nawy S. Nitric Oxide Depresses GABA A Receptor Function via Coactivation of cGMP-Dependent Kinase and Phosphodiesterase. *The Journal of neuroscience* 1998; 18(7):2342–9.
83. Wang G-Y, Liets LC, Chalupa LM. Nitric Oxide Differentially Modulates ON and OFF Responses of Retinal Ganglion Cells. *J Neurophysiol* 2003; 90(2):1304–13. doi: 10.1152/jn.00243.2003.
84. Schmetterer L, Polak K. Role of Nitric Oxide in the Control of Ocular Blood Flow. *Prog Retin Eye Res* 2001; 20(6):823–47.
85. Mori A, Saito M, Sakamoto K, Narita M, Nakahara T, Ishii K. Stimulation of prostanoid IP and EP(2) receptors dilates retinal arterioles and increases retinal and choroidal blood flow in rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 570(1-3):135–41. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.05.052.
86. Koss MC. Functional role of nitric oxide in regulation of ocular blood flow. *Eur J Pharmacol* 1999; 374(2):161–74.
87. Gericke A, Sniatecki JJ, Mayer VGA, Goloborodko E, Patzak A, Wess J et al. Role of M1, M3, and M5 muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic dilation of small arteries studied with gene-targeted mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 300(5):H1602-H1608. doi: 10.1152/ajpheart.00982.2010.
88. Gericke A, Mayer VGA, Steege A, Patzak A, Neumann U, Grus FH et al. Cholinergic Dilation of Ophthalmic Arteries is Abolished in M3, but Retained in M5 Muscarinic Acetylcholine Receptor Knockout Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(10):4822–7. doi: 10.1167/iovs.09-3600.
89. Massey SC, Neal MJ. The light evoked release of acetylcholine from the rabbit retina in vivo and its inhibition by γ - aminobutyric acid. *Journal of Neurochemistry* 1979; 32(4):1327–9.
90. Ferrari-Dileo G, Davis EB, Anderson DR. Biochemical Evidence for Cholinergic Activity in Retinal Blood Vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30(3):473–7.
91. Haefliger IO, Fammer J, Lüscher TF. Nitric oxide and Endothelin-1 are Important Regulators of Human Ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33(7):2340–3.
92. Chakravarthy U, Stitt AW, McNally J, Bailie JR, Hoey EM, Duprex P. Nitric oxide synthase activity and expression in retinal capillary endothelial cells and pericytes. *Curr Eye Res* 1995; 14(4):285–94. doi: 10.3109/02713689509033528.
93. Osborne NN, Barnett NL, Herrera AJ. NADPH diaphorase localization and nitric oxide synthase activity in the retina and anterior uvea of the rabbit eye. *Brain Research* 1993; 610(2):194–8.

94. Toda N, Kitamura Y, and Okamura T. Role of nitroxidergic nerve in dog retinal arterioles in vivo and arteries in vitro. *American journal of physiology* 1994; 266(5 Pt 2):H1985-H1992.
95. Shareef S, Sawada A, Neufeld AH. Isoforms of Nitric Oxide Synthase in the Optic Nerves of Rat Eyes with Chronic Moderately Elevated Intraocular Pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(12):2884–91.
96. Laties AM. Central Retinal Artery Innervation: Absence of Adrenergic Innervation to the Intraocular Branches. *Archives of Ophthalmology* 1967; 77(3):405–9.
97. Ferrari-Dileo G, Davis EB, Anderson DR. Response of Retinal Vasculature to Phenylephrine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31(6):1181–2.
98. Toda M, Okamura T, Ayajiki K, Toda N. Neurogenic Vasoconstriction as Affected by Cholinergic and Nitroxidergic Nerves in Dog Ciliary and Ophthalmic Arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(8):1753-1760.
99. Gericke A, Kordasz ML, Steege A, Sanbe A, Goloborodko E, Vetter JM et al. Functional Role of α 1-Adrenoceptor Subtypes in Murine Ophthalmic Arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(7):4795–9. doi: 10.1167/iovs.11-7516.
100. Yang Z, Diederich D, Schneider K, Siebenmann R, Stulz P, Segesser L von et al. Endothelium-Derived Relaxing Factor and Protection Against Contractions Induced by Histamine and Serotonin in the Human Internal Mammary Artery and in the Saphenous Vein. *Circulation* 1989; 80(4):1041–8.
101. Förstermann U, Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *Br J Pharmacol* 2011; 164(2):213–23. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01196.x.
102. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H Oxidase: Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circulation Research* 2000; 86(5):494–501.
103. Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK et al. Angiotensin II-mediated Hypertension in the Rat Increases Vascular Superoxide Production via Membrane NADH/NADPH Oxidase Activation: Contribution to Alterations of Vasomotor Tone. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 97(8):1916–23.
104. Li H, Witte K, August M, Brausch I, Gödtel-Armbrust U, Habermeier A et al. Reversal of Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Up-Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression Lowers Blood Pressure in Hypertensive Rats. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47(12):2536–44. doi: 10.1016/j.jacc.2006.01.071.
105. Lopez-Lopez JG, Moral-Sanz J, Frazziano G, Gomez-Villalobos MJ, Flores-Hernandez J, Monjaraz E et al. Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295(5):L727-32. doi: 10.1152/ajplung.90354.2008.
106. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M et al. Increased NADH-Oxidase-Mediated Superoxide Production in the Early Stages of Atherosclerosis: Evidence for Involvement of the Renin-Angiotensin System. *Circulation* 1999; 99(15):2027–33.
107. Landmesser U, Spiekermann S, Preuss C, Sorrentino S, Fischer D, Manes C et al. Angiotensin II Induces Endothelial Xanthine Oxidase Activation: Role for Endothelial Dysfunction in Patients

- With Coronary Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(4):943–8. doi: 10.1161/01.ATV.0000258415.32883.bf.
108. Heinzel B, John M, Klatt P, Böhme E, Mayer B. Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochemical Journal* 1992; 281(Pt 3):627–30.
109. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of Superoxide by Purified Brain Nitric Oxide Synthase. *J Biol Chem* 1992; 267(34):24173–6.
110. Xia Y, Roman LJ, Masters BSS, Zweier JL. Inducible Nitric-oxide Synthase Generates Superoxide from the Reductase Domain. *J Biol Chem* 1998; 273(35):22635–9.
111. Vázquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BSS, Karoui H et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(16):9220–5.
112. Xia Y, Tsai A-L, Berka V, Zweier JL. Superoxide Generation from Endothelial Nitric-oxide Synthase: A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem* 1998; 273(40):25804–8.
113. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J. Clin. Invest.* 2003; 111(8):1201–9. doi: 10.1172/JCI200314172.
114. Culcasi M, Lafon-Canzal M, Pietri S, Bockaert J. Glutamate Receptors Induce a Burst of Superoxide via Activation of Nitric Oxide Synthase in Arginine-depleted Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 369(17):12589–93.
115. Xia Y, Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(13):6954–8.
116. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of Peroxynitrite, Tetrahydrobiopterin, Ascorbic Acid, and Thiols: Implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2003; 278(25):22546–54. doi: 10.1074/jbc.M302227200.
117. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite Oxidation of Sulfhydryls: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991; 266(7):4244–50.
118. Burke TM, Wolin MS. Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *American journal of physiology* 1987; 252(4 Pt 2):H721-H732.
119. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa J, Mukai Y, Hirano K et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *Journal of Clinical Investigation* 2000; 106(12):1521–30.
120. Griending KK, Harrison DG. Dual Role of Reactive Oxygen Species in Vascular Growth. *Circulation Research* 1999; 85(6):562–3.
121. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG et al. Role of NADH/NADPH Oxidase-Derived H₂O₂ in Angiotensin II-Induced Vascular Hypertrophy. *Hypertension* 1998; 32(3):488–95.
122. Drew B, Leeuwenburgh C. Aging and the Role of Reactive Nitrogen Species. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; 959(1):66–81.

123. Eisenrich JP, Cross CE, Jones AD, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of Nitrating and Chlorinating Species by Reaction of Nitrite with Hypochlorous Acid: A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Biol Chem* 1996; 271(32):19199–208.
124. Crowley JR, Yarasheski K, Leeuwenburgh C, Turk J, Heinecke JW. Isotope Dilution Mass Spectrometric Quantification of 3-Nitrotyrosine in Proteins and Tissues Is Facilitated by Reduction to 3-Aminotyrosine. *Analytical Biochemistry* 1998; 259(1):127–35.
125. van der Vliet A, Eisenrich JP, Halliwell B, Cross CE. Formation of Reactive Nitrogen Species during Peroxidase-catalyzed Oxidation of Nitrite: A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem* 1997; 272(12):7617–25.
126. Gow AJ, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H. Effects of peroxynitrite - induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Letters* 1996; 385(1-2):63–6.
127. Takakura K, Beckman JS, MacMillan-Crow LA, Crow JP. Rapid and Irreversible Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by Peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 1999; 369(2):197–207.
128. Kamisaki Y, Wada K, Bian K, Balabanli B, Davis K, Martin E et al. An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(20):11584–9.
129. Deeb RS, Nuriel T, Cheung C, Summers B, Lamon BD, Gross SS et al. Characterization of a cellular denitrase activity that reverses nitration of cyclooxygenase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 305(5):H687-98. doi: 10.1152/ajpheart.00876.2012.
130. Osoata GO, Ito M, Elliot M, Hogg J, Barnes PJ, Ito K. Reduced Denitration Activity in Peripheral Lung of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Tanaffos* 2012; 11(4):23–9.
131. Gally JA, Montagu PR, Reeke GN, JR., Edelman GM. The NO hypothesis: Possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(9):3547–51.
132. Morales-Medina JC, Mejorada A, Romero-Curiel A, Flores G. Alterations in Dendritic Morphology of Hippocampal Neurons in Adult Rats After Neonatal Administration of N-Omega-Nitro-L-Arginine. *Synapse* 2007; 61(9):785–9. doi: 10.1002/syn.20406.
133. Reese BE, Colello RJ. Neurogenesis in the retinal ganglion cell layer of the rat. *Neuroscience* 1992; 46(2):419–29.
134. Lam K, Sefton AJ, Bennett MR. Loss of axons from the optic nerve of the rat during early postnatal development. *Developmental Brain Research* 1981; 3(3):487–91.
135. Potts RA, Dreher B, Bennett MR. The loss of ganglion cells in the developing retina of the rat. *Developmental Brain Research* 1982; 3(3):481–6.
136. Weidman TA, Kuwabara T. Postnatal Development of the Rat Retina: An Electron Microscopic Study. *Archives of Ophthalmology* 1968; 79(4):470–84.
137. Huang PL, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH, Fishman MC. Targeted Disruption of the Neuronal Nitric Oxidase Synthase Gene. *Cell* 1993; 75(7):1273–86.

138. Laspas P, Goloborodko E, Sniatecki JJ, Kordasz ML, Manicam C, Wojnowski L et al. Role of nitric oxide synthase isoforms for ophthalmic artery reactivity in mice. *Exp Eye Res* 2014; 127:1–8. doi: 10.1016/j.exer.2014.06.018.
139. Land PW, Lund RD. Development of the Rat's Uncrossed Retinotectal Pathway and Its Relation to Plasticity Studies. *Science* 1979; 205(4407):698–700. doi: 10.1126/science.462177.
140. Wu HH, Cork RJ, Huang PL, Shuman DL, Mize RR. Refinement of the ipsilateral retinocollicular projection is disrupted in double endothelial and neuronal nitric oxide synthase gene knockout mice. *Developmental Brain Research* 2000; 120(1):105–11. doi: 10.1016/S0165-3806(99)00145-5.
141. Stone J, Itin A, Alo T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T et al. Development of Retinal Vasculature Is Mediated by Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression by Neuroglia. *The Journal of neuroscience* 1995; 15(7):4738–47.
142. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Medicine* 1995; 1(10):1024–8.
143. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang H-T, Donnini S, Granger HJ et al. Nitric Oxide Synthase Lies Downstream from Vascular Endothelial Growth Factor-induced but Not Basic Fibroblast Growth Factor-induced Angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 99(11):2625–34.
144. Papapetropoulos A, García-Cardeña G, Madri JA, Sessa WC. Nitric Oxide Production Contributes to the Angiogenic Properties of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Endothelial Cells. *J Clin Invest* 1997; 100(12):3131–9.
145. Al-Shabrawey M, El-Remessy AB, Gu, X., Brooks, S. S., Hamed MS, Huang P, Caldwell RB. Normal vascular development in mice deficient in endothelial NO synthase: Possible role of neuronal NO synthase. *Molecular Vision* 2003; 9:549–58.
146. D'Amore PA. Mechanisms of Retinal and Choroidal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35(12):3974–9.
147. Davalli P, Mitic T, Caporali A, Lauriola A, D'Arca D. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016; 2016:3565127. doi: 10.1155/2016/3565127.
148. Martin JE, Sheaff MT. The pathology of ageing: concepts and mechanisms. *J Pathol* 2007; 211(2):111–3. doi: 10.1002/path.2122.
149. Sohal RS, Orr WC. Relationship between Antioxidants, Prooxidants, and the Aging Process. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1992; 663(1):74–84.
150. Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* 1956; 11(3):298–300.
151. Weyemi U, Dupuy C. The emerging role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage responses. *Mutat Res* 2012; 751(2):77–81. doi: 10.1016/j.mrrrev.2012.04.002.
152. Ahmed EK, Rogowska-Wrzesinska A, Roepstorff P, Bulteau A-L, Friguet B. Protein modification and replicative senescence of WI-38 human embryonic fibroblasts. *Aging Cell* 2010; 9(2):252–72. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00555.x.

153. Gericke A, Goloborodko E, Pfeiffer N, Manicam C. Preparation Steps for Measurement of Reactivity in Mouse Retinal Arterioles Ex Vivo. *J Vis Exp* 2018; (135). doi: 10.3791/56199.
154. Bailey LE, Ong SD. Krebs-Henseleit Solution as a Physiological Buffer in Perfused and Superfused Preparations. *Journal of pharmacological methods* 1978; 1(2):171–5.
155. Ivanova E, Toychiev AH, Yee CW, Sagdullaev BT. Optimized Protocol for Retinal Wholemount Preparation for Imaging and Immunohistochemistry. *Journal of visualized experiments* 2013; (82):e51018. doi: 10.3791/51018.
156. Laspas P, Sniatecki JJ, Brochhausen C, Steege A, Goloborodko E, Kordasz ML et al. Effect of the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor on Retinal Neuron Number Studied with Gene-Targeted Mice. *J Mol Neurosci* 2015; 56(2):472–9. doi: 10.1007/s12031-015-0524-7.
157. García-Cabezas MÁ, John YJ, Barbas H, Zikopoulos B. Distinction of Neurons, Glia and Endothelial Cells in the Cerebral Cortex: An Algorithm Based on Cytological Features. *Front Neuroanat* 2016; 10:107. doi: 10.3389/fnana.2016.00107.
158. Laspas P, Gramlich OW, Müller HD, Cuny CS, Gottschling PF, Pfeiffer N et al. Autoreactive Antibodies and Loss of Retinal Ganglion Cells in Rats Induced by Immunization with Ocular Antigens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(12):8835–48. doi: 10.1167/iovs.10-6889.
159. Laspas P, Zhutdieva MB, Brochhausen C, Musayeva A, Zadeh JK, Pfeiffer N et al. The M1 muscarinic acetylcholine receptor subtype is important for retinal neuron survival in aging mice. *Sci Rep* 2019; 9(1):5222. doi: 10.1038/s41598-019-41425-5.
160. Feirabend HKP, Choufoer H, Ploeger S. Preservation and Staining of Myelinated Nerve Fibers. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 1998; 12(2):123–31.
161. Lamping KG, Nuno DW, Chappell DA, and Faraci FM. Agonist-specific impairment of coronary vascular function in genetically altered, hyperlipidemic mice. *The American Journal of Physiology* 1999; 276(4):R1023-R1029.
162. Manicam C, Staubitz J, Brochhausen C, Grus FH, Pfeiffer N, Gericke A. The Gatekeepers in the Mouse Ophthalmic Artery: Endothelium-Dependent Mechanisms of Cholinergic Vasodilation. *Sci Rep* 2016; 6:20322. doi: 10.1038/srep20322.
163. Toda N, Nakanishi-Toda M. Nitric oxide: Ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res* 2007; 26(3):205–38. doi: 10.1016/j.preteyeres.2007.01.004.
164. Quigley HA. Examination of the retinal nerve fiber layer in the recognition of early glaucoma damage. *Transactions of the American Ophthalmological Society* 1986; 84:920–66.
165. Quigley HA. Reappraisal of the Mechanisms of Glaucomatous Optic Nerve Damage. *Eye (Lond)* 1987; 1(Pt 2):318–22. doi: 10.1038/eye.1987.51.
166. Glovinsky Y, Quigley HA, Pease ME. Foveal Ganglion Cell Loss Is Size Dependent in Experimental Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34(2):395–400.
167. Lei Y, Zhang X, Song M, Wu J, Sun X. Aqueous Humor Outflow Physiology in NOS3 Knockout Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56(8):4891–8. doi: 10.1167/iovs.15-16564.
168. Wu R-Y, Ma N. Expression of nitric oxide synthase and guanylate cyclase in the human ciliary body and trabecular meshwork. *Chinese Medical Journal* 2012; 125(1):129–33.

169. Vidal L, Díaz F, Villena A, Moreno M, Campos JG, Vargas IP de. Nitric oxide synthase in retina and optic nerve head of rat with increased intraocular pressure and effect of timolol. *Brain Res Bull* 2006; 70(4-6):406–13. doi: 10.1016/j.brainresbull.2006.07.009.
170. Neufeld AH, Sawada A, Becker B. Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(17):9944–8.
171. Seddon M, Melikian N, Dworakowski R, Shabeeh H, Jiang B, Byrne J et al. Effects of Neuronal Nitric Oxide Synthase on Human Coronary Artery Diameter and Blood Flow In Vivo. *Circulation* 2009; 119(20):2656–62. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.822205.
172. Nangle MR, Cotter MA, Cameron NE. An in vitro investigation of aorta and corpus cavernosum from eNOS and nNOS gene-deficient mice. *Pflugers Arch* 2004; 448(2):139–45. doi: 10.1007/s00424-003-1232-7.
173. Galindo-Romero C, Avilés-Trigueros M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás F et al. Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: Quantitative and topographic time course analyses. *Exp Eye Res* 2011; 92(5):377–87. doi: 10.1016/j.exer.2011.02.008.
174. Cavet ME, Vittitow JL, Impagnatiello F, Ongini E, Bastia E. Nitric Oxide (NO): An Emerging Target for the Treatment of Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(8):5005–15. doi: 10.1167/iovs.14-14515.
175. Haefliger IO, Flammer J, Bény J-L, Lüscher TF. Endothelium-dependent Vasoactive Modulation in the Ophthalmic Circulation. *Prog Retin Eye Res* 2001; 20(2):209–25.
176. Neufeld AH, Hernandez MR, Gonzalez M. Nitric Oxide Synthase in the Human Glaucomatous Optic Nerve Head. *Archives of Ophthalmology* 1997; 115(4):497–503.
177. Li Q, Verma A, Han P-Y, Nakagawa T, Johnson RJ, Grant MB et al. Diabetic eNOS-Knockout Mice Develop Accelerated Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(10):5240–6. doi: 10.1167/iovs.09-5147.
178. Choi B, Shin M-K, Kim E-Y, Park J-E, Lee H, Kim SW et al. Elevated Neuropeptide Y in Endothelial Dysfunction Promotes Macrophage Infiltration and Smooth Muscle Foam Cell Formation. *Front Immunol* 2019; 10:1701. doi: 10.3389/fimmu.2019.01701.
179. 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(10):1870–8.
180. Sinclair JR, Nirenberg S. Characterization of Neuropeptide Y-Expressing Cells in the Mouse Retina Using Immunohistochemical and Transgenic Techniques. *J Comp Neurol* 2001; 432(3):296–306. doi: 10.1002/cne.1104.
181. Alvaro AR, Rosmaninho-Salgado J, Santiago AR, Martins J, Aveleira C, Santos PF et al. NPY in rat retina is present in neurons, in endothelial cells and also in microglial and Müller cells. *Neurochem Int* 2007; 50(5):757–63. doi: 10.1016/j.neuint.2007.01.010.
182. Michel MC, Beck-Sickinger A, Cox H, Doods HN, Herzog H, Larhammar, D., Quirion, R. et al. XVI. International Union of Pharmacology Recommendations for the Nomenclature of Neuropeptide

- Y, Peptide YY, and Pancreatic Polypeptide Receptors. *Pharmacological Reviews* 1998; 50(1):143–50.
183. Troger J, Sellemond S, Kieselbach G, Kralinger M, Schmid E, Teuchner B et al. Inhibitory effect of certain neuropeptides on the proliferation of human retinal pigment epithelial cells. *British Journal of Ophthalmology* 2003; 87(11):1403–8.
184. Milenkovic I, Weick M, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A. Neuropeptide Y-evoked proliferation of retinal glial (Müller) cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004; 242(11):944–50. doi: 10.1007/s00417-004-0954-3.
185. Movafagh S, Hobson JP, Spiegel S, Kleinman HK, Zukowska Z. Neuropeptide Y induces migration, proliferation, and tube formation of endothelial cells bimodally via Y1, Y2, and Y5 receptors. *FASEB J* 2006; 20(11):1924–6. doi: 10.1096/fj.05-4770fje.
186. Alvaro AR, Martins J, Araújo IM, Rosmaninho-Salgado J, Ambrósio AF, Cavadas C. Neuropeptide Y stimulates retinal neural cell proliferation - involvement of nitric oxide. *Journal of Neurochemistry* 2008; 105(6):2501–10. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05334.x.
187. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Koch H-G, Hrsg. Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*. 10., vollständig überarb. Aufl. 2022. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2022. Verfügbar unter: <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-2068907>.
188. Fonseca ICF, Castelo-Branco M, Cavadas C, Abrunhosa AJ. PET Imaging of the Neuropeptide Y System: A Systematic Review. *Molecules* 2022; 27(12). doi: 10.3390/molecules27123726.
189. King PJ, Widdowson PS, Doods HN, Williams G. Regulation of Neuropeptide Y Release by Neuropeptide Y Receptor Ligands and Calcium Channel Antagonists in Hypothalamic Slices. *Journal of Neurochemistry* 1999; 73(2):641–6. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0730641.x.
190. Klapstein GJ, Colmers WF. On the Sites of Presynaptic Inhibition by Neuropeptide Y in Rat Hippocampus in vitro. *Hippocampus* 1993; 3(1):103–11. doi: 10.1002/hipo.450030111.
191. Greber S, Schwarzer C, Sperk G. Neuropeptide Y inhibits potassium-stimulated glutamate release through Y₂ receptors in rat hippocampal slices in vitro. *Br J Pharmacol* 1994; 113(3):737–40.
192. Xapelli S, Bernardino L, Ferreira R, Grade S, Silva AP, Salgado JR et al. Interaction between neuropeptide Y (NPY) and brain-derived neurotrophic factor in NPY-mediated neuroprotection against excitotoxicity: a role for microglia. *Eur J Neurosci* 2008; 27(8):2089–102. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06172.x.
193. D. Fukumura, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun C-O et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(5):2604–9.
194. Ha JM, Jin SY, Lee HS, Shin HK, Lee DH, Song SH et al. Regulation of retinal angiogenesis by endothelial nitric oxide synthase signaling pathway. *Korean J Physiol Pharmacol* 2016; 20(5):533–8. doi: 10.4196/kjpp.2016.20.5.533.
195. McLeod DS, Baba T, Bhutto IA, Luttj GA. Co-expression of Endothelial and Neuronal Nitric Oxide Synthases in the Developing Vasculatures of the Human Fetal Eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012; 250(6):839–48. doi: 10.1007/s00417-012-1969-9.

196. Campochiaro PA. Retinal and Choroidal Neovascularization. *J. Cell. Physiol.* 2000; 184(3):301–10. doi: 10.1002/1097-4652(200009)184:3<301::AID-JCP3>3.0.CO;2-H.
197. Gericke A, Mann C, Zadeh JK, Musayeva A, Wolff I, Wang M et al. Elevated intraocular pressure causes abnormal reactivity of mouse retinal arterioles. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019.
198. Cupitra NI, Calderón JC, Narvaez-Sanchez R. Influence of Ageing on Vascular Reactivity and Receptor Expression in Rabbit Aorta: A Complement to Elastocalcinosis and Smooth Muscle Mechanisms. *Clin Interv Aging* 2020; 15:537–45. doi: 10.2147/CIA.S236173.
199. Kim SY, Park JT, Park JK, Lee JS, Choi JC. Aging impairs vasodilatory responses in rats. *Korean J Anesthesiol* 2011; 61(6):506–10. doi: 10.4097/kjae.2011.61.6.506.
200. Woodman CR, Price EM, Laughlin MH. Selected Contribution: Aging impairs nitric oxide and prostacyclin mediation of endothelium-dependent dilation in soleus feed arteries. *J Appl Physiol* (1985) 2003; 95(5):2164–70. doi: 10.1152/jappphysiol.01073.2002.
201. Mitchell GF, Parise H, Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Vita JA et al. Changes in Arterial Stiffness and Wave Reflection With Advancing Age in Healthy Men and Women: The Framingham Heart Study. *Hypertension* 2004; 43(6):1239–45. doi: 10.1161/01.HYP.0000128420.01881.aa.
202. Delp MD, Brown M, Laughlin MH, Hasser EM. Rat aortic vasoreactivity is altered by old age and hindlimb unloading. *Journal of Applied Physiology* 1995; 87(6):2079–86.
203. Moritoki H, Tanioka A, Maeshiba Y, Iwamoto T, Ishida Y, Araki H. Age-associated decrease in histamine-induced vasodilation may be due to reduction of cyclic GMP formation. *Br J Pharmacol* 1988; 95(4):1015–22.
204. Lugnier C, Stoclet J-C. Age related changes in cardiac and aortic phosphodiesterase activities in normotensive and hypertensive rats. *Biochemical Pharmacology* 1979; 28(24):3581–7.
205. Dohi Y, Thiel MA, Bühler FR, Lüscher TF. Activation of Endothelial L-Arginine Pathway in Resistance Arteries: Effect of Age and Hypertension. *Hypertension* 1990; 16(2):170–9.
206. Dohi Y, Kojima M, Sato K, Lüscher TF. Age-related changes in vascular smooth muscle and endothelium. *Drugs & Aging* 1995; 7(4):278–91.
207. Mead B, Thompson A, Scheven BA, Logan A, Berry M, Leadbeater W. Comparative Evaluation of Methods for Estimating Retinal Ganglion Cell Loss in Retinal Sections and Wholemounds. *PLoS ONE* 2014; 9(10):e110612. doi: 10.1371/journal.pone.0110612.

8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. habil. Adrian Gericke, FEBO, MHBA, Leiter der Abteilung für Ophthalgo-Pharmakologie und Physiologie an der Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation sowie die Betreuung während des Arbeitsprozesses und wiederholte Korrekturen.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. med. habil. Panagiotis Laspas, FEBO, für die Mitarbeit an der Durchführung der Experimente sowie den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Gericke, die zu einer freundschaftlichen und hilfsbereiten Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Mein Dank gilt Steven Wolf, dessen ausdauernden Anregungen und kritischen Korrekturen wesentlich zum Fortschreiten meiner Arbeit beigetragen haben und dessen Freundschaft ich sehr schätze.

Ich danke meinen Eltern und Flo für ihre liebevolle und motivationsfördernde Unterstützung während verschiedener Phasen des Schreibprozesses.

9. Lebenslauf

[In der elektronischen Version aus Datenschutzgründen entfernt]

