

## 1. EINLEITUNG

Zielstellung der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung eines organotypischen Kultursystems der adulten Retina, welches sich zum Studium retinaler bzw. neurodegenerativer Erkrankungen eignet.

Im Folgenden wird zunächst ein Überblick über den Aufbau der Netzhaut gegeben. Die in der Literatur beschriebenen Kulturmodelle der Retina werden dargestellt, und der Nutzen dieser Modelle für Untersuchungen retinaler bzw. neurodegenerativer Erkrankungen wird betrachtet. Auf den besonderen Wert einer organotypischen Kultur der adulten Retina wird hingewiesen. Anschließend wird das Glaukom angeführt, welches ein Beispiel einer mit Überstimulation der Glutamat-Rezeptoren assoziierten neurodegenerativen Erkrankung ist. Die Priorität der Suche nach einer klinisch sicheren anti-glutamatergen Substanz wird betont. Sowohl das  $\beta$ -Carbolin Abecarnil als auch der HMG-CoA-Reduktasehemmer Simvastatin werden vorgestellt als Substanzen mit potentiell protektiver Wirkung auf Glutamat-induzierte Schädigung neuronaler Zellen der Netzhaut.

### 1.1 Aufbau der Retina

Die Netzhaut adulter Säugetiere besteht aus drei zellkörperreichen und zwei zellkörperarmen Schichten (Abbildung 1).

**Äußere Körnerschicht:** Die äußere Körnerschicht (ONL) setzt sich zusammen aus den kernhaltigen Zytoplasmagebieten der Stäbchen- und Zapfenzellen.

**Innere Körnerschicht:** Die innere Körnerschicht (INL) enthält die Perikarya der bipolaren Zellen, deren Dendriten in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) synaptischen Kontakt mit den Neuriten der Sinnesepithelzellen haben. Die bipolaren Zellen leiten über ihr Axon die Erregung in die innere plexiforme Schicht (IPL) weiter, wo die Umschaltung auf die Ganglienzelle erfolgt.

Außerdem werden in der inneren Körnerschicht gefunden:

- Horizontalzellen, welche als Interneuronen die Synapsen von Zapfen- und Stäbchenzellen verbinden,
- amakrine Zellen, welche als Interneuronen die bipolaren Zellen mit den Ganglienzellen verbinden,
- die Zellkörper der Müller-Stützzellen, die radialen Gliazellen der Netzhaut, welche die extrazelluläre Konzentration neuroaktiver Substanzen, wie z.B. Glutamat und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), modulieren (Newman und Reichenbach, 1996; Izumi *et al.*, 2002).

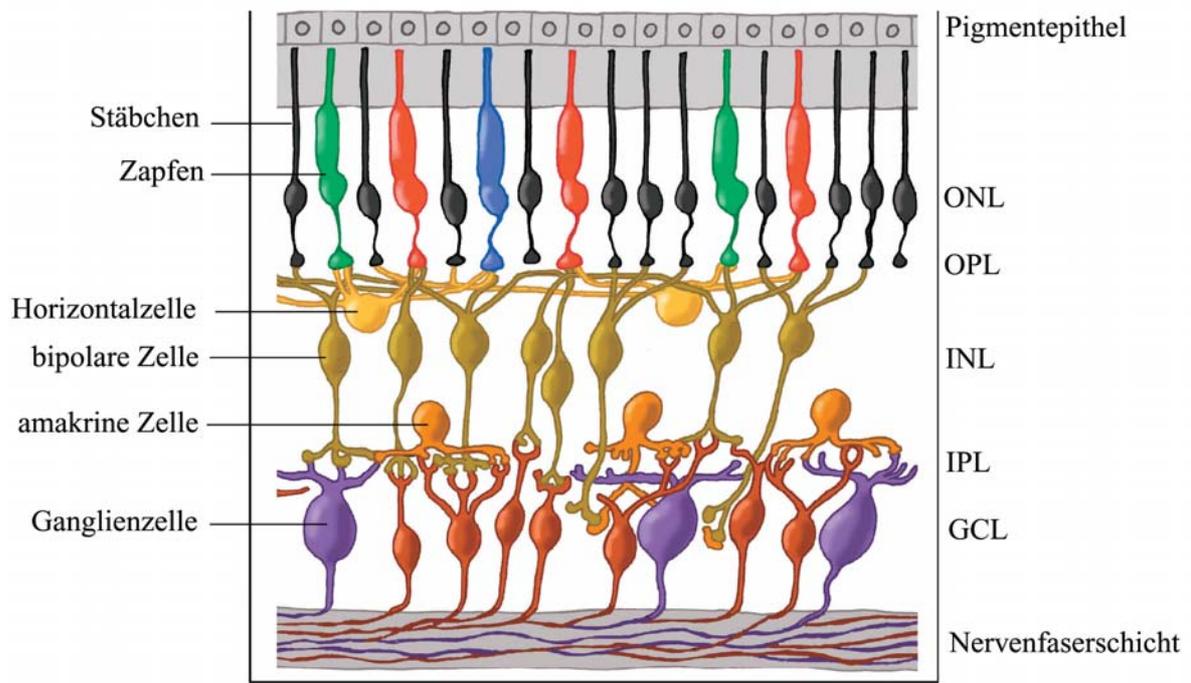
**Ganglienzellschicht:** Die Ganglienzellschicht (GCL) besteht aus den Zellkörpern der Ganglienzellen, sowie bis zu 50 % aus denen der dislokalisierten amakrinen Zellen (Perry, 1981; Linden und Esbérard, 1987). Die Dendriten der Ganglienzellen liegen in der inneren plexiformen Schicht, ihre Axone ziehen in die Nervenfaserschicht und bilden den Sehnerv.

**Gliazellen:** Außer den Müller-Stützzellen enthält die Netzhaut noch weitere Gliazellen. Astrozyten umgeben die Axone der Ganglienzellen sowie retinale Blutgefäße (Schnitzer, 1988). Sowohl Astrozyten (Schnitzer, 1988) als auch Müller-Stützzellen (Guerin *et al.*, 1990) enthalten GFAP (saures Gliafaserprotein)-immunreaktives Intermediärfilament. In der Retina ubiquitär vorkommende Mikroglia können nach einem retinalen Trauma degenerierende neuronale Zellen phagozytieren (Boycott und Hopkins, 1981; Kreutzberg, 1996).

**Glutamat-Rezeptoren:** Mit Hilfe des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat werden die in den Photorezeptoren erzeugten Erregungen über die bipolaren Zellen zu den Ganglienzellen weitergeleitet. Glutamat-Rezeptoren konnten auf diesen Neuronen der Sehbahn in großer Zahl nachgewiesen werden (Massey, 1990; Davanger *et al.*, 1991; Crooks und Kolb, 1992; Meldrum, 2000). Glutamat-Rezeptoren vom N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Subtyp (Monyer *et al.*, 1992) finden sich auf den amakrinen und Ganglienzellen (Massey, 1990). Glutamat-Rezeptoren vom AMPA/Kainat-Subtyp (Keinänen *et al.*, 1990) sind lokalisiert auf bipolaren Zellen, Horizontalzellen, amakrinen und Ganglienzellen (Brandstätter, 2002).

**GABA-Rezeptoren:** Mit Hilfe des inhibitorischen Neurotransmitters GABA modulieren Horizontalzellen und amakrine Zellen die Erregungsweiterleitung. GABA-Rezeptoren konnten auf den Horizontalzellen und amakrinen Zellen in der INL sowie den Ganglienzellen und dislokalisierten amakrinen Zellen in der GCL nachgewiesen werden (Osborne, 1980; Davanger *et al.*, 1991; Crooks und Kolb, 1992).

Darüber hinaus sind auf den Zellen der Netzhaut Rezeptoren für weitere Neurotransmitter lokalisiert, z.B. Glycin, Dopamin, Acetylcholin, Serotonin, Adenosin, Substanz P (Crooks und Kolb, 1992).



**Abbildung 1:** Die schematische Darstellung der Netzhaut adulter Säugetiere zeigt die diskrete Anordnung der unterschiedlichen Nervenzellen in Schichten.

In den Stäbchen und Zapfen erzeugte Erregungen werden über die bipolaren Zellen zu den Ganglienzellen mit Hilfe des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat weitergeleitet.

Horizontalzellen und amakrine Zellen modulieren diese Erregungsweiterleitung mit Hilfe des inhibitorischen Neurotransmitters  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA).

ONL – äußere Körnerschicht; OPL – äußere plexiforme Schicht; INL – innere Körnerschicht; IPL – innere plexiforme Schicht; GCL – Ganglienzellschicht (modifiziert nach Kolb, 2003).

## 1.2 Literaturübersicht über Kulturmodelle der Retina

Der Vorteil organotypischer Kultursysteme ist die den *in-vivo*-Bedingungen ähnelnde erhaltene Zytoarchitektur, welche eine Voraussetzung für das Studium der Entwicklung, Differenzierung, sowie Degeneration bzw. Regeneration des isolierten Organs ist. Organotypische Kulturen der Retina wurden erstmalig in den 1960er Jahren beschrieben (Hild und Callas, 1967; LaVail und Hild, 1971). Die meisten der bisher beschriebenen Modelle wurden an der Ratte oder Maus etabliert, da über diese Spezies die umfangreichsten Erfahrungen auf dem Gebiet der Regeneration des zentralen Nervensystems (ZNS) vorliegen. Wichtige Ereignisse der retinalen Entwicklung und Differenzierung vollziehen sich in den ersten 2 Wochen nach der Geburt des Nagetieres (Perry *et al.*, 1983; Young, 1984; Horsburgh und Sefton, 1987). Folglich werden organotypische Kulturen der neonatalen (bis etwa 2 Tage nach Geburt) bzw. postnatalen Retina (etwa bis 2 Wochen nach Geburt) eher für die Erforschung der Entwicklung und Differenzierung der Netzhaut angewendet. Organotypische Kulturen der adulten Netzhaut dagegen eignen sich eher für Untersuchungen der Degeneration bzw. Regeneration. Zwar finden sich in der Literatur verschiedene organotypische Kultursysteme der Retina, doch eignet sich keines davon als Modell für neurodegenerative Erkrankungen der Netzhaut, wie z.B. dem Glaukom (Überblick bei Levin, 2001).

**Embryonale Retina:** Die embryonale Retina kann in beschichteten Gewebekulturschalen kultiviert und das Wachstum bzw. die Regeneration der Axone der Ganglienzellen untersucht werden (Carri und Ebendal, 1983; Engelsberg *et al.*, 2005). Auch auf einem rotierenden Objektträger aufgetragene embryonale Retinakulturen wiesen eine gut erhaltene Zytoarchitektur auf (Hoff *et al.*, 1999).

**Neonatale und postnatale Retina:** Die neonatale Retina (Hild und Callas, 1967; LaVail und Hild, 1971; Mosinger Ogilvie *et al.*, 1999; Pinzón-Duarte *et al.*, 2000; Caffé *et al.*, 2001; Pérez-Léon *et al.*, 2003) sowie die postnatale Retina (Zhang *et al.*, 2003) können ebenfalls in beschichteten Gewebekulturschalen bzw. auf semipermeablen Membranen kultiviert werden. Auf einer Wälzvorrichtung im Nährmedium flottierende

organotypische Kulturen der postnatalen Retina wurden kürzlich beschrieben (Victorov *et al.*, 2004).

**Adulte Retina:** Die adulte Retina konnte in beschichteten Gewebekulturschalen bei mäßigem Erhalt der Zytoarchitektur kultiviert werden (Kim und Takahashi, 1988; Bähr *et al.*, 1988; Thanos und Vanselow, 1989; Kretz *et al.*, 2004). Dabei wurde die Nervenfaserschicht in direkten Kontakt mit dem Nährsubstrat gebracht, und das Auswachsen von Neuriten wurde beobachtet. In einem Kulturmodell der Netzhaut des Menschen, in welchem Angiogenese beobachtet wurde, sind bereits nach 24 h *in vitro* sämtliche Schichten der Retina degeneriert (Knott *et al.*, 1999).

Die meisten der Untersuchungen an organotypischen Retinakulturen fokussierten auf die Beschreibung der Photorezeptoren bzw. das Überleben retinaler Ganglienzellen. Beim Glaukom, der weltweit zweithäufigsten Ursache für Erblindung (Quigley und Broman, 2006), ist die Schädigung der retinalen Ganglienzellen verantwortlich für den Funktionsverlust (Überblick bei Osborne *et al.*, 1999). Für die Entwicklung neuroprotektiver Strategien in der Therapie des Glaukoms bedarf es daher Modelle, an denen die Degeneration retinaler Ganglienzellen als Reaktion auf mit dem Glaukom assoziierte Stimuli untersucht werden können (Überblick bei Levin, 2001; Goldblum und Mittag, 2002). Dies setzt insbesondere ein organotypisches Modell der adulten Retina voraus, das die Verabreichung pharmakologischer Substanzen über einen Zeitraum von Tagen ermöglicht. Obwohl in der Literatur durchaus das Überleben adulter axotomierter retinaler Ganglienzellen während einer bestimmten Kultivierungszeit beschrieben wird (Kim und Takahashi, 1988; Kretz *et al.*, 2004), stand bisher kein experimentelles *in-vitro*-System zur Verfügung, mit dem es möglich war, die Reaktion adulter Ganglienzell-Populationen auf mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziierten Stimuli in einer dreidimensionalen organotypischen Retinakultur zu untersuchen.

In dieser Arbeit charakterisieren wir eine neue Methode der organotypischen Retina-Kultivierung der adulten Ratte, in welchem axotomisierte Ganglienzellen überleben und möglicherweise regenerieren, und das sich als Modell neurodegenerativer Erkrankungen eignet.

### 1.3 Das Glaukom: Glutamat-Exzitotoxizität retinaler Ganglienzellen

Etwa 60 Millionen Menschen leiden weltweit am Glaukom; über 8 Millionen sind erblindet (Quigley und Broman, 2006). Das Glaukom ist assoziiert mit der progressiven Schädigung von Perikaryon, Axon und Dendriten retinaler Ganglienzellen, daraus resultierenden Gesichtsfeldausfällen, sowie, meistens, einem erhöhten Augendruck (Überblick bei Osborne *et al.*, 2004). Exzessive Stimulation der Glutamat-Rezeptoren, vor allem vom NMDA-Subtyp, führt aufgrund eines übermäßigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms zum neuronalen Zelltod retinaler Ganglienzellen (Ferreira *et al.*, 1996; Lam *et al.*, 1999; Lipton, 2003). Dabei wird der Apoptose, dem energieabhängigen, programmierten Zelltod (Kerr *et al.*, 1972), eine wichtige Rolle zugeordnet (Quigley *et al.*, 1995; Lam *et al.*, 1999). Die intraokuläre Druckerhöhung scheint einen noch aufzuklärenden pathophysiologischen Mechanismus zu aktivieren, der eine exzessive Freisetzung von Glutamat bewirkt (Überblick bei Osborne *et al.*, 1999; Wein und Levin, 2002).

Übermäßige Aktivität des NMDA-Rezeptors tritt auch bei anderen akuten und chronischen degenerativen Erkrankungen des ZNS auf, z.B. dem Schlaganfall (Dirnagl *et al.*, 1999; Schäbitz *et al.*, 2000) und der Alzheimer-Krankheit (Ikonomic *et al.*, 1999). Zahlreiche klinische Studien mit NMDA-Rezeptor-Antagonisten verliefen jedoch enttäuschend, so dass bisher keine der getesteten Substanzen Eingang in die klinische Praxis finden konnte. Sowohl der Versuch, die Glutamat-induzierte Schädigung des Sehnervs zu reduzieren (Osborne *et al.*, 2004), als auch die Behandlung des Schlaganfalls (Muir und Lees, 2003), bzw. der Demenz (Areosa *et al.*, 2004), scheiterten daran, dass bei hinreichender Dosierung schwerwiegende Nebenwirkungen auftraten. Somit hat weiterhin die Suche nach einer klinisch sicheren anti-glutamatergen Substanz eine hohe Priorität für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen (Bolshakov *et al.*, 2005). Insbesondere bei chronischen Erkrankungen, wie z.B. dem Glaukom, könnte der Glutamat-induzierte Zelluntergang medikamentös aufgehalten werden (Überblick bei Wein und Levin, 2002).

#### 1.4 Abecarnil, ein GABA-Modulator mit anti-exzitotoxischen Eigenschaften

Ein physiologischer Gegenspieler des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat ist der Transmitter GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure), welcher über einen Einstrom von  $\text{Cl}^-$ -Ionen inhibitorisch wirkt (Eccles *et al.*, 1963). Durch ihre Bindungsstelle am  $\text{GABA}_A$ -Rezeptor (Braestrup 1980) können Benzodiazepine die GABA-erge Übermittlung verstärken (Haefely *et al.*, 1975).

Das  $\beta$ -Carbolin Abecarnil wirkt als partieller Benzodiazepin-Rezeptor-Agonist etwa 10-mal potenter als Diazepam indem es den  $\text{GABA}_A$ -Rezeptor direkt moduliert und somit, ähnlich wie Diazepam, GABA-induzierte Chloridströme potenziert (Stephens *et al.*, 1990; Knoflach *et al.*, 1993). Kürzlich zeigte sich in elektrophysiologischen Untersuchungen (Brückner *et al.*, unveröffentlicht), dass Abecarnil zusätzlich zu diesem  $\text{GABA}_A$ -Rezeptor-modulierenden Effekt auch antagonistische Eigenschaften am NMDA-Rezeptor aufweist. Da der NMDA-Rezeptor nur dann für  $\text{Ca}^{2+}$  permeabel wird, wenn die Zellmembran depolarisiert ist, eine Verstärkung des GABA-ergen Systems dagegen zu einer Hyperpolarisierung der Zelle führt, bewirken GABA-verstärkende Substanzen eine Inhibition des NMDA-Rezeptors. Zusätzlich wird durch eine Hyperpolarisierung der Zellmembran auch die Aktivierung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle verhindert. Aufgrund der Summe dieser Effekte kann Abecarnil ein hohes neuroprotektives Potential zugesprochen werden.

In Modellen der kombinierten Sauerstoff- und Glukosedeprivation (OGD) sowie der NMDA-Exzitotoxizität (Ruscher *et al.*, 2006) konnte der protektive Effekt Abecarnils an kultivierten kortikalen Neuronen demonstriert werden.

Auch der neuroprotektive Effekt eines anderen  $\beta$ -Carbolins, Stobadine, konnte bereits in einer Reihe von Modellen des experimentellen Schlaganfalls nachgewiesen werden (Stolč *et al.*, 1997).

Abecarnil wurde erfolgreich in klinischen Studien der Phase II und III an über 2600 Patienten mit generalisierter Angststörung getestet und erwies sich auch im

Vergleich zu anderen Benzodiazepinen als ausgesprochen gut verträglich (Stephens *et al.*, 1990; Pollack *et al.*, 1997; Small und Bystritsky, 1997; Rickels *et al.*, 2000).

All diese Gründe veranlassten uns zur Untersuchung der Wirkung von Abecarnil bei Glutamat-induziertem neuronalen Zelltod retinaler Ganglienzellen, ein dem Glaukom zugrunde liegender pathophysiologischer Mechanismus.

## 1.5 Statine als neuroprotektive Substanzen

Statine (HMG-CoA-Reduktasehemmer) sind potente cholesterolsenkende Substanzen, die in der Behandlung der Hypercholesterinämie (Shepherd *et al.*, 1995; Stein, 2002) und koronaren Herzkrankheit (Sacks *et al.*, 1996; Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, 1994) eingesetzt werden. Darüber hinaus senken Statine die Inzidenz des Schlaganfalls (Blauw *et al.*, 1997; Hess *et al.*, 2000) und konnten in experimentellen Studien auch dessen Outcome verbessern (Endres *et al.*, 1998). Zu dieser protektiven Wirkung der Statine tragen auch cholesterin-unabhängige pleiotrope Effekte bei; dazu zählen anti-thrombotische, anti-inflammatorische und anti-oxidative Eigenschaften (Laufs *et al.*, 2000; Liao 2002).

In einem Modell der Glutamat-induzierten Schädigung kultivierter kortikaler Neurone konnte der protektive Effekt von Statinen beobachtet werden (Bösel *et al.*, 2005). Dieser anti-exzitotoxische Effekt war unabhängig von einer HMG-CoA-Reduktasehemmung. Dabei reduzierte das Statin über einen bisher ungeklärten Mechanismus die NMDA-Rezeptor-Aktivität und verringerte somit den Glutamat-induzierten intrazellulären Calcium-Einstrom, dem Mediator des exzitotoxischen Zelltods (Choi 1995).

Kürzlich wurde berichtet, dass Simvastatin durch die exogene Induktion eines Hitzeschockproteins das Überleben axotomisierter retinaler Ganglienzellen *in vivo* fördert (Kretz *et al.*, 2006). Zuvor konnte bereits in einem Glaukommodell die Protektion retinaler Ganglienzellen durch Induktion eines Hitzeschockproteins nachgewiesen werden (Caprioli *et al.*, 2003; Schmeer *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse dieser Studien veranlassten uns zur Untersuchung der Wirkung von Simvastatin auf die Glutamat-induzierte Schädigung retinaler Ganglienzellen in einer organotypischen Retinakultur.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines organotypischen Kulturmodells der adulten Retina, das als Modell retinaler bzw. neurodegenerativer Erkrankungen verwendet werden kann. Darüber hinaus ergaben sich bezüglich der Charakterisierung dieses Modells folgende Fragestellungen:

1. Über welchen Zeitraum ist die organotypische Kultivierung der adulten Retina möglich?
2. Gibt es Anzeichen der Regeneration axotomisierter retinaler Ganglienzellen?
3. Können Gliazellen in den organotypischen Retinakulturen dargestellt werden?
4. Existieren vaskuläre Strukturen in den organotypischen Retinakulturen?
5. Kann ein Modell der Glutamat-induzierten Schädigung der GCL etabliert werden?
6. Mit welchen Methoden ist dieser Schaden quantifizierbar?
7. Schützt Abecarnil vor Glutamat-induzierter Schädigung der GCL?
8. Schützt Simvastatin vor Glutamat-induziertem Zelltod in der GCL?