Untersuchungen zum Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktoren auf die elektrischen Signale retinaler Stäbchen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von **Mischa Horst Peter Billek**
aus **Giessen**
Giessen 2002

Aus dem Physiologischen Institut
Leiter: Prof. Dr. Dr. Piper
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: Prof. Dr. Gottfried Nöll
Gutachter: Prof. Dr. Florian Dreyer

Tag der Disputation: 05. Juni 2008

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

1.1 Der Transduktionsprozess der Photorezeptoren 5

1.2 Ganz-Zell-Ableitungen von retinalen Stäbchen 11

1.3 Stickoxid in Photorezeptoren 12

1.4 Fibroblastenwachstumsfaktoren in der Retina 15

1.5 Fragestellung 17

2. Methoden

2.1 Isolierung und Kultivierung von Zellen 18

2.2 Elektroden und Medien 19

2.3 Elektronik und Lichtreize 24

2.4 Serienwiderstand und Diffusion 24

3. Ergebnisse

3.1 Kontrollversuche mit dem Standardmedium 29

3.2 Versuche mit Fibroblastenwachstumsfaktoren 31

3.3 Versuche mit Stickoxiddonatoren 32

3.4 Versuche mit Stickoxidsynthaseinhibitoren 34

3.5 Versuche mit NADPH 35

3.6 Versuche mit L-Arginin 38

3.7 Versuche mit EGTA 40

4. Diskussion

4.1 Die Botenstoffsysteme in Lichtsinneszellen 44
4.2 Die Kontrolle des cGMP in Photorezeptoren 45
4.3 Zum Einfluss der Stickoxidsynthase 46
4.4 Die Wirkung von NADPH und L-Arginin 48
4.5 Zur Wirkung veränderter Kalziumkonzentrationen 50
4.6 Überlegungen zum Wirkungsmechanismus von FGF 51

5. Zusammenfassung 54

6. Summary 56

7. Literatur 58

Danksagung 67

Lebenslauf 68

1. Einleitung

1.1 Der Transduktionsprozess der Photorezeptoren

Photorezeptoren sind grossen Änderungen der Leuchtdichte ausgesetzt. Für das Tages- und Dämmerungssehen stehen daher zwei Typen von Photorezeptoren mit unterschiedlicher Empfindlichkeit zur Verfügung: Zapfen für das photopische Sehen am Tag und Stäbchen für das skotopische Sehen in der Dämmerung. Beide Typen können ihre Empfindlichkeit über einen grossen Leuchtdichtebereich variieren. Während der Dunkeladaptation nimmt die Lichtempfindlichkeit zu. Die absolute Sehschwelle, die nach einem mehrstündigen Dunkelaufenthalt erreicht wird, liegt nahe an der physikalisch möglichen Grenze. Bereits einzelne Photonen können dann elektrische Antworten in retinalen Photorezeptoren auslösen.

Photorezeptoren von Vertebraten beantworten Lichtreize mit einer Hyperpolarisation ihres Membranpotenzials. Die einzelnen Schritte dieses Transduktionsprozesses und die Rolle des zyklischen 3',5'- Guanosin-Monophosphat (cGMP) als intrazellulärer Messenger sind weitgehend geklärt.

Photorezeptoren bestehen aus Außen- und Innensegment mit unterschiedlicher Struktur und Funktion. Die Außensegmente werden fast vollständig durch einen Stapel von Membranscheiben (Disks) ausgefüllt. In die Lipidmembran dieser Disks ist der Sehfarbstoff Rhodopsin eingelagert, der aus einem Proteinanteil, dem Opsin, und dem Chromophor Retinal besteht (Wald 1933; Morton 1944). Der erste Schritt im Transduktionsprozess ist die Isomerisation des Retinals aus der 11-2is in die all-trans Konfiguration durch die Absorption eines Lichtquants (Wald

1968). In der Folge wird das Opsin durch Konformationsänderungen in einen aktivierten Zustand überführt und interagiert nun mit drei weiteren Proteinen: dem Transducin aus der Gruppe der G-Proteine, der Rhodopsin-Kinase und dem Arrestin (Kühn 1978, 1980; Kühn & Chabre 1983). Transducin ist ein aus drei Untereinheiten bestehendes Membran-assoziiertes GTP-bindendes Protein. Ein Rhodopsinmolekül aktiviert bis zu 2000 Transducin-Proteine (Fung & Stryer 1980). Die α-Untereinheit des Transducins dissoziiert frei in das Zytoplasma und aktiviert eine Phosphodiesterase (Uchida et al. 1981; Fung et al. 1981), die bis zu 1000 cGMP-Moleküle spalten kann. Die cGMP-Konzentration im Zytoplasma nimmt daher schnell ab. Die Konzentration von cGMP steuert direkt die lichtabhängigen Kanäle in der Aussensegmentmembran (Fesenko et al. 1985). Eine hohe Konzentration von cGMP hält die Kanäle bei Dunkelheit offen, bei Abnahme der intrazellulären cGMP-Konzentration schließen sich die Kanäle. Die cGMP-gesteuerten Kanäle sind für ein- und zweiwertige Kationen, vor allem für Natrium- und Kalziumionen, durchlässig und haben unter physiologischen Bedingungen nur eine Einzelkanal-Leitfähigkeit von ca. 0.1 pS und eine Öffnungsdauer von ca. 1 ms (Detwiler et al. 1982, Attwell & Gray 1984, Schmidt et al. 1985). Die im Vergleich zu anderen bekannten Ionenkanälen sehr geringe Leitfähigkeit des lichtgesteuerten Kanals wird durch zweiwertige Ionen verursacht, die die Kanäle während der Passage zeitweilig blockieren. Durch die lichtabhängigen Kanäle fließt ein ständiger Dunkelstrom. Bei Belichtung schließen sich diese Kanäle infolge der abnehmenden intrazellulären cGMP-Konzentration. Das Rezeptorpotenzial besteht aus einer von der Lichtintensität abhängigen Hyperpolarisation. Im Dunklen liegt das Membranpotenzial bei etwa -30 mV und erreicht nach Schließung der Kanäle etwa -55 mV.

Die Transduktionskaskade kann an verschiedenen Stationen abgeschaltet werden. Das Transducin hydrolisiert GTP zu GDP und inaktiviert sich damit selbst.

Die intrazelluläre cGMP-Konzentration kann durch eine kalziumabhängige Guanylatzyklase wieder erhöht werden. Diese Regulation der cGMP-Synthese ergibt eine negative Rückkopplung zur Kontrolle von Membranstrom und cGMP-Konzentration. Sie wird durch einen in der Aussensegmentmembran vorhandenen Natrium-Kalzium-Kalium-Austauscher (Yau & Nakatani 1984; Cervetto et al. 1989) vervollständigt. Wenn sich bei abnehmender cGMP-Konzentration die Kanäle schließen, strömt kein Kalzium in die Zelle ein und der Kalziumspiegel sinkt, denn über den Natrium-Kalzium-Kalium-Austauscher wird zunächst weiterhin Kalzium aus der Zelle hinausbefördert. Kalzium wirkt, obwohl es nicht der intrazelluläre Messenger der Photorezeptoren ist, somit an mindestens zwei Stellen auf den Transduktionsprozess ein: Es blockiert die Kanäle während der Passage und hemmt die Guanylatzyklase. Diese Befunde erklären die früher von Hagins und Yoshikami aufgestellte Hypothese, dass Kalzium den intrazellulären Botenstoff der Photorezeptoren darstellt.

Auch Rhodopsin wird in einem etwas längeren Zeitraum durch die Rhodopsinkinase und das Arrestin wieder inaktiviert (Kühn & Dreyer 1972). In einem noch längeren Zeitraum zerfällt schließlich das Rhodopsin in Opsin und Retinal und kann dann mit Hilfe des im Pigmentepithel reisomerisierten 11-cis-Retinals regeneriert werden (Nöll 1984, 1986; Rando 1990). Dieser Vorgang kann allerdings einen Zeitraum im Minutenbereich einnehmen. Der Transduktionsprozess der Photorezeptoren mit den daran beteiligten Proteinen, Coenzymen, intrazellulären Botenstoffen und Ionen ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Der Zellkern, der gesamte Syntheseapparat und zahlreiche Mitochondrien zur ATP-Produktion liegen in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen. ATP getriebene Natrium-Kalium-Pumpen in der äußeren Plasmamembran des Innensegments generieren im Dunklen einen ständigen Strom von ca. 30 pA. Das Innenglied bildet somit auch eine Spannungsquelle, die bei Belichtung oder Abwesenheit von cGMP ein Potenzial von - 60 bis - 90 mV erzeugt. Die elektrischen Eigenschaften der Photorezeptoren in der Retina werden außerdem durch die elektrische Kopplung dieser Zellen, besonders der Stäbchen, untereinander beeinflusst (Baylor et al. 1971; Attwell & Wilson 1984). Das Spannungsrauschen kann durch die Kopplung vermindert werden. Dabei verschlechtert sich jedoch das räumliche Auflösungsvermögen. In der Innensegmentmembran lokalisierte spannungsabhängige, cäsiumsensitive Ionenkanäle sind für die Ausprägung der Lichtantworten von Bedeutung (Fain et al. 1978; Bader et al. 1982; Baylor et al. 1984). Diese Kanäle werden bei einem Potenzial von ca. - 52 mV aktiviert und bilden ein induktives Element, das ein Hochpassverhalten bewirkt (Baylor et al. 1984). Schnelle Komponenten der Lichtantwort werden daher bevorzugt über das an das Innenglied anschließende Axon zur Synapse und damit an die nachgeschalteten Neurone weitergeleitet. Als Transmitter der Photorezeptoren dient vermutlich Glutamat, das von den Photorezeptoren synthetisiert wird (Miller & Schwartz 1983), den Effekt des Photorezeptor-Transmitters an den nachgeschalteten Neuronen imitiert (Murakami et al. 1972, 1975), über einen hoch-affinen Mechanismus von den Photorezeptoren aufgenommen (Marc & Lam 1981) und in Abhängigkeit vom Membranpotenzial freigesetzt wird (Ayoub et al. 1989; Ayoub & Copenhagen 1991).

Abbildung 1: Der Transduktionsprozess in den retinalen Photorezeptoren mit den daran beteiligten Enzymen kann in drei Komplexe unterteilt werden:

1. Die lichtabhängige Enzymkaskade an den Membranstapeln des Außensegments umfasst die in diesem Schema im oberen linken Teil dargestellten Elemente. Rhodopsin (Rh) aktiviert nach Belichtung das aus drei Untereinheiten bestehende G-Protein Transducin (Tα, Tβ, Tγ). Die drei Proteine Arrestin (Ar), Rhodopsin-Kinase (Ki), Recoverin (Rec) blockieren das aktivierte Rhodopsin nach einiger Zeit. Eine Untereinheit des Transducins (Tα) aktiviert das cGMP-spaltende Enzym Phosphodiesterase (PDE). Phosphodiesterase (PDE) und membrangebundene Guanylatzyklase (GC) regulieren die cGMP-Konzentration. Kalzium (Ca^{++}) beeinflusst die Aktivität dieser Enzyme zum Teil über zwischengeschaltete kalzium-bindende Proteine (Cb).

2. Das Membranpotenzial hängt von den Ionenkonzentrationen in der Zelle ab und wird durch drei Proteine in der Außenmembran gesteuert. Diese Elemente sind im rechten Teil des Schemas dargestellt. Der lichtabhängige Ionenkanal (Kanal) wird durch cGMP offengehalten und schließt sich bei Belichtung. Die Bindung des cGMP an den Kanal hängt von dem kalzium-bindenden Protein Calmodulin (Cal) ab. Die Konzentrationen der positiven Ionen Natrium (Na^{+}) und Kalzium (Ca^{++}) in der Zelle werden durch den lichtabhängigen Ionenkanal (Kanal), durch den Natrium-Kalzium-Austauscher (Na-Ca Exch.) und durch die ATP abhängige Natrium-Kalium-Pumpe (Na-K Pump) im Innensegment reguliert.

3. Konzentration und Umsatz von cGMP in der Lichtsinneszelle werden auch durch ein Stickstoffmonoxid bildendes Enzym (NOS) und eine lösliche Guanylatzyklase im Innensegment beeinflusst. Diese Enzyme sind im unteren linken Teil des Schemas dargestellt. Stickstoffmonoxid (NO) wird aus Arginin (ARG) hergestellt. Die Synthase (NOS) wird durch das Coenzym NADPH und das kalzium-bindende Protein Calmodulin (Cal) reguliert.

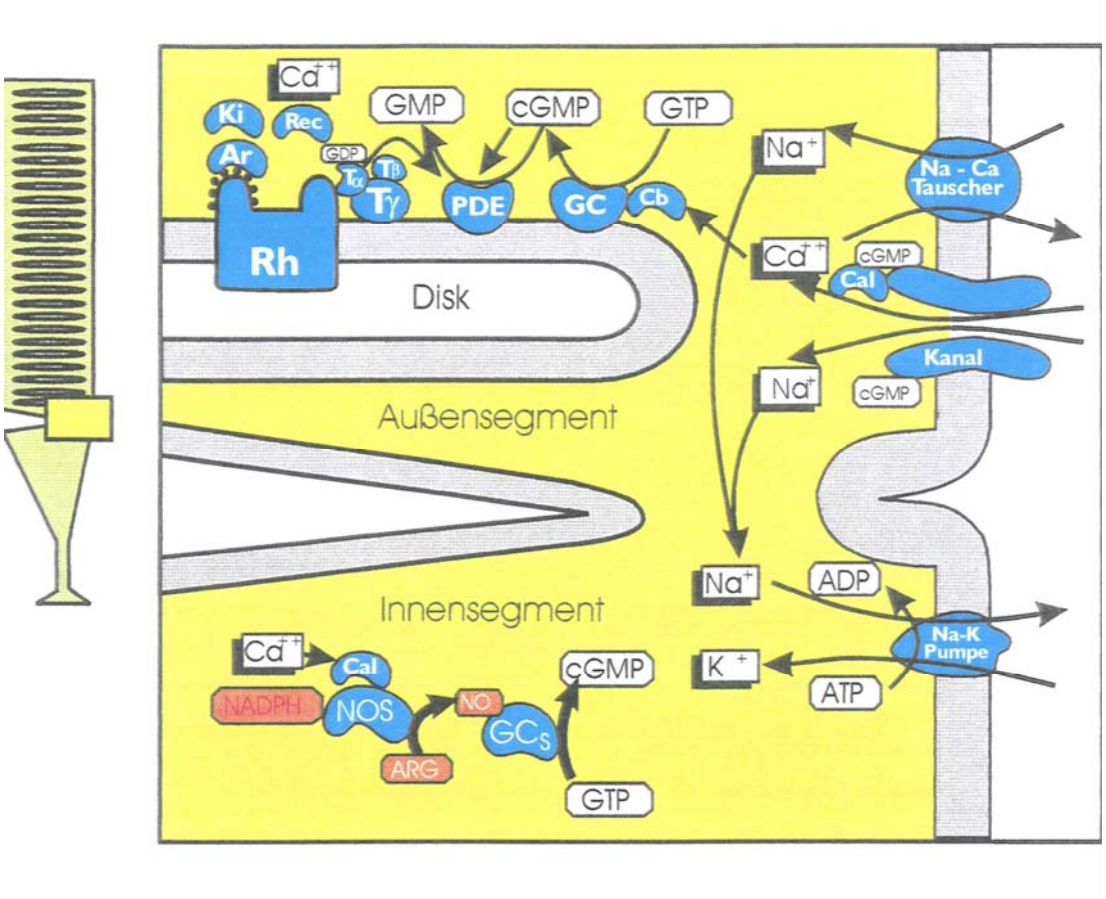

Abbildung 1: Legende Seite 10

1.2 Ganz-Zell-Ableitungen von retinalen Stäbchen

Bei Ableitungen mit Patch-Clamp-Elektroden in der Ganz-Zell-Konfiguration findet ein Austausch löslicher Substanzen zwischen Zellinhalt und Elektrodenfüllung statt. Dieser Austausch folgt den Diffusionsgesetzen und hat daher einen exponentiellen Zeitverlauf, dessen Geschwindigkeit von der Austauschfläche zwischen Zelle und Elektrode und dem Diffusionskoeffizienten der jeweiligen Substanz abhängt. Die Größe der Öffnung zwischen Zelle und Elektrode lässt sich durch Messung des Serienwiderstandes bei jeder Ableitung bestimmen. Die Bestimmung des Serienwiderstandes kann durch die Analyse von Zeitkonstanten kapazitiver Ströme bei unterschwelligen Spannungssprüngen erfolgen (Marty & Neher 1983). Bei retinalen Stäbchen hat der diffusionsbedingte Verlust von Nukleotiden und der Austausch von Ionen einen direkten Einfluss auf die Membranströme und -spannungen. Diese Veränderungen lassen sich sowohl unter Voltage-Clamp als auch unter Current-Clamp-Bedingungen registrieren. Wir haben uns bei unseren Versuchen dafür entschieden, die Potenzialveränderungen der Zellen im Current-Clamp-Modus des Patch-Clamp-Verstärkers zu registrieren, weil dann die Diffusion von Ionen nicht durch Ionenströme überlagert wird. Der Diffusionsaustausch eröffnet gleichzeitig die Möglichkeit, durch intrazelluläre Applikation biochemisch aktiver Substanzen in den Metabolismus der Zelle einzugreifen. Das ist bei der Analyse der metabolischen Licht- und Dunkelreaktionen in Photorezeptorzellen von besonderem Interesse, weil der einem Second-Messenger-System analoge Transduktionsprozess unter Beteiligung zyklischer Nukleotide eine besonders direkte Verknüpfung von Zell-Metabolismus und Membranpotenzial herstellt. Diese Untersuchungen ergänzen die Untersuchungen an isolierten Enzymsystemen mit biochemischen Methoden und stellen so eine Verknüpfung von Biochemie und Physiologie der Photorezeptorzelle her.

1.3 Stickoxid in Photorezeptoren

Es gibt Hinweise darauf, dass der Transduktionsprozess auch durch eine im Innenglied der Photorezeptoren vorhandene Stickstoffmonoxidsynthase beeinflusst wird. Stickstoffmonoxid stimuliert in verschiedenen Geweben das Enzym Guanylatzyklase (Moncada et al. 1988). Im Zentralnervensystem wird Stickstoffmonoxid von dem Enzym Nitrooxidsynthase aus L-Arginin synthetisiert. Dieses Enzym konnte immunhistochemisch in verschiedenen Neuronenpopulationen des zentralen Nervensystems und in autonomen Nervenfasern der Retina nachgewiesen werden (Bredt et al. 1990). Zusammengenommen deuten diese Befunde daraufhin, dass Stickstoffmonoxid auch für neuronale Interaktionen im Nervensystem eine Bedeutung haben kann, die über die Regulation des intrazellulären cGMP-Spiegels vermittelt wird.

Da die lichtabhängigen Kanäle in der Aussensegmentmembran von Photorezeptoren direkt von cGMP gesteuert werden und weil auch eine Guanylatzyklase an der Regulation des cGMP-Spiegels beteiligt ist, wurde der Einfluss von Stickstoffmonoxid auf das Membranpotenzial und die Lichtantworten von Photorezeptoren untersucht. Während es bei Ganz-Zell-Patch-Clamp-Ableitungen nicht möglich war, durch die Ergänzung des Pipettenmediums mit GTP allein eine vollständige Stabilisierung der Dunkelspannung zu erreichen, gelang das, wenn zusätzlich Substanzen vorhanden waren, welche die Aktivität cGMP-regulierender Enzyme beeinflussen können (wenn z.B. Stickstoffmonoxid in die Zelle gebracht wurde). Auch die Konfiguration der Lichtantworten wurde durch Stickstoffmonoxid im Verlauf eines Versuches stabilisiert (Schmidt et al. 1992). Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn der biochemische Vorläufer des Stickoxids L-Arginin oder das Coenzym der Stickstoffmonoxidsynthase NADPH in

die Photorezeptorzelle injiziert wurden (Tsuyama et al. 1993). Der Verlauf der Dunkelspannung ist daher geeignet, einen Effekt von Stickstoffmonoxid auf die Regulation des cGMP-Spiegels zu demonstrieren. Mit Stickoxiddonatoren in der Pipette wurde eine stabile Dunkelspannung oder sogar eine leichte Tendenz zur Depolarisation anstelle der sonst beobachteten Hyperpolarisation registriert.

Stickoxiddonatoren hatten noch einen zweiten Effekt auf die Funktion der Photorezeptoren: der Verlauf der Repolarisationsphase von Lichtantworten wird beschleunigt. Unter der Voraussetzung, dass die Membranspannung zu jedem Zeitpunkt eine Funktion des cGMP-Spiegels in der Photorezeptorzelle ist, kann man annehmen, dass die beiden von Stickstoffmonoxid bewirkten Modifikationen verschiedene Aspekte des cGMP-Metabolismus reflektieren. Die Änderungen der Dunkelspannung können als Indikator für den intrazellulären cGMP-Spiegel gebraucht werden und die Geschwindigkeit der Repolarisation kann einen Anhaltspunkt für die Größe des cGMP-Umsatzes geben. Diese Befunde sind mit der Hypothese vereinbar, dass Stickstoffmonoxid die Aktivität der Guanylatzyklase in den Stäbchen steigert. Die beobachteten Änderungen im zeitlichen Verlauf der Lichtantworten stimmen mit Änderungen überein, die bei der Helligkeitsadaptation der Photorezeptoren beobachtet wurden. Es ist daher möglich, dass die Stickstoffmonoxidsynthase eine Rolle in diesen Adaptationsprozessen spielt.

Photorezeptorzellen sind für die Untersuchung zum Einfluss von Stickstoffmonoxid besonders geeignet, weil in diesen Zellen sowohl das Enzym Stickstoffmonoxidsynthase, das aus L-Arginin Stickstoffmonoxid bildet, als auch das Zielprotein des Stickstoffmonoxids, die lösliche Guanylatzyklase, vorhanden ist. Ausserdem spiegelt sich die cGMP-Konzentration in diesem Zelltyp direkt im Membranpotenzial und kann daher besonders leicht gemessen werden. Es gibt auch

Hinweise darauf, dass Störungen in der Regulation des Stickstoffmonoxids bei degenerativen Netzhauterkrankungen von Bedeutung sein könnten.

Die vorliegenden Resultate konnten im Rahmen eines einfachen theoretischen Modells interpretiert werden, bei dem die Konzentration und der metabolische Fluss von cGMP von den zwei Enzymen Guanylatzyklase (GC) und Phosphodiesterase (PDE) kontrolliert werden (Bownds & Thomson 1988):

$$\text{GTP} \xrightarrow{\text{GC}} \text{cGMP} \xrightarrow{\text{PDE}} \text{GMP}$$

Höhere cGMP-Konzentrationen können dabei das Resultat einer Aktivierung der Guanylatzyklase oder einer Inhibition der Phosphodiesterase sein. Obwohl die intrazelluläre cGMP-Konzentration in beiden Fällen angehoben ist, sind die Auswirkungen auf den metabolischen Fluss gegensätzlich: er wird im ersten Fall erhöht, aber im zweiten gesenkt. Es ist bekannt, dass NO den cGMP-Spiegel im Gehirn und in anderen Geweben durch Aktivierung einer löslichen Guanylatzyklase erhöht (Knowles et al. 1989; Bredt & Snyder 1989). Es ist daher möglich, dass der gleiche Mechanismus in Photorezeptoren realisiert ist. Es muss daher berücksichtigt werden, dass die Guanylatzyklase in Photorezeptoren in einer löslichen und einer nichtlöslichen membrangebundenen Form vorliegt. Über die Aktivierung einer Guanylatzyklase aus den Stäbchenaußensegmenten von Rindern durch NO und Natrium-Nitroprussid wurde von Horio & Murad (1991) berichtet. Der Adaptationsprozess in Photorezeptoren ist vermutlich mit Änderungen des metabolischen cGMP-Flusses assoziiert (Ames et al. 1986; Bownds & Thomson 1988).

1.4 Fibroblastenwachstumsfaktoren in der Retina

Wachstumsfaktoren sind per Definition Faktoren, die das Wachstum von Zellen und Geweben *in vitro* und *in vivo* steuern können. Verschiedene Wachstumsfaktoren werden auch in der Retina, im Pigmentepithel und anderen okulären Geweben sezerniert und spielen, wie neuere Forschungsergebnisse gezeigt haben, ein wichtige Rolle in der Entwicklung, Differenzierung und bei verschiedenen Augenerkrankungen.

Die in der vorliegenden Untersuchung behandelten Fibroblastenwachstums-faktoren (Fibroblast growth factor, FGF) bestehen aus einer einzelnen Polypeptid-kette, die in unterschiedlichen Formen mit 134 bis 154 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 16 bis 18 kDa vorliegen kann. Die Aminosäuresequenz wurde komplett bestimmt (Burgess et al. 1985). Interessant ist, dass in der Sequenz der Fibroblastenwachstumsfaktoren eine Sequenz fehlt, von der angenommen wird, dass sie für die Sekretion vom Cytoplasma in den Interzellularraum von Bedeutung ist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Faktoren ihre Wirkungen im Inneren der Zellen entfalten.

In dieser Arbeit wurden zwei Prototypen aus dieser Gruppe von Peptiden verwendet, und zwar das in einer acidischen Form vorliegende FGF-1 und das in einer basischen Form vorliegende FGF-2. Diese beiden Wachstumsfaktoren teilen 55° % ihrer Aminosäuresequenz, die auch zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert ist. Rezeptoren für diese beiden Wachstumsfaktoren konnten in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Die Fibroblastenwachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen biologischen Prozessen, wie Zellwachstum, Entwicklung und Differenzierung. Auch in verschiedenen Geweben des Auges und besonders in der Retina und in Photorezeptoren konnten diese

Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden. Dabei ist der FGF-Level in jungen undifferenzierten Sehzellen besonders hoch und scheint hier die Expression von Opsin anzuregen (Hicks & Courtois 1988). In adulten Photorezeptoren werden Fibroblastenwachstumsfaktoren lichtabhängig an spezifische Bindungsstellen der Membran gebunden und können möglicherweise direkt in den Transduktionsprozess involviert sein (Stryer 1986, Plouet et al. 1988). Auch die Konzentrationen von ATP und GTP in der Zelle spielen für die Bindung des FGF eine Rolle.

Verschiedene Experimente haben auch gezeigt, dass Fibroblasten-wachstumsfaktoren eine Verlangsamung degenerativer Prozesse in retinalen Nervenzellen bewirken können. Solche Ergebnisse wurden bei Ratten nach Durchtrennung des Sehnerven gefunden. Ähnliche Befunde gibt es bei Schädigungen durch hohe Lichtintensitäten und auch bei RCS-Ratten mit degenerativer Netzhauterkrankung (Sievers et al. 1987; Faktorovitch et al. 1990, 1992; Lavail et al. 1992). In der hier vorliegenden Untersuchung wurde damit begonnen, den Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktoren auf die Membranspannung und die Lichtantworten retinaler Stäbchen zu untersuchen, um Hinweise auf den intrazellulären Mechanismus für die protektive Wirkung der Fibroblasten-wachstumsfaktoren zu gewinnen.

1.5 Fragestellung

Untersuchungen an Photorezeptoren und anderen Neuronen in der Retina spielen für neurobiologische Untersuchungen eine wichtige Rolle, weil sie in vielen Fällen als Modelle für den Ablauf zentralnervöser und zellulärer Signalverarbeitungsprozesse dienen können. Die intrazellulären Transduktionsprozesse in den Photorezeptoren gehören z.B. zu den am frühesten und am besten untersuchten Systemen dieser Art und auch die Verschaltungen zwischen den verschiedenen retinalen Neuronen sind besonders gut beschrieben und charakterisiert. Diese besonderen Fortschritte bei der Forschung an der Netzhaut sind möglich, weil die Retina eine besonders klare Struktur und Architektur hat, experimentell relativ sehr gut zugänglich ist und durch den einfach zu kontrollierenden Reiz Licht direkt und adäquat beeinflusst werden kann. Da die Netzhaut in der Individualentwicklung aus dem Zentralnervensystem hervorgeht und weiter mit diesem zusammenhängt, kann sie auch als Modellsystem für andere zentralnervöse Prozesse dienen. So haben Untersuchungen an der Retina oft als Anregung und Leitlinie für Forschungen in anderen Bereichen der Neurobiologie und darüber hinaus gedient.

In dieser Arbeit sollen die Einflüsse zweier Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF-1 und FGF-2) auf den Transduktionsprozess und die elektrischen Signale retinaler Photorezeptoren untersucht werden. Dazu wurden Ableitungen mit der Patch-clamp Technik in der Ganz-Zell-Konfiguration durchgeführt. Diese Technik erlaubt die Registrierung der elektrischen Signale von Photorezeptoren mit einem besonders hohen Signal-Rausch-Abstand. Gleichzeitig können über die Ableitpipette biochemisch wirksame Substanzen in die Zelle appliziert und in ihrer Wirkung studiert werden. Die Wachstumsfaktoren konnten auf diese Weise in das Zellinnere transportiert und in ihrer Wirkung mit der anderer biochemisch aktiver Substanzen verglichen werden. Durch die gleichzeitige Applikation von Wachstumsfaktoren und

anderen Substanzen gab es erste Hinweise auf mögliche Wirkungsmechanismen für die beobachteten Effekte.

2. Methoden

2.1 Isolierung und Kultivierung von Zellen

Stäbchen wurden aus den Netzhäuten adulter Grasfrösche *(Rana temporaria*) isoliert. Die Präparation erfolgte unter Infrarotlicht. Die Bulbi oculi wurden auf Eis gekühlt und mit Hilfe eines Makrotoms äquatorial durchtrennt. Die Retina der für 24 Stunden dunkeladaptierten Tiere wurde nach Öffnung der Bulbi entnommen und unter einem Stereomikroskop mit Infrarotkonverter und Infrarot-Beleuchtung von Sklera, Chorioidea und Pigmentepithel separiert. Durch vorsichtiges Zerzupfen der Retina mit feinen Pinzetten in der Messkammer unter extrazellulärem Medium konnten funktionsfähige Stäbchen, die aus dem Aussensegment und dem distalen Teil des Innensegments bestanden, ohne Enzymbehandlung isoliert werden. Einzelne isolierte Stäbchen sanken auf den Boden der Messkammer. Größere verbliebene Teile der Retina wurden entfernt. Die Flüssigkeitsoberfläche in der Messkammer wurde zur Reinigung noch mit einer feinen Spritze abgesaugt. Die Ausbeute betrug bis zu einhundert intakte Stäbchen bei einer Präparation. Daneben fanden sich in großer Zahl abgebrochene Außensegmente, die für unsere Versuche nicht verwendet werden konnten. Die isolierten Stäbchen wurden innerhalb von drei Stunden untersucht und zeigten während dieser Zeit keine physiologischen Veränderungen. Ein Austausch oder eine Umwälzung des extrazellulären Mediums während des Versuchs fand nicht statt. Die Zellen befanden sich während der Messung auf dem Boden einer Messkammer, in der sich eine nur 1 mm hohe Schicht von

extrazellulärem Medium befand, so dass durch Diffusion eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet war.

Die Stäbchen auf dem Boden der Messkammer wurden über ein Zeiss® Invertoskop D und ein Zeiss® Plan-Objektiv 40/0,60 mit langem Arbeitsabstand und eine Infrarotkamera auf einem Monitor mit Rotfilter bei 700-facher Vergrösserung beobachtet (Abb. 2). Die Wellenlänge der Mikroskopbeleuchtung wurde durch einen Schott® RG 1000 Filter auf den Infrarotbereich über 800 nm beschränkt.

2.2 Elektroden und Medien

Die Messungen an Photorezeptoren wurden mit der Patch-Clamp-Methode durchgeführt (Hamill et al. 1981). Die Ableitungen erfolgten in der Ganz-Zell-Konfiguration. Die Elektroden wurden aus Flintglas-Kapillaren mit einem Zwei-Schritt-Puller gezogen und anschließend unter dem Mikroskop an einer elektrisch beheizten Glaskugel, die sich zur Vermeidung von Konvektionsströmungen in einem schwachen Luftstrom befand, an der Spitze thermisch poliert. In der Nähe der Spitze wurden die Elektroden mit einem durch Hitze polymerisierten Silikonelastomer (Sylgard®) überzogen, um die Elektrodenkapazität zu vermindern. Die Weite der Elektrodenöffnung wurde mit einer Bläschen-Methode kontrolliert. Dabei wird die über einen Silikonschlauch mit einer Spritze verbundene Elektrode mit der Spitze in Methanol getaucht. Aus dem Druck, der aufgewendet werden muss, bis an der Elektrodenspitze kleine sichtbare Luftbläschen austreten, kann auf die Öffnungsweite der Elektroden geschlossen werden. Für die Ableitungen von Stäbchen wurden Elektroden mit einer Bläschenzahl von 2.6 - 3.0 verwendet, d.h. eine 10 ml-Spritze muss bis zum Austritt der Bläschen bis zu der entsprechenden Markierung zusammengedrückt werden. Diese Elektroden hatten bei Füllung mit einem Standardmedium einen elektrischen Widerstand von 4 bis 6 MΩ und einen mit

dem Rasterelektronenmikroskop gemessenen Spitzeninnendurchmesser von ca. 0.5 µm. Bei den Ableitungen wurden die Elektroden möglichst in rechtem Winkel mit Hilfe eines Mikromanipulators bis in den Mikrometerbereich an die Mitte der Aussenglieder angenähert (Abb. 2). Die Messkammer war drehbar gelagert, um die einzelnen Stäbchen in eine möglichst günstige Annäherungsposition bringen zu können. Während der Annäherung wurde auf die Pipette ein hydrostatischer Druck von einer 2 cm hohen über ein U-Rohr angeschlossenen Wassersäule ausgeübt. Der ständige Ausstrom von Flüssigkeit verhinderte eine Verunreinigung der Pipettenspitze. Der Kontakt und die hochohmige Abdichtung zwischen Pipette und Photorezeptorzelle wurde durch Anlage eines Unterdrucks hergestellt. Der elektrische Widerstand einer solchen Abdichtung beträgt 5 bis 10 GΩ. Nach erfolgter Ausbildung eines solchen Gigaseals erfolgte spontan, durch erhöhten Unterdruck oder durch eine höhere Spannung der Membrandurchbruch und es ergab sich die gewünschte Ganz-Zell-Konfiguration.

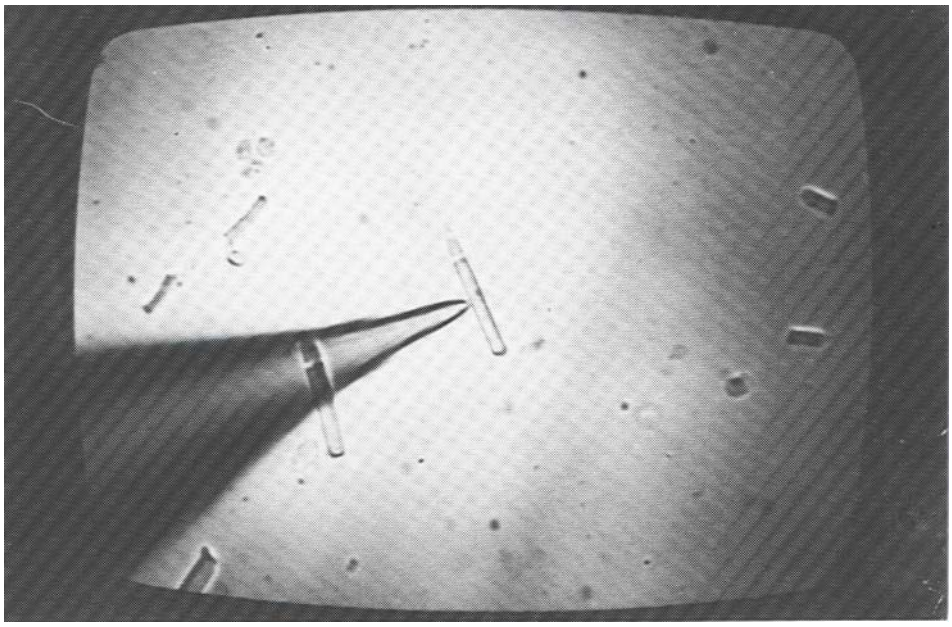

Abbildung 2: Elektrode und Stäbchen. Aufnahme vom Monitor unter Infrarotlicht bei 700-facher Vergrösserung.

Das Inkubationsmedium für die Stäbchen hatte die folgende Zusammensetzung:

NaCl:	100 mM
KCl:	2.7 mM
MgCl:	0.5 mM
CaCl:	1.0 mM
Glukose:	5.0 mM
HEPES:	10 mM
pH:	7.8

Patch-Clamp-Elektroden wurden mit dem folgenden Standardmedium gefüllt:

KCl:	100 mM
MgCl:	0.5 mM
EGTA:	0.3 mM
GTP:	1.0 mM
HEPES:	10 mM
pCa:	7.3
pH:	7.2

Die Substanzen, deren Wirkung im Verlauf der Experimente getestet werden soll, wurden diesem Medium hinzugefügt. FGF-2 wurde von Farmitalia Carlo Erba® bezogen, FGF-1 wurde im Institut National de la Sante et de la Recherche Medical (INSERM) U118 in Paris hergestellt.

Die verwendeten Lösungen wurden über einen sterilen 0,2 µm-Filter der Fa. Schleicher und Schüll® gefiltert. Die Füllung der Elektroden erfolgte durch Ansaugen der Intrazellularmedien über einen Schlauch und anschließendes Auffüllen mit einer Spritze.

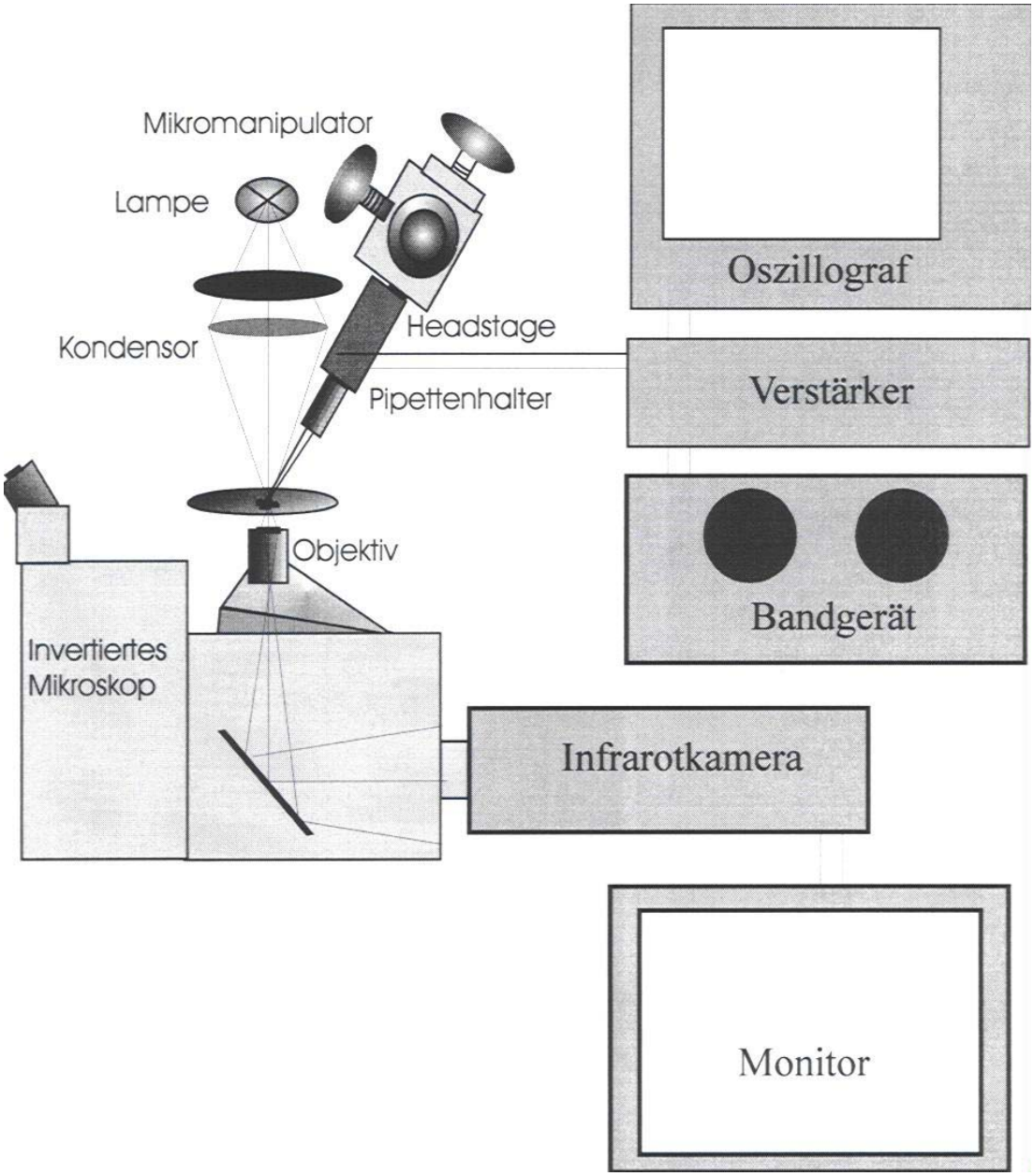

Abbildung 3: Schemazeichnung des Versuchsaufbaus

2.3 Elektronik und Lichtreize

Die elektrischen Signale wurden über Ag-AgCl Elektroden abgeleitet, mit einem EPC-7 Verstärker der Firma List verstärkt, parallel auf einem Oszillografen dargestellt und analog auf Magnetband gespeichert. Zur Erzeugung von Strom- und Spannungspulsen war ein im Institut gebauter Pulsgenerator an den Verstärker angeschlossen (Abb. 3). Die Pipetten wurden unmittelbar vor der Annäherung an die Zellen mit dem Potenzial der Badlösung abgeglichen und die Elektrodenkapazität wurde am Verstärker kompensiert. Durch die abweichende ionale Zusammensetzung von Badlösung und Cytosol tritt bei dem Übergang von der Cell-Attached- zur Ganz-Zell-Ableitkonfiguration ein Diffusionspotenzial von etwa 4 mV auf, das bei der Auswertung korrigiert wurde.

Lichtreize unterschiedlicher Intensität und Dauer konnten mit einer Leuchtdiode bei einer Wellenlänge von λ = 550 nm appliziert werden. Die Leuchtdichte bei verschiedenen Einstellungen wurde mit einer kalibrierten Silikon-Photodiode (SDC Typ SD-444-12-12-171) gemessen. Die maximale Bestrahlungsstärke betrug $9.1 * 10^{-8}$ W/cm^2, was bei einer monochromatischen Strahlung von 550 nm 2500 Photonen / s μm^2 entspricht.

2.4 Der Zusammenhang von Serienwiderstand und Diffusion

Bei Ableitungen von retinalen Stäbchen mit einem einfachen Standard-Elektrodenmedium ohne Nukleotide spiegelt sich der diffusionsbedingte Verlust von GTP und cGMP in einer Hyperpolarisation des Membranpotenzials und in Veränderungen der Lichtantworten wider. Die Zellen verändern ihre Dunkelspannung spontan in einigen Minuten von anfänglich etwa -25 mV auf annähernd -52 mV, die Amplitude der Lichtantworten nimmt parallel dazu ab und

die Repolarisation der Lichtantworten verlangsamt sich. Diese Veränderungen folgen einem exponentiellen Zeitverlauf. Die Geschwindigkeit der Hyperpolarisation und der anderen Änderungen unter ansonsten identischen Versuchsbedingungen kann so durch die Zeitkonstante einer Exponentialfunktion beschrieben werden. Der Wert dieser Zeitkonstante hängt vom elektrisch gemessenen Serienwiderstand der Präparate ab. Es ist daher eine Datennormierung erforderlich, wenn Ergebnisse verschiedener Zellen verglichen werden. Ein einfacher Weg zum Ausgleich unterschiedlicher Zeitkonstanten (τ) ist es, die Messwerte gegen den Quotienten t/τ (t = Zeit in s) aufzutragen. Die gemessene Hyperpolarisation kann dann durch:

$$V(t/\tau) = V_\infty - (V_\infty - V_O)e^{-k(t/\tau)} \qquad (1)$$

beschrieben werden, wobei V die Dunkelspannung mit einem Anfangswert V_O und einem Endwert V_∞ bezeichnet. Der Geschwindigkeitsparameter k wird zur Berücksichtigung abweichender Lösungszusammensetzungen eingeführt und muss unter Standardbedingungen 1.0 betragen. Um den Wert des Parameters k unter verschiedenen Messbedingungen zu ermitteln, ist es notwendig, die Zeitkonstante τ über die Messung des Serienwiderstandes unabhängig vom Verlauf des Versuchs zu bestimmen. Das ist möglich, weil zwischen τ und Rser eine lineare Relation der einfachen Form

$$\tau = a + b\mathrm{Rser} \qquad (2)$$

besteht. Die Konstanten *a* und *b* konnten mit ausreichender Genauigkeit nach dem in Abbildung 4 dargestellten Verfahren bestimmt werden. Mit dem beschriebenen Verfahren konnten auch Änderungen der Lichtantworten analysiert werden.

Abbildung 4: (folgende Seite):

A) Elektrisches Ersatzschaltbild eines isolierten Stäbchens und einer Patch-Elektrode in der Ganz-Zell-Ableitungskonfiguration. Es sind Widerstände (R) und Kapazitäten (C) von Pipette (P), Seal (S), Membran (M) und Zellelementen (acc) eingezeichnet. Der in Reihe zur Kapazität geschaltete Serienwiderstand (Rser) ergibt sich aus R_{acc} *plus* R_P. Die kleinen ausgefüllten Dreiecke repräsentieren die indifferente Elektrode.

B) Stromantworten auf Spannungssprünge von 5 mV. Die schraffierten Flächen sind proportional zu C_M. Der Serienwiderstand (Rser) und die Membrankapazität (C_M) kann aus den Zeitkonstanten (τc) des kapazitiven Stromes (ΔQ) errechnet werden.
R_M kann aus den Strömen, die nach der Umladung der Membrankapazität noch fließen, bestimmt werden. Dabei bestehen die folgenden Relationen:

$$C_M = \Delta Q/\Delta V \qquad \text{und} \qquad Rser = \tau c/C_M$$

C) Änderungen der Membranspannung und der Lichtantwortamplituden im Versuchsverlauf. Die steilen Abwärtssprünge sind Antworten auf einen sättigenden Lichtreiz von 100 ms Dauer. Der Ganz-Zell-Kontakt wurde zum Zeitpunkt t = 0 hergestellt.

D) In dieser Abbildung ist das Verhältnis zwischen dem gemessenen Serienwiderstand und der Zeitkonstante (τ) für den Verlauf der Dunkelspannung bei 11 verschiedenen Experimenten dargestellt. Der Korrelationskoeffizient für diese beiden Größen betrug 0.96. Die Gleichung der Regressionsgeraden ist:

$$\tau\ [s] = Rser\ [M\Omega] \times 8.37\ [s/M\Omega] - 97.5\ s$$

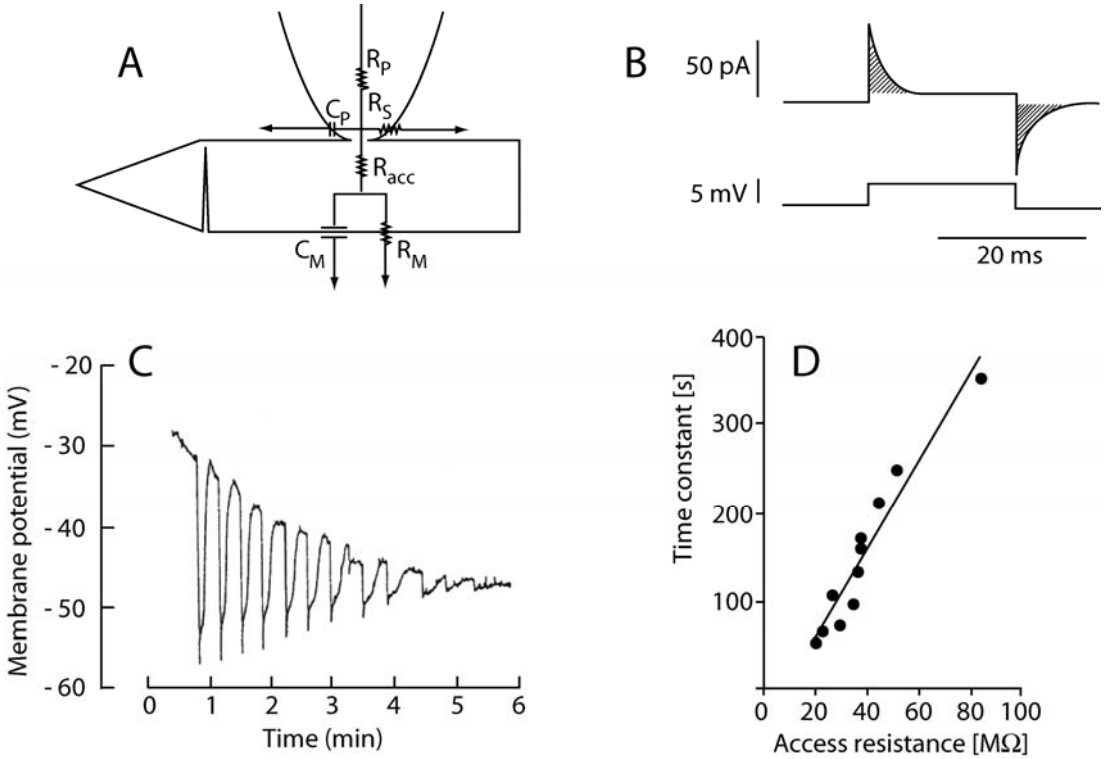

Abbildung 4: (Schmidt et al. 1994) **(**Legende siehe Seite 26)

Wenn in der Messpipette keine Nukleotide zugegeben waren, nahm die Amplitude der Lichtantworten parallel zur Hyperpolarisation ab (Abb. 4C). Ausserdem verlangsamte sich auch die Geschwindigkeit der Repolarisation der Lichtantworten. Zur quantitativen Analyse dieser Änderungen wurde die Geschwindigkeit der Repolarisation als Verhältnis zwischen Amplitude und Dauer der Lichtantwort definiert. Die schnelle initiale Spitze der Lichtantworten blieb dabei unberücksichtigt, weil sie den spannungsabhängigen Kanälen und nicht dem Metabolismus der Nukleotide zugeschrieben wird. Die Änderungen der Repolarisationsgeschwindigkeit S_r folgen ebenfalls einem exponentiellen Zeitverlauf und können daher mit einer Funktion analog Gleichung (1) beschrieben werden, wobei V durch S_r zu ersetzen ist. S_r wird dabei definiert als das Verhältnis der Lichtantwortamplitude in Millivolt zur Lichtantwortdauer in Sekunden. Die Lichtantwortdauer wird definiert als das Intervall, das mit der schnellen Hyperpolarisation beginnt und mit dem Punkt endet, an dem eine Tangente, welche die Repolarisationsphase annähernd beschreibt, den Verlauf der vor dem Lichtreiz registrierten Basislinie schneidet. Bei der Bestimmung der Lichtantwortamplitude wurde die initiale Spitze der Antwort, die durch spannungsabhängige Kanäle verursacht wird, nicht berücksichtigt. Die so definierte Repolarisationsgeschwindigkeit fällt dann bei Versuchen mit einem Standardmedium ohne Nukleotide von anfänglichen Werten von etwa 1.2 mV/s bis auf Werte von 0.1 mV/s ab.

Für die statistische Auswertung bei den Untersuchungen dieser Arbeit wurde der F-Test zur Überprüfung der Varianz-Homogenität und der t-Test für den Mittelwertvergleich verwendet. Da der Parameter k Exponent einer Exponentialfunktion ist, wurde der Parameter (ln k) für die statistische Auswertung verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Kontrollversuche mit dem Standardmedium

Bei einer Ganz-Zell-Ableitung von retinalen Stäbchen mit einer Pipette, die mit dem Standardmedium einschliesslich 1 mM GTP gefüllt ist, wird am Versuchsbeginn eine Dunkelspannung von etwa -10 mV gemessen, und die Repolarisationsgeschwindigkeit des Membranpotenzials nach einer Lichtantwort liegt bei 2 bis 3 mV/s (Abb. 5A). Im Verlauf eines Experiments wird eine spontane Hyperpolarisation auf Werte von etwa -30 mV beobachtet, die von einer Abnahme der Lichtantwortamplituden begleitet wird. Daneben tritt auch eine Verlangsamung der Repolarisationsphase auf. Die Repolarisationsgeschwindigkeit fällt von Anfangswerten von 2 bis 3 mV/s auf etwa 0.6 mV/s ab. Für diese Kontrollversuche sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameter (ln k) und (V_∞ - V_0) aus Gleichung (1) und der Geschwindigkeit der Repolarisationsphase (S_r) nach mehr als 10 Minuten Versuchsdauer aus Tabelle 1 zu ersehen. Die Veränderungen der Dunkelspannung und der Lichtantworten werden bei diesen Versuchen hauptsächlich durch die Diffusion von Nukleotiden aus dem Zytoplasma in die Pipette verursacht und haben daher in Übereinstimmung mit den Diffusionsgesetzen einen exponentiellen Zeitverlauf. Durch Substitutionsexperimente konnte bereits früher gezeigt werden, dass die Hyperpolarisation der Dunkelspannung dem Verlust von cGMP zugeschrieben werden kann, während die Verlangsamung der Repolarisationsphase durch die Diffusion von ATP verursacht wird (Schmidt et al. 1989, 1994).

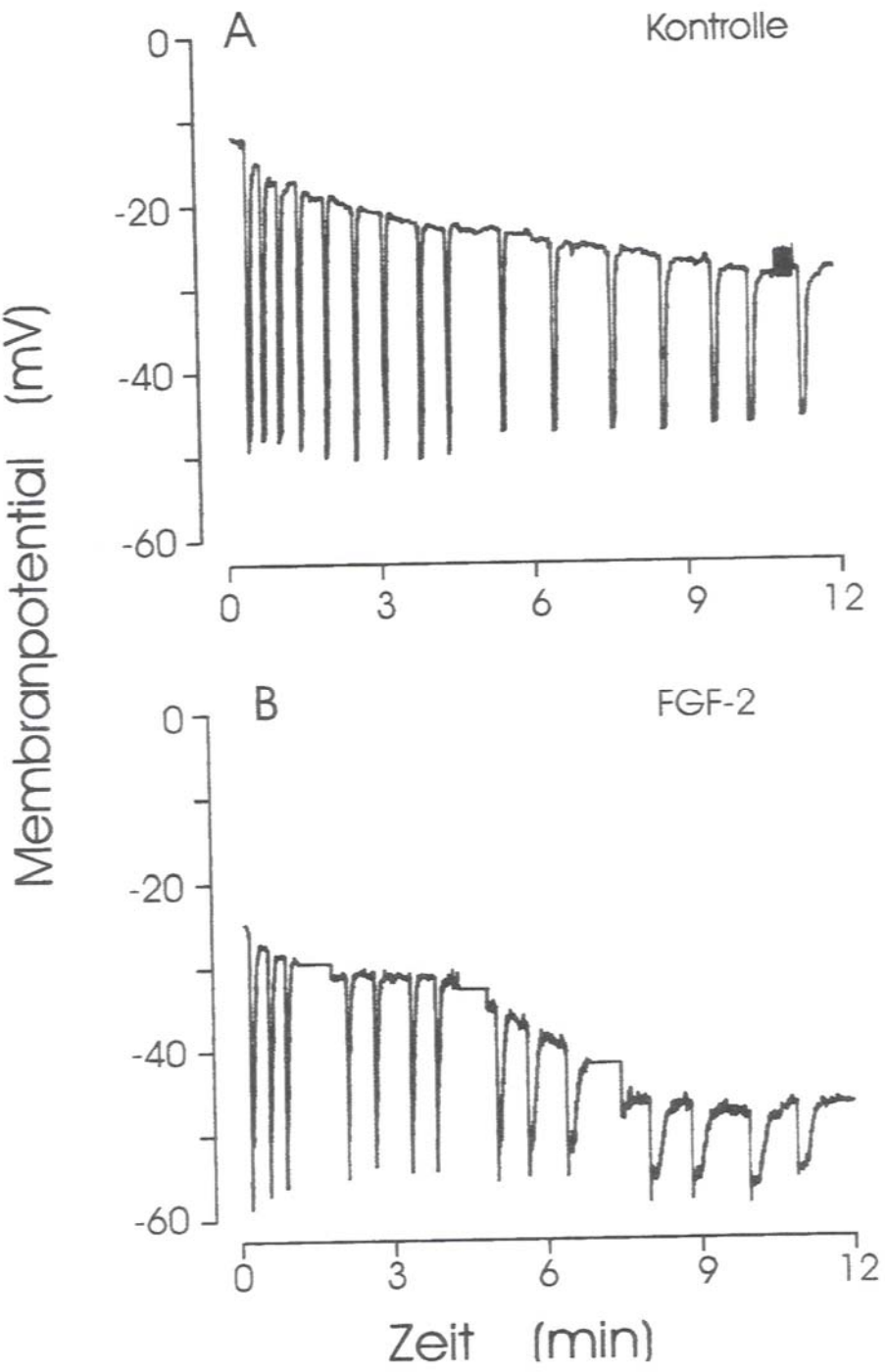

Abbildung 5: Zeitabhängiger Verlauf der Dunkelspannung und der Lichtantworten im Ganz-Zell-Ableitungsmodus. Die steilen Abwärtsbewegungen sind Antworten auf einen sättigenden Lichtreiz. A) Versuch unter Kontrollbedingungen mit dem Standardmedium. B) Versuch mit zusätzlich 10 ng/ml FGF-2 in der Pipettenfüllung

3.2 Versuche mit Fibroblastenwachstumsfaktoren

Wenn ein Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF-1 oder FGF-2) in der Ableitpipette vorhanden war, so wurde die spontane Hyperpolarisation beschleunigt und die Repolarisationsgeschwindigkeit der Lichtantworten nahm im Verlauf eines Experiments stärker ab als unter Kontrollbedingungen. Das Membranpotenzial lag bei Einbruch der Pipette bei etwa -25 mV und erreichte nach einigen Minuten Werte von etwa -50 mV. Die Geschwindigkeit der Repolarisationsphase sank von den anfänglich registrierten 2 bis 3 mV pro Sekunde auf Werte von 0.2 bis 0.3 mV pro Sekunde ab. Eine Registrierung von einem Experiment mit FGF-2 ist in Abbildung 5B dargestellt. Der acidische Fibroblastenwachstumsfaktor FGF-1 verursachte ähnliche, wenn auch etwas weniger ausgeprägte Veränderungen im Verlauf der Dunkelspannung und in der Konfiguration der Lichtantworten wie der basische Faktor FGF-2. Die registrierten Veränderungen waren bei beiden Peptiden signifikant. Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameter (ln k) und (V_∞ - V_0) aus Gleichung (1) und der Geschwindigkeit der Repolarisationsphase (S_r) nach mehr als 10 Minuten Versuchsdauer sind aus Tabelle 1 zu ersehen. Die Resultate zeigen, dass die Konzentration und die Umsatzrate des cGMP in der Photorezeptorzelle durch die Applikation von Fibroblastenwachstumsfaktoren vermindert werden. Die durch die Applikation von Fibroblastenwachstumsfaktoren verursachten Effekte waren sehr ähnlich wie solche, die bei der im übernächsten Abschnitt beschriebenen Applikation von Stickstoffmonoxidsynthase-Inhibitoren auftraten (siehe Tabelle 1 und Schmidt et al. 1992, Nöll et al. 1994).

3.3 Versuche mit Stickoxiddonatoren

Nach der Zugabe von Stickoxiddonatoren wie Natriumnitroprussid oder SIN-1 zum Pipettenmedium konnten zwei signifikante Veränderungen im Verhalten der Membranspannung beobachtet werden. Die spontane Hyperpolarisation der Dunkelspannung wurde verhindert und stattdessen wurde eine anfängliche Depolarisation, gefolgt von einer stabilen Dunkelspannung registriert. Die Dunkelspannung bei einem solchen Versuch lag anfangs bei etwa -10 mV und erreichte im Versuchsverlauf nach einigen Minuten Werte von -5 mV bis 0 mV. Außerdem wurde die Verlangsamung der Repolarisationsphase durch eine Beschleunigung ersetzt und die Geschwindigkeit der Repolarisation (S_r) nach einem Lichtreiz erreichte nach 10 Minuten Versuchsdauer bis zu 6 mV/s. Ein solches Experiment ist in Abbildung 6A dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameter (ln k) und (V_∞ - V_0) aus Gleichung (1) und der Geschwindigkeit der Repolarisationsphase (S_r) nach mehr als 10 Minuten Versuchsdauer sind aus Tabelle 1 zu ersehen. Ebenso sind die Daten aus einer Versuchsreihe mit dem Stickoxiddonator SIN-1 gezeigt.

Wenn man davon ausgeht, dass die Veränderungen des Membranpotenzials in den Photorezeptoren den augenblicklichen cGMP-Spiegel in der Zelle reflektieren, kann man annehmen, dass die beiden durch Stickoxiddonatoren verursachten Veränderungen verschiedene Aspekte des cGMP-Stoffwechsels repräsentieren. Die Veränderungen der Dunkelspannung können als Indikator für die Veränderung der intrazellulären cGMP-Konzentration dienen, während die Repolarisationsgeschwindigkeit ein Maß für den cGMP-Umsatz in der Zelle bildet. Unter diesen Annahmen weisen die beobachteten Effekte daraufhin, dass Stickoxid die cGMP-Konzentration erhöht und den cGMP-Umsatz in der Zelle steigert (Schmidt et al. 1992).

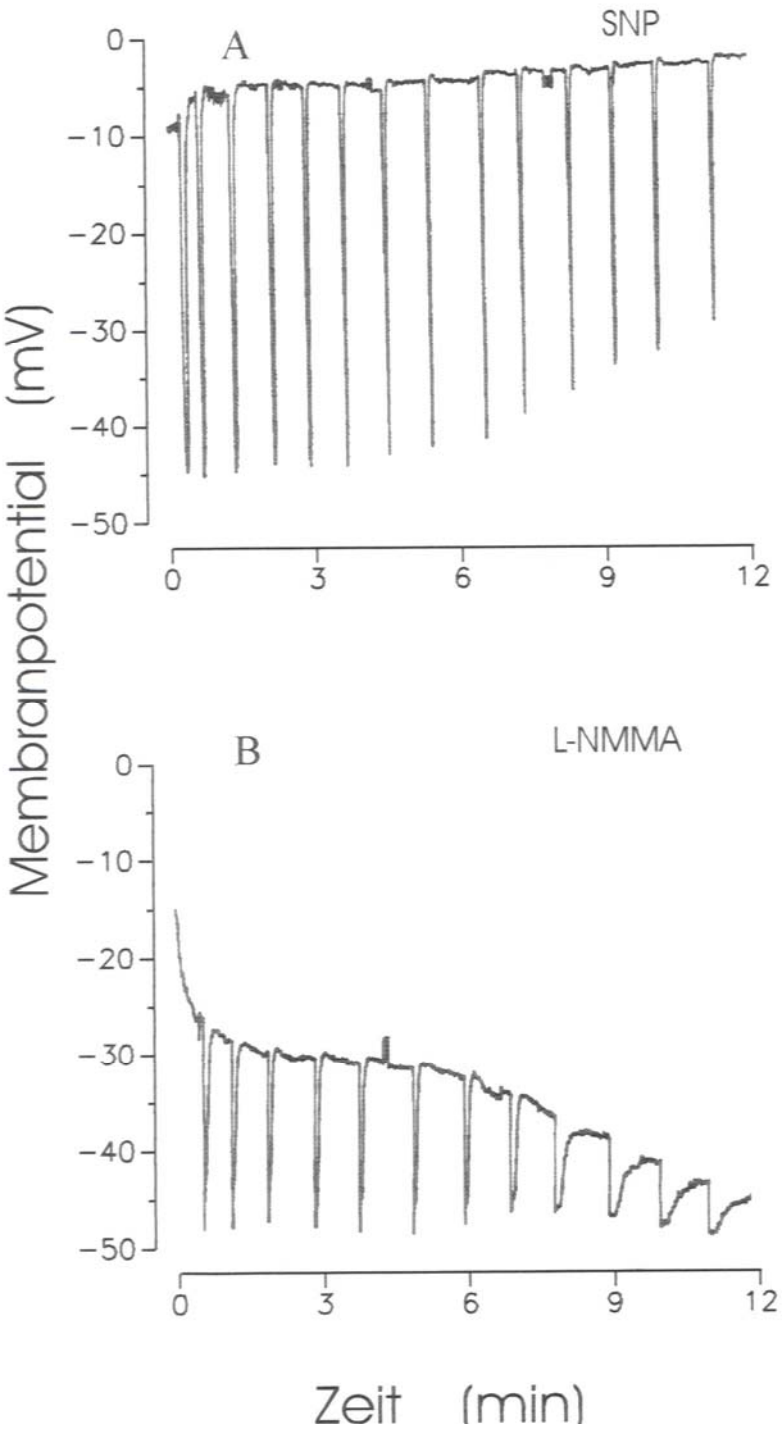

Abbildung 6: Zeitabhängiger Verlauf der Dunkelspannung und der Lichtantworten im Ganz-Zell-Ableitungsmodus. Die steilen Abwärtsbewegungen sind Antworten auf einen sättigenden Lichtreiz. A) Versuch mit 0.3 mM Natriumnitroprussid in der Pipettenfüllung. B) Versuch mit 0.1 mM L-NMMA in der Pipettenfüllung

3.4 Versuche mit Stickoxidsynthaseinhibitoren

Die Effekte von intrazellulär applizierten Stickstoffmonoxidsynthase-Inhibitoren auf die Dunkelspannung und die Lichtantworten retinaler Stäbchen waren entgegengesetzt zu denen, die bei der Applikation von Stickoxiddonatoren beobachtet wurden. Wenn Stickstoffmonoxidsynthase-Inhibitoren in der Ableitpipette vorhanden waren, so wurde die spontane Hyperpolarisation des Dunkelstroms beschleunigt und die Geschwindigkeit der Repolarisation der Lichtantworten nahm im Verlauf eines Experiments stärker ab als unter Kontrollbedingungen. Die Geschwindigkeit der Repolarisationsphase sank von den anfänglich registrierten 2 bis 3 mV pro Sekunde auf Werte von unter 0.2 mV pro Sekunde ab. L-NMMA (N-ω-Monomethyl-L-Arginin) und L-NNA (N-ω-Nitro-L-Arginin) sind Arginin-Analoge, die als Inhibitoren der Stickoxidsynthase verwendet werden. Die Registrierung eines Experiments mit dem competitiven Stickstoffmonoxidsynthase-Inhibitor L-NMMA zeigt die Abbildung 6B. Die Veränderungen im Verlauf des Dunkelstroms und in der Konfiguration der Lichtantworten waren bei einem Versuch mit diesem Inhibitor signifikant. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameter (ln k) und (V_∞ - V_0) aus Gleichung (1) und der Geschwindigkeit der Repolarisationsphase (S_r) nach mehr als 10 Minuten Versuchsdauer von Experimenten mit dem inhibitorischen Arginin-Analog L-NMMA werden in Tabelle 1 gezeigt. Aus Tabelle 1 ist auch zu entnehmen, dass der zweite Inhibitor L-NNA ähnliche, wenn auch weniger ausgeprägte Effekte auf den Verlauf der Dunkelspannung der Repolarisation der Lichtantworten hatte. Bei den Versuchen mit L-NNA unterschied sich jedoch nur die Geschwindigkeit der Repolarisationsphase signifikant von den Kontrollversuchen. Die Unterschiede in der Geschwindigkeitskostante der spontanen Hyperpolarisation (ln k) waren nicht signifikant.

3.5 Versuche mit NADPH

Mit den in den folgenden Abschnitten beschriebenen Versuchsreihen sollen einige Hinweise auf den Wirkungsmechanismus der Fibroblastenwachstumsfaktoren gefunden werden, indem FGF-2 zusammen mit anderen Substanzen, deren Wirkung auf das Membranpotenzial bereits bekannt ist, appliziert wird.

Ist das Coenzym NADPH in einer Konzentration von 0.1 mM in der Ableitpipette vorhanden, so wird die spontane Hyperpolarisation unterbunden, und statt dessen wird eine deutliche Depolarisation registriert. Die Repolarisationsphase der Lichtantworten wird bei einem solchen Experiment im Versuchsverlauf beschleunigt. NADPH ist ein Cofaktor der Stickstoffmonoxidsynthase in Photorezeptoren und die Effekte werden daher einer Aktivierung dieses Enzyms zugeschrieben. In den Experimenten mit NADPH folgten die Veränderungen der Dunkelspannung und der Repolarisationsgeschwindigkeit nicht einem einfachen exponentiellen Zeitverlauf, sondern zeigten ein etwas komplexeres Verhalten wie es das Beispiel in der Abbildung 7A zeigt. Die Photorezeptorzellen hielten ihre Dunkelspannung in der ersten ca. ein bis drei Minuten dauernden Versuchsphase relativ konstant. Darauf folgte eine schnelle Depolarisation von -15 mV auf etwa -5 mV. Dieser Dunkelstrom blieb dann für über 10 Minuten stabil und gleichzeitig konnten in dieser Zeit Lichtantworten ausgelöst werden. Der Parameter (ln k) aus Gleichung (1) in Tabelle 1 wurde bei diesen Versuchen für eine Exponentialkurve mit (t_0) am Beginn der schnellen Depolarisation berechnet. Wenn NADPH in der Ableitpipette vorhanden war, betrug die Repolarisationsgeschwindigkeit für die ersten Lichtantworten etwa 2.5 mV/s. Im Verlauf eines Experiments erreichte die Repolarisationsgeschwindigkeit nach 10 Minuten Werte von mehr als 8 mV/s.

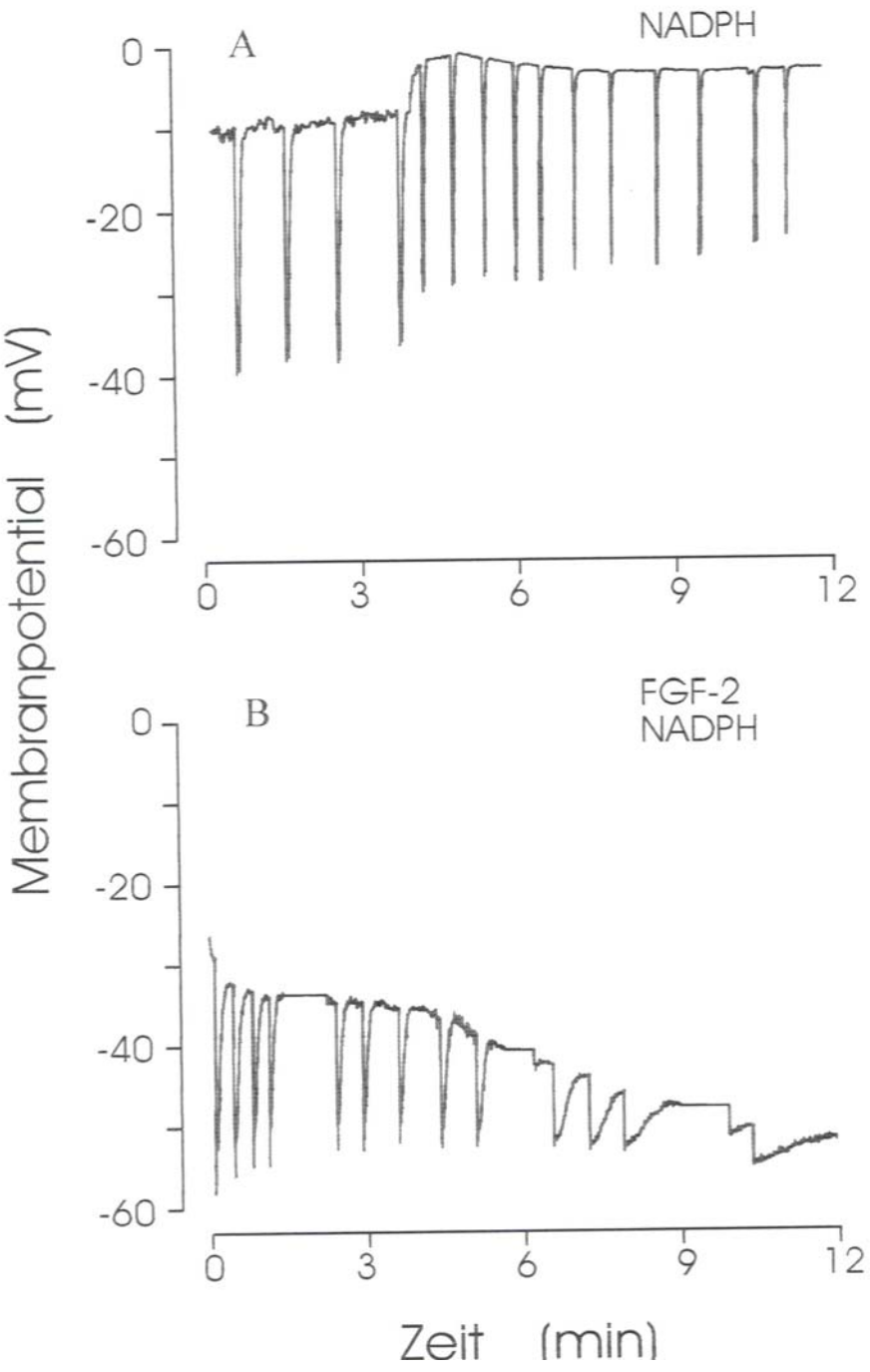

Abbildung 7: Zeitabhängiger Verlauf der Dunkelspannung und der Lichtantworten im Ganz-Zell-Ableitungsmodus. Die steilen Abwärtsbewegungen sind Antworten auf einen sättigenden Lichtreiz. A) Versuch mit 0.1 mM NADPH in der Pipettenfüllung. B) Versuch mit 0.1 mM NADPH plus 10 ng/ml FGF-2 in der Pipettenfüllung

Die im vorhergehenden Absatz beschriebenen Effekte des Coenzyms NADPH konnten durch die gleichzeitige Applikation von FGF-2 aufgehoben werden (Abb. 7A und 7B). Bei einem solchen Versuch lag das Membranpotenzial bei Einbruch der Pipette bei etwa -25 mV und erreichte nach einigen Minuten Werte von etwa -50 mV. Die Geschwindigkeit der Repolarisationsphase sank auch bei diesen Versuchen von den am Versuchsanfang gemessenen 2 bis 3 mV pro Sekunde auf Werte von 0.2 bis 0.3 mV pro Sekunde ab. Der Verlauf eines Versuchs mit FGF-2 plus NADPH ist praktisch genauso wie mit FGF-2 ohne NADPH, d.h. der Einfluss des Coenzyms NADPH wird somit durch FGF-2 vollständig aufgehoben. Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameter (ln k) und (V_∞ - V_0) aus Gleichung (1) und der Geschwindigkeit der Repolarisationsphase (S_r) nach mehr als 10 Minuten Versuchsdauer mit FGF-2 plus NADPH sind aus Tabelle 1 zu ersehen. Die Messwerte unterschieden sich signifikant von den Kontrollversuchen. Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, unterschieden sich die Werte für die Parameter (ln k), (V_∞ - V_0) aus Gleichung (1) und der Geschwindigkeit der Repolarisationsphase (S_r) bei den Versuchen mit NADPH und FGF-2 nicht signifikant von den Daten, die mit FGF-1 oder FGF-2 allein erreicht wurden.

Ganz ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn NADPH zusammen mit dem Stickoxidsynthaseinhibitor L-NMMA appliziert wurde. Auch in diesen Versuchen wurde die Wirkung des Coenzyms NADPH vollständig aufgehoben, und wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, unterschieden sich die Werte für die Parameter (ln k), (V_∞ - V_0) aus Gleichung (1) und der Geschwindigkeit der Repolarisationsphase (S_r) bei den Versuchen mit NADPH und L-NMMA nicht signifikant von den Daten, die mit L-NMMA allein erreicht wurden.

3.6 Versuche mit L-Arginin

Wenn dem Pipettenmedium der biochemische Vorläufer des Stickstoffmonoxid, das L-Arginin hinzugefügt wurde, hatte das zwar auf den Verlauf der Dunkelspannung keinen signifikanten Einfluss, die Abnahme der Repolarisationsgeschwindigkeit wurde jedoch unterdrückt. Die Dunkelspannung lag bei diesen Experimenten zu Versuchsbeginn bei etwa -15 mV und erreichte nach 10 Minuten Werte von etwa -30 mV. Die Repolarisationsgeschwindigkeit lag bei Versuchsbeginn bei 2.3 mV/s und blieb auch nach 10 Minuten mit etwa 2.4 mV/s fast konstant. Ein solches Experiment mit L-Arginin wird in der Abbildung 8A gezeigt. Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameter (ln k) und (V_∞ - V_0) aus Gleichung (1) und der Geschwindigkeit der Repolarisationsphase (S_r) nach mehr als 10 Minuten Versuchsdauer sind aus Tabelle 1 zu ersehen.

Wurde der Wachstumsfaktor FGF-2 zusammen mit L-Arginin appliziert, so wurde die Wirkung des L-Arginins aufgehoben. Bei einem solchen Versuch lag das Membranpotenzial bei Einbruch der Pipette bei etwa -25 mV und erreichte nach einigen Minuten Werte von etwa -50 mV. Die Geschwindigkeit der Repolarisationsphase sank von den anfänglich registrierten 2 bis 3 mV pro Sekunde auf Werte von etwa 0.2 mV pro Sekunde ab. Ein Versuch mit FGF-2 plus L-Arginin verläuft ebenfalls wie mit FGF-2 ohne L-Arginin. Ein solches Experiment mit L-Arginin wird in der Abbildung 8B gezeigt. Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameter (ln k) und (V_∞ - V_0) aus Gleichung (1) und der Geschwindigkeit der Repolarisationsphase (S_r) nach mehr als 10 Minuten Versuchsdauer mit FGF-2 plus L-Arginin sind aus Tabelle 1 zu ersehen. Die Messwerte unterschieden sich signifikant von den Kontrollversuchen.

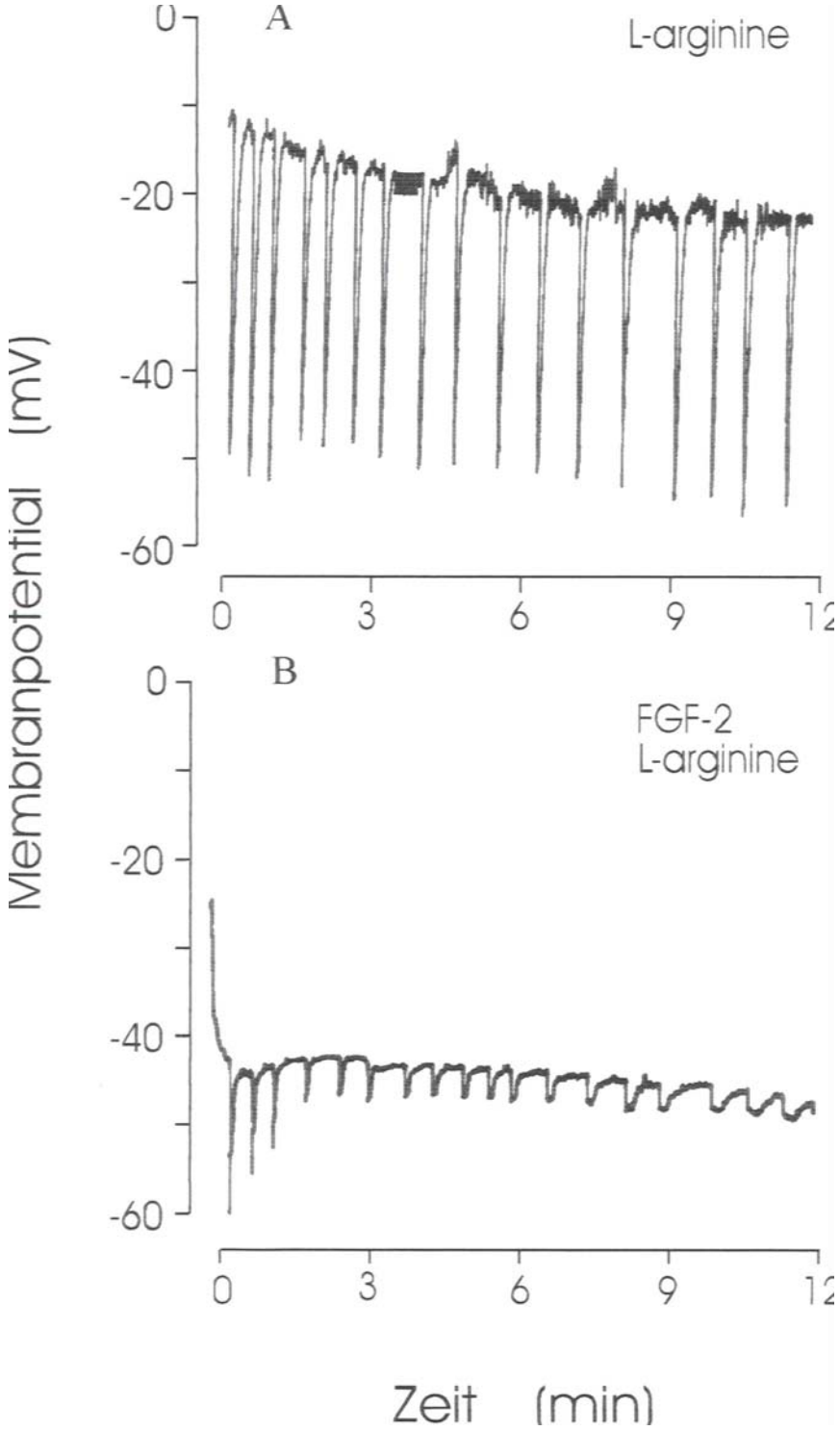

Abbildung 8: Zeitabhängiger Verlauf der Dunkelspannung und der Lichtantworten im Ganz-Zell-Ableitungsmodus. Die steilen Abwärtsbewegungen sind Antworten auf einen sättigenden Lichtreiz. A) Versuch mit 0.3 mM L-Arginin in der Pipettenfüllung.
B) Versuch mit 0.3 mM L-Arginin plus 10 ng/ml FGF-2

Die Resultate zeigen, dass die Konzentration und die Umsatzrate des cGMP in der Photorezeptorzelle durch die Applikation von Fibroblastenwachstumsfaktoren vermindert werden. Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, unterschieden sich die Werte für die Parameter (ln k), (V_∞ - V_0) aus Gleichung (1) und der Geschwindigkeit der Repolarisationsphase (S_r) bei den Versuchen mit L-Arginin und FGF-2 nicht signifikant von den Daten, die mit FGF-1 oder FGF-2 allein oder mit FGF-2 plus NADPH gemessen wurden. Zusammenfassend kann man sagen, das FGF-2 auch die Wirkungen des L-Arginins vollkommen aufhebt.

3.7 Versuche mit EGTA

In einer weiteren Reihe von Versuchen wurde der Einfluß des Kalzium-Chelatbildners Ethylenglycol-bis-(ß-Amino-Ethylether) N,N'-Acetat (EGTA) auf den Dunkelstrom und die Konfiguration der Lichtantworten untersucht. Mit 1 mM freiem EGTA und einer daraus resultierenden freien Kalziumkonzentration von unter 10^{-7} M in der Pipette zeigte sich ein etwas stabileres Membranpotenzial, die Unterschiede waren aber nicht signifikant. Auf die Repolarisationsgeschwindigkeit der Lichtantworten im Versuchsverlauf hatte das EGTA keinen Einfluss. Ein Beispiel für einen solchen Versuch zeigt Abbildung 9A. Die Geschwindigkeit der Repolarisationsphase sank bei diesen Versuchen von den am Versuchsanfang gemessenen 2 bis 3 mV pro Sekunde auf Werte von etwa bis 0.6 mV pro Sekunde ab, und unterscheidet sich nicht signifikant von den Kontrollversuchen. Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameter (ln k) und (V_∞ - V_0) aus Gleichung (1) und der Geschwindigkeit der Repolarisationsphase (S_r) nach mehr als 10 Minuten Versuchsdauer mit FGF-2 plus EGTA sind aus Tabelle 1 zu ersehen. Die Messwerte unterschieden sich signifikant von den Kontrollversuchen. Der auffallendste Unterschied zu den Kontrollversuchen bestand bei den Versuchen mit EGTA in

einem sehr ausgeprägten Überschwingen des Membranpotenzials am Ende der Repolarisationsphase der Lichtantworten.

Der Verlauf eines Versuchs mit FGF-2 plus EGTA unterscheidet sich nicht von einem Versuch mit EGTA alleine, d.h. der Einfluss des FGF-2 wird durch EGTA vollständig unterdrückt. Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameter (ln k) und (V_∞ - V_0) aus Gleichung (1) und der Geschwindigkeit der Repolarisationsphase (S_r) nach mehr als 10 Minuten Versuchsdauer mit FGF-2 plus EGTA sind aus Tabelle 1 zu ersehen. Die Messwerte unterscheiden sich signifikant von den Kontrollversuchen. Diese Resultate zeigen, dass der intrazelluläre Kalziumspiegel den Zeitverlauf der Hyperpolarisation beeinflußt, und stimmen damit überein, daß ein niedriger Kalziumspiegel, wie es nach den Untersuchungen von Koch & Stryer (1988) zu erwarten ist, die cGMP-Synthese in den Stäbchen stimuliert. Bei diesen Versuchen kann ein über Calmodulin vermittelter Einfluß der intrazellulären Kalziumkonzentration auf die cGMP-Bindung an die lichtabhängigen Kanäle von Bedeutung sein.

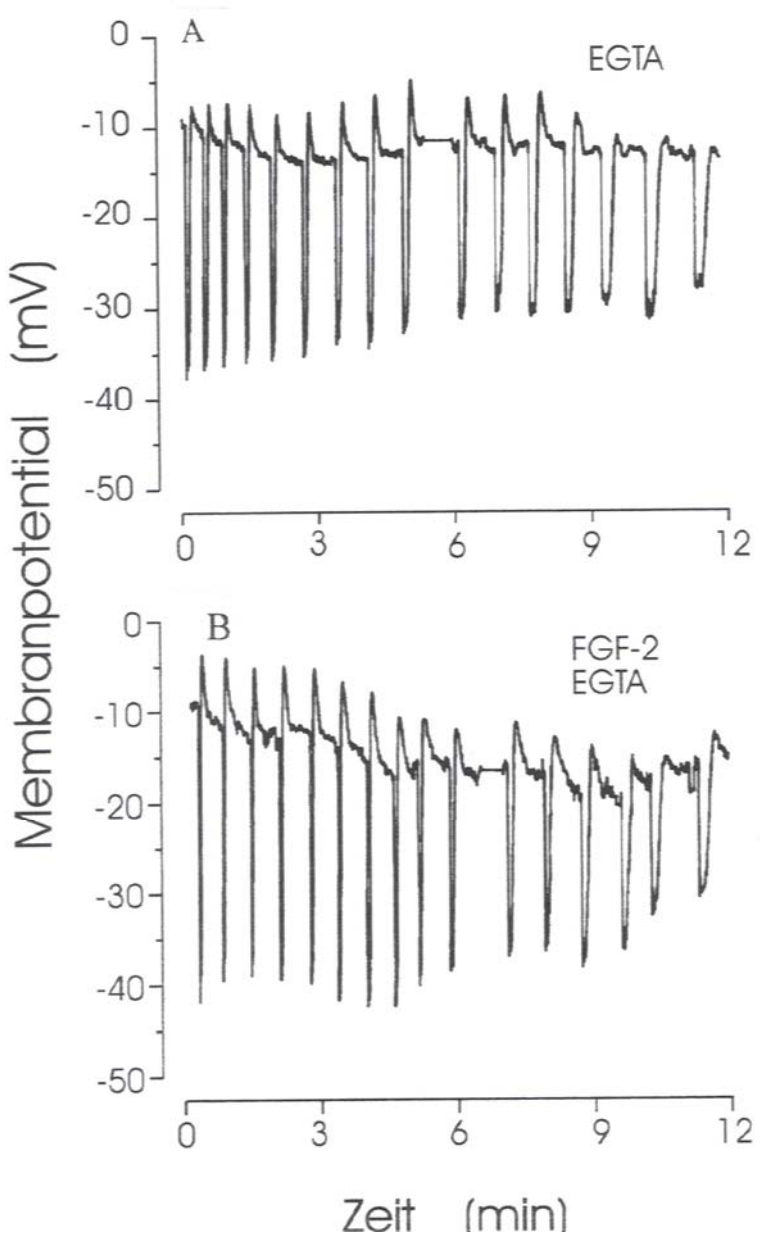

Abbildung 9: Zeitabhängiger Verlauf der Dunkelspannung und der Lichtantworten im Ganz-Zell-Ableitungsmodus. Die steilen Abwärtsbewegungen sind Antworten auf einen sättigenden Lichtreiz. A) Versuch mit 1.0 mM EGTA in der Pipettenfüllung. B) Versuch mit 1.0 mM EGTA plus 10 ng/ml FGF-2 in der Pipettenfüllung

Medium	**(n)**	**ln k**	**(V_∞ - V_0) [mV]**	**S_r [mV/s)**
Control	(8)	-1.36 ± 0.34	-12.9 ± 5.2	0.60 ± 0.24
FGF-2 (10 ng/ml)	(7)	+0.58 ± 0.42	-20.2 ± 6.9	0.26 ± 0.21
FGF-1 (10 ng/ml)	(3)	+0.74 ± 0.38	-17.3 ± 3.8	0.36 ± 0.17
Nitroprussid (0.3 mM)	(5)	-0.52 ± 0.40	+ 7.2 ± 6.2	7.20 ± 2.50
SIN-1 (<0.1 mM)	(7)	2.10 ± 0.92	-12.3 ± 5.4	3.95 ± 3.53
L-NMMA (0.1 mM)	(4)	-0.75 ± 0.36	-37.3 ± 9.3	0.14 ± 0.05
L-NNA (0.1 mM)	(3)	-1.04 ± 0.38	-25.3 ± 4.9	0.16 ± 0.07
NADPH (0.1 mM)	(6)	+1.73 ± 0.53	+13,9 ± 4.9	8.30 ± 3.10
NADPH (0.1 mM) FGF-2 (10 ng/ml)	(5)	+0.82 ± 0.38	-18.5 ± 7.3	0.21 ± 0.09
NADPH (0.1 mM) L-NMMA (0.1 mM)	(3)	+0.66 ± 0.34	-22.4 ± 8.4	0.19 ± 0.08
L-Arginin (0.3 mM)	(5)	-1.24 ± 0.40	-16.1 ± 7.3	2.41 ± 0.41
L-Arginin (0.3 mM) FGF-2 (10 ng/ml)	(2)	+0.45 ± 0.21	-27.3 ± 8.2	0.18 ± 0.10
EGTA (1 mM)	(5)	-1.97 ± 0.45	-8.4 ± 5.1	0.66 ± 0.32
EGTA (1 mM) FGF-2 (10 ng/ml)	[5]	-1.77 ± 0.59	-10.1 ± 3.7	0.56 ± 0.24

Tabelle 1: Die Daten in dieser Tabelle sind Mittelwerte ± Standardabweichung, die aus Versuchen mit unterschiedlichen Füllungen der Ableitpipette berechnet wurden. Die Zusammensetzung der Pipettenmedien steht in Spalte 1 und die Anzahl der jeweiligen Versuche (n) in Spalte 2. Der Parameter ln k aus Gleichung 1 in Spalte 3 beschreibt den Zeitverlauf der spontanen Hyper- oder Depolarisation. Niedrigere Werte in dieser Spalte bedeuten einen stabileren funktionellen Status der Photorezeptorzelle. Der Parameter (V_∞ - V_0) in Spalte 4 beschreibt die Amplitude der Veränderung des Membranpotenzials im Versuchsverlauf. Der Parameter S_r in Spalte 5 gibt die Geschwindigkeit der Repolarisationsphase nach mehr als 10 Minuten Versuchsdauer wieder und kann mit dem Ausgangswert von 2 - 3 mV/s zu Versuchsbeginn verglichen werden.

4. Diskussion

4.1 Die Botenstoffsysteme in Lichtsinneszellen

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss von intrazellulär applizierten Fibroblastenwachstumsfaktoren auf die intrazellulären Signalverarbeitungsprozesse in Lichtsinneszellen von Vertebraten untersucht. Die dabei in die Untersuchung einbezogenen Botenstoffsysteme gehören zu den am frühesten und am besten erforschten Transduktionsmechanismen überhaupt. Solche Botenstoffsysteme können aber in einer Zelle nicht isoliert betrachtet werden, sondern müssen im Zusammenhang mit anderen intrazellulären Messenger, Enzymen und Ionen gesehen werden. Auf der Ebene dieser biochemischen Reaktionen wird auch die enge Verwandtschaft von zellulären Signalketten und Informationsverarbeitungssystemen in ganz unterschiedlichen Organen und Zellen deutlich, und es zeigt sich, wie die einmal entwickelten Informationsverarbeitungssysteme in den Dienst der verschiedensten Aufgaben gestellt werden können. Photorezeptoren bieten aufgrund ihrer gut definierten physiologischen Funktion, ihrer ausgeprägten Differenzierung und ihrer relativ leichten Zugänglichkeit ein besonders geeignetes Objekt für die Untersuchung einzelner Botenstoffsysteme und ihrer Zusammenhänge und gegenseitigen Beeinflussung (Harcourt 1974, Rohen 1977, Schiebler & Pieper 1984).

Photorezeptoren zeigen, wie vernetzte biochemische Reaktionen in den Dienst der Informationsverarbeitung gestellt werden, so dass einzelne Zellen komplexe Aufgaben bearbeiten können und nicht nur als einfache elektrische Schaltelemente funktionieren. Die Komplexität dieser Systeme schränkt aber gleichzeitig die vollständige und exakte Beschreibung der Gesamtvorgänge zumindest zum jetzigen Zeitpunkt ein. Wir begnügen uns daher mit dem Versuch,

unsere Ergebnisse im Einklang mit bereits von anderen Autoren entwickelten Modellen aus der Literatur widerspruchsfrei zu interpretieren, ohne mathematisch exakte Beschreibungen liefern zu können.

4.2 Die Kontrolle des cGMP in Photorezeptoren

Das zyklische Guanosin-Monophosphat wird in den Photorezeptorzellen vermutlich unter der Mitwirkung zweier verschiedener Enzyme synthetisiert, einer partikulären und einer löslichen Guanylatzyklase. Die Spaltung des zyklischen Guanosin-Monophosphats erfolgt durch eine Phosphodiesterase, die durch eine lichtabhängige Enzymkaskade kontrolliert wird. Die Aktivitäten dieser drei Enzyme bestimmen die zytoplasmatische Konzentration des zyklischen Guanosin-Monophosphats in der Photorezeptorzelle. Die Konzentration des zyklischen Guanosin-Monophosphats im Zytosol reguliert ihrerseits die Öffnung der lichtabhängigen Kanalproteine und steuert damit direkt die Membranströme und Membranspannungen der Lichtsinneszellen. Diese direkte Verknüpfung von Zellmetabolismus, elektrischen Vorgängen und Signalverarbeitung in einer definierten physiologischen Funktion machen die Photorezeptoren zu idealen Objekten für die Aufklärung der biologischen Informationsverarbeitungsprozesse.

In der Photorezeptorzelle wird unter Dunkelbedingungen durch die dann geöffneten Ionenkanäle ein durch einen Einstrom von Natrium- und Kalziumionen getragener Dunkelstrom aufrechterhalten, der eine Depolarisation der Membran zur Folge hat. Diese Membrandepolarisation kann bei Ganz-Zell-Patch-Clamp-Ableitungen durch die Diffusion oder das Einschleusen von cGMP beeinflusst werden (Schmidt et al. 1989, 1994). Es zeigte sich, dass die freie cGMP-Konzentration im Dunkeln zwischen 0.5 - 4 μM liegt. Dabei sind unter physiologischen Bedingungen nur etwa 1-2 % der lichtabhängigen Kationenkanäle

geöffnet (Kaupp & Koch 1992). Die Umsatzrate des cGMP liegt unter diesen Bedingungen bei 2 - 4 μM/s, wobei sich die Synthese durch die Guanylatzyklase und die Hydrolysierung durch die Phosphodiesterase im Fliessgleichgewicht befinden. Durch Belichtung kann die Hydrolysierung des cGMP um den Faktor 5 - 20 gesteigert werden, so dass die cGMP-Konzentration in der Zelle sinkt, die Ionenkanäle geschlossen werden und auf diese Weise das Membranpotenzial der Photorezeptoren in Richtung des Kaliumgleichgewichtspotenzials hyperpolarisiert wird.

4.3 Zum Einfluss der Stickoxidsynthase

In der vorliegenden Studie werden zwei unterschiedliche Modifikationen im Verhalten der Membranspannung als Indikatoren für den funktionellen Status der Photorezeptorzelle herangezogen. Erstens die langsame spontane Depolarisation der Membranspannung unter Dunkelbedingungen und zweitens die Änderung in der Geschwindigkeit der Repolarisationsphase der Lichtantworten. Wenn es richtig ist, dass die Membranspannung zu jedem gegebenen Zeitpunkt die intrazelluläre Konzentration von cGMP widerspiegelt, so kann man annehmen, dass die beiden genannten Modifikationen im elektrischen Verhalten der Photorezeptoren verschiedene Aspekte des cGMP Stoffwechsels reflektieren. Die jeweilige Dunkelspannung kann die cGMP-Konzentration in der Photorezeptorzelle anzeigen, und die Geschwindigkeit der Repolarisation zeigt die Umsatzrate des cGMP in der Zelle an. Diese Größen können durchaus unabhängig voneinander reguliert werden, denn eine bestimmte Konzentration von cGMP kann sowohl bei einer hohen, als auch bei einer niedrigen Umsatzrate in der Zelle aufrechterhalten werden.

Stickoxiddonatoren wie Natriumnitroprussid oder Sin-1 verursachen im Vergleich zu den Kontrollversuchen eine Depolarisation des Membranstroms und

eine Beschleunigung der Repolarisationsphase der Lichtantworten. Auf der anderen Seite wird die Hyperpolarisation durch Stickoxidsynthaseinhibitoren wie L-NMMA oder L-NNA beschleunigt und verstärkt, und die Repolarisationsphase der Lichtantworten wird verlangsamt. Diese Ergebnisse können am besten durch eine Beteiligung des Stickoxidmetabolismus am Transduktionsprozess der Photorezeptoren erklärt werden (Schmidt et al. 1992, Nöll et al. 1994). Man muss annehmen, dass durch Stickoxid die Konzentration an freiem cGMP und die metabolische cGMP-Umsatzrate in der Zelle gesteigert wird. Allein aufgrund der elektrophysiologischen Befunde ist es allerdings nicht möglich zu entscheiden, ob die Effekte der Stickoxiddonatoren durch eine Interaktion mit der Phosphodiesterase oder durch eine Wirkung auf die Guanylatzyklase vermittelt werden. Die Tatsache, dass die Anstiegsphase der Lichtantworten durch die Stickoxiddonatoren nicht beeinflusst wird, spricht allerdings eher dafür, dass das Stickoxid nicht mit der lichtabhängigen Phosphodiesterase interagiert. Da das Stickoxid im Zentralnervensystem und in anderen Geweben die cGMP-Konzentration durch die Kontrolle einer löslichen Guanylatzyklase steuert (Ames et al. 1986, Bownds and Thomson 1988), kann angenommen werden, dass dieser Mechanismus auch in den Photorezeptoren realisiert ist. Die Existenz einer löslichen, durch Stickoxid regulierten und vermutlich im Innenglied der Photorezeptoren lokalisierten Guanylatzyklase konnte auch von anderen Autoren nachgewiesen werden (Horio & Murad 1991, Margulis et al. 1992).

Die Wirkungen der durch Donatoren oder Inhibitoren veränderten Stickoxidkonzentration auf die Funktion der Photorezeptoren kann mit den Effekten einer Hintergrundbeleuchtung von geringer Lichtintensität verglichen werden. Wenn die Photorezeptoren einer solchen Hintergrundbeleuchtung ausgesetzt werden, wird die Konzentration an freiem cGMP reduziert, während die metabolische Umsatzrate erhöht wird (Ames & Barad 1988, Dawis et al. 1988). Das hat dann ebenfalls zur

Folge, dass die Repolarisationsphase der Lichtantworten beschleunigt abläuft. Es ist daher naheliegend, der Stickoxidsynthase eine Rolle im Adaptationsprozess der retinalen Photorezeptorzelle zuzuschreiben.

Interessant ist es noch, darauf hinzuweisen, dass die Inhibition der Guanylatzyklase eine ähnliche Verlangsamung in der Repolarisationsphase der Lichtantworten verursacht, wie sie vorher nach einer Applikation des Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthin) oder nach einer intrazellulären Applikation hoher cGMP-Konzentrationen beobachtet wurde (Cobbs & Pugh 1985, Cervetto & McNaughton 1986, Schmidt et al. 1992, 1994). Diese Resultate können erklärt werden, wenn angenommen wird, dass die Aktivitäten der cGMP metabolisierenden Enzyme Guanylatzyklase und Phosphodiesterase und die aktuelle cGMP-Konzentration in der Zelle exakt aufeinander abgestimmt werden. Veränderungen von einem dieser Parameter würden dann unmittelbar zu entsprechenden Anpassungsreaktionen der anderen Parameter führen, und die Inhibition eines Enzyms oder ein ansteigender intrazellulärer cGMP-Spiegel würde den gesamten cGMP-Umsatz verlangsamen.

4.4 Die Wirkung von NADPH und L-Arginin

Der Verlauf der Experimente mit NADPH in der Pipette unterschied sich deutlich von den Kontrollexperimenten. Die unter Kontrollbedingungen registrierte Hyperpolarisation war nicht mehr zu beobachten, und stattdessen wurde eine Depolarisation des Membranpotenzials gemessen. Die Veränderungen des Membranpotenzials folgten bei diesen Versuchen nicht einem einfachen exponentiellen Verlauf, sondern zeigten ein komplexeres Verhalten, bei dem eine zunächst stabile Membranspannung von einer schnellen Depolarisation gefolgt wird. Ein ähnlicher Zeitverlauf war bei der Beschleunigung der Repolarisation der

Lichtantworten zu beobachten. Das könnte anzeigen, dass in der Zelle zunächst über einen gewissen Zeitraum eine bestimmte Konzentration von NADPH erreicht werden muss, bevor die Wirkung, z.B. die Aktivierung eines Enzyms, eintritt. Die durch die Applikation von NADPH bewirkten Effekte ähnelten, abgesehen von der initialen zeitlichen Verzögerung, den Effekten, die durch Stickoxidapplikation hervorgerufen wurden. Die Ergebnisse könnten damit erklärt werden, dass auch NADPH als Coenzym die metabolische Umsatzrate von cGMP steigert. Das könnte indirekt über eine Aktivierung der Stickoxidsynthase *in vivo* erfolgen, wie es in vitro von Venturini et al. (1991) nachgewiesen wurde. Darauf deuten auch die Ergebnisse hin, die bei gleichzeitiger Applikation von NADPH und dem Stickoxidsynthaseinhibitor L-NMMA aufgezeichnet wurden. In diesen Fällen war die Wirkung des NADPH aufgehoben und es muss angenommen werden, dass eine Aktivierung der Stickoxidsynthase nicht mehr erfolgen kann, wenn das Enzym durch einen Inhibitor blockiert ist.

Durch die Applikation von L-Arginin, dem Substrat der Stickoxidsynthase und biochemischen Ausgangsprodukt des Stickoxids, konnte der Verlauf der Dunkelspannung nicht signifikant beeinflusst werden, die Abnahme der Repolarisationsgeschwindigkeit während eines Versuchs wurde aber unterdrückt. Es kann daher angenommen werden, dass der Verlust von L-Arginin durch Abdiffusion in die Ableitpipette zumindest eine wesentliche Ursache für die Abnahme der Repolarisationsgeschwindigkeit von Lichtantworten im Verlauf einer Ganz-Zell-Ableitung ist.

4.5 Zur Wirkung veränderter Kalziumkonzentrationen

Bereits in früheren Untersuchungen wurden die Effekte untersucht, die veränderte Kalziumkonzentrationen auf den Verlauf der Dunkelspannung haben.
Diese Ergebnisse sollen hier kurz rekapituliert werden, um im folgenden Abschnitt die Blockierung der FGF-abhängigen Wirkungen durch EGTA zu diskutieren. Eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration konnte vor allem durch erhöhte Natriumkonzentrationen in der Pipette und eine dadurch verursachte Blockierung des Natrium-Kalzium-Austauschers bewirkt werden. Ein auf diese Weise erhöhter Kalziumspiegel hatte eine stark beschleunigte Hyperpolarisation des Membranpotenzials zur Folge, die durch eine Inhibition der Guanylatzyklase erklärt werden kann (Schmidt et al. 1990). Eine Verminderung der intrazellulären Kalziumkonzentration konnte durch die Applikation des Kalziumchelatbildners EGTA hervorgerufen werden. Bei einer niedrigen freien Kalziumkonzentration verlief die Hyperpolarisation erheblich langsamer als unter Standardbedingungen. Diese Resultate haben gezeigt, dass der intrazelluläre Kalziumspiegel den Zeitverlauf der Hyperpolarisation über die Regulation der Guanylatzyklase beeinflusst, wie es die biochemischen Experimente von Koch and Stryer (1988) erwarten lassen. Daneben greift das Kalzium auch noch regulativ in die Aktivität verschiedener anderer Enzyme in der Photorezeptorzelle ein. Dazu gehören die Phosphodiesterase (Kawamura 1993), die NO-Synthase (Koch et al. 1994) und wahrscheinlich auch der cGMP-abhängige Ionenkanal (Hsu & Molday 1993). Das Kalzium hat damit eine zentrale Rolle in den Regulations- und Adaptationsmechanismen der Photorezeptorzelle.

4.6 Überlegungen zum Wirkungsmechanismus von FGF

Die Addition von Fibroblastenwachstumsfaktoren zum Medium in der Ableitpipette beschleunigte den Zeitverlauf der spontanen Hyperpolarisation des Membranpotenzials, und die Verlangsamung der Repolarisationsphase der Lichtantworten im Versuchsverlauf wurde ebenfalls intensiviert. Die Beschleunigung der Hyperpolarisation zeigt, dass die Konzentration des cGMP in der Zelle durch Fibroblastenwachstumsfaktoren reduziert wird, und die stärkere Abnahme der Repolarisationsgeschwindigkeit zeigt an, dass daneben auch die Umsatzrate des cGMP in der Zelle reduziert wird. Die Wirkungen der Fibroblastenwachstumsfaktoren entsprechen damit den Wirkungen auf die elektrischen Signale retinaler Stäbchen, wie sie in vorhergehenden Versuchen durch die Applikation von Stickoxidsynthase-Inhibitoren wie z.B. L-NMMA erzielt wurden (Nöll et al. 1994).

Die beschleunigte Depolarisation des Membranpotenzials und die Beschleunigung der Repolarisationsphase der Lichtantworten, wie sie durch die Applikation von NADPH und in nicht ganz so ausgeprägter Form auch durch die Applikation von L-Arginin hervorgerufen wurden, sind bei gleichzeitiger Applikation von Fibroblastenwachstumsfaktoren verschwunden. Diese von NADPH und L-Arginin bewirkten Veränderungen konnten ebenfalls durch Stickoxidsynthase-Inhibitoren ausgelöscht werden. Auch in dieser Hinsicht entspricht also die Wirkung der Fibroblastenwachstumsfaktoren den Wirkungen von Stickoxidsynthase-Inhibitoren.

Eine Möglichkeit, um die Wirkungen der Fibroblastenwachstumsfaktoren zu erklären, könnte also darin bestehen, dass sie in inhibitorischer Form auf die Stickoxidsynthasekette in der Photorezeptorzelle einwirken. Ein ähnlicher

inhibitorischer Effekt wurde in retinalen Pigmentepithelzellen von Rindern nachgewiesen (Goureau et al. 1993).

Die intrazelluläre Applikation von Fibroblastenwachstumsfaktoren hatte keine Veränderung in der Hyperpolarisation des Membranpotenzials, wenn sie zusammen mit dem Kalziumchelatbildner EGTA appliziert wurden. Da EGTA in der Photorezeptorzelle einen Anstieg des intrazellulären freien Kalziumspiegels verhindert, kann geschlossen werden, dass eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumpegels durch die Fibroblastenwachstumsfaktoren als Regulations-mechanismus für die Stickoxidsynthase von Bedeutung sein könnte. Es ist daher möglich, dass die Effekte von Fibroblastenwachstumsfaktoren unter anderem auch auf einer kalziumabhängigen Hemmung der Stickoxidsynthase in den Photorezeptoren beruhen können. Da Stickoxid neben seiner Rolle als Botenmolekül auch zytotoxisch wirkt, kann die Hemmung einer möglicherweise überaktivierten Stickoxidsynthase auch zu den von verschiedenen Autoren beschriebenen protektiven Wirkungen von Fibroblastenwachstumsfaktoren bei degenerativen Prozessen in der Retina beitragen (Faktorovitch et al. 1990, 1992, Lavail et al. 1991, 1992, Campochiaro et al. 1996). Es wäre allerdings auch möglich, dass die Wirkungen der Fibroblastenwachstumsfaktoren lediglich durch die sehr wirksamen Kalziumchelatoren verdeckt werden. Es wurde allerdings in den Membranen der Disks in den Photorezeptoren ein Protein nachgewiesen, das ein Molekulargewicht von etwa 45 kDa hat und eine hohe Affinität zu Fibroblastenwachstumsfaktoren aufweist (Mascarelli et al. 1989). Obwohl die Funktion dieses Proteins nicht geklärt ist, ist es möglich, dass es zur Freisetzung von Kalzium aus den Disks beitragen kann. Eine ähnliche durch Applikation von Fibroblastenwachstumsfaktoren ausgelöste Freisetzung von Kalzium konnte in retinalen Gliazellen nachgewiesen werden (Puro and Mano 1991).

Es bleibt nun zu diskutieren, welchen Beitrag unsere Untersuchungen zum Verständnis der protektiven Effekte von Fibroblastenwachstumsfaktoren bei degenerativen Netzhauterkrankungen beitragen können. Dabei ist es klar, dass diese Untersuchungen kein abschließendes Bild ergeben können, sondern nur einige Hinweise auf mögliche Wirkungsketten zu liefern vermögen.

In den Photorezeptorzellen würde ein niedriger Kalziumpegel und eine hohe Konzentration an Stickoxid zu einer langanhaltenden Depolarisation des Membranpotenzials führen. Ein solcher Zustand kann sicherlich zu einer Zerstörung der Photorezeptorzelle führen. Es ist daher möglich, dass die Effekte von Fibroblastenwachstumsfaktoren auf einer Hemmung der Stickoxidsynthase in den Photorezeptoren beruhen kann. Da Stickoxid neben seiner Rolle als Botenmolekül auch zytotoxisch wirkt, kann die Hemmung einer möglicherweise überaktivierten Stickoxidsynthase und eine Normalisierung der Kalziumkonzentration zu den protektiven Wirkungen von Fibroblastenwachstumsfaktoren bei degenerativen Prozessen in der Retina beitragen.

5. Zusammenfassung

Eine Behandlung der Retina mit Fibroblastenwachstumsfaktoren kann die Photorezeptoren vor degenerativen Prozessen, die durch Erbkrankheiten oder Licht ausgelöst werden, schützen. Über die dieser Schutzfunktion zugrundliegenden physiologischen Mechanismen der Wachstumsfaktoren in den Lichtsinneszellen ist aber nur sehr wenig bekannt. Wir haben daher mit der von Neher und Sakmann entwickelten Patch-clamp-Technik die Effekte von Fibroblastenwachstumsfaktoren allein und zusammen mit verschiedenen Aktivatoren und Inhibitoren der Stickoxidsynthase auf die elektrischen Signale isolierter Photorezeptoren aus der Netzhaut dunkeladaptierter Grasfrösche (*Rana temporaria)* untersucht. Alle Substanzen wurden intrazellulär durch die Ganz-Zell-Ableitpipette appliziert und gleichzeitig wurde die Membranspannung der Zellen kontinuierlich registriert. Während dieser Form der Ableitung wird die Funktion der Photorezeptorzellen durch den Austausch von Substanzen durch Diffusion zwischen Zelle und Ableitpipette beeinflusst. Da das Membranpotenzial in den Photorezeptoren direkt durch die intrazelluläre Konzentration des cGMP bestimmt wird, lassen sich aus der Membranspannung Rückschlüsse auf die Modifikation im Zellstoffwechsel ablaufender Prozesse durch zusätzlich eingebrachte Substanzen ziehen. Der cGMP-Umsatz wird in den Photorezeptoren durch verschiedene andere Botenstoffe wie Kalzium und Stickoxid beeinflusst.

Unter Kontrollbedingungen mit einem einfachen Pipettenmedium ohne cGMP wird der diffusionsbedingte Nukleotidverlust durch eine langsame Hyperpolarisation des Membranpotenzials und eine Verlängerung der Lichtantworten widergespiegelt. Werden Fibroblastenwachstumsfaktoren zu dem Pipettenmedium hinzugefügt, so wurde der Zeitverlauf dieser Hyperpolarisation

beschleunigt und die Verlängerung der Lichtantworten wurde verstärkt. Durch die Addition von NADPH oder L-Arginin zum Pipettenmedium konnte eine Depolarisation des Membranpotenzials und eine Verkürzung der Lichtantworten erzielt werden, die vermutlich auf einer Aktivierung der NO-Synthase beruhen. Diese Effekte wurden durch die gleichzeitige Applikation von NO-Synthase-Inhibitoren ebenso wie durch Fibroblastenwachstumsfaktoren aufgehoben. Die Wirkung der Fibroblastenwachstumsfaktoren entspricht damit insgesamt den Wirkungen von Stickoxidsynthaseinhibitoren.

Fibroblastenwachstumsfaktoren hatten keine Wirkung, wenn sie zusammen mit dem Kalziumchelatbildner EGTA appliziert wurden. Daraus kann geschlossen werden, dass eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumpegels durch die Fibroblastenwachstumsfaktoren als Regulationsmechanismus für die Stickoxid-synthase in Betracht gezogen werden kann. Es ist daher möglich, dass die Effekte von Fibroblastenwachstumsfaktoren unter anderem auch auf einer Hemmung der Stickoxidsynthase in den Photorezeptoren beruhen kann. Da Stickoxid neben seiner Rolle als Botenmolekül auch zytotoxisch wirkt, kann die Hemmung einer möglicherweise überaktivierten Stickoxidsynthase auch zu den protektiven Wirkungen von Fibroblastenwachstumsfaktoren bei degenerativen Prozessen in der Retina beitragen.

6. Summary

A treatment of the retina with Fibroblast-growth-factors, can protect the photoreceptors from degenerative processes, due to genetic diseaseses or light. Although there is little known about the physiological mechanism of the growth factor within the sense of light cells, inhabitating this protectional function. Therefore we have examined the effects of Fibroblast-growth-factors allone and together with different activators and inhibitors of nitrogenoxidesynthase, the electrical signals of isolated photoreceptors out of the retina of dark adapted gras frog´s, with the Patch-clamp-technique developed by Neher and Sakmann.

All substances have been applied intacellular through the whole-cell-revulsion-pipette and at the same time the tension of the membrane of the cells has been continously registered. During this form of revulsion the function of the photoreceptorcells through the exchange of substances through diffusion between cell and revulsion-pipette is influenced.

Due to the potential of the membrane within the photoreceptors determined directly through the intracellular concentration of cGMP, conclusions out of the tension of the membrane towards the modification within cell metabolism running processes through additional retrieved substances are drawn. The cGMP-turnover is influenced in the photoreceptors through different other transmitters like calcium and nitrogen-oxide.

Under terms of controlling with a simple pipette-medium without cGMP, the diffusion conditional loss of nucleotid through a slowly hyperpolarisation of membrane-potential and a prolonging of answers to light has been reflected. Are there Fibroblast-groth-factors added to the pipette-medium, the run of time of this hyperpolarisation has been accelerated and the prolonging of answers to light was increased.

Through the addition of NADPH or L-Arginin to the pipette-medium a

depolarisation of the membrane-potential and a shortening to the answers to light could be reached, which is evantually based on an activating of NO-synthase. These effects have been neutralized through the simultaneous application of NO-synthase-inhibitors as well as through Fibroblast-growth-factors. The effect of Fibroblast-growth-factors corresponds therefore to the results of nitrogenoxidesynthase-inhibitors.

Fibroblast-growth-factors had no effect, if applied with the calcium-chelat-builder EGTA. Therefore we can result that an increase of intracellular calcium through Fibroblast-growth-factors as a regulational mechanism for the nitrogenoxide-synthase, can be taken into consideration. That is why it is possible that the effects of Fibroblast-growth-factors might result, among other reasons, in a obstruction of nitrogenoxidesynthase in the photoreceptors. Because nitrogenoxide reacts, beside his role as a transmitter, also cytotoxic, the obstruction of a possible hyperactiv nitrogenoxidesynthase might contribute also to the protective effects of Fibroblast-growth-factors in degenerative processes within the retina.

7. Literatur

Ames A. III and Barad M.: Metabolic flux of cyclic GMP and phototransduction in rabbit retina. Journal of Physiology 406: 163-179 (1988)

Ames A., Walseth T.F., Heyman R.A., Barad M., Graeff R.M. and Goldberg N.D.: Light-induced increases in cGMP metabolic flux correspond with electrical responses of photoreceptors. Journal of Biological Chemistry 261: 13034-13042 (1986)

Attwell D. and Gray P.: Patch clamp recording from isolated rods of the salamander retina. Journal of Physiology 351: 9P (1984)

Attwel D. and Wilson M.: Behaviour of the rod network in the tiger salamander retina mediated by membrane properties of individual rods. Journal of Physiology 352: 703-737 (1984)

Ayoub G.S. and Copenhagen D.R.: Application of a fluorometric method to measure glutamate release from single photoreceptors. Journal of Neuroscience Methods 37: 7-14 (1991)

Ayoub G.S., Korenbrot J.I. and Copenhagen D.R.: Release of endogenous glutamate from isolated cone photorezeptors of the lizard. Neuroscience Research 10: 47-56 (1989)

Bader C.R., Bertrand and Schwartz E.A.: Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from salamander retina. Journal of Physiology 331: 253-284 (1982)

Baylor D.A., Fuortes M.G.F. and O'Bryan P.M.: Receptive fields of cones in the retina of the turtle. Journal of Physiology 214: 265-294 (1971)

Baylor D.A., Matthews G. and Nunn B.J.: Location and function of voltage sensitive conductances in retinal rods of the salamander Ambystoma tigrinum. Journal of Physiology 357: 575-607 (1984)

Bownds D. and Thomson D.: Control of the sensitivity and kinetics of the vertebrate photoresponse during light adaptations - Calculations from simple molecular models. Proceedings of Yamada Conference XXI on Molecular Physiology of Retinal Proteins pp. 241-246 (1988)

Bredt D.S. and Snyder S.H.: Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP in the cerebellum. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86: 9030-9033 (1989)

Bredt D.S., Hwang P.M. and Snyder S.H.: Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. Nature 347: 768-770 (1990)

Burgess W.H., Mehlmann T., Friesel R., Johnson W.V. and Maciag T.: Multiple forms of endothelial cell growth factor. Rapid isolation and biological and chemical characterisation. Journal of Biological Chemistry 260 11389-11392 (1985)

Campochiaro P.A., Chang M., Ohsato M., Vinores S.A., Nie Z. Hjemeland L., Mansukhani A., Basilico C. and Zack D.J.: Retinal degeneration in transgenic mice with photoreceptor specific expression of a dominant-negative fibroblast growth factor receptor. Journal of Neuroscience 16: 1679-1688 (1996)

Cervetto L., Lagnado L., Perry R.J., Robinson D.W. and McNaughton P.A.: Extrusion of calcium from rod outer segments is driven by both sodium and potassium gradients. Nature 338: 78-83 (1989)

Cervetto, L. & McNaughton P.A. : The effects of phosphodiesterase inhibitors and lanthanum ions on the light sensitive current of retinal rods. Journal of Physiology 370: 91-109 (1986)

Cobbs W.H. and Pugh E.N. : Cyclic GMP can increase rod outer-segment light sensitive current 10-fold without delay of excitation. Nature 313: 585-587 (1985)

Dawis S. M., Graeff R. M., Heyman R. A., Walseth T. F. and Goldberg N. D.: Regulation of cyclic GMP metabolism in toad photoreceptors. Journal of Biological Chemistry 263: 8771-8785 (1988)

Detwiler P.B., Connor J.D. and Bodoia R.D.: Gigaseal patch clamp recordings from outer segments of intact retinal rods. Nature 300: 59-61

Fain G.L., Quandt F.N., Bastian B.L. and Gerschenfels H.M.: Contribution of a caesium-sensitive conductance increase to the rod photoresponse. Nature 272: 467-469 (1978)

Faktorovitch F.G., Steinberg R.G., Yasamura D., Matthes M.T. and Lavail M.M.: Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. Nature 347: 83-86 (1990)

Faktorovitch, F.G., Steinberg, R.G., Yasumura, D., Matthes, M.T. and Lavail, M.M.: Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. Journal of Neuroscience 12: 3554-3567 (1992)

Fesenko E.E., Kolesnikov S.S. and Lyubarsky A.L.: Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. Nature 313: 310-313 (1985)

Fung B.K.K. and Stryer L.: Photolyzed rhodopsin catalyzes the exchange of GTP for GDP in retinal rod outer segment membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 77: 2500-2504 (1980)

Fung B.K.K., Hurley J.B. and Stryer L.: Flow of information in the light triggered cyclic nucleotide cascade of vision. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 78: 152-156 (1981)

Goureau O., Lepoivre M., Becquet F. and Courtois Y.: Differential regulation of inducible nitric oxide synthase by fibroblast growth factors and transforming growth factor β in bovine retinal pigmented epithelial cells: inverse correlation with cellular proliferation. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 90: 4276-4280 (1993)

Harcourt B.: The visual system. In: J.A. Davis, J. Dobbing (Hrsg.): Scientific Foundations of Paediatrics, Saunders Philadelphia: 649 (1974)

Hicks D., Courtois Y. : Acidic fibroblast growth factor stimulates Opsin levels in retinal photoreceptor cells in vitro. FEBS Lett. 234: 475-479 (1988)

Horio Y. and Murad F.: Solubilization of guanylyl cyclase from bovine rod outer segments and effects of lowering Ca^{2+} and nitro compounds. Journal of Biological Chemistry 266: 3411-3415 (1991)

Hsu Y., Molday R.: Modulation of the cGMP-gated channel of rod photoreceptor cells by calmodulin. Nature 361: 76-79 (1993)

Kaupp U. B. and Koch K. W.: Role of cGMP and Ca^{2+} in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. Annual Reviews of Physiology 54: 153-175 (1992)

Kawamura S.: Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclic GMP phosphodiesterase regulation by S-modulin. Nature 362: 855-857 (1993)

Knowles R. G., Palacios M., Palmer R. M. and Moncada S.: Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86: 5159-5162 (1989)

Koch K. W. and Stryer L.: Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylyl cyclase by calcium ions. Nature 334: 64-66 (1988)

Koch K. W., Lambrecht H.-G., Haberecht M., Redburn D. and Schmidt H. H. H. W.: Functional coupling of a Ca^{2+}/calmodulin-dependent nitric oxide synthase and a soluble guanylyl cyclase in vertebrate photoreceptor cells. The EMBO Journal 13: 3312-3320 (1994)

Kühn H. : Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle bovine photoreceptor membranes. Biochemistry 17: 4389-4395 (1978)

Kühn H.: Light- and GTP-regulated interaction of GTP-ase and other proteins with bovine photoreceptor membranes. Nature 283: 587-589 (1980)

Kühn H. and Dreyer W.J.: Light dependent phosphorylation of Rhodopsin by ATP. FEBS letters 20: 1-6 (1972)

Kühn H. and Chabre M.: Light dependent interactions between rhodopsin and photoreceptor enzymes. Biophysical Structures and Mechanisms 9: 231-234 (1983)

Lavail M.M., Faktorovitch E.G., Hepler J.M., Pearson K.L., Yasumura D., Matthes M.T. and Steinberg R.H.: Basic fibroblast growth factor protects photoreceptors from light- induced degeneration in albino rats. Annals of the New York Academy of Sciences 638: 341-347 (1991)

Lavail M.M., Unoki K., Yasumura D., Matthes M.T., Yancopoulos G.D. and Steinberg R.H.: Multiple growth factors, cytokines and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 89: 11249-11253 (1992)

Marc R.E. and Lam D.M.K.: Uptake of aspartic and glutamic acid by photoreceptors of the goldfish retina. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 78: 7185-7189 (1981)

Margulis A., Sharma R.K. and Sitaramayya A.: Nitroprusside-sensitive and insensitive guanylate cyclases in retinal rod outer segments. Biochemical and Biophysical Research Communication 185 : 909-914 (1992)

Marty, A. and Neher, E.: Tight-seal whole-cell recording. In "Single-channel recording" (Sakmann B. and Neher E. ed.). Plenum Press New York and London pp. 107-122 (1983)

Mascarelli F., Raulais D. and Courtois Y.: Fibroblast growth factor phosphorylation and receptors in rod outer segments. EMBO Journal 8 : 2265-2273 (1989)

Miller A.M. and Schwartz E.A.: Evidence that cyclic GMP regulates the membrane potential in rod photoreceptors. Nature 280: 295-297 (1983)

Moncada S., Radomsky M.W. and Palmer R.M.: Endothelium derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. Biochemical pharmacology 37: 2495-2501 (1988)

Morton R.A.: Chemical aspects of the visual process. Nature 153: 69-71 (1944)

Murakami M., Ohtsu T. and Ohtsuka T.: Effects of chemicals on receptors and horizontal cells in the carp retina. Journal of Physiology 227: 899-913 (1972)

Murakami M., Ohtsuka T. and Shimazakio H.: Effects of aspartate and glutamate on the bipolar cells in the carp retina. Vision Research 15: 456-458 (1975)

Nöll G.N.: Suitability of retinol, retinal and retinylpalmitate for the regeneration of bleached rhodopsin in the isolated frog retina. Vision Research 24: 1615-1622 (1984)

Nöll G.N.: Über die Regeneration des Sehfarbstoffs in den Stäbchen der Vertebraten-Netzhaut. R.G. Fischer Verlag Frankfurt (1986)

Nöll G.N., Billek M., Pietruck C., and Schmidt K.-F.: Inhibition of nitric oxide synthase alters light responses and dark voltage of amphibian photoreceptors. Neuropharmacology 33 : 1407-1412 (1994)

Plouet J., Mascarelli F., Loret M., Faure J.P. and Courtois Y.: Regulation of eye derived growth factor binding to membranes by light, ATP or GTP in photoreceptor outer segments. EMBO Journal 7: 373-376 (1988)

Puro D.G. and Mano T.: Modulation of calcium channels in human retinal glial cells by basic fibroblast growth factor: a possible role in retinal pathobiology. Journal of Neuroscience 11: 1873-1880 (1991)

Rando R.R.: Die Chemie des Vitamins A und des Sehvorgangs. Angewandte Chemie 102: 507-526 (1990)

Rohen J.W.: Funktionelle Anatomie des Menschen. 3. Auflage, Schattauer, Stuttgart, New York: 263 (1977)

Schiebler T.H. und Pieper U.: Histologie, Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo: 589-610 (1984)

Schmidt K.-F., Baumann C. and Nöll G. N.: Electrical properties of single isolated retinal rods in darkness and during light responses. Pflügers Archiv 403: R44

Schmidt K.-F., Nöll G. N. and Baumann C.: Effect of guanine nucleotides on the dark voltage of single frog rods. Visual Neuroscience 2: 101-108 (1989)

Schmidt K.-F., Nöll G. N. and Baumann C.: Effects of intracellulary applied sodium ions on the dark voltage of isolated retinal rods. Visual Neuroscience 4: 331-336 (1990)

Schmidt K.-F., Nöll G. N. and Yamamoto Y.: Sodium nitroprusside alters dark voltage and light responses on isolated retinal rods during whole-cell recording. Visual Neuroscience 9: 205-209 (1992)

Schmidt K.-F., Nöll G. N., Jacobi P. and Baumann C.: Configuration of light responses in isolated retinal rods. A patch-clamp study. Graefe`s Archiv 232: 153-161 (1994)

Schmidt K.-F., Billek M., Pietruck C., Nöll G. N., Goureau O. and Courtois Y.: Fibroblast growth factors alter light responses and dark voltage in retinal rods of the frog (*Rana temporaria*). Neuroscience Letters 191: 177-180 (1995)

Sievers J., Hausmann B., Unsicker K. and Berry M.: Fibroblast growth factor promote the survival of adult rat retinal ganglion cells after transsection of the optic nerve. Neuroscience Letters 76: 157-162 (1987)

Streyer L.: Cyclic GMP cascade of vision. Annual Review of Neuroscience 9: 87-119 (1986)

Tsuyama Y., Nöll G. N. and Schmidt K.-F.: L-Arginine and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate alter dark voltage and accelerate light response recovery in

isolated retinal rods of the frog (Rana temporaria). Neuroscience Letters 149: 95-98 (1993)

Uchida S., Wheeler G.L., Yamazaki A. and Bitensky M.W.: GTP-protein activator of phosphodiesterase which forms a response to bleached rhodopsin. Journal of Cyclic Nucleotide Research : 95-104 (1981)

Venturini C. M., Knowles R. G., Palmer R. M. J. and Moncada S.: Synthesis of nitric oxide in the bovine retina. Biochemical and Biophysical Research Communications 180: 920-925 (1991)

Wald G.: Vitamin A in the retina. Nature 132: 316-317 (1933)

Wald G.: Molecular basis of visual excitation. Science 162: 230-239 (1968)

Yau K.W. and Nakatani K.: Electrogenic Na-Ca exchange in retinal rod outer segment. Nature 311: 661-663 (1984)

Danksagung

Herrn Priv.Doz. Dr. K.-F. Schmidt möchte ich für die Überlassung des Arbeitsthemas, die exzellente Betreuung, den regen Gedankenaustausch und das sehr angenehme Arbeitsklima meinen besonderen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. G. Nöll danke ich herzlich für die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der Versuche, die freundliche Atmosphäre und die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Meiner lieben Ehefrau Anette, sowie meinen Eltern und Schwiegereltern herzlichen Dank für die geduldige und hilfreiche Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Billek
Vorname	Mischa Horst Peter
Geburtsdatum	30.11.1964
Geburtsort	Giessen
Familienstand	verheiratet, 3 Töchter, 2 Söhne
Eltern	Horst Billek, Masseur u. med. Bademeister Irene Billek, geb. Dunkelberg

Schulbildung/Ausbildung

08/71 – 06/75	Grundschule in Hausen
08/75 – 07/77	Gesamtschule in Pohlheim
08/77 – 06/85	Gymnasium, Liebig-Schule in Giessen, Abitur
10/85 – 03/88	Ausbildung zum Masseur und med. Bademeister (abgeschlossen)
04/88 – 10/94	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig Universität in Giessen
01/95 – 06/96	Arzt im Praktikum, Kreiskrankenhaus in Lich, Chirurgie
07/96 – 11/96	Assistenzarzt in der Klinik Rabenstein in Bad Salzhausen, Orthopädie
01/97 – 01/00	Assistenzarzt in der Rhein-Sieg-Klinik in Nümbrecht, Orthopädie
02/00 –03/02	Assistenzarzt im Krankenhaus Balserische Stiftung in Giessen, Innere Medizin
04/02-06/03	Assistenzarzt in der Allgemeinmedizinischen Praxis bei Dr. med. H. Pfeffer in Reiskirchen
05/03	Facharztprüfung für Allgemeinmedizin
ab 07/03	Selbständig in allgemeinmedizinischer Praxis