

Untersuchungen zu den molekularen Ursachen der beiden Makulopathien Sorsby Fundusdystrophie und X- gebundene juvenile Retinoschisis

**Von der Charakterisierung krankheitsreflektierender Mausmodelle zum Einsatz
geeigneter Therapiemöglichkeiten**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin der
Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Andreas Janßen aus
Xanten
(Marienbaum)**

Regensburg im Januar 2008

Promotionsgesuch eingereicht am: 08.02.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 30.05.2008

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Wirth

Erstgutachter: Prof. Dr. Ernst Tamm

Zweitgutachter: Prof. Dr. Bernhard Weber

Prüfer aus der Fakultät III: Prof. Dr. Richard Warth

Die vorliegende Arbeit wurde von Prof. Dr. Bernhard Weber angeleitet.

Eidesstattliche Erklärung

(zu § 6 Abs. 1, Nr. 3 der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität Regensburg)

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Prof. Dr. Ernst Tamm (Institut für Anatomie, Universität Regensburg); transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen von Mausorganen
2. Prof. Dr. Christian Albrecht May (Institut für Anatomie, Universität Dresden) rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von Mausorganen
3. Prof. Dr. Mathias Seeliger (Universitätsaugenklinik Tübingen); SLO- und ERG-Untersuchungen von Mäusen
4. PD Dr. Frank Schweda (Institut für Physiologie, Universität Regensburg); biochemische Charakterisierung des Nierenphänotyps von Mäusen
5. PD Dr. Silke Haverkamp (MPI für Hirnforschung, Frankfurt); immunhistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen von Mausorganen

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 08.02.2008

Danke...

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater

Herrn Prof. Dr. Bernhard Weber

für die herzliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, für die vielen anregenden Diskussionen und für die stete und engagierte Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit. Seinem unermüdlichen Arbeitseinsatz für die Wissenschaft und Forschung ist es zu verdanken, dass es mir als Doktorand im Labor nie an etwas gefehlt hat... Vielen Dank!!!

Für die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Entstehung dieser Arbeit danke ich ganz herzlich Prof. Dr. Ernst Tamm und Prof. Dr. Mathias Seeliger und ihren Mitarbeitern, die mich in ihren Arbeitsgruppen wie einen Ihrer eigenen Doktoranden aufgenommen und unterstützt haben. Ohne den nahezu unbeschränkten Zugriff auf ihre personellen wie arbeitstechnischen Möglichkeiten wäre diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen... Vielen vielen Dank!!!

Bei allen Mitarbeitern und Kollegen unseres Instituts möchte ich mich ganz herzlich für jede Form von Hilfe, Unterstützung und emotionalem zur Seite stehen bedanken, es war wirklich eine schöne Zeit mit Euch... beruflich, wie privat. Manches wäre ohne dieses Team vielleicht ganz anders verlaufen!!!

Besonders herzlich möchte ich mich bei Johanna Förster bedanken, die in dieser Zeit ein ganz wichtiger Bezugs- und Ruhepunkt für mich war, was wäre ich ohne Dich gewesen!!! Lars, Du bist natürlich fest mit eingeschlossen.

Ein ganz herzliches Dankeschön auch an Heidi Stöhr, Margit Schiml und Elke Stauber, die immer, auch in sehr schwierigen Zeiten an meiner Seite waren!!!

Meinen Eltern danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz sowohl in zwischenmenschlicher als auch finanzieller Hinsicht. Ohne eure aufopfernde, völlig selbstlose Hilfe hätte ich nie studieren können, und an alles Weitere wäre gar nicht zu denken gewesen... Ihr seid die Besten!!!! DANKE, DANKE, DANKE!

Allen meinen Freunden und Bekannten, meinen Geschwistern und besonders natürlich Christian danke ich dafür, dass es sie gibt, dass sie mir immer zur Seite stehen, und dass sie mich so mögen, wie ich bin - das gibt Kraft und tut unendlich gut!!!

IN MEMORIAM

An dieser Stelle möchte ich an meinen ehemaligen Klassenlehrer der Walter Bader Realschule Xanten

Herrn Rainer Werz (* 27.02.1941; + 03.11.1998)

erinnern. Er hat mir vieles mit auf den Weg gegeben, auf das ich heute noch gerne zurückgreife.



*Das Auge hat sein Dasein dem Licht zu danken.
Aus gleichgültigen tierischen Hülfsorganen ruft sich das Licht sein Organ hervor,
das seinesgleichen werde,
und so bildet sich das Auge am Lichte fürs Licht,
damit das innere Licht dem äußeren entgegen trete.*

Johann Wolfgang von Goethe (1749 -1832),
Naturforscher und Dichter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	VI
A. Abbildungsverzeichnis	X
B. Tabellenverzeichnis	XIII
I. Zusammenfassung.....	1
II. Einleitung.....	5
1. Dystrophien der zentralen Netzhaut.....	5
1.1 Sorsby Fundusdystrophie	7
1.2 X-gebundene juvenile Retinoschisis	12
III. Material und Methoden.....	19
1. Grundsätzliche Methoden der Mikrobiologie	19
2. DNA-spezifische molekularbiologische Methoden	19
2.1 DNA Extraktion.....	19
2.1.1 Extraktion aus Maus Gewebe.....	19
2.1.2 Extraktion von Plasmid-DNA.....	19
2.2 Quantifizierung von DNA.....	20
2.3 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten.....	20
2.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
2.5 Direktes Sequenzieren von PCR-Produkten	21
2.6 Klonierung von PCR-Produkten	22
2.6.1 Klonierung mit T- Überhang.....	22
2.6.2 Klonierung durch das Einführen neuer Restriktionsstellen.....	22
2.6.3 Vektor-Modifikationen	22
2.6.4 Ligation von PCR-Produkten	23
3. RNA spezifische Methoden	23
3.1 Präparation von Gesamt-RNA.....	23
3.2 cDNA-Synthese.....	23
3.3 Reverse-Transcriptase-(RT)-PCR.....	24
3.4 RNA in situ Hybridisierung an Kryoschnitten.....	24
3.4.1 Herstellung und Markierung der RNA-Sonde.....	24
3.4.2 Linearisierung der Plasmid-DNA.....	24
3.4.3 Markierung der RNA-Sonde durch in vitro-Transkription	25
3.4.4 Dot blot	25
3.4.5 Hybridisierungsreaktion	26
3.5 Northern Blot.....	26
3.6 Quantitative Echtzeit-RT-PCR (qRT-PCR).....	27
4. Tiere und Tierhaltung.....	29
5. Morphologische und histologische Methoden	31
5.1 Elektroretinographie (ERG)	31

5.2 Raster-Laser Ophthalmoskopie (SLO)	32
5.3 Licht- und Elektronenmikroskopie	32
5.3.1 Eponeinbettung von Geweben	32
5.3.2 Herstellung von Gefäßausgüssen (vascular corrosion casts)	33
5.4 Kryoeinbettung von Geweben	33
5.5 Histologische Doppelfärbung mit Hämalaun und Eosin	34
5.6 Immunohistochemie	34
5.6.1 Antikörperfärbungen an Gewebebeschnitten	34
5.6.2 Antikörperfärbungen an vollständigen Geweben (whole mount)	35
5.6.3 Antikörperfärbungen an Zellen	35
5.7 Immunogold Antikörperfärbungen (Pre-Embedding Methode)	36
5.8 In situ Zymographie.....	37
6. Angiogenese Methoden	37
6.1 Aortenring Assay (ARA)	37
6.2 Fibrin Bead Assay	38
6.3 Isolierung muriner Endothelzellen aus der Aorta (aortic endothelial cells, AEC).....	39
6.3.1 Fluoreszenz - aktiviertes „cell sorting“	39
6.3.2 Matrikel Assay.....	41
7. Proteinbiochemische Methoden.....	41
7.1 Herstellung von Proteinextrakten	41
7.2 Western Blot.....	42
7.2.1 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)	42
7.2.2 Immunoblot.....	43
7.3 Zymographie	43
IV. Ergebnisse	44
1. Charakterisierung der Timp3-defizienten Mauslinie auf C57/Bl6- und CD1-Albino-Hintergrund	44
1. 1 Morphologische Untersuchungen des Augenphänotyps	45
1.1.1 Licht- und Elektronenmikroskopie	45
1.1.2 Raster-Laser Ophthalmoskopie	46
1.2 Untersuchungen zu den molekularen Ursachen der Gefäßveränderungen in Timp3 ^{-/-} Mäusen (CD1-Hintergrund)	47
1.2.1 In situ Zymographie und Immunohistochemie.....	47
1.2.2 Studien zum Gefäßwachstum mit Hilfe der Aortenring- und Fibrin Bead Assays	50
1.2.3 Zymographischer Nachweis der MMP-Aktivität in AEC-Zellextrakten.....	52
1.2.4 Überprüfung des VEGF/VEGFR2-Signalwegs durch Western Blotting	53
2. Funktionelle Untersuchungen zur Rolle von mutantem Timp3-S156C bei angiogenen Vorgängen	54
2.1 Aortenring-Assay.....	54
2.2 Fibrin Bead Assay	55
2.3 Überprüfung des VEGF/VEGFR2-Signalwegs durch Western Blotting	57
3. Charakterisierung der Timp3-S156C Maus auf CD1-Hintergrund.....	58
3.1 In vivo SLO-Aufnahmen	58
3.2 Licht- und Elektronenmikroskopie	59
3.2.1 Timp3- und Elastin-Immunohistochemie.....	61
3.2.2 Immunogold Elektronenmikroskopie.....	63

3.2.3 Elastin whole mount Antikörperfärbungen der BM	65
3.3 Quantitative Reverse Transkriptase Real Time PCR (qRT-PCR)	66
3.3.1 Expressionsprofile der Timp-Moleküle (Timp1 - Timp4)	67
3.3.2 Expressionsprofile ausgewählter Strukturproteine in der BM.....	68
3.3.3 Expressionsprofile ausgewählter Kollagene in der BM	70
3.3.4 Expressionsprofile ausgewählter MMPs in der BM	71
3.4 Immunohistochemie von ausgewählten EZM-Proteinen	72
4. Charakterisierung von Basalmembranveränderungen in der Timp3-S156C knock-in Niere auf CD1-Hintergrund	73
4.1 Licht- und Elektronenmikroskopie	74
4.2 Biochemische Charakterisierung des Nierenphänotyps.....	76
5. Charakterisierung der Timp3-S156C knock-in Mutation auf dem Balb/C-Albino-(Inzucht)-Hintergrund	79
5.1. Licht- und Elektronenmikroskopie	79
6. Untersuchungen zu den molekularen Ursachen der RS1	81
6.1 Immunhistochemischer Nachweis der Mikroglia-/Makrophagen-Aktivierung in Rs1h-defizienten Mäusen	81
6.2 Der Einfluss von early response gene 1 (Egr1) auf die Mikroglia-/Makrophagen-Aktivierung in Rs1h-defizienten Mäusen.....	82
6.3 Die Rolle von Caspase1 (Casp1) bei der Mikroglia-/Makrophagen-Aktivierung in Rs1h-defizienten Mäusen	84
7. Somatische Gentherapie am Mausmodell der RS1	87
7.1 Abschätzung eines inizialen therapeutischen Erfolgs	88
7.1.1 SLO-Messungen.....	88
7.1.2 ERG-Messungen	89
7.1.3 Immunhistochemische Untersuchungen	89
7.1.4 Analyse der räumlichen Expression des rAAV-mOP-RS1-Konstrukts	93
7.2 Studien zum Langzeiterfolg der rAAV-mOP-RS1-Gentherapie	94
7.2.1 SLO-Messungen.....	94
7.2.2 ERG-Messungen	95
7.2.3 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen.....	97
7.2.4 Elektronenmikroskopie	100
7.3 Studien zum therapeutischen Erfolg bei rAAV-mOP-RS1-Applikation in fortgeschrittenen Stadien retinaler Degeneration Rs1h-defizienter Mäuse	101
7.3.1 Zeitlicher Verlauf der Photorezeptordegeneration in Rs1h-defizienten Mäusen.....	102
7.3.2 ERG-Messungen	103
7.3.3 Immunhistochemische Evaluierung des therapeutischen Effekts zu unterschiedlichen Injektionszeitpunkten	105
V. Diskussion.....	109
1. Die Timp3-defiziente Maus	109
2. Der Einfluss der Timp3-S156C-Mutation auf die anti-angiogenen Eigenschaften des Timp3-Proteins.....	112
3. Charakterisierung der Timp3-S156C Maus auf dem CD1-Hintergrund	114
4. Basalmembranveränderungen der Niere	125

5. Untersuchungen zu den molekularen Ursachen der RS1	128
5.1 Der Einfluss von early response gene 1 (Egr1) auf die Mikroglia/Makrophagen-Aktivierung in Rs1h-defizienten Mäusen.....	129
5.2 Die Rolle von Casp1 bei der Mikroglia-/Makrophagen-Aktivierung in Rs1h-defizienten Mäusen	129
6. rAAV-mOP-RS1-Gentherapie am Mausmodell der RS1	131
VI. Literatur	140
C. Abkürzungsverzeichnis	XIV
D. Anhang.....	XX
1. Nachweis der Timp3-targetierten Mäuse, die für die Arbeiten zu IV. 1.-5. benutzt wurden	XX
2. Nachweis der Rs1h-AAV Mäuse, die für die Arbeiten zu IV. 7.1. - 7.2 benutzt wurden.....	XXI
3. Nachweis der Rs1h-AAV Mäuse, die für die Arbeiten zu IV. 7.3 benutzt wurden.....	XXII
E. Publikationen.....	XXIV
1. Begutachtete Veröffentlichungen	XXIV
2. Kongressbeiträge.....	XXIV
F. Lebenslauf.....	XXVI

A. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Übersichtsdarstellung des menschlichen Auges mit einer detaillierten Abbildung der menschlichen Netzhaut	5
Abb. 2	Darstellung des Augenfundus eines SFD-Patienten	8
Abb. 3	Hypothetisches Modell von TIMP3 und relative Positionen der SFD-Mutationen	8
Abb. 4	Fundusaufnahme eines Patienten mit den typischen Manifestationen einer RS1	13
Abb. 5	Ganzfeld-ERG	14
Abb. 6	Expressionsanalyse des murinen <i>RS1</i> -Homolog <i>Rs1h</i>	17
Abb. 7	Hämatoxilin/Eosin Übersichtsfärbung der Wildtyp und <i>Rs1h</i> -defizienten Netzhaut	18
Abb. 8	Genotypisierung der verwendeten Mauslinien	30
Abb. 9	Morphologische Darstellung von isolierten, aufgereinigten murinen AECs im Vergleich zu Fibroblasten	40
Abb. 10	Immunohistochemische Antikörperfärbung von AECs mit den EC-Markern CD31 und VE-cadherin	40
Abb. 11	Kultivierung isolierter, Zell-sortierter AECs auf einem Matrikel Nährboden	41
Abb. 12	Zielgerichtete Unterbrechung des Maus <i>Timp3</i> -Gens	44
Abb. 13	Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen von Wildtyp und <i>Timp3</i> -defizienten Mäusen	45
Abb. 14	<i>In vivo</i> Analysen und Rasterelektronenmikroskopie von Wildtyp und <i>Timp3</i> -defizienten Mäusen	47
Abb. 15	Erhöhte MMP-Aktivität in der Choroidea <i>Timp3</i> -defizienter Mäuse	48
Abb. 16	Whole mount Antikörperfärbung der retinalen Gefäße von Wildtyp und <i>Timp3</i> ^{−/−} Mäusen	49
Abb. 17	Ein verstärktes Auswachsen von Pseudogefäßen bei Gewebeexplantaten der Aorten <i>Timp3</i> -defizienter Mäuse wird durch unbalancierte VEGF-induzierte Angiogenese vermittelt	50
Abb. 18	Die antiangiogene Wirkung auf die Bildung kapillarer Pseudogefäße wird durch den TIMP3 C-Terminus Vermittelt	51
Abb. 19	Zymographischer Nachweis der MMP2- und MMP9-Aktivität in AECs	52
Abb. 20	Analyse VEGF-induzierter Signalwege	53
Abb. 21	<i>Timp3-S156C</i> homozygote Aortenexplantate zeigen keine signifikant erhöhte Auswachsraten an Pseudogefäßen	54
Abb. 22	Spontane Gefäßneubildungsrate von <i>Timp3</i> ^{+/+} , <i>Timp3</i> ^{+/<i>S156C</i>} , <i>Timp3</i> ^{<i>S156C/S156C</i>} und <i>Timp3</i> ^{−/−} AECs	55
Abb. 23	Einfluss von rTimp3-S156C auf die Gefäßneubildung von <i>Timp3</i> ^{+/+} , <i>Timp3</i> ^{+/<i>S156C</i>} , <i>Timp3</i> ^{<i>S156C/S156C</i>} und <i>Timp3</i> ^{−/−} AECs	56
Abb. 24	Analyse VEGF-induzierter Signalwege in <i>Timp3-S156C</i> knock-in Maus	57
Abb. 25	Retinale SLO-Aufnahmen des gesamten Augenfundus von 12 Monate alten <i>Timp3</i> ^{+/+} , <i>Timp3</i> ^{+/<i>S156C</i>} und <i>Timp3</i> ^{<i>S156C/S156C</i>} knock-in Mäusen	59
Abb. 26	Lichtmikroskopische Untersuchungen von Wildtyp und <i>Timp3-S156C</i> knock in Mäusen	60
Abb. 27	Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Wildtyp und <i>Timp3-S156C</i> knock-in Mäusen	61
Abb. 28	Immunohistochemischer Nachweis von Timp3 und Elastin an retinalen Kryoschnitten von <i>Timp3-S156C</i> knock-in Mäusen	62

Abb. 29 Immunochemischer Nachweis einer Timp3 Akkumulation in <i>Timp3-S156C knock-in</i> Fibroblasten und aufgereinigter EZM	63
Abb. 30 Nachweis von Timp3 an retinalen Ultradünn-Schnitten von <i>Timp3-S156C knock-in</i> Mäusen	64
Abb. 31 Nachweis von Elastin an retinalen ultra-dünn Schnitten von <i>Timp3-S156C knock-in</i> Mäusen	65
Abb. 32 Immunhistochemischer Nachweis von Elastin an <i>whole mount</i> RPE/BM/Choroid Präparaten von <i>Timp3-S156C knock-in</i> Mäusen	66
Abb. 33 Nachweis der relativen Expression von Timp1 - Timp4 im Komplex Choroid/BM/RPE durch qRT-PCR	68
Abb. 34 Nachweis der relativen Expression ausgewählter EZM-Proteine im Komplex Choroid/BM/RPE durch qRT-PCR	69
Abb. 35 Nachweis der relativen Expression der hauptsächlich in der EZM vorhandenen Collagene im Komplex Choroid/BM/RPE durch qRT-PCR	71
Abb. 36 Nachweis der relativen Expression von ausgewählten MMPs im Komplex Choroid/BM/RPE durch qRT-PCR	72
Abb. 37 Immunhistochemischer Nachweis von LamininB2, KollagenIV, VI und XVIII an retinalen Kryoschnitten von <i>Timp3-S156C knock-in</i> Mäusen	73
Abb. 38 Lichtmikroskopische Untersuchungen von Wildtyp und <i>Timp3-S156C knock-in</i> Nieren	75
Abb. 39 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen von Wildtyp und <i>Timp3-S156C knock-in</i> Nieren Glomeruli	76
Abb. 40 Biochemische Analyse der Urin- Natrium und renalen Kaliumausscheidung von Wildtyp und <i>Timp3-S156C knock-in</i> Mäusen	77
Abb. 41 Biochemische Analyse der renalen Renin mRNA und Plasmareninkonzentration von Wildtyp und <i>Timp3-S156C knock-in</i> Mäusen	78
Abb. 42 Lichtmikroskopische Untersuchungen von Balb/C-Wildtyp und <i>Timp3-S156C knock-in</i> Mäusen	79
Abb. 43 Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Balb/C-Wildtyp und <i>Timp3-S156C knock-in</i> Mäusen	80
Abb. 44 Immunhistochemischer Nachweis von F4/80 und Gfap in den Netzhäuten von <i>Rs1h^{+/y}</i> und <i>Rs1h</i> -defizienten Mäusen	82
Abb. 45 Immunhistochemischer Nachweis von F4/80 in den Netzhäuten von <i>Rs1h/Egr1</i> Doppel- <i>knock-out</i> Mutanten	83
Abb. 46 Immunhistochemischer Nachweis von F4/80 in den Netzhäuten von <i>Rs1h/Casp1</i> Doppel- <i>knock-out</i> Mutanten	85
Abb. 47 AAV-Vektorkonstrukt zur Einbringung des menschlichen RS1-Gens in die murine Netzhaut	87
Abb. 48 In vivo SLO-Darstellungen von rAAV-mOP-RS1-injizierten und nicht-injizierten Augen	88
Abb. 49 Elektrophysiologische Evaluierung rAAV-mOP-RS1-injizierter und nicht-injizierter Augen <i>Rs1h</i> -defizienter Mäuse 5 Monate nach der Vektor Injektion	90
Abb. 50 Immunfluoreszenz Mikroskopie der Netzhäute rAAV-mOP-RS1-injizierter und nicht-injizierter <i>Rs1h</i> -defizienten Mäuse 9 Monate nach Vektor Applikation	92
Abb. 51 RNA in situ-Hybridisierung an rAAV-mOP-RS1-behandelten und nicht-behandelten Schnitten zum Nachweis einer erfolgreichen Vektortransfektion von Photorezeptoren	93
Abb. 52 Retinale SLO-Aufnahmen des gesamten Augenfundus von repräsentativen Wildtyp <i>Rs1h</i> -defizienten behandelten und nicht-behandelten Augen	95

Abb. 53 Elektrophysiologische Evaluierung rAAV-mOP-RS1-behandelter und nicht-behandelter Augen <i>Rs1h</i> -defizienter Mäuse 12 und 19 Monate nach der Vektor Injektion	96
Abb. 54 Elektrophysiologische Evaluierung rAAV-mOP-RS1-behandelter Augen <i>Rs1h</i> -defizienter Mäuse 19 Monate nach der Vektor Injektion und Alters-anangepasster Wildtyp-Kontrollen	97
Abb. 55 Lichtmikroskopische Aufnahme von Wildtyp, <i>Rs1h</i> -defizienten behandelten und nicht-behandelten Augen	98
Abb. 56 Immunohistochemischer Nachweis von Retinoschisin und Rhodopsin an retinalen Kryoschnitten von Wildtyp, <i>Rs1h</i> -defizienten behandelten und nicht-behandelten Augen	99
Abb. 57 Immunohistochemischer Nachweis von PKC α und CtBP2 an retinalen Kryoschnitten von Wildtyp, <i>Rs1h</i> -defizienten behandelten und nicht-behandelten Augen	100
Abb. 58 Transmissionselektronenmikroskopische Analyse der Synapsen von Wildtyp, <i>Rs1h</i> -defizienten behandelten Augen	101
Abb. 59 Statistische Evaluierung der Zapfen- und Gesamtphotorezeptorzellen Färbung in retinalen Kryoschnitten von <i>Rs1h</i> -defizienten Augen, die die progressive Photorezeptordegeneration bei RS1 darstellt	103
Abb. 60 Elektrophysiologische Evaluierung rAAV-mOP-RS1-behandelter und nicht-behandelter Augen <i>Rs1h</i> -defizienter Mäuse 4 Monate nach der Vektor-Injektion	104
Abb. 61 Immunohistochemischer Nachweis von PNA und Retinoschisin an retinalen Kryoschnitten von Wildtyp, <i>Rs1h</i> -defizienten behandelten und nicht-behandelten Augen	106
Abb. 62 Statistische Evaluierung der Zapfen- und Gesamtphotorezeptorzellen Färbung in retinalen Kryoschnitten von rAAV-mOP-RS1-behandelter und nicht-behandelter Augen zu unterschiedlichen Zeiten der Vektor-Injektion	107
Abb. 63 Hypothetisches Modell des möglichen Pathomechanismus, der zu massiver Dilatation von Gefäßen im Choroid von <i>Timp3</i> ^{-/-} Mäusen führt	111
Abb. 64 Humane und murine SFD-charakteristische sub-RPE-Ablagerungen	115
Abb. 65 Schematisch Darstellung der BM und der wichtigsten Strukturproteine	121
Abb. 66 Bevorzugte Stellen von Ablagerungen immunreaktiven und elektronendichten Materials in verschiedenen Formen humaner Glomerulopathien	126

B. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Primersequenzen für RT-PCR-Amplifikationen	21
Tab. 2 Primersequenzen für quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)-Amplifikationen	28
Tab. 3 Genetische Charakteristika der verwendeten Mauslinien	30
Tab. 4 Verwendete Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen	36
Tab. 5 Verwendete Antikörper für Western Blot Untersuchungen	42
Tab. 6 Quantitative Erfassung von aktivierte und residenten Mikroglia/Makrophagen in retinalem Gewebe von drei Kryoschnitten eines einzigen Tieres	85
Tab. 7 Quantitative Messung des Verlustes an Photorezeptorzellen in rAAV-mOP-RS1- behandelten und nicht-behandelten Augen	107

I. Zusammenfassung

Sorsby Fundusdystrophie (SFD) ist eine erbliche autosomal-dominante Degeneration der Makula, die zu einem schwerwiegenden Verlust der Visusfunktion führt, der hauptsächlich durch neovaskuläre Komplikationen ausgelöst wird. Als ursächlich für diese Augenpathologien wurden Mutationen im Gewebsinhibitor der Metalloproteininasen-3 (*TIMP3*)-Gen beschrieben. *TIMP3* ist ein starker Inhibitor von Matrix Metalloproteininasen (MMPs) und reguliert die durch den vaskulären, endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF)-vermittelte Angiogenese. Im Auge ist *TIMP3* stark mit der Bruchschen Membran (BM), der extrazellulären Matrix (EZM) zwischen den retinalen Pigmentepithel (RPE) und dem Choroid assoziiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Timp3*-defiziente Mäuse (auf C57/BL6- und CD1-Hintergrund) abnormal veränderte Gefäßstrukturen mit erweiterten Kapillaren im Bereich der Choroidea ausbilden. Mit Hilfe der *in situ* Zymographie konnte in *Timp3*^{-/-} Mäusen eine erhöhte MMP-Aktivität an der RPE/Choroid-Grenze im Vergleich zu Wildtyp-Tieren festgestellt werden. In Aortenring- und *Fibrin Bead Assays* wurde eine verstärkte angiogene Aktivität in *Timp3*^{-/-} Geweben gegenüber den Wildtypgeweben beobachtet, ein Effekt, der durch die Zugabe von rekombinantem rTIMP3 revertiert werden konnte. Diese anti-angiogene Eigenschaft von *TIMP3* ist im C-terminalen Bereich des Proteins verankert. Durch die Zugabe eines VEGFR2-Inhibitors zu Aortenexplantaten *Timp3*-defizienter Mäuse konnte die endotheliale Pseudogefäßneubildung drastisch reduziert werden. Dies ging mit einer erhöhten Aktivierung des VEGF/VEGFR2-Signalwegs in *Timp3*^{-/-} Endothelzellen der Aorta (AECs) einher. Die Daten lassen auf eine unbalancierte VEGF-vermittelte Angiogenese in *Timp3*-defizienten Mäusen schließen. Zusammenfassend geben die Daten Grund zu der Annahme, dass der distinkte choroidale Phänotyp in *Timp3*^{-/-} Mäusen das Resultat einer lokalen Zerstörung der EZM- sowie VEGF-Homöostase im Bereich des RPE/Choroid darstellt. Die These unterstützt die Annahme, dass *TIMP3* eine bedeutende regulative Rolle bei der Entwicklung der choroidalen Vaskulatur einnimmt. Gegenüber dem vollständigen Fehlen des *Timp3*-Moleküls wird die anti-angiogene Wirkung durch die *Timp3-S156C*-Mutation kaum beeinflusst.

Die *Timp3-S156C*-Mutation auf dem CD1-Hintergrund stellt ein geeignetes Mausmodell zur Erforschung der molekularen Grundlagen der Sorsby Fundusdystrophie (SFD) dar. Die heterozygote *Timp3-S156C*-Mutante weist distinkte morphologische Veränderungen mit großen Ähnlichkeiten zum klinischen Bild der SFD auf. Auf elektronenmikroskopischer Ebene konnte eine Desorganisation und Zerstörung des typischen fünf-schichtigen Aufbaus der BM aufgedeckt werden. Charakteristischerweise ist die zentrale elektronendichte, vermutlich aus

Elastin bestehende Schicht aufgelöst, und extrazelluläres Material fließt zwischen die basalen RPE-Mikrovilli. Zudem erscheint die Basalmembran des RPE aufgelöst. In Korrelation mit dem Phänotyp der heterozygoten Mutante, fanden sich Timp3- und Elastin-Moleküle verstärkt in den sub-RPE-Ablagerungen der betroffenen heterozygoten Mutanten, während die Immunreakтивität auf der Choriokapillaris zugewandten Seite der BM deutlich abnahm. Elastin *whole mount* Antikörperfärbungen präsentierten ausgeleiert erscheinende Fasergeflechte in *Timp3^{+/S156C}* Tieren. Durch quantitative Echtzeit-PCR- (qRT-PCR) Analysen konnten signifikante Hochregulationen von Elastin, LamininB2 sowie den Kollagenen I, IV, VI und XVIII in *S156C-Timp3* heterozygoten Mutanten nachgewiesen werden, die in tendenziell erhöhte Proteinmengen der untersuchten Strukturproteine der BM in diesen Tieren resultierten, wie durch immunohistochimische Untersuchungen gezeigt werden konnte. Zusammenfassend deuten die Daten auf eine direkte oder indirekte Interaktion des SFD-mutierten TIMP3-Moleküls mit den untersuchten Strukturproteinen hin. Dies lässt den Rückschluss zu, dass S156C-TIMP3 in der BM eine bisher nicht bekannte Funktion übernimmt (Funktionsgewinn-Mutation, *gain of function*), die für den Pathomechanismus der SFD von entscheidender Bedeutung ist. Die Einbringung der *S156C*-Mutation auf den Balb/C-Inzucht-Hintergrund führte zu atrophischen Veränderungen von Endothelzellen der Choriokapillaris von *Timp3^{+/S156C}* Mäusen, währenddessen die BM vollständig intakt erschien. Die Daten sprechen für ein Modell einer sich natürlich entwickelnden Neovaskularisation des Auges.

Elektronenmikroskopische Analysen der Glomeruli von CD1-*S156C knock-in* Mäusen, deren ultrastruktureller Aufbau deutliche Gemeinsamkeiten mit dem der BM aufweist, offenbarten distinkte Veränderungen der glomerulären Basalmembran (GBM) und Podozytenfortsätze (PDZF) in *Timp3^{+/S156C}* und *Timp3^{S156C/S156C}* mutierten Glomeruli im Kontrast zu Wildtyp-Nieren. Diese Pathologien zeigten deutliche Gemeinsamkeiten mit denen in *Timp3^{+/S156C}* Augen. Die PDZF der Niere wirkten geschrumpft und wiesen knotenartige, punktförmige intrazelluläre und membranständige Verdickungen auf. Auf biochemischer Ebene konnten jedoch keine Veränderungen der basalen Parameter der Nierentätigkeit festgestellt werden. Die Daten bestätigen im Mausmodell den erstmals 1989 von Duvall-Young *et al.* beschriebenen Zusammenhang zwischen humanen Nierenpathologien und Alters-abhängigen Veränderungen im Auge (Duvall-Young *et al.* 1989).

X-gebundene juvenile Retinoschisis (RS1) ist eine verbreitete Form einer Makuladegeneration bei Männern. RS1 ist durch zahnradförmige Makulopathie, periphere Schisis der Netzhaut und eine typische „negative“ b-Welle im Elektroretinogramm (ERG) charakterisiert. Die *Rs1h*-defiziente Maus zeigt charakteristische Veränderungen der Netzhaut, die typisch für die RS1 sind. Konsequenterweise stellt diese Mauslinie ein

exzellentes Modellsystem für die Analyse der frühen molekularen Ereignisse der RS1 dar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen der Hochregulation von Apoptose-induzierenden Genen vorausgeht und eine Mikroglia-/Makrophagen-Aktivierung den eigentlichen molekularen Mechanismus darstellt, der eine Apoptose-bedingte Photorezeptordegeneration in *Rs1h knock-out* Mäusen auslösen könnte. Analysen von *Rs1h^{y/y}/Egr1^{-/-}* und *Rs1h^{y/y}/Casp1^{-/-}* Doppel-*knock-out* Mäusen konnte nachweisen, dass eine *Egr1* Hochregulation keine Voraussetzung für die Makrophagen-Aktivierung oder Induktion der Apoptose darstellt. Ein direkter Einfluss des Caspase1-Genotyps auf die Apoptose in *Rs1h*-defizienten Tieren konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

Für die RS1 ist zurzeit keine therapeutische Medikation verfügbar. In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass in diesem *Rs1h*-defizienten Mausmodell die Verabreichung des humanen *RS1*-Gens (eine einmalige Injektion am postnatalen Tag 15, P15) über einen AAV-Vektor in den sub-retinalen Bereich betroffener Augen die Expression des *RS1*-Gens in den Photorezeptorzellen und Zellen der inneren Retina *Rs1h*-defizienter Augen den Wildtyp-Augen vergleichbar restauriert hat. Sechs Monate nach erfolgter Vektor-Applikation konnte die retinale Funktion durch eine Revertierung der „negativen“ b-Welle im ERG in den behandelten Augen wiederhergestellt werden. Zudem wurde die Morphologie und Integrität der Photorezeptorzellen in der Netzhaut durch den therapeutischen Eingriff aufrechterhalten, die ohne medizinische Intervention progressiv degenerieren würde.

Studien zur Langzeit-Effizienz dieses Gen-therapeutischen Ansatzes lieferten erstaunliche Resultate. Folgeuntersuchungen an 12 und 19 Monate alten Tieren zeigten einen zunehmenden Heilungseffekt über die Zeit im Vergleich zu den Resultaten zum Zeitpunkt 5 Monate nach der Injektion. In den behandelten Augen zeigte sich eine stabile Visusfunktion mit niedrigen normalen ERG-Niveaus über den gesamten Untersuchungszeitraum, während in den unbehandelten Augen eine graduelle Abnahme bis zur vollständigen Erblindung zum Zeitpunkt von 12 Monaten zu beobachten war. Morphologisch konnte in behandelten Augen nach 19 Monaten eine fast vollständige Erhaltung der retinalen Struktur und Integrität festgestellt werden, während die unbehandelten Augen schwerwiegende Degenerationen im Endstadium der Krankheit erkennen ließen.

Weiterhin wurde versucht, die Auswirkungen einer einzigen RS1-AAV-Injektion zu unterschiedlichen Stadien der RS1-Krankheitsprogression zu untersuchen. Mit Hilfe von ERG-Messungen konnten funktionelle Verbesserungen der behandelten *versus* nicht-behandelter Augen lediglich zu Injektionszeitpunkten an P15 und bei 1 bzw. 2 Monaten (PM1, PM2) nach der Geburt festgestellt werden. Zum sehr weit fortgeschrittenen

Degenerationszeitpunkt bei PM7 konnte die RS1-AAV-Injektion keinen im ERG ersichtlichen Heilungseffekt in den behandelten Augen erzeugen. Der funktionelle Heilungseffekt der bei PM0,5; PM1 und PM2 injizierten Augen wird von einer Erhaltung der retinalen Architektur und Morphologie begleitet, die in den behandelten Augen deutlich erhöht ist. Zusammenfassend liefert diese Studie weitere Sicherheit, dass ein AAV-vermittelter Generalsatz den Krankheitsverlauf der RS1 im *Rs1h*-defizienten Mausmodell positiv beeinflusst. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Heilungseffekt sogar dann noch zu erreichen ist, wenn der Krankheitsverlauf bereits fortgeschrittene Stadien erreicht hat. In künftigen Gentherapie-Ansätzen könnten menschliche RS1-Patienten von diesen Befunden profitieren, da eine Applikation dieser Therapie nicht auf die frühen Stadien des Krankheitsverlauf beschränkt zu sein scheint, sondern auch in Spätstadien ausreichend wirksam ist, den Krankheitsverlauf zu stoppen.

Die vorliegende Arbeit wurde von Prof. Dr. Bernhard Weber angleitet.

II. Einleitung

Aufgabe der Naturwissenschaft ist es nicht nur, die Erfahrung stets zu erweitern, sondern in diese Erfahrung eine Ordnung zu bringen.

Nils Bohr (1885 - 1962), dänischer Physiker

1. Dystrophien der zentralen Netzhaut

Erbliche Dystrophien der zentralen Netzhaut (Makula) sind degenerative Erkrankungen des Auges, die primäre Anomalien des RPE mit der sensorischen Netzhaut verbinden (Abb. 1). Diese Krankheitsbilder, deren Hauptmerkmal durch einen dramatischen, progressiven Verlust der Visusfunktion charakterisiert wird, sind die Hauptursache von Erblindungen in den Industrieländern und betreffen Individuen aller Altersstufen, insbesondere jedoch Personen in der gealterten Bevölkerung.

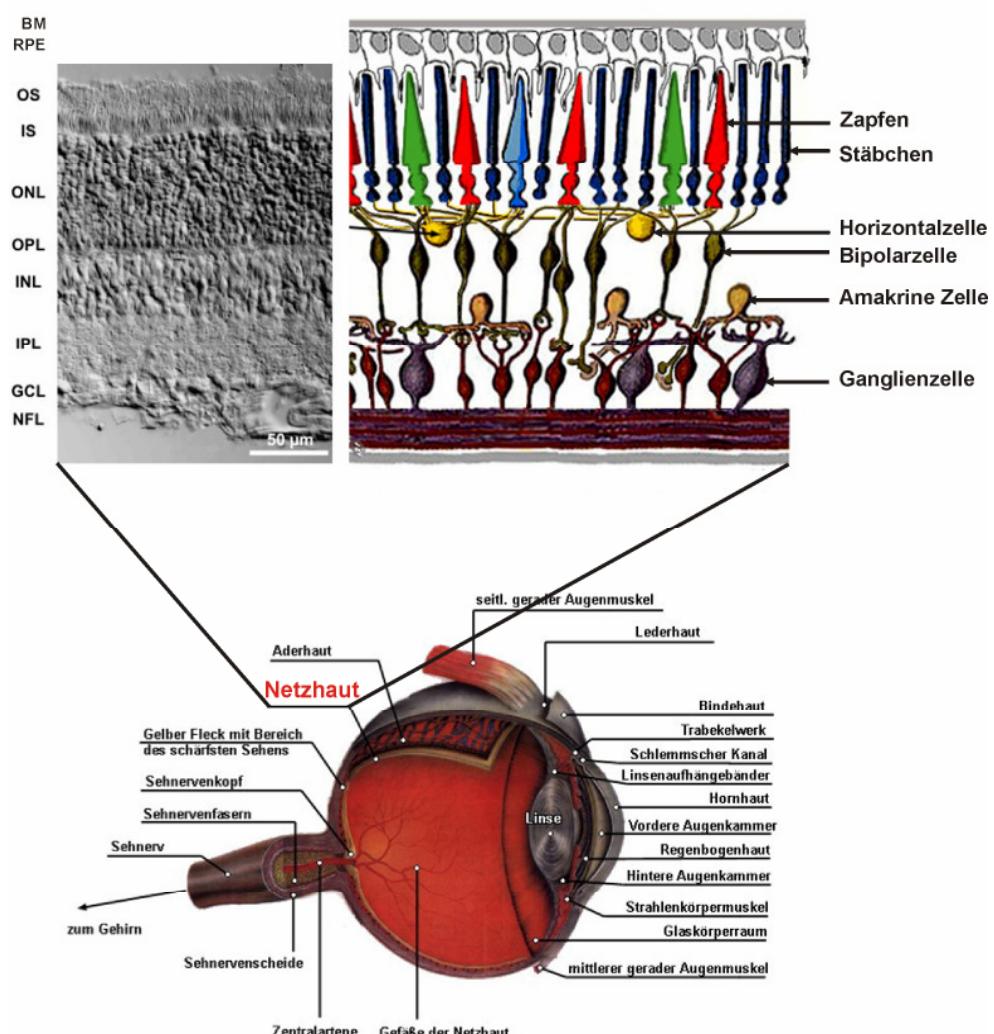


Abb. 1: Übersichtsdarstellung des menschlichen Auges mit einer detaillierten Abbildung der menschlichen Netzhaut. Dargestellt ist der hochkomplexe Aufbau des menschlichen Auges als sagittaler Querschnitt. Im Detail ist eine DIC Aufnahme der menschlichen Netzhaut (links) mit einer korrespondierenden schematischen Übersicht der einzelnen retinalen Schichten gegeben (rechts). BM, Bruchsche Membran; RPE, retinales Pigmentepithel; OS, äußere Photorezeptorsegmente; IS, Photorezeptorinnensegmente; ONL, äußere Kernschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere Kernschicht; IPL, innere plexiforme Schicht, GCL, Ganglienzellschicht; NFL, Nervenfaserschicht. (Abbildung verändert nach (www.doc.gold.ac.uk/.../Eye/cajal_retina560.jpg/www.acs.appstate.edu/.../simple_retina2.jpg)/www.blickpunkt.de/Das_Auge/auge_gut.jpg).

Die Inzidenz beträgt ca. 1 pro 1.000 Einwohner in Deutschland (Krumpaszyk *and* Klauß 1996). Insgesamt werden 10 % aller Erblindungsfälle von hereditären Netzhautdystrophien verursacht. Aufgrund des demographischen Wandels in der gegenwärtigen Gesellschaftsstruktur, den enormen psychischen Belastungen für die stetig wachsende Anzahl an betroffenen Patienten und einem immensen klinisch-pharmakologischem Interesse sind Makuladystrophien in den vergangenen 20 Jahren deutlich in das Blickfeld der internationalen wissenschaftlichen Forschung gerückt. Dystrophien der zentralen Retina umfassen Erkrankungen, die auf genetischer, klinischer, histologischer sowie pathophysiologischer Ebene heterogenen Ursprungs sind.

Monogene (durch eine einzige Genveränderung ausgelöste), meist relativ selten auftretende Degenerationen der Makula werden oftmals autosomal dominant vererbt wie z.B. die Sorsby Fundusdystrophie, North Carolina Makuladystrophie oder Morbus Best. Ausnahmen bilden in diesem Zusammenhang Morbus Stargardt in seiner typischen Form, verschiedene Formen der Retinitis Pigmentosa und die X-gebundene juvenile Retinoschisis, die nicht nur relativ häufig auftreten, sondern auch autosomal bzw. X-chromosomal gebunden rezessiv weitergegeben werden. In den letzten Jahren hat man mit der Identifizierung der zugrunde liegenden Gendefekte begonnen, die molekularen Grundlagen dieser Krankheitsbilder aufzuschlüsseln. Für einige dieser Netzhautpathologien bedeutete der Gewinn der neuen Informationen eine Bestätigung gewachsener Hypothesen zur Pathogenese, während die Identifizierung des ursächlichen Gens bei anderen Krankheiten eine größere Komplexität in die Beurteilung des Krankheitsprozesses eingebracht hat.

Zwei widersprüchliche Konzepte wurden durch diese genetischen Studien hervorgehoben. Viele Phänotypen, die bisher als unterschiedliche klinische Phänomene beschrieben wurden, konnten aufgrund eines gemeinsamen mutationsbedingten genetischen Ursprungs zusammengefasst werden, und gegensätzliche klinische Krankheitsbilder, die historisch bedingt den gleichen Namen erhalten haben, zeigten sich auf genetischer wie pathophysiologischer Ebene heterogen (Rozet *et al.* 2005). Ein besseres Verständnis des Ursache - Wirkungsverhältnisses spezifischer krankheitsauslösender Mutationen erleichtert es dem Kliniker jedoch enorm, geeignete therapeutische Maßnahmen zu ergreifen. Das wissenschaftliche Interesse an monogenen Netzhautdystrophien ist aber noch durch weitere Umstände begründet. Viele für monogene Makuladegenerationen charakteristische genetische Defekte werden oftmals als potentielle Suszeptibilitätsfaktoren der häufig auftretenden, multifaktoriellen altersabhängigen Makuladegenerationen (AMD) angesehen, auch wenn bisher nur für Morbus Stargardt typische ABCA4-Mutationen mit einer Minderheit der retinalen Komplikationen bei der AMD assoziiert werden konnten (Rivera *et al.* 2000). Dies ermöglicht Aussagen über den genetischen Anteil spezifischer Mutation an der

Manifestation typischer klinischer Merkmale von Abnormalitäten multifaktoriellen Ursprungs wie z.B. der AMD. Darüber hinaus teilen einige monogene Erkrankungen bedeutende phänotypische Gemeinsamkeiten mit der AMD (siehe Sorsby Fundusdystrophie). Molekulare wie biochemische Analysen der biologischen Auswirkungen der für monogene Augenerkrankungen spezifischen Mutationen erlauben daher Rückschlüsse auf die Pathomechanismen der verursachten Erkrankung als auch phänotypisch ähnlicher multifaktorieller Erkrankungen.

1.1 Sorsby Fundusdystrophie

Sorsby Fundusdystrophie (SFD, OMIM¹ 136900) ist eine seltene, hereditäre, degenerative Erkrankung der zentralen Netzhaut (Makula) wobei dieser Bereich normalerweise hoch aufgelöstes Scharf- und Farbensehen vermittelt. Die klinischen Symptome zeichnen sich durch frühzeitige Entwicklung mittiger bis peripherer Drusen, Farbsehdefizite und Nachtblindheit aus (Polkinghorne *et al.* 1989, Kalmus *et al.* 1976, Jacobson *et al.* 1995). Die Krankheit manifestiert sich grundsätzlich in der vierten bis sechsten Lebensdekade, verbunden mit einem rapiden Verlust des zentralen Sehens, gefolgt von einem progressiven Verlust der peripheren Visusfunktion, der letztlich zur Erblindung der betroffenen Patienten führt. In seiner Originalschrift spricht Sorsby von „Hämorrhagen und Exudaten, die sich in generelle choroidale Atrophie mit massiver Pigmentproliferation entwickeln“ (Sorsby *et al.* 1949).

Ein regulärer SFD-Befund findet sich in der abnormalen Deposition von Lipofuscin-ähnlichem Material im sub-RPE-Bereich und einer Verdickung der Bruchschen Membran (BM) (Capon *et al.* 1989, Chong *et al.* 2000). Mit zunehmenden Krankheitsverlauf treten gehäuft subretinale Neovaskularisation, eine in die Peripherie expandierende Atrophie des RPE und später folgende atrophische Veränderungen der Choriokapillaris auf (Abb. 2). Trotz der Seltenheit, mit der die autosomal dominant vererbte SFD auftritt, wurde dieser Makuladegeneration in den letzten Jahren sehr viel wissenschaftliches Interesse entgegengebracht, da die klinischen Symptome größtenteils mit denen der AMD übereinstimmen. AMD ist eine häufig auftretende retinale Dystrophie mit komplexem, multifaktoriellem Ursprung, die für den größten Teil der Erblindungen bei Augenerkrankungen mit spätem Krankheitsbeginn in den entwickelten Ländern verantwortlich ist (Klein *et al.* 1992, Patel *et al.* 2007). 1994 wurde es durch einen Kandidatengenansatz möglich, in Betroffenen von zwei nicht verwandten SFD-Familien,

¹ OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>

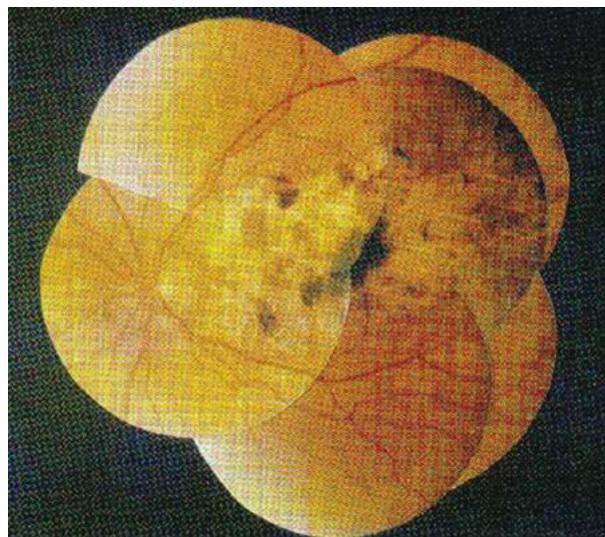


Abb. 2: Darstellung des Augenfundus eines SFD-Patienten. Typisches Fundusbild eines Patienten mit SFD, ungefähr 10 Jahre nach dem Verlust der zentralen Sehschärfe. Der Bereich der Makula zeigt disziforme Degeneration, Atrophie der Choriokapillaris und Hyperplasie des retinalen Pigmentepithels.

heterozygote Punktmutationen im Gewebsinhibitor der Metalloproteasen-3 (*tissue-inhibitor of metalloproteinases-3, TIMP3*) Gen als ursächlich für die Entwicklung der SFD zu identifizieren (Weber *et al.* 1994a). Gegenwärtig sind 11 unabhängige *TIMP3*-Mutationen in SFD-Patienten beschrieben, von denen 9 den C-terminalen Bereich des Proteins betreffen.

Die meisten *TIMP3*-Mutationen lokalisieren in Exon 5 oder betreffen diesen Bereich des Gens. Sie führen zu einer vorhergesagten Strukturveränderung in der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur von TIMP3 (Abb. 3).

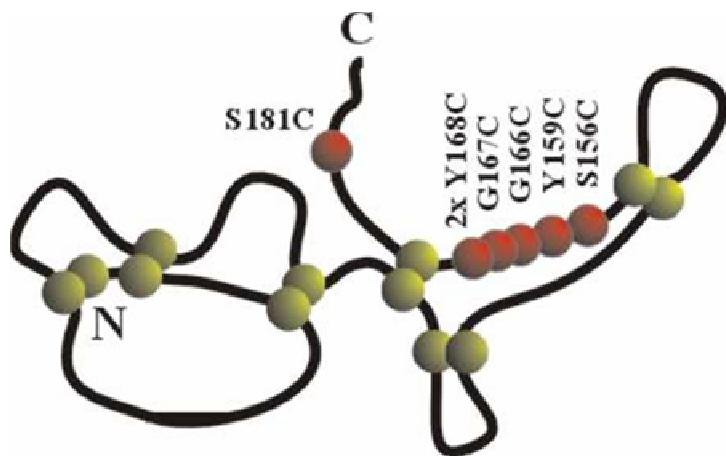


Abb. 3: Hypothetisches Modell von TIMP3 und relative Positionen der SFD-Mutationen. Die 12 Cysteinreste, die an der Bildung von 6 Disulfidbrücken beteiligt sind, sind durch die gelben Kreise dargestellt. Die roten Kreise stellen zusätzliche Cysteinreste in exemplarischen, mutierten TIMP3-Proteinen in betroffenen SFD-Patienten dar.

Sieben Mutationen führen jeweils ein zusätzliches, ungepaartes Cystein ein: S156C (Felbor *et al.* 1995), G166C (Felbor *et al.* 1997), G167C (Jacobson *et al.* 1995), Y168C (Felbor *et al.* 1996), S170C (Barbazetto *et al.* 2005), Y172C (Jacobson *et al.* 2002) und S181C (Weber *et*

et al. 1994b), während die achte Mutation (E139X, Exon1-Exon4) zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteintranslation führt (Langton et al. 2000). Die neunte Veränderung findet sich in der Akzeptor-Spleißsequenz des Intron4/Exon5-Übergangs und wurde in einer japanischen Familie mit einer sehr späten Form der SFD-Erkrankung identifiziert (Tabata et al. 1998). Die zehnte, erst kürzlich beschriebene H158R Mutation ist ebenfalls mit einem späten SFD-Krankheitsbeginn assoziiert. Sie führt auf bioinformatische Voraussagen beruhend zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinbiosynthese (Lin et al. 2006). Im Gegensatz zu den „klassischen“ SFD-Mutationen wird durch den Arginin- gegen Histidin-Austausch kein ungepaartes Cystein am C-Terminus von TIMP3 generiert.

Eine heterologe Expression von mutiertem TIMP3 in COS7 Zellen demonstriert, dass mindestens drei dieser Mutationen in der Synthese eines Proteins münden, dass die MMP-inhibitorische Aktivität beibehält und in der EZM lokalisiert. Sowohl die Vollängemutanten als auch die trunkierte Form (E139X) weisen einen typischen Proteinphänotyp mit einer starken Tendenz zur Bildung von höhermolekularen TIMP3-Proteinkomplexen auf, deren Natur und Auswirkungen auf die zellphysiologischen Vorgänge im Auge noch nicht hinreichend aufgeschlüsselt werden konnten, und deren pathogenetische Relevanz für die SFD bisher noch weitgehend unklar sind. Interessanterweise besitzt mutantes TIMP3 weiterhin MMP-inhibierende Aktivitäten (Langton et al. 1998 und 2000).

TIMP3 wurde ursprünglich als ein Protein mit einem molekularen Massegewicht von 21 kDa identifiziert, das in der Lage war, stark an das Zellsubstrat von kultivierten Fibroblasten des Hühnerembryos zu binden, die mit dem Rous Sarcoma Virus infiziert wurden (Blenis et al. 1983). Weitere Studien offenbarten komplexe und multifunktionale Eigenschaften für dieses Molekül. TIMP3 ist Mitglied einer Proteinfamilie, die exklusiv in der EZM lokalisiert, einer dynamischen fibrillären Struktur, die Zellen bzw. Zellverbände umschließt und Gerüst- wie Signaltransduktionsfunktionen ausübt. In der EZM formiert sich TIMP3 in nicht-kovalenten Komplexen mit zahlreichen sekretierten und Membran-Typ Matrix Metalloproteininasen (MMPs, z.B. MMP1, -2, -3, -9, MT1-MMP), einer umfangreichen Gruppe von Zink-abhängigen Endopeptidasen (Apte et al. 1995, Saunders et al. 2006). Strukturell und funktionell können die TIMPs (TIMP1 - 4) in ihre Amino- und Carboxy-terminalen Domänen unterteilt werden, die jeweils sechs Cysteinreste enthalten, welche wiederum drei Disulfidbrücken ausbilden. Die N-terminale Domäne enthält das hochkonservierte CXC - Motiv, das essentiell an der MMP-Inhibition beteiligt ist. Die N-terminale Domäne von TIMP3 bindet an das aktive Zentrum der MMPs und inhibiert über diesen Mechanismus die proteolytische MMP-Aktivität (Bond et al. 2000). Der C-Terminus vermittelt davon getrennte Funktionen, wie die Bindung an Pro-MMPs z.B. MMP2 und MMP9, um die entsprechenden Pro-Enzym-Vorstufen in ihre aktive Form zu überführen (Butler et al. 1999, Zhao et al. 2004)

und ist im Falle von TIMP3 für die kovalente Verankerung des Proteins in der EZM verantwortlich (Blenis *et al.* 1984). Der C-Terminus vermittelt darüber hinaus die Freisetzung von EZM-Komponenten und Signalmolekülen aus der EZM. Eine gesteuerte Koordination der lokalen MMP- und TIMP-Level ist entscheidend für normal ablaufende Umstrukturierungsprozesse in der EZM, die für die unterschiedlichsten physiologischen Prozesse wie der Embryonalentwicklung, dem Wundverschluss, der Angiogenese, der Apoptose, der Zellmigration und der Ovulation von besonderer Bedeutung sind. Als Konsequenz dieses empfindlichen Gleichgewichtsverhältnisses MMPs zu TIMPs liegen Störungen dieser Homöostase einer ganzen Reihe von Krankheiten zu Grunde wie z.B. der Arthritis, kardiovaskulären Erkrankungen und der Tumorinvasion. Während TIMP3 seine typische Domänenstruktur mit den übrigen Familienmitgliedern teilt, besitzt es den restlichen TIMP Molekülen gegenüber jedoch einige einzigartige Eigenschaften. Insbesondere etwa die Tatsache, dass TIMP3 mit der EZM über die Bindung an Glycosaminoglycane unlöslich verbunden ist (Yu *et al.* 2000). TIMP3 ist ein effizienter Inhibitor der Aggrecanasen und ein Inhibitor bestimmter ADAM (*a disintegrin and metalloprotease domain*) und ADAMTS (*a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif*) Proteininasen, welche an der Prozessierung mehrerer Typ 1 Membranprotein-Ektodomänen (z.B. Tumor-Nekrosisfaktor- α) beteiligt sind (Lambert *et al.* 2004). Die N-terminale Domäne alleine kann die Aktivitäten der Metalloproteinase-Inhibition vermitteln. Nennenswert ist in diesem Zusammenhang auch, dass eine Bindung von TIMP3 und ADAM17 (*alias TACE, TNF- α -cleaving enzyme*) die Abspaltung von TNF- α von seinem korrespondierenden Rezeptor verhindert und somit eine Rolle für TIMP3 bei inflammatorischen Vorgängen suggeriert (Amour *et al.* 1998).

Unlängst wurden Mäuse mit einer targetierten Deletion im *Timp3*-Gen generiert, um die Rolle dieses Proteins *in vivo* zu studieren. *Timp3*-defiziente Tiere entwickeln eine spontane Erweiterung der pulmonaren Luftwege, die durch einen verstärkten Kollagenabbau im peribronchiolaren Bereich begleitet wird (Leco *et al.* 2001). Zusätzlich deutet eine reduzierte Anzahl von Bronchiolen und erweiterten Gefäßen auf eine verminderte Morphogenese in der Bronchialverzweigung in der *Timp3 knock-out* Maus hin (Gill *et al.* 2003). Die Abwesenheit von *Timp3* in der Maus führt ebenfalls zu einer spontanen Erweiterung des linken Ventrikels im Herzen, kardiomyozytischer Hypertrophie und einer kontraktilen Dysfunktion, typische Probleme bei der humanen Form einer erweiterten Kardiomyopathie (Fedak *et al.* 2004). Von den pathologischen Veränderungen in der Lunge und im Herzen wird angenommen, dass sie durch einen erhöhten MMP-vermittelten Matrixabbau und eine unkontrollierte Spaltung des Zytokins TNF- α durch TACE in Abwesenheit von TIMP3 hervorgerufen werden. Erhöhte TNF- α Mengen in *Timp3*-defizienten Mäusen könnten zudem für die chronische Inflammation in der Leber sowie einer verminderten Leberrgeneration nach partieller Hepatektomie

verantwortlich sein (Mohammed *et al.* 2004). Eine verstärkte inflammatorische Antwort in Antigen-induzierter Arthritis ließe sich ebenfalls durch eine *Timp3*-Defizienz erklären (Mahmoodi *et al.* 2005). *Timp3*^{-/-} Mäuse wurden zudem dafür verwandt, die Rolle von TIMP3 bei der Tumorentstehung aufzuschlüsseln. Das Fehlen von *Timp3* im Stroma eines Maus-Wirtsorganismus unterstützte das Tumorwachstum aufgrund erhöhter angiogener Vorgänge, die extensive Gefäßweiterungen im Tumor auslösten (Cruz-Munoz *et al.* 2006a). Darüber hinaus weisen *Timp3*^{-/-} Mäuse eine erhöhte metastatische Kolonialisierung durch Tumorzellen auf (Cruz-Munoz *et al.* 2006b). Die Förderung der verschiedenen Stadien der Tumorentwicklung wurde dem Verlust der Protease-inhibierenden Wirkung von TIMP3 zugerechnet. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von rekombinantem TIMP3 in Krebszellen das Tumorwachstum *in vivo* unterdrückt, und dass die *TIMP3*-Genexpression durch eine Hypermethylierung des Promoters in unterschiedlichen menschlichen Tumoren reduziert wurde (Anand-Apte *et al.* 1996, Wild *et al.* 2003). Zusammenfassend deuten diese Befunde auf eine bedeutende, aber komplexe Rolle von TIMP3 im Zusammenhang mit der Entstehung und Progression von Krebs.

Eine der wenigen allgemein bekannten zellulären TIMP3-Aktivitäten, von denen man annimmt, dass sie unabhängig von der inhibitorischen Wirkung auf proteolytische Enzyme ausgeübt wird, besteht in der Fähigkeit, spezifisch an VEGFR2 *in vitro* zu binden, und somit eine ungehemmte Interaktion zwischen VEGFR2 und dem Hauptliganden VEGF zu unterbinden (Qi *et al.* 2003). Von dieser TIMP3-Eigenschaft wird angenommen, dass sie für eine Suppression der VEGF-vermittelten Angiogenese verantwortlich ist (Anand-Apte *et al.* 1997). Eine direkte Verbindung zwischen dem anti-angiogenen Effekt von TIMP3 sowie der Inhibition der VEGF/VEGFR2-Interaktion *in vivo*, benötigt in jedem Fall weitere Bestätigungen.

Das RPE im Bereich des äußeren Augenballs ist eine der wichtigsten Stellen endogener *TIMP3*-Expression (Della *et al.* 1996). Nach erfolgreicher Sekretion aus den RPE-Zellen akkumuliert TIMP3 in der BM, einem im Elektronenmikroskop aus fünf Lagen zu differenzierendem Band konnektiven EZM-Materials, welches zwischen dem RPE und der Choriokapillaris lokalisiert ist (Weber *et al.* 2002). An dieser Position wird TIMP3 als einer der entscheidenden Regulatoren bei physiologisch bedingten Re- und Umstrukturierungsprozessen der BM angenommen. Eine erhöhte Proteinmenge von TIMP3 wurde in abnormalen Depositionen extrazellulären Materials von humanen Spenderaugen nachgewiesen, die unter Sorsby Fundusdystrophie litten. In SFD-Patienten wuchsen neue, dünnwandige Blutgefäße häufig in den sub-retinalen Bereich des RPE (choroidale Neovaskularisation), die eine schwerwiegende Beschädigung der Makula und daraus

resultierend eine fortschreitende Erblindung der betroffenen Personen auslösten (Farris *et al.* 1998).

Die Fragestellungen dieser Arbeit zielen auf die Aufklärung der molekularen Pathologie der TIMP3-assoziierten Mutationen und beruhen auf der Analyse von Mausmodellen, die spezifische Mutationen im endogenen *Timp3* tragen. Unter Benutzung des Cre-loxP Systems wurden zwei Mauslinien, jeweils auf drei verschiedenen genetischen Hintergründen (C57BL/6, CD1-Albino und Balb/C-Albino), etabliert. Im Einzelnen handelt es sich hierbei um eine *Timp3*-defiziente Maus, sowie eine *knock-in* Mauslinie, die jeweils eine Missense-Mutation in dem zum Menschen orthologen Codon 156 von *Timp3* (S156C, S156M) trägt.

Zunächst sollte die phänotypische Charakterisierung der Mauslinien mit histologischen, immunohistochemischen und (elektronen)mikroskopischen Methoden im Vordergrund stehen. Dies sollte Hinweise auf funktionelle Gewebestörungen in Abhängigkeit vom *Timp3* Mutationsstatus erbringen, welche dann gezielt mittels molekulargenetischer, proteinbiochemischer und zellbiologischer Ansätze weiter untersucht werden sollten. Das *Timp3*-defiziente Mausmodell sollte dazu dienen, die Folgen eines vollständigen Funktionsverlusts (*loss-of-function*) von TIMP3 im Netzhaut-/Aderhautkomplex zu untersuchen. Es wird erwartet, dass diese Analysen Aufschluss über das gesamte Funktionsspektrum von TIMP3 in den Augengeweben ergeben. Hierbei ist unter anderem die Frage nach einer funktionellen Redundanz der TIMP3-Funktionen durch die weiteren Familienmitglieder TIMP1, 2 und 4 von Bedeutung. Die SFD-Maus (*Timp3-S156C*) sollte zunächst zeigen, ob phänotypisch vergleichbare Manifestationen, wie sie beim Menschen zu finden sind, auch im Nager beobachtet werden können. Von besonderem Interesse hierbei sind Veränderungen in der EZM der BM, die als ursächlich für die letztlich visusmindernden sekundären Komplikationen beim Menschen (Neovaskularisation, Atrophie des Aderhaut/RPE/Netzhautkomplexes) angesehen werden.

1.2 X-gebundene juvenile Retinoschisis

X-gebundene juvenile Retinoschisis (RS1, OMIM 312700) ist eine der häufiger vererbten, rezessiven retinalen Störungen, die die Funktion der Makula in betroffenen männlichen Individuen angreift. Sie wurde erstmals 1898 vom Österreichischen Ophthalmologen Jürgen Haas in zwei erkrankten Brüdern beschrieben (Haas J. 1898). Die Prävalenz dieser Erkrankung liegt in einer geschätzten Spanne von 1:5.000 bis 1:20.000 (George *et al.* 1995). Der Name Retinoschisis leitet sich ursprünglich von einer internen Aufspaltung der Netzhaut (Schisis der Retina) ab, die hauptsächlich die temporale Peripherie des Augenfundus betrifft. Dieses Merkmal ist allerdings in weniger als 50% der RS1-Patienten zu finden. Die

hauptsächlichen klinischen Manifestationen präsentieren sich in einer limitierten Aufsplittung der inneren Netzhaut im Bereich der Nervenfasern der Ganglienzellschicht (GCL), die zu einer zystischen Degeneration der Makula Region in der zentralen Netzhaut führt (Abb. 4). Die peripheren Bereiche des Auges können ebenfalls betroffen sein (Yanoff *et al.* 1968, Manschot *et al.* 1972, Condon *et al.* 1986, Kirsch *et al.* 1996).

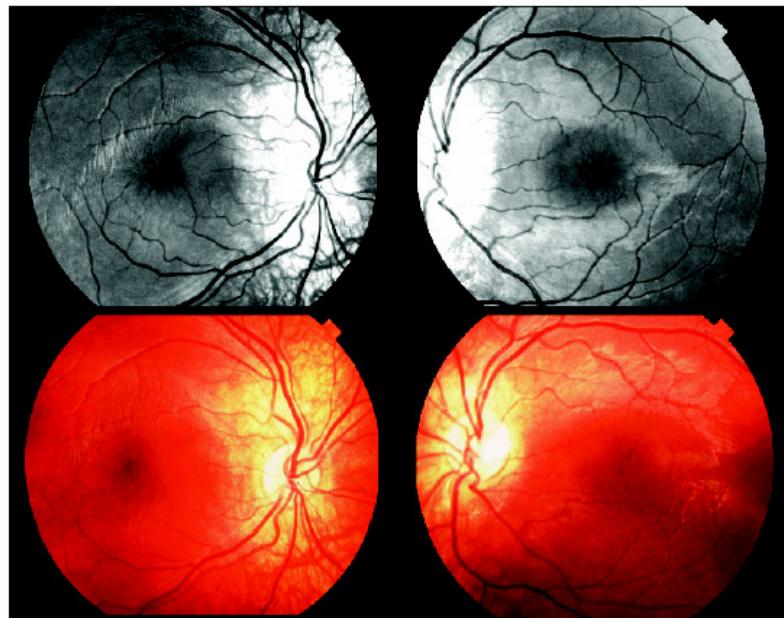


Abb. 4: Fundusaufnahme eines Patienten mit den typischen Manifestationen einer RS1. Infrarot (obere Hälfte) und normale Fundusaufnahmen im Bereich der Makula eines RS Patienten. Die radial zystischen Läsionen der Makula sind in den Infrarot-Aufnahmen deutlicher zu erkennen (Abbildung entnommen aus Sikkink *et al.* 2006).

In jüngerer Zeit konnten Optische Kohärenztomographieuntersuchungen (*ocular coherence tomography*, OCT) aufdecken, dass die intra-retinale Aufsplittung bei RS1 alle Schichten der Netzhaut betreffen kann und nicht ausschließlich auf den Bereich der Nervenbündel der GCL beschränkt ist (Prenner *et al.* 2006, Minami *et al.* 2005). Obwohl diese Form der pathologischen Veränderung in fast allen betroffenen Männern, die jünger als 30 Jahre alt sind, vorkommt, verhalten sich die unterschiedlichen Ausprägungsformen in der Fovea oft sehr diskret und werden insbesondere bei jungen Kindern auch von erfahrenen Ärzten mitunter übersehen (Sieving *et al.* 1989).

Eines der bedeutendsten Merkmale der RS1 präsentiert sich in einer stark verminderten, sogenannten „negativen“ b-Welle bei relativ unveränderter a-Welle im ERG (Peachey *et al.* 1987). Ein breiter Lichtblitz erzeugt typischerweise eine „negative“ Antwort in der krankhaft veränderten Netzhaut, in der die a-Welle stärker ausgeprägt ist als die b-Welle, genau umgekehrt wie in der gesunden Retina (Abb. 5). Gewöhnlicherweise zeigen die Lichtadaptierten Reizantworten ebenfalls eine Reduktion in der Ausprägung der Amplitude. Der Ursprung der retinalen Dysfunktion ist eine Abnormalität in den ON- und OFF-Signalwegen

auf der Ebene der Bipolarzellen (Khan *et al.* 2001). Viele Störungen der Netzhaut können mit einem „negativen“ ERG verbunden sein, bei jungen männlichen Individuen ist die einzige Differentialdiagnose jedoch kongenitale stationäre Nachtblindheit (CSNB), wobei eine Kombination von Veränderungen der Makula mit einem „negativen“ ERG auf RS1 hindeutet.

Die unverminderte a-Welle spricht für eine Erhaltung der elektrophysiologische Antworten im Zapfen-Stäbchen Photorezeptorsystem, während die reduzierte b-Welle einen Verlust der Bipolarzell-Aktivität andeutet (Robson *et al.* 1998). Obwohl die Ausbildung des Phänotyps konsistent ist, ist der Schweregrad dieser Erkrankung hoch variabel, sogar innerhalb einer Familie. Diagnostiziert wird RS1 ungefähr zu dem Zeitpunkt, an dem die Patienten das schulfähige Alter erreichen, einige schwerwiegende Fälle mit Nystagmus und bilateralen vesikulären Schisisbereichen der Netzhaut wurden allerdings schon bei der Geburt beobachtet.

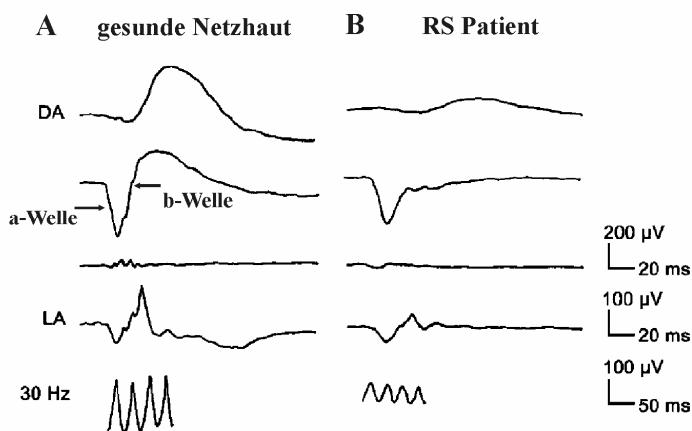


Abb. 5: Ganzfeld-ERG. Gezeigt werden drei Reizantworten bei Dunkel-Adaption (DA), bei geringen Stimulusintensitäten (erste Linie), hohen Stimulusintensitäten (zweite Reihe) und mit speziellen Filtern für oszillatorische Potentiale (dritte Reihe) bei normalen, gesunden Individuen (**A**) und exemplarisch für einen RS1 Patienten (**B**). Zusätzlich wird eine Einzelblitz-Antwort (vierte Reihe) bei Licht-Adaption (LA) und eine 30 Hz Flickerantwort (fünfte Reihe) aufgezeigt. Die Antwort in der zweiten Reihe zeigt eine starke Reduktion der Amplitude der b-Welle im RS1 Patienten (sogenanntes „negatives“ ERG). Die Zapfen-abhängigen Antworten bei Licht Adaption und 30 Hz Flicker sind ebenfalls reduziert. (Abbildung modifiziert nach Weber und Kellner, aus *Ophthalmology Research: Retinal Degenerations: Biology, Diagnostics and Therapeutics*, Humana Press Inc., Totowa, N.).

Das klassische Verständnis der humanen Form der RS1 geht von einem relativ stationären Zustand aus, gepaart mit einer minimalen altersabhängigen Progression der klinischen Veränderungen der Netzhaut. RS1 präsentiert typischerweise eine moderate Ausprägung der Krankheit im Kindesalter, verschlechtert sich zunehmend in den Teenager Jahren und manifestiert sich endgültig im Erwachsenenalter (George *et al.* 1995, Roesch *et al.* 1998). Der klinische Krankheitsverlauf ist relativ mild, verbunden mit einer eher geringen Abnahme der Sehfähigkeit. Von sehr schwerwiegenden Formen betroffene Personen können aber demgegenüber bereits bei der Geburt erblindet sein (Kellner *et al.* 1990). Ungefähr zu dem

Zeitpunkt, an dem die Patienten das 40. bis 50. Lebensjahr erreichen, entwickeln sich die Schisisbereiche in der Makula zurück, aber meist tritt damit verbunden eine Atrophie der Makula auf, die eine zusätzliche Beeinträchtigung der Visusfunktion bedingt. In fortgeschrittenem Stadium treten häufig sekundäre Komplikationen wie Hämorrhagien des Glaskörpers, eine Ablösung der Netzhaut vom RPE und neovaskuläre Glaukomformationen auf (Roesch *et al.* 1998). Die Häufigkeit sekundärer Probleme beträgt ungefähr 5 % in allen betroffenen Männern, wobei die Komplikationen sich meist im ersten Lebensjahrzehnt entwickeln. Extraokuläre Manifestationen sind für die RS1 bisher noch nicht beschrieben worden.

Der zugrunde liegende Gendefekt bei RS1 konnte bereits 1983 auf den kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp22) kartiert werden (Wieacker *et al.* 1983). Dies führte über einen positionellen Klonierungsansatz 1997 schließlich zur Isolierung des Krankheitsgenes und kodiert für ein Netzhaut-spezifisches 24 kDa großes Polypeptid, welches Retinoschisin (RS1) genannt wird. Der *RS1*-Genlokus umspannt 32,4 kb genomicscher DNA und ist in 6 Exons organisiert. Die N-terminale Proteindomäne enthält charakteristische Motive für die extrazelluläre Sekretion von RS1 (Sauer *et al.* 1997). Eine signifikante Homologie besteht zwischen einem großen Teil der vorausgesagten RS1-Sequenz und der sogenannten Discoidin-Domäne, die den Hauptteil der RS1-Sequenz ausmacht. Die Discoidin-Domäne wurde erstmals im Discoidin 1-Protein des Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* identifiziert (Poole *et al.* 1981). Dieses Motiv ist in einer ganzen Reihe von sekretierten sowie membranständigen Proteinen in unterschiedlichen eukaryotischen Spezies konserviert und bekanntermaßen an zellulären Vorgängen wie zellulärer Adhäsion, zellulärer Signalleitung und neuronaler Entwicklung beteiligt (Wood *et al.* 1984, Kawakami *et al.* 1995, Baumgartner *et al.* 1996). Zwei kleinere Teile des RS1-Proteins sind einzigartig und besitzen keinerlei Homologien zu anderen bekannten Proteinen. In N-terminaler Richtung zur Discoidin-Domäne befindet sich eine 38 Aminosäure große RS1-spezifische Sequenz, weitere 5 einzigartige Aminosäurereste flankieren die Discoidin-Domäne auf der C-terminalen Seite. Bisher konnten keine funktionalen Eigenschaften dieser zwei RS1-spezifischen Proteindomänen identifiziert werden, sie könnten aber bei strukturellen Aspekten während des Zusammenbaus der Proteinuntereinheiten und der Komplexformation beteiligt sein (Wu *et al.* und 2005).

Bis heute sind über 130 individuelle krankheitsbezogene Mutationen im Retinoschisin-Gen bei RS1-Patienten der unterschiedlichsten genealogischen Ursprünge wie z.B. Großbritannien, China, Kolumbien, Dänemark, Finnland, Deutschland etc. beschrieben (The Retinoschisis Consortium 1998, Gehrig *et al.* 1999, Yu *et al.* 2001, Mendoza-Londono *et al.* 1999 etc.) Eine detailliert Übersicht über die krankheitsverursachenden Mutationen findet

sich in der RS1-Mutationsdatenbank (<http://www.dmd.nl/rs/index.html>). Überwiegend treten Missense-Mutationen auf, die in den Exons 4 - 6 gehäuft sind und für die Discoidin-Domäne kodieren, obwohl auch Deletionen, Insertionen, Spleißmutationen und Verschiebungen des Leserahmens bekannt sind. Die Daten suggerieren, dass ein Fehlen von RS1 oder ein Verlust der Proteinfunktion die molekularen Hauptursachen darstellen, die dem Pathomechanismus der RS1 zugrunde liegen. Insbesondere die Discoidin-Domäne scheint überaus entscheidende Bedeutung für die Funktionalität des RS1-Proteins zu besitzen, die stark auf der korrekten Anordnung der Aminosäurebausteine der Polypeptidkette beruht. *In vitro* Studien an genetisch veränderten RS1-Proteinen, die RS1-charakteristische Missense-Mutationen trugen, führten zu einem Modellansatz, nachdem 3 unterschiedliche Szenarien auf molekularer Ebene denkbar sind, die zur Manifestation von RS1 führen (Wang *et al.* 2002, Wu *and* Molday, Wu *et al.* 2005). Zum einen könnten pathologische Missense-Mutationen in der Discoidin-Domäne die Synthese falsch gefalteter Proteine auslösen, die konsequenterweise im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten und abgebaut werden. Zweitens könnten die missense Mutationen, wenn sie nicht mit der Proteinsekretion interferieren den durch Disulfid-Brücken bedingten Zusammenbau der einzelnen Proteinuntereinheiten stören, so dass kein funktionsfähiger oligomerer RS1-Proteinkomplex gebildet wird. Drittens könnten die Missense-Mutationen in der Leader Sequenz des RS1-Proteins den gerichteten Proteineinbau in die ER-Membran verhindern, eine zelluläre Misslokalisierung und fehlerhafte Sekretion von RS1 auslösen. Die Hypothesen korrelieren mit der Tatsache, dass der RS1-Schweregrad nicht allein durch spezifische Mutationen im *RS1*-Gen festgelegt wird. (Eksandh *et al.* 2000, Hewitt *et al.* 2005, Pimenides *et al.* 2005). Dies suggeriert, dass auch weitere Faktoren wie Umwelteinflüsse oder Gen-Modifizierungsmechanismen die Stärke der Krankheitsausprägung beeinflussen (Iannaccone *et al.* 2004).

Die *RS1*-Expression ist Netzhaut-spezifisch, Gentranskripte wurden in den inneren Segmenten der Photorezeptorzellen, den Bipolarzellen, den Amakrinen Zellen und den retinalen Ganglienzellen gefunden (Reid *et al.* 1999, Grayson *et al.* 2000, Takada *et al.* 2004). RS1 wird als oligomerer Proteinkomplex, der durch die Ausbildung von Disulfid-Brücken zusammengehalten und von beiden Photorezeptorzelltypen, Stäbchen wie Zapfen als auch den Bipolarzellen exprimiert und sekretiert (Reid *et al.* 1999, Molday *et al.* 2001). In der murinen Netzhaut beginnt die *RS1*-Expression um P1 und erreicht sein Maximum zwischen P5 und P7. Dieses Expressionslevel wird dann das ganze Leben über aufrechterhalten und deutet darauf hin, dass eine konstitutive *de novo* Synthese von RS1 stattfindet, die essentiell für die Aufrechterhaltung der Integrität der Netzhaut benötigt wird (Abb. 6A). Immunhistochemische Färbungen mit unterschiedlichen mono- und polyklonalen Antikörpern gegen RS1 in der Säugernetzhaut konnten aufdecken, dass RS1 vorwiegend in

den Membranen der Photorezeptorinnensegmente und den Bipolarzellen lokalisiert, eine Färbung findet sich jedoch auch in den zwei plexiformen Schichten der Netzhaut (Abb. 6B) (Molday *et al.* 2001).

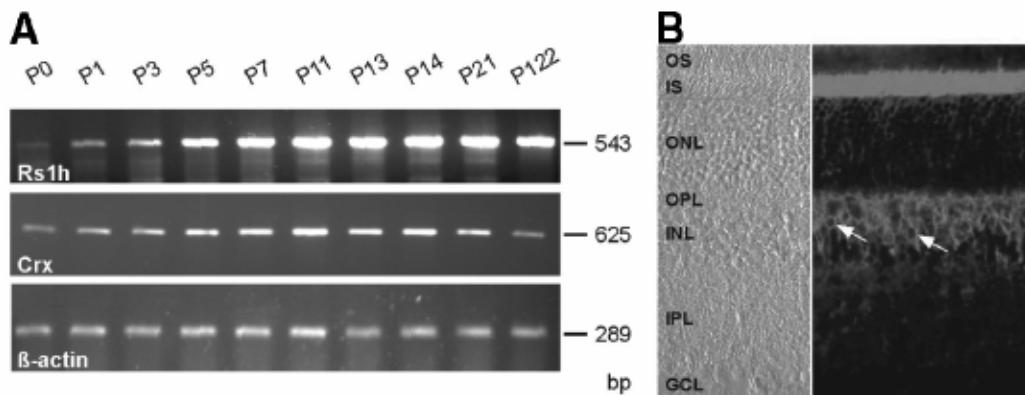


Abb. 6: Expressionsanalyse des murinen *RS1*-Homolog *Rs1h*. (A) RT-PCR-Analyse von *Rs1h* im Vergleich zu *Crx* (Zapfen-Stäbchen Homöobox-enthaltendes Gen) und β -Actin als Kontrolle für die Integrität der DNA. Die *Rs1h*-Expression beginnt an P0, erreicht ihr Maximum bei P5 und wird auf diesem Level lebenslang aufrechterhalten. Im Gegensatz dazu nimmt die *Crx*-Expression entwicklungsbedingt bis zu einem Maximum an P11 langsam zu und nimmt anschließend wieder ab, so dass nur geringe Mengen im Erwachsenenalter exprimiert werden. (B) Immunohistochimische Lokalisation von *Rs1h* in der murinen Retina. Ein starkes Signal findet sich in den inneren Segmenten der Photorezeptoren und um die Bipolarzellen (Pfeile). Die beiden plexiformen Schichten sind ebenfalls schwach gefärbt. OS, äußere Photorezeptorsegmente; IS, Photorezeptorinnensegmente; ONL, äußere Kernschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere Kernschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglionzellschicht. (Abbildung aus Weber und Kellner, *Ophthalmology Research: Retinal Degenerations: Biology, Diagnostics and Therapeutics*, Humana Press Inc., Totowa, NJ).

Zur Aufdeckung der biologischen Funktionen von RS1 wurde in dieser Arbeitsgruppe eine Mauslinie mit einer targetierten Unterbrechung des *Rs1h*-Gens dem Homolog des humanen *RS1*-Gens generiert. Exon 3 des murinen *Rs1h* wurde bei Beibehaltung des Leserahmens durch eine *LacZ/Neo* Kassette unterbrochen, was zu einem Abbruch der Proteinsynthese führt (Weber *et al.* 2002). Die *Rs1h knock-out* Maus scheint ein exzellentes Krankheitsmodell für die humane RS1 darzustellen, da der Krankheitsverlauf in der *Rs1h*-defizienten Maus deutliche Gemeinsamkeiten mit der Pathogenese der humanen RS1 aufweist. Hemizygote männliche Mäuse weisen z.B. ebenfalls ein charakteristisches „negatives“ ERG und eine starke Disorganisation der retinalen Architektur auf. Schwerwiegende Schisisbereiche treten in der inneren Kernschicht an der Grenze zur äußeren plexiformen Schicht (OPL) auf (Abb. 7B). Diese Abnormalitäten werden von einem massiven Absterben der Photorezeptorzellen begleitet. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese Degenerationen auf apoptotische Prozesse zurückzuführen sind, die ihren Höhepunkt an P18 erreichen (Gehrige *et al.* 2006). Die Aufsplittung der INL in der *Rs1h*-defizienten Maus stimmt nicht mit dem klassischen Befund der humanen RS1-Pathologie überein, die durch eine Aufsplittung der Netzhaut zwischen der inneren limitierenden Membran (ILM) und der Schicht der Nervenfasern

beschrieben wurde (George *et al.* 1995, Condon *et al.* 1986). Unabhängig vom diesem Umstand existieren histopathologische Daten eines 19 Jahre alten RS1-Patienten mit einer eher generellen Desorganisation der retinalen Schichten mit einer Aufsplittung in den Bereichen der IPL und OPL (Mooy *et al.* 2002).

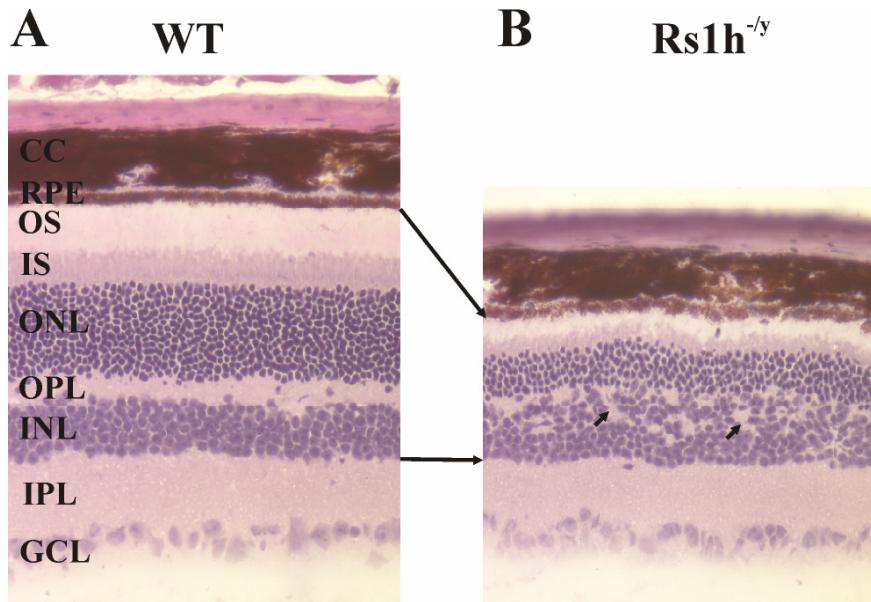


Abb. 7: Hämatoxilin/Eosin Übersichtsfärbung der Wildtyp und *Rs1h*-defizienten Netzhaut. Retinale Kryoschnitte von 12 Monate alten Wildtyp (A) und *Rs1h*-defizienten Mäusen (B) wurden mit Hämatoxilin und Eosin gefärbt. In der *Rs1h*^{-/-} Netzhaut findet sich eine auffällige Reduktion der Photorezeptorzellkörper in der ONL sowie Disorganisation und Zellverschiebungen, vorwiegend die OPL und INL (Pfeile) betreffend. Die äußeren wie inneren Photorezeptorsegmente sind deutlich in der knock-out Maus verkürzt. Die Histologie der IPL und GCL erscheint durchweg normal. OS, äußere Photorezeptorsegmente; IS, Photorezeptorinnensegmente; ONL, äußere Kernschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere Kernschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht.

Zusätzlich zu dem in dieser Arbeitsgruppe generierten Mausmodell für die humane RS1 existieren zwei weitere, unabhängig generierte Tiermodelle für diese Erkrankung. Zeng und Kollegen ersetzten Exon 1 und 1,6 kb von Intron 1 durch eine *Neo'* Kassette, um eine zweite *Rs1h*-defiziente Linie zu erhalten (Zeng *et al.* 2004). Jüngst wurde vom *Tennessee Mouse Genome Consortium* ein Mausstamm (44TNJ) mit einer T nach C Substitution in Exon 2 von *Rs1h* produziert. Dies führt zur Expression von Wildtyp-*Rs1h* und zwei trunkierten Proteinen innerhalb einer Maus (Jablonski *et al.* 2005). Auch diese beiden Mausmodelle weisen morphologisch wie funktionell ähnliche Gemeinsamkeiten zur humanen RS1 wie der Bildung Zysten-ähnlicher Strukturen und aufgesplittete Bereiche der inneren Retina sowie ein „negatives“ ERG auf. Auf Grund der Tatsache, dass die RS1-Pathologie als eine Konsequenz des Fehlens eines funktionellen RS1-Proteins auftritt, bietet die *Rs1h*-defiziente Maus vielversprechende Möglichkeiten einer therapeutischen Intervention. Insbesondere das Einbringen des normalen *RS1*-Genprodukts in die Netzhaut im Rahmen einer Gentherapie könnte eine bedeutende, wirkungsvolle Option für die RS1 darstellen.

III. Material und Methoden

Was tun? Sprach Zeus.

Friedrich von Schiller (1759 - 1805),
deutscher Dichter

1. Grundsätzliche Methoden der Mikrobiologie

Für die Kultivierung von Bakterien (*Escherichia coli*), der Herstellung von elektrokompetenten Zellen (*E.coli* Stämme DH5α) und die Inkorporation von Plasmid DNA in *E.coli* DH5α-Zellen finden die bei Sambrock *et al.* beschriebenen Standard Methoden für das mikrobiologische Arbeiten Anwendung (Sambrock *et al.* 1989). Von neu hergestellten Plasmiden werden kryokonservierungsfähige Bakterienstocks hergestellt. Zur Kryokonservierung und Dauerlagerung bei -80°C werden den LB Bakterienkulturen 15 % (v/v) Glycerin hinzugefügt (LB Medium: 10g Bakto-Trypton, 5g Bakto-Hefe Extrakt, 10g NaCl; ddH₂O ad 1L).

2. DNA-spezifische molekularbiologische Methoden

2.1 DNA Extraktion

2.1.1 Extraktion aus Maus Gewebe

Zur Überprüfung einer korrekten Genotypisierung der für das experimentelle Arbeiten verwendeten Mäuse wird genomische DNA aus den Schwanzspitzen der Maus isoliert. Die DNA wird aus frisch entnommenem als auch in flüssigem Stickstoff eingefrorenem und bei -80°C gelagertem Gewebe gewonnen. Das verwendete Gewebe wird in 1 Vol Laird's Lysis Puffer (0,2 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl, pH 8,3; 5 mM Na₂EDTA, pH 8,0) 0,1 Vol SDS (20 %) und 0,1 Vol Proteinase K aufgenommen und bei 65°C über Nacht auf einem Rundschüttler inkubiert. Anschließend werden die unverdauten Zellreste abzentrifugiert (13.000 rcf, 10 min, RT). Der Überstand wird in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt. Die DNA wird bei 13.000 rcf für 10 min bei RT pelletiert und zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, 10 bis 20 min luftgetrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen HPLC-H₂O gelöst.

2.1.2 Extraktion von Plasmid-DNA

Bakterielle Plasmid DNA wird aus in LB Medium (zuzüglich geeigneter Antibiotika) über Nacht bei 37°C im Inkubationsschüttler kultivierten Bakterienkulturen isoliert. Zur Extraktion der Plasmid DNA werden kommerzielle *kits* verwendet, die auf der bei Sambrock *et al.* 1989 beschriebenen Methode der alkalischen Lyse beruhen. Das grundlegende Prinzip dieser *kits* beruht auf Zentrifugationssäulen mit einer hohen DNA-Bindungsaffinität, die die zeitaufwendigen Phenol/Chloroform- und Ethanol-Präzipitationsprotokolle ersetzen. Abhängig von dem Volumen der Übernachtkulturen wird die Plasmid DNA durch Mini-

Präparationen, „minipreps“ aus 1 - 5 ml gesättigter *E. coli* Kultur (Nucleospin®Plasmid, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) isoliert. „Midipreps“ ermöglichen eine Plasmid Extraktion aus ca. 100 ml Kulturen und „maxipreps“ ermöglichen die Bearbeitung von mehr als 100 ml Bakterienkulturen mit *high copy* Plasmid DNA (QIfilter™Plasmid Midi/Maxi, Qiagen, Hilden, Deutschland).

2.2 Quantifizierung von DNA

Quantitative und qualitative DNA Analysen werden mit Hilfe der Agarose Gelelektrophorese durchgeführt. Abhängig von der ungefähren Größe der zu erwartenden doppelsträngigen DNA (dsDNA) Fragmente werden Agarose Gele mit einer Endkonzentration von 0,6 % - 2 % Agarose in 1x TBE (89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM Na₂EDTA) gebraucht. Während 1 %ige Agarose Gele grundsätzlich zur Auf trennung eines relativ breiten Spektrums an dsDNA Fragmenten benutzt werden, werden 0,6 %ige Gele genutzt, um Fragmentgrößen von 2 kb und mehr aufzutrennen. Höherprozentige Gele ab 2 % aufwärts benutzt man zur Auf trennung von kleinen dsDNA Fragmenten unter 2 kb. dsDNA wird elektrophoretisch bei ca. 140 - 180 V für 30 min aufgetrennt und durch Ethidiumbromid Interkalation in die DNA unter UV Bestrahlung visualisiert. Die 1 kb Plus DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wird zur akkurate Masse- sowie Größenabschätzung verwendet. Alternativ wird die DNA mit Hilfe des NanoPhotometers (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) gemessen.

2.3 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten

Die Restriktionsenzyme werden von New England Biolabs (New England Biolabs, NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) kommerziell erworben. Ein typischer Restriktionsverdau beinhaltet Plasmid DNA, 1x Puffer bereitgestellt von der Firma und das Restriktionsenzym der Wahl. Als Faustregel wird davon ausgegangen, dass 1 Unit Enzym ungefähr 1 µg DNA in 1 Stunde schneidet. Abhängig von Typ und Qualität der DNA werden Restriktionsansätze zwischen 1 h (Plasmid DNA) und 12 h (genomische DNA) bei 37°C (oder optionalen Temperaturen, vom Hersteller vorgeschlagen) inkubiert.

2.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine Standard PCR-Reaktion wird in einem Volumen von 25 µl in 1x Puffer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 1,0 mM MgCl₂; 0,01 % Gelatine) mit ca. 100 ng Template DNA; 0,4 µM vorwärts und rückwärts Primern (Metabion, Martinsried, Deutschland; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland); 1 U *Taq* Polymerase und 2,5 mM dNTPs (Peqlab, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Die Proben werden für 33 Zyklen durch PCR

amplifiziert, wobei jeder Zyklus aus einem Denaturierungsschritt für 30 sec bei 94°C, einem Anlagerungsschritt (annealing) bei gegebener Anlagerungstemperatur für 30 sec und einem Verlängerungsschritt (elongation) für 30 sec bei 72°C besteht. Eine Beschreibung aller vorwärts- und rückwärts-Primer findet sich in Tabelle1. Die Oligonucleotid-spezifische Anlagerungstemperatur wird empirisch kalkuliert (Anlagerungstemperatur = [(2 x (A + T) + 4 x (C + G)) - 2°C] und experimentell abgeglichen. Modifizierungen dieses Standard Protokolls umfassen Änderungen in der Mg²⁺ Konzentration (1,0 mM oder 1,5 mM) und die Zugabe von 4 % Formamid.

Tab.1 Primersequenzen für RT-PCR-Amplifikationen

Name	Sequenz (5'- 3' Richtung)	Produkte (bp)	Verwendungszweck
tmp3ex3F	TTCAGTAAGATGCCCAACG	634; (3F + 4R)	
tmp3ex4R	TACATCTTGCCTTCATACACG	2530; 209 (3F +	
pGKneoR	ATGTGGAATGTGTGCGAGG	neoR)	Genotypisierung TIMP3-Defizienz
TIMP3_KI_F2	CAGTAGACACTCAATGGGAGC	470, 550	Genotypisierung TIMP3-S156C knock-in Mutation
TIMP3_KI_R	CAACTCCATAGACAGCACAGAC		
rsc3F	CGAGGACCCCTGGTAYCARAA		
lacZR2	GCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGT	200; 260	Genotypisierung <i>Rs1/h</i> -Defizienz
RS1-KO-F1	TGTGACTTGTGCTCCTCTGG		
Rs1-AAV-F	GTCAAAGCTTGTCTTCTATGGCAACTCGGA	500	Klonierung
Rs1-AAV-R	ATCGTCTAGACACTGCATTCTAGTTGGGT		
M13F	CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC	ca. 500	Sequenzierungen von PCR Produkten
M13R	AGCGGATAACAATTTCACACAGGA		
mATPase-RT-F	CAGCAGATTTAGCAGGTGAA	100	Überprüfung cDNA Synthese
mATPase-RT-R	CTGCCAGCTTATCAGCCTT		

Die Elongationszeit von Amplikons von 1 kb und weniger beträgt grundsätzlich 30 sec, bei größeren PCR Produkten wird die Elongationszeit um 1 min pro 1 kb zusätzlich erhöht. Insbesondere wird für das Klonieren von PCR Produkten genauere mit „proof-reading“-Aktivität versehene *Taq* Polymerase mit zusätzlicher 3'- 5' Exonuklease-Aktivität (Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

2.5 Direktes Sequenzieren von PCR-Produkten

Vor der *cycle sequencing* Reaktion werden die amplifizierten PCR-Produkte mit Shrimp Alkalischer Phosphatase und Exonuclease I (USB, Cleveland, USA) behandelt, um einzelsträngige DNA (ssDNA) und nicht eingebaute dNTPs aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Alternativ werden die PCR-Produkte durch Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Gelextractions-kit (Nucleospin® Extract. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt. Die Fluoreszenzmarkierung der DNA wird in 24 Zyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt (30 sec, 96°C) und einem Anlagerungs- und Elongationsschritt (4 min, 60°C) mit dem BigDye terminator kit (Applied

Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und den entsprechenden vorwärts und rückwärts Primern durchgeführt. Nach einer Ethanolpräzipitation mit 0,1 Vol 3 M NaOAc (pH 4.6) und 2,5 Vol 100 % Ethanol werden die Sequenzierprodukte mit einem automatischen Kapillarsequenzer (31xl Genetic Analyser, Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) analysiert und mit der dazugehörigen Software (Data Collecting Software v3.0) evaluiert.

2.6 Klonierung von PCR-Produkten

2.6.1 Klonierung mit T- Überhang

Wird die *Taq*-Polymerase bei der PCR-Amplifikation benutzt, hängt das Enzym ein überzähliges Adenin an das Ende des replizierten Moleküls. Um einen Vorteil aus dieser Ungenauigkeit zu ziehen, können vorbereitete Vektoren mit T-Überhängen die Ligation solcher PCR-Produkte erheblich erleichtern. Mit Hilfe des *kits* von Promega (pGEM®- T vector, Mannheim, Deutschland) wurden die amplifizierten T-Überhang PCR-Produkte (< 2 kb) direkt in den entsprechenden T-Überhang Vektor ligiert und in DH5alpha elektrokompetente *E.coli* Zellen transformiert.

2.6.2 Klonierung durch das Einführen neuer Restriktionsstellen

Es ist möglich, an jeder Seite der PCR-Produkte neue Restriktionsstellen während der PCR-Amplifikation einzuführen. Um dies zu erreichen, werden Oligonucleotid Primer entwickelt, die die template-spezifische Sequenz, als auch eine zusätzliche, für die gewünschten Restriktionsenzyme spezifische Sequenz an ihrem 5'- Enden beinhalten. Für gewöhnlich werden zwei verschiedene Restriktionsenzyme verwendet, um eine gerichtete Insertion der PCR-Produkte in den vorgesehenen Vektor zu ermöglichen. Nach erfolgter Amplifikation wird das PCR-Produkt mit den relevanten Restriktionsenzymen verdaut, um cohäsive, überhängende (*sticky*) oder gerade (*blunt*) Enden zu generieren (siehe 2.3). Der Vektor wird mit den gleichen Enzymen geschnitten. Zur Gewährleistung der Ligation des Vektors mit den Inserts, und um eine Ligation des Vektors mit sich selbst zu vermeiden, werden die linearisierten Vektorenden dephosphoryliert und gleich darauf in elektrokompetente *E.coli* DH5alpha Zellen transformiert. Tabelle 1 zeigt die für eine auf Restriktionsstellen basierende Klonierung mit den korrespondierenden Vektoren benutzten Oligonucleotid-Primer.

2.6.3 Vektor-Modifikationen

In den meisten Fällen werden die Vektoren dephosphoryliert, um eine Ligation mit sich selbst zu verhindern. Dieser Schritt ist wichtig, wenn nur ein einziges Enzym für eine nicht gerichtete Klonierung verwendet wird. In einem Endvolumen von 100 µl werden 88 µl vollständig linearisierte Vektor DNA (ca. 10 µg); 10 µl 10x Shrimp Alkalische Phosphatase

Puffer und 2 µl Shrimp Alkalische Phosphatase (USB, Cleveland, USA) gemischt und 2 h bei 37°C inkubiert. Vor der Ligation (siehe 2.6.4) werden die verwendeten Enzyme und Puffer mit dem Nucleospin®Extract kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) entfernt.

2.6.4 Ligation von PCR-Produkten

Der Ligationsansatz (1:3 Ratio von Vektor und Insert DNA Template; 1µl T4 Ligase; 1x Ligations-Puffer) (NEB, Frankfurt a. M., Deutschland) wird bei 14°C - 16°C in einem Endvolumen von 10 µl über Nacht inkubiert. Anschließend werden 1 µl Ligationsprodukt in elektrokompetente *E.coli* DH5alpha Zellen transformiert.

3. RNA spezifische Methoden

3.1 Präparation von Gesamt-RNA

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen werden bei allen Arbeiten mit RNA die bei Sambrock *et al.* beschriebenen Arbeitsregeln eingehalten (Sambrock *et al.* 1989). Zur Isolierung von RNA eignet sich Gewebe, welches frisch entnommen wurde oder unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert wurde.

Gesamt-RNA wird aus a) choroidalem Gewebe der Augen von *Timp3-S156C knock-in* Mäusen, b) der Netzhäute einer *Rsh1*-AAV-injizierten Maus isoliert. Im ersten Fall erfolgt eine Analyse der RNA durch RT-PCR und quantitative Echt-RT-PCR. Im Fall b) wird die RNA für ein Northern Blot Experiment verwendet. Bei der Isolierung von Gesamt-RNA aus murinem Gewebe wird grundsätzlich die Standard Guanidin Isothiocyanat Methode (Peqlab, Erlangen, Deutschland) angewandt. Dem Protokoll des Herstellers folgend werden die Gewebe bzw. Zellen zuerst in peqGold RNAPure™ aufgenommen und homogenisiert. Die RNA wird durch Chloroform Fällung und anschließender Präzipitation mit 0,7 % Volumen Isopropanol von Proteinverunreinigungen durch Zentrifugation getrennt. Im Anschluss daran werden die RNA Pellets mit 70 % Ethanol gewaschen und in RNase freiem H₂O resuspendiert. Eine Überprüfung der qualitativen als auch quantitativen Ausbeute der RNA Isolierung erfolgt durch Gel Elektrophorese in einem Formaldehyd enthaltenden 1,2 %igen Agarosegel sowie durch Messung der RNA mit Hilfe des NanoPhotometers (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA).

3.2 cDNA-Synthese

Die Erststrang „first strand“ cDNA Synthese wird durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) Superscript™ (Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland) katalysiert. In einem Syntheseansatz von 20 µl Endvolumen werden 500 ng Gesamt-RNA (~ 5 µg), 1 µl oligo(dT)₁₂

18 primer (0,5 µg), 1 µl dNTPs (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM GTP, 10 mM dTTP), 9 µl RNase freies H₂O, 4 µl 5x Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl DTT (0,1 M) und 1 µl Superscript™ II (200 U) gemischt.

Der AP primer, 5'GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTT, wird als oligo(dT)₁₂₋₁₈ verwendet. Zunächst wird eine Mischung aus Gesamt-RNA, H₂O, Primer sowie dNTPs für zwei Minuten bei 70°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend werden die noch fehlenden Komponenten (5x Reaktionspuffer, DTT und Superscript™ II) hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wird für 50 min bei 42°C inkubiert. Durch Inkubation des Reaktionsansatzes für weitere 15 min bei 70°C wird die Synthesereaktion durch Inaktivierung des RT Enzyms gestoppt. Fertig synthetisierte Erststrang cDNA wird bei -20°C gelagert. Wiederholte Auftau- und Einfrierzyklen werden so gut wie möglich minimiert.

3.3 Reverse-Transcriptase-(RT)-PCR

Für RT PCR Experimente wurde eine Standard PCR (siehe 2.4) mit first strand cDNA als Template und verschiedenen vorwärts und rückwärts Primern (Tab. 1) durchgeführt.

3.4 RNA *in situ* Hybridisierung an Kryoschnitten

3.4.1 Herstellung und Markierung der RNA-Sonde

Für die Herstellung von RNA-Sonden müssen die zu analysierenden Sequenzen bzw. Gene in Plasmidvektoren mit RNA-Polymerase-Bindungsstellen (T3-, T7-, oder SP6-Promotoren) kloniert werden. Durch die Sequenzierung der Klonierungstellen wird die Orientierung der klonierten DNA bestimmt. Die Synthese der Hybridisierungssonde (*antisense*) und der komplementären (*sense*) Negativkontrolle erfolgt von entgegengesetzt angeordneten RNA-Polymerase Bindungsstellen.

3.4.2 Linearisierung der Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wird unmittelbar neben der Klonierungsstelle linearisiert. Dies beschränkt die anschließende *in vitro*-Transkription auf die klonierte Sequenz (*run-off*-Transkript). In einem 100 µl Restriktionsansatz werden je 1 µg Plasmid-DNA mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten und anschließend durch PCI-Extraktion gereinigt. Zum Fällen werden 3 Vol EthOH und 0,1 Vol 2 M NH₄OAc zugegeben und bei 13.000 rcf, 25 min, RT abzentrifugiert. Die so gefällte DNA wird in 70 % EtOH gewaschen, kurz angetrocknet und in 16 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Linearisierung werden 3 µl auf einem Agarose-Gel aufgetrennt.

3.4.3 Markierung der RNA-Sonde durch *in vitro*-Transkription

Die Sondenmarkierung erfolgt durch den Einbau von Digoxigenin (DIG)-markiertem dUTP während der Transkriptionsreaktion. Dazu wird der DIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet. Das Protokoll folgt den Anweisungen des Herstellers. Jeweils 11,5 µl vollständig linearisierte DNA; 2 µl 10x Transkriptionspuffer; 2 µl DIG RNA Markierungs-Mix; 0,5 µl RNase-Inhibitor und 2 µl der entsprechenden RNA Polymerase (T3, T7 oder SP6) werden 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 2 µl DNase I (RNase-frei) zugegeben, und der Ansatz wird erneut für 25 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt die Fällung der RNA-Sonde für 30 min bei -80°C mit 2 µl 2M Na₂EDTA, pH 8,0; 2,4 µl 4 M LiCl und 75 µl EtOH. Die gefällte Sonde wird abzentrifugiert (13.000 rcf, 15 min, 4°C), mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 95 µl DEPC-H₂O gelöst. 5 µl werden auf ein Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen, um die Integrität der RNA-Probe zu überprüfen. Der restliche Ansatz wird mit 10 Vol Hybridisierungslösung (50 % Formamid (deionisiert); 1,3x SSC; 5 mM Na₂EDTA; 0,5 % CHAPS; 100 µg/ml Heparin; 0,2 % Tween®20) versetzt und bei -20°C gelagert.

3.4.4 Dot blot

Diese Methode dient der Überprüfung des DIG-dUTP Einbaus sowie einer Konzentrationsabschätzung der RNA-Sonde. Das Protokoll folgt den Herstellerangaben des DIG-Labeling Kit Mix (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland). Von der RNA-Sonde wird eine Verdünnungsreihe mit 6 Verdünnungsstufen hergestellt. Ausgangskonzentration sind 2 µl RNA-Sonde in 38 µl Verdünnungspuffer (Hybridisierungslösung). Diese Ausgangslösung wird weitere 5 mal 1:10 in Verdünnungspuffer verdünnt. Jeweils 1 µl der RNA-Verdünnungsstufen werden auf eine mit 2x SSC (10x SSC: 1,5 mM NaCl; 150 mM Na-Citrat) aktivierte Nylon Hybond N⁺ Membran (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg, Deutschland) aufgetragen. Die RNA wird durch UV-Bestrahlung auf die Membran kreuzvernetzt. Die Membran wird für 1 min bei RT in MABT (11,6 g Maleinsäure; 8,75 g NaCl ad 500 ml H₂O; 0,1 % Tween®20, pH 7,5) inkubiert, anschließend 30 min in Block-Reagenz (1 %) in MAB (11,6 g Maleinsäure; 8,75 g Na₂Cl ad 500 ml H₂O) blockiert. Es erfolgt eine Inkubation mit dem anti-DIG Antikörper 1:5000 in 1 % Block-Reagenz in MAB. Die Membran wird zunächst zweimal 15 min in MABT, dann einmal 2 min in NTM (10 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; 100 mM Tris-HCl, pH 9,5) gewaschen. Danach werden die Membranen in der Färbelösung C 200 µl NBT/BCIP-Lösung, 10 ml NTMT und 2 mM Levamisol) 15 - 20 min unter Lichtausschluss inkubiert, bis sich ein lilafarbener Niederschlag gebildet hat.

3.4.5 Hybridisierungsreaktion

Die nachfolgenden Schritte werden, soweit nicht anders angegeben bei RT, in RNase-freien Lösungen in handelsüblichen Glasfärbekästen durchgeführt. Die Kryoschnitte werden aufgetaut, luftgetrocknet, zweimal 5 min in 1x PBS rehydriert und anschließend 30 min mit 4 % PFA/PBS fixiert, zweimal 5 min mit 1x PBS gewaschen und 10 min mit 10 µg/ml Proteinase K behandelt. Nach 5 min Waschen mit 1x PBS wird erneut 30 min mit 4 % PFA/PBS fixiert, zweimal je 5 min mit 1x PBS, zweimal je 5 min mit 2x SSC und zweimal je 15 min mit Tris/Glycin-Puffer gewaschen. Anschließend werden die Objektträger in Quadriperm®-Kästen (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) gelegt, je Objektträger 60 µl denaturierte RNA-Probe mit 100 µg/ml tRNA auf die Schnitte pipettiert und mit Parafilm abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgt in einer mit 5x SSC gesättigten Kunststoffdose im Wasserbad bei 70°C über Nacht. Die Schnitte werden anschließend dreimal für 20 min mit 5x SSC bei RT und einmal für 40 min mit vorgewärmtem 0,5x SSC/20 % Formamid bei 60°C gewaschen. Letztere Waschlösung wird gewechselt und auf 37°C abgekühlt, bevor die Schnitte nacheinander für 15 min bei 37°C mit NTE (500 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 5 mM Na₂EDTA), 30 min bei 37°C mit 10 µg/ml RNase A in NTE und 15 min bei 37°C mit NTE inkubiert werden. Nach erneutem Waschen für 30 min bei 60°C in 0,5 %SSC/ 20 % Formamid und 30 min in 2x SSC bei RT werden die Schnitte 1 h mit 1 % Block-Reagenz in MABT bei RT vorhybridisiert. Der anti-Digoxigenin Antikörper wird 1:5000 in MABT verdünnt, und die Schnitte werden mit dem anti-Digoxigenin Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wird viermal für je 10 min und einmal für 40 min mit TBST (80 g NaCl; 20 g KCl; 250 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5 ad 1 L H₂O; 0,1 % Tween®20), zweimal für je 10 min mit NTMT (10 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; 100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 % Tween®20) und 10 min mit NTMT/ 2 mM Levamisol gewaschen. Die Schnitte werden in der Färbelösung (200 µl NBT/BCIP-Lösung (aus dem DIG-Labeling Kit), 10 ml NTMT und 2 mM Levamisol) eine Stunde bis mehrere Tage unter Lichtausschluss inkubiert, bis sich ein lilafarbener Niederschlag gebildet hat. Anschließend werden die Schnitte zweimal für 15 min mit NTMT und einmal 10 min mit 1x PBS gewaschen und in Kaisers Glyceringelatine (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingebettet.

3.5 Northern Blot

Die RNA-Proben (isoliert von den Netzhäuten der *Rsh1*-AAV injizierten Maus #1488) werden elektrophoretisch in einem 1,2 % Formaldehyd-Agarose-Gel bei 50 - 70 V für 3 h aufgetrennt. Zur Herstellung der Gel-Lösung sowie als Laufpuffer wurde MOPS Puffer (10x (N-Morpholino)-Propansulfonsäure, MOPS): 0,2 M MOPS; 50 mM NaOAc, 10 mM Na₂EDTA; pH 7,0) verwendet. 2 µl Gesamt-RNA und 18 ml Ladepuffer (1x MOPS; 50 % Formamid; 18,5 % Formaldehyd; 0,04 % Bromphenolblau; 10 µg Ethidiumbromid) werden gemischt und 10 min

bei 65°C denaturiert. Um die Größe der RNA-Proben abzuschätzen, werden 3 µl eines RNA-Standards (Promega, Mannheim, Deutschland) zusätzlich aufs Gel aufgetragen. Die Integrität der RNA wird auf dem UV Schirm überprüft. Intakte, nicht degradierte RNA präsentiert sich als Schmier zwischen zwei intensiven, distinkten Banden der 28S und 18S ribosomalen RNA bei 4,8 und 1,9 kb. Die RNA-Proben werden anschließend über Nacht auf eine Nylon Hybond N⁺ Membran (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg, Deutschland) übertragen. Dies geschieht durch nach oben gerichtete Kapillarkräfte in 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat; pH 7,0). Nach erfolgreicher Übertragung der RNA-Proben auf die Nylon Membran wird die RNA durch Inkubation bei 120°C für 30 min im Trockenschrank auf der Membran kreuzvernetzt. Der Nachweis der entsprechenden RNAs erfolgte mit Hilfe der DIG RNA-Färbelösung (*DIG RNA Labeling Mix*, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland). Zunächst wird die Membran in 5 ml Hybridisierungslösung (siehe 3.4.5) 3 h bei 65°C geblockt. Der Block-Lösung wird anschließend 1 ml 1:10 verdünnte DIG-markierte RNA-Probe zugegeben und die Proben über Nacht bei 65°C hybridisiert (mind. 15 h). Die Membranen werden in 2 x SSC/0,1% SDS 10 min bei RT gewaschen, es folgen zwei weitere Waschschritte mit 0,2 x SSC/0,1% SDS für 20 min bei 65°C. Danach werden die Membranen in der Färbelösung (200 µl NBT/BCIP-Lösung (Roche), 10 ml NTMT und 2 mM Levamisol) einige Stunden unter Lichtausschluss inkubiert, bis sich ein lilafarbener Niederschlag gebildet hat.

3.6 Quantitative Echtzeit-RT-PCR (qRT-PCR)

Alle Genexpressionsanalysen werden mit *Universal ProbeLibrary assays* (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland) auf dem *iCycler iQ™ Real Time PCR Detection System* (Bio-Rad, München, Deutschland) in einem 25 µl Reaktionsansatz in 96 well Platten durchgeführt. Die für jede PCR Reaktion spezifische Roche-Sonde ist FAM490 markiert. Für jeden 25 µl PCR-Ansatz werden 5 µl cDNA Template (1:10 verdünnt), je 2,5 µl vorwärts und rückwärts Primer (12,5 pMol); 2,5 µl 10x TEMPase PufferII PCR-Puffer (Tris-HCl pH 8,7; balanciertes KCl/(NH₄)₂SO₄; 15 mM MgCl₂; 1 % Tween® 20); 0,25 µl TEMPase Hot Start Polymerase; 25 mM MgCl₂ (beides Ampliqon, Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland); 0,25 µl Sonde (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland); 2,5 µl dNTPs (1 mM, Peqlab, Erlangen, Deutschland) und 6,5 µl HPLC-H₂O gemischt. Das analysierte cDNA Panel wird aus 24 verschiedenen Mausgeweben durch Gesamt-RNA Isolierung (siehe 3.1) mit anschließender cDNA Synthese (siehe 3.2) generiert. Pro Genotyp Wildtyp, *Timp3-S156C* heterozygot, *Timp3-S156C* homozygot und *Timp3*-defizient werden von jeweils von drei Tieren beide Augen getrennt als eigenständige cDNA behandelt. Jede PCR-Reaktion wird im Triplikat mit den 6 unterschiedlichen cDNAs des gleichen Maus-Genotyps durchgeführt. Geeignete Oligonucleotid-Primer werden mit den NCBI Nucleotide mRNA-Sequenzen

(www.NCBI.com) und der *Probe Finder Software* (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland) für Exon/Intron überspannende Primer entwickelt und von den Firmen Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland) und Metabion GmbH (Martinsried, Deutschland) hergestellt (Tabelle 2). Zur Amplifikation und Detektion der PCR-Produkte wird auf dem iCycler™ ein optimiertes Programm erstellt. Nach einem initialen Denaturierungsschritt für 15 min bei 95°C erfolgt das Binden der Primer an die Template cDNA bei 94°C für 20 sec und die Elongation der Amplifikate in 42 Zyklen je 1 min bei 60°C. Die Detektion der Fluoreszenz, „plate read“ genannt, erfolgt nach jedem Elongationsschritt.

Tab. 2 Primersequenzen für quantitative Echtzeit -PCR (qRT-PCR)-Amplifikationen

Gen	Primerpaar	Sequenz (5'- 3')	Effizienz (slope)	Sonde (Roche)
mTimp1	mTimp1-RT-S-F mTimp1-RT-S-R2	CAGCGTTATAAGATCAAGATGAAGAT CTGGGACTTGTGGGCATATC	-3,379	#110
mTimp2	mTimp2-RT-S-F mTimp2-RT-S-R2	GGAATCCACCTCCTTCAG GGAATCCACCTCCTTCAG	-3,354	#21
mTimp3	Timp3-Ex3/4-RT-S-F2 Timp3-Ex3/4-RT-S-R2	GCCTCAAGCTAGAAGTCACAAA TGTACATCTGCCCTCATACAG	-3,753	#62
mTimp4	mTimp4-RT-S-F3 mTimp4-RT-S-R3	ATTCAAGTATGTCTACACGCCATT TTTCCATCACTGAGAACATCGA	-3,869	#103
mMMP2	mMMP2-RT-S-F2 mMMP2-RT-S-R2	GGAGAAGGCTGTGTTCTCG GCATCTACTTGCTGGACATCAG	-3,887	#64
mMMP9	mMMP9-RT-S-F3 mMMP9-RT-S-R3	CGACATAGACGGCATCCAG CTGTCGGCTGTGGTTCACT	-3,29	#77
mMMP14	mMMP14-RT-S-F mMMP14-RT-S-R2	CCCAAGGCAGCAACTTCA CCCTGGAGGTAGGTAGCCATA	-3,242	#71
mElastin	mEln-RT-S-F mEln-RT-S-R	CTGGTGTTGGTGGCATCC GCTGCAGCTGGTGACACA	-3,626	#81
mFibronectin	mFn1-RT-S-F1 mFn1-RT-S-R1	TCGGTGATTGTGTCAGGACT TGTCACTGTGTCCTTGAGAGC	-2,271	#49
mLamininB2	mLamB2-RT-F1 mLamB2-RT-R1	AGGCCGCTCAGGATAAGC AGTGCACGCTCGTTCTCC	-3,776	#17
mFibrillin	mFbn1-RT-F2 mFbn1-RT-R2	CGGAGGGCTATAGGTGTAGCTG TGCACTCAGGCACACTATTT	-4,293	#67
mProcollagen1	mCol1a1-RT-F1 mCol1a1-RT-R1	GGAGATGATGGGAAAGCTG AATCCACGAGCACCCCTGA	3,241	#79
mProcollagen4	mCol4a1-RT-F1 mCol4a1-RT-R1	GGGAGACCCAGGATTCCA TCCCATATCTCCCTTGAACC	-3,767	#80
mProcollagen6	mCol6a1-RT-F1 mCol6a1-RT-R1	GACATCCAGGGCTCAAAG GGTGTGAGCACGAAGAATAG	-2,975	#97
mProcollagen18	mCol18a1-RT-F1 mCol18a1-RT-R1	CCATCGTCAACCTGAAGG GGAGGCCAGAAAACAGGGAGT	-3,154	#33
mATPase (HHG)	Mm_ATPase_For Mm_ATPase_Rev	GGCACAAATGCAGGAAGG TCAGCAGGCACATAGATAGCC	-3,972	#77
mRpl4 (HHG)	Mm_RPL4_For2 Mm_RPL4_Rev2	AAGGTTGAAGGTTACAAGAAGACC GATGAGCTGTATGGCACTTGG	-3,290	#38
mSDHA (HHG)	Mm_SDHA_For2 Mm_SDHA_Rev2	AGAAGCCGTTGGGAAAC AACAGGTCTGTACTCCAAAGTAACC	-3,202	#69

Bei der Elongation wird die „gequenchte“ Sonde abgebaut, und Fluoreszenz proportional zur neu gebildeten DNA emittiert. Nach der PCR-Amplifikation werden die Proben auf 15°C gekühlt. Alle qRT-PCR-Expressionsdaten werden gegen die Expression von Haushaltsgenen (*house keeping genes*, HHGs) abgeglichen. HHGs sollten in allen Geweben eine nahezu identische Expression zeigen. Zur Bestimmung der HHGs, die im Gewebepanel am stabilsten exprimiert werden, und der optimalen Anzahl an HHGs für die Normalisierung wurde das geNorm-Programm von Vandesompele herangezogen. Die Auswahl der entsprechenden HHGs wurden nach Empfehlungen von Vandesompele getroffen und beinhaltet HHGs aus unterschiedlichen funktionellen Klassen mit unterschiedlichen Expressionsniveaus (Vandesompele *et al.* 2002).

Das von Muller und Kollegen entwickelte Q-Gene Programm (Muller *et al.* 2002), ein Excel®-basierendes Makro wird für die Abschätzung der PCR-Effizienz ($E = 10^{(-1/\text{slope})}$) sowie zur Normalisierung der relativen Genexpression (MNE) nach folgender mathematischer Grundlage verwendet:

$$\frac{(E_{\text{target}})^{\text{CT(target well 1)}}}{(E_{\text{ref}})^{\text{CT(ref well 1)}}} + \frac{(E_{\text{target}})^{\text{CT(target well 2)}}}{(E_{\text{ref}})^{\text{CT(ref well 2)}}} + \frac{(E_{\text{target}})^{\text{CT(target well 3)}}}{(E_{\text{ref}})^{\text{CT(ref well 3)}}}$$

MNE = $\frac{1}{3}$

4. Tiere und Tierhaltung

Als Ausgangsmaterial dienen Gewebe von verschiedenen Mauslinien (Charles River Laboratories) (Tab. 3). Alle Tiere werden unter standardisierten Bedingungen in einer klimatisierten Umgebung bei ca. 63 % Luftfeuchte in einem 12 h hell-dunkel Rhythmus bei 20°C - 22°C mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Während der Hellphase wird der Tierstall mit ca. 15 Lux beleuchtet. Der gesundheitliche Zustand der Tiere wird regelmäßig kontrolliert, und alle Prozeduren werden strikt nach dem „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“ durchgeführt. Die Tiere werden durch CO₂-Asphyxiation und anschließende zervikale Dislokation getötet. Alternativ werden die Tiere durch Perfusionsfixation getötet. Die Tiere werden mit 0,9 % NaCl-Lösung + 300 IE Heparin/kg Körprgewicht perfundiert und anschließend 4% PFA in 1% PBS perfusionsfixiert. Die gewünschten Gewebe werden präpariert und mit den unten beschriebenen Methoden weiter verarbeitet. Zur Überprüfung des korrekten Genotyps werden die Versuchstiere der *Timp3*- und *Rs1h*- Mauslinien vor Versuchsbeginn mittels RT-PCR-Amplifikationen genotypisiert.

Tab. 3 Genetische Charakteristika der verwendeten Mauslinien

Name der Maus-Linie	Gen	genetische Veränderung	genetischer Hintergrund
<i>Timp3</i> ^{-/-}	<i>Timp3</i>	<i>knock-out</i>	C57BL/6
<i>Timp3</i> ^{-/-}	<i>Timp3</i>	<i>knock-out</i>	CD1
<i>Timp3</i> ^{S156C/S156C}	<i>Timp3</i>	<i>knock-in</i>	CD1
<i>Timp3</i> ^{S156C/S156C}	<i>Timp3</i>	<i>knock-in</i>	Balb/C
<i>Rs1h</i> ^{-y}	<i>Rs1h</i>	<i>knock-out</i>	C57BL/6
<i>Rs1h</i> ^{-y} - AAV	<i>Rs1h</i>	<i>knock-out,-AAV-mOP500-hRS1</i>	C57BL/6
<i>Rs1h</i> ^{-y} / <i>Egr1</i> ^{-/-}	<i>Rs1h / Egr1</i>	Doppel <i>knock-out</i>	C57BL/6
<i>Rs1h</i> ^{-y} / <i>Casp1</i> ^{-/-}	<i>Rs1h / Casp1</i>	Doppel <i>knock-out</i>	C57BL/6

Die Typisierung der *Timp3-S156C knock-in* Linie erfolgt mit den Primern TIMP3_KI_F2 und TIMP3_KI_R (Tab. 1). Die erwarteten Produkte betragen für *Timp3*^{+/+} Tiere 470 bp und für *Timp3*^{S156C/S156C} Tiere 550 bp (Abb. 8A). Die Typisierung der *Timp3*-defizienten Tiere erfolgt mittels zwei getrennter PCR-Reaktionen. Zur Ermittlung des Wildtyp Allels werden die Primer *timp3ex3F* und

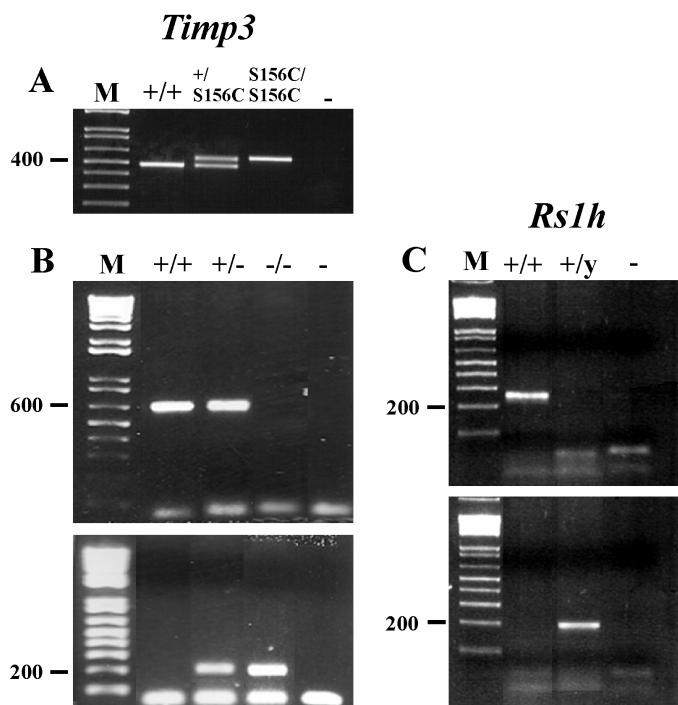


Abb. 8: Genotypisierung der verwendeten Mauslinien. (A) Typisierung der *Timp3-S156C knock-in* Maus mit den Primern TIMP3_KI_F2 und TIMP3_KI_R. Die erwarteten Fragmente betragen für *Timp3*^{+/+} Tiere 470 bp und für *Timp3*^{S156C/S156C} Tiere 550 bp. (B) Typisierung der *Timp3*-defizienten Maus mittels zwei getrennter PCR-Reaktionen mit den Primern *timp3ex3F*, *timp3ex4R* und *pGKneoR*. Die erwarteten Produkte betragen für *Timp3*^{+/+} Tiere 634 bp und für *Timp3*^{-/-} Tiere 209 bp. (C) Typisierung der *Rs1h*-defizienten Maus mittels zwei getrennter PCR-Reaktionen mit den Primern *rsc3F*, *lacZR2* und *RS1-KO-F1*. Die erwarteten Produkte betragen für *Rs1h*^{+/+} Tiere 200 bp und für *Rs1h*^{-/-} Tiere 260 bp. M, Marker; (-), Negativkontrolle.

timP3ex4R (Tab.1) verwendet. Die erwarteten *TimP3^{+/+}* Fragmente betragen 2530 bp und 634 bp. Das große 2530 bp Fragment wird durch die Taq Polymerase jedoch nicht erfolgreich amplifiziert, so dass im Gel nur das 634 bp Fragmente sichtbar wird (Abb. 8B). Das 209 bp Fragment, welches eindeutig die korrekte Insertion des *knock-out* Konstrukts anzeigt, erfolgt mit den Primern timP3ex3F (Tab.1) und pGKneoR. Die Kombination beider PCR-Reaktionen ermöglicht eine eindeutige Typisierung der *TimP3*-Defizienz (Abb. 8B). *Rs1h*-defiziente Tiere werden ebenfalls durch zwei getrennte PCR-Reaktionen typisiert. Das Wildtyp-Allel wird durch die Primer rsc3F und lacZR2 resultierend in einem 200 bp Fragment (Abb. 8C) nachgewiesen. Die Amplifikation des 260 bp Fragments aus dem *Rs1h knock-out* Konstrukt erfolgt in einer PCR mit den Primern rsc3F und RS1-KO-F1 (Abb. 8C). Alle Typisierungen werden zur Absicherung zweimal durchgeführt.

5. Morphologische und histologische Methoden

5.1 Elektroretinographie (ERG)

Die Mäuse werden über Nacht dunkel-adaptiert und kurz vor der Messung werden die Pupillen der Tiere mit Tropicamide Augentropfen (Mydriaticum Stulln, Pharma Stulln, Stulln, Deutschland) erweitert. Es erfolgt eine Anästhesierung der Mäuse mit Ketamin (66.7 mg/kg) und Xylazin (11.7 mg/kg). Silberadel-Elektroden dienen als Referenz (Kopfende) und Bezugspotential (Schwanzende), Goldring-Elektroden als aktive Messelektroden (Augen). Die ERG-Ausrüstung besteht aus einer Ganzfeld-Halbkugel, einem DC-Verstärker und einer PC basierten Kontroll- und Aufzeichnungseinheit (Toennies Multiliner Vision, Jaeger/Toennies, Höchberg, Deutschland). Die Bandpassfilter-Ausschlussfrequenzen betragen 0,1 und 3000 Hz. Es werden Einzelblitz-Aufzeichnungen unter dunkel-adaptierten (skotopischen) und licht-adaptierten (photopischen) Bedingungen durchgeführt. Licht-adaptierte Messungen werden von einer Hintergrund-Lichtintensität von 30 cd/m² für 10 min begleitet. Die einzelnen Stimuli werden mit steigenden Intensitäten 10⁻⁴ cd*s/m² bis 25 cd*s/m² durchgeführt und in 10 Schritten von 0.5 und 1 log cd*s/m² geteilt. Je 10 ERG-Antworten mit einem Stimulus Zwischenintervall (ISI) von 5 sec oder 7 sec (für 1, 3, 10 und 25 cd*s/m²) werden gemittelt. Neben den Einzelblitz-Aufzeichnungen werden auch Aufzeichnungen für Mehrfachblitze (Flicker) entweder mit einer vorgegebenen Intensität (3 cd*s/m²) mit 8 Frequenzen (0,5; 1; 2; 3; 5; 10; 15 und 30 Hz) oder einer festen Frequenz (10 Hz) mit variierenden Intensitäten (0,00012 - 19 cd*s/m² in Schritten von 0,2 logarithmischen Einheiten) durchgeführt. Vorausgehende Breitblitz-Experimente werden mit einem Mecablitz 60CT4 flash gun Aufsatz (Metz, Deutschland) für die Ganzfeld-Halbkugel durchgeführt. Das Spektrum der Intensitäten beträgt 110 - 9000 cd*s/m². Aufgrund der Geschwindigkeit des Aufladekondensators beträgt die höchste erreichbare Blitzfrequenz 3 Hz mit einer minimalen Intensität von 110 cd*s/m².

5.2 Raster-Laser Ophthalmoskopie (SLO)

Für diese Arbeit wird ein Heidelberg Engineering HRA I SLO (Heidelberg Engineering, Dossenheim, Deutschland) benutzt, welches für den Gebrauch für Tiere modifiziert wurde (Seeliger *et al.* 2000). Das HRA I bietet zwei Argon-Laser (488 nm, 514 nm) für kurze Wellenlängen und zwei Infrarot-Laserdioden (795 nm, 830 nm) im langwelligen Bereich. Die 488 nm und 795 nm Laser werden für Fluoreszenz-Angiographie (FA) und Indocyanin-Angiographie (ICGA) Untersuchungen benutzt. 500 nm und 800 nm Detektionsfilter garantieren ein weitgehend Hintergrund-freies Signal. In pigmentierten Tieren (C57BL/6) ermöglichen die kurzweligen Laser die höchste Darstellungsqualität im Bereich der Netzhaut, können allerdings nicht das RPE durchdringen und den Komplex der Choriokapillaris/Choroidea darstellen. Demgegenüber können die langwelligen Infrarotlaser retinale Details kaum visualisieren, ermöglichen aber einen Blick in die tiefer liegenden Schichten bis hin zur Sklera. Die FA bietet die detailgetreuste Auflösung retinaler Kapillaren, während die ICGA zusätzliche Informationen über die Choroidalgefäß erlaubt, aber weniger Details in den Gefäßen der Netzhaut aufdeckt. Zur Darstellung von Übersichten des Augenfundus wird eine 20° Lasereinstellung benutzt, vergrößerte Aufnahmen des Fundus werden bei 10° Lasereinstellung aufgenommen. Ausgenommen von der Dunkeladaptation werden die Tiere für die Untersuchungen wie oben beschrieben vorbereitet (siehe 5.1). Zusätzlich wird eine handelübliche Linse benutzt, um ein Austrocknen der Kornea der Tiere zu verhindern.

5.3 Licht- und Elektronenmikroskopie

5.3.1 Eponeinbettung von Geweben

Die präparierten Gewebe werden in Ito-Lösung (2,5 % Paraformaldehyd; 2,5 % Glutaraldehyd; 0,2 % Pikrinsäure in Cacodylatpuffer (10,7 g Cacodylsäure in 0,5 l H₂O; pH 7,2) für mindestens 12 h immersionsfixiert und in Cacodylatpuffer wiederholt für mehrere Stunden gespült. Die Gewebe werden mit 1 % Osmiumtetraoxid nachfixiert, das Osmium wird ausgewaschen und die Gewebe werden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70 %, 80 %, 90 %, 100 %) entwässert. Die Einbettung in Epon (Araldite 502, Ted Pella, Redding, USA) erfolgt mit Hilfe eines Einbettautomaten (Histomat 3000, Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland) über Azeton nach Standardmethoden (Ethanol/Azeton 1:1, Azeton 100 %, Epon/Azeton 1:2, Epon/Azeton 2:1, Epon 100 %). Die Proben werden im Brutschrank 1 h bei 30°C und weitere 48 h bei 60°C ausgehärtet. Die Stammlösung A des Epongemisches besteht aus 62 ml Glycidether 100 gemischt mit 100 ml DDSA, die Stammlösung B besteht aus 100 ml Glycidether 100 gemischt mit 89 ml MNA (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Für die Einbettungen werden diese Stammlösungen im

Verhältnis 1:1 mit 2 % (v/v) Beschleuniger DMP-30 verwendet. Von den Geweben werden mit einem Reichert Ultramikrotom Semidünnschnitte (0,5 - 1 µm) angefertigt, nach Richardson mit Toluidinblau (zuzügl. 1 % Borax) (Chromagesellschaft Schmidt, Kröingen, Deutschland) gefärbt und mit einem Zeiss Lichtmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) analysiert. Von ausgewählten Regionen werden Ultradünnschnitte (≤ 50 nm) angefertigt. Diese werden auf Kupfergrids aufgetragen, mit Uranylacetat (10 %, 10 min) und Bleicitrat (5 %, 1min) unter Lichtausschluss kontrastiert und mit einem Zeiss Transmissionselektronenmikroskop EM10 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet.

5.3.2 Herstellung von Gefäßausgüssen (vascular corrosion casts)

Zur Herstellung von Gefäßausgüssen wird das gewünschte Gewebe mit Plastik ausgegossen. Nach vollständigem Aushärten des Plastiks wird das native Gewebe mehrere Wochen lang schonend verdaut und es bleibt ein Plastikabdruck des ursprünglichen Gewebes zurück, der mikroskopisch ausgewertet werden kann. Zunächst werden die Mäuse mit Thiopental betäubt, der Thorax wird eröffnet, und es erfolgt eine Perfusion der Tiere mit flüssigem Plastik (Araldite CY 223 (45 %), Härter HY (25 %), Aceton (30 %) über die linke Herzkammer durch den gesamten Körper. Nach 24 h werden die Augen enukleiert und in mehreren Waschschritten in konzentrierter KOH eingeweicht. Nachdem das Gewebe vollständig verdaut ist, werden die Augen auf einer Halterung fixiert und mit Goldpartikeln besprührt. Die Gefäßausgüsse werden anschließend mit einem Rasterelektronenmikroskop (Stereoscan 90, Cambridge Instruments, UK) analysiert.

5.4 Kryoeinbettung von Geweben

Nicht fixierte Gewebe werden nach kurzem Waschen in 1x PBS in O.T.C. compound (Tissue Tek, Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande) einbettet und bei -80°C eingefroren. Gewebe, die dauerfixiert werden sollen, werden nach erfolgter Präparation für 2 - 4 h in 4 % PFA immersionsfixiert, mehrmals in 1x PBS gewaschen und anschließend für 1 - 12 h bei 4°C in 18 % Saccharose inkubiert. Dann werden die Gewebe in O.T.C. compound eingebettet und in flüssigem N₂ eingefroren. Anschließend werden mit einem Kältemikrotom (Leica, Bensheim, Deutschland) 10 µm Gewebeschnitte angefertigt, auf POLYSINE™ Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und für mindestens 1 h bei RT getrocknet. Bis zur weiteren Verarbeitung werden die Schnitte bei -80°C gelagert.

5.5 Histologische Doppelfärbung mit Hämalaun und Eosin

Die Doppelfärbung mit Hämalaun und Eosin Y (yellow) dient als einfache und schnelle Übersichtsfärbung. Dabei werden die Zellkerne blau und die übrigen Gewebekomponenten in unterschiedlichen Rottönen dargestellt. Schnitte von nicht fixierten Geweben werden aufgetaut, Luft getrocknet und für 20 min in 100 % Ethanol bei -20°C fixiert. Nach dem Fixieren werden die Schnitte 5 min bei RT in 1x PBS gewaschen. Es erfolgt eine Inkubation in Hämalaunlösung (0,75 % Hämatolxylin nach Härris, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) für 5 min bei RT. Die Schnitte werden anschließend 15 min unter fließendem Leitungswasser geblättert, 3 min in 1 % Eosin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gegen gefärbt, kurz in aqua dest. ausgewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80 % EtOH 5 sec, 90 % EtOH 5 sec, 100 % EtOH, 2 x 2 min) für 3 min in 100 % Xylol überführt. Das Einbetten der Schnitte erfolgt in dem Xylol-löslichen Einbettmedium Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

5.6 Immunohistochemie

5.6.1 Antikörperfärbungen an Gewebeschnitten

Kryoschnitte werden aufgetaut und Luft-getrocknet. Nicht-fixierte Schnitte werden mit einer geeigneten Fixierungsmethode (standardmäßig 4 % PFA, 6 min bei RT) nachfixiert und mehrfach mit 1x PBS gewaschen. Mitunter ist eine Rehydrierungszeit von mindestens 30 min in 1x PBS für eine erfolgreiche Antikörperfärbung notwendig (z.B. bei Färbung mit anti-Timp3 El-2). Es erfolgt eine Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen im Gewebe mit BLOTTO (1 % Magermilchpulver; 0,01 % Tween®20 in 1x PBS) für 30 min bei RT. Anschließend werden die Schnitte, mit dem primären Antikörper gebrauchsfertig in der Antikörperlösung (2 % BSA; 0,02 % NaN₃; 0,1 % Triton X-100 in 1x PBS) verdünnt (Tab.4), bei 4°C für 24 h bzw. bei RT für 4 h inkubiert. Nach der Inkubation mit den primären Antikörpern werden die Schnitte dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die nachfolgenden Schritte werden alle im Dunkeln durchgeführt. Es erfolgt eine Inkubation der Schnitte mit sekundären Fluoreszenz markierten Alexa Fluor® 488 (1:1000) bzw. Alexa Fluor® 594 (1:800) Antikörpern (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in 1x PBS für 1 h bei RT. Nach einem erneuten Waschschritt in 1x PBS werden die Zellkerne im Gewebe 10 - 15 min bei RT mit DAPI-Lösung (4',6-Diamidino-2-phenylindol, DAPI, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml in 1x PBS gegen gefärbt. Die Kernfärbung dient standardmäßig als Orientierungshilfe bei der Auswertung der Antikörperfärbungen. Nach wiederholtem, dreimaligem Waschen in 1x PBS werden die Schnitte in Fluoreszenz-Einbettmedium (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) eingebettet und mit dem Axioskop2 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet.

5.6.2 Antikörperfärbungen an vollständigen Geweben (whole mount)

Whole mount Antikörperfärbungen wurden am Komplex RPE/BM/Choriokapillaris von *Timp3-S156C knock-in* Mäusen und der gesamten Retina von *Timp3*-defizienten Mäusen durchgeführt. Die entsprechenden Gewebe werden präpariert und in 1x PBS bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Es erfolgt zur Reduktion unspezifischen Hintergrunds eine Inkubation der Gewebe in 24-well Platten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (EtOH 40 %, 60 %, 80 %, 95 %, 100 % Xylol 100 %) für je 2 min bei RT. Danach werden die Gewebe wiederum über dieselbe, absteigende Alkoholreihe von 100 % Xylol bis zu 1x PBS jeweils für 2 min bei RT inkubiert. Die Gewebe werden zur Erleichterung der Zugänglichkeit zu den Antigen-Bindungsstellen über Nacht bei 4°C in 25 % Triton-X100, 25 % Tween®20 in 1x PBS auf einem Rotationschüttler inkubiert. Es erfolgt eine Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen im Gewebe mit BLOTTO (1 % Magermilchpulver; 0,01 % Tween®20 in 1x PBS) für 1 h bei RT. Anschließend werden die Schnitte mit dem primären Antikörper, gebrauchsfertig in Antikörperlösung (2 % BSA; 0,02 % NaN₃; 0,1 % Triton X-100 in 1x PBS) verdünnt (Tab.4) bei 4°C für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation mit den primären Antikörpern werden die Gewebe dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die nachfolgenden Schritte werden alle im Dunkeln durchgeführt. Es erfolgt eine Inkubation der Gewebe mit sekundären Fluoreszenz markierten Alexa Fluor® 488 (1:1000) bzw. Alexa Fluor® 594 (1:800) Antikörpern (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in 1x PBS für 1 h bei RT. Die Gewebe werden in 1x PBS gewaschen und in Fluoreszenz-Einbettmedium (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) eingebettet. Eine Analyse der Präparate mit dem Axioskop2 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

5.6.3 Antikörperfärbungen an Zellen

Fibroblasten und AECs werden für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ auf sterilen Deckgläschen kultiviert. Nachdem die Zellen auf den Deckgläschen adhäriert und angewachsen sind, werden sie zweimal in 1x PBS gewaschen und für 10 min mit 4 % PFA fixiert. Die Zellen werden erneut zweimal in 1x PBS gewaschen. AECs werden in 10 % (v/v) Ziegenserum in 1x PBS für 30 min RT geblockt, um unspezifische Antikörperbindungstellen abzusättigen. Danach werden die Zellen über Nacht bei 4°C mit den primären Antikörpern in Antikörperlösung (0,1 % (v/v)) Ziegenserum in 1x PBS) inkubiert. Fibroblasten werden in 3 % Rinderserumalbumin in TBS, 0,1 % Triton X-100 für 30 min bei RT geblockt. Die Zugabe von TritonX-100 führt zu einer Permeabilisierung der Zellmembran, dies ermöglicht intrazelluläre Antikörperfärbungen. Nach dem Blockschritt werden die Zellen mit primären Antikörper in TBS + 0,1 % TritonX-100 1h bei RT inkubiert. und anschließend dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die nachfolgenden Schritte werden alle im Dunkeln durchgeführt. Es erfolgt eine Inkubation der Zellen mit den sekundären Fluoreszenz-markierten Antikörpern in 1x PBS für

30 min. Nach einem erneuten Waschschritt mit 1x PBS werden die Zellkerne 10 - 15 min bei RT mit DAPI-Lösung (4',6-Diamidino-2-phenylindol, DAPI, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) gegengefärbt. Nach wiederholtem, dreimaligem Waschen in 1x PBS werden die Zellen in Fluoreszenz-Einbettmedium (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) eingebettet und mit dem Axioskop2 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) analysiert.

5.7 Immunogold Antikörperfärbungen (Pre-Embedding Methode)

Zunächst werden mit 4 % PFA fixierte Augen der *Timp3-156C* Mauslinie auf Aluminiumhaltern in 3 % Agarose eingebettet. Es erfolgt die Herstellung von 100 µm dicken Vibrotomschnitten. Die Schnitte können bis zur weiteren Verarbeitung in 1x PBS 2 mM NaN₃ bei 4°C gelagert werden. Zur Reduzierung von unspezifischem Hintergrund beginnt das Protokoll mit dem optionalen Schritt der Aldehyd-Blockierung. Dazu werden die Schnitte mit 0,1 % NaBH₄ 5 - 10 min bei RT inkubiert (zeitabhängig, je schwächer die Fixierung und das verwendete Fixans, desto kürzer die Aldehyd-Blockierung). Die Schnitte werden 2x 5 min in 1x TBS gewaschen. Es erfolgt die eigentliche Absättigung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation in Blocklösung 1 h bei RT. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper geeignet verdünnt (Tab. 4) in der Blocklösung für mindestens 48 h bei 4°C. Nach mindesten sechs Waschschritten in 1x TBS für 10 min bei RT werden die Präparate mit dem sekundären Gold-beschichteten (Nanogold, ≤ 1nm Partikelgröße, Ambion, Austin, USA) Antikörper ÜN bei 4°C gefärbt.

Tab. 4 Verwendete Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Timp3 El-2	Kaninchen, polyklonal	1:2500	<i>Labor Prof. Weber</i>
Elastin (PR385)	Kaninchen, polyklonal	1:200	<i>Elastin products company, Inc.</i>
Laminin (ab11575)	Kaninchen, polyklonal	1:250	<i>Abcam</i>
GFAP (G9269)	Kaninchen, polyklonal	1:200	<i>Sigma-Aldrich</i>
F4/80 (BM8)	Ratte, monoklonal	1:600	<i>Acris</i>
Collagen IV (AB769)	Maus, monoklonal	1: 250	<i>Rockland</i>
Collagen VI (ab6588)	Kaninchen, polyklonal	1: 300	<i>Abcam</i>
Collagen XVIII	Kaninchen, polyklonal	1: 300	<i>Labor Prof. Heljasvaara</i>
CD31(ab7388)	Ratte, monoklonal	1:300	<i>Abcam</i>
VE-cadherin (ab7047)	Maus, monoklonal	1: 200	<i>Abcam</i>
Retinoschisin (RS1-3R10)	Kaninchen, polyklonal	1:250	<i>Labor Prof. Molday</i>
Rhodopsin (1D4)	Maus, monoklonal	1: 200	<i>Labor Prof. Molday</i>
(IsolectinB4-FITC)	Protein	1:200	<i>Molecular Probes</i>
(lectin PNA Alexa Fluor® 488)	Protein	1:600	<i>Molecular Probes</i>

Die Schnitte werden 10x 10 min in 1x TBS/BSA-c und weitere 6x 5 min in 1x TBS gewaschen, danach für 30 min in 1x TBS/ 2 % Glutaraldehyd nachfixiert und erneut mehrfach gewaschen: 1x 5 min 1XTBS 1x 5 min Tris-HCl pH 7,4 und 1x 5 min in Cacodylat-Puffer. Die fertig gefärbten Präparate werden in Epon eingebettet (siehe 5.3.1) und mit einem Zeiss Transmissionselektronenmikroskop EM1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet.

5.8 *In situ Zymographie*

Die Technik der *in situ* Zymographie ermöglicht die Identifizierung von Zellen in Gewebeverbänden, die Proteinaseaktivität ausüben. Dies geschieht mit Hilfe eines fluorogenen Substrats (DQ-gelatin-FITC, Molecular Probes, Leiden, Niederlande), welches bei einer Spaltung durch aktive MMPs ein Fluoreszenzsignal emittiert. Nicht-fixierte Kryoschnitte von Wildtyp und Timp3-defizienten Augen werden aufgetaut und in Detektionslösung (100 µg/ml DQ-gelatin-FITC, 2 % Agarose, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 2 mM NaN₃) eingebettet. Die Zymogramme werden ÜN bei 37°C und hoher Luftfeuchte inkubiert. Eine Analyse der Präparate erfolgt und mit dem Axioskop2 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

6. Angiogenese Methoden

6.1 Aortenring Assay (ARA)

Die Mäuse werden durch CO₂ - Asphyxiation betäubt und anschließendem Genickbruch getötet. Es erfolgt die Eröffnung des Thorax sowie des abdominalen Bauchraums. Die dorsale Aorta wird frei präpariert, in voller Länge entnommen und in eisgekühltem 1x PBS gelagert. Unter dem Stereomikroskop werden die Aorten von störendem Bindegewebe gereinigt und mit einem Skalpell in etwa 1 mm große Stücke geschnitten (Ausbeute ca. 12 - 16 Stücke pro Aorta). Es ist darauf zu achten, dass die Aortenwände nicht verletzt werden. Bis zur weiteren Verarbeitung werden die Stücke in eisgekühltem 1x PBS gelagert. Es werden 48 *well* Zellkulturschalen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) vorbereitet, von denen jedes *well* 400 µl Endothelial Basal Medium-2 ohne FCS (EBM-2; Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien) ergänzt durch 0,25 % Fibrinogen und 0,5 % ε-amino-n-caproic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) enthält. Pro Well wird ein Aortenstück mittig platziert und 0,05 U Thrombin (Calbiochem, VWR Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) in EBM-2 zugegeben. Die Zellkulturschalen werden bei 37°C, 5 % CO₂ ca. 30 min in einem befeuchteten Brutschrank inkubiert, damit das Fibrin gel polymerisieren kann. Von der Aortenpräparation bis zur Einbettung der Aortenstücke in das Fibrin gel sollten nicht mehr als maximal 45 min vergehen. Nach der vollständigen

Polymerisation des Fibringels werden pro Well 500 µl Endothelial Basal Medium (EBM; Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien) zugegeben. In einigen Assays wurden dem EBM Medium 40 ng/ml kommerziell erhältliches rekombinantes VEGF (rVEGF, R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland), 200 mM VEGFR2 Inhibitor ZM323881 (Merck Biosciences GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 0,7 µg/ml rTimp3 (Calbiochem, VWR Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) zugesetzt. Zudem wurden in diesem Labor selbst hergestelltes rekombinantes rTimp1, rTimp2, rTimp3, N-termiales rTimp3 (aa 1 - 121), C-terminales rTimp3 (aa 122 - 188) und rTimp4 in einer Konzentration von 2 µg/ml in diesem Assay eingesetzt. Die Aortenstücke werden 6 bis 8 d bei 37°C, 5 % CO₂ einem befeuchteten Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde während des Assay einmal an Tag 3 gewechselt. Eine Quantifikation der neu ausgewachsenen Pseudogefäße inklusive aller Verzweigungen erfolgt alle zwei Tage nach den von Nicosia *et al.* 1990 beschriebenen Kriterien. Repräsentative Fotos werden an Tag 6 aufgenommen.

6.2 Fibrin Bead Assay

AECs wurden mit einer Konzentration von 400 AECs pro Mikroträgerkugel (Cytodex3 microcarriers, Biotechnology, Europe GmbH, Freiburg, Germany) in 10 ml FCS-freiem EBM-2 aufgenommen und 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle 20 min wurden die Mikroträgerkugeln leicht geschüttelt, um ein vollständiges Anhaften der AECs an die gesamte Kugeloberfläche zu ermöglichen. Anschließend werden die Mikroträgerkugeln dreimal mit FCS-freiem EBM-2 gewaschen und in einer steril filtrierten Fibrinogen Lösung (FCS-freies EBM-2; 0,25 % Fibrinogen und 0,5 % ε-amino-n-caproic acid) mit einer Konzentration von 100 beads/ml aufgenommen. Insgesamt 500 µl der Fibrinogen/Kugel-Mischung werden in je ein Well einer 24 Well Platte gegeben und mit 0,05 U Thrombin versetzt. Die Zellkulturschalen werden bei 37°C, 5 % CO₂ ca. 30 min zur Polymerisation des Gels in einem befeuchteten Brutschrank inkubiert. Nach vollständiger Polymerisation des Gels werden pro Well 20.000 Lungen-Fibroblasten der unterschiedlichen Mauslinien in EBM auf das Gel ausgesät. Wenn die Fibroblasten auf dem Gel adhäriert sind, wird 1 ml frisches EBM, supplementiert mit den unterschiedlichen Timps (siehe 6.1), hinzugefügt. Die Kulturen werden 6 Tage bei 37°C in einem befeuchteten Brutschrank inkubiert. Eine Quantifikation der neu ausgewachsenen Pseudogefäße an den mit AECs bedeckten Mikroträgerkugeln erfolgt alle zwei Tage an den *in vitro* Kulturen mit Hilfe eines inversen Mikroskops (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland). Alle Pseudogefäße, deren Länge mindestens dem halben Kugeldurchmesser entsprechen, werden statistisch berücksichtigt. Repräsentative Fotos werden an Tag 6 aufgenommen.

6.3 Isolierung muriner Endothelzellen aus der Aorta (aortic endothelial cells, AEC)

Die Aorten werden präpariert, von störendem Bindegewebe befreit (siehe 6.1), in 3 - 6 ca. 3 mm große Stücke geschnitten und bis zur weiteren Verarbeitung in eiskaltem 1XPBS gelagert. Zur Kultivierung der Aortenstücke werden Zellkulturschalen für 10 min mit 1 ml Gelatine (0,1 % in PBS) beschichtet. Die Aortenstücke werden auf dem Boden der Zellkulturschalen leicht angedrückt und gerade soviel mit EBM bedeckt, dass sie feucht bleiben und nicht abschwimmen können. Es erfolgt eine Inkubation der Kulturen bei 37°C, 5 % CO₂. Nach 1 - 2 Tagen adhärieren die Gewebeexplantate und wachsen am Schalenboden fest. Die Aortenstücke werden in 10 ml EBM weiter kultiviert, das Medium alle zwei Tage gewechselt. Nach ca. 2 - 4 Tagen beginnen Zellen an den Ecken der Gewebestücke auszuwachsen. Zuerst auswachsende Fibroblasten werden von folgenden, primären AECs, die deutlich an ihrer typischen polygonalen Morphologie erkannt und differenziert werden können, überwachsen. Bei ca. 70 % Konfluenz werden die Aortenstücke entfernt und die Zellen weitere 2 Tage kultiviert. Es erfolgt eine sub-Kultivierung der Zellen in nicht beschichtete 10 cm Zellkulturschalen. Die Zellen erreichen innerhalb von 2 bis 4 Tagen vollständige Konfluenz und werden als „Passage 1“ bezeichnet.

6.3.1 Fluoreszenz - aktiviertes „cell sorting“

AECs der Passage 4 werden bis zu 80 % Konfluenz kultiviert. Anschließend werden die Zellen in 5 µg/ml Alexa488 gekoppeltem di-l-acetyliertem-LDL (low density lipoprotein, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) enthaltendem EBM über Nacht bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Endothelzellen nehmen spezifisch di-l-acetyliertes-LDL durch ihren Stoffwechsel auf und können durch Fluoreszenz-Anregung bei 488 nm Wellenlänge von nicht gefärbten Zellen in primären Zell-Mischkulturen sortiert und getrennt werden. Am nächsten Tag werden die Zellen durch Trypsinierung 5 - 10 min bei 37°C (1x Trypsin in 1xPBS/0,05 mM Na₂EDTA) von den Schalen gelöst, in FACS Puffer (PBS/1 mM Na₂EDTA) aufgenommen und auf Eis gelagert. Das Sortieren erfolgt in einem Becton Dickenson FACSAria™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) Zell Sortierer mit einem Argon Laser bei 488 nm Anregung und einem Emissionsfilter von 550 nm Wellenlänge. Frisch sortierte Zellen werden in 1 ml EBM + 20 % FCS aufgenommen und in 24 well Zellkulturschalen kultiviert. Sie erreichen Konfluenz in 10 cm Schalen innerhalb einer Woche. Nach 3 - 4 weiteren Passagen werden die Zellen erneut sortiert, um einen höheren Reinigungsgrad von primären AECs zu erreichen. Gefärbte, kommerziell erhältliche Endothelzellen aus dem Maus-Herzen (*mouse heart endothelial cells*, MHEC-5) dienen als Positivkontrolle, nicht gefärbte AECs sowie MHEC-5 als Negativkontrolle. Morphologisch präsentieren sich die isolierten, mit di-l-acetyliertem-LDL aktivierten Zell-sortierten AECs als Zellen mit backsteinartiger, eher polygonaler Struktur (Abb. 9) die als typisch für isolierte Endothelzellen aus der Aorta beschrieben wurde (Lincoln

et al. 2003, Huang *et al.* 2003). Mischkulturen mit Fibroblasten waren nach dem Sortierungsvorgang nicht mehr vorhanden. Ein Vergleich der Morphologie der beiden Zelltypen zeigt die offensichtlichen Unterschiede (Abb. 9).

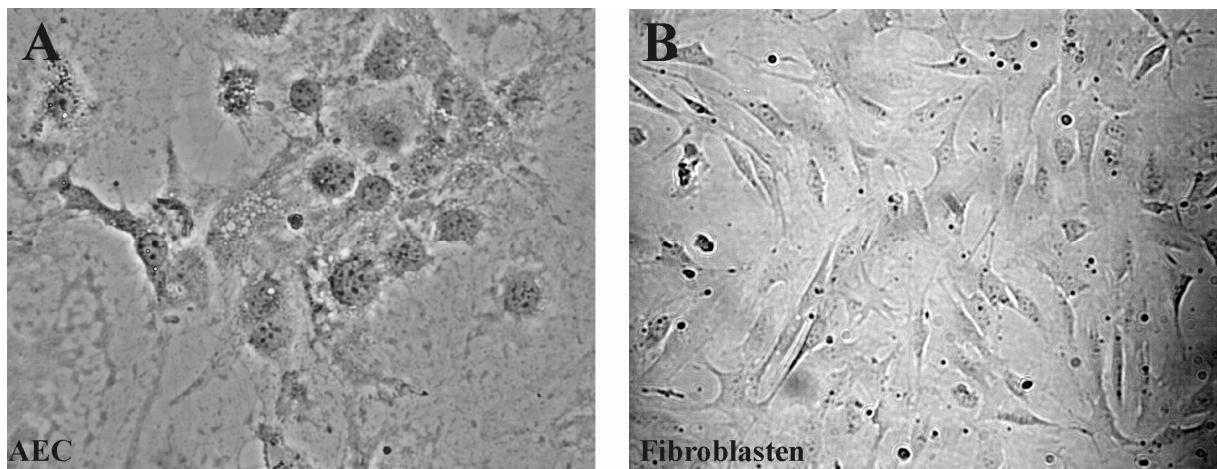


Abb. 9: Morphologische Darstellung von isolierten, aufgereinigten murinen AECs im Vergleich zu Fibroblasten. (A, B) Morphologische Darstellung von murinen AECs zum Stadium P11 nach di-I-acetyliertem-LDL aktiviertem Zell-Sortieren (A) 20-fache Vergrößerung. (B) Immortalisierte, isolierte Maus Fibroblasten aus der Lunge zum Stadium P21. Morphologisch betrachtet sind beide Zelltypen deutlich voneinander zu unterscheiden. AECs präsentieren sich als rundlich-polygonale Zellen. Die Fibroblasten präsentieren sich in der für sie typischen länglichen, seitlich abgeflachten und eng anliegenden Morphologie.

Antikörperfärbungen mit den Endothelzellspezifischen Markern CD31 und VE-cadherin zeigten eine starke, positive Anfärbung der aufgereinigten AECs mit Hilfe der Immunocytochemie (Abb. 10)

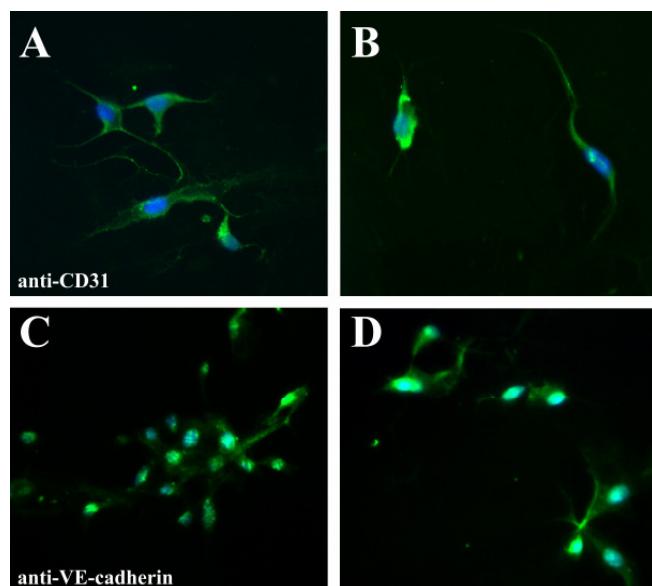


Abb. 10: Immunhistochemische Antikörperfärbung von AECs mit den EC Markern CD31 und VE-cadherin. (A und B) AECs wurden mit dem Endothelzell-spezifischen Marker anti-CD31, Ratte monoklonal, in einer Verdünnung von 1:300 gefärbt. (C und D) AECs wurden mit dem Endothelzell-spezifischen Marker anti-VE-cadherin, Maus monoklonal, in einer Verdünnung von 1:200 gefärbt. Zur Detektion des Antikörpersignals wurden Alexa488-gekoppelte fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (grün) verwendet. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Die isolierten, aufgereinigten AECs zeigen für beide Endothelzellmarker ein starkes positives Signal.

6.3.2 Matrikel Assay

Ein weiterer, anerkannter Test von Zellkulturen auf eine mögliche Endothelzellspezifität besteht in der Kultivierung der zu testenden Zellen auf der EZM Ersatzsubstanz Matrikel. Ausschließlich echte Endothelzellen sind in der Lage, auf Matrikel innerhalb von 1 bis 2 Tagen spinnennetzartige Pseudogefäßstrukturen auszubilden (Min *et al.* 2004). Ungefähr 20.000 AECs werden auf 500 µl Matrikel (BD Biosciences, Erembodegem, Belgien) pro 24 Well Kulturplatte ausgesät und für 4 h bis zu 6 Tage bei 37°C und 5% CO₂ in einem befeuchteten Brutschrank inkubiert und nach entsprechender Inkubationszeit mit einem inversen Mikroskop (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) analysiert. Auf Matrikel ausgesäte, gereinigte AECs bildeten bereits nach 2 h die Endothelzell-typischen spinnennetzartigen Strukturen. Interessanterweise intensivierten sich diese nicht, sondern die Zellen formierten sich nach einem Tag zu kugelartigen Zellaggregaten. Im Verlauf der folgenden 5 Tage sind aus diesen Aggregaten dreidimensionale Pseudogefäßnetzwerke entstanden, die vermutlich echte Gefäßlumina enthielten (Abb. 11).

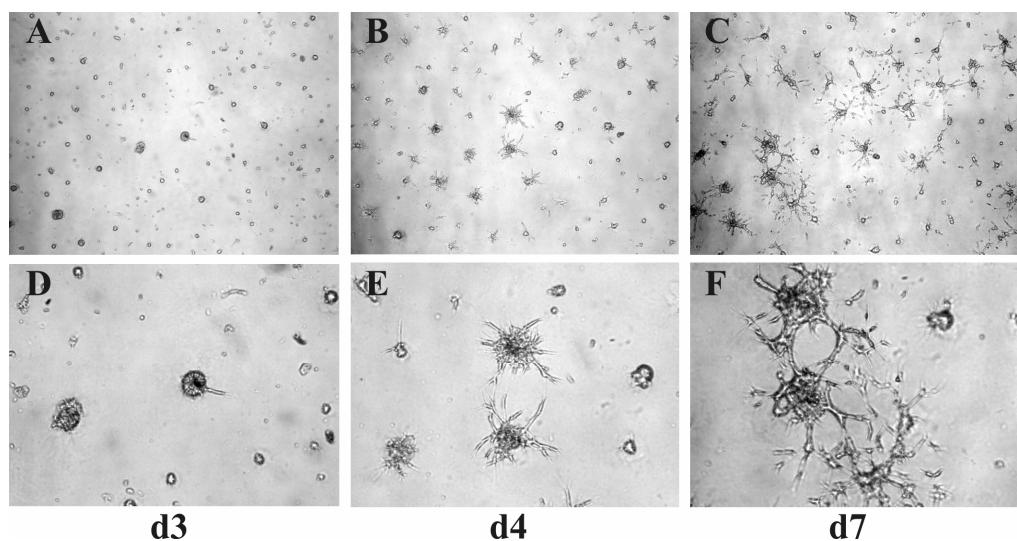


Abb. 11: Kultivierung isolierter, Zell-sortierter AECs auf einem Matrikel Nährboden. AECs wurden auf einer Matrikel EZM Nährlösung in 24er Zellkulturwells für 6 Tage in einem befeuchteten Brutschrank bei 37°C kultiviert und an Tag 6 mit einem inversen Mikroskop bei 4-facher Vergrößerung (**A – B**) aufgenommen, die Abbildungen **D – E** stellen Ausschnittsvergrößerungen dar. AECs bilden ab dem 2. Tag Zellkonglomerate, aus denen sich Pseudogefäße ausbilden, die im weiteren Verlauf Pseudogefäßnetzwerke bilden.

7. Proteinbiochemische Methoden

7.1 Herstellung von Proteinextrakten

AECs in 10 cm Zellkulturschalen werden mit 1x PBS/ 0,1 mM NaVO₄ gewaschen. Nach dem Absaugen der Waschlösung werden die Zellen in 300 µl PhosphoSafe™ Puffer (Novagen, Merck Biosciences GmbH, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen und sonifiziert (Vibra cell,

Zinsser Analytic, Frankfurt am Main, Deutschland). Die Proteinextrakte werden in Ladepuffer [62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8); 2 % SDS; 10 % Glycerol; 5 % β -Mercaptoethanol; 0,001 % Bromphenolblau] gelöst und für 5 min bei 95°C denaturiert. Sowohl das Erhitzen der Proben als auch die Zugabe von β -Mercaptoethanol und SDS haben reduzierende Wirkung auf die Proteine. Beide Substanzen sind denaturierende Agenzien, die Disulfid-Brücken zerstören und nichtkovalente Proteininteraktionen auflösen.

7.2 Western Blot

7.2.1 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinextrakte werden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Diese Methode beruht auf der elektrophoretischen Mobilität von Proteinen in Relation zu ihrer Größe. Kurz vor dem Auftrag werden die Proben für ca. 5 min aufgekocht und auf Eis abgekühlt. Pro Gelspur werden 30 - 50 μ l Proteinprobe und 2 μ l vor-gefärbter peqlab peqGOLD Proteinmarker IV (Peqlab, Erlangen, Deutschland) aufgetragen. Die 6 % und 12 % Acrylamid-Gele laufen für ca. 1,5 h bei konstanten 75 mA in Tris-Glycine Puffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 1 % SDS) in der BioRad Mini-protean[®] Apparatur (BioRad, München, Deutschland). Polyacrylamid-SDS-Gele bestehen aus zwei verschiedenen Lagen, einem oben liegenden Sammelgel ((4 % 30:8 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid; 0,1 % SDS; 375 mM Tris-HCl (pH 8,8)) und einem darunter liegenden Trenngel (10 % 30:8 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid; 0,1 % SDS; 125 mM Tris-HCl (pH 6,8)). Um eine Polymerisation der Gelkomponenten zu aktivieren werden 16 μ l TEMED und 16 μ l APS einer 10 ml Gel-Lösung zugegeben. Die Funktion des Sammelgels besteht darin, ein gleichzeitiges Einwandern der Proteine auf gleicher Höhe in allen Spuren zu ermöglichen. Nach der Elektrophorese werden die Gele entweder direkt für 30 min in einer Coomassie[®] Lösung (0,025 % (w/v) Coomassie[®] Brilliant Blue R250; 50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Eisessig) gefärbt und anschließend entfärbt mit 10 % (v/v) Eisessig, oder die Proteingele werden durch einen Immunoblot weiter prozessiert (siehe 7.2.2).

Tab. 5 Verwendete Antikörper für Western Blot Untersuchungen

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
ERK1/2 (M5670)	Kaninchen, polyklonal	1:40000	Sigma-Aldrich
phospho ERK1/2 (E7028)	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Sigma-Aldrich
p38 (M0800)	Kaninchen, polyklonal	1:10000	Sigma-Aldrich
phospho p38 (P1491)	Kaninche, polyklonal	1:2000	Sigma-Aldrich
VEGFR2 (07-158)	Kaninchen, polyklonal	1:1000	upstate
phospho VEGFR2 (ab5473)	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Sigma-Aldrich
β -Actin (AC-15)	Maus, monoklonal	1:30000	Sigma-Aldrich

7.2.2 Immunoblot

Der Proteintransfer auf eine PVDF Membran (Immobilon-P, Milipore, Eschborn, Deutschland) erfolgt bei konstanten mA (2,5 mA pro cm² Membran) in Transfer Puffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 15 % Methanol) in einer Trans-Blot® SD *semi-dry transfer cell* Apparatur (BioRad, München, Deutschland) für 1,5 h. Anschließend wird die PVDF Membran in 3 % Magermilch Pulver in 1xPBS (137 mM NaCl; 0,3 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 6,7 mM KH₂PO₄; pH 7,4) bzw. 1,5 % BSA (für den Nachweis von Proteinphosphorylierungen) in 1x PBS für mindestens 1 h geblockt. Danach wird die Membran in der Antikörperlösung (0,3 % Magermilch in 1xPBS bzw. 1,5 % BSA in 1xPBS) mit den entsprechenden Antikörpern (Tabelle 5) inkubiert. Zur Detektion der Proteinbanden werden sekundäre Anti-Maus und Anti-Kaninchen mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper (Calbiochem, VWR Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) in Verdünnungen von 1:5000 - 1:10000 verwendet. Der Bandennachweis erfolgt mit dem ECL Detektionssystem (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg, Deutschland).

7.3 Zymographie

Diese Methode wird zur Bestimmung der Aktivität der Gelatinasen A (MMP2) und B (MMP9) im Zellkulturüberstand von murinen AECs verwendet. Subkonfluente (ca. 80 % Konfluenz) 10 cm Zellkulturschalen mit AECs werden über Nacht in DMEM Medium ohne FCS kultiviert. Der Zellkulturüberstand wird 10 min bei 4000 g abzentrifugiert, in Ladepuffer (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8); 2 % SDS; 10 % Glycerol; 0,001 % Bromphenolblau) aufgenommen und für 10 min bei RT inkubiert. Es erfolgt eine SDS-PAGE (siehe 7.2.1) in einem 40 mg/ml Gelatine enthaltenden 10 % SDS Gel (1 - 2 h, 200 V, 25 mA). Die Gelapparatur sollte während des Laufs mit Eis gekühlt werden. Nach erfolgter SDS-PAGE wird das Gel 3x 30 min in jeweils neuem Puffer I (50 mM Tris-HCl, pH7,5; 5 mM MaCl₂; 2,5 % Triton X-100) inkubiert. Triton X-100 ersetzt das im Gel enthaltende SDS und erlaubt eine Renaturierung der MMPs. Das Gel wird 16 h bei 37°C in Puffer II (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM MaCl₂) inkubiert und anschließend ca. 30 min bis 1 h mit Coomassie® Lösung (0,025 % (w/v) Coomassie® Brilliant Blue R250; 50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Eisessig) gefärbt und mit 10 % (v/v) Eisessig entfärbt.

Am Anfang jeder Forschung steht das Staunen.
Plötzlich fällt einem etwas auf.

IV. Ergebnisse

Wolfgang Wickler (* 1931), deutscher
Verhaltensforscher und Zoologe

1. Charakterisierung der *Timp3*-defizienten Mauslinie auf C57Bl6- und CD1-Albino-Hintergrund

In dieser Arbeitsgruppe wurde in vorangegangenen Arbeiten eine Unterbrechung des endogenen *Timp3*-Gens durch die Insertion einer Expressionskassette mit einer Neomycin Resistenz (PGKneo bpA) in Exon 3 des *Timp3*-Gens erreicht (Abb. 12A). Diese genetische Veränderung führt zu einer Verschiebung des Leserahmens (*frame shift*) im *Timp3*-Gen und daraus resultierend zur Generierung eines vorzeitigen Stop-Codons. Die DNA-Sequenz des veränderten Allels sollte nach erfolgreicher homologer Rekombination zur Expression einer trünierten und nicht mehr funktionalen *Timp3*-mRNA führen. Eine erfolgreiche Einbringung des mutierten Allels in die Keimbahn wurde durch zwei Genlocus-spezifische genomische PCR Reaktionen überprüft. Mit DNA aus Mäuseschwänzen, die das rekombinante Allel tragen, wurden ein 2,8 kb bzw. 2,9 kb großes Fragment amplifiziert, welches die 5'- und 3'-Sequenz der PGKneo bpA-Kassette darstellen (Abb. 12A, B).

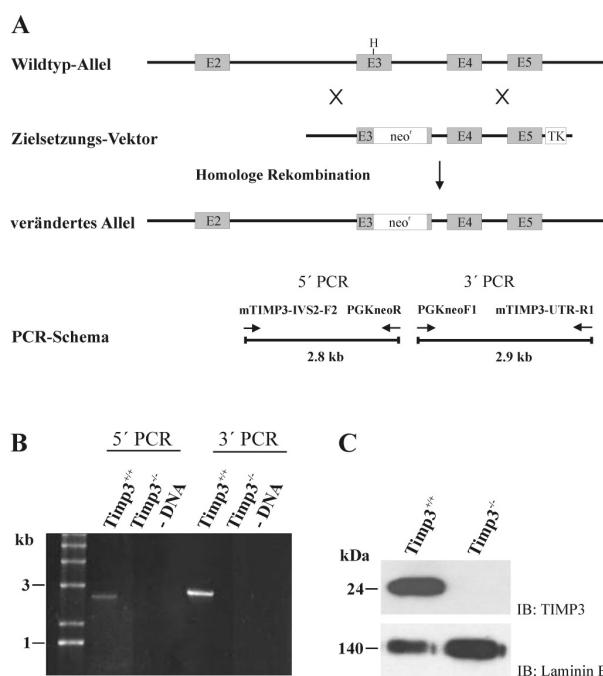


Abb. 12: Zielgerichtete Unterbrechung des Maus *Timp3*-Gens. Diese Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Heidi Stöhr zur Verfügung gestellt. (A) Der Zielsetzungs-Vektor trägt eine Neomycinresistenz-Kassette (PGKneo bpA), inseriert in die *HincII* (H) Schnittstelle des Exon 3 (E3) des *Timp3*-Gens und eine HSV-TK Expressionskassette am 3'-Ende zur Negativ-Selektion. Die Positionen der 5'- und 3'-Primerpaare für die Überprüfung der Insertion des mutierten Allels in ES-Zellen und Nachkömmlinge von Chimären Tieren sowie die Größen der PCR-Produkte sind angegeben. (B) Exemplarische PCR-Amplifikation mit genomischer DNA aus Schwanzbiopsien von *Timp3*^{+/+} und *Timp3*^{−/−} Mäusen bestätigen das korrekte Targeting von *Timp3* in den Tieren. (C) Western Blot Analysen von EZM-Extrakten primärer Fibroblastenkulturen von Wildtyp und *Timp3*^{−/−} Mäusen. Das *Timp3*-Protein fehlt in der *Timp3*^{−/−} EZM. Ein Immunoblot mit einem Laminin B2 Antikörper dient als Kontrolle.

Western Blot Analysen mit Fibroblasten EZM-Extrakten, die aus Mäusen generiert wurden, die homozygote Träger des inaktivierten *Timp3*-Gens darstellten, zeigen, dass das veränderte Allel tatsächlich ein echtes Null-Allel darstellt (Abb. 12C). Diese Mäuse wurden für die Experimente zur vorliegenden Arbeit freundlicherweise von Prof. Dr. Weber zur Verfügung gestellt.

1. 1 Morphologische Untersuchungen des Augenphänotyps

1.1.1 Licht- und Elektronenmikroskopie

Histologische Untersuchungen von Semidünn-Schnitten der Retina von *Timp3*^{+/+} Mäusen verschiedener Altersstadien bis hin zu einem Alter von 18 Monaten zeigten keine morphologischen Abnormalitäten in der strukturellen Zusammensetzung der unterschiedlichen retinalen Schichten, der BM oder dem RPE im Vergleich zu Wildtyp Geschwistern (Abb. 13A, B). Transmissionselektronenmikroskopische Analysen von Ultradünn-Schnitten (in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ernst Tamm, Institut für Anatomie, Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie, Universität Regensburg, 93053 Regensburg)

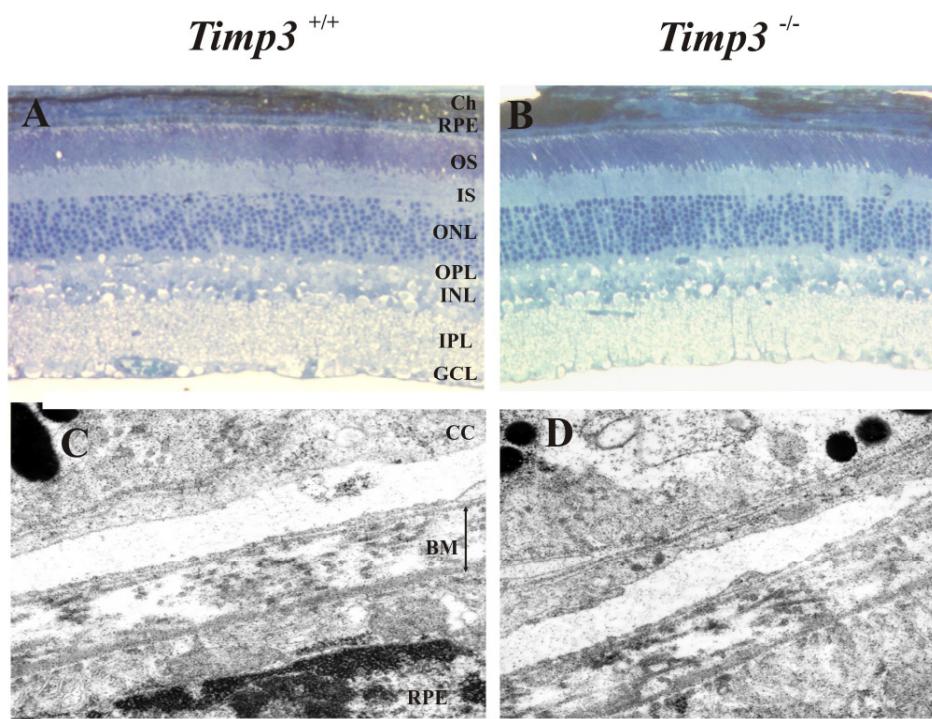


Abb. 13: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen von Wildtyp und *Timp3*-defizienten Mäusen. Die Abb. C und D wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ernst Tamm zur Verfügung gestellt. (A und B) Semidünn-Schnitte ($\leq 1\mu\text{m}$) der Netzhäute 18 Monate alter C57/Bl6 *Timp3*^{+/+} (E1 $+/+$) und *Timp3*^{-/-} (C1 $-/-$) Mäuse wurden durch Licht- und Elektronenmikroskopie ausgewertet. (C und D) Ultradünn-Schnitte (ca. 50 nm) des Komplex RPE/BM/Choriokapillaris von 6 Monate alten *Timp3*^{+/+} (KO281) und *Timp3*^{-/-} (KO43) Mäusen in 20.000-facher Vergrößerung. Pro Genotyp wurden jeweils drei Tiere untersucht. CC, Choriokapillaris; OS, Äußere Segmente; IS, Innere Segmente; ONL, Äußere Kernschicht; OPL, Äußere plexiforme Schicht ; INL, Innere Kernschicht; IPL, Innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglion Zellschicht; BM, Bruchsche Membran.

von *Timp3*^{-/-} Mäusen präsentierten ein reguläres Erscheinungsbild von RPE-Zellen und der BM. Sie besteht aus ihrer charakteristischen, fünf Lagen umfassenden Ultrastruktur mit einer zentralen, elektronendichten Elastika. Diese wird von einer inneren und äußereren kollagenen Schicht flankiert, welche jeweils von einer Basallamina, generiert vom RPE auf der einen Seite sowie von der Choriokapillaris auf der anderen Seite, abgegrenzt werden (Abb.13C, D).

1.1.2 Raster-Laser Ophthalmoskopie

Zur Aufdeckung retinaler Defekte, die eventuell nicht ausschließlich durch eine Analyse saggitaler Querschnitte der Netzhaut aufgedeckt werden können, wurden *in vivo* ophthalmoskopische Untersuchungen (*scanning-laser ophthalmoscopy*, SLO; in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Mathias Seeliger, Universitätsaugenklinik Tübingen, AG Retinale Funktionsdiagnostik, 72076 Tübingen) durchgeführt. Diese Technik ermöglicht die Gewinnung detaillierter Informationen bezüglich der strukturellen Integrität des Augenfundus durch die Generierung von Gesamtaufsichten der einzelnen retinalen Schichten auf verschiedenen Ebenen beginnend bei der inneren Netzhaut über das RPE bis in den Bereich Choriokappillaris/Choroid. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Angiographie konnten aufgeblähte, ballonähnliche Ausweitungen, assoziiert mit der Vaskulatur der Choroidea in *Timp3*^{-/-} Mäusen aufgedeckt werden (Abb. 14A, B). Diese pathologischen Veränderungen fehlten in allen untersuchten Wildtyp-Geschwistertieren. Auf dem genetischen C57/BL6 Hintergrund wird das ICG Fluoreszenzsignal durch die Pigmente im RPE gestreut. Dies verhindert eine detailgetreue, hoch auflösende Darstellung des choroidalen Gefäßsystems. Daher wurden die *Timp3*^{-/-} Mäuse auf den pigmentlosen CD1-Auszuchtstamm zurückgekreuzt. Auf diesem Hintergrund zeigten SLO-Aufnahmen von *Timp3*-defizienten Mäusen wesentlich prominenter Veränderungen des tiefliegenden vaskulären Bettes der Choroidea, charakterisiert durch zahlreiche aufgeblähte, erweiterte Gefäße, die nicht in gesunden Geschwistertieren nachgewiesen werden konnten (Abb. 14C, D). Zur genaueren Bestimmung der Art der Gefäßabnormalitäten in *Timp3*^{-/-} Mäusen wurden Gefäßausgüsse von *Timp3*^{-/-} (C57BL/6) und Wildtyp-Augen angefertigt (in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Albrecht May, Institut für Anatomie, TU Dresden, 01307 Dresden) und mit einem Rasterelektronenmikroskop ausgewertet. Im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren, die sich durch eine reguläre Gefäßstruktur der choroidalen Blutversorgung auszeichneten, war das Choroid der *Timp3*^{-/-} Tiere von schweren Gefäßerweiterungen bzw. Gefäßverschmelzungen und/oder Verwachsungen betroffen (Abb. 14E), die rein morphologisch betrachtet gut mit den SLO-Befunden (Abb. 14D) korrelierten.

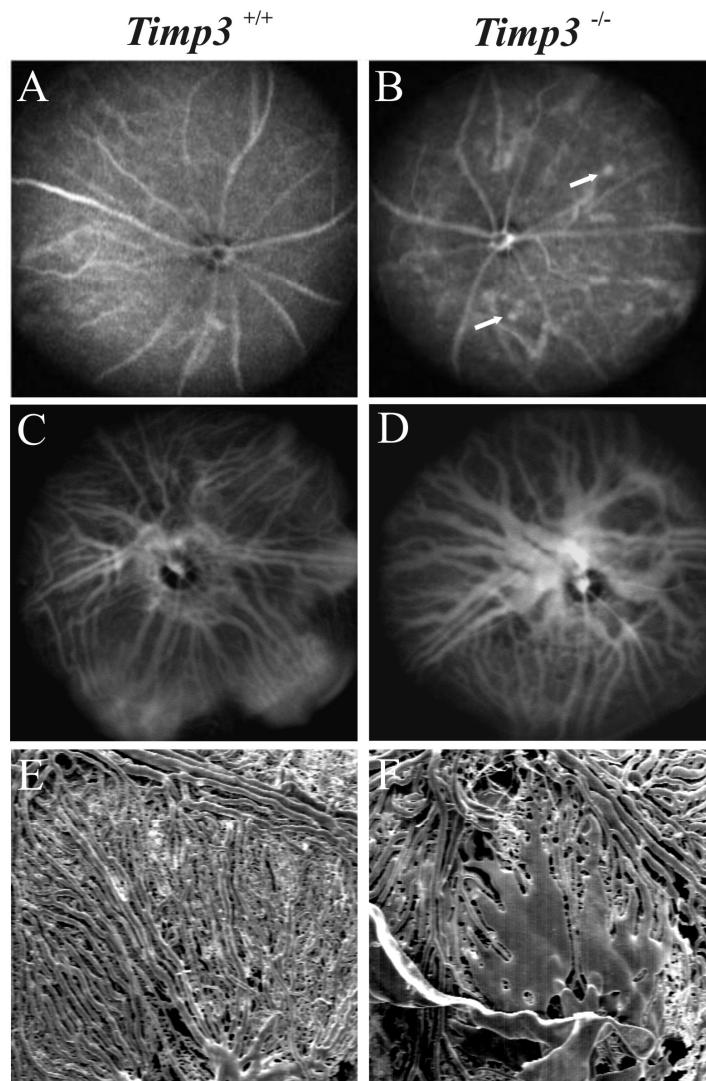


Abb. 14: In vivo Analysen und Rasterelektronenmikroskopie von Wildtyp und *Timp3*-defizienten Mäusen. Die Abb. A-D wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Mathias Seeliger und E und F von Prof. Dr. Albrecht May zur Verfügung gestellt. (A und B) Panorama ICG-Angiogramme des choroidalen vaskulären Netzwerks von 3 Monate alten C57BL/6 Mäusen, die entweder das homozygote Wildtyp (*Timp3*^{+/+}, KO281) oder Mutante (*Timp3*^{-/-}, KO43) *Timp3* Allel tragen. Mutante Tiere zeigen ballonartige Erweiterungen von choroidalen Gefäßen (weiße Pfeile). (C und D) SLO-Aufnahmen von 4 Wochen alten *Timp3*^{+/+} (CO1381) und *Timp3*^{-/-} (CO1377) CD1-Albino Mäusen. *Timp3*-defizierte Mäuse zeigen zahlreiche ballonartig erweiterte, aufgeweitete Gefäße (^{+/+},KO281, ^{-/-},KO43). (E und F) Pro Experiment wurden jeweils 3 Tiere (A und B), 2 Tiere (C und D) sowie 3 Tiere pro Genotyp (E und F) ausgewertet. Skleraler Blick einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme eines Gefäßausguss von ca. 1/4 der choroidalen Vaskulatur von 2 Monate alten *Timp3*^{+/+} und *Timp3*^{-/-} C57BL/6-Mäusen. *Timp3*^{-/-} Tiere weisen stark erweiterte oder verschmolzene vaskuläre Strukturen auf.

1.2 Untersuchungen zu den molekularen Ursachen der Gefäßveränderungen in *Timp3*^{-/-} Mäusen (CD1-Hintergrund)

1.2.1 In situ Zymographie und Immunohistochemie

Zur Aufschlüsselung der molekularen Signalwege, die zu den beobachteten Pathologien in der choroidalen Vaskulatur *Timp3*^{-/-} Tiere führen könnten, wurden zunächst *in situ* Zymogramme an retinalen Schnitten von Wildtyp und *Timp3*^{-/-} Mäusen durchgeführt. In

Timp3^{-/-} Schnitten (Abb. 15E, F) konnte wiederholt ein signifikant erhöhter Gelatine-Abbau im Bereich der Choroidalgefäß im Vergleich zum Wildtyp (Abb.15A) nachgewiesen werden. Zur genauen Lokalisation der MMP-Aktivität im Komplex RPE/BM/Choroid wurden an sukzessiven Kryoschnitten Antikörperfärbungen mit KollagenXVIII durchgeführt. KollagenXVII lokalisiert in der Maus scharf abgegrenzt in der BM und den Gefäßen der Choriokapillaris bzw. Choroidea (Fukai *et al.* 2002). Dieses Färbemuster konnte in *Timp3^{+/+}* und *Timp3^{-/-}* Tieren bestätigt werden. Ein Vergleich der KollagenXVIII-Färbung mit Darstellungen der *in situ* Zymogramme zeigt eine eindeutige MMP-Aktivität in den tief liegenden Gefäßen der Choroidea und nicht an der Grenze RPE/BM (Abb. 15B, D und G, H). Dies deutet darauf hin, dass in *Timp3^{-/-}* Tieren die Aktivität der beiden Gelatinasen MMP2

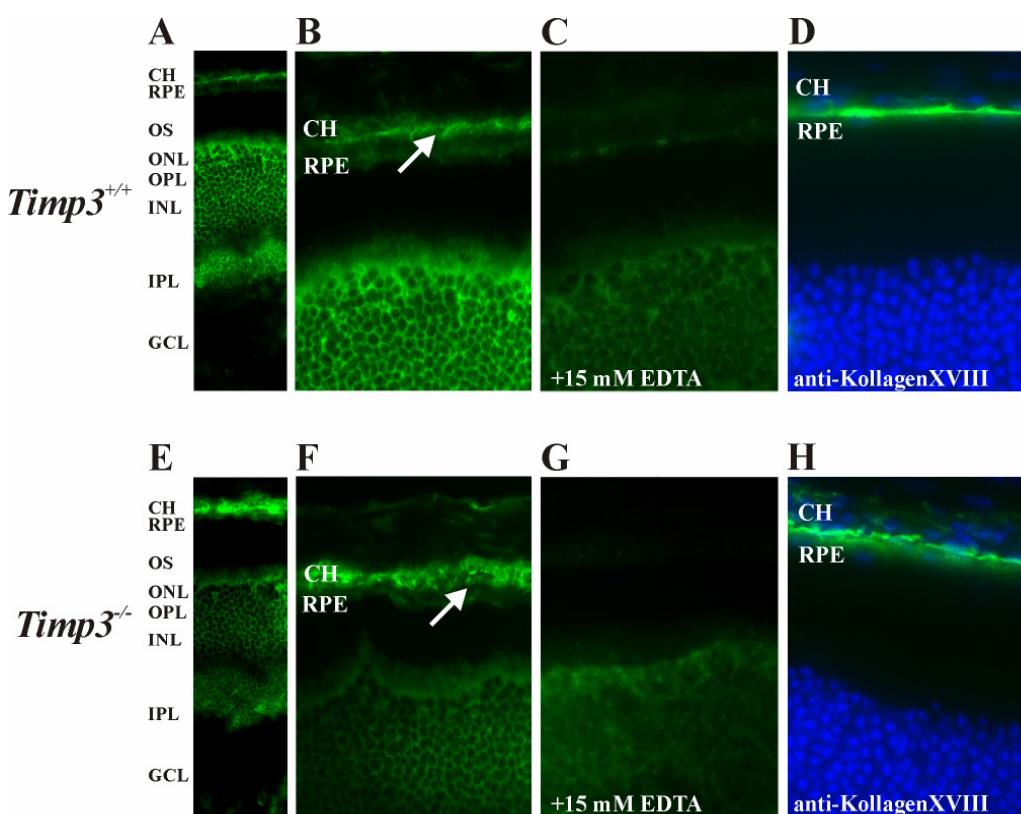


Abb. 15: Erhöhte MMP-Aktivität in der Choroidea *Timp3*-defizienter Mäuse. Die *in situ* Zymographie wurde an retinalen Kryoschnitten von (A, B und C) *Timp3^{+/+}* (CO46.14) und (E, F und G) *Timp3^{-/-}* (CO46.3) Mäusen durchgeführt. Eine MMP-vermittelte Degradation des DQ™ Gelatine Substrats generiert stark fluoreszierende Peptide. Eine erhöhte Fluoreszenz im Choroid von *Timp3^{-/-}* Mäusen im Vergleich zu *Timp3^{+/+}* Tieren (weiße Pfeile) deutet auf eine verstärkte MMP-vermittelte Proteolyse. (C und G) Die MMP-Aktivität konnte erfolgreich durch Zugabe von 15 mM EDTA geblockt werden. Die Aufnahmen wurden bei 20-facher (A und E) und 40-facher Vergrößerung aufgenommen. (D und H) Die Experimente wurden 3x an sukzessiven Schnitten von zwei Tieren pro Genotyp wiederholt. Immunohistochemischer Nachweis von KollagenXVIII im Komplex BM/Choroid von Wildtyp und *Timp3^{-/-}* Mäusen. In beiden Genotypen ist die BM deutlich angefärbt. Eine Antikörperreakтивität findet sich auch in den Endothelen der Choriokapillaris. ONL, Äußere Kernschicht; RPE, Retinales Pigmentepithel; CH, Choroid.

und MMP9 im Choroid erhöht ist. Eine *in situ* Zymographie in Anwesenheit des MMP-Inhibitors EDTA führte zu einem vollständigen Verlust des Fluoreszenzsignals (Abb.15C, D)

im Bereich BM/Choroid, eine Bestätigung für die Annahme, dass der Gelatine-Abbau in diesem Assay durch die MMP-Aktivität vermittelt wird.

Zur Überprüfung, ob pathologische Veränderungen auch in den Gefäßsystemen der *Timp3*^{-/-} Netzhaut auftreten, wurden *whole mount* Antikörperfärbungen mit Fluoreszenz-konjugiertem IsolectinB4 durchgeführt. Abb. 16 zeigt von der Seite des Glaskörpers her gesehenen (anterior-posterior) einen Blick durch die retinale Gefäßstruktur von ca. ¼ der gesamten Oberfläche der Netzhaut von *Timp3*^{+/+} (Abb. 16A) und *Timp3*^{-/-} (Abb. 16C) Tieren. Detailaufnahmen sind in Abb. 16B und D gegeben. In beiden Genotypen ist ein großer Gefäßzweig gezeigt, der sich in immer feinere Kapillaren aufästelt. Es konnten keine morphologischen Unterschiede in der Dicke, der Anzahl der Gefäße sowie der Gefäßverzweigungen in der *Timp3*^{-/-} Netzhaut im Vergleich zur *Timp3*^{+/+} Netzhaut festgestellt werden. Offensichtlich wird die Entwicklung der Morphologie der retinalen Vaskulatur nicht durch das Fehlen von Timp3 beeinflusst.

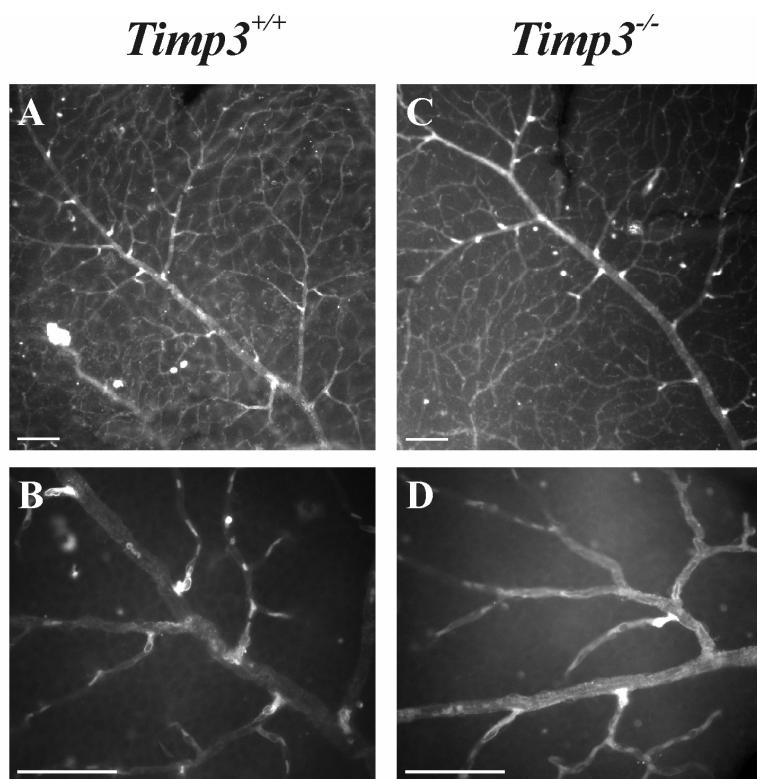


Abb. 16: Whole mount Antikörperfärbung der retinalen Gefäße von Wildtyp und *Timp3*^{-/-} Mäusen. (A und B) *Timp3*^{+/+} (CO50.2) und (C und D) *Timp3*^{-/-} (CO51.3) Retinae wurden mit Alexa-488 konjugiertem IsolectinB4 zur Darstellung der retinalen Vaskulatur angefärbt. Die Aufnahmen wurden bei 20-facher (A und C) und 40-facher Vergrößerung (B und D) aufgenommen. In beiden Genotypen ist die Vaskulatur durch größere Gefäßäste, die sich immer feiner verzweigen ausgezeichnet. Unterschiede zwischen Wildtyp und *Timp3*^{-/-} Tieren konnten nicht festgestellt werden.

1.2.2 Studien zum Gefäßwachstum mit Hilfe der Aortenring- und Fibrin Bead Assays

Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass eine Überstimulation mit VEGF zur Ausbildung unnormal vergrößerter Blugefäße und vaskulärer Hyperfusion führen kann (Drake *et al.* 1998, Springer *et al.* 1998). Eine Dysregulation von VEGF-induzierter Angiogenese kann daher bei der Entwicklung der in den *Timp3*^{-/-} Mäusen beschriebenen pathologischen Gefäßveränderungen von ursächlicher Bedeutung sein. Zu diesem Zweck wurden die Auswirkungen der *Timp3*-Defizienz auf die VEGF-vermittelte Angiogenese mit Hilfe des *ex vivo* Aortenring-Assays untersucht. Gewebeexplantate der Aorten von *Timp3*^{-/-} Mäusen zeigten im Vergleich zu Wildtypieren eine signifikant und reproduzierbar erhöhte Auswachsrate neuer Pseudogefäße unter spontanen Bedingungen (Abb. 17A). Die Zugabe von rekombinantem *rTimp3* (Abb. 17B) führte zu einer Reduktion des Kapillarwachstums auf ein Niveau vergleichbar dem spontanen Auswachsen in Wildtypieren.

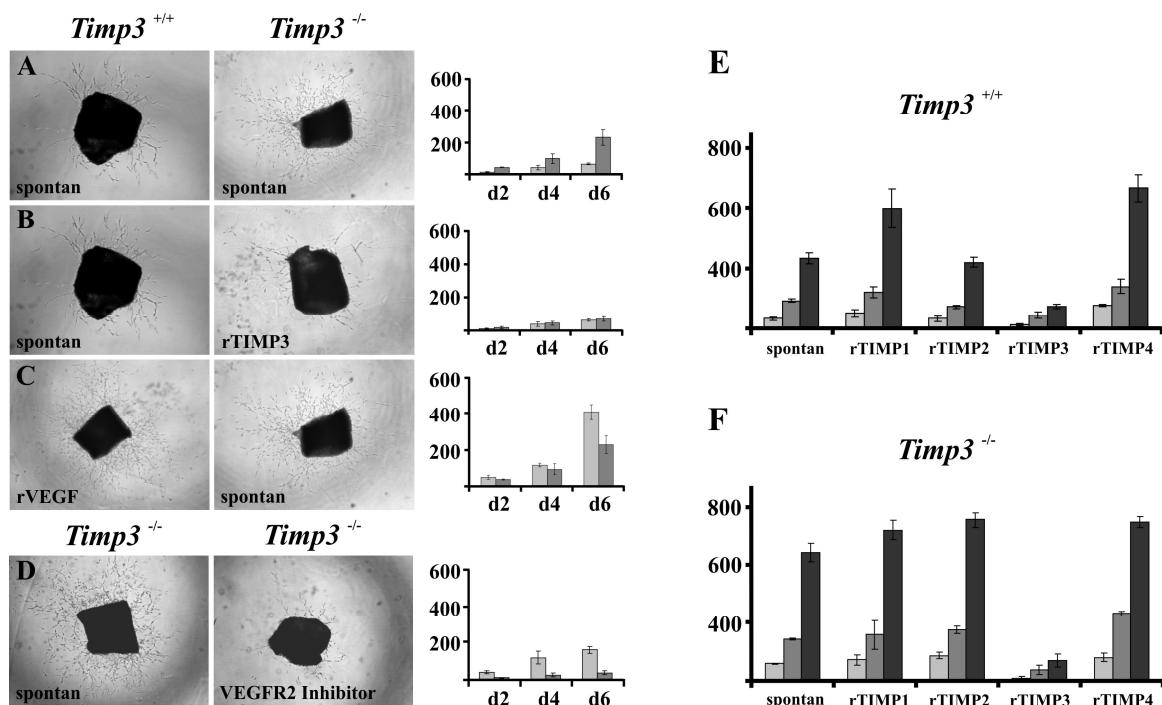


Abb. 17: Ein verstärktes Auswachsen von Pseudogefäßen bei Gewebeexplantaten der Aorten *Timp3*^{-/-} defizienter Mäuse wird durch unbalancierte VEGF-induzierte Angiogenese vermittelt. Aortenring-Assays zeigen (A) spontanes Gefäßwachstum in *Timp3*^{+/+} (KO1375) versus *Timp3*^{-/-} (KO1376) Aortenstückchen, (B) spontanes Gefäßwachstum in *Timp3*^{+/+} (KO1375) versus Gefäßwachstum in *Timp3*^{-/-} (KO1376) Aortenstückchen supplementiert mit rekombinantem *Timp3*, (C) Gefäßwachstum in *Timp3*^{+/+} (KO1375) Aorten supplementiert mit rekombinantem VEGF versus spontanem Gefäßwachstum in *Timp3*^{-/-} (KO1376) Aortenstückchen, (D) spontanes Gefäßwachstum in *Timp3*^{-/-} (KO1182) versus Gefäßwachstum in *Timp3*^{-/-} (KO1382) Aortenstückchen supplementiert mit VEGFR2-Inhibitor ZM323881. Eine Quantifizierung des Gefäßwachstums ist in den Graphen neben den dazugehörigen Photographien angegeben. (Die Photographien wurden an Tag 6 der Assays aufgenommen). Die hell und dunkel gezeichneten Säulen fassen die Daten von Tag 2, Tag 4 und Tag 6 zusammen; *d*, Tag. Kapillarwachstum von Aortenexplantaten von (E) *Timp3*^{+/+} oder (F) *Timp3*^{-/-} Aortenstückchen supplementiert mit rekombinantem rTIMP1-4. Die hell gezeichneten Säulen repräsentieren das Gefäßwachstum an Tag 2, die dunkel gezeichneten Säulen an Tag 4 und die schwarz gezeichneten Säulen an Tag 6 der Assays. Alle Daten sind Durchschnittswerte (*n* = 3); Balken, +/- SD; Y-Achse, Anzahl der Pseudogefäße/Aortenstückchen.

Dieser Effekt erscheint spezifisch für TIMP3, eine Zugabe von rekombinantem rTIMP1, rTIMP2 und rTIMP4 hatte keine hemmende Wirkung auf das Auswachsen von Pseudogefäßen in der *Timp3^{-/-}* Maus (Abb. 17E, F). Eine Behandlung von Wildtyp-Aortenstücken mit rekombinantem rVEGF erhöhte in Korrelation zum vorangegangenen Experiment das Kapillarwachstum auf das Niveau vergleichbar mit der spontanen Auswachsrate in den *Timp3*-defizienten Tieren (Abb. 17C). Zur Überprüfung der These, ob das Gefäßwachstum über den VEGF/VEGFR2-Signalweg vermittelt wird, wurden *Timp3^{-/-}* Aortenexplantate mit dem für den VEGFR2-spezifischen Inhibitor ZM323881 behandelt. Die Behandlung führte zu einer dramatischen Reduktion des Kapillarwachstums von mehr als 80 % des ursprünglichen Wertes (Abb. 17D). Zusammenfassend lassen diese Daten den Schluss zu, dass eine fehlende kompetitive Interaktion zwischen TIMP3 und VEGF um die Bindung an den VEGFR2 eine starke Auswachsaktivität von Pseudogefäßen in *Timp3^{-/-}* Aortenexplantaten zur Folge hat.

Zur Definierung der genauen Region des TIMP3-Proteins, die für die anti-angiogene Aktivität verantwortlich ist, wurde das Auswachsen neuer Kapillare bei einer Inkubation von *Timp3^{-/-}* Aortenstücken mit entweder dem wildtypischem TIMP3 (aa 1 - 188), dem N-terminalen Teil des Proteins (aa 1 - 121, TIMP3 Δ C), welcher die MMP-inhibitorische Domäne umfasst oder dem C-terminalen Teil (aa 122 - 188, TIMP3 Δ N) von TIMP3 verglichen (Abb. 18B - E). Die Zugabe von rekombinantem Volllänge sowie C-terminalem TIMP3 verhindert drastisch ein Neuauswachsen von Kapillaren auf ein Niveau, das noch unter der spontanen Auswachsrate von Wildtyp-Aortenstücken liegt (Abb. 18A).

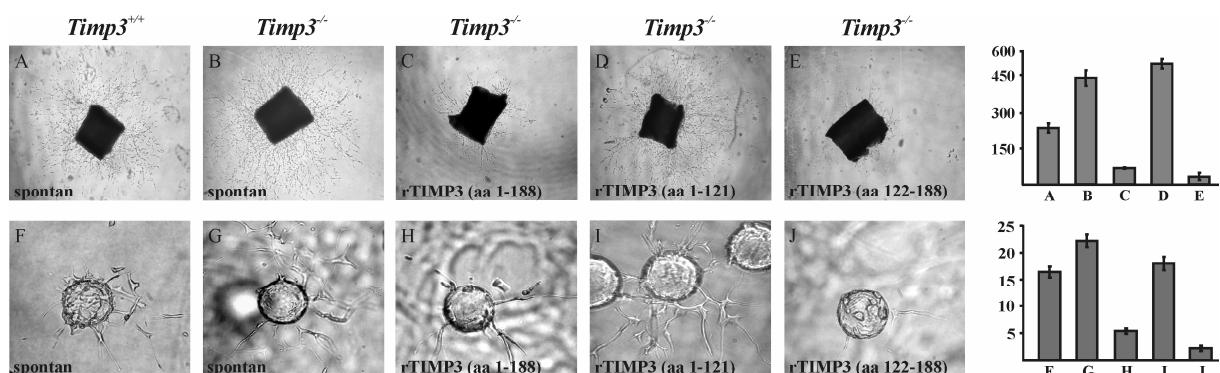


Abb. 18: Die antiangiogene Wirkung auf die Bildung kapillarer Pseudogefäße wird durch den TIMP3 C-Terminus vermittelt. (A-E) Aortenring- und (F-J) Fibrin Bead Assays wurden verwendet, um die für die anti-angiogene Aktivität verantwortliche Region im TIMP3 Protein zu definieren. Die Angiogenese in *Timp3^{-/-}* versus *Timp3^{+/+}* Mäusen wurde durch (A und B) Gefäßauswachsen und (F und G) Gefäßneubildung gemessen. Eine erhöhte angiogene Aktivität in *Timp3^{-/-}* Mäusen konnte signifikant durch die Applikation von rekombinantem Volllänge TIMP3 (aa 1-188) (C und H) oder dem C-terminalen Teil von TIMP3 (aa 122-188) (E und J) geblockt werden. Die Quantifizierung des Auswachsens (Y-Achse, Anzahl der Pseudogefäße/Aortenstückchen) und Gefäßneubildung (Y-Achse, Gefässauswüchse/Bead) ist in den Graphen neben den Photographien dargestellt. Alle Daten sind Durchschnittswerte ($n = 3$); Balken, +/- SD.

Der N-Terminus von TIMP3 zeigte keine inhibitorische Aktivität in Bezug auf das Gefäßwachstum (Abb. 18D). Bei einer Beurteilung der Angiogenese durch den *Fibrin Bead Assay* konnte nachgewiesen werden, dass isolierte *Timp3^{-/-}* AECs korrelierend mit den Befunden des Aortenring-Assay ebenfalls eine signifikant erhöhte Bildung von kapillaren Pseudogefäßen im Vergleich zu Wildtyp-AECs fördern (Abb. 18F,G). Die Applikation von rekombinantem Volllänge und C-terminalem TIMP3 konnte analog zu den vorangegangenen Versuchen die Bildung neuer Kapillaren drastisch reduzieren (Abb. 18F - H). Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass die C-terminale Domäne von TIMP3 alleine ausreichend ist, die anti-angiogenen Eigenschaften des TIMP3-Proteins auszuüben.

1.2.3 Zymographischer Nachweis der MMP-Aktivität in AEC-Zellextrakten

Zur Klärung der Frage, ob eine erhöhte MMP2- und MMP9-Aktivität auch im Modellsystem der Aortenendothelzellen ein entscheidender Faktor im erhöhten Angiogenesestatus der *Timp3^{-/-}* Maus darstellt, wurden Zymogramme mit AEC-Zellextrakten durchgeführt (Abb. 19). Sowohl die pro- als aktivierte Formen der Metalloproteininasen 2 und 9 konnten zymographisch nachgewiesen werden, wobei keine Unterschiede in der Stärke der Banden zwischen

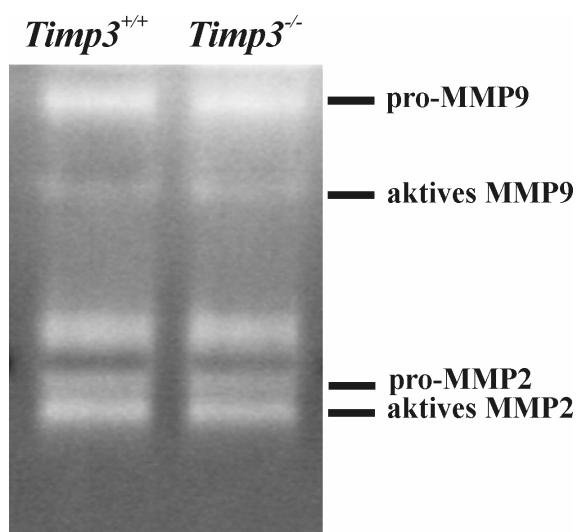


Abb. 19: Zymographischer Nachweis der MMP2- und MMP9-Aktivität in AECs. Gesamtproteinextrakte (n = 3) kultivierter AECs von *Timp3^{+/+}* und *Timp3^{-/-}* Aortenexplantaten wurden in einem Gelatine-enthaltenden SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Eine proteolytische Aktivität der Metalloproteasen führt zu einem Verdau der Gelatine, die Stellen, an denen die MMPs aktiv sind, sind als weiße Banden zu erkennen. Die pro- und aktivierte Formen von MMP2 und 9 konnten nachgewiesen werden. Es bestehen keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *Timp3^{-/-}* AECs.

Wildtyp und *Timp3^{-/-}* Tieren festgestellt wurden (Abb. 19). Unterschiede in der MMP-Aktivität, die durch Limitationen im Auflösungsvermögen dieser Methode nicht aufgedeckt werden können, scheinen im Modellsystem der AECs von eher untergeordneter Bedeutung. Eine stark erhöhte Angiogenese in *Timp3^{-/-}* AECs lässt sich durch diesen Befund nicht erklären.

1.2.4 Überprüfung des VEGF/VEGFR2-Signalwegs durch Western Blotting

VEGF ist durch die Aktivierung des für dieses Molekül spezifischen Tyrosinkinase Rezeptors VEGFR2 auf der Oberfläche von Endothelzellen und sukzessiv aktiverter *downstream* Signalmoleküle in der Lage, eine Reihe unterschiedlicher endothelialer Zellfunktionen zu vermitteln. Zum weiteren Verständnis, inwieweit ein Fehlen von TIMP3 die VEGF-vermittelte Angiogenese verstärkt, wurden die Effekte der *TIMP3*-Defizienz in AECs von *Timp3^{-/-}* Mäusen in Bezug auf die Aktivierung des VEGF/VEGFR2 Signalwegs genauer untersucht. Immunoblot Analysen zeigten eine erhöhte Autophosphorylierung von VEGFR2 in nicht stimulierten AECs von *Timp3^{-/-}* Tieren, während eine Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) ERK1/2 und p38, beides detailliert beschriebene *downstream* Moleküle von VEGFR2, in *Timp3^{-/-}*-AECs im Vergleich zu Wildtyp-AECs vermindert waren (Abb. 20, linke Hälfte).

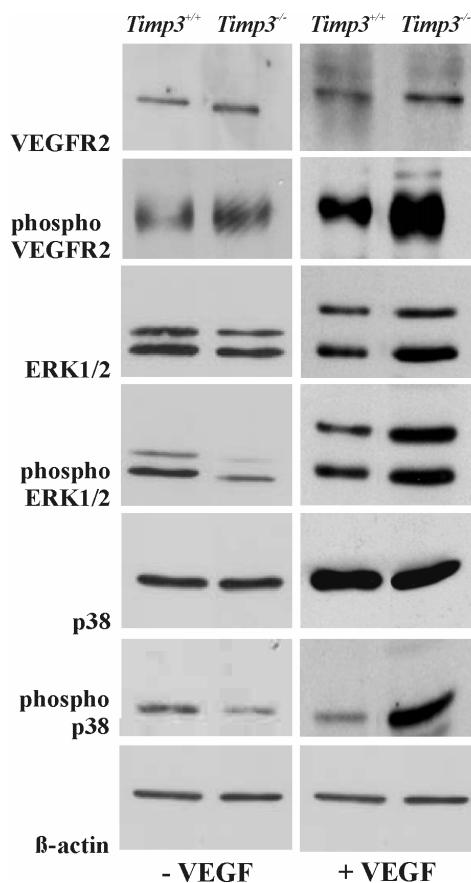


Abb. 20: Analyse VEGF-induzierter Signalwege. Gesamtproteinextrakte kultivierter AECs von *Timp3^{+/+}* und *Timp3^{-/-}* Aortenexplantaten wurden mit Antikörpern gegen VEGF-downstream Signalmoleküle immungeblottet (n = 3). Immunoblots mit Antikörpern gegen β-Actin dienten als Ladekontrolle gleicher Proteinmengen. In einem Set von Experimenten wurden die AECs mit 10 ng/ml rekombinantem VEGF stimuliert.

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die *TIMP3*-Defizienz eine konstitutive Aktivierung von VEGFR2 bedingt, während eine Aktivierung von ERK1/2 und p38 unterbunden wird. Das Fehlen von *Timp3* hatte keinen Einfluss auf die Proteinmenge von dephosphoryliertem

VEGFR2, ERK1/2 und p38. Im Gegensatz dazu resultierte eine Stimulation der AECs mit rekombinantem VEGF in erhöhte Autophosphorylierungen von VEGFR2 und den dazugehörigen downstream Molekülen ERK1/2 und p38 in *Timp3^{-/-}* versus Kontroll-AECs (Abb. 20, rechte Hälfte). Zusammenfassend zeigen die Befunde eine unbalancierte Aktivierung VEGF-induzierter VEGF/VEGFR2-Signalwege, welche durch das Fehlen von TIMP3 hervorgerufen wird. Eine Signalkaskade, die durch VEGFR2 ausgelöst wird, ist in der Literatur häufig für angiogene Prozesse als ursächlich beschrieben worden.

2. Funktionelle Untersuchungen zur Rolle von mutantem *Timp3-S156C* bei angiogenen Vorgängen

2.1 Aortenring-Assay

In vorangangenen Studien konnte gezeigt werden, dass TIMP3 einen potentiellen Angiogenese-Inhibitor darstellt (Anand-Apte *et al.* 1997). Diese anti-angiogene Wirkung wird durch eine TIMP3-vermittelte kompetitive Blockierung der VEGF/VEGFR2 Bindung ausgeübt (Qi *et al.* 2003). Choroidale Neovaskularisation ist eines der Hauptcharakteristika in der SFD-Pathogenese und könnte durch die Aktivierung von Angiogenese-spezifischen Signalwegen durch mutiertes TIMP3 ausgelöst werden.

Eine wesentliche Zielsetzung dieser Arbeit war es, Störungen von funktionellen Mechanismen/Reaktionswegen bei einer *Timp3*-Defizienz (*Timp3* knock-out Maus) zu definieren, um diese dann gezielt auf eine entsprechende Funktionalität in der *Timp3* knock-in Maus (*S156C*) zu überprüfen. Damit soll geklärt werden, ob selektive Funktionsdefizite von TIMP3 dem Pathomechanismus der SFD zugrunde liegen.

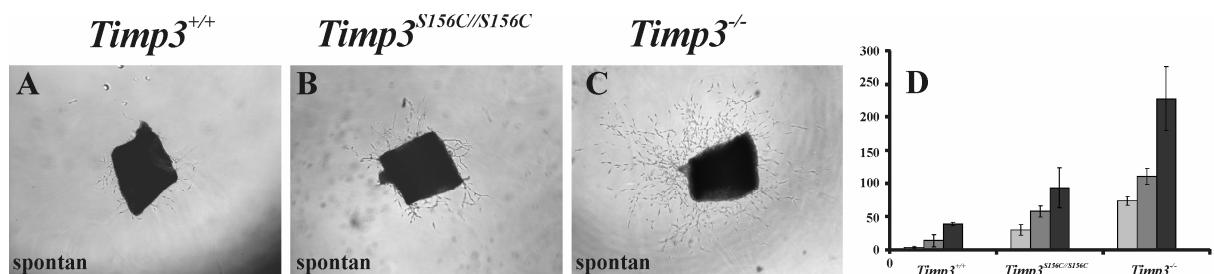


Abb. 21: TIMP3-S156C homozygote Aortenexplantate zeigen keine signifikant erhöhte Auswachsraten an Pseudogefäßen. Aortenring-Assays zeigen spontanes Gefäßwachstum in (A) *Timp3^{+/+}* (CD1168) Aortenstückchen, (B) in *Timp3^{S156C/S156C}* (CD1164) und (C) *Timp3^{-/-}* (KO1366) Aortenstückchen. (D) Quantifizierung des Gefäßwachstums. Die Photographien wurden an Tag 6 der Assays aufgenommen. Die hell gezeichneten Säulen repräsentieren das Gefäßwachstum an Tag 4, die dunkel gezeichneten Säulen an Tag 6 und die schwarz gezeichneten Säulen an Tag 8 der Assays. Alle Daten sind Durchschnittswerte ($n = 3$); Balken, +/- SD; Y-Achse, Anzahl der Pseudogefäße/Aortenstückchen. Die Auswachsraten sind in *Timp3^{S156C/S156C}* Tieren im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht, bleiben jedoch deutlich unter dem Niveau *Timp3*-defizienter Aortenstücke.

Es wurde daher untersucht, inwieweit die SFD-assoziierte *S156C*-Mutation die anti-angiogenen Eigenschaften des TIMP3 beeinflusst. Parallel zu den Versuchen der *Timp3*-defizienten Maus wurde der Aortenring-Assay auch bei homozygot-mutanten *S156C*-Tieren durchgeführt (Abb.21). Es zeigte sich eine leicht erhöhte spontane Auswachsrate von Endothelzellen aus den mutanten Aortenstücken im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 21B, D), die aber deutlich unter dem Niveau der Auswachsrate von Pseudogefäßwachstums in der *Timp3*^{-/-} Maus (Abb. 21C) liegt.

2.2 Fibrin Bead Assay

Analog den Versuchen des Aortenring-Assay wurde in *Fibrin Bead Assays* das spontane Gefäßneubildungsverhalten muriner Wildtyp, *Timp3-S156C knock-in* und *Timp3*-defizienter Endothelzellen verglichen (Abb. 22). Gegenüber der leicht erhöhten Proliferation von *Timp3*^{S156C/S156C} ECs aus Aortenstückchen (Abb. 22B), konnte dieser Unterschied auf Bead Assay Ebene bei der spontanen Gefäßneubildung in homozygoten *Timp3-S156C knock-in*

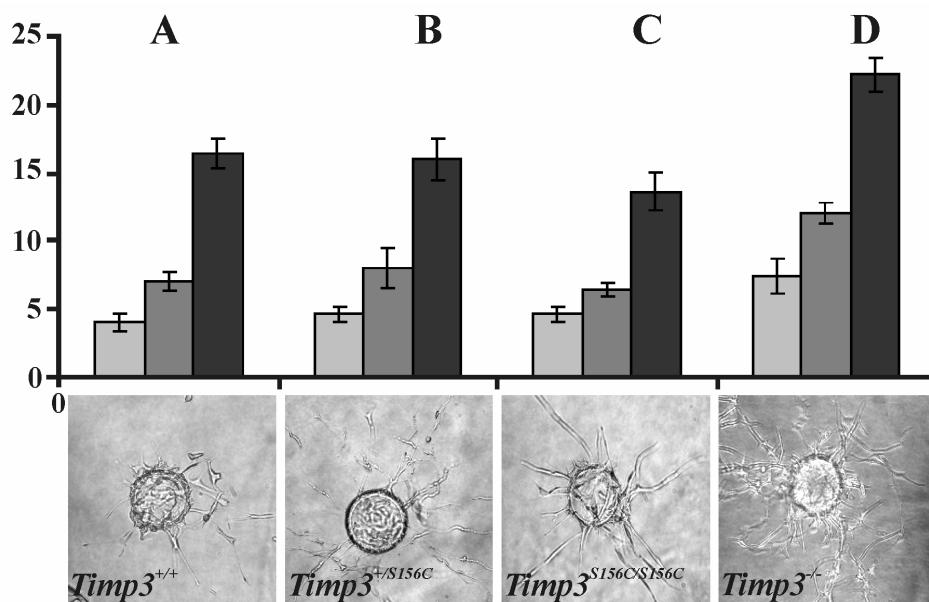


Abb. 22: Spontane Gefäßneubildungsrate von *Timp3*^{+/+}, *Timp3*^{+/S156C}, *Timp3*^{S156C/S156C} und *Timp3*^{-/-} AECs. Fibrin Bead Assays wurden verwendet, um einen möglichen Effekt der *Timp3-S156C* Mutation auf die spontane Gefäßneubildungsrate von (A) *Timp3*^{+/+}, (B) *Timp3*^{+/S156C}, (C) *Timp3*^{S156C/S156C} und (D) *Timp3*^{-/-} AECs zu untersuchen. Die Bilder stammen von Tag 6 des Assays. Die hellgrauen Säulen repräsentieren das Gefäßwachstum an Tag 2, die mittelgrauen Säulen an Tag 4 und die dunkelgrauen Säulen an Tag 6 der Assays. Alle Daten sind Durchschnittswerte ($n = 5$); Balken, +/- SD; Y-Achse, Anzahl der Gefäßauswüchse/Bead. Es sind keine Unterschiede in der Gefäßneubildungsrate im Vergleich zu Wildtyp AECs bei *Timp3*^{+/S156C} und *Timp3*^{S156C/S156C} AECs festzustellen.

ECs nicht mehr festgestellt werden. Die Entstehung neuer Pseudogefäße an Mikroträgerkugeln zeigte für *Timp3*^{+/+}, *Timp3*^{+/S156C} und *Timp3*^{S156C/S156C} AECs über einen Zeitraum von 6 Tagen ein weitgehend gleiches Niveau ohne signifikante Unterschiede (Abb. 22A, B, C), während die spontane Gefäßneubildung von *Timp3*^{-/-} AECs gegenüber den

anderen AEC-Zelllinien deutlich verstärkt wahrzunehmen war (Abb. 22D). Des Weiteren wurden Experimente durchgeführt, um die inhibitorische Wirkung von extern zugefügtem, rekombinantem rS156C-TIMP3 auf die Gefäßneubildung aller AEC-Zelllinien zu testen (Abb. 23). Eine Applikation von rS156C-TIMP3 in das Medium der unterschiedlichen AECs, die an Mikrokugeln immobilisiert wurden, resultierte in verminderter Gefäßneubildungsrate aller Zelllinien leicht unter das Niveau spontanen Auswachsens.

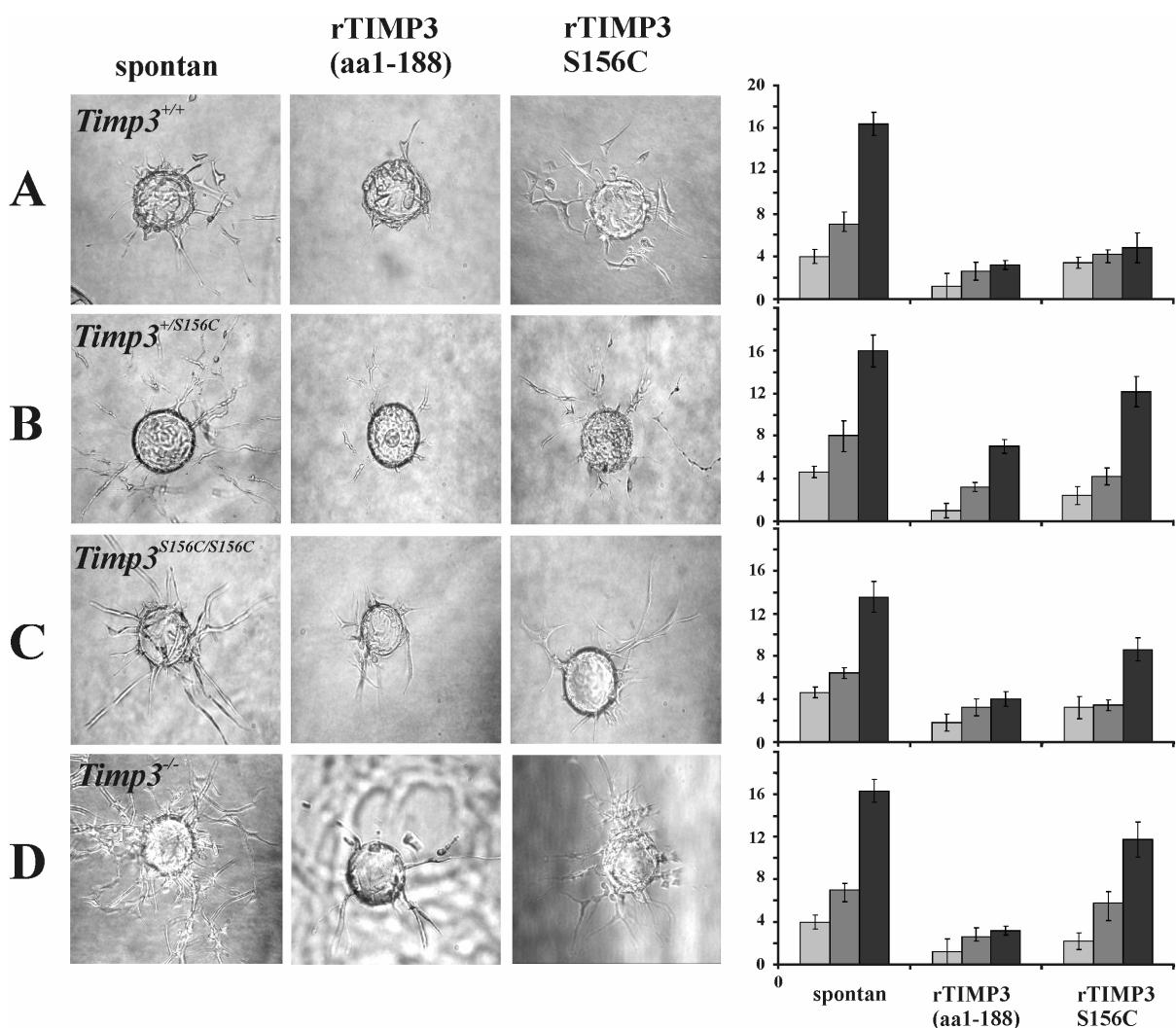


Abb. 23: Einfluss von rTIMP3-S156C auf die Gefäßneubildung von *Timp3*^{+/+}, *Timp3*^{+/S156C}, *Timp3*^{S156C/S156C} und *Timp3*^{-/-} AECs. Fibrin Bead Assays wurden verwendet, um den Effekt der S156C-Mutation auf die anti-angiogene Aktivität von TIMP3 bei der Gefäßneubildung von (A) *Timp3*^{+/+}, (B) *Timp3*^{+/S156C}, (C) *Timp3*^{S156C/S156C} und (D) *Timp3*^{-/-} AECs zu detektieren. AECs der unterschiedlichen Genotypen wurden mit Volllänge rTIMP3 (aa 1-188) (Positivkontrolle) (mittlere Säule) und rTIMP3-S156C (hintere Säule) supplementiert. Als Negativkontrolle dient die spontane Auswachsraten (vordere Säule). Die Photographien wurden an Tag 6 der Assays aufgenommen. Eine Quantifizierung der Daten ist in den Graphen hinter der jeweiligen experimentellen Serie angegeben. Die hell gezeichneten Säulen repräsentieren das Gefäßwachstum an Tag 2, die dunkel gezeichneten Säulen an Tag 4 und die schwarz gezeichneten Säulen an Tag 6 der Assays. Alle Daten sind Durchschnittswerte ($n = 5$); Balken, +/- SD; Y-Achse, Anzahl der Gefäßauswüchse/Bead. Im System Bead Assay ist ein geringer inhibitorischer Effekt von S156C-mutiertem TIMP3 festzustellen, der jedoch nicht die Wirksamkeit des Volllängen, TIMP3 (aa 1-188) erreicht.

Ein Vergleich mit der Wirkung des Wildtyp-Volllänge-TIMP3 legte jedoch eine leicht eingeschränkte Wirkung der anti-angiogenen Eigenschaften des mutierten S156C-TIMP3 offen (Abb. 23A-D). Diese Daten korrelieren mit der Detektion einer leicht erhöhten Pseudogefäßauswachsrate von *Timp3-S156C knock-in* Aortenstückchen (Abb. 23B).

2.3 Überprüfung des VEGF/VEGFR2-Signalwegs durch Western Blotting

Die vorangegangenen Versuche deuten darauf hin, dass *S156C*-mutiertes TIMP3 eine reduzierte Funktionalität im VEGF/VEGFR2 Reaktionsweg besitzt. Möglicherweise ist die kompetitive Bindung von mutantem TIMP3 an den VEGFR2 Rezeptor aufgrund der aberranten Faltung des maturen Proteins beeinträchtigt. Im VEGF-stimulierten und nicht stimuliertem Zustand ist der VEGFR2 Rezeptor in *Timp3^{+/S156C}* und *Timp3^{S156C/S156C}* AECs gegenüber dem Wildtyp stärker phoshoryliert. Es wurde weiterhin geprüft, ob die erhöhte Auswachsrate mit einer erhöhten Phosphorylierung/Aktivierung des ERK1/2 und p38 MAP-Kinasewegs einhergeht (Abb. 24).

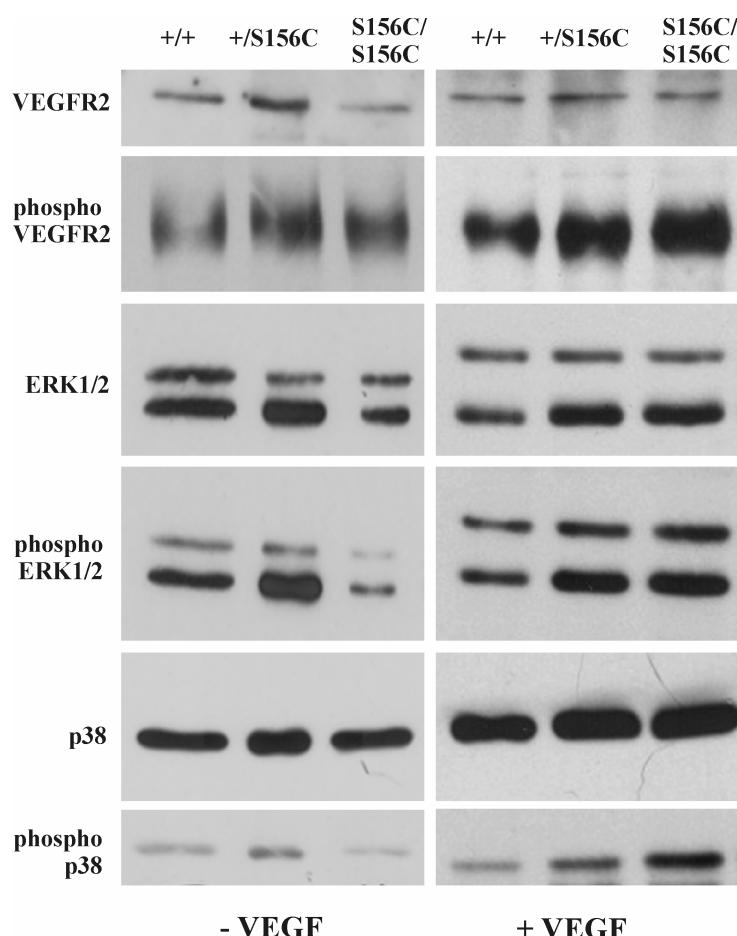


Abb. 24: Analyse VEGF-induzierter Signalwege in *Timp3-S156C knock-in* Maus. Gesamtproteinextrakte kultivierter AECs von *Timp3^{+/+}*, *Timp3^{+/S156C}* und *Timp3^{S156C/S156C}* Aortenexplantaten wurden mit Antikörpern gegen VEGF-downstream Signalmoleküle immungeblottet. In einem Set von Experimenten wurden die AECs mit 10 ng/ml rekombinantem VEGF stimuliert (rechte Hälfte der Blots).

Für ERK1/2 ist keine signifikante Abweichung der Phosphorylierung bei nicht stimulierten Wildtyp und *Timp3^{t/S156C}* AECs zu erkennen (Abb. 24, linke Hälfte). Die Phosphorylierung bei *Timp3^{S156C/S156C}* AECs ist demgegenüber deutlich verringert. Eine Stimulation mit rekombinantem VEGF führt zu einer erhöhten ERK1/2 Aktivierung bei den mutanten Endothelzellen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 24, rechte Hälfte) Im Unterschied zu ERK1/2 zeigt das Phosphorylierungsprofil von p38 ein abweichendes Muster. Die basale Menge an phosphoryliertem p38 ist in allen Genotypen relativ gering und schwer zu detektieren (Abb. 24, linke Hälfte). VEGF-stimulierte heterozygote und homozygote *S156C knock-in* AEC Proteinpräparate zeigen demgegenüber eine deutlich erhöhte Phosphorylierung von p38 im Vergleich zu Wildtyp-AECs. (Abb. 24, rechte Hälfte).

3. Charakterisierung der *Timp3-S156C* Maus auf CD1-Hintergrund

In vorangegangenen Arbeiten wurde das SFD-Mausmodell auf einem genetisch reinen C57BL/6-Hintergrund (*knock-in* der Patienten relevanten *missense*-Mutation *S156C* an orthologer Position des murinen *Timp3*) histologisch, immunohistochemisch und biochemisch umfassend charakterisiert (Weber *et al.* 2002). Auf dem C57BL/6-Hintergrund konnte gezeigt werden, dass heterozygote *knock-in* Tiere einen mildereren Augenphänotyp im Vergleich zum Menschen entwickeln, wobei primär das RPE betroffen ist mit auffallenden Veränderungen in der Organisation der basalen Mikrovilli. Um die Expression der *S156C*-Mutation auf einem weiteren genetischen Hintergrund zu überprüfen, wurde die ursprüngliche *Timp3-S156C* C57BL/6-Linie über 8 Generationen auf den CD1-Auszuchtstamm gekreuzt.

3.1 In vivo SLO-Aufnahmen

Obenflächen- und Autofluoreszenzaufnahmen (erstellt in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Mathias Seeliger, Universitätsaugenklinik Tübingen, AG Retinale Funktionsdiagnostik, 72076 Tübingen) von 12 Monate alten CD1-*Timp3-S156C knock-in* Tieren mit grünen (514 nm) und blauen (488 nm) Laserwellenlängen (Abb. 25, 1. und 2. Spalte) offenbarten eine partiell fleckige Darstellung des Fundus aufgrund von Pigmentverlusten des RPE (Abb. 25B, D; AF). Diese Veränderungen sind jedoch auf den genetischen CD1 -Hintergrund zurückzuführen und nicht durch die *Timp3*-Mutationen bedingt. Die Netzhaut weist einen regulären strukturellen Aufbau zwischen Photorezeptoren, RPE und dem Choroid auf. Bei einem Tiefen-Scan der Retina mit Hilfe der Indocyanin- und Fluoreszenzangiographie zeigte das Choroid ein völlig gesundes Erscheinungsbild der retinalen Blutversorgung. Die Gefäße waren schlank und deutlich voneinander getrennt. Der Augenfundus wird durch die ein- und abfließenden Arterien und Venen in vier ungefähr gleich große Quadranten aufgeteilt, die keinerlei pathologische Veränderungen im Gegensatz zu den massiven Störungen der

Gefäßstruktur in der *Timp3*-defizienten Maus erkennen ließen. Dies unterstützt die Befunde, dass die *S156C*-Mutation nicht unmittelbar die anti-angiogenen Eigenschaften des TIMP3-Proteins beeinflusst.

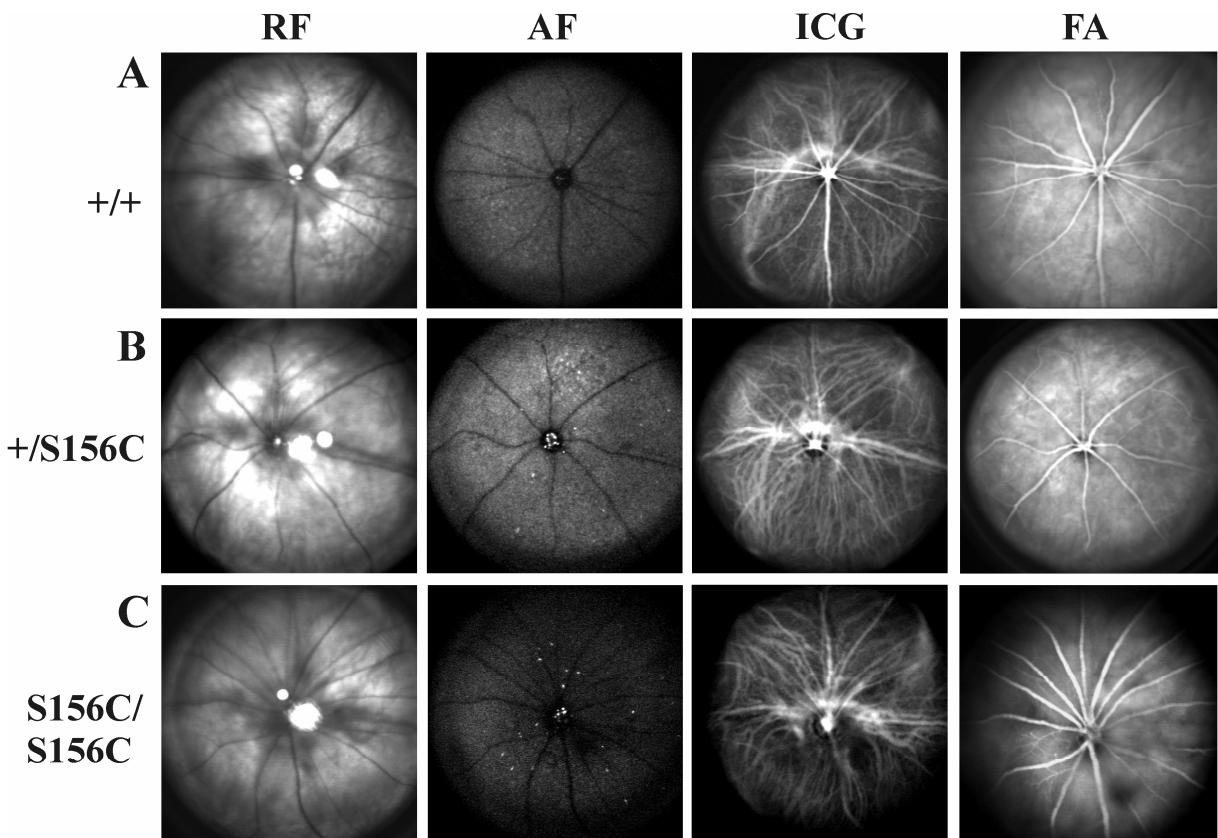


Abb. 25: Retinale SLO-Aufnahmen des gesamten Augenfundus von 12 Monate alten *Timp3*^{+/+}, *Timp3*^{+/S156C} und *Timp3*^{S156C/S156C} knock-in Mäusen. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Mathias Seeliger zur Verfügung gestellt. Infrarot (RF, 524,5 nm), Autofluoreszenz (AF, 488 nm), Indocyaningrün Angiographie (ICGA) und Fluoreszenz Angiographie- (FA) Aufnahmen des Augenfundus von (A) *Timp3*^{+/+} (CD682), (B) *Timp3*^{+/S156C} (CD683) und (C) *Timp3*^{S156C/S156C} (CD687) knock-in Mäusen bei 20° Lasereinstellung (n = pro Genotyp). Die SLO-Aufnahmen bei den unterschiedlichen Laser-Wellenlängen offenbaren keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Genotypen. Eine verstärkte Pigmentierung in der Autofluoreszenz ist auf den CD1-Hintergrund zurückzuführen und nicht durch die *Timp3* Mutation bedingt.

3.2 Licht- und Elektronenmikroskopie

Im Vergleich zur *Timp3*^{+/S156C}-Linie auf C57BL/6-Hintergrund weist die *Timp3*^{+/S156C} Maus auf CD1-Hintergrund nun distinkte morphologische Veränderungen mit großen Ähnlichkeiten zum klinischen Bild der SFD auf. Histologische Untersuchungen (Abb. 26A - F) von Semidünn-Schnitten der Retina von 8 Monate alten *Timp3*^{+/S156C} Mäusen zeigen knotenartig verdickte und in das RPE verlängerte Bereiche der BM (Abb. 26E, schwarze Pfeile), die in Wildtyp Geschwisterkontrollen nicht gefunden werden konnten (Abb. 26D). Die BM von Tieren, in denen das mutierte *Timp3*-Allel homozygot vorliegt, zeigte ebenfalls auffällige Bereiche, die auf vergleichbare pathologische Veränderungen an der Grenze zum RPE (Abb.

26F, schwarze Pfeile) hindeuten. Diese Befunde ließen sich auf transmissionselektronenmikroskopischer Ebene nicht bestätigen (Abb. 27F). Die weitaus weniger prominenten morphologischen Unterschiede der BM *Timp3^{S156C/S156C}* Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren sind vermutlich auf eine gewisse „normale“ phänotypische Varianz der BM zurückzuführen, da Schnittartefakte im Bereich der BM sowie Differenzen bei der Gewebeaufarbeitung ausgeschlossen werden konnten. Transmissionselektronische Analysen derselben Region an Ultradünn-Schnitten der unterschiedlichen Genotypen verdeutlichten, dass vorwiegend die BM betroffen ist, die normalerweise aus jeweils einer basalen Membran vom RPE sowie von der Choriokapillaris und zwei dazwischen liegenden kollagenen Schicht mit einer zentralen elastischen Faserschicht zusammengesetzt ist. Die BM von *Timp3^{+/S156C}* Tieren ist durch eine auffällige Desorganisation gekennzeichnet (Abb. 27B - E).

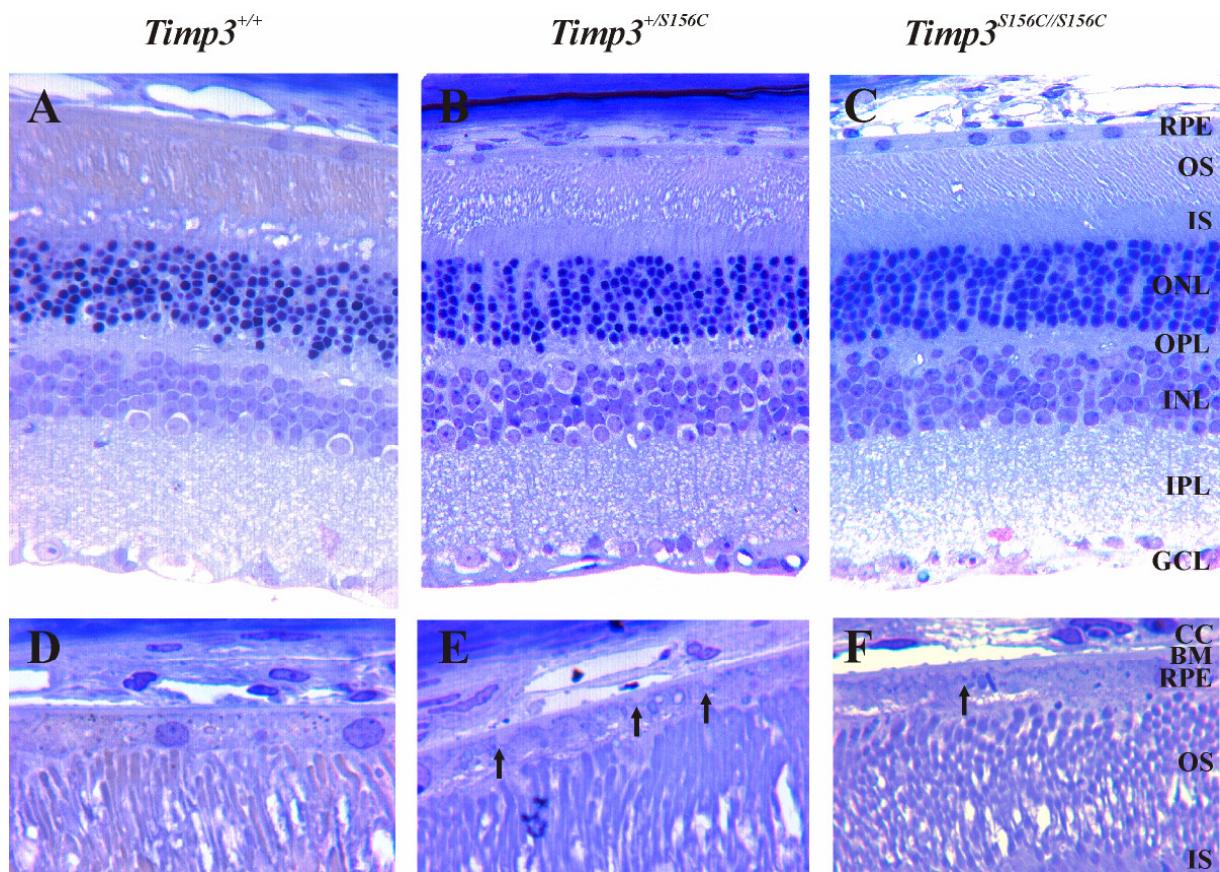


Abb. 26: Lichtmikroskopische Untersuchungen von Wildtyp und *Timp3-S156C knock-in* Mäusen. (A - C) 40-fache Vergrößerungen von Semidünn-Übersichtsschnitten ($\leq 1\mu\text{m}$) der Netzhäute 2 Monate alter *Timp3^{+/+}* (CD1102), *Timp3^{+/S156C}* (CD700) und *Timp3^{S156C/S156C}* (CD1101) Mäuse wurden durch Lichtmikroskopie ausgewertet. (D - F) Semidünn Schnitte der Netzhäute 8 Monate alter *Timp3^{+/+}*, *Timp3^{+/S156C}* und *Timp3^{S156C/S156C}* Mäuse ausgewertet bei 100-facher Vergrößerung. CC, Choriokapillaris; BM, Bruchsche Membran; RPE, Retinales Pigmentepithel; OS, Äußere Photorezeptorsegmente; IS, Innere Photorezeptorsegmente; ONL, äußere Kernschicht; INL, innere Kernschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellen. Die BM von *Timp3^{S156C/S156C}* Tieren weist deutliche pathologische Veränderungen in Form von knoten förmigen *Timp3^{+/S156C}* sub-RPE Ablagerungen (E, schwarze Pfeile) auf.

Die vom RPE gebildete Basalmembran fehlt vollständig, aber auch die zentrale elastische Schicht weist deutliche pathologische Veränderungen auf. Eine scharf abgegrenzte, für die

Elastika charakteristische Ansammlung elektronendichten Materials in der Mitte der BM, ist nicht mehr zu identifizieren. Insgesamt erscheint die extrazelluläre Lage als amorphe, gräuliche Masse. Diese Auflösung der regulären, fünfschichtigen Struktur der BM führt folglich zu einem Einströmen von extrazellulärem Material in das basale Labyrinth der RPE Mikrovilli. Die dem RPE abgewandte Hälfte der BM in Richtung Choriokapillaris ist hingegen vollständig erhalten. Die Basallamina der Choriokapillaris sowie die korrespondierende, elektronendurchlässige, kollagene Schicht sind deutlich zu differenzieren.

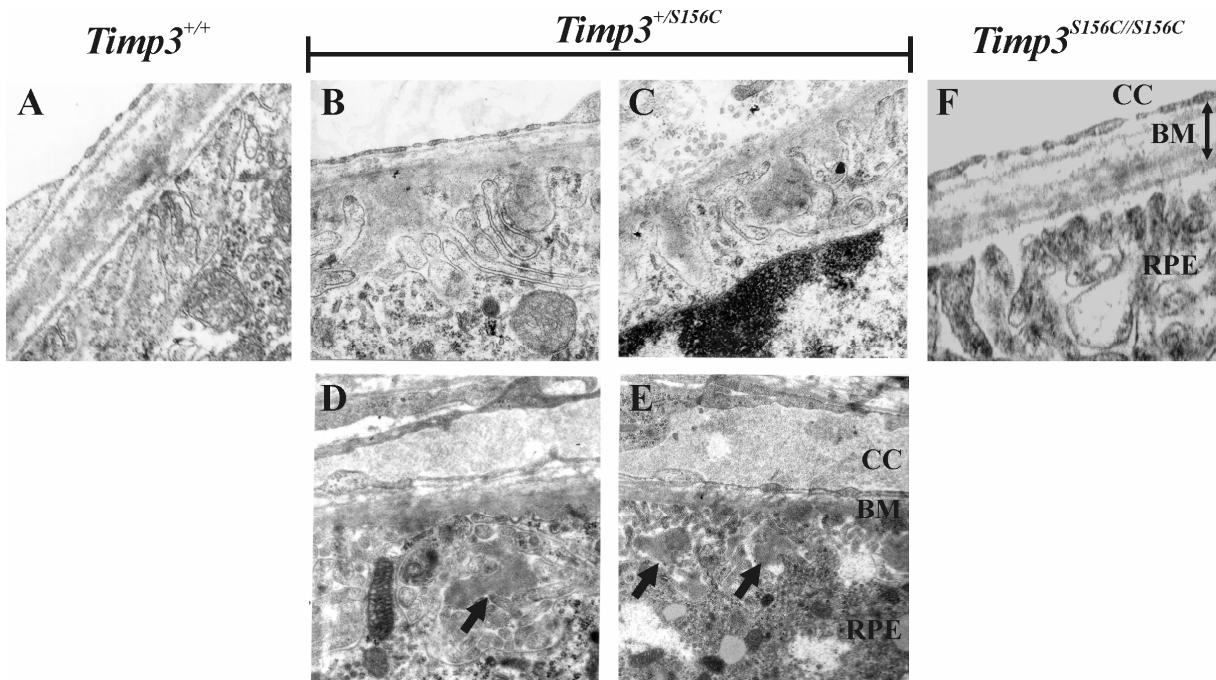


Abb. 27: Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Wildtyp und *Timp3-S156C knock-in* Mäusen. (A - F) Ultradünn-Schnitte (ca.50 nm) des Komplex RPE/Bruchsche Membran/Choriokapillaris von 2 Monate alten *Timp3^{+/+}*(CD1102), *Timp3^{+/S156C}* (CD700 (B, C), CD1106 (D, E))und *Timp3^{S156C/S156C}* (CD1107) Mäuse in 20.000-facher Vergrößerung und 8.000-facher Vergrößerung (D und E) (n = 3 pro Genotyp). CC, Choriokapillaris; BM, Bruchsche Membran; RPE, Retinales Pigmentepithel; OS, Äußere Photorezeptorsegmente; IS, Innere Photorezeptorsegmente. Die BM von *Timp3^{+/S156C}* Tieren weist starke pathologische Veränderungen (B – E, schwarze Pfeile) auf. Die Basallamina des RPE ist aufgelöst, und extrazelluläres Material der BM fließt in das basale Labyrinth der RPE Zell-Mikrovilli.

3.2.1 *Timp3-* und *Elastin-Immunohistochemie*

Spezifische Antikörperfärbungen gegen Timp3 und Elastin (Abb. 28) ermöglichen eine Lokalisation dieser Proteine im Komplex RPE/BM/Choriokapillaris an Kryoschnitten von *Timp3-S156C knock-in* Tieren. Mit dieser Methode sollte überprüft werden, ob die in Abb. 27 beschriebenen Veränderungen in der *Timp3^{+/S156C}* BM mit diesen beiden Molekülen assoziiert sind, und inwieweit die phänotypische Auswertung der Antikörperfärbungen mit den beobachteten Pathologien in der Licht- bzw. Elektronenmikroskopie korrelieren. Die immunhistochemische Färbung gegen Timp3 ermöglichte eine distinkte, scharf abgegrenzte Darstellung der BM und teilweise der Choriokapillaris in allen drei Genotypen. Signifikante

Unterschiede sowohl in der Schichtdicke als auch in der Signalstärke der Timp3-Antikörperfärbung in der BM im Vergleich der einzelnen Genotypen untereinander konnten auf diesem Niveau nur schwer

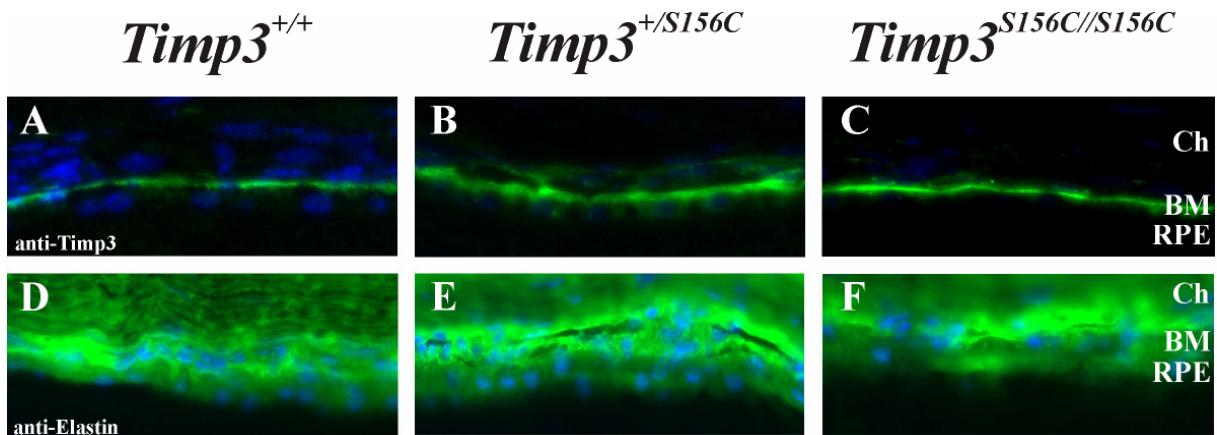


Abb. 28: Immunohistochimischer Nachweis von Timp3 und Elastin an retinalen Kryoschnitten von *Timp3-S156C knock-in* Mäusen. 10 µm Kryoschnitte der Nezhäute 18 Monate alter *Timp3^{+/+}* (CD1130) (A und D) *Timp3^{+/-S156C}* (CD1133) (B und E) und *Timp3^{S156C/S156C}* (CD1132) (C und F) inkubiert mit anti-Timp3 El-2 (1:2500, obere Hälfte) und anti-Elastin (1: 200, untere Hälfte) in 40-facher Vergrößerung. Zur Visualisierung wurde ein fluoreszenzgekoppelter Ziege anti-Kaninchen Alexa488 gekoppelter sekundärer Antikörper (grün) verwendet. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau) (n = 3 pro Färbung und Genotyp). BM, Bruchsche Membran; RPE, Retinales Pigmentepithel; ONL, Äußere Kernschicht; INL, Innere Kernschicht; GC, Ganglienzellschicht. In der *Timp3^{+/-S156C}* Retina zeigt eine Färbung mit Timp3 ein deutliches Signal der BM sowie ein diffuses Signal um die Zellkerne des RPE. Die Elastin Färbung zeigt in allen Genotype ein schwer zu differenzierendes diffuses Signal vom RPE bis hinein in die Sklera.

festgestellt werden (Abb. 28A - C). Auffälligerweise war jedoch eine Verlagerung des Fluoreszenzsignals mehr zur inneren Retina hin um die Kerne des RPE bei *Timp3^{+/-S156C}* Mäusen zu beobachten (Abb. 28B). Dies deutet auf eine möglicherweise erhöhte Proteinmenge und/oder eine Fehllokalisierung von Timp3 in der S156C heterozygoten BM hin. Zur Überprüfung einer erhöhten intrazellulären Timp3-Proteinkonzentration in der *Timp3^{+/-S156C}* Maus wurden *Timp3-S156C knock-in* Fibroblastenkulturen immunocytochemisch untersucht (Abb. 29A-C). In *Timp3^{+/-S156C}* Fibroblasten ist eine gegenüber dem Wildtyp und der homozygoten Mutante deutlich erhöhte Akkumulation von Timp3 um die Zellkerne, möglicherweise im ER lokalisiert, zu erkennen. Korrespondierende Western Blot Analysen der EZM dieser Fibroblasten zeigten zudem stark erhöhte Proteinmengen in der EZM von *Timp3^{+/-S156C}* und *Timp3^{S156C/S156C}* Mäusen im Vergleich zum Wildtyp.

Die Antikörperfärbung des elastischen Netzwerks resultierte in starken, schwer zu differenzierenden Signalen vom RPE bis in die Sklera hinein. Besonders deutlich zeichnet sich eine Färbung der choroidalen Gefäße ab (Abb. 28D - E). Unterschiede im Färbemuster im Vergleich der drei Genotypen konnten nicht aufgedeckt werden. Eine eindeutige Auswertung des spezifischen Signals wurde zusätzlich durch den starken Hintergrund (Fluoreszenzsignal) in der Sklera erschwert. Die Daten deuten jedoch darauf hin, dass die

beschriebenen Pathologien der *Timp3^{+/S156C}* Mäuse eventuell durch eine Assoziation von Timp3 mit den elastischen Fasern der BM und einer krankheitsbedingten Fehllokalisierung dieser

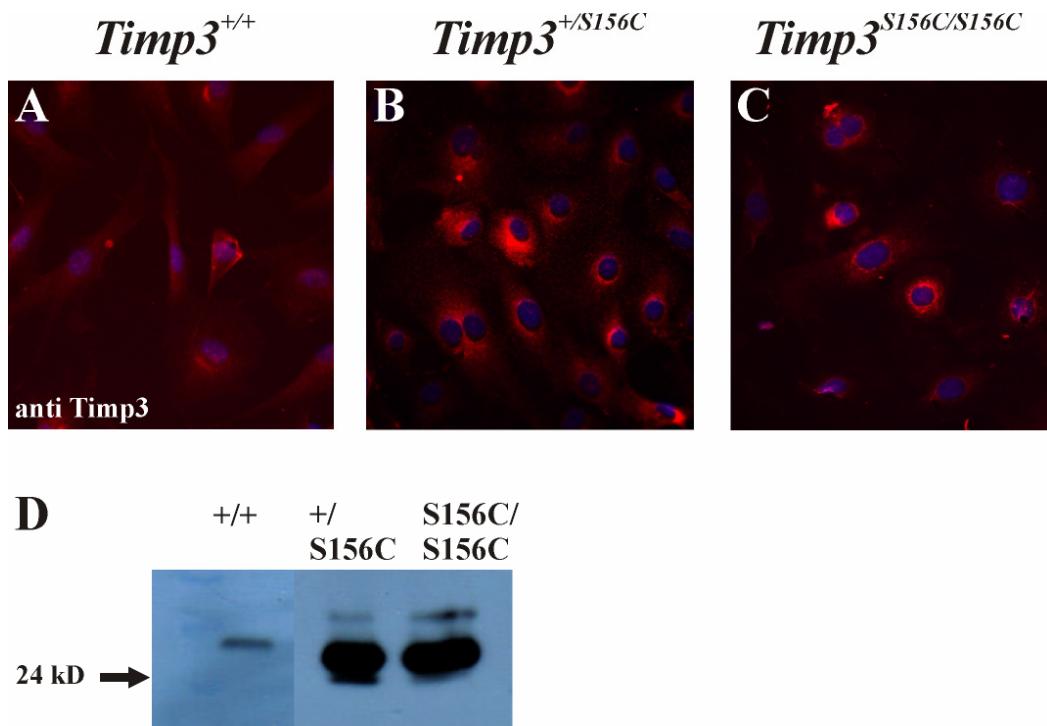


Abb. 29. Immunochemischer Nachweis einer Timp3-Akkumulation in *Timp3-S156C knock-in* Fibroblasten und aufgereinigter EZM. (A - C) *Timp3^{+/+}*, *Timp3^{+/S156C}* und *Timp3^{S156C/S156C}* Fibroblasten wurden mit anti-Timp3 El-2 (1:2500) gefärbt ($n = 3$). Zur Visualisierung wurde ein fluoreszenzgekoppelter Ziege anti-Kaninchen Alexa488 gekoppelter sekundärer Antikörper (grün) verwendet. (D) Western blot Nachweis von Timp3 (1:10.000) in der EZM von *Timp3-S156C* knock-in Fibroblasten. Aufgetragen wurden jeweils gleiche Lademengen (40 µl EZM-Extrakt pro Genotyp und Ladetasche). In *Timp3^{+/S156C}* Fibroblasten ist eine deutlich gegenüber dem Wildtyp und *Timp3^{S156C/S156C}* Fibroblasten erhöhte intrazelluläre Timp3 Färbung zu detektieren. Im Western Blot sind die Timp3 Proteinmengen in beiden *S156C*-Mutanten gleichermaßen im Vergleich zum Wildtyp erhöht.

Moleküle bedingt sind. Um diese These zu untermauern, wurden Darstellungen dieser Moleküle in der BM von *Timp3-S156C*-Tieren mit Hilfe des Immunogoldverfahrens angefertigt.

3.2.2 Immunogold Elektronenmikroskopie

Aus der Literatur ist bisher noch keine eindeutige ultrastrukturelle Lokalisation von Timp3 in der BM bekannt. Vermutet wird jedoch, dass Timp3-Moleküle in Form von *Clustern* in das zentrale KollagenVI Fasergeflecht eingelagert sind (Knupp *et al.* 2002). Mit Hilfe der Immunogoldfärbung ließ sich eine Assoziation von Timp3 mit der elektronendichten, zentralen EZM-Schicht nachweisen (Abb. 30A, D und C, F). Interessanterweise war die Timp3-Lokalisation jedoch nicht auf diese vorhergesagte Mikrokomponente beschränkt. Mit Gold visualisierte Timp3-Antikörper fanden sich ebenfalls in den beiden Basallaminae sowohl des RPE als auch der Choriokapillaris (Abb. 30 A, D und C, F). Die kollagenen Schichten

zeigten hingegen keine signifikante Timp3-Antikörperreaktivität. Die Goldkörnchen erschienen in der *Timp3^{+/S156C}* BM eher zufällig und ungeordnet verteilt, jedoch mit der homogen und durchgehend grau erscheinenden extrazellulären Masse einhergehend und in

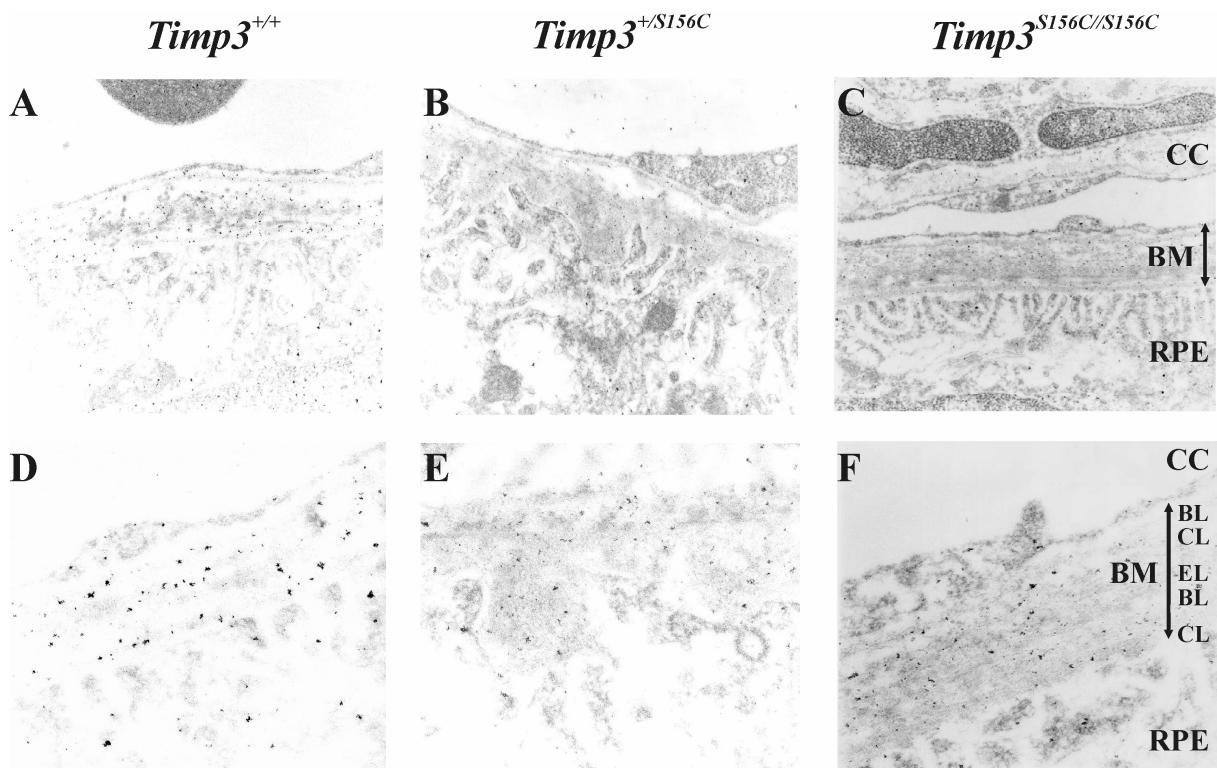


Abb. 30: Nachweis von Timp3 an retinalen Ultradünn-Schnitten von *Timp3-S156C knock-in* Mäusen. Ultradünn-Schnitte der Netzhäute 3 Monate alter *Timp3^{+/+}* (CD7.14) (A und D) *Timp3^{+/S156C}* (CD8.4) (B und E) und *Timp3^{S156C/S156C}* (CD8.14) (C und F) ($n = 2$ pro Genotyp) inkubiert mit anti-Timp3 El-2 (1:100, obere Hälfte) in 25.000-facher (obere Reihe) und 63.000-facher Vergrößeitung (untere Reihe). Zur Visualisierung wurde ein Nano-Gold ($\leq 0,9\text{nm}$) gekoppelter Ziege anti-Kaninchen Antikörper (schwarze Punkte) verwendet. CC, Choriokapillaris; BM, Bruchsche Membran (bestehend aus: BL, Basallamina; CL, kollagene Lage; EL, elastische Lage); RPE, Retinales Pigmentepithel; Timp3 lokalisiert in geringem Maße im RPE und in den Basallaminae und der Elastika der Bruchschen Membran. In der *Timp3^{+/S156C}* Retina kolokalisiert Timp3 mit den typischen Sorsby-ähnlichen Pathologien der BM.

Richtung basales Labyrinth der RPE-Mikrovilli verlagert. Zudem konnte eine Timp3-Antikörperreaktivität mit den sub-RPE-Ablagerungen extrazellulärer Matrix assoziiert werden (Abb. 30B, E). Dies geht mit dem Verlust einer intakten elastischen Schicht einher. In *Timp3^{S156C/S156C}* retinalen Ultradünn-Schnitten konnte das gleiche Färbemuster wie in Wildtyp-Schnitten aufgedeckt werden (Abb. 30C, F). Sukzessive Vibratomschnitte wurden in einem parallelen Ansatz mit Elastin-Antikörpern gefärbt. Die Immunreaktivität spezifischer Elastin-Antikörper mit der elektronendichten zentralen Schicht in der BM bestätigten diesen Befund. Im Gegensatz zur Timp3-Färbung war die Lokalisation der anti-Elastin-Goldkörnchen weitgehend auf die elastische Schicht beschränkt (Abb. 31A, D). In der *Timp3^{+/S156C}* Retina konnte ein im Vergleich zu *Timp3^{+/+}* und *Timp3^{S156C/S156C}* Netzhäuten deutlich verstärktes Färbemuster beobachtet werden (Abb. 31B, E). Dies könnte auf eine erhöhte Elastin Proteinmenge in *Timp3^{+/S156C}* Mäusen hindeuten. Die Verteilung der Elastin-

Goldkörner in der Netzhaut von *Timp3^{+/S156C}* Mäusen verhält sich analog zu den Befunden der Timp3-Immunogoldreaktivität und folgte

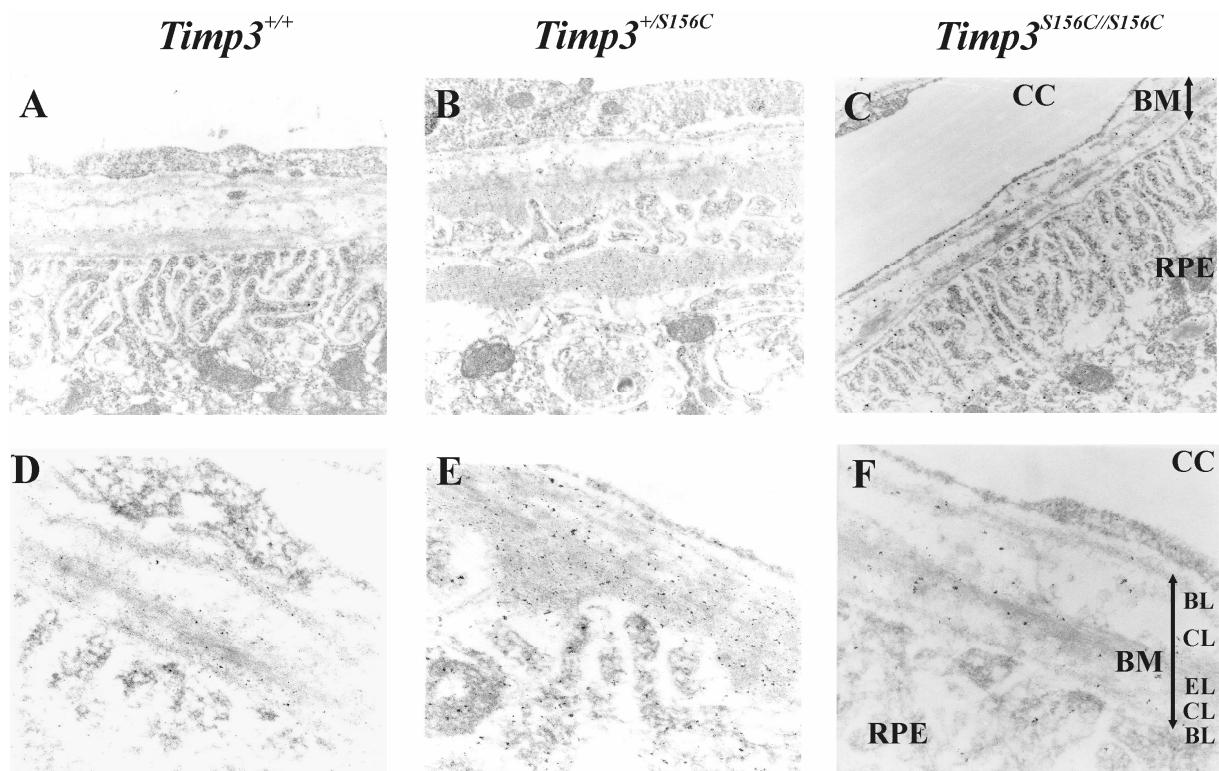


Abb. 31: Nachweis von Elastin an retinalen Ultradünn-Schnitten von *Timp3-S156C knock-in* Mäusen. Ultradünn-Schnitte der Netzhäute 3 Monate alter *Timp3^{+/+}* (CD7.14) (A und D) *Timp3^{+/S156C}* (CD8.4) (B und E) und *Timp3^{S156C/S156C}* (CD8.14) (C und F) ($n = 2$) inkubiert mit anti-Elastin (1: 500) in 25.000-facher (obere Reihe) und 63.000-facher (untere Reihe) Vergrößerung. Zur Visualisierung wurde ein Nano-Gold ($\leq 0,9$ nm) gekoppelter Kaninchen anti-Maus Antikörper (schwarze Punkte) verwendet. CC, Choriokapillaris; BM, Bruchsche Membran (bestehend aus: BL, Basallamina; CL, kollagene Lage; EL, elastische Lage); RPE, Retinales Pigmentepithel; Elastin lokalisiert hauptsächlich mit dem zentralen elektronendichten Bereich der BM. In der *Timp3^{+/S156C}* Retina kolokalisiert Elastin mit den typischen Sorsby-ähnlichen Pathologien der BM. Die Intensität der Färbung (Anzahl der Goldkörnchen) ist in der *Timp3^{+/S156C}* Retina deutlich erhöht.

der mutationsbedingten Fehlverteilung in das basale Labyrinth der RPE-Mikrovilli und die tiefer liegenden sub-RPE Zellzwischenräume (Abb. 31B, E). Diese Befunde verstärken die Hypothese einer Timp3/Elastin-Kolokalisation sowie einer möglichen Interaktion dieser Moleküle miteinander.

3.2.3 Elastin whole mount Antikörperfärbungen der BM

Elastische Fasern sind Proteinbündel, die sich hauptsächlich in Bindegeweben, der Lunge, der Haut und den Gefäßen finden. Sie werden von Fibroblasten und glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*) gebildet. Diese Faserbündel sind für die elastische Dehnbarkeit von Geweben verantwortlich. Sie können sich um das 1,5-fache ihrer Länge dehnen, und in ihre ursprüngliche Länge zurück springen, wenn sie entspannt werden. Die elastische Faser selbst wird aus einer Mikrofibrille gebildet, die viele verschiedene Proteinkomponenten wie

die mikrofibrillär-assoziierten Glykoproteine, Fibrillin, Fibulin, den Elastin-Rezeptor und amorphes Elastin beinhaltet. An *whole mount* Antikörperfärbungen der BM von *Timp3 knock-in* Mäusen wurde das elastische Fasergeflecht in einer dreidimensionalen Darstellungsweise analysiert, um Unterschiede in der Komposition, Anordnung, Verteilung und Erscheinung der Fasern, die in Zusammenhang mit den $\text{Timp3}^{+/S156C}$ BM-Abnormalitäten stehen könnten, aufzudecken.

Abb. 32 zeigt die Darstellung der Maus-Elastika als Aufsicht-Darstellung mit Blick von der Retina durch das RPE auf die BM bis hinein in die Chorokapillaris. Die Elastika stellte sich in allen Genotypen als völlig ungeordnetes, weit und zufällig verzweigtes, amorphes Fasergeflecht mit sehr eng- und weitmaschigen Bereichen in allen untersuchten Tieren dar (Abb. 32A - C).

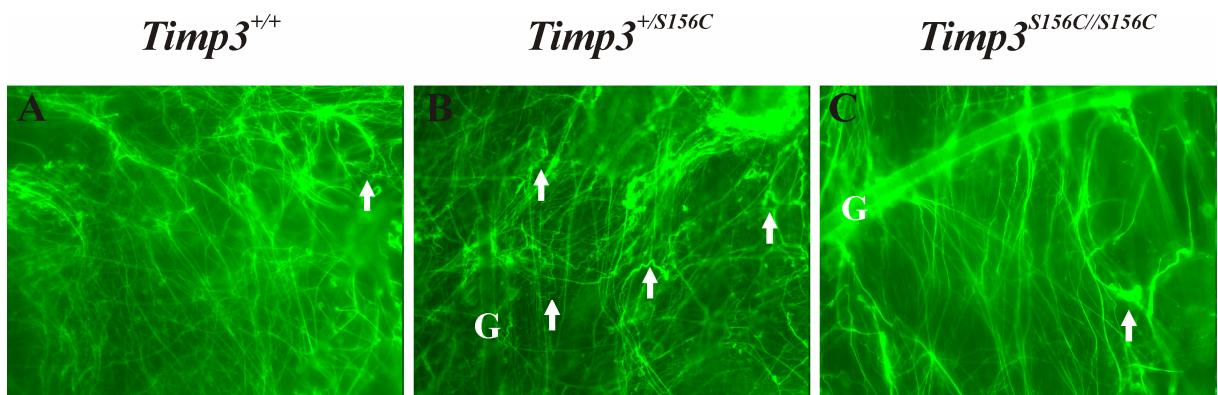


Abb. 32: Immunohistochemischer Nachweis von Elastin an *whole mount* RPE/BM/Choroid Präparaten von *Timp3-S156C knock-in* Mäusen. *Whole mount* Präparate des Komplex RPE/BM/Choroid 6 Wochen alter $\text{Timp3}^{+/+}$ (CD1070) (A) $\text{Timp3}^{+/S156C}$ (CD1192) (B) und $\text{Timp3}^{S156C/S156C}$ (CD1185) (C) ($n = 1$ pro Genotyp) Mäuse inkubiert mit anti-Elastin (1:200) in 40-facher Vergrößerung. Zur Visualisierung wurde ein fluoreszenzgekoppelter Ziege anti-Kaninchen Alexa488 gekoppelter sekundärer Antikörper (grün) verwendet. G, Gefäße der Choriokapillaris. Die Darstellung des elastischen Fasersystems zeigt in allen Genotypen ein heterogenes Erscheinungsbild mit einer unterschiedlichen Verteilung wie Ausrichtung elastischer Fasern. In $\text{Timp3}^{+/S156C}$ Tieren finden sich jedoch vermehrt ungespannte, ausgeleiert erscheinende Fasern (weiße Pfeile).

Ein einheitlicher Aufbau war nicht zu erkennen, daher ist ein Vergleich der Genotypen untereinander sehr schwierig. Auffällig war jedoch eine Häufung von ausgeleiert, überdehnt und instabil erscheinenden elastischen Fasern (weiße Pfeile) in $\text{Timp3}^{+/S156C}$ Tieren (Abb. 31B), die gut mit den transmissionsmikroskopisch aufgedeckten Elastin-Abnormalitäten übereinstimmen.

3.3 Quantitative Reverse Transkriptase Real Time PCR (qRT-PCR)

Aufgrund des morphologisch klar gezeichneten Phänotyps in der BM $\text{Timp3}^{+/S156C}$ Tiere sollte auf mRNA Ebene im Komplex RPE/BM/Choroid überprüft werden, ob und inwieweit Veränderungen im Expressionsprofil repräsentativ ausgewählter BM-assozierter Proteine mit

den phänotypischen Befunden korrelieren oder als ursächlich für die Entstehung der beschriebenen Pathologien angesehen werden können.

Die qRT-PCR ist die gegenwärtig sensitivste Methode zur Quantifizierung der Gen-Expression, insbesondere für schwach exprimierte Gene, und ermöglicht auch die Detektion relativ geringer Unterschiede im Expressionsprofil einzelner Gene, deren Aufdeckung durch eine fehlende Sensitivität der konventionellen PCR-Methoden nicht möglich sind. (Klein *et al.* 2002; Liu and Saint 2002). Im Gegensatz zur klassischen RT-PCR zeichnen sich qRT-PCR-Assays durch höhere Sensitivitäten, eine verlässliche Spezifität und gute Reproduzierbarkeit aus. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Quantifizierung zu Beginn der logarithmischen Amplifikationsphase erfolgt, dem stabilsten und effizientestem Teil der PCR-Reaktion.

In dieser Arbeit wurde ein Gewebepanel aus 24 verschiedenen cDNAs analysiert. Pro Genotyp *Timp3*^{+/+}, *Timp3*^{+/S156C}, *Timp3*^{S156C/S156C} und *Timp3*^{-/-} wurden jeweils von drei 6 Wochen alten Tieren beide Augen getrennt voneinander ausgewertet (6 cDNAs pro Mausgenotyp). Eine Normalisierung der Expressionsdaten erfolgte gegen die drei Haushaltsgene Adenosin-Triphosphatase (*ATPase*), Ribosomales Protein L4 (*Rpl4*) und Succinat Dehydrogenase Komplex Untereinheit A (*Sdhα*) nach den bei Vandesompele *et al.* 2002 und Muller *et al.* 2002 beschriebenen Methoden. Vor-Experimente zu diesen Studien beinhalteten das Design geeigneter Primer sowie das Austesten der Bedingungen für optimale, spezifische PCR Reaktionen zur Generierung hoher Effizienzen der untersuchten Gene (siehe auch Material und Methoden 3.6).

Beschrieben werden im Folgenden die Auswirkungen der *Timp3-S156C* Mutation auf die Expression von 15 repräsentativen Proteinen der BM, die in enger Korrelation mit der Entstehung des EZM Phänotyps in *Timp3*^{+/S156C} stehen könnten. In diesem Zusammenhang werden signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und *Timp3*^{+/S156C} bzw. Wildtyp und *Timp3*^{S156C/S156C} Mäusen durch * (Student's T-Test, $p \leq 0,05$), hoch-signifikante Unterschiede durch ** (Student's T-Test, Korrektur nach Bonferroni, $p \leq 0,0167$) wiedergegeben. Die Expressionsdaten der *Timp3*^{-/-} Tiere dienen für das Expressionsprofil von Timp3 als unabhängige Negativkontrolle.

3.3.1 Expressionsprofile der Timp-Moleküle (*Timp1 - Timp4*)

Zunächst wurde überprüft, ob und wie die SFD-assoziierte *Timp3-S156C* Mutation die mRNA Menge der einzelnen Timp Moleküle im Komplex RPE/BM/Choroid beeinflusst, und ob mutationsbedingte Kompensationseffekte im Expressionsniveau einzelner Timps

festzustellen sind. Timp2 und Timp3 zeigen keine Unterschiede in der relativen Expression zueinander (Abb. 33B und C). Die Expressionsprofile bleiben durch die *Timp3-S156C* Mutation unbeeinflusst. Demgegenüber werden die mRNAs von Timp1 in der *Timp3^{+/S156C}* Mutante signifikant 2-fach hochreguliert ($p = 0,036234$) und von Timp4 in der *Timp3^{+/S156C}* Mutante hoch-signifikant ($p = 0,008498$) im Vergleich zu *Timp3^{+/+}* Tieren 2-fach runterreguliert (Abb. 33A, D).

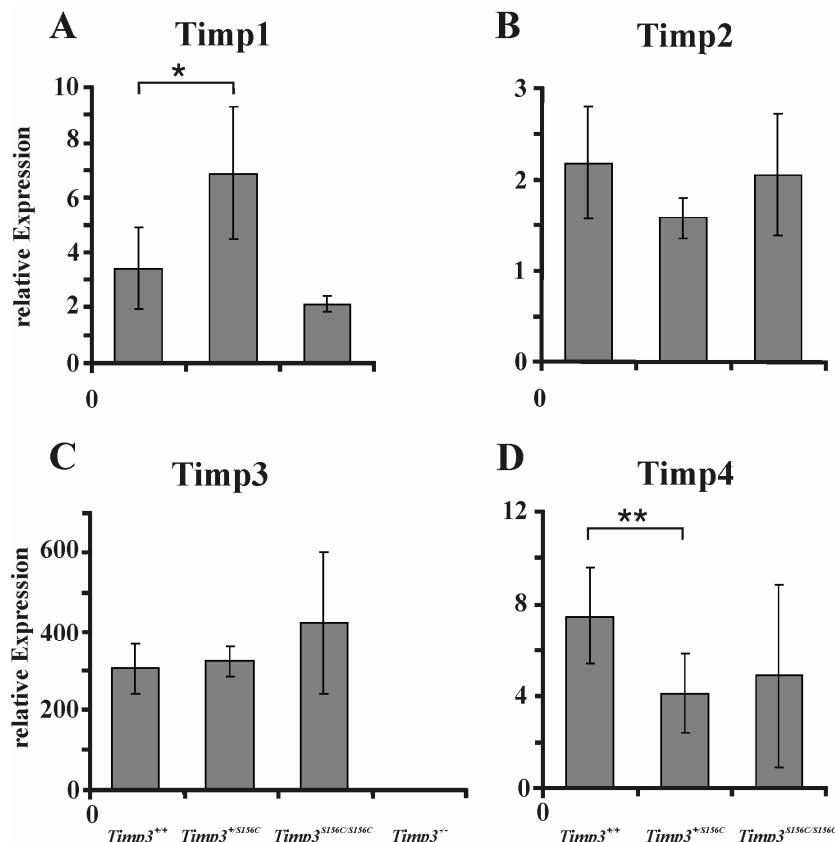


Abb. 33: Nachweis der relativen Expression von Timp1 – Timp4 im Komplex Choroid/BM/RPE durch qRT-PCR. qRT-PCR wurde verwendet, um durch die *S156C*-Mutation bedingte Regulationsunterschiede (insbesondere im Hinblick auf die in der hetetozygoten *S156C* Maus gefundenen Pathologien) in der Expression von (A) Timp1, (B) Timp2, (C) Timp3, (D) Timp4 in *Timp3^{+/+}*, *Timp3^{+S156C}*, *Timp3^{S156C/S156C}* und *Timp3⁻* Mäusen darzustellen. Die grauen Balken geben die Expressionsprofile der einzelnen Genotypen in Relation zueinander wieder. Pro Genotyp wurden von jeweils drei Tieren beide Augen getrennt analysiert (6 cDNAs pro Genotyp, insgesamt 24 cDNAs als Panel). Jede PCR-Reaktion wurde im Triplikat angesetzt. Alle Daten sind Durchschnittswerte ($n = 6$) \pm SD; Y-Achse, relative Expression. Signifikante Unterschiede zwischen *Timp3^{+/+}/Timp3^{+S156C}* und *Timp3^{+/+}/Timp3^{S156C/S156C}* Mäusen sind durch * (Students T-Test, $p \leq 0,05$) und ** ($p \leq 0,0167$; Korrektur nach Bonferroni) angezeigt.

3.3.2 Expressionsprofile ausgewählter Strukturproteine in der BM

Elastin, Laminin, Fibrillin, und Fibronectin sind neben bestimmten Kollagenen die hauptsächlich vorhandenen Strukturproteine in der EZM des Auges (Marshall *et al.* 1998). Sie stellen als Ankerproteine die Verbindung zwischen den verschiedenen Bestandteilen der EZM her. Diese multifunktionalen Proteine sind durch ihre Fähigkeit gekennzeichnet,

gleichzeitig mehrere andere Matrixkomponenten zu binden und Zellen über Zelloberflächen-Rezeptoren an die intrazelluläre Matrix zu fixieren. Elastin und Fibrillin sind eher in der zentralen, elektronendichten Schicht der BM lokalisiert, während Laminin und Fibronectin mit den Basallaminae des RPE und der Choriokapillaris (äußere elektronendichte Bereiche) assoziiert sind. Diese qRT-PCR-Analysen dienten der Aufklärung der Frage, ob die Anhäufung und Fehllokalisierung extrazellulären Materials in der BM und dem RPE *Timp3^{+/S156C}* heterozygoter Mäuse mit eindeutigen Veränderungen im Expressionsprofil der mit hoher Wahrscheinlichkeit betroffenen Strukturproteine einhergeht. Die Expressionsprofile von Elastin und LamininB2 zeigen in *Timp3^{+/S156C}* Mäusen eine dramatische Hochregulation (Abb. 34A, B).

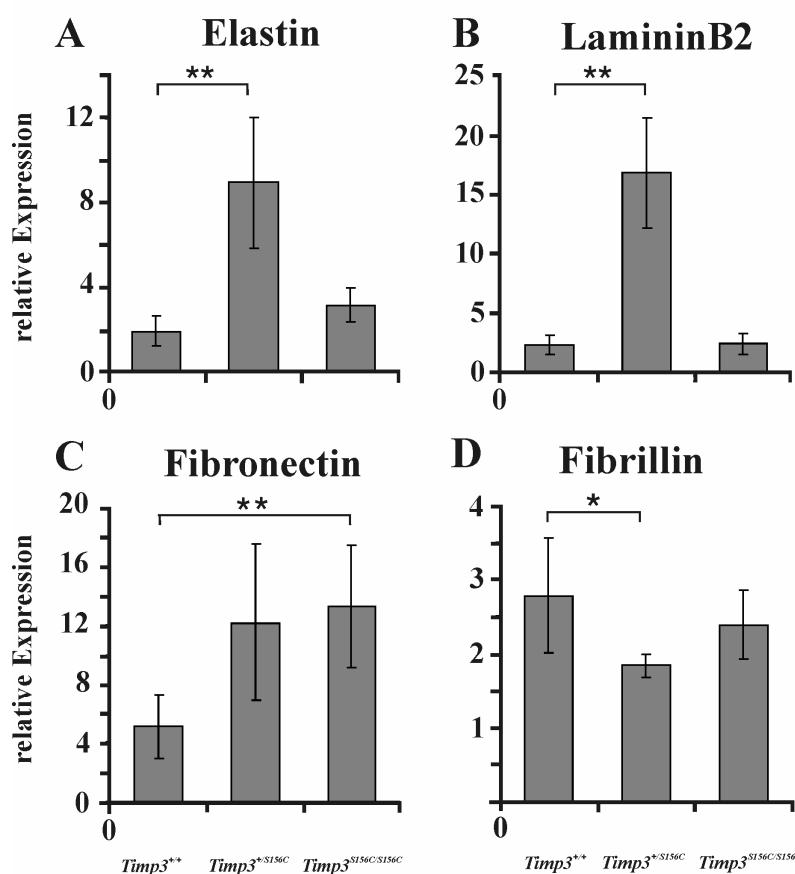


Abb. 34: Nachweis der relativen Expression ausgewählter EZM Proteine im Komplex Choroid/BM/RPE durch qRT-PCR. qRT-PCR wurde verwendet, um durch die *S156C*-Mutation bedingte Regulationsunterschiede (insbesondere im Hinblick auf die in der hetozygoten *S156C* Maus gefundenen Pathologien) in der Expression von (A) Elastin, (B) LamininB2, (C) Fibronectin, (D) Fibrillin in *Timp3⁺⁺*, *Timp3^{+/S156C}* und *Timp3^{S156C/S156C}* Mäusen darzustellen. Die grauen Balken geben die Expressionsprofile der einzelnen Genotypen in Relation zueinander wieder. Pro Genotyp wurden von jeweils drei Tieren beide Augen getrennt analysiert (6 cDNAs pro Genotyp, insgesamt 18 cDNAs als Panel). Jede PCR-Reaktion wurde im Triplikat angesetzt. Alle Daten sind Durchschnittswerte ($n = 6 \pm SD$; Y-Achse, relative Expression. Signifikante Unterschiede zwischen *Timp3⁺⁺/Timp3^{+/S156C}* und *Timp3^{+/+}/Timp3^{S156C/S156C}* Mäusen sind durch * (Students T-Test, $p \leq 0,05$) und ** ($p \leq 0,0167$; Korrektur nach Bonferroni) angezeigt.

Die Elastin mRNA Menge ist im Vergleich zum Wildtyp 4,5-fach erhöht ($p = 0,000591$). Das Expressionsprofil von LamininB2 ist in der *Timp3^{+/S156C}* Mutante gegenüber *Timp3⁺⁺* Tieren

um das 7-fache erhöht ($p = 0,002747$). Interessanterweise verbleibt die Expression dieser Moleküle im $Timp3^{S156C/S156C}$ Tieren unverändert auf Wildtyp Niveau. Diese Daten implizieren einen eindeutigen Zusammenhang zwischen den $Timp3^{+/S156C}$ EZM Pathologien der Elastika als auch der Basallamina des RPE und der Expressionsstärke der beteiligten Proteine. Eine erhöhte Elastin-Immunogoldfärbung (Abb. 31B, E) in der $Timp3^{+/S156C}$ Maus ließe sich ebenfalls durch eine verstärkte Elastin Expression erklären. Die Fibronectin mRNA Menge ist in der $Timp3^{+/S156C}$ BM ebenfalls tendenziell erhöht (Abb. 34C). Aufgrund der hohen Standardabweichung wird jedoch ausschließlich in der homozygoten Mutante ein signifikantes Niveau erreicht ($p = 0,002589$). Da die $Timp3^{S156C/S156C}$ BM keine EZM-Pathologien aufweist, legt dieser Befund den Schluss nahe, dass die Veränderung in der Fibronectin-Expression nicht zur Entstehung des charakteristischen $Timp3^{+/S156C}$ Phänotyps beiträgt. Die Expression von Fibrillin (Abb. 34D) wird in der $Timp3^{+/S156C}$ Mutante signifikant herunterreguliert ($p = 0,035655$). Durch eine eventuell in verringertem Maße gebildete Fibrillin Proteinmenge könnte die strukturelle Integrität der elastischen Schicht der BM zusätzlich geschwächt werden.

3.3.3 Expressionsprofile ausgewählter Kollagene in der BM

Kollagene sind bedeutende, aus einer Triple-Helix bestehende Strukturproteine, deren wichtige Vertreter KollagenI, KollagenIV, KollagenVI und KollagenXVIII vorwiegend in den beiden inneren kollagenen, elektronenschwachen Schichten der BM lokalisiert sind (Marshall *et al.* 1998). Sie bilden Fasern, Fibrillen, Netze und Bänder. Ihre charakteristischen Eigenschaften sind Zugfestigkeit und Flexibilität. qRT-PCR-Analysen wurden durchgeführt, um herauszufinden, ob die zweite wesentliche Gruppe von BM Strukturkomponenten durch mutationsbedingte Veränderungen im Expressionsprofil einen Beitrag zu den SFD-ähnlichen Pathologien in $Timp3^{+/S156C}$ Mäusen leisten können. Alle vier untersuchten Kollagene weisen signifikante bzw. hoch-signifikante Hochregulationen in der $Timp3^{+/S156C}$ Mutante im Vergleich zu Wildtyp Tieren auf. KollagenI ist 5-fach erhöht ($p = 0,028331$) (Abb. 35A). KollagenIV ist ca. 3-fach erhöht ($p = 0,019843$; Abb. 35B). Kollagen VI zeigt ein im Vergleich zu $Timp3^{+/+}$ Mäusen doppelt erhöhtes Expressionsniveau ($p = 0,00272$) (Abb. 35C). Der prominenteste Unterschied im Expressionsverhalten konnte bei KollagenXVIII beobachtet werden (Abb. 35D). Die BM von heterozygoten $S156C$ Mäusen weist eine 7-fach erhöhte Expression dieses Proteins auf ($p = 9,69E-05$). Die Expression der homozygoten $S156C$ -Mutante ist gegenüber den $Timp3^{+/+}$ Tieren ebenfalls signifikant erhöht ($p = 0,044267$). Wird die verstärkt gebildete Kollagen-mRNA in eine höhere Proteinmenge umgesetzt, könnte diese Kollagenanreicherung in der $Timp3^{+/S156C}$ BM maßgeblich an der Bildung der beschriebenen EZM-Pathologien, insbesondere dem Verlust der strukturellen Integrität beteiligt sein.

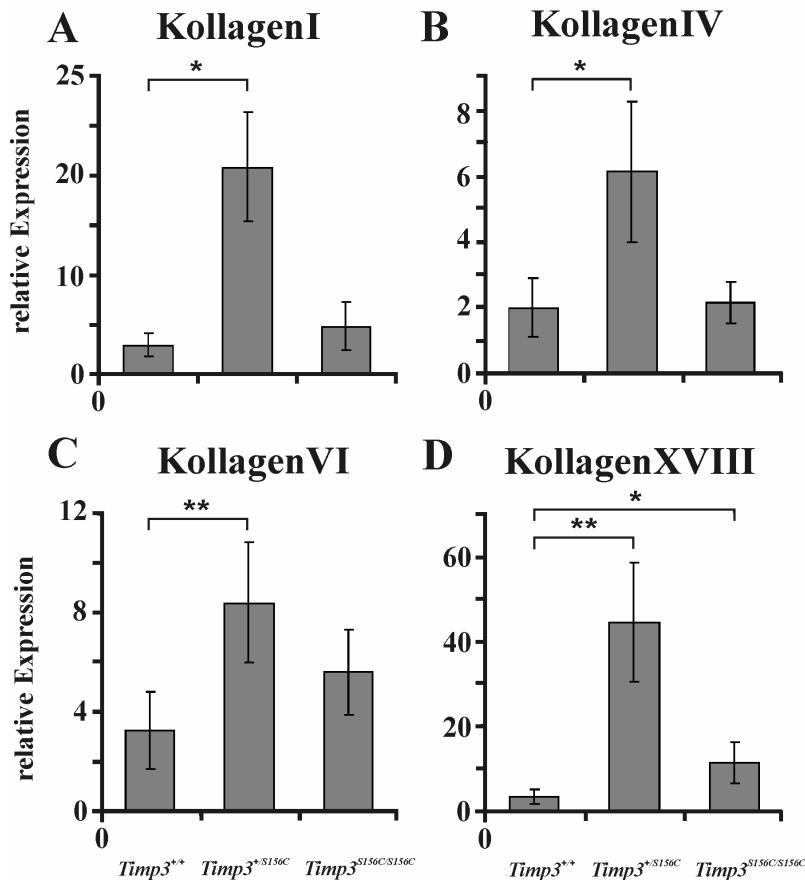


Abb. 35: Nachweis der relativen Expression der hauptsächlich in der EZM vorhandenen Kollagene im Komplex Choroid/BM/RPE durch qRT-PCR. qRT-PCR wurde verwendet, um durch die S156C Mutation bedingte Regulationsunterschiede (insbesondere im Hinblick auf die in der hetereozygoten S156C-Maus gefundenen Pathologien) in der Expression von (A) KollagenI, (B) KollagenIV, (C) KollagenVI, (D) KollagenXVIII in *Timp3*^{+/+}, *Timp3*^{+/S156C} und *Timp3*^{S156C/S156C} Mäusen darzustellen. Die grauen Balken geben die Expressionsprofile der einzelnen Genotypen in Relation zueinander wieder. Pro Genotyp wurden von jeweils drei Tieren beide Augen getrennt analysiert (6 cDNAs pro Genotyp, insgesamt 18 cDNAs als Panel). Jede PCR-Reaktion wurde im Triplikat angesetzt. Alle Daten sind Durchschnittswerte ($n = 6$) \pm SD; Y-Achse, relative Expression. Signifikante Unterschiede zwischen *Timp3*^{+/+}/*Timp3*^{+/S156C} und *Timp3*^{+/+}/*Timp3*^{S156C/S156C} Mäusen sind durch * (Students T-Test, $p \leq 0,05$) und ** ($p \leq 0,0167$; Korrektur nach Bonferroni) angezeigt.

3.3.4 Expressionsprofile ausgewählter MMPs in der BM

Die beiden Gelatinasen MMP2 und MMP9 sind die am besten charakterisierten MMPs, deren Aktivität durch eine N-terminale Inhibition von TIMP3 reguliert wird (Langton *et al.* 1998). MMP14 ist eine Metalloprotease mit elastolytischer Aktivität (Ntayi *et al.* 2004). Die Analyse dieser Moleküle diente der Aufklärung der Frage, inwieweit eine mutationsabhängig veränderte Aktivität von Metalloproteasen, die in hohem Maße für die EZM-Homöostase und den geordneten Abbau extrazellulärer Proteine verantwortlich sind, zur Aufweichung einer geordneten BM-Struktur beitragen könnten. Die Expressionprofile der untersuchten MMPs sind weder signifikant noch tendenziell durch die *Timp3*-Mutation fehlreguliert (Abb.36A - C), was gegen eine Beteiligung dieser MMPs an der Pathogenese in der *Timp3*^{+/S156C} Mutante spricht.

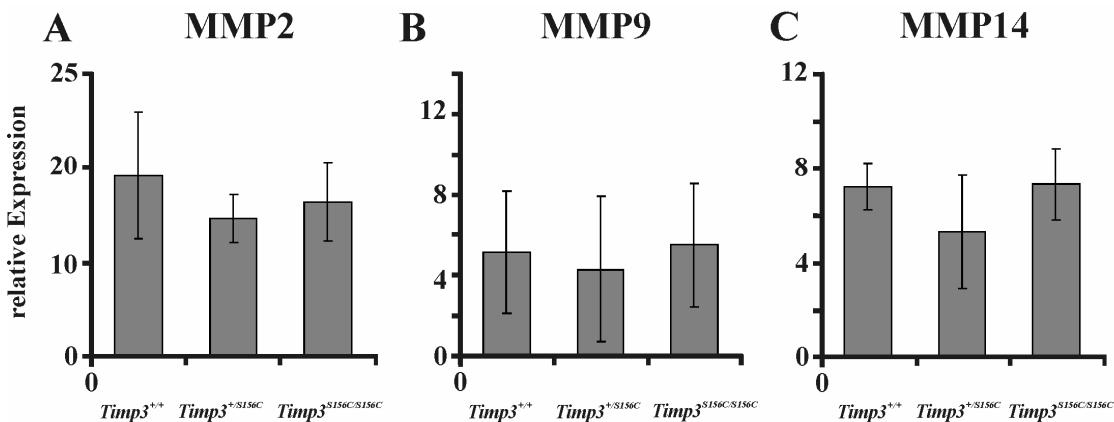


Abb. 36: Nachweis der relativen Expression von ausgewählten MMPs im Komplex Choroid/BM/RPE durch qRT-PCR. qRT-PCR wurde verwendet, um durch die S156C-Mutation bedingte Regulationsunterschiede (insbesondere im Hinblick auf die in der hetetozygoten S156C Maus gefundenen Pathologien) in der Expression von (A) MMP2, (B) MMP9 und (C) MMP14 in *Timp3*^{+/+}, *Timp3*^{+/S156C} und *Timp3*^{S156C/S156C} darzustellen. Die grauen Balken geben die Expressionsprofile der einzelnen Genotypen in Relation zueinander wieder. Pro Genotyp wurden von jeweils drei Tieren beide Augen getrennt analysiert (6 cDNAs pro Genotyp, insgesamt 18 cDNAs als Panel). Jede PCR-Reaktion wurde im Triplikat angesetzt. Alle Daten sind Durchschnittswerte ($n = 6$) \pm SD; Y-Achse, relative Expression.

3.4 Immunohistochemie von ausgewählten EZM-Proteinen

Antikörperfärbungen gegen Moleküle der BM mit hoch-signifikant verändertem Expressionsprofil dienten der Aufklärung der Fragen, ob die stark erhöhten Expressionsniveaus in vermehrt gebildete Proteinmengen dieser Moleküle in der BM betroffener Mäuse umgesetzt werden, und ob eventuell antikörperpositive sub-RPE Ablagerungen aufgedeckt werden können. Kryoschnitte von *Timp3-S156C knock-in* Tieren wurden mit Antikörpern gegen LamininB2, KollagenIV, V und XVIII gefärbt. Eine LaminB2- (Abb. 37A-C) und KollagenVI- (Abb. 37D-M) Antikörperreakтивität konnte im Bereich RPE/BM und der Sklera detektiert werden. Obwohl bei dem Auflösungsniveau dieser Methode keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen festgestellt werden konnten, zeigte sich jedoch ein tendenziell intensiviertes Signal von LamininB2 (Abb. 37B, Pfeile) und KollagenVI (Abb. 37H, Pfeile) in der *Timp3^{+/S156C}* BM. Die KollagenIV- und KollagenXVII-Färbungen ermöglichen eine scharf abgegrenzte, deutlich gezeichnete Darstellung der BM und chorikapillarer Blutgefäße (Abb. 37G-M). In der *Timp3^{+/S156C}* und *Timp3^{S156C/S156C}* BM erscheint das KollagenXVIII-Signal gegenüber dem Wildtyp stärker und teilweise diffuser gezeichnet (Abb. 37L, M). In *Timp3^{+/S156C}* Mutanten konnten zudem vereinzelt knotenartig verdickte KollagenXVIII-positive Bereiche aufgedeckt werden (Abb. 37L, Pfeile). Signifikante Unterschiede in der Signalstärke von KollagenXVIII bzw. der Dicke der BM konnten im Vergleich der unterschiedlichen Genotypen zueinander nicht festgestellt werden. Offensichtlich resultiert eine verstärkte Expression dieser Moleküle nicht automatisch in einer drastischen Erhöhung der Proteinmenge in der BM betroffener Tiere, dass sie auch durch die

relativ unspezifische Methode der Immunohistochemie an Kryoschnitten aufgedeckt werden könnte. Genaue Daten zur Bestimmung der Proteinmengenverhältnisse müssen in weiteren Experimenten z.B. mit Hilfe von Western Blot Analysen und ELISA-Assays an Proteinextrakten der BM von *knock-in* Tieren erhalten.

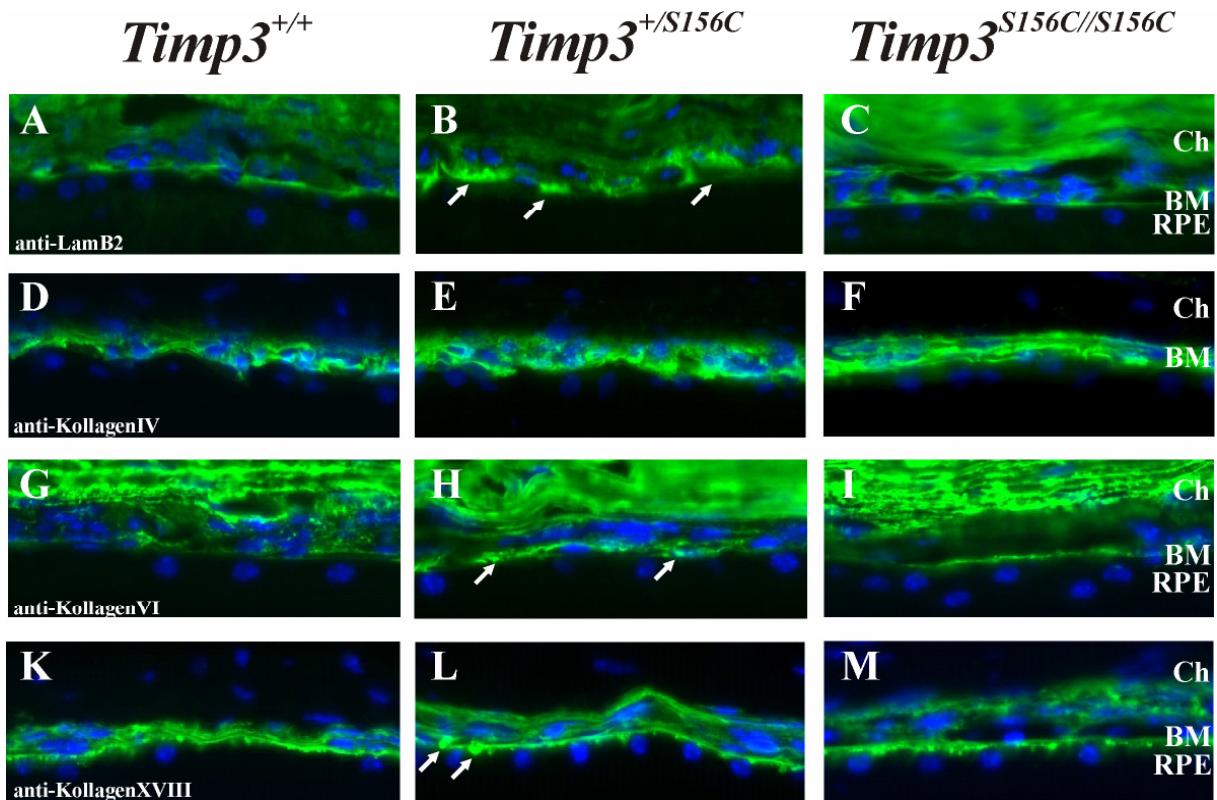


Abb. 37: Immunohistochemischer Nachweis von LamininB2, KollagenIV, VI und XVIII an retinalen Kryoschnitten von *Timp3-S156C knock-in* Mäusen. 10 µm Kryoschnitte der Netzhäute 12 Monate alter *Timp3^{+/+}* (CD1130) (A, D, G und K) *Timp3^{+/-}* (CD1133) (B, E, H und L) und *Timp3^{S156C/S156C}* (CD1132) (C, F, I und M) inkubiert mit anti-LamB2 (1:200), anti-KollagenIV (1: 250), anti-KollagenVI (1: 200) und anti-KollagenXVIII (1:300) in 40-facher Vergrößerung. Zur Visualisierung wurden ein fluoreszenzgekoppelter Ziege anti-Kaninchchen Alexa488 gekoppelter und Hase anti-Maus Alexa 488 gekoppelter sekundärer Antikörper (grün) verwendet. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Ch, Choroid; BM, Bruchsche Membran; RPE, Retinales Pigmentepithel. In der *Timp3^{+/-}* Retina zeigt die Färbung mit LamininB2 und KollagenVI ein tendenziell erhöhtes Signal im Bereich der BM. KollagenIV und KollagenXVIII färben spezifisch und scharf abgegrenzt in der BM und die Gefäße der Choriokapillaris. Bei der KollagenXVIII-Färbung ist das choroidale Signal in *Timp3^{+/-}* und *Timp3^{S156C/S156C}* Tieren diffuser als im Wildtyp. In der heterozygoten Mutante zeigen sich zudem knotenartige Verdickungen (Pfeile).

4. Charakterisierung von Basalmembranveränderungen in der *Timp3-S156C knock-in* Niere auf CD1-Hintergrund

Aufgrund der pathologischen Homologien der SFD im Vergleich zur AMD liegt das Hauptinteresse dieser Arbeit in der Charakterisierung und Erklärung des Augenphänotyps. Bei einer dominanten *Timp3-S156C knock-in* Funktionsgewinn-Mutation (*gain of function*) ist es aber durchaus möglich, dass Basalmembranveränderungen ein grundsätzliches Problem

in *knock-in* Tieren darstellen, und nicht auf das in sich abgeschlossene neuronale System Auge begrenzt sind. In Patienten, die z. B. an membranproliferativer Glomerulonephritis Typ II leiden, konnten gehäuft AMD-charakteristische Drusen im Auge nachgewiesen werden. Dies spricht für eine Assoziation von Drusenformationen mit glomerulonephritischen Pathologien. Ferner weisen diese Befunde darauf hin, dass Drusen sowie abnormale extrazelluläre Ablagerungen der BM und glomerulären Basalmembran aufgrund eines gemeinsamen oder verwandten systemischen Defekts hervorgerufen werden könnten (Duvall-Young *et al.* 1989a und b).

Darüber hinaus besteht die Basalmembran einiger spezifischer Gewebe aus einer speziellen Zusammensetzung der Kollagen- und Lamininketten. Normalerweise besteht ein KollagenIV-Trimer aus zwei $\alpha 1$ und einer $\alpha 2$ Kette ($[\alpha 1]_2[\alpha 2]$). Gegenüber diesem ubiquitär verbreitetem Aufbau finden sich in den Basalmembranen der Glomeruli und distalen Tubuli der Niere, der neuromuskulären Verbindungen, dem Auge, dem Ohr, der Lunge und der Testis $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 5$ Ketten von KollagenIV. Laminin zeigt eine ähnliche ontogenetische Transition von LamininA, B1 und B2 zu vornehmlich A, S und B2, die sich analog dem Tausch von $[\alpha 1]_2[\alpha 2]$ zu $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ Ketten in KollagenIV verhält (Miner JH and Sanes AF 1990).

Eine weitere Gemeinsamkeit der Basalmembranen dieser Gewebe ist eine funktionelle Verwandtschaft. Die Basalmembranen in den genannten Geweben bilden Diffusionsbarrieren, die endotheliale Gefäße von anderen Funktionseinheiten wie dem RPE im Auge, den Tubuli des Primärharns in den Glomeruli der Niere oder den Bronchiolen in der Lunge trennen. Zudem ist die Fließrichtung des Diffusionsstroms immer gleich, vom Endothel durch die EZM in Richtung andere Funktionseinheit. Auf Grund dieser engen Zusammenhänge wurde zunächst eine basale phänotypische wie biochemische Charakterisierung der Niere vorgenommen.

4.1 Licht- und Elektronenmikroskopie

Auf lichtmikroskopischer Ebene sind 6 Wochen alte *Timp3^{+/+}*, *Timp3^{+/S156C}* wie *Timp3^{S156C/S156C}* Nieren morphologisch unauffällig (Abb. 38). Es konnten keine offensichtlichen strukturellen Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen aufgedeckt werden. Im Gegensatz zum fünf-schichtigen ultrastrukturellen Aufbau der BM des Auges weist die glomeruläre Basalmembran (GBM) einen drei-schichtigen Aufbau der Ultrastruktur auf. Eine zentrale, elektronendichte Lage vornehmlich aus Elastin und weiteren fibrillären Proteinen

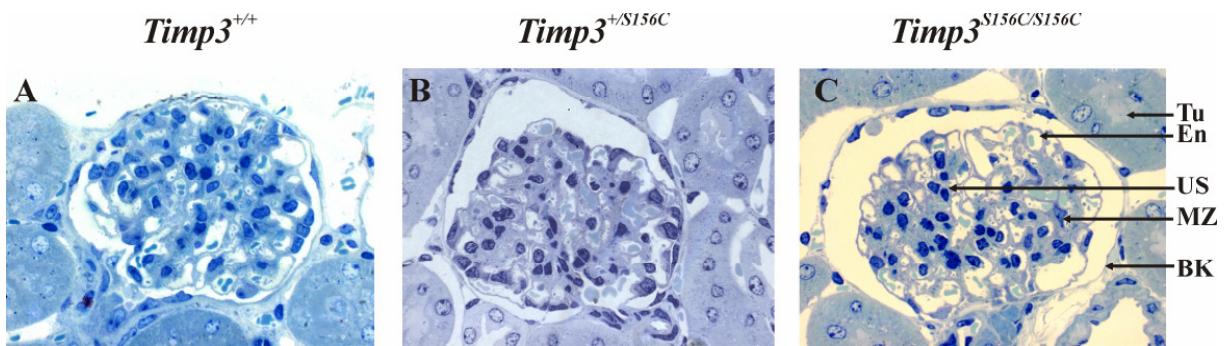


Abb. 38: Lichtmikroskopische Untersuchungen von Wildtyp und *Timp3-S156C knock-in* Nieren. (A - C) 100-fache Vergrößerungen von Semidünn-Übersichtsschnitten ($\leq 1\mu\text{m}$) der Glomeruli 6 Wochen alter *Timp3^{+/+}* (CD16.5), *Timp3^{+/S156C}* (CD16.4) und *Timp3^{S156C/S156C}* (CD16.3) Mäuse wurden durch Lichtmikroskopie ausgewertet (n = 3 pro Genotyp). Tu, Nierentubuli; En, Endothel; Us, Abfluss des Primärharns; MZ, Mesangiumzellen; BK, Bowmannsche Kapsel. Die Glomeruli der unterschiedlichen Genotypen weisen lichtmikroskopisch keine offensichtlichen pathologischen Veränderungen auf.

(Fibrilline, Fibronectine etc.) bestehend wird von zwei elektronendurchlässigen, collagenen Schichten flankiert (Abb. 39A, D). Die GBM ist eine Diffusionsbarriere zwischen dem echtenestrierten Endothel der glomerulären Blutgefäße und den ineinander verzahnten Podozytenfortsätzen (PDZF), deren Gesamtheit die glomeruläre Blutversorgung vom Lumen des Primärharns trennt. Der eigentliche Diffusionsvorgang erfolgt durch die sogenannte Schlitz Membran (SM), die von Ionen, nicht aber Proteinen passiert werden kann. In Wildtyp-Mäusen ist dieser drei-schichtige Aufbau der GBM deutlich zu erkennen (Abb. 39A, D). Die Abbildung zeigt jeweils zwei Ausschnitte von glomerulären Kapillarschleifen und dem Lumen des Primärharns bei 12.500- und 40.000-facher Vergrößerung auf transmissionselektronenmikroskopischer Ebene. Sowohl die PDZF als auch das fenestrierte Endothel weisen eine klar vom Zelllumen abgegrenzte, deutlich erkennbare Zellmembran auf. Die SM ist typischerweise kaum zu erkennen (Abb. 39A, D). Dazwischen befinden sich zwei elektronendurchlässige Lagen, die ihrerseits eine zentrale dunkelgrau gezeichnete, elektronendichte Schicht umschließen. In den *Timp3^{+/S156C}* und *Timp3^{S156C/S156C}* Mutanten ist dieser Aufbau weitgehend zerstört. Die GMB ist durch einen Verlust der drei-schichtigen Ultrastruktur gekennzeichnet. Es finden sich zahlreiche Regionen mit fokalen Verdickungen extrazellulären Materials auf der den Podozyten zugewandten Seite der GMB (Abb. 39B, C, Pfeile). Die zentrale elektronendichte Schicht ist nicht mehr zu differenzieren, die GMB ist homogen hellgrau gefärbt. Diese Pathologien tragen deutliche Gemeinsamkeiten mit den Abnormalitäten in der BM von *Timp3^{+/S156C} knock-in* Mäusen. Bei höherer Vergrößerung wird deutlich, dass auch die PDZF und fenestrierten Endothelzellen abnormalen Veränderungen unterlegen sind (Abb. 39E, F). Die PDZF und Endothelzellen sind wesentlich elektronendichter als in Wildtyp-Tieren. Sie wirken geschrumpft.

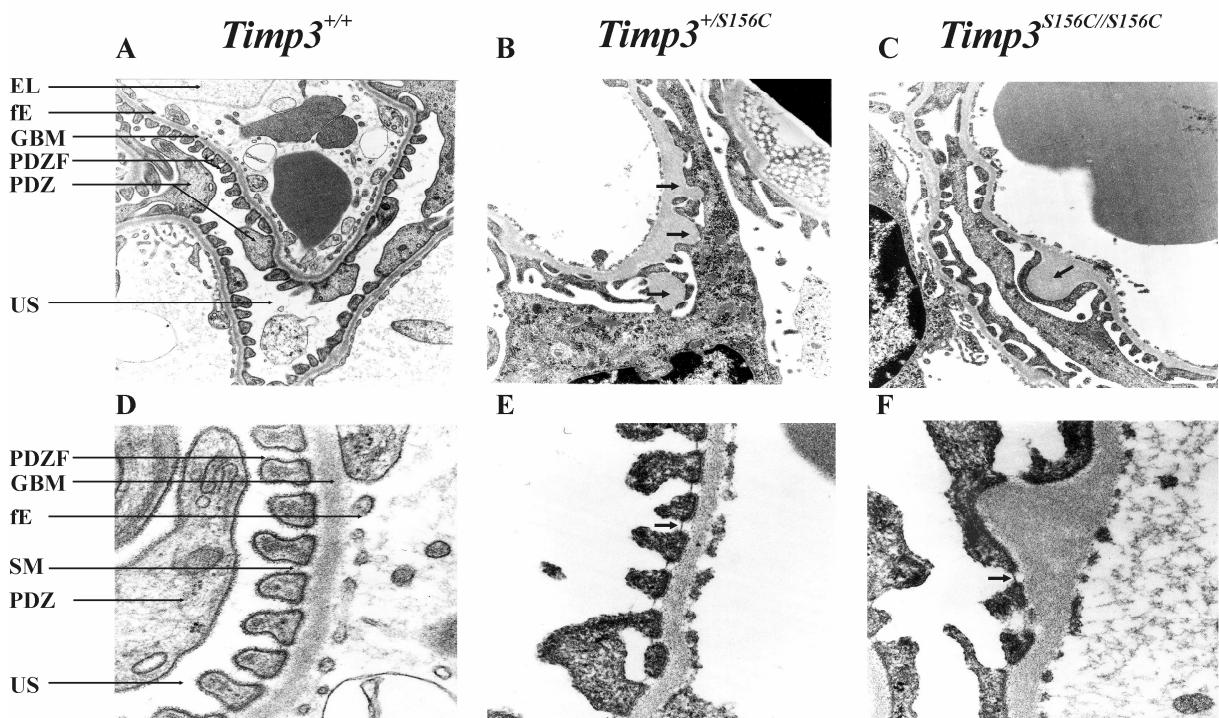


Abb. 39: Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen von Wildtyp und *Timp3-S156C* knock-in Nieren Glomeruli. Ultradünn-Schnitte der Glomeruli 6 Wochen alter *Timp3^{+/+}* (16.5) (A und D) *Timp3^{+/-}* (16.4) (B und E) und *Timp3^{S156C/S156C}* (16.3) (C und F) Mäuse in 12.500-facher Vergrößerung (obere Reihe) und 40.000-facher Vergrößerung (untere Reihe) ($n = 1$ pro Genotyp). EL, Endothellumen; fE, fenestriertes Endothel; GBM, glomeruläre Basalmembran; PDZ, Podozyt; PDZF, Podozytenfortsätze; SM, Schlitz Membran; US, Primärurin (urinary space). In den GBM von *Timp3^{+/-}* und *Timp3^{S156C/S156C}* Glomeruli finden sich geweitete, ausgestulppte Bereiche der BM gefüllt mit einer amorphen, hellgrauen extrazellulären Masse (*Timp3^{+/-}*, Pfeile, B und C). Die PDZF von *Timp3^{+/-}* und *Timp3^{S156C/S156C}* Glomeruli zeigen zudem eine körnig veränderte Zellmembran und eine besonders deutlich sichtbare Schlitzmembran zwischen den einzelnen PDZF (Pfeile, E und F).

Die Zellmembranen tragen perl schnurartig aufgereihte, knotenartige Verdickungen, die wie intrazelluläre Ablagerungen erscheinen, und die SM zwischen den PDZF ist im Gegensatz zur SM in den Wildtyp-Glomeruli besonders gut zu differenzieren (Abb. 39E, F, Pfeile). Diese Befunde stützen die These eines systemischen, durch die *Timp3-S156C*-Mutation hervorgerufenen Defekts auf verschiedene, spezifische Basalmembranen. Unklar ist jedoch die Tatsache, warum in der BM des Auges nur heterozygote Mutationsträger betroffen sind, während in der Niere auch die homozygoten Träger der Mutation betroffen sind.

4.2 Biochemische Charakterisierung des Nierenphänotyps

Zur Überprüfung, ob die morphologischen Abnormalitäten in den Glomeruli von *Timp3^{+/-}* und *Timp3^{S156C/S156C}* Mäusen eine systemische sowie funktionelle Beeinträchtigung der Nierentätigkeiten zur Folge hat, wurden die Nieren von drei *Timp3-S156C* knock-in Triplets (in Zusammenarbeit mit Dr. Frank Schweda, Institut für Physiologie, Universität Regensburg, 93053 Regensburg) umfassend molekularbiologisch und biochemisch charakterisiert.

Einige Parameter sind dabei von besonderer Bedeutung. Zunächst wurde die durchschnittliche tägliche Urin-Ausscheidung als basales Maß für die Nierentätigkeit (Regulation des Wasserhaushalts) bestimmt, und eine Analyse des Urins zur Beurteilung der Osmolyt-Exkretion durchgeführt (Abb. 40A).

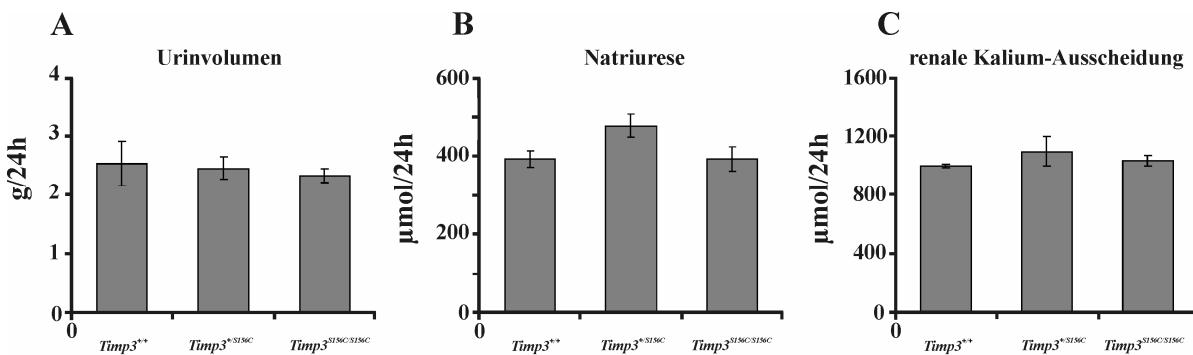


Abb. 40: Biochemische Analyse der Urin- Natrium- und renalen Kaliumausscheidung von Wildtyp und *Timp3-S156C* knock-in Mäusen. Die Daten für diese Abbildung wurden freundlicherweise von Dr. Frank Schweda zur Verfügung gestellt. Messung der Urinausscheidung (A), des Natriumgehalts im Urin (B) und der renalen Kalium-Ausscheidung im Urin (C) 6 Wochen alter *Timp3⁺⁺* (CD39.1; CD39.4; CD41.3), *Timp3^{*S156C}* (CD39.2; CD39.3; CD41.6) und *Timp3^{S156CS156C}* (CD39.14; CD39.5; CD41.4) Tiere. Die Tiere wurden 1 Woche in speziellen metabolischen Käfigen gehalten, und die Gesamt- Urinmenge pro Genotyp aufgefangen. Die Natrium- und Kaliumwerte wurden aus dem Ausscheidungsvolumen des Urins bestimmt. Die grauen Balken geben die Mengenverhältnisse in g/24h (A) bzw. µmol/24h (B und C) wieder. Alle Daten sind Durchschnittswerte ($n = 3$) \pm SD. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind nicht zu erkennen. Die *Timp3^{*S156C}* Tiere zeigen aber eine tendenziell erhöhte Natriurese und Kaliumausscheidung.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Urin-Ausscheidung zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Demgegenüber weisen die Nieren der *Timp3^{*S156C}* Mäuse eine nicht signifikant, aber tendenziell erhöhte Ausscheidung von Na^+ -Ionen (Natriurese) und K^+ -Ionen (Kaliurese) im Urin auf (Abb. 40B, C). Die grundsätzliche Nierenfunktion im Hinblick auf den Wasserhaushalt scheint von den beschriebenen GBM-Abnormalitäten in diesem Stadium der Erkrankung kaum beeinflusst zu sein.

Renin ist eine Endopeptidase in der Niere, die von den Zellen des juxtaglomerulären Apparats (granulierende epitheloide Zellen) gebildet wird. Renin wird bei niedrigem Blutdruck oder geringem Natriumgehalt in der Niere ausgeschüttet. Catecholamine können ebenfalls via beta-Rezeptoren zu einer erhöhten Renin-Freisetzung führen. Zusammenfassend reguliert Renin langfristig den Blutdruck und wirkt einem starken Blutdruckabfall entgegen (Renin-Angiotensin-Aldosteron System). Bei Nierenerkrankungen, die die Durchblutung senken (Stenosen, Arteriosklerose, die oft auch altersbedingt auftreten), wird zuviel Renin gebildet, da die Durchblutung abnimmt. Als Resultat wird der Blutdruck erhöht, was sich in einer Hypertonie äußerst.

Pathologische Veränderungen in den Basalmembranen der Blutgefäße wirken sich einerseits durch vasodilatierende oder vasokontraktierende Eigenschaften direkt auf den Blutdruck aus. In diesem Zusammenhang wurden die Plasmareninkonzentrationen und renale Renin mRNA Mengen detektiert, um einen direkten Einfluss der GBM-Veränderungen auf das Blutdrucksystem der betroffenen Mäuse aufzudecken. Die Plasmareninkonzentration ist in $Timp3^{+/S156C}$ und $Timp3^{S156C/S156C}$ nicht signifikant, aber tendenziell erhöht (Abb. 41B).

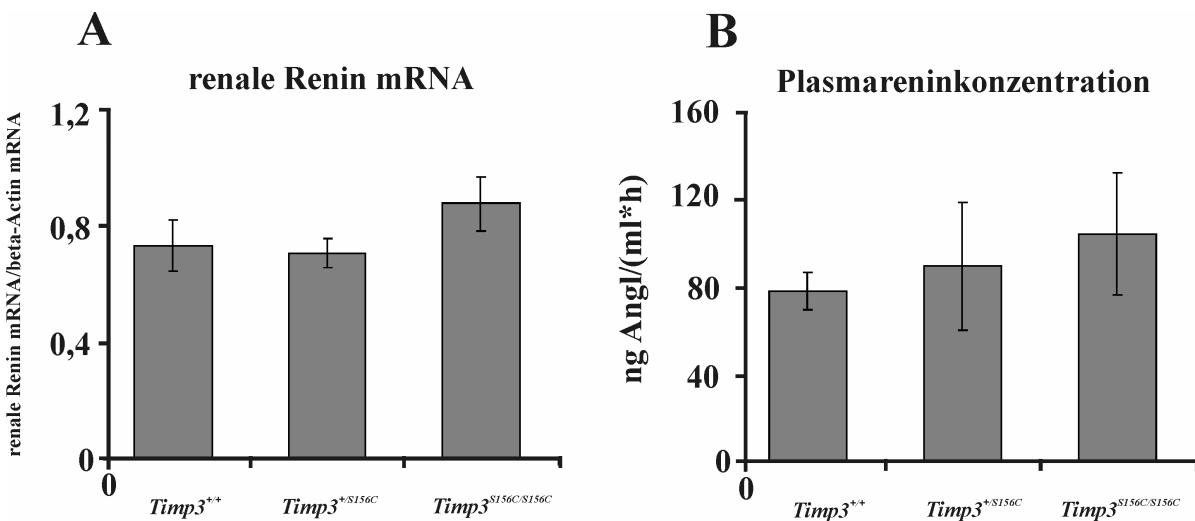


Abb. 41: Biochemische Analyse der renalen Renin mRNA und Plasmareninkonzentration von Wildtyp und $Timp3\text{-}S156C$ knock-in Mäusen. Die Daten für diese Abbildung wurden freundlicherweise von Dr. Frank Schweda zur Verfügung gestellt. Renale mRNA (A) und Plasmareninkonzentration (B) 6 Wochen alter $Timp3^{+/+}$ (CD39.1; CD39.4; CD41.3), $Timp3^{+/\text{S156C}}$ (CD39.2; CD39.3; CD41.6), und $Timp3^{\text{S156C/S156C}}$ (CD39.14; CD39.5; CD41.4) Tiere. Die grauen Balken geben die relative Expression (A) bzw. Konzentration in ng Ang I / (ml*h) (B) wieder. Alle Daten sind Durchschnittswerte ($n = 3$) \pm SD.

Die Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren pro experimenteller Gruppe (Genotyp) sind jedoch relativ stark. Eine Analyse der korrespondierenden renalen mRNA Menge zeigt ebenfalls tendenziell erhöhte Werte, jedoch ausschließlich in der $Timp3^{S156C/S156C}$ Niere (Abb. 41A). Diese Daten unterstreichen einen möglichen Trend zur Hypertonie in den mutanten Tieren. Möglicherweise waren die analysierten $Timp3\text{-}S156C$ Mäuse noch zu jung, um nachhaltige Veränderungen auf das Blutdruck-regulierende Renin-Angiotensin-Aldosteron System aufdecken zu können.

5. Charakterisierung der *Timp3-S156C knock-in* Mutation auf dem Balb/C-Albino-(Inzucht)-Hintergrund

5.1. Licht- und Elektronenmikroskopie

Bei C57BL/6-Mäusen handelt es sich um einen Inzuchttamm, bei dem CD1-Maushintergrund handelt es sich um einen Auszucht-Mausstamm. Um das gesamte phänotypische Spektrum der Expressivität der *S156C*-Mutation aufzudecken, wurde diese Mutation auf einen weiteren genetischen Hintergrund über 8 Generationen auf den Balb/C-Albino-Inzucht-Mausstamm gekreuzt.

2 Monate alte *Timp3^{+/+}* wie *Timp3^{S156C/S156C}* Balb/C-Mutanten sind lichtmikroskopisch betrachtet hinsichtlich des Augenphänotyps morphologisch unauffällig (Abb. 42). Die *Timp3^{+/S156C}* Mutante weist keine morphologischen Veränderungen mit Ähnlichkeiten zu den in der *Timp3^{+/S156C} knock-in* Mutante auf CD1-Hintergrund beschriebenen Pathologien auf. Im Lichtmikroskop konnten weder sub-RPE-Ablagerungen noch weitere Auffälligkeiten im Komplex Choriokapillaris/BM/RPE aufgedeckt werden (Abb. 42A-F).

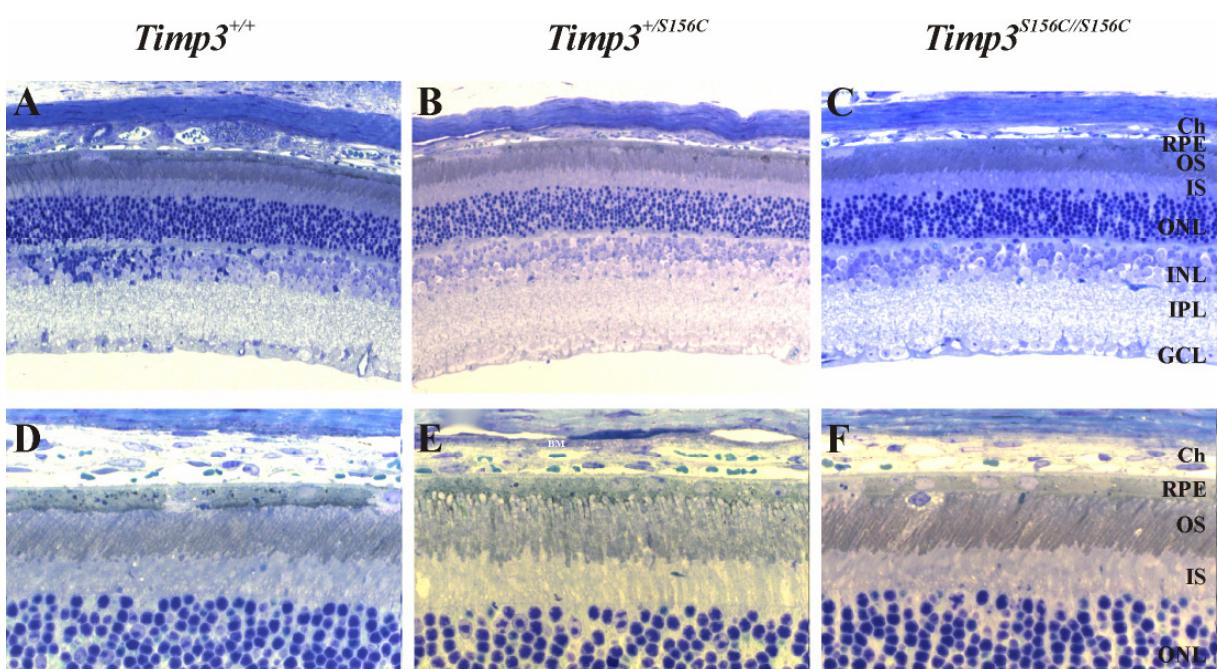


Abb. 42: Lichtmikroskopische Untersuchungen von Balb/C Wildtyp und *Timp3-S156C knock-in* Mäusen. (A - C) 20-fache Vergrößerungen von Semidünn-Übersichtsschnitten ($\leq 1\mu\text{m}$) der Netzhäute 2 Monate alter *Timp3^{+/+}* (WT2), *Timp3^{+/S156C}* (BC2.5) und *Timp3^{S156C/S156C}* (BC2.2) Mäuse wurden durch Lichtmikroskopie ausgewertet. (D - F) ($n = 3$ pro Genotyp) Semidünn-Schnitte der Netzhäute 2 Monate alter *Timp3^{+/+}*, *Timp3^{+/S156C}* und *Timp3^{S156C/S156C}* Mäuse, ausgewertet bei 100-facher Vergrößerung. Ch, Choroidea; RPE, Retinales Pigmentepithel; OS, Äußere Photorezeptorsegmente; IS, Innere Photorezeptorsegmente; ONL, äußere Kernschicht; INL, innere Kernschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellen. Die Netzhaut der unterschiedlichen Genotypen weist lichtmikroskopisch keine offensichtlichen pathologischen Veränderungen auf. Insbesondere der Bereich CC/BM/RPE zeigt keine für die SFD typischen EZM Veränderungen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten eine durchweg vollständig erhaltene Basallamina des RPE im Bereich der BM. Die zentrale elastische Schicht ist in den meisten Bereichen scharf abgegrenzt und deutlich zu differenzieren. Auch ein eher milder, wie auf dem C57BL/6-Hintergrund beschriebener Phänotyp, der primär durch strukturelle Veränderungen in den basalen Mikrovilli des RPE charakterisiert ist, konnte in diesen Tieren nicht gefunden werden. Die BM präsentierte sich über große Bereiche der Netzhaut in der für sie typischen fünf-schichtigen Aufbau (Abb. 43B). Einige Bereiche zeigten jedoch beginnende, SFD-typische atrophische Veränderungen der Choriokapillaris, die sich auf die strukturelle Integrität der BM insgesamt auswirken könnten (Abb. 43B - E). *Timp3^{+/S156C}* Mäuse zeigten verbreiterte Bereiche der BM mit aufgelöster Basallamina und fehlendem fenestrierten Endothel der Choriokapillaris. Der fünf-schichtige Aufbau der BM war an den betreffenden Stellen massiv gestört.

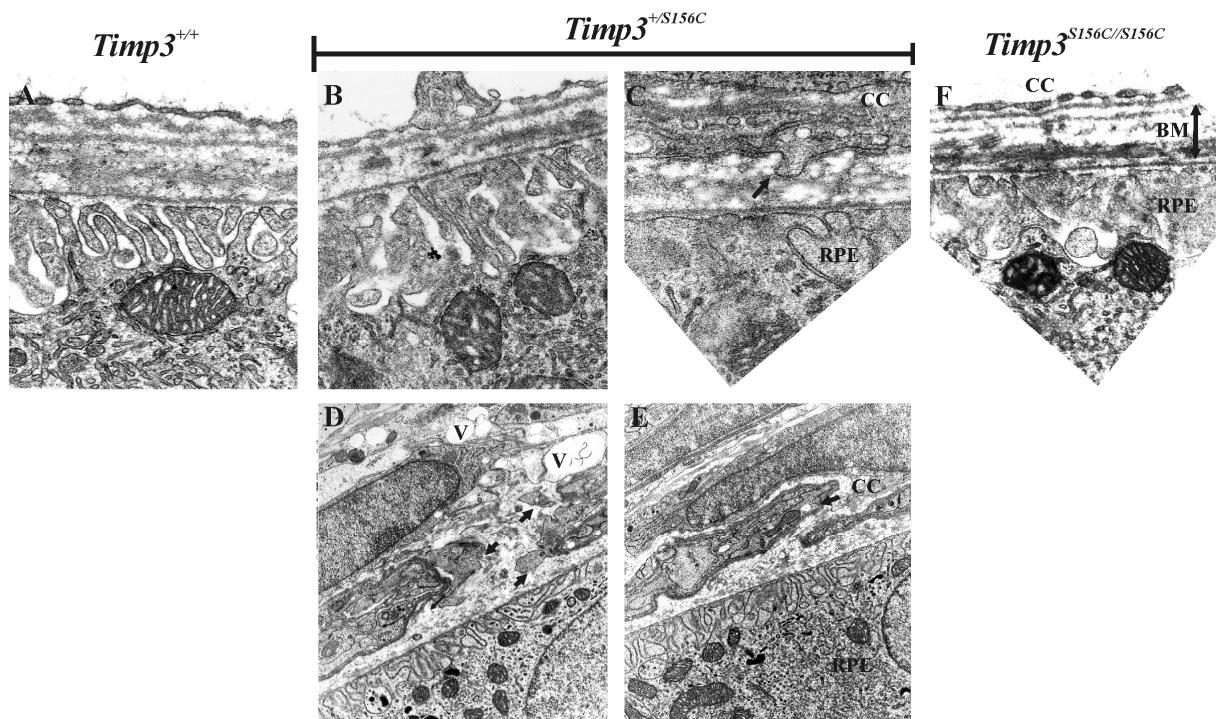


Abb. 43: Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Balb/C Wildtyp und *Timp3-S156C knock-in* Mäusen. (A - F) Ultradünn (ca.50 nm) Schnitte des Komplex RPE/Bruchsche Membran/Choriokapillaris von 2 Monate alten *Timp3^{+/+}* (WT2), *Timp3^{+/S156C}* (BC2.5) und *Timp3^{S156C/S156C}* (BC2.2) Mäusen in 20.000-facher Vergrößerung und 12.5.000-facher Vergrößerung (D und E) ($n = 1$ pro Genotyp). CC, Choriokapillaris; BM, Bruchsche Membran; RPE, Retinales Pigmentepithel; V, Vakuole. Die BM von *Timp3^{S156C/S156C}* Tieren weist deutliche pathologische Veränderungen (B – E, schwarze Pfeile) auf.

Diese Bereiche waren zudem durch atrophisch veränderte Endothelzellen und Vakuolenbildung in der Choriokapillaris charakterisiert (Abb. 43D und E, schwarze Pfeile). Zudem konnten Endothelzellen, die möglicherweise in die BM invaginieren, gefunden werden (Abb. 43C, schwarzer Pfeil). Die Daten deuten auf Frühstadien einer sich entwickelnden choroidalen Neovaskularisation in den betroffenen *Timp3^{/S156C}* knock-in Tieren. Somit könnte die *Timp3-S156C knock-in* Mauslinie das erste beschriebene, natürliche Modell einer

neovaskulären Veränderung im Mausauge darstellen. Zur genauen phänotypischen Analyse sind weitere Untersuchungen an Tieren unterschiedlicher, fortgeschrittener Altersstadien (Zeitreihe) notwendig.

Offensichtlich ist der genetische Hintergrund, auf dem die *Timp3-S156C* ins Mausgenom eingebracht wird von entscheidender Bedeutung für die Penetranz der Mutation und der phänotypischen Manifestation SFD-charakteristischer Pathologien im Auge der betroffenen Tiere.

6. Untersuchungen zu den molekularen Ursachen der RS1

(Mikroglia-/Makrophagen-Aktivierung als ursächliches Ereignis zur pathologischen Manifestation der RS1)

Zur Aufdeckung der molekularen Ereignisse, die der Photorezeptordegeneration in *Rs1h*-defizienten Mäusen vorausgehen, wurden DNA-Microarray basierte mRNA Profile in retinalen Geweben der postnatalen Stadien P7, P9, P11 und P14 an Wildtyp und *Rs1h*^{−/−} Mäusen durchgeführt. Unabhängig von *Rs1h* wurden eine Reihe weiterer differentiell exprimierter Transkripte mit funktionellen Verbindungen zu Zelladhäsion, Zytoskelett, Vesikeltransport und der Immunantwort gefunden. Die meisten Gene dieser Gruppen werden reguliert, bevor eine nennenswerte Expression von Apoptose-involvierten Genen beginnt. Erstaunlicherweise sind viele dieser Gene in der Glia- und Mikroglia-Aktivierung sowie bei inflammatorischen Prozessen beteiligt. Die Analysen der Daten zeigten eindeutig, dass eine Mikroglia-assoziierte Genexpression der Expression von Apoptose-assoziierten Transkripten um einige Tage vorausgeht (Gehrig *et al.* 2007).

6.1 Immunhistochemischer Nachweis der Mikroglia-/Makrophagen-Aktivierung in *Rs1h*-defizienten Mäusen

Immunhistochemische Untersuchungen wurden an retinalen Kryoschnitten von Wildtyp und *Rs1h*-defizienten Netzhäuten an drei verschiedenen Entwicklungsstadien (P14, P18 und P24) durchgeführt, um die Makrophagen/Mikroglia-assoziierten mRNA Profile mit einer entsprechenden Proteinexpression zu korrelieren. Anti-F4/80 (Kwakkenbos *et al.* 2004) wurde als Marker für die Mikroglia-Aktivierung verwendet, während Gfap (*glial fibrillary acidic protein*) als Streßindikator der retinalen Müllergliazellen bei Schädigungen der Netzhaut verwendet wurde. Bei P14-Stadien konnte eine vergleichbare, basale Gfap-Expression in der Wildtyp und *Rs1h*-defizienten Retina aufgedeckt werden. Der Aktivierungsmarker F4/80 zeigt einige isolierte Mikrogliazellen in den inneren Kernschichten der *Rs1h*^{−/−} Netzhaut (Abb. 44A, D). Bei P18 und P24 konnte eine verstärkte, prominente Färbung beider Marker Gfap und

F4/80 in *Rs1h^γ* Geweben nachgewiesen werden (Abb. 44B, E, C und F). Aus Abbildung 44F wird deutlich, dass die Makrophagen vorwiegend aus der retinalen Blutversorgung, dem Choroid und der Choriokapillaris über das RPE in die innere Retina einwandern, und sich in den durch die Krankheit bedingten Schisis-Bereichen an der Grenze der ONL/OPL/INL sammeln. Die Befunde bestätigen vollständig die qRT-PC- Daten (Gehrig *et al.* 2007) und stärken den Verdacht, dass eine Mikrogliaaktivierung eventuell das entscheidende Moment zur Auslösung der Photorezeptorapoptose darstellt.

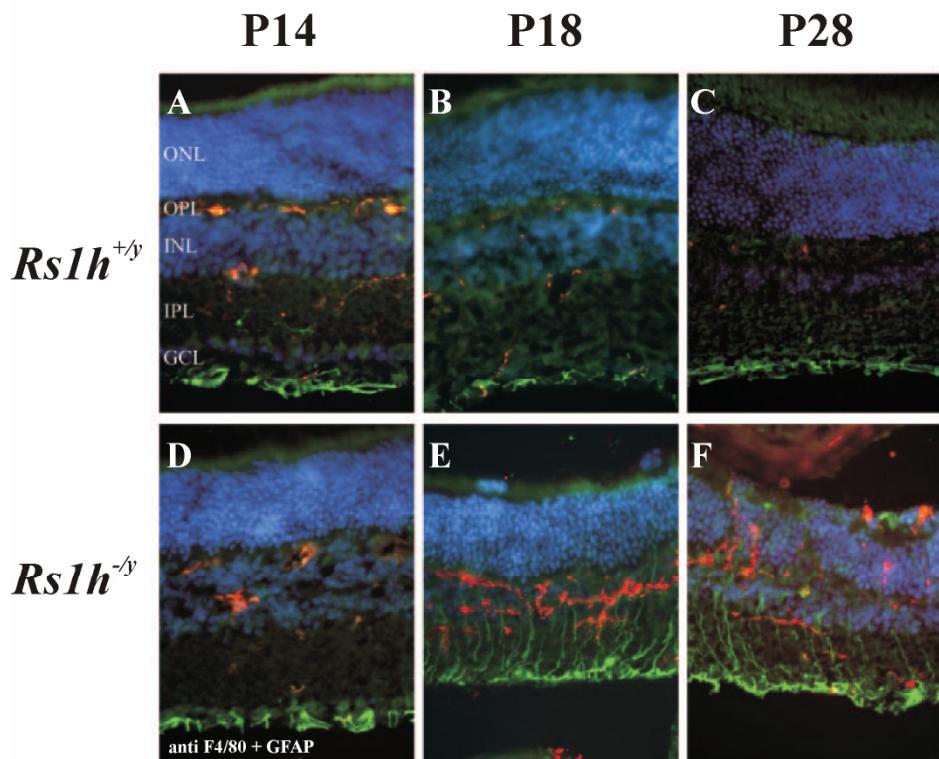


Abb. 44: Immunohistochemischer Nachweis von F4/80 und GFAP in den Netzhäuten von *Rs1h^γ* und *Rs1h*-defizienten Mäusen. Retinale Kryoschnitte (10 µm) von P14 (A und D), P18 (B und E) und P24 (C und F) Netzhäuten *Rs1h^γ* und *Rs1h*-defizienter Mäuse wurden mit dem monoklonalen F4/80 Makrophagen-Marker und dem polyklonalen Gfap Antikörper doppelt gefärbt, um eine Mikroglia-Aktivierung und die Antwort der Müller Zellen auf den retinalen Stress zu detektieren. Zur Visualisierung wurden ein fluoreszenzgekoppelter Ziege anti-Kaninchen Alexa488 (grün) und Esel anti-Ratte Alexa594 (rot) gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). ONL, Äußere Kernschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, Innere Kernschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GC, Ganglienzellschicht. Retinale Schnitte von *Rs1h*-defizienten Mäusen zeigen zelluläre Desorganisation und kleine Schisisbereiche, die sich ab P14 bilden. Initiale Makrophagen/Mikroglia-Aktivierung beginnt ab P14 und erreicht zwischen P18 und P24 ihren Höhepunkt, und wird von starker Gfap Expression begleitet.

6.2 Der Einfluss von early response gene 1 (*Egr1*) auf die Mikroglia-/Makrophagen-Aktivierung in *Rs1h*-defizienten Mäusen

Eine hoch-regulierte Expression von *Egr1* wurde relativ früh zu Beginn des Krankheitsverlaufs an P9 in *Rs1h^γ* Mäusen gefunden. Aus diesem Grund sollte anhand von *Rs1h^γ/Egr1^{-/-}* Doppel-knock-out Tieren die Rolle von *Egr1* in der Mikroglia-Aktivierung genauer untersucht werden. Eine histologische Untersuchung retinaler Kryoschnitte von 6

Wochen alten *Rs1h^{y/+}/Egr1^{-/-}* Doppel-knock-out Mäusen gefärbt mit F4/80, veranschaulichte pathologische Manifestationen, die typisch für den Phänotyp *Rs1h*-defizienter Mäuse sind (Abb. 45B, C). Eine *Egr1*-Defizienz alleine führte nicht zur Aktivierung von Mikrogliazellen (Abb. 45A). In retinalen Kryoschnitten der entsprechenden Genotypen konnten keine F4/80 positiven Zellen in der inneren Retina detektiert werden. Die kleinen immunreaktiven Punkte in der OPL und IPL stellen Kreuzreaktionen des monoklonalen Antikörpers mit den retinalen Blutgefäßen dar.

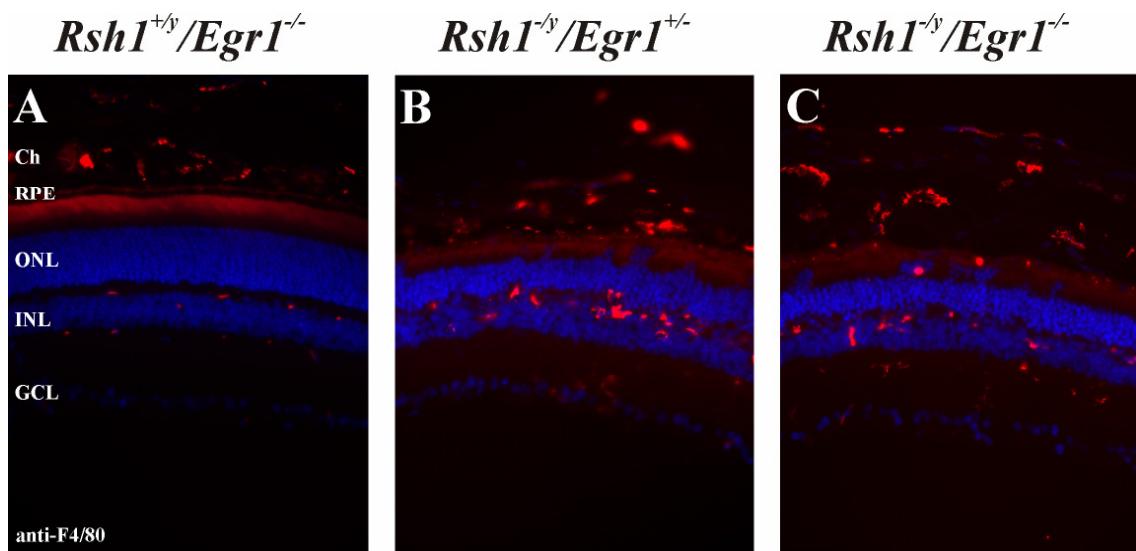


Abb. 45: Immunohistochemischer Nachweis von F4/80 in den Netzhäuten von *Rsh1/Egr1* Doppel-knock-out Mutanten. Retinale Kryoschnitte (10 µm) von (A) *Rsh1^{+/y}/Egr1^{-/-}*, (B) *Rsh1^{y/y}/Egr1^{+/-}* und (C) *Rsh1^{y/y}/Egr1^{-/-}* Netzhäute wurden mit dem monoklonalen F4/80 Makrophagen-Marker gefärbt, um den Einfluss der *Egr1*-Mutationen auf die Mikroglia-Aktivierung zu überprüfen. Zur Visualisierung wurde ein fluoreszenzgekoppelter Esel anti-Ratte Alexa594 (rot) sekundärer Antikörper verwendet. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Ch, Choroid; RPE, retinales Pigmentepithel; ONL, Äußere Kernschicht; INL, Innere Kernschicht; GCL, Ganglienzellschicht. Doppel-knock-out Tiere zeigen pathologische Manifestationen, die typisch für den Phänotyp *Rs1h*-defizienter Mäuse sind. Eine *Egr1*-Defizienz hat keine offensichtlichen Auswirkungen auf die Mikrogli-/Makrophagen-Aktivierung.

Es wurden lediglich Makrophagen im Bereich der Choriokapillaris angefärbt, ein Gewebe, das grundsätzlich aktivierte Mikrogliazellen aufweist. Eine hetero- wie homozygote *Egr1*-Mutation in Kombination mit einer *Rs1h*-Defizienz führte zur typischen Manifestation des *Rs1h*-defizienten Phänotyps mit der charakteristischen Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen (Abb. 45C, D). Die Daten konnten daher keine direkte Verbindung zwischen der Hochregulation von *Egr1* auf transkriptioneller Ebene und der Mikroglia-Aktivierung in der *Rs1h* knock-out Maus herstellen.

6.3 Die Rolle von Caspase 1 (Casp1) bei der Mikroglia-/Makrophagen-Aktivierung in *Rs1h*-defizienten Mäusen

Der Verlust von Photorezeptorzellen durch programmierten Zelltod bei der Apoptose ist ein allgemeines Merkmal erblicher Degenerationen der Netzhaut. Dieser Mechanismus könnte einen letztendlich, universalen Signalweg darstellen, der unabhängig von dem individuellen kausativen Gendefekt, der einer Krankheit zu Grunde liegt, die gleichen molekularen Pathologien verursacht (Chang *et al.* 1993). Zur weiteren Umreißung der RS1-Pathologie in diesem *Rs1h*-defizienten Mausmodell wurde die Rolle von Caspisen und Caspase-assozierten Molekülen in dem Krankheitsprozess untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Welle Apoptose-bedingten Zelltods von Photorezeptorzellen um P18 kulminiert und mit einer verstärkten Expression von FADD-Adaptoren und der Initiator-Caspase, Caspase8 assoziiert ist. Dies deutet auf einen extrinsischen apoptotischen Signalweg hin, der der Pathogenese der *Rs1h*-Defizienz zugrunde liegt (Gehrig *et al.* 2006). Interessanterweise konnte eine Hochregulation auch für die Caspisen1, -11 und -12 gefunden werden. Die Daten deuten auf eine inflammatorische Komponente in der RS1-Ethiologie hin (Gehrig *et al.* 2006). Aus diesem Grund wurden *Rs1h* und *Casp1* Doppel-*knock-out* Tiere hergestellt, um die Rolle der Casp1 in diesem Prozess genauer zu analysieren. Western Blot-Analysen und qRT-PCR-Untersuchungen deuten auf eine geringe Einflussnahme von Casp1 in die Folge der apoptotischen Ereignisse im Krankheitsverlauf hin.

In diesem Mausmodell erfolgte daher eine detaillierte Analyse der Auswirkungen der Casp1-Expression auf die Aktivierung residierender Mikroglia und/oder aus dem Blut stammender Makrophagen (Abb. 46, Tab.6). Die aktivierte Zellen stammen entweder von im Blut zirkulierenden Makrophagen, die bei einer Verletzung, einer Infektion oder einem Trauma in die Netzhaut infiltrieren, oder von „ruhenden“ Mikroglia, die in den unterschiedlichen retinalen Schichten residieren und durch inflammatorische Prozesse aktiviert werden und somit Motilität erlangen (Caicedo *et al.* 2005). Als spezifischer Marker in diesen Experimenten wurde erneut F4/80 verwendet, mit dessen Hilfe zwei distinkte Zellpopulationen unterschieden werden konnten. In der Netzhaut werden residente, ruhende Mikrogliazellen als einzelne, kleine, mit vielen Fortsätzen sternförmig aussehende, schwach gefärbte Zellen dargestellt. Aktivierte Mikroglia/Makrophagen werden hingegen als vergrößerte, amöboide Zellaggregate mit intensiver Färbung dargestellt.

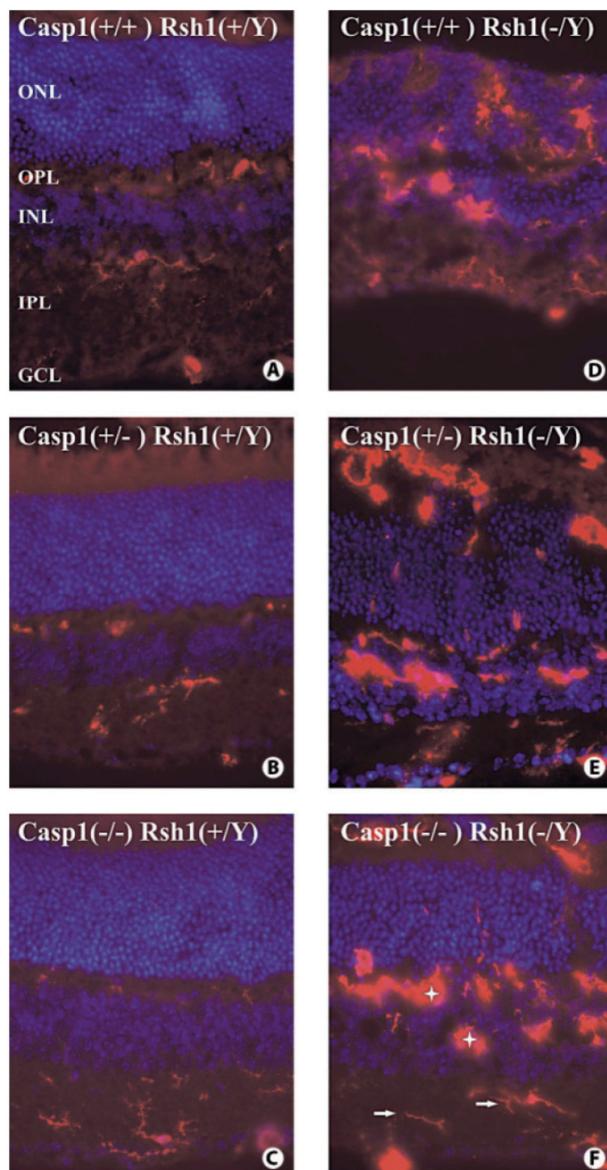


Abb. 46: Immunohistochimischer Nachweis von F4/80 in den Netzhäuten von *Rsh1/Casp1* Doppel-knock-out Mutanten. Retinale Kryoschnitte ($10 \mu\text{m}$) von *Rsh1/Casp1* Doppel-knock-out Netzhäuten auf dem *Rsh1* Wildtyp (A - C) und *Rsh1*-defizienten Hintergrund (D- E) wurden mit dem monoklonalen F4/80 Makrophagen Marker gefärbt, um den Einfluss der *Casp*-Mutationen auf die Mikroglia-Aktivierung zu überprüfen. Zur Visualisierung wurde ein fluoreszenzgekoppelter Esel anti-Ratte-Alexa594 (rot) sekundärer Antikörper verwendet. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Die Netzhäute wurden an P21 analysiert. ONL, Äußere Kernschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, Innere Kernschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht. Auf dem *Rsh1*-Wildtyp Hintergrund können residierende Makrophagen in der inneren wie äußeren Retina in abnehmenden Zahlen in Kombination mit dem *Casp1* (+/-) (B) und *Casp1* (-/-) (C) Genotyp. Eine große Anzahl an aktivierten Makrophagen (weiße Sterne) kann in der inneren und äußeren Retina *Rsh1*-defizienter Tiere (D- F) detektiert werden. Im Gegensatz zu den Befunden für die residierenden Makrophagen (weiße Pfeile) scheinen heterozygote oder homozygote *Casp1*-Mutationen die Makrophagen-Aktivierung nicht zu modifizieren.

Eine Unterscheidung zwischen aktuierten residenten und aktuierten infiltrierten Makrophagen mit Hilfe des F4/80-Antikörpers ist jedoch nicht durchführbar. In der Wildtyp-Netzhaut zeigte eine F4/80-Immunfärbung eine große Anzahl an residenten Mikroglia (schwach gefärbt) in der OPL und IPL aber nur wenige, vermutlich aktivierte

Mikroglia/Makrophagen (intensiv gefärbt) in der inneren wie äußeren Netzhaut (Abb. 46A, Tabelle 6).

Tabelle. 6 Quantitative Erfassung von aktivierten und residenten Mikroglia/Makrophagen in retinalem Gewebe von drei Kryoschnitten eines einzigen Tieres.

Genotyp	äußere Retina		innere Retina	
	aktiviert	resident	aktiviert	resident
Rs1h ^{+/Y} /Casp1 ^{+/+}	1	122 (+/-6)	15 (+/-6)	238 (+/-11)
Rs1h ^{+/Y} /Casp1 ^{+/-}	8 (+/-2)	76 (+/-6)	15 (+/-3)	176 (+/-23)
Rs1h ^{+/Y} /Casp1 ^{-/-}	1	67 (+/-2)	19 (+/-4)	141 (+/-25)
Rs1h ^{-/Y} /Casp1 ^{+/+}	115 (+/-20)	33 (+/-14)	132 (+/-20)	237 (+/-12)
Rs1h ^{-/Y} /Casp1 ^{+/-}	48 (+/-3)	4 (+/-1)	156 (+/-12)	153 (+/-16)
Rs1h ^{-/Y} /Casp1 ^{-/-}	96 (+/-15)	6 (+/-6)	149 (+/-4)	169 (+/-34)

In der *Casp1 knock-out* (*Casp1^{-/-}/Rs1h^{+/Y}*) war eine signifikante Abnahme residenter Mikroglia von 41 % (innere Retina) und 45 % (äußere Retina) zu beobachten, während die Anzahl an aktivierte Mikroglia/Makrophagen unverändert blieb (Abb. 46C, Tabelle 6). Die *Casp1^{+/+}/Rs1h^{+/Y}* Maus deutet einen vergleichbaren Trend an (Abb. 46B, Tabelle 6).

Die degenerierende *Rs1h^Y* Netzhaut (*Casp1^{+/+}/Rs1h^Y*) enthüllte eine Zunahme an aktivierte Mikroglia/Makrophagen in der inneren wie äußeren Retina (Abb. 46D, Tabelle 6). Grundsätzlich scheint eine *Casp1*-Mutation auf dem *Rs1h^Y*-Hintergrund die Mikroglia/Makrophagen Aktivierung kaum zu beeinflussen (z.B. *Casp1^{+/+}/Rs1h^Y*: 132 vs. *Casp1^{-/-}/Rs1h^Y*: 149) (Abb. 46E, Tabelle 6). Zudem ist eine Anwesenheit von residenten Mikroglia in der inneren Netzhaut für die unterschiedlichen Kombinationen von *Rs1h* und *Casp1*-Genotypen relativ vergleichbar. Es zeigte sich lediglich eine untergeordnete Abnahme von residenten Mikroglia um ungefähr 28 % in der äußeren Netzhaut für den *Casp1^{-/-}/Rs1h^Y* Genotyp (z.B. Abb. 46C, F, Tabelle 6). Die äußere Netzhaut von *Casp1^{-/-}/Rs1h^Y* Doppel-knock-out Mäusen zeigte eine auffällige Abnahme residenter Mikroglia von mehr als 80 % im Vergleich zu alleinig *Rs1h*-defizienten Tieren (Abb. 46D, F, Tabelle 6). In ähnlicher Weise war die Anzahl residenter Mikrogliazellen in der inneren Retina von *Casp1^{-/-}/Rs1h^Y* Doppel-knock-out Mäusen um mehr 40 % reduziert (Abb. 46D, Tabelle 6). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine *Casp1*-Defizienz keinen Einfluss auf die Aktivierung aber die Anzahl residierender Makrophagen ausübt. Dieser Effekt scheint völlig unabhängig vom genetischen Hintergrund der *Rs1h*-Mutationen zu sein.

7. Somatiche Gentherapie am Mausmodell der RS1

Die *Rs1h*-defiziente Maus zeigt deutliche pathologische Gemeinsamkeiten zum menschlichen Krankheitsbild, wie beispielsweise eine typische „negative“ Antwort im Elektroretinogramm (ERG), oder die Entwicklung zystischer Strukturen der inneren Retina, die von einem massivem apoptotischen Zelltod der Photorezeptoren begleitet werden (Weber *et al.* 2002). Somit stellt die *Rs1h*-defiziente Maus ein ideales Modellsystem für die Erprobung innovativer Therapieanwendungen für dieses Krankheitsbild dar.

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Wirksamkeit einer somatischen Generatztherapie der *Rs1h*-defizienten murinen Netzhaut zu erproben. Hierzu wurde das menschliche Wildtyp Retinoschisin-Gen *RS1* in Replikations-defiziente Adeno-assoziierte Viren vom Serotyp 5 (AAV 5) unter der Kontrolle eines murinen Opsinpromoters kloniert (Abb. 47) und in das rechte Auge von 15 Tage alten *Rs1h*-defizienten Tieren ($n = 17$) subretinal injiziert.

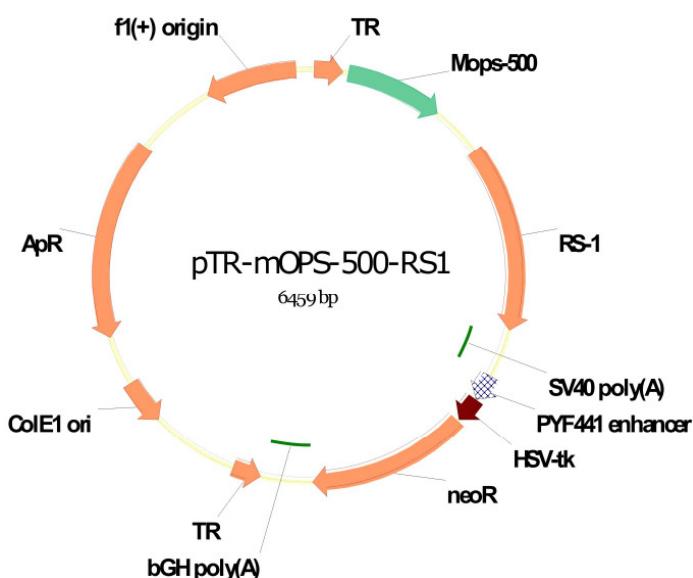


Abb. 47: AAV-Vektorkonstrukt zur Einbringung des menschlichen RS1 Gens in die murine Netzhaut. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. William Hauswirth zur Verfügung gestellt. Das AAV-Plasmid enthält das menschliche *RS1*-Gen (*RS1*) unter der Kontrolle des murinen Opsinpromotors (Mops-500). Im Anschluß an die *RS1*-Sequenz wurde ein SV40 poly(A) Signal zur Translationskontrolle kloniert. Zudem enthält das Plasmid die üblichen Vektorbestandteile wie eine Selektionskassette (neoR) und verschiedene Replikationsursprünge (ColE1 ori, f1(+)).

Diese Arbeiten wurden in einer Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe von Dr. Seok H. Min und Prof. William W. Hauswirth (*Departments of Ophthalmology, Molecular Genetics and Microbiology and Gene Therapy Center, University of Florida College of Medicine, USA*) durchgeführt. Das kontralaterale linke Auge wurde nicht injiziert und diente als interne Referenz. Um eine statistische Abschätzung der Ergebnisse zu ermöglichen wurden 17 *Rs1h*-defiziente Mäuse einem gentherapeutischen Ansatz unterzogen. Die so behandelten

für diese Arbeit Tiere wurden von Prof. Dr. Hauswirth und Dr. Seok H. Min zur Verfügung gestellt.

7.1 Abschätzung eines inizialen therapeutischen Erfolgs

7.1.1 SLO-Messungen

In vivo scanning-laser ophthalmoskopische Analysen (erstellt in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Mathias Seeliger, Universitätsaugenklinik Tübingen, AG Retinale Funktionsdiagnostik, 72076 Tübingen) zeigten einen deutlichen strukturellen Unterschied zwischen den behandelten und nicht-behandelten Augen 6 Monate nach der Vektor-Injektion (Abb. 48). Das pathologische Muster einer gleichmäßig verteilten Sprenkelung in den nicht injizierten Augen (Abb. 48C, F) hat seinen Ursprung in der zystisch veränderten inneren Retina der erkrankten Augen (Weber *et al.* 2002) und ist eindeutig nicht in den behandelten Augen zu finden (Abb. 48A, D). Im Gegensatz dazu ist das Erscheinungsbild der inneren Retina der behandelten Augen abgesehen von der Injektionsstelle des Vektorkonstrukts den Wildtyp-Augen sehr ähnlich (Abb. 48B, E). Eine untergeordnete Pigmentveränderung flankiert die Injektionsstelle. Dies deutet auf kleine,

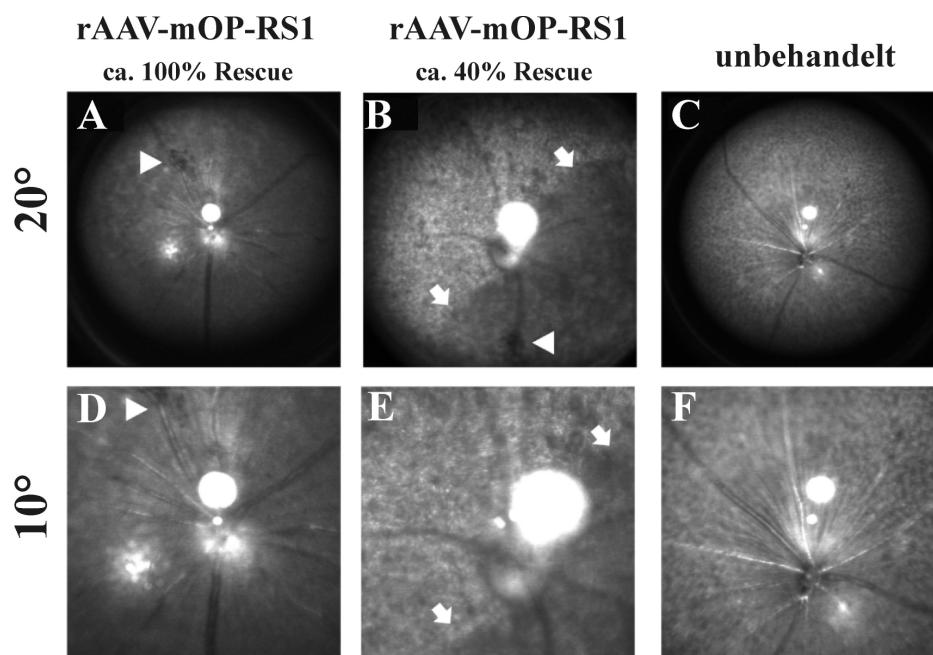


Abb. 48: *In vivo* SLO Darstellungen von rAAV-mOP-RS1-injizierten und nicht-injizierten Augen. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Mathias Seeliger zur Verfügung gestellt. Fundusphotographien wurden bei 10° und 20° (instrumentelle Grundeinstellungen) aufgenommen. Infrarot (514,5 nm) Laser Bilder demonstrieren das Fundusbild bei 100 % erfolgreichen rAAV-mOP-RS1 vermitteltem Rescue (A und D) und durch den *Rslh* knock-out hervorgerufene retinale Läsionen in den nicht-behandelten Augen (C und F) und die dramatische positive Veränderung in den behandelten Augen. Die Injektionsstellen (Pfeile) und der damit verbundene, durch post-injektionale Veränderungen hervorgerufenen Farbverlust sind deutlich sichtbar. Die Ausdehnung des behandelten Bereichs der Netzhaut variierte von fast vollständiger Durchdringung der Retina bis zu ungefähr 40 % Effizienz. Im zweiten Fall ist die Grenze des behandelten Bereichs durch Pfeile angedeutet (B, E).

partielle Ablösungen der Netzhaut hin, hervorgerufen durch methodische Probleme der Injektion an sich (Abb. 48B E, Pfeile).

7.1.2 ERG-Messungen

Eine detaillierte elektroretinographische Analyse (erstellt in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Mathias Seeliger, Universitätsaugenklinik Tübingen, AG Retinale Funktionsdiagnostik, 72076 Tübingen) wurde an einer Kohorte von (15 Tieren) (in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Mathias Seeliger, Universitätsaugenklinik Tübingen) durchgeführt. Diese Methode erfasst die elektrische Reizweiterleitung der eintreffenden Lichtreize durch die unterschiedlichen Schichten der Netzhaut und kann zwischen Beiträgen des Stäbchen- und Zapfensystems differenzieren (Seeliger *et al.* 2001).

Dunkel-adaptierte (skotopische) Einzelblitz-ERGs implizieren eine signifikante Erholung der „negativen“ b-Welle in den behandelten *versus* nicht-behandelten Augen (Abb. 49A). Eine verstärkte b-Welle konnte durch höhere Stimulusintensitäten erreicht werden, wobei eine moderate Zunahme der Stäbchen-vermittelten Amplituden in nahezu allen Tieren detektiert werden konnte (Abb. 49E, linke Hälfte). Ein deutlicherer therapeutischer Effekt konnte in hell-adaptierten (photopischen) Einzelblitz-ERGs wahrgenommen werden, der hauptsächlich durch die Erholung oszillatorischer Potentiale (OPs) zustande kommt (Abb. 49B, C). Der prominenteste Unterschied konnte im photopischen Flicker-ERG beobachtet werden (Abb. 49D, E). Zusätzlich zu den erhöhten oszillatorischen Potentialen waren die Antworten der Stimulusfrequenzen (größer als 3 bis 5 Hz) in den injizierten Augen deutlich vergrößert.

7.1.3 Immunohistochemische Untersuchungen

Zur Beurteilung des therapeutischen Effekts auf die RS1-Gewebeverteilung wurden Antikörperfärbungen mit dem polyklonalen RS1-3R10-Antikörper an retinalen Kryoschnitten Vektor-behandelter und nicht-behandelter Augen an PM9 sowie an altersangepassten C57BL/6 Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Das RS1-Färbemuster in den injizierten Augen war der erwarteten Verteilung des RS1-Proteins in der Wildtyp Retina erstaunlich ähnlich (Abb. 50A, B). Die Photorezeptorinnensegmente zeigten eine intensive Färbung, wobei die ONL und OPL ebenfalls diffus gefärbt waren. Typischerweise waren die Zellmembranen um die Bipolarzellen in der INL deutlich angefärbt. Die Verteilung des RS1-Proteins findet sich bis in die IPL. Wie erwartet, war lediglich in den peripheren Regionen der Netzhaut, die weit von der Injektionsstelle entfernt liegen, ein unvollständiges RS1-Färbemuster nachzuweisen. Diese Befunde korrelieren deutlich mit den SLO-Daten.

Therapeutische Verbesserungen in der strukturellen Integrität der Netzhaut wurden durch Differentielle Interferenzkontrast-Aufnahmen (DIC), mit DAPI gegengefärbt, gekennzeichnet (Abb. 50D - F).

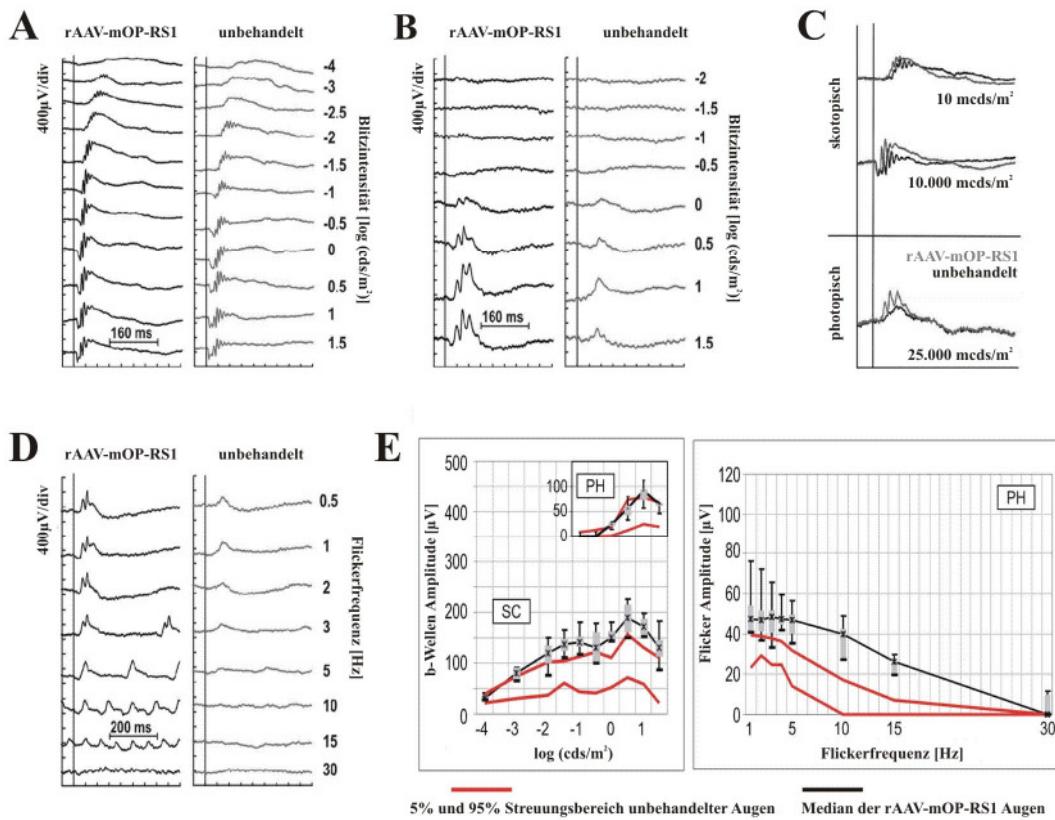


Abb. 49: Elektrophysiologische Evaluierung rAAV-mOP-RS1-injizierter und nicht-injizierter Augen *Rslh*-defizienter Mäuse 5 Monate nach der Vektor-Injektion. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Mathias Seeliger zur Verfügung gestellt. (A) Exemplarische skotopische (dunkel-adaptierte) Intensitätsserien einer behandelten Maus. Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Augen werden erst bei höheren Blitzintensitäten deutlich. Dies illustriert die Erholung der negativen b-Welle. (B) Exemplarische photopische (hell-adaptierte) Intensitätsserie einer behandelten Maus. Die Differenzen zwischen behandelten und nicht behandelten Augen sind aufgrund der stark reduzierten oder vollständig fehlenden oszillatorischen Potentiale in den unbehandelten Augen wesentlich deutlicher sichtbar. (C) Überlagerung ausgewählter skotopischer (oben) und photopischer (unten) ERG-Wellendarstellungen einer Intensitätsserie eines behandelten Tiers, um Unterschiede in der Ausprägung der einzelnen Wellen in den behandelten und nicht behandelten Tieren darzustellen. (D) Photopische Flicker-Serie eines behandelten Tiers. Prominente Unterschiede zwischen injizierten und nicht injizierten verdeutlichen ein Erholen der Wellen, insbesondere bei hohen Frequenzen über 3 bis 5 Hz. (E) Dunkel- (SC) und Hell- (PH) adaptierte b-Wellen und Flicker-Amplituden von injizierten Augen als eine Funktion des Logarithmus der Blitzintensität und Flicker-Frequenz. In beiden Graphen sind die Daten als box- und whisker-plots dargestellt. Dargestellt sind 5 % und 95 % Streubereich (whiskers), der 25 % Viertelwert (box), und der Median (gekennzeichnet durch ein Kreuz). Die roten Linien grenzen den Streubereich zwischen 5 % und 95 % der behandelten Augen ein.

Unbehandelte Augen ließen eine fortgeschrittene Fehlorganisation in der OPL und an der Grenze zwischen der äußeren und inneren Körnerschicht erkennen. Diese war durch zahlreiche Lücken und Löcher variabler Größen in der Schicht der Bipolarzellen zu erkennen (Abb. 50). Demgegenüber konnte in den behandelten Augen eine scharf abgegrenzte

Separierung der ONL und INL, eine Fehlen zystischer Bereiche an der Grenze zur OPL sowie eine Zunahme in der Dicke der Lage der Photorezeptorkerne, ähnlich den Befunden in Wildtyp-Tieren, aufgedeckt werden (Abb. 50D, E).

Zum Nachweis, dass diese Photorezeptoren potentiell funktionsfähig sind, wurde die Retina mit Antikörpern gegen Rhodopsin gefärbt. Es konnten keine offensichtlichen Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und rAAV-mOP-RS1-behandelten Augen festgestellt werden (Abb. 50G, H). In beiden Fällen sind die Innen- wie Außensegmente der Photorezeptoren stark angefärbt und weisen auf eine potentielle Funktionalität der Zellen hin. In nicht behandelten Augen konnte eine schwache Immunreakтивität in den wenigen verbleibenden Photorezeptoren detektiert werden (Abb. 50I).

Die Ausprägung des durch apoptotische Vorgänge gekennzeichneten Krankheitsbilds der *Rs1h*-defizienten Retina ist durch ein massives Einwandern von Makrophagen vom RPE herkommend in die innere Retina, initiiert an P14, begleitet (Gehrig *et al.* 2007). Antikörperfärbungen mit den Makrophagenmarker F4/80 (Abb. 50K - M) bestätigten eine starke Immunreakтивität in nicht behandelten Augen in Bereichen mit pathologischen Läsionen der Retina (Abb. 50M). Aktivierte und residente Makrophagen befinden sich in Bereich der Schisis (ONL/INL-Grenze), der IPL und den Ganglienzellen. In den behandelten Augen wie Wildtyp-Kontrollen konnten nur vereinzelt residente Makrophagen nachgewiesen werden (Abb. 50K, L).

GFAP ist ein Marker für eine pathologische, unspezifische Stressreaktion in der Retina. Normalerweise wird GFAP lediglich in geringen Mengen in der basalen Region der Müller Zellen exprimiert (Lewis *et al.* 1992). In den unbehandelten Augen war Gfap aufgrund der pathologischen Veränderungen der *Rs1h*-defizienten Netzhaut deutlich hoch reguliert (Abb. 50P). Der Befund deckt sich mit einer Reihe unabhängiger Studien, in denen unterschiedliche Abnormalitäten der Netzhaut von einer erhöhten *Gfap*-Expression begleitet wurden (Bravo-Nuevo *et al.* 2004; Smith *et al.* 1997). Behandelte *Rs1h*-defizierte Netzhäute zeigten annähernd normale *Gfap*-Expressionslevel (Abb. 50O).

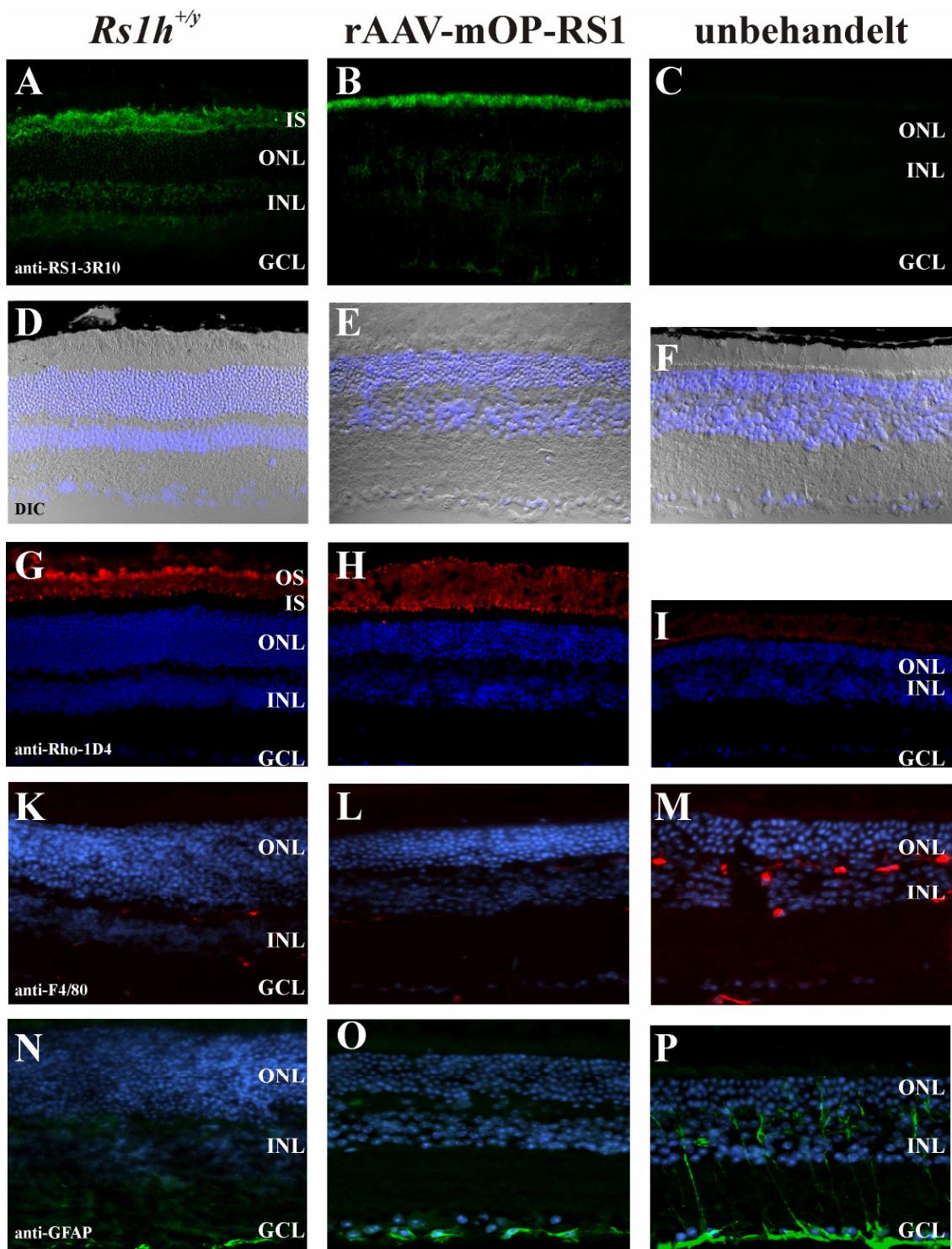


Abb. 50: Immunfluoreszenzmikroskopie der Netzhäute rAAV-mOP-RS1-injizierter und nicht-injizierter *Rslh*-defizienten Mäuse 9 Monate nach Vektor-Applikation. Retinale Kryoschnitte (#1492, WT PM9) (10 µm) wurden (A – C) mit dem polyklonalen RS1-3R10-Antikörper und (D – F) durch Differentielllem Interferenz-Kontrast (DIC) visualisiert, (G – I) Färbung mit dem monoklonalen anti-Rho-ID4-Antikörper, (K – M) dem monoklonalen F4/80 Makrophagenmarker und (N – P) dem polyklonalen Gfap-Antikörper, um die Antwort der Müller Zellen auf den retinalen Stress zu detektieren; Färbung. Zur Visualisierung wurden ein fluoreszenzgekoppelter Ziege anti-Kaninchchen-Alexa488 (grün) und Esel anti-Ratte-Alexa594 (rot) gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). RPE, Retinales Pigmentepithel; IS, Photorezeptorinnensegmente; ONL, Äußere Kernschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, Innere Kernschicht; GC, Ganglionzellschicht. Die Analyse aller verwendeter Marker deutet auf einen eindeutigen therapeutischen Erfolg in den behandelten *versus* nicht-behandelten Augen hin.

7.1.4 Analyse der räumlichen Expression des rAAV-mOP-RS1-Konstrukts

Zur Beurteilung der Effektivität der Vektortransduktion in Photorezeptorzellen, sowie der räumlichen Verteilung der rAAV-mOP-RS1-mRNA-Expression wurden RNA *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Ein 502 bp großes Fragment (rAAV), welches ein Teilstück des pTR-mOPS-RS1-Vektors, die kodierende Sequenz des humanen *RS1* und einen Teil der SV40-polyA-Sequenz umfasst (Abb. 51), wurde mit Hilfe der Primer Rs1-AAV-F und Rs1-AAV-R aus der RNA eines rAAV-mOP-RS1-injizierten Auges amplifiziert und kloniert. Durch *in vitro*-Transkription des Klons wurden DIG-markierte *sense*- und *antisense*-Sonden gewonnen. Mit diesen wurden retinale Kryoschnitte von Vektor-behandelten und nicht-behandelten Augen sowie *Rs1h*-defizienten Augen an P14 als Negativkontrolle hybridisiert (Abb. 51). Als Positivkontrolle zur Überprüfung einer erfolgreichen Hybridisierungsreaktion wurde eine Maus-Opsin *antisense*-Sonde verwendet. Diese hybridisierte zu den inneren Segmenten der Photorezeptoren und der äußeren Körnerschicht (Abb. 51A, Brann and Young 1986).

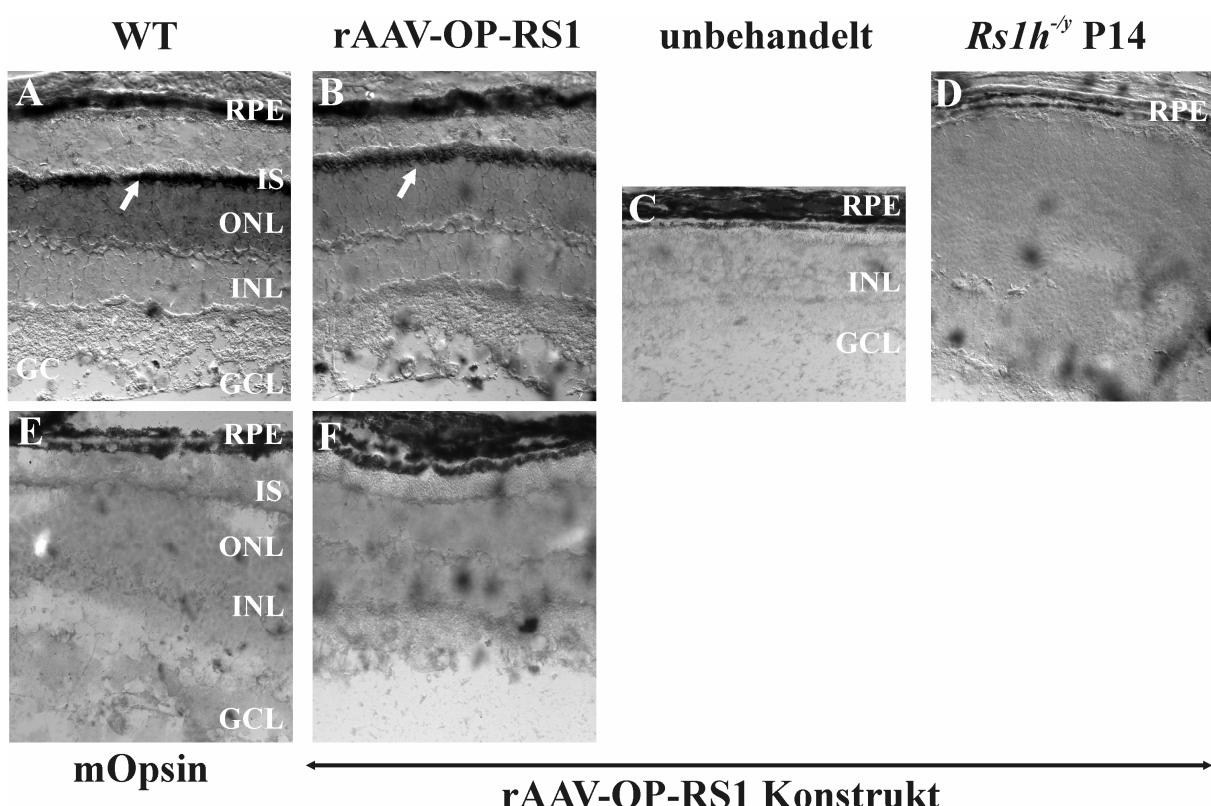


Abb. 51: RNA *in situ*-Hybridisierung an rAAV-mOP-RS1-behandelten und nicht-behandelten Schnitten zum Nachweis einer erfolgreichen Vektortransfektion von Photorezeptoren. RNA *in situ*-Hybridisierung an retinalen Wildtyp-Kryoschnitten (WTP9; #1492 B, C, F; *Rs1h*^{⁻/⁺} P12, D) mit der Maus Opsin *antisense*- (A) und (E) *sense*-Sonde als Positivkontrolle des Hybridisierungsprotokolls. RNA *in situ*-Hybridisierung an retinalen Kryoschnitten von (B) rAAV-mOP-RS1-behandelten und (C) nicht-behandelten sowie (D) *Rs1h*-defizienten P12 Augen, hybridisiert mit der rAAV-*antisense*-Sonde und (F) *sense*-Sonde. Die Hybridisierung mit der rAAV-*antisense*- Sonde zeigt eine pan-retinale Färbung der Photorezeptor-Innensegmente sowie ganz schwach in der äußeren Körnerschicht. RPE, retinales Pigmentepithel; IS, Photorezeptor Innensegmente; ONL, äußere Körnerschicht; INL, innere Körnerschicht; GCL, Ganglienzellschicht.

Die Hybridisierung mit der rAAV-*antisense*- Sonde ergab pan-retinale Hybridisierungssignale in den inneren Segmenten der Photorezeptoren rAAV-mOP-RS1-behandelter Augen (Abb. 51B). Demgegenüber konnte das rAAV-Fragment in unbehandelten Augen und den Augen von P14 *Rs1h*-defizienten Mäusen als externe Negativkontrolle nicht gefunden werden (Abb. 51C, D). Ein Hybridisierungsvorgang an rAAV-mOP-RS1-behandelten Schnitten mit der rAAV-*sense*-Sonde zeigte ebenfalls keine Signale (Abb. 51F). Die Daten lassen auf eine vollständige Transfektion der Photorezeptorzellen mit dem Vektorkonstrukt schließen. Diese führt letztlich zu einer pan-retinalen mRNA-Expression des viralen Vektorkonstrukts in den behandelten Tieren. Die Ergebnisse korrelieren deutlich mit den immunohistochimischen RS1-Färbungen (Abb. 51A - C).

7.2 Studien zum Langzeiterfolg der rAAV-mOP-RS1-Gentherapie

Von den ursprünglich behandelten ($n = 17$) Tieren konnte der individuelle Verlauf der Erkrankung bei 5 Tieren bis zum 19. Lebensmonat mittels nicht-invasiver Techniken wie dem SLO und ERG verfolgt werden. Anschließend wurden die Tiere getötet und phänotypisch im Detail charakterisiert.

7.2.1 SLO-Messungen

Obenflächen- und Autofluoreszenzaufnahmen (erstellt in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Mathias Seeliger, Universitätsaugenklinik Tübingen, AG Retinale Funktionsdiagnostik, 72076 Tübingen), die 19 Monate nach der Injektion mit grünen (514 nm) und blauen (488 nm) Laserwellenlängen aufgenommen wurden, offenbarten einen deutlichen Unterschied zwischen den behandelten und nicht-behandelten Augen (Abb. 52B, C; E, F). Der Augenfundus der nicht-behandelten Augen zeigte die typischen Zeichen einer starken Degeneration im Endstadium. Eine fleckige Darstellung des Fundus aufgrund von Pigmentverlusten des RPE als auch einen Verlust des regulären strukturellen Aufbaus zwischen Photorezeptoren, RPE und dem Choroid konnten beobachtet werden. Zudem erschien das Choroid abnormal verändert (Abb. 52C). Die retinalen Gefäßstrukturen waren zusammengezogen. Das massive Absterben von Photorezeptoren äußerte sich in pünktchenförmigen autofluoreszierenden Partikeln im kurzweligen Bereich (Abb. 52F). Demgegenüber konnten in Fundusanalysen des behandelten Partnerauges nur leichte pathologische Veränderungen in Bezug auf die Pigmentierung des RPE und die retinale Vaskulatur aufgedeckt werden (Abb. 52B, E). Diese Befunde beschreiben bei einem Vergleich mit Wildtyp Kontrollen jedoch „normale“ altersabhängige Degenerationsprozesse (Abb. 52A). Autofluoreszenzaufnahmen demonstrierten lediglich limitierte autofluoreszierende Signale,

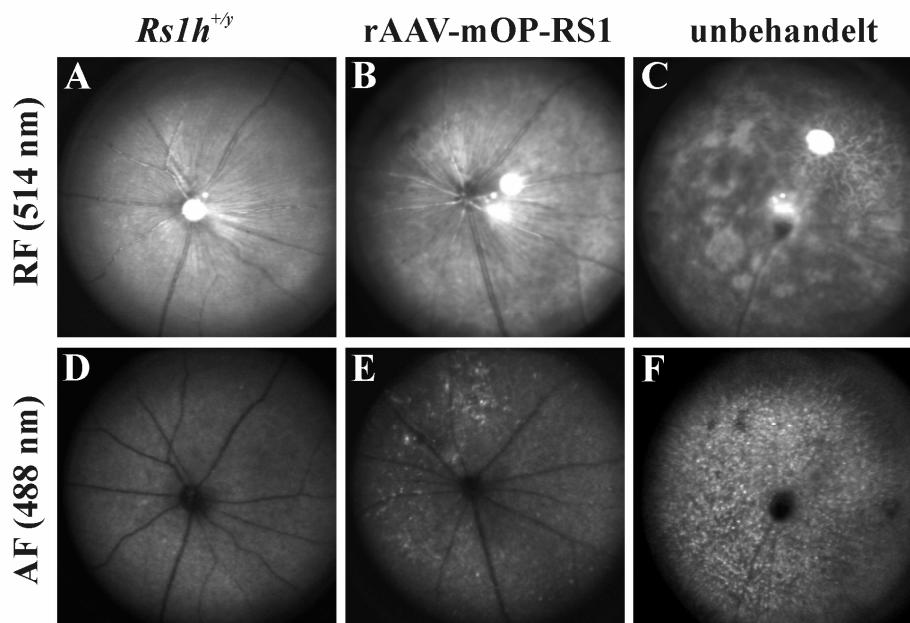


Abb. 52: Retinale SLO-Aufnahmen des gesamten Augenfundus von repräsentativen Wildtyp *RsIh*-defizienten behandelten und nicht-behandelten Augen. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Mathias Seeliger zur Verfügung gestellt. (A – C) Infrarot (RF, 514,5 nm) Aufnahmen des Augenfundus bei 20°. (D – F) Autofluoreszenzaufnahmen (AF, 488 nm) des Augenfundus bei 20°. RF-Aufnahmen lassen eine fast vollständige Zerstörung der Retina in unbehandelten Augen erkennen, während die behandelten Augen ein weitgehend gesundes Erscheinungsbild ohne große Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Unbehandelte Augen zeigen zudem starke autofluoreszierende Signale, die in den rAAV-mOP-RS1 behandelten Augen im Wesentlichen auf die Injektionsstelle beschränkt sind.

was darauf hindeutet, dass die meisten Photorezeptoren überlebt haben (Abb. 53E).

7.2.2 ERG-Messungen

In den inizialen Studien zum therapeutischen Erfolg der AAV-mOP-RS1-Injektion konnte eine Erhaltung der visuellen Funktion der Netzhaut 5 Monate nach der Vektor Applikation anschaulich verdeutlicht werden. Um einen Langzeiterfolg auf die Erhaltung der Reizweiterleitung der retinalen Neuronen zu definieren, wurden ERG-Messungen (erstellt in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Mathias Seeliger, Universitätsaugenklinik Tübingen, AG Retinale Funktionsdiagnostik, 72076 Tübingen) zu den Zeitpunkten 12 und 19 Monate nach dem therapeutischen Eingriff vorgenommen. Bei einem Vergleich der behandelten gegen nicht-behandelten Augen im zeitlichen Verlauf konnte ein auffälliger Seitenunterschied im ERG der Augen (Abb. 53A, B exemplarisch für ein Tier) festgestellt werden. Der Befund korreliert mit der Tatsache, dass die retinale Funktion in den behandelten Augen stabil erhalten bleibt, während die ERG-Antworten in den nicht-behandelten Augen graduell bis hin zu nicht mehr detektierbaren Werten zum Zeitpunkt von PM19 nach der Behandlung abnimmt (Abb. 53B, D). Diese Befunde gelten gleichermaßen für skotopische und

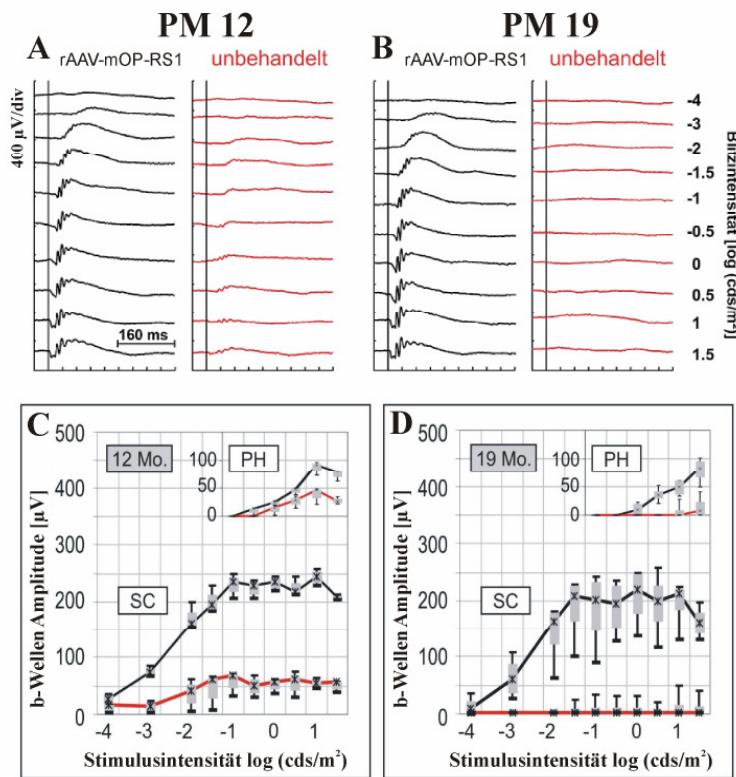


Abb. 53: Elektrophysiologische Evaluierung rAAV-mOP-RS1-behandelter und nicht-behandelter Augen *Rs1h*-defizienter Mäuse 12 und 19 Monate nach der Vektor-Injektion. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Mathias Seeliger zur Verfügung gestellt. (A und B) Exemplarische skotopische (dunkel-adaptierte) Intensitätsserien einer behandelten Maus 12 und 19 Monate nach der Vektor-Applikation. (C und D) Dunkel- (SC) und Hell- (PH) adaptierte b-Wellen von injizierten und nicht-injizierten Augen als eine Funktion des Logarithmus in Abhängigkeit von der Blitzintensität. In beiden Graphen sind die Daten als box- und whisker-plots dargestellt. Die Antworten der therapierten Augen bleiben in etwa konstant, während die der nicht-behandelten Augen bei PM19 postnatal praktisch verschwunden sind.

photopische ERG-Ableitungen (Abb. 53C, D, Durchschnittswerte von 5 Tieren) und deuten darauf hin, dass sich der Therapieerfolg sowohl im Stäbchen- wie auch im Zapfensystem der Netzhaut auswirkt. Um neben einem relativen Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Augen auch ein absolutes Maß für die Einschätzung der Therapieeffizienz zu haben, wurden die ERG-Antworten der behandelten Augen von *Rs1h*-defizienten Tieren auch mit solchen von altersangepassten Wildtyp-Tieren verglichen (Abb. 54). Bei diesem Vergleich waren die Werte der behandelten Augen nur etwas geringer als die der Wildtypkontrollen, wobei der Überlappungsbereich der Messungen darauf hindeutet, dass etwa 50 % der behandelten Augen mit dem 90 % Normalbereichs der Wildtyp-Kontrollen übereinstimmen (Abb. 54).

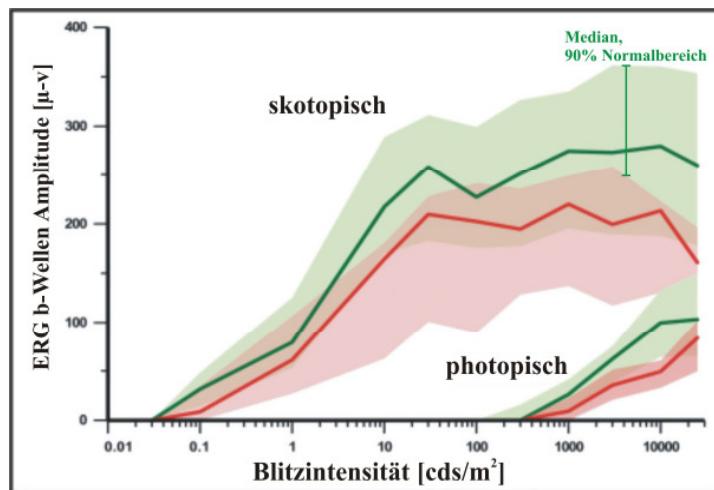


Abb. 54: Elektrophysiologische Evaluierung rAAV-mOP-RS1-behandelter Augen *Rs1h*-defizienter Mäuse 19 Monate nach der Vektor Injektion und altersangepasster Wildtyp-Kontrollen. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Mathias Seeliger zur Verfügung gestellt. Skotopisch und photopisch adaptierte b-Wellen von injizierten PM19 Augen (rote Linien) und altersangepassten Wildtyp-Kontrollen (grüne Linien) als eine Funktion des Logarithmus der Blitzintensität. Die Standardabweichungen sind als grüne (Wildtyp) und rote (behandelte Augen) Wolken dargestellt. In beiden Graphen sind die Daten als box- und whisker-plots dargestellt. Etwa 50 % der Antworten der therapierten Augen überlappen mit dem Normalbereich für Wildtyp-Tiere.

7.2.3 Histologische und immunohistochemische Untersuchungen

Eine nachfolgende histologische Analyse (in Zusammenarbeit mit PD Dr. Silke Haverkamp, MPI für Hirnforschung Frankfurt, 60528 Frankfurt am Main) verdeutlichte anschaulich das Ausmaß des therapeutischen Heilungseffekts. Nahezu alle Photorezeptoren in der äußeren Retina zeigten in den nicht-behandelten Augen eine vollständige Degeneration. Dies führte zu einem abnormalen Kontakt zwischen dem RPE und den Zellen der inneren Körnerschicht (Abb. 55C). Der strukturelle Aufbau und die Dicke der behandelten Netzhaut konnte durch den therapeutischen Eingriff in den meisten Bereichen vollständig erhalten werden. Insbesondere die Photorezeptoraußensegmente, verantwortlich für die primären Schritte in der Verarbeitung des optischen Signals, erschienen gut entwickelt (Abb. 55B). Zur Vergewisserung, dass diese Photorezeptoren potentiell funktionsfähig sind, wurde die Retina mit Antikörpern gegen Rhodopsin (monoklonal, Rho1D4), dem Chromophor der Photorezeptor-Stäbchen (Abb. 56A - C) gefärbt. Es konnten keine offensichtlichen Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und rAAV-mOP-RS1-behandelten Augen festgestellt werden. In beiden Fällen sind die Innen- wie Außensegmente der Photorezeptoren stark angefärbt und weisen auf eine potentielle Funktionalität der Zellen hin. In nicht-behandelten Augen konnte keine Rhodopsin-Immunreakтивität detektiert werden (Abb. 56C).

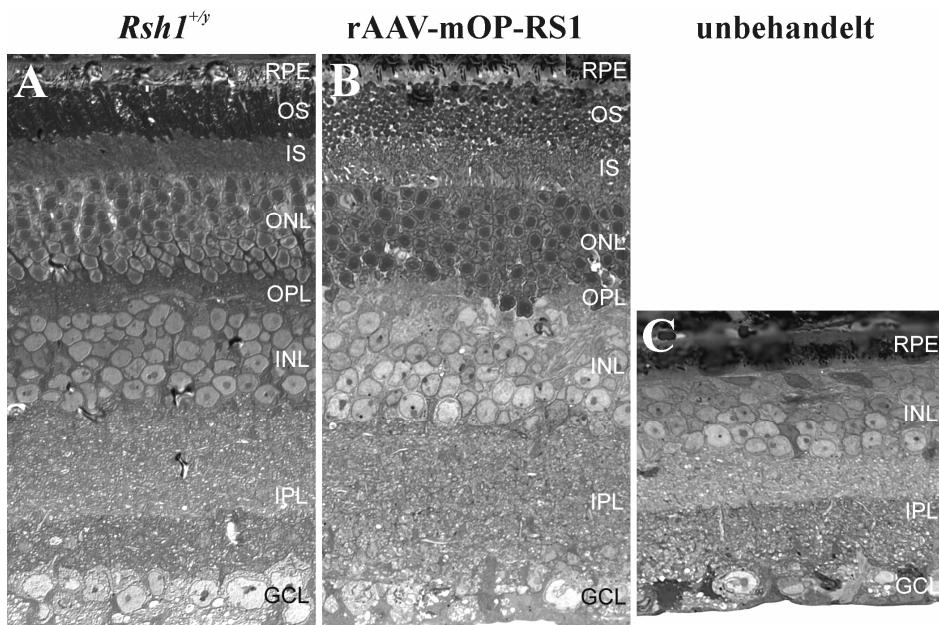


Abb. 55: Lichtmikroskopische Aufnahme von Wildtyp, *Rsh1*-defizienten behandelten und nicht-behandelten Augen. Die Abbildung wurde freundlicherweise von PD Dr. Silke Haverkamp zur Verfügung gestellt. (A und B) Semidünn-Schnitte ($\leq 1\mu\text{m}$) der Netzhäute 18 Monate alter *Rsh1*^{+/y} (Z1059) (A), *Rsh1*^{Δy} rAAV-mOP-RS1 (#1497) behandelter (B) und nicht-behandelter Augen (C) wurden durch Lichtmikroskopie ausgewertet. RPE, retinale Pigmentepithel; OS, Äußere Segmente; IS, Innere Segmente; ONL, Äußere Kernschicht; OPL, Äußere plexiforme Schicht ; INL, Innere Kernschicht; IPL, Innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglion Zellschicht.

In vergleichbarer Weise wurden das Vorhandensein und die Verteilung von RS1, dem Protein, dass in *Rsh1*-defizienten, unbehandelten Augen vollständig fehlt (Abb. 56F) durch Antikörperfärbungen mit einem polyklonalen Antikörper (RS1-3R10) überprüft. Auch in diesem experimentellen Ansatz waren Menge und Verteilung von RS1 in der Netzhaut von Kontrollen und behandelten Augen nicht voneinander zu unterscheiden. Die Photorezeptorinnensegmente und Bipolarzellen zeigten die intensivsten Immunreaktivitäten mit gradualem Abfall der Färbeintensität in der ONL und IPL (Abb. 56D-E).

Im Folgenden wurde überprüft, ob die synaptischen Verbindungen zwischen Photorezeptor- und Bipolarzellen in den behandelten Augen eine reguläre Reizweiterleitung in die innere Retina ermöglichen. Diese Fragestellung ist von besonderer Bedeutung, da durch eine Schisis bedingte Separation der ONL, OPL und INL diese synaptischen Verbindungen in der *Rsh1*-defizienten Netzhaut zerstört werden (Weber *et al.* 2002). Retinale Kryoschnitte wurden mit den Markern für Stäbchen-ON-Bipolarzellen, Proteinkinase C (*Protein kinase C alpha*, PKC α), und für Band (Ribbon)- Synapsen, C-terminales Bindeprotein (*C-terminal binding protein 2*, CtBP2), gefärbt (Abb. 57). Wie erwartet, waren in der INL nicht-injizierter Augen sämtliche synaptischen Verbindungen zwischen diesen Zelltypen vollständig degeneriert (Abb. 57C). In den rAAV-mOP-RS1 behandelten Augen zeigten die Bipolarzellendriten und korrespondierenden

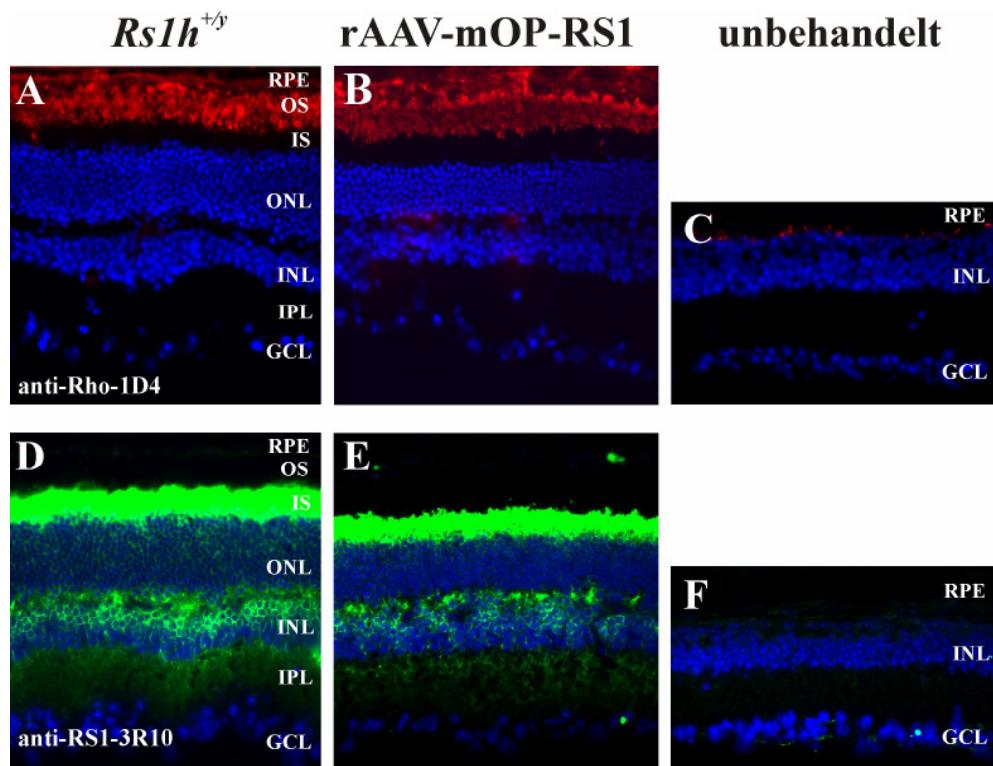


Abb. 56: Immunohistochemischer Nachweis von Retinoschisin und Rhodopsin an retinalen Kryoschnitten von Wildtyp, *Rs1h*-defizienten behandelten und nicht-behandelten Augen. 10 µm Kryoschnitte der Netzhäute 19 Monate alter 18 Monate alter *Rs1h*^{+/y} (A und D), *Rs1h*^{+/y} rAAV-mOP-RS1 (#1495) behandelter (B und E) und nicht-behandelter Augen (C und F) inkubiert mit anti-Rhodopsin Rho 1D4 (1: 200, obere Reihe) und anti-RS1-3R10 (1:250, untere Reihe) in 40-facher Vergrößerung. Zur Visualisierung wurde ein fluoreszenzgekoppelter Ziege anti-Kaninchen-Alexa488 gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). RPE, Retinales Pigmentepithel; ONL, Äußere Kernschicht; INL, Innere Kernschicht; GC, Ganglienzellschicht. In der *Rs1h*^{+/y} und rAAV-mOP-RS1-behandelten Retina zeigen die Retinoschisin- und Rhodopsin-Färbungen das erwartete, normale Verteilungsmuster in den einzelnen retinalen Schichten. In der nicht-behandelten Netzhaut können diese Proteine aufgrund der schwerwiegenden Degeneration nicht mehr nachgewiesen werden.

Synapsen zu den Photorezeptorzellen eine annähernd korrekte Lokalisation an der Grenze OPL/INL, jedoch mit einer größeren Variabilität in der Länge der Neuriten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Abb. 57B, D). Darüber hinaus kam es zur Bildung von neu verschalteten (ektopischen) Synapsen in der ONL (Abb. 57B, D). Neuverschaltungen werden als ektopische Synapsen bezeichnet, da sie nicht an ihrer typischen, ursprünglichen Stelle in der Netzhaut, der OPL, lokalisieren. Bei diesem Effekt könnte es sich um Spuren der durch den Krankheitsverlauf der Retinoschisis bedingten Aufsplittung der OPL halten, da die Bildung von ektopischen Synapsen zwischen Photorezeptor-Stäbchen und Bipolarzellen als ein typisches Merkmal von retinalen Degenerationserscheinungen auftritt (Claes *et al.* 2004, Cuenca *et al.* 2005, Haverkamp *et al.* 2006, Bayley *et al.* 2007).

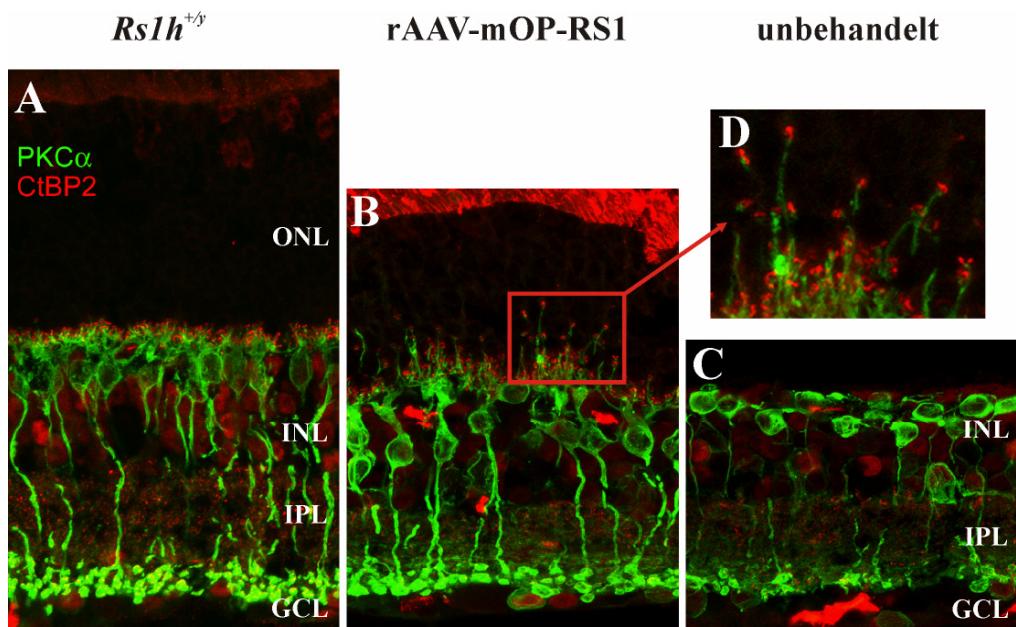


Abb. 57: Immunohistochemischer Nachweis von PKC α und CtBP2 an retinalen Kryoschnitten von Wildtyp, *RsIh*-defizienten behandelten und nicht-behandelten Augen. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Silke Haverkamp zur Verfügung gestellt. 10 μ m Kryoschnitte der Nezhäute 19 Monate alter *RsIh*^{+/−} (A), *RsIh*^{−/−} rAAV-mOP-RS1 (#1497) behandelter (B) und nicht behandelter Augen (C) doppelt gefärbt mit anti-PKC α (Bipolarzellen, grün) und anti-CtBP2 (Ribbon Synapsen, rot). ONL, Äußere Kernschicht; INL, Innere Kernschicht; GC, Ganglienzellschicht. (D) Ausgewählter Bereich, um das Auswachsen bipolarer Zellen und ektopischer Synapsen in der ONL bei höherer Vergrößerung zu zeigen. Die wachsenden Dendriten der Neuronen bilden Kontakte mit den präsynaptischen Photorezeptor-Ribbons. Behandelte rAAV-mOP-RS1 Augen zeigen vollständig restaurierte neuronale Schichten mit funktionsfähigen Bipolarzellen.

Offensichtlich ermöglichte es die therapeutische Behandlung den Bipolarzellen, diese Distanz durch ein Auswachsen der Neuriten zu überkommen, so dass potentiell funktionsfähige Verbindungen mit den Photorezeptoren neu geknüpft werden konnten (Abb. 57D). In einem Mausmodell, das sich durch ein vollständiges Fehlen von Photorezeptorzellen, Zapfen, wie Stäbchen auszeichnet, konnte gezeigt werden, dass ein Auswachsen von Bipolareuriten sehr schnell abgebrochen wird, wenn keine funktionsfähigen Photorezeptoren mehr zur Verfügung stehen (Claes *et al.* 2004).

7.2.4 Elektronenmikroskopie

Eine weitergehende, ultrastrukturelle Untersuchung der Synapsen rAAV-mOP-RS1-behandelter Mäuse wurde mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (in Zusammenarbeit mit Dr. Silke Haverkamp, MPI für Hirnforschung, Frankfurt) durchgeführt (Abb. 58). Detaillierte Analysen der Bipolarzellen an der Grenze der OPL zur INL ergaben, dass sowohl die Stäbchen- (*rod spherules*) als auch Zapfen-spezifischen (*cone pedicles*) synaptischen Verbindungen in den behandelten vollständig ausgebildet sind (Abb. 58B, D). Da keine auffälligen strukturellen oder integrativen Veränderungen der Synapsen zu

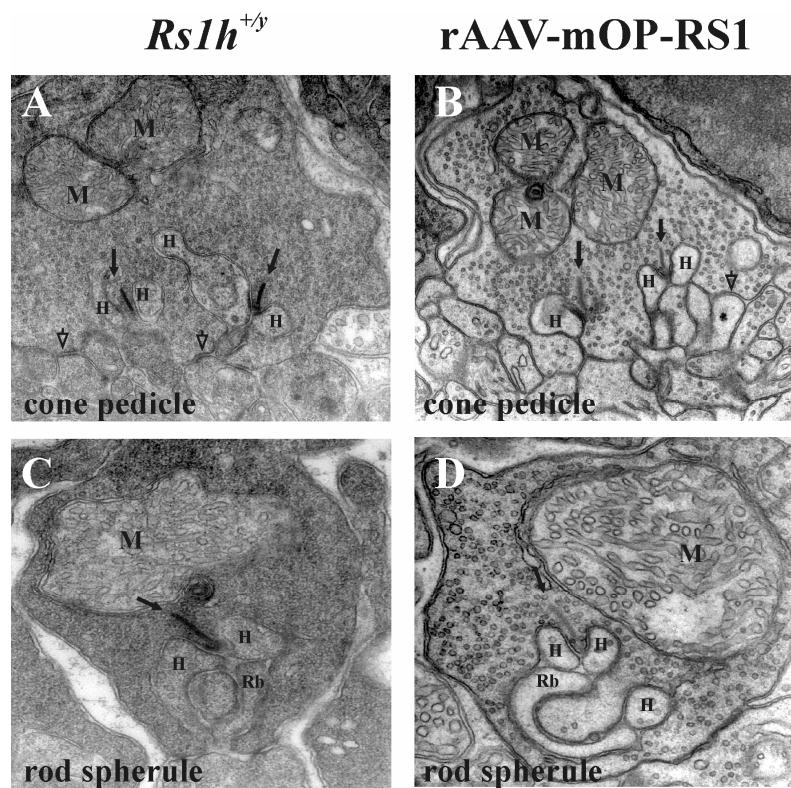


Abb. 58: Transmissionselektronenmikroskopische Analyse der Synapsen von Wildtyp, *Rs1h*-defizienten behandelten Augen. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Silke Haverkamp zur Verfügung gestellt. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Zapfensynapse (*cone pedicle*) in einem Wildtyp (A) und rAAV-mOP-RS1 (#1497) behandelten Auge (B). (C und D) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Wildtyp und Vektor behandelten Stäbchensynapse (*rod spherule*) derselben Netzhaut. M, Mitochondrien; H, Horizontalzellen; Rb, Dendriten der Stäbchen-Bipolarzellen. Die behandelten Augen zeigen intakte synaptische Bänder (*ribbons*) (Pfeile) und intakte, flache synaptische Verbindungen (Pfeilköpfe). Es können keine morphologischen Unterschiede zwischen behandelten und Wildtypsynapsen festgestellt werden.

Wildtyp-Kontrollen (Abb. 58A, C) gefunden werden konnten, deutet der Befund sowohl auf funktionsfähige Synapsen in der OPL, als auch funktionsfähige, ektopische Synapsen in der ONL hin, auch wenn die ektopischen Synapsen nicht ultrastrukturell untersucht wurden.

7.3 Studien zum therapeutischen Erfolg bei rAAV-mOP-RS1-Applikation in fortgeschrittenen Stadien retinaler Degeneration *Rs1h*-defizienter Mäuse

Im Folgenden sollten Effizienz und Effektivität eines gentherapeutischen Eingriffs zu unterschiedlichen Stadien retinaler Degeneration in *Rs1h*-defizienten Mäusen geklärt werden. Insbesondere im Hinblick auf die klinische Relevanz eines solchen therapeutischen Ansatz beim Menschen wurden rAAV-mOP-RS1-Injektionen zu fortgeschrittenen und späten Stadien der Krankheit vorgenommen, um ein optimiertes Zeitfenster zu definieren, in dem eine solche Intervention bei dem sowohl heterogenen wie progressiven Krankheitsverlauf der RS1 Sinn macht.

Die Injektionen wurden bei vier unterschiedlichen Altersstadien *Rs1h*-defizienter Mäuse vorgenommen (PM0,5; PM1; PM2 und PM7). Die Injektionen wurden wie in den

vorangegangenen Studien einmalig vorgenommen. Insgesamt wurden 38 Tiere mit 9 bis 10 Mäusen pro Altersstadium injiziert, um eine statistische Relevanz der Daten abschätzen zu können. Aufgrund morphologischer Pathologien wie Katarakte und Netzhautveränderungen, die durch methodische Probleme des Injektionsvorgangs an sich hervorgerufen wurden, mussten 5 Tiere von den Untersuchungen ausgeschlossen werden, so dass letztlich 33 Tiere mit 7 bis 10 Tieren pro Altersstadium ausgewertet werden konnten. Aufgrund der häufig aufgetretenen Veränderungen im vorderen Abschnitt der Augen behandelter Tiere (Katarakt etc.) konnten keine brauchbaren SLO-Daten generiert werden.

7.3.1 Zeitlicher Verlauf der Photorezeptordegeneration in *Rs1h*-defizienten Mäusen

Der Zeitpunkt, zu dem die Injektion stattfindet, könnte für eine erfolgreiche Verzögerung bzw. ein Stoppen des Krankheitsverlaufs von entscheidender Bedeutung sein. In vorangegangenen Studien dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der Photorezeptor-Zelltod in der *Rs1h*-defizienten Maus durch apoptotische Vorgänge vorangetrieben wird, die um den postnatalen Tag 14 beginnen (Gehrig *et al.* 2006, 2007). Histologisch werden die Auswirkungen durch eine progressive Reduktion in der Dicke der ONL im zeitlichen Verlauf deutlich (Weber *et al.* 2002, Kjellstrom *et al.* 2007). Um genauere Aussagen über den zeitlichen Verlauf und die Quantifizierung des Zelltods der Photorezeptoren in der *Rs1h*-defizienten Netzhaut treffen zu können, wurde die Anzahl der Zapfen und Schichten der Gesamtphotorezeptorkerne in der ONL über einen Zeitraum von 10 Monaten der Krankheitsprogression ermittelt (Abb. 59). Als Marker für den Zelltod wurden die Anzahl der verbleibenden Zapfen in der Retina sowie die Schichten der gesamten Photorezeptorkerne, die beide Zelltypen (Zapfen wie Stäbchen) repräsentieren, ausgezählt (Abb. 59). Die Zapfen wurden spezifisch mit Alexa488-konjugiertem Erdnuss-Agglutinin (*peanut agglutinin*, PNA) angefärbt. PNA färbt ebenso die synaptischen Verbindungen (ribbon-Synapsen) in der OPL. Als Maß für die Gesamtheit der Photorezeptoren wurden die Zellkerne der retinalen Schichten mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Diese Zählungen wurden mit Wildtyp-Mäusen aus drei unterschiedlichen Altersstadien von P15 bis PM13 verglichen. Die *Rs1h*-defizienten Tiere wurden zu den Zeitpunkten PM0,5; PM1; PM4; PM6 und PM10 analysiert. Zum Zeitpunkt PM0,5 kurz vor der großen Apoptosewelle um PM18 (Gehrig *et al.* 2006, 2007) sind in der *Rs1h*-defizienten Netzhaut ca. 16 Schichten von Photorezeptorzellkernen und ca. 500 Zapfen pro retinalem Kryoschnitt vorhanden. Die Zahlen stimmen mit denen von Wildtyp Tieren überein (Abb. 59). Der weitere Verlauf des Zellverlustes in der erkrankten Netzhaut folgt einem 2-Phasen Muster mit einer inizialen dramatischen Abnahme von Photorezeptorzellen von über 40 % innerhalb des ersten Lebensmonats. Anschließend scheint sich der Verlust an Photorezeptorzellen zu verlangsamen, und adaptiert sich in eine lineare Progression mit einer durchschnittlichen

Zelltodrate von 9,3 % pro Monat. Bis zu einem Alter von 10 Monaten sind ca. 83 % der Photorezeptoren in der erkrankten Netzhaut verloren gegangen.

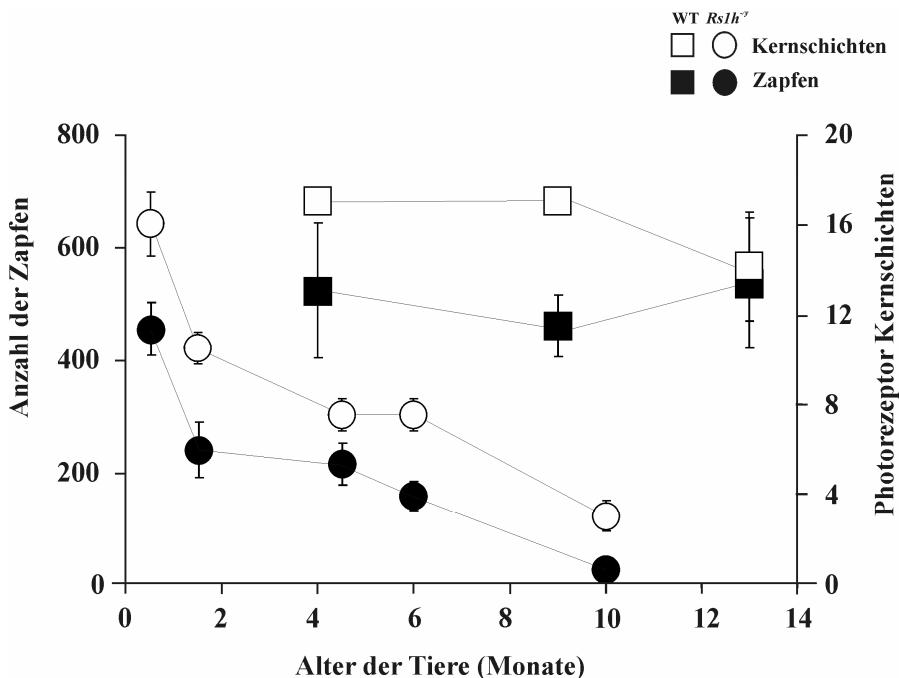


Abb. 59: Statistische Evaluierung der Zapfen- und Gesamtphotorezeptorzellen Färbung in retinalen Kryoschnitten von *Rs1h*-defizienten Augen, die die progressive Photorezeptordegeneration bei RS1 darstellt. Retinale Kryoschnitte der angezeigten Altersstadien wurden mit Alexa488-konjugiertem *peanut agglutinin* (PNA) gefärbt und mit DAPI gegengefärbt, um die retinalen Kernschichten zu definieren. Die Graphen repräsentieren die durchschnittliche Anzahl der Zapfen (schwarz) und Photorezeptorkernschichten (weiß) \pm SD der *Rs1h*-defizienten Netzhäute. Die Werte stellen den Durchschnitt von drei retinalen Schnitten eines einzelnen Auges von zwei unterschiedlichen Individuen eines Altersstadiums dar.

Unter Berücksichtigung dieser Befunde erscheint eine Therapie zu einem frühstmöglichen Zeitpunkt, bevor die ersten Photorezeptoren absterben (P14), am sinnvollsten. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Expression des über den Virus verabreichten RS1-Proteins in einem geeigneten physiologischen Level, so dass die Photorezeptoren fortan weniger anfällig für Degenerationsprozesse sind.

7.3.2 ERG-Messungen

Zur Gewinnung eines Überblicks der funktionellen Konsequenzen eines RS1-Ersatzes zu unterschiedlichen Stadien der Krankheitsprogression wurden die maximalen Stäbchenvermittelten (skotopischen) ERG-Amplituden (erstellt in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Mathias Seeliger, Universitätsaugenklinik Tübingen, AG Retinale Funktionsdiagnostik, 72076 Tübingen) in regelmäßigen Intervallen über einen Zeitraum von 4 Monaten gemessen (Abb. 60). In den vorangegangenen Studien zeigte sich, dass die b-Wellen Amplituden in den unbehandelten Augen mit dem zeitlichen Verlauf abnehmen, während sich dieser Trend durch die rAAV-mOP-RS1-Behandlung ca. einen Monat nach der Injektion umkehrte und

lebenslang (19 Monate) vollständig erhalten geblieben ist. Ein ähnlicher Effekt konnte auch für die Stäbchen-vermittelte a-Welle mit stabilen a-Wellen Amplituden in behandelten Netzhäuten über einen Zeitraum von 3 und 19 Monaten nachgewiesen werden (Weber *and* Kellner 2006, Min *et al.* 2006). Auch in diesem experimentellen Ansatz eigneten sich die b-Wellen Amplituden sehr gut, um den therapeutischen Erfolg von der funktionellen Seite her abzuschätzen. Insbesondere die „negative“ b-Wellenform zeigte bei hohen Stimulusintensitäten in den skotopischen Einzelblitz-ERGs und oszillatorischen Potentialen, die aus der inneren Retina resultieren, deutliche Verbesserungen. Der zeitliche Abstand nach der Behandlung wurde mit 4 Monaten konstant gehalten, somit wurden die ERG-Messungen bei einem Alter der Tiere von 4,5; 5; 6 und 11 Monaten durchgeführt. Eine deutliche Zunahme der b-Wellenamplitude in Relation zum unbehandelten Partnerauge (verdeutlicht durch den grün markierten Bereich) konnte nur bei Tieren mit einer Injektion bei PM0,5 festgestellt werden (Abb. 60A). Diese Daten stimmen mit den vorangegangenen Studien überein und können als Positivkontrolle für die neue Versuchsreihe herangezogen werden. Eine Injektion zum Zeitpunkt PM1 führte immer noch zu einem substantiellen, positiven Effekt auf die retinale Funktion innerhalb der nächsten 4 Monate (Abb. 60B).

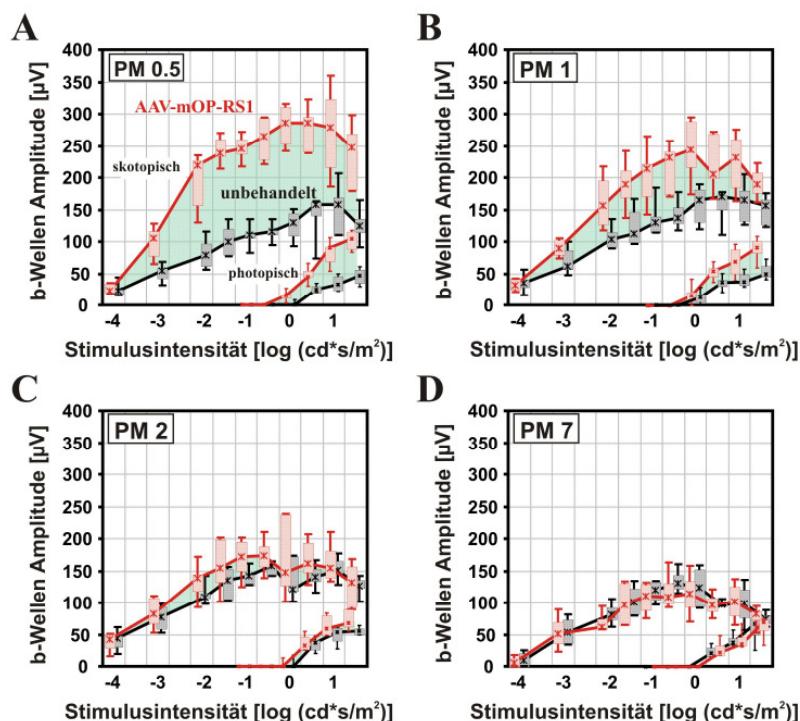


Abb. 60: Elektrophysiologische Evaluierung rAAV-mOP-RS1-behandelter und nicht-behandelter Augen *Rsh*-defizienter Mäuse 4 Monate nach der Vektor-Injektion. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Mathias Seeliger zur Verfügung gestellt. Exemplarische skotopische und photopische (dunkel-und helladaptierte) Intensitätsserien behandelter Mäuse 4 Monate nach der Vektor Applikation bei einem Alter bei der Injektion von (A) PM0,5; (B) PM1; (C) PM2; (D) PM7. Die skotopisch und photopisch adaptierte b-Wellen von injizierten und nicht-injizierten Augen werden als eine Funktion des Logarithmus in Abhängigkeit von der Blitzintensität dargestellt. In allen Graphen sind die Daten als *box- und whisker-plots* dargestellt. Die Antworten der therapierten Augen nehmen dem Krankheitsverlauf entsprechend mit zunehmendem Alter bei Injektion deutlich ab. Ab PM2 sind keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und nicht-behandelten Augen feststellbar.

Tiere, die zu einem Zeitpunkt von 2 Monaten injiziert wurden, zeigten lediglich tendenziell erhöhte b-Wellen im Vergleich zu den nicht-behandelten Augen jedoch ohne statistische Signifikanz. Eine Injektion im finalen Stadium der Degeneration bei PM7 konnte keine erfolgreichen ERG-Antworten der injizierten Augen bei PM11 hervorrufen (Abb. 60D).

7.3.3 Immunohistochemische Evaluierung des therapeutischen Effekts zu unterschiedlichen Injektionszeitpunkten

Zur Bestimmung des Behandlungseffekts auf die gewebespezifische Verteilung des RS1-Proteins in der Netzhaut wurden Kryoschnitte der oben beschriebenen Tiere mit dem polyklonalen RS1-3R10-Antikörper gefärbt. Das RS1-Färbemuster der rAAV-mOP-RS1-injizierten Augen hat sich nicht von der Wildtyp RS1-Verteilung bei einer Injektion zum Zeitpunkt PM0,5 unterschieden (Abb. 61A). Sowohl in Wildtyp als auch injizierter Augen konnte in den inneren Segmenten der Photorezeptoren eine intensive RS1-Immunreakтивität nachgewiesen werden, wobei die äußere Kernschicht und die äußere plexiforme Schicht ebenfalls angefärbt wurden. Eine zusätzliche, distinkte Färbung der Bipolarzellen der inneren Kernschicht und Färbungen in der inneren plexiformen Schicht waren ebenso zu detektieren. Diese Daten bestätigen die vorangegangenen Analysen. Erstaunlicherweise war eine RS1-Immunreakтивität in allen rAAV-mOP-RS1-behandelten Augen nachzuweisen, zu jedem Zeitpunkt der Vektor-Injektion und völlig unabhängig vom Status der Krankheitsprogression. Sogar zu einem Zeitpunkt, an dem die meisten Photorezeptoren bereits abgestorben sind (83 % bei PM7) konnte eine Expression des RS1-Proteins durch erfolgreiche rAAV-mOP-RS1-Applikation in die verbleibenden Photorezeptoren erreicht werden. Allerdings war eine Abnahme der Färbung mit fortschreitender Entwicklung des *Rs1h*-defizienten Phänotyps zu beobachten (Abb. 61C, D). Darüber hinaus wurde RS1 erfolgreich in die innere Retina weitergeleitet und konnte an die Oberfläche der Bipolarzellen binden, obwohl die retinale Architektur der äußeren Kernschicht, äußeren plexiformen Schicht und der inneren Kernschicht aufgrund der Degenerationserscheinungen im Endstadium, einer schwerwiegenden Desorganisation unterlegen ist.

Zur Quantifizierung des Behandlungserfolgs auf histologischer Basis, wurden die Zapfen und Photorezeptorkernschichten rAAV-mOP-RS1-behandelter und nicht-behandelter Augen sowie altersangepasster Wildtypkontrollen mit PNA und DAPI doppelt gefärbt. Jede experimentelle Gruppe wird durch einen Rhombus dargestellt. Die Standardabweichung reflektiert die Unterschiede aller 7 - 10 Individuen eines Injektionsstadiums. In den unbehandelten Augen folgte die Anzahl der Zapfen sowie die Anzahl der Photorezeptorschichten einer linearen Abnahme mit einem finalen Durchschnittswert erhaltenener Photorezeptoren von 131.6 ± 40.3 Zapfen/Kryoschnitt (6.0 ± 0.5 Kernschichten/Kryoschnitt) für Tiere, injiziert bei PM0,5 (27 retinale Schnitte wurden

untersucht) und $34,8 \pm 23,2$ Zapfen/Kryoschnitt ($2,5 \pm 0,6$ Kernschichten) bei Mäusen, injiziert bei PM7 (21 retinale Schnitte wurden untersucht) (Abb. 62A, B; Tabelle 7).

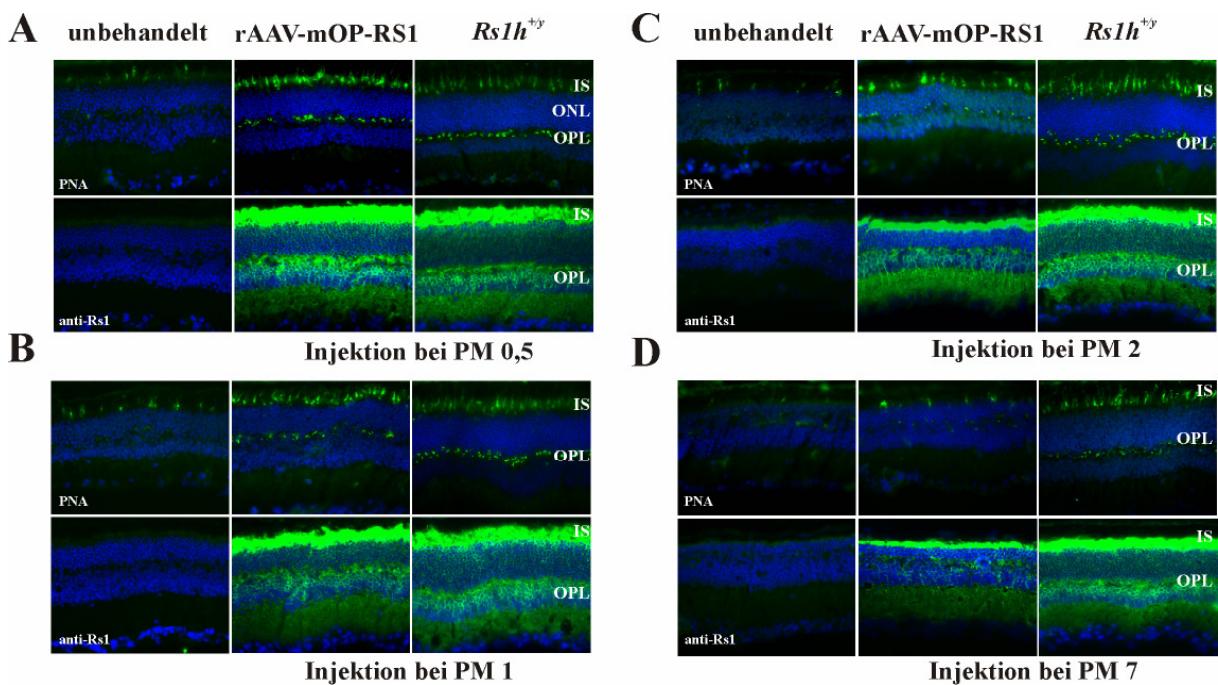


Abb. 61: Immunohistochemischer Nachweis von PNA und Retinoschisin an retinalen Kryoschnitten von Wildtyp, *Rs1h*-defizienten behandelten und nicht-behandelten Augen. 10 μ m Kryoschnitte der Nezhäute *Rs1h*^{+/y}, *Rs1h*^{-/-} rAAV-mOP-RS1-behandelter und nicht-behandelter Augen zum Injektionszeitpunkt (A) PM 0,5; (B) PM 1; (C) PM 2; (D) PM 7. Die Schnitte wurden mit PNA (1: 800, obere Reihe) und anti-RS1-3R10 (1: 250, untere Reihe) inkubiert und bei 40-facher Vergrößerung photographiert. Zur Visualisierung wurde ein fluoreszenzgekoppelter Ziege anti-Kaninchen-Alexa488 gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). IS, innere Photorezeptorsegmente; ONL, Äußere Kernschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht;. In der *Rs1h*^{+/y} und der rAAV-mOP-RS1-behandelten Retina zeigt RS1 erwartete, normale Verteilungsmuster in den einzelnen retinalen Schichten in Abhängigkeit der Krankheitsprogression. PNA positive Zapfen reflektieren ebenso den Status der retinalen Degeneration.

Dies führt zu einer durchschnittlichen Photorezeptorzellverlustrate von ungefähr 10,2 % pro Monat (Abb. 62) in guter Übereinstimmung mit den Raten, die für den grundsätzlichen Verlauf des Krankheitsverlaufs gewonnen werden konnten (Abb. 39). In den rAAV-mOP-RS1-behandelten Augen war der Verlust von Zapfen ($p \leq 2,3 \times 10^{-8}$) wie auch der generelle Verlust an Photorezeptorkernschichten ($p \leq 8,5 \times 10^{-4}$) im Vergleich zu den nicht behandelten Augen in jeder der vier experimentellen Gruppen signifikant erniedrigt (Abb. 62A, B).

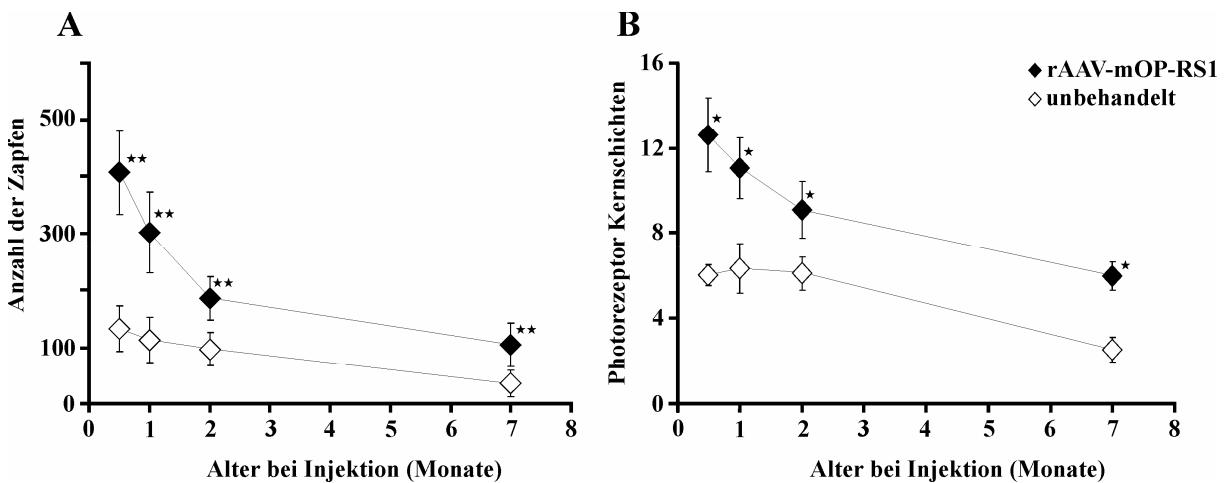


Abb. 62: Statistische Evaluierung der Zapfen- und Gesamtphotorezeptorzellen Färbung in retinalen Kryoschnitten von rAAV-mOP-RS1-behandelter und nicht-behandelter Augen zu unterschiedlichen Zeiten der Vektorinjektion. Retinale Kryoschnitte der angezeigten Altersstadien wurden mit Alexa488-konjugiertem PNA gefärbt und mit DAPI gegengefärbt, um die retinalen Kernschichten zu definieren. (A) Die Graphen repräsentieren die durchschnittliche Anzahl der Zapfen (schwarz) und Photorezeptorkernschichten (weiß) \pm SD der *Rs1h*-defizienten Netzhäute. Die Werte stellen den Durchschnitt von drei retinalen Schnitten eines einzelnen Auges von zwei unterschiedlichen Individuen eines Altersstadiums dar. Die *p*-values für die rAAV-mOP-RS1-behandelten und nicht-behandelten Augen wurden mit dem gepaarten Student's T-Test ermittelt (* $p \leq 8,5 \times 10^{-4}$; ** $p \leq 2,3 \times 10^{-8}$).

Durchschnittlich konnte in den behandelten Augen eine 2.7 ± 0.5 -fach höhere Anzahl an Zapfen (eine 1.9 ± 0.4 -fache Zunahme in den Photorezeptorkernschichten) gegenüber den unbehandelten Augen zu jedem Injektionszeitpunkt festgestellt werden.

Tab.7 Quantitative Messung des Verlustes an Photorezeptorzellen in rAAV-mOP-RS1-behandelten und nicht-behandelten Augen

Alter bei Injektion (Monate) / Age at injection (months)	Anzahl der analysierten Mäuse / Number of analyzed mice	unbehandelte Netzhaut* / Unreated retina		rAAV-mOP-RS1-behandelte Netzhaut* / Treated retina	
		Anzahl an Zapfen (\pm SD) / Number of cones (\pm SD)	Photorezeptorkernschichten (\pm SD) / Photoreceptor layers (\pm SD)	Anzahl an Zapfen (\pm SD) / Number of cones (\pm SD)	Photorezeptorkernschichten (\pm SD) / Photoreceptor layers (\pm SD)
0.5	9	131.6 \pm 40.3	6.0 \pm 0.5	407.0 \pm 74.0	12.6 \pm 1.7
1	10	111.5 \pm 40.0	6.3 \pm 1.2	300.9 \pm 71.1	11.1 \pm 1.4
2	7	95.1 \pm 28.8	6.1 \pm 0.8	184.7 \pm 38.0	9.1 \pm 1.3
7	7	34.8 \pm 23.2	2.5 \pm 0.6	102.8 \pm 38.0	5.9 \pm 0.7

* drei retinale Kryoschnitte pro Auge

Zusammenfassend zeigte sich, dass die morphologischen Veränderungen in den nicht behandelten Augen eng dem bekannten Verlauf der retinalen Degeneration in der *Rs1h*-defizienten Maus folgt (Weber *et al.* 2002, Kjellstrom *et al.* 2007). Alle untersuchten

Altersgruppen zeigten einen signifikanten Verlust von Photorezeptorzellen, insbesondere Zapfen, eng begleitet von einem nahezu vollständigen Verlust von *ribbon*-Synapsen (Abb. 61 A-D). Netzhäute, die im Alter von PM0,5 bis PM7 behandelt wurden zeigten eine zunehmende Verschlechterung in der Architektur der retinalen Schichten, jedoch in einem Ausmaß, das verglichen mit den unbehandelten Partneraugen signifikant weniger ausgeprägt und fortgeschritten war (Abb. 61 und 62). Bei PM1, PM2 und sogar in der in Bezug auf den Degenerationsstatus am weitesten fortgeschrittenen Gruppe bei PM7 zeigten die rAAV-mOP-RS1-behandelten Augen eine deutliche Aufrechterhaltung der retinalen Architektur durch einen Schutz der Photorezeptorzellen (inklusive der Zapfen). Diese zeigte im Vergleich mit den unbehandelten Augen starke Verbesserungen. Ebenso zeichneten sich die behandelten Augen durch die Präsenz von synaptischen Endigungen der Photorezeptor- und Bipolarzellen und dünnere aber aufrecht erhaltene äußere und innere Kernschichten aus, die gut mit den deutlich zu separierenden Strukturen der äußeren und inneren plexiformen Schichten einhergehen (Abb. 61 A-D).

V. Diskussion

Nur im Widerstreit gegensätzlicher Meinungen wird die Wahrheit entdeckt und an den Tisch gebracht.

Claude Adrien Helvetius (1715 - 1771), französischer Philosoph

1. Die *Timp3*-defiziente Maus

Das choroidale vaskuläre System formiert sich in der frühen Embryonalentwicklung des Mausauges zum Zeitpunkt der Invagination des optischen Vesikels (Saint-Geniez *et al.* 2004). Primitive periokuläre Blutgefäße werden aus einem schwammähnlichen, wenig unterteilten perineuralen vaskulären Plexus an E11,5 der Embryogenese gebildet und erweitern sich rund um die äußere Lage des optischen Bechers. Dieses erste Netzwerk differenziert sich durch einen angiogenen Prozess fortlaufend in eine komplexe Vaskulatur, der das Auswachsen neuer Gefäße aus dem bestehenden Netzwerk sowie Septumbildung und Unterteilung des bestehenden Netzwerks in kleinere Funktionseinheiten miteinander verbindet. Die Entwicklungsschritte werden von massiven Umstrukturierungen und Veränderungen im Reifegrad der Blutgefäße begleitet (Risau 1997). Eine anhaltende Interaktion zwischen den Blutgefäßen und dem unterliegendem RPE ist dabei im Zusammenhang mit der Entstehung und Aufrechterhaltung einer intakten choroidalen Vaskulatur von entscheidender Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass eine Unterdrückung der RPE-Differenzierung eine Entwicklung der Choroidea verhindert (Zhao *et al.* 2004), währenddessen eine biochemische oder mechanische Zerstörung des einschichtigen RPE zu einem Verlust der Endothel-Fenestrierung, einer Atrophie der Choriokapillaris und der unterliegenden Choroidea sowie der abnormalen Ablagerung und Deposition von kollagenem Material in die Choroidea führt (Korte *et al.* 1984, Del Priore *et al.* 1995, Leonard *et al.* 1997). Eine Reihe verschiedener Wachstumsfaktoren, die vom RPE sezerniert werden, spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Modulations- und Überlebensfunktionen, die das RPE auf die Choroidea ausübt (Campochiaro *et al.* 1996, Liu *et al.* 1998). Diese umfassen VEGF, einen entscheidenden vaskulären Permeabilitäts- und Angiogenese-Faktor, der in allen Stadien der Blutgefäßformierung in den ineinander laufenden Prozessen der Vaskulogenese und Angiogenese eine tragende Rolle übernimmt. Zellen des RPE exprimieren VEGF während der Choroidalentwicklung und fahren mit der Sekretion von VEGF an der basolateralen Seite der Choroidea bis in Erwachsenenalter fort (Blaauwgeers *et al.* 1999, Marneros *et al.* 2005, Saint-Geniez *et al.* 2006). Die Lokalisation des VEGFR2 in der inneren Choriokapillaris unterstützt eine mögliche VEGF-vermittelte parakrine Verbindung zwischen dem RPE und dem Choroid (Marneros *et al.* 2005). In Ko-Kultur-Experimenten konnte gezeigt werden, dass vom RPE generiertes VEGF Pseudogefäßformierung in unterliegenden choroidalen Endothelzellen induziert. Der Prozess kann durch die Applikation von neutralisierenden VEGF-Antikörpern unterbunden werden (Sakamoto *et al.* 1995). Die Beobachtung, dass Mäuse mit einer konditionalen Inaktivierung

der endogenen *Vegf*-Genexpression durch ein Fehlen der choroidalen Vaskulatur und Abnormalitäten der Morphologie von RPE und BM charakterisiert sind, unterstützt und bestätigt eventuell sogar die fundamentale Rolle von VEGF bei der Formierung der Choroidea (Marneros *et al.* 2005).

Durch diese Arbeiten konnte demonstriert werden, dass eine *Timp3*-Defizienz im Mausgenom einen distinkten Phänotyp in den tiefliegenden Choroidalgefäßen der Blutversorgung des Auges hervorruft. Diese pathologischen Manifestationen sind hauptsächlich durch erweiterte, aufgebläht erscheinende Blutgefäße charakterisiert und bieten erste *in vivo* Bestätigungen für eine hypothetische, postulierte Rolle von TIMP3 in der Regulation der choroidalen Vaskularisation der Netzhaut.

Von TIMP3 wurde gezeigt, dass dieses Molekül VEGF-vermittelte Angiogenese in einem *Assay* mit der chorioallantoiden Membran des Hühnerembryos inhibieren kann. Eine Interaktion von rekombinantem TIMP3 unterdrückte erfolgreich eine VEGF-vermittelte Endothelzell-Migration und -Proliferation auf dieser Membran *in vitro* (Qi *et al.* 2003). Die anti-angiogenen Eigenschaften von TIMP3 resultieren aus der Fähigkeit, spezifisch den VEGFR2 zu binden, und durch eine kompetitive Hemmung von VEGF eine Aktivierung intrazellulärer *downstream* Signalwege von VEGFR2 zu blockieren, die für eine Stimulation der unterschiedlichen endothelialen Zellfunktionen notwendig sind. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde eine erhöhte angiogene Antwort in *ex vivo Assays* mit ringförmigen Explantaten der dorsalen Aorta *Timp3*-defizienter Mäuse beobachtet. Durch Inkubation mit einem spezifischen Inhibitor für Vegfr2 konnte dieser Effekt revertiert werden. Es ist daher legitim anzunehmen, dass unter physiologischen Bedingungen das Fehlen des Timp3-Proteins in der BM betroffener Tiere eine Vegf-vermittelte parakrine Signalweiterleitung zwischen dem RPE und dem Choroid unterdrückt. Als Konsequenz dieser gestörten Stoffwechselwirkung könnte durch eine ungehinderte Bindung von Vegf an den korrespondierenden Vegfr2 in den Endothelzellen eine verstärkte intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst werden, die letztlich durch erhöhte Zellproliferation und Migration zur Formierung pathologisch erweiterter Choroidalgefäß führt (Abb. 63). Unterstützende Daten für dieses Modell finden sich in einer Studie mit transgenen Mäusen, in denen die RPE-Zellen *Vegf* unter dem *RPE65*-Promotor überexprimieren. Die *Vegf*-Überexpression äußert sich in einer Verdickung der Choroidea, in der ausgeweitete Gefäße mit großen Lumina zu finden sind (Schwesinger *et al.* 2001). Darüber hinaus ist bekannt, dass eine Stimulation mit VEGF zur Induktion von malformierten, fusionierten Gefäßen mit erweiterten Lumina führen kann (Drake *et al.* 1998), und erhöhte VEGF Konzentrationen über VEGFR2 Signalwege eine dilatierende Wirkung auf den Gefäßdurchmesser *in vitro* ausüben (Nakatsu *et al.* 2003).

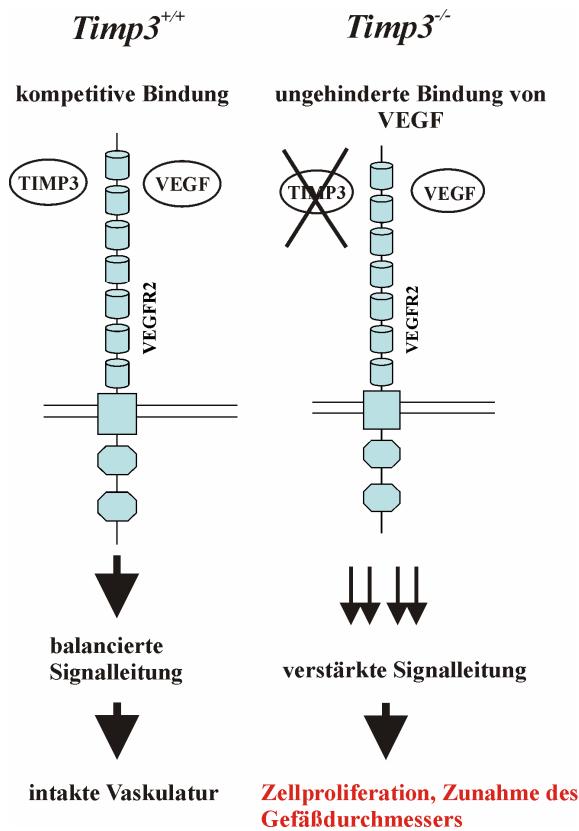


Abb. 63: Hypothetisches Modell des möglichen Pathomechanismus, der zu massiver Dilatation von Gefäßen im Choroid von *Timp3*^{-/-} Mäusen führt. Das Fehlen von Timp3 führt zu einer ungehinderten Bindung von VEGF an VEGFR2. Dies bedingt eine erhöhte Autophosphorylierung von VEGFR2, die in einer verstärkten Signalweiterleitung führt, die letztlich durch Zellproliferation eine pathologische Zunahme des Gefäßdurchmessers auslöst.

Mit Hilfe der *in situ* Zymographie wurde eine erhöhte MMP-Aktivität im Choroid *Timp3*-defizienter Mäuse festgestellt. Die Befunde korrelieren mit einer früheren Studie der Arbeitsgruppe von Prof. Weber, in der höhere Level der inaktiven pro-Formen als auch der aktivierten Formen von MMP 2 und 9 in primären Fibroblasten aus der Lunge von *Timp3*^{-/-} Tieren gefunden wurden (Soboleva *et al.* 2003). Eine unabhängige Arbeitsgruppe zeigte in Übereinstimmung mit den jetzigen Daten verstärkte Metalloproteinaseaktivitäten in unterschiedlichen Geweben einer weiteren, unabhängig generierten *Timp3*-defizienten Mauslinie (Leco *et al.* 2001, Gill *et al.* 2003, Fedak *et al.* 2004). MMPs sind dafür bekannt, die vaskuläre Morphogenese auf verschiedene Art und Weise zu regulieren. Unabhängig von ihrer prominenten Rolle in der Erhaltung der EZM-Homöostase durch die kontrollierte Degradierung von EZM-Komponenten zur Ermöglichung einer gerichteten Migration und Proliferation von Endothelzellen, setzen MMPs sowohl pro- als auch anti-angiogene Faktoren frei. Diese werden von der perizellulären EZM abgesondert und modifizieren die umgebende EZM-Struktur (Rundhaug *et al.* 2005). MMPs werden zum Beispiel in einem Zusammenhang mit der Koordination der VEGF-Freisetzung aus extrazellulären Vorräten durch den Abbau der Matrix und durch direkte MMP-vermittelte intramolekulare Prozessierung gesehen (Lee *et*

al. 2005). Eine erhöhte MMP-Aktivität könnte somit in der Abwesenheit von Timp3 eine Kaskade von Ereignissen auslösen, die in direkter Weise in die Entstehung der vaskulären Pathologien eingreifen, wie sie in *Timp3*^{-/-} Mäusen gesehen werden können.

Gefäßabnormalitäten sind bisher nicht in anderen Organen von Mäusen mit einer targetierten *Timp3*-Defizienz beschrieben worden (Leco *et al.* 2001, Gill *et al.* 2003, Fedak *et al.* 2004). Injektionen von Melanomazellen in *Timp3*^{-/-} Mäuse resultierten in einem verstärktem Tumorwachstum und erhöhter Angiogenese. Beide Faktoren äußerten sich in der Entstehung von Blutgefäßen mit größeren Gefäßdurchmessern im Vergleich mit Wildtyp Kontroll-Geschwistertieren (Cruz-Munoz *et al.* 2006a). Dies könnte bedeuten, dass die Auswirkungen einer *Timp3*-Entfernung auf die vaskuläre Morphogenese subtil und von dem umgebenden zellulären Mikroklima abhängig sind. Zudem konnte eine phänotypische Variabilität einer *Timp3*-Defizienz in betroffenen Mäusen auf unterschiedlichen genetischen Hintergründen beobachtet werden, die in dieser und einer vorangegangenen Studie bestätigt werden konnte (Fedak *et al.* 2004). Solch ein Effekt wird grundsätzlich Modifizierungsgenen zugeschrieben, die mit dem kausativen Gen gemeinsam agieren. In diesem Zusammenhang sind weitere Studien notwendig, die den Einfluss der *Timp3*-Defizienz auf Vaskulogenese und Angiogenese in verschiedenen Mausstämmen aufschlüsseln.

Es konnte gezeigt werden, dass Modulationen von VEGF-induzierter Angiogenese völlig unabhängig von den MMP-inhibitorischen Eigenschaften des TIMP3-Moleküls sind, die im N-Terminus des Proteins kodiert werden (Qi *et al.* 2003). In Übereinstimmung dieses Befundes, wurde in der vorliegenden Arbeit die Region, die für die anti-angiogenen Eigenschaften von TIMP3 verantwortlich ist, auf den C-terminalen Bereich des Proteins kartiert. Interessanterweise sind alle elf bekannten Mutationen, die der SFD zugrunde liegen, im C-Terminus lokalisiert oder betreffen die C-terminale Proteindomäne.

2. Der Einfluss der *Timp3*-S156C-Mutation auf die anti-angiogenen Eigenschaften des *Timp3*-Proteins

Im Gegensatz zu den intensiven Studien zur anti-angiogenen Wirkung von Wildtyp-Timp3 ist bisher nur sehr wenig über die Angiogenese betreffenden Eigenschaften vom *Timp3*-S156C aus der Literatur bekannt. Eine Adenovirus-vermittelte (Rad66) Transfektion von *Timp3*^{S/C} mutiertem Protein in MS1-Zellen (*mouse endothelial cells*) inhibierte die Proliferation der MS1-Zellen auch im VEGF stimuliertem Zustand (Qi et al. 2003). Die proliferative Antwort wurde durch den Einbau von [³H]Thymidin gemessen. In der Studie von Qi et al. liegt die Hemmwirkung von *Timp3*^{S/C} auf das Gefäßwachstum genau zwischen dem Wert für Wildtyp-

Timp3 und einer anti-angiogenen Positivkontrolle in Übereinstimmung mit den in der vorliegenden Arbeit generierten Daten (Qi *et al.* 2003).

Mit Hilfe des Aortenring-Assays konnte nachgewiesen werden, dass endogenes *S156C*-mutiertes Timp3 weiterhin in der Lage ist, den Auswachsprozess von ECs aus isolierten *Timp3^{S156C/S156C}*-Aortenstücken gegenüber dem Wildtyp zu verringern. Die Stärke des inhibitorischen Effekts ist aber gegenüber Wildtyp-Timp3 um ca. 50 % verringert. Die Anzahl der spontan ausgewachsenen Gefäße in Gewebeexplantaten der dorsalen Aorta liegt genau zwischen den Werten von Wildtyp und *Timp3*-defizienten Aortenstücken. Dieser Effekt konnte in *Fibrin Bead Assay*-Auswachsversuchen mit isolierten, in der Zellkultur kultivierten *Timp3^{S156C/S156C}*-AECs nicht reproduziert werden. Eine Applikation von rekombinantem rTimp3-S156C zeigte jedoch eine exakt vergleichbare intermediäre Wirkung des mutierten Proteins auf die Gefäßneubildung der AECs aller Genotypen im *Fibrin Bead Assay* und unterstützte die Befunde des Aortenring-Assay.

Im Unterschied zu dem stark artifiziellen System von Virus-transfizierten Zellen, mit endogenem Timp3, die das mutierte Timp3-Protein zusätzlich überexprimieren, sind die im *Timp3-S156C* Mausmodell generierten *ex vivo* und *in vitro* Daten vermutlich realitätsnäher, da die Auswirkung des endogenen, mutierten Timp3 in Bezug auf die Angiogenese unter realen physiologischen Bedingungen untersucht werden konnte. *S156C*-mutiertes Timp3 ist weiterhin in der Lage an VEGFR2 zu binden bzw. die Bindung von VEGF an diesen korrespondierenden Rezeptor zu inhibieren (Fogarasi *et al.* 2008). Eine Analyse der Aktivierung von VEGFR2 und den korrespondierenden *downstream* Molekülen ERK1/2 sowie p38 zeigt leicht erhöhte Phosphorylierungsmuster für diese Mediatoren in *Timp3^{+/S156C}* und *Timp3^{S156C/S156C}* AECs nach einer Stimulation mit VEGF. Die Unterschiede in der Signalstärke der Phosphorylierungen in der *S156C knock-in* Maus im Vergleich zum Wildtyp ist weniger prominent verglichen mit den Unterschieden zwischen Wildtyp- und der *Timp3*-defizienten Maus.

Das komplexe strukturelle wie physiologische Zusammenspiel zwischen der Choriokapillaris, der BM und dem RPE ist für einen erfolgreichen strukturellen Aufbau der einzelnen Schichten des hinteren Augenabschnitts von entscheidender Bedeutung. Die spezifische Lokalisierung von VEGFR2 in der inneren Choriokapillaris, die dem RPE unterliegt, unterstützt weiterhin die Beobachtung, dass VEGF, welches von den RPE Zellen sekretiert wird, in physiologischen, parakrinen Interaktionen mit der Choriokapillaris steht (Blaauwgers *et al.* 1999). Die Fähigkeit von Timp3 zur Inhibition der VEGFR2-Signallleitung wie auch die Präsenz in der BM legen eine Hauptfunktion von TIMP3 in der Regulation des Angiogenesestatus der Choriokapillaris fest.

SFD wird unter anderem durch eine Verdickung der BM und submakularer choroidaler Neovaskularisation, beides bedeutende gemeinsame, pathologische Merkmale mit der AMD, charakterisiert. Mutationen im *TIMP3*-Gen sind mit der Manifestation dieser Erkrankung verbunden (Weber *et al.* 1994, Langton *et al.* 1999), und eine erhöhte Menge dieses Proteins wurde in den umfangreichen sub-retinalen Depositionen betroffener Patienten gefunden (Farris *et al.* 1998). Die *TIMP3*-Niveaus sind in Drusen und der BM von AMD-Patienten nachweisbar verstärkt. Eine *TIMP3*-Immunoreaktivität in den Bereichen choroidaler Neovaskularisation war demgegenüber deutlich reduziert (Kamei *et al.* 1999). Es ist möglich, dass atrophische Veränderungen des RPE oder der Choriokapillaris die Suszeptibilität dieses Gewebes für neovaskuläre Vorgänge erhöht, und eine gestörte Balance bzw. Interaktion zwischen Wildtyp- und *S156C*-mutiertem *TIMP3* in SFD-Patienten eine verstärkte Bindung von VEGF an VEGFR2 ermöglicht, und so einen entscheidenden Auslöser choroidaler Neovaskularisation darstellt.

Die Hypothese wird durch die Befunde der heterozygoten *S156C*-Mausmutante auf dem Balb/C-Hintergrund gestützt. Bei diesen Tieren konnten erste pathologische Veränderungen im Bereich der BM und Choriokapillaris gefunden werden, die auf atrophische, einer Neovaskularisation vorausgehende Veränderungen von Endothelzellen der Choriokapillaris hindeutet. Dieses Mausmodell wäre somit das erste beschriebene Mausmodell einer natürlichen, nicht induzierten Neovaskularisation, für die im Gegensatz dazu zahlreiche Mausmodelle existieren (Campochiaro 2007).

3. Charakterisierung der *Timp3-S156C* Maus auf dem CD1-Hintergrund

Es existieren relativ wenige Berichte über die Histopathologie der SFD beim Menschen (Ashton *and* Sorsby 1951, Capon *et al.* 1989, Chong *et al.* 2000 und 2004). Die ausführliche histologische und immunohistochemische Analyse der Augen einer 77 Jahre alten SFD-Patientin mit einer *TIMP3-S181C*-Mutation, die wie die *S156C*-Mutation ebenfalls ein ungepaartes Cystein am C-Terminus von *TIMP3* generiert, reflektiert, dass die bei der *S156C knock-in* Netzhaut auf CD1-Hintergrund beschriebenen Abnormalitäten typischen SFD-Pathologien gleichkommen (Chong *et al.* 2004). Chong und Kollegen berichten, dass auf lichtmikroskopischer Ebene bei Patienten ca. 30 µm dicke sub-RPE-Ablagerungen von eosinophilem Material gefunden wurden. Darüber hinaus fanden sich Foci von loserem, eosinophilen Material, die EZM-Depots von einer diskontinuierlichen BM separierten (Chong *et al.* 2004). Capon und Kollegen beschreiben in Übereinstimmung mit der Studie von Chong *et al.* Lipid-positive flokkuläre Ablagerungen mit bis zu 30 µm Dicke an der inneren, dem RPE zugewandten Seite der BM (Capon *et al.* 1989). Ähnliche Ablagerungen im sub-RPE konnten auch bei L-ORMD (*late-onset retinal macular degeneration*) und dominant auftretenden

retinalen Drusen (*Malattia Levantine*, ML) (Kuntz *et al.* 1996), dominanter *Retinitis Pigmentosa* (RP) und Hypobetalipoproteinemia mit RP (Brosnahan *et al.* 1994) sowie der altersabhängigen Makuladegeneration (Patel *et al.* 2007) und weiteren Augenerkrankungen gefunden werden. In allen beschriebenen Fällen war die exakte Morphologie und Komposition der Ablagerungen geringfügig unterschiedlich, allen gemeinsam war jedoch die Beinhaltung extrazellulären Materials mit oder ohne Calcium- und Lipid-Bestandteilen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *Tim3-S156C*-Mutation auf dem CD1-Hintergrund ein geeignetes Mausmodell zur Erforschung der molekularen Grundlagen der Sorsby Fundusdystrophie darstellt. Die heterozygote *Tim3-S156C*-Mutante weist distinkte morphologische Veränderungen mit großen Ähnlichkeiten zum klinischen Bild der SFD auf. In den betroffenen Augen finden sich im Lichtmikroskop deutlich sichtbare sub-RPE-Ablagerungen. Abb. 64 zeigt einen Vergleich der lichtmikroskopisch sichtbaren humanen S181C- und murinen S156C-sub-RPE-Ablagerungen, um die offensichtlichen Gemeinsamkeiten zu verdeutlichen.

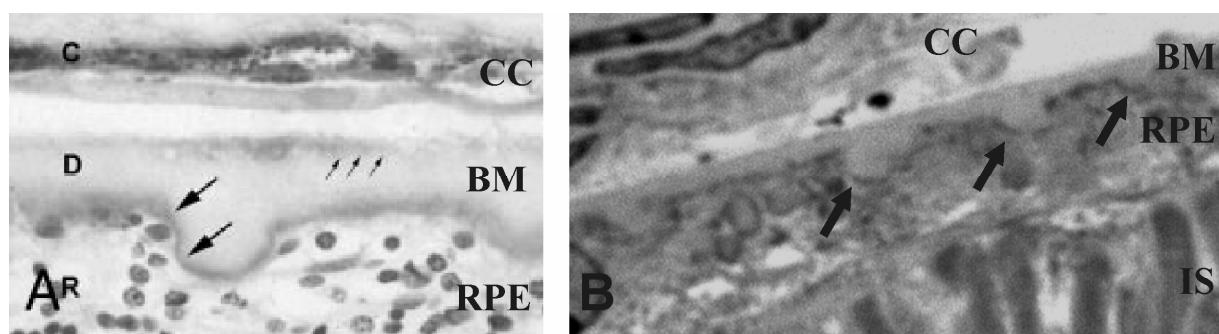


Abb. 64: Humane und murine SFD-charakteristische sub-RPE-Ablagerungen. (A) KollagenVI-Immunohistochemie am humanen SFD (*TIMP3-S181C*) Auge (schwarze Pfeile), Abbildung entnommen aus Chong *et al.* 2000. (B) Semidünn-Schnitt durch die heterozygote *Tim3-S156C* knock-in Maus Retina auf CD1-Hintergrund. CC, Choriokapillaris; BM, Bruchsche Membran; RPE, retinales Pigmentepithel. Die beiden retinalen Querschnitte zeigen vergleichbare, SFD-typische sub-RPE Ablagerungen extrazellulären Materials der Bruchschen Membran.

Elektronenmikroskopisch konnte eine Desorganisation und Zerstörung des typischen fünf-schichtigen Aufbaus der BM aufgedeckt werden. Charakteristischerweise ist die zentrale elektronendichte, vermutlich aus Elastin bestehende Schicht aufgelöst, und extrazelluläres Material fließt zwischen die basalen RPE-Mikrovilli. Zudem erscheint die Basalmembran des RPE aufgelöst. Diese schwerwiegenden Abnormalitäten in der EZM der Augen betroffener Mäuse konnten bereits bei 3 Monate alten Tieren beobachtet werden. In Richtung Choriokapillaris/Choroidea wird die Organisation und Struktur der EZM jedoch weiterhin morphologisch unauffällig aufrechterhalten. Die Basalmembranen der Choriokapillaris mit anschließendem fenestrierten Endothel präsentieren sich völlig unverändert.

Die Daten der vorliegenden Arbeit korrelieren mit den Befunden beim SFD-Patienten. Auf elektronenmikroskopischer Ebene konnte nachgewiesen werden, dass die grundsätzliche Abnormalität der BM in der zentralen, elektronendichten Schicht zu finden ist. Diese erscheint aufgespalten, verzweigt und ohne den typischen elektronendichten Kern. Einige Bereiche dieses Materials stellen ein bandartiges Muster mit größeren Abständen der einzelnen Fibrillen zueinander dar, die auch als „*long-spaced*“-Kollagen bekannt sind. „*Long-spaced*“-Kollagen zeigte sich auch im sub-RPE-Bereich von heterozygoten *S156C knock-in* Mäusen (Abb. 26E, 64B). Die elastische Lage der BM der SFD-Patientin, die aus dem ursprünglich von Sorsby *et al.* beschriebenen Stammbaum stammt (Sorsby *et al.* 1949), war irregulär verdickt und in vielen Bereichen gebrochen. Die äußere kollagene Schicht der BM und die Basalmembran der Choriokapillaris erschienen lediglich an den Stellen relativ normal, an denen die elastische Schicht intakt war (Chong *et al.* 2004). Hier wird ein deutlicher Unterschied zum Mausmodell offensichtlich, da auch bei vollständiger Zerstörung der zentralen elektronendichten Schicht in der BM heterozygoter *Timp3-S156C knock-in* Tiere die äußere kollagene Schicht der BM sowie die Basalmembran der Choriokapillaris in allen untersuchten Tieren bis hin zu einem Alter von 12 Monaten vollständig intakt erschien. Interessanterweise sind die beschriebenen EZM/RPE-Pathologien bereits bei 3 Monate alten Tieren vollständig ausgebildet und mit 12 Monaten im Schweregrad nahezu unverändert, so dass eine altersabhängige Progression der Erkrankung in diesem Modell unwahrscheinlich erscheint. Die Effekte deuten eher auf einen entwicklungsbedingten, eventuell pränatalen Beginn der Erkrankung in der *Timp3-S156C knock-in* Maus auf dem CD1-Hintergrund hin.

Bisher sind bei einer Reihe von Mausmodellen altersabhängige Veränderungen im RPE und/oder der BM beschrieben worden, die den Veränderungen in der *S156C knock-in* Maus sehr ähnlich sind. (Cousins *et al.* 2002 und 2003, Gottsch *et al.* 1993, Kliffen *et al.* 2000, Majji *et al.* 2000, Rakoczy *et al.* 2002). In einigen dieser Studien wird von ungewöhnlichen Veränderungen der basalen Mikrovilli und der Basalmembran des RPE, die sich im Alter von 12 bis 24 Monaten entwickeln, berichtet (Katz *et al.* 1984, Mishima *et al.* 1978 und 1981). Die *Rpe65^{-/-}* Maus zeigte z. B. eine altersabhängige Zunahme in der Stärke der RPE-Basalmembran mit einem progressiven Verlust basaler RPE-Mikrovilli und der Protrusion von extrazellulärem Material tief hinein in das Zytoplasma der RPE-Zellen. Diese Veränderungen zeigten sich ab dem 6. Lebensmonat und verstärkten sich bis zu einem Lebensalter von einem 1 Jahr enorm (Ivert *et al.* 2005). Elektronenmikroskopische Aufnahmen der BM 6 Monate alter *Rpe65*-defizienter und 3 Monate alten heterozygoten *Timp3-S156C* Mäuse zeigten absolut vergleichbare Pathologien. Interessanterweise ist die der Choriokapillaris zugewandte Seite der BM in der *Rpe65^{-/-}* Maus ebenfalls morphologisch unauffällig (Ivert *et al.* 2005). Ein weiteres Mausmodell mit vergleichbaren pathologischen Manifestationen findet sich in der erst kürzlich beschriebenen und von zwei Arbeitsgruppen

unabhängig generierten *Efemp1-R345W knock-in* Maus (Fu *et al.* 2007, Marmorstein *et al.* 2007). Sowohl die hetero- als auch homozygoten *R345W knock-in* Mutanten entwickeln starke altersabhängige sub-RPE-Ablagerungen einhergehend mit dem Verlust von basalen RPE-Mikrovilli. Die der Choriokapillaris zugewandte Seite der BM erscheint über den gesamten Untersuchungszeitraum bis zu 23 Monaten morphologisch unauffällig. Es wurden jedoch atrophisch veränderte choroidale Kapillare mit degenerierten Endothelzellen gefunden (Marmorstein *et al.* 2007). Die molekularen Ursachen der Entstehung aller dieser Basalmembranveränderungen sind bislang nicht bekannt, es wurden aber erhöhte, mit den sub-RPE-Ablagerungen korrelierende Mengen von Efemp1 und Timp3 mit Hilfe immunhistochemischer Antikörperfärbungen nachgewiesen (Fu *et al.* 2007).

Im SFD-Patienten klebte darüber hinaus der Glaskörper an die Netzhaut, welche in Fundusaufnahmen eine irreguläre Färbung mit dunklen, fahl-gelblichen Punkten aufweist. Intraokulare Untersuchungen verdeutlichten weit verteilte Pigmentveränderungen am adhärierten posterioren Pol der Netzhaut mit Bereichen von blasser und dunkel gelber Pigmentationen des RPE. Diese SLO-Befunde gehen mit der Entwicklung von weichen und harten Drusen einher. (Chong *et al.* 2000) Detaillierte makromorphologische *in vivo* SLO-Aufnahmen an *Timp3-S156C* Mäusen bei unterschiedlicher Wellenlängen konnten die oben beschriebenen Pigmentveränderungen, die typisch für Alters-abhängige Degenerationsprozesse der Netzhaut sind, im Mausmodell für die SFD nicht bestätigen. Zwar zeigten sich in Autofluoreszenzaufnahmen (488 nm Wellenlänge) Bereiche von verstärkter Pigmentation auf der Ebene des RPE, diese sind jedoch auf den genetischen CD1-Albino-Hintergrund zurückzuführen und nicht mutationsbedingt. Sie treten durchweg in allen drei Genotypen *Timp3^{+/+}*, *Timp3^{+/S156C}* und *Timp3^{-/-}* auf (Abb. 25). Drusen oder Drusenähnliche Veränderungen wurden in den Mäusen bisher nicht gefunden. Dieser Unterschied könnte sich durch die anatomischen Unterschieden zwischen der humanen und murinen Netzhaut erklären. Die Anatomie der murinen Retina der Maus entspricht eher der peripheren Netzhaut des Menschen und besitzt keine Makula. In SFD- wie auch AMD- oder ML-Patienten finden sich große Drusen meist im Bereich der Makula, während die periphere Netzhaut für gewöhnlich gut erhalten bleibt. Die vielen einzigartigen strukturellen wie metabolischen Eigenschaften der humanen Makula könnten die Bildung der Abnormalitäten verschärfen und eine schnellere Akkumulation von membranöser Debris und die Bildung von Drusen unterstützen. Das Photorezeptor- zu RPE-Zell-Verhältnis ist z. B. in der Makula bedeutend höher als in der Peripherie bis hin zu einer Versorgung von ca. 25 Photorezeptorzellen pro RPE-Zelle im Bereich der Fovea. Die Fovea ist darüber hinaus durch ein Fehlen retinaler Blutgefäße gekennzeichnet. Diese Eigenschaften könnten den metabolischen Druck auf die zentralen Zellen des RPE, die für die Photorezeptorversorgung

zuständig sind, und den Stress eines geschädigten RPE z. B. durch reaktive Sauerstoffspezies und toxische Abbauprodukte deutlich erhöhen (Dorey *et al.* 1989).

Die Netzhaut des SFD-Patienten zeigte zudem Bereiche retinaler Gliosis mit einer deutlicher Abnahme der Kernschichten der INL und einem nahezu vollständigem Verlust von Photorezeptorzellen. Das RPE präsentierte lokale, fleckige Verluste und Desorganisation vom verbleibenden RPE. Beschränkte Bereiche von Neovaskularisation präsentierten sich extern vom RPE oder in den sub-RPE-Ablagerungen. Typisch ist die Bildung neovaskulärer Membranen im sub-RPE-Bereich. Das Choroid war atrophisch verändert, gepaart mit dem vollständigen Verlust der Choriokapillaris in einigen Bereichen, insbesondere dort, wo das RPE ebenfalls nicht mehr vorhanden war. Im *Timp3-S156C knock-in* Mausmodell auf CD1-Hintergrund konnte in unterschiedlichen Altersstadien bis hin zu 15 Monate alten Tieren kein Anzeichen von RPE-Abnormalitäten, choroidal Neovaskularisation und/oder retinaler Degeneration festgestellt werden. Neovaskuläre Membranen bilden sich wie Drusen bevorzugt im Bereich der Makula, ein weiteres Beispiel warum aufgrund dieser anatomischen Spezialität des Menschen, im Mausmodell möglicherweise keine entsprechenden pathologischen Veränderungen gefunden werden konnten. Es ist außerdem wichtig darauf hinzuweisen, dass die wenigen menschlichen SFD-Augen, die für morphologisch/histologische Untersuchungen zur Verfügung stehen, grundsätzlich von Spendern höheren Alters mit einem Langzeitverlauf der SFD-Erkrankung stammen. Daraus entsteht die Schwierigkeit, falls dies im Mausmodell überhaupt möglich ist, zwischen primären pathologischen Charakteristika und sekundären krankheitsbedingten Veränderungen zu unterscheiden. Bis jetzt sind noch keine Pathologien, die einen primären SFD-Krankheitsbeginn auszeichnen würden, beschrieben worden. Es ist ebenfalls möglich, dass die in der heterozygoten *Timp3-S156C knock-in* Mutante beschriebenen Veränderungen der BM und basalen Mikrovilli des RPE ein mittleres oder intermediäres Stadium der SFD repräsentieren. Diese Veränderungen könnten eine Suszeptibilität für sekundäre Prozesse wie eine choridale Neovaskularisation oder RPE-Atrophie schaffen, die zu einem Zeitpunkt von PM15 noch nicht ausgeprägt sind. Wäre dies der Fall, würden die Befunde dieser Studie implizieren, dass die ursächliche Stelle der SFD-Erkrankung an der Verbindung zwischen der BM und dem RPE zu lokalisieren ist, mit frühen Manifestationen im basalen Labyrinth des RPE gepaart mit Störungen in der inneren kollagenen Schicht der BM (Weber *et al.* 2002), gefolgt vom Verlust der Basalmembran des RPE und dem Einströmen extrazellulären Material aus der BM in die Zwischenraum der basalen RPE-Mikrovilli (die vorliegende Studie). Choroidale Neovaskularisation und atrophische Veränderungen wie sie beim Menschen beobachtet werden, könnten somit eine verzögerte, sekundäre Reaktion der EZM-/RPE-Störungen darstellen, die sich in der „normalen“ Lebensspanne von Mäusen nicht manifestieren.

Durch Studien an Mensch und Maus war es möglich das RPE als die Zellschicht der „normalen“ *TIMP3*-Expression in der Netzhaut zu determinieren (Della *et al.* 1996, Ruiz *et al.* 1996, Vranka *et al.* 1997). Es ist nicht bekannt, wie und in welchem Maße die *S156C*-Mutation im *TIMP3*-Gen zur Manifestation der beschriebenen basalen Depositionen ausschließlich in den für die Mutation heterozygoten nicht aber homozygoten Trägern führt. Die immunohistochemischen Analysen zeigten eine korrekte Lokalisation von Timp3-S156C im Bereich der BM betroffener Tiere beider Mutanten auf CD1-Hintergrund, eine Bestätigung der immunohistochemischen Befunde für die *Timp3-S156C*-Mutation auf dem C57/BL6-Hintergrund (Weber *et al.* 2002). In der heterozygoten *S156C* Mutante erscheint das Fluoreszenzsignal im Gegensatz zum Wildtyp und der homozygoten *S156C*-Mutante verstärkt in der Choriokapillaris und innerhalb der RPE-Zellen, möglicherweise ein Korrelat mit den in den Semidünn-Schnitten beobachteten sub-RPE-Ablagerungen. Bei SFD-Patienten wurde ebenfalls eine TIMP3-Antikörperreaktivität im äußeren Bereich der sub-RPE-Depositionen gefunden (Chong *et al.* 2004). Dies könnte eine intrazelluläre Proteinakkumulation von Timp3 in den *S156C*-heterozygoten RPE-Zellen bedeuten, die maßgeblich an den Auswirkungen der *S156C*-bedingten Pathomechanismen auf dem CD1-Hintergrund beteiligt sind.

Diese These wird durch Timp3-Immunogoldfärbungen gestützt. Erstmals wurde gezeigt, dass Timp3 in der Wildtyp-Maus sowohl in der zentralen elektronendichten Schicht der BM als auch in den äußeren Bereichen der Basallaminae des RPE und der Choriokapillaris zu finden ist (Abb. 30). In Korrelation mit dem Phänotyp der heterozygoten Mutante, fanden sich Timp3-Moleküle verstärkt in den sub-RPE-Ablagerungen, während die Timp3-Immunreaktivität auf der der Choriokapillaris zugewandten „gesunden“ Seite der BM deutlich abnahm. Die Daten stimmen mit der Tatsache überein, dass in SFD-Patienten klassischerweise Akkumulationen von Timp3 in der BM und oder dem RPE nachgewiesen werden konnten (Farris *et al.* 1998, Chong *et al.* 2000, Hagemann *et al.* 2001). Ob die Ansammlung bzw. Fehllokalisierung von Timp3 in den heterozygoten CD1-*S156C knock-in* Mäusen der Auslöser für die sub-RPE-Ablagerungen oder eine sekundäre Folge der Pathogenese darstellen, bleibt weiterhin unklar. Die Ergebnisse stützen jedoch die These von Jomary und Kollegen, nach der ein möglicher SFD-Pathomechanismus in einer Fehllokalisierung von TIMP3 zu finden ist (Jomary *et al.* 1997).

Einer weiteren Hypothese zur Folge könnte die Anreicherung eines veränderten, funktionalen TIMP3-Proteins eher als ein Fehlen bzw. eine Defizienz dem Pathomechanismus der SFD zu Grunde liegen. Nach diesem Modell sind höhermolekulare TIMP3-Komplexe weniger anfällig für Proteinabbaumechanismen in den betroffenen Zellen, und könnten somit aufgrund einer deutlich erhöhten Halbwertszeit während der Gewebealterung in den RPE-Zellen und

sukzessive der BM akkumulieren. Als Resultat würden zeitlich koordinierte molekulare Re- und Umstrukturierungsprozesse in der BM massiv gestört und könnten die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Pathologien auslösen. Das CD1-Mausmodell bietet wie das C57/BL6-Modell einige Hinweise, die auch diese These untermauern (Weber *et al.* 2002, Soboleva *et al.* 2003). Im System der Zellkultur konnte mit Hilfe der Immunozytochemie eine Akkumulation von Timp3 um die Zellkerne von CD1-heterozygoten und homozygoten *S156C*-Fibroblasten nachgewiesen werden, wobei der Effekt in den heterozygoten Fibroblasten wesentlich stärker zu beobachten war, ein im Auge möglicher dominant-negativer Effekt des mutierten über das Wildtyp-Allel. Das Timp3-Färbemuster impliziert eine Retention des Proteins vermutlich im Endoplasmatischen Retikulum oder Golgi Aparat der betroffenen Zellen. Auf proteinbiochemischer Ebene konnte die für SFD-Mutationen typische und bei Patienten beschriebene Bildung höhermolekularer TIMP3-Aggregate (Langton *et al.* 1998 und 2000) in der homozygoten nicht jedoch der heterozygoten EZM aus CD1-*Timp3-S156C knock-in* Fibroblasten bestätigt werden (nicht gezeigt). Auf proteinbiochemischer Ebene wurde zudem eine stark erhöhte Proteinmenge an Timp3 in der EZM von *S156C knock-in* heterozygoten und homozygoten Fibroblasten gefunden (Abb. 29D). Obwohl eine akkurate Quantifizierung von Wildtyp- und mutantem Timp3 in der BM schwer zu bewerkstelligen ist, lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass das mutierte Auge durch eine relative Zunahme des mutierten Timp3-Proteins gegenüber dem Wildtyp-Protein gekennzeichnet sein könnte. Die *TIMP3-S156C*-Mutation wäre demnach eine Funktionsgewinn (*gain of function*) Mutation, die eine neue, bisher nicht bekannte TIMP3-Aktivität ermöglicht (Langton *et al.* 1998, 2000 und 2005).

Zur weiteren Untersuchung dieser Fragestellung sind proteinbiochemische Untersuchungen des Komplex RPE/BM in *S156C knock-in* Augen dringend notwendig, aber auch RNA-Expressionsanalysen, die eine Unterscheidung der Mengenverhältnisse des Wildtyp- und mutierten Allels ermöglichen. Auf Transkriptionsebene wurden bei relativ jungen Mäusen im Alter von 6 Wochen keine signifikanten Unterschiede im Expressionslevel von Gesamt-Timp3 im Vergleich der einzelnen Genotypen zueinander gefunden. Timp1 wird demgegenüber in der heterozygoten *S156C knock-in* Maus signifikant hoch- und Timp4 runterreguliert. Dies spricht erneut für einen dominant-negativen Effekt des mutierten Timp3 über das Wildtyp-Allel, die zu kompensatorischen Effekten bei den unterschiedlichen Mitgliedern der Timp-Familie führen könnten. Timp1 und Timp4 sind lösliche Moleküle, die sich frei in der BM bewegen und mit weiteren BM-Komponenten interagieren können. Veränderte Timp1- und Timp4-Mengenverhältnisse könnten sekundär die Umsatzrate weiterer BM-Moleküle beeinflussen.

Die Zusammensetzung der Basalmembranen wie z.B. der BM ist viel komplexer als Darstellungen, die durch traditionelle Verfahren der Elektronenmikroskopie möglich sind. Sämtliche Basalmembranen enthalten Elastin, Laminine, Fibronectin, Fibrillin, KollagenIV, Heparansulfat Proteoglykane wie KollagenXVIII, weitere Kollagene, Agrin, Perlecan, verschiedene Wachstumsfaktoren und Proteasen (Marshall *et al.* 1998, Engbring *et al.* 2003, Erickson *et al.* 2000, Abb. 65). Die strukturelle Anordnung und Integrität der einzelnen Komponenten ist äußerst kompliziert und Schwankungen in der EZM-Homöostase können sich dramatisch auf den Zusammenhalt der EZM im Auge auswirken. Eine exzessive Deponierung von membranösen Material in den sub-RPE-Bereich muriner Augen könnte mit der Pathogenese altersabhängiger Netzhautdegenerationen beim Menschen verwandt sein, da die Tendenz einer Verdickung der BM in Richtung RPE in den meisten murinen Modellen für mögliche altersabhängige Degenerationsprozesse zu finden ist (siehe oben). Es scheint, dass diese amorphe Masse eine Überexpression von Basalmembrankomponenten durch das RPE darstellt, obwohl bislang keine RNA-Expressionsstudien an Basalmembran proteinen von Mausaugen vorliegen, die durch sub-RPE-Ablagerungen charakterisiert sind (Ivert *et al.* 2005).

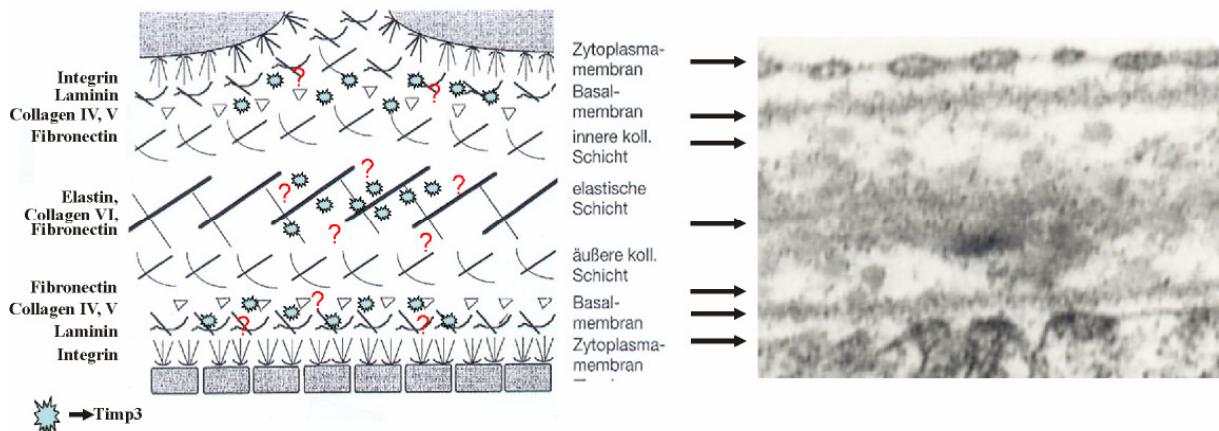


Abb. 65: Schematisch Darstellung der BM und der wichtigsten Strukturproteine. Schematische Darstellung der Bruchschen Membran des Auges mit korrespondierender elektronenmikroskopischer Darstellung der realen BM des Mausauge. Eingezeichnet sind die bedeutendsten strukturellen Vertreter jeder der 5 BM-Schichten. Zusätzlich ist die hypothetische Einflechtung von Timp3 (blaue Sterne) basierend auf den Immunogoldfärbungen sowie der hypothetischen Lokalisation aus der Fachliteratur in das EZM-Proteinsystem eingezeichnet.

Zur weiteren Klärung der Fragestellung, inwieweit die *TIMP3-S156C*-Mutation direkt oder indirekt an der EZM-Stabilität sowie der Umsatzrate von Molekülen der BM beteiligt ist, wurden detaillierte Analysen der Expressionsprofile von 11 ausgewählten Strukturproteinen der BM im Komplex RPE/BM in CD1-*Timp3-S156C knock-in* Mäusen erstellt. Auf Ebene der Genexpression fanden sich signifikante und hoch-signifikante Hochregulationen für Elastin, LamininB2 und der KollagenIV, VI und XVIII im Komplex RPE/BM in heterozygoten *S156C knock-in* Tieren. Die Aktivität von MMP2 und MMP9 (detailliert untersuchte MMPs in der

EZM) und MMP14 hingegen wurde durch die Mutation nicht beeinflusst. Die Expressionsprofile der MMPs zeigten keinerlei Unterschiede im Expressionslevel der einzelnen Genotypen zueinander. Eine verstärkte EZM-Umsatzrate als Sekundäreffekt einer *Timp3-S156C*-vermittelten Zunahme an MMP-Aktivität in der BM betroffener Tiere erscheint daher unwahrscheinlich. Dies stützt die These einer Akkumulation von Basalmembrandebris aufgrund einer RPE-vermittelten Überexpression von EZM-Komponenten, die durch die *Timp3-S156C* mutationsbedingte Änderung eines der beiden *Timp3*-Allele ausgelöst wird und zur Bildung pathologisch erhöhter Proteinmengen führen könnte. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass eine verstärkte Genexpression nicht konsequenterweise mit einer Zunahme der Menge des entsprechenden Proteins einhergeht.

Zur Aufklärung dieser Fragestellung wurden zahlreiche Antikörperfärbungen durchgeführt. Immunohistochemische Elastin-Antikörperfärbungen zeigten ein annähernd identisches, diffuses Verteilungsmuster im Bereich RPE/BM/Choriokapillaris in allen drei Genotypen, wobei keine sub-RPE-Ablagerungen in der heterozygoten Mutante aufgedeckt werden konnten. Mit dem Immunogoldverfahren hingegen war es möglich, eine eindeutige Immunreaktivität von Elastinkomponenten mit der zentralen, elektronendichten Schicht der BM zu assoziieren. Darüber hinaus erscheint die Anzahl an Elastin-Goldpartikeln in der heterozygoten Maus in Übereinstimmung mit dem qRT-PCR-Expressionsprofil deutlich gegenüber den Wildtyp-Tieren und homozygoten *S156C*-Mutanten erhöht, insbesondere bei den ins RPE verlagerten SFD-typischen Depositionen. Die Verteilung der Elastin Goldfärbung zeigt ein sehr ähnliches Muster im Vergleich zur *Timp3*-Immunogoldfärbung, was auf eine Ko-Lokalisierung der beiden Moleküle schließen lässt.

Whole mount Antikörperfärbungen am Komplex RPE/BM bieten zudem Hinweise, dass die Elastinfasern in *S156C* heterozygoten Augen an Elastizität und Spannkraft verloren haben. Das in seinem äußeren Erscheinungsbild sehr heterogene Elastinfasergeflecht scheint in heterozygoten Mutanten durch vermehrt ausgeleierte Faserstränge charakterisiert zu sein. In der Literatur finden sich ebenfalls Hinweise, dass Veränderungen in der Elastinmenge und der Arrangierung des elastischen Netzwerks in der BM mit AMD-typischen Alters-abhängigen Basalmembranveränderungen einhergehen könnten. Die Dicke und Integrität der elastischen Schicht der Makula war in Individuen mit Formen später AMD deutlich erniedrigt, während die peripheren Bereiche des Auges nicht von den Veränderungen betroffen waren (Chong *et al.* 2005). Ugarte und Kollegen konnten nachweisen, dass die Elastizität des Komplex BM/Choroid grundsätzlich mit zunehmendem Alter abnimmt und somit die Suszeptibilität für mögliche neovaskuläre Vorgänge erhöht. Die für Elastinmoleküle typische Rückschnelleigenschaft der individuellen Faser bleibt aber weiterhin erhalten. Ein direkter Zusammenhang mit den AMD-ähnlichen Vorgängen konnte nicht hergestellt werden (Ugarte

et al. 2006). Die Daten scheinen im Kontrast zu den Ergebnissen in diesem Mausmodell zu stehen, der Pathomechanismus differiert, führt aber letztlich zu ähnlichen Veränderungen der BM. Ein durch die *Timp3-S156C*-Mutation bedingter fehlerhafter Aufbau des Elastinnetzwerks in der CD1 *knock-in* BM könnte somit einen entscheidenden Auslöser für das Einströmen extrazellulären Materials in den sub-RPE-Bereich sowie der Ausbildung massiver Strukturveränderungen der BM heterozygoter Augen darstellen.

KollagenXVIII-Antikörperfärbungen ermöglichten eine scharf abgegrenzte Darstellung der BM und der Blutgefäße der Choriokapillaris. Die Daten bestätigen vorangegangene immunhistochemische Studien beim Menschen (Bhutto *et al.* 2004) und in der Maus (Fukai *et al.* 2002). Heterozygote und homozygote *S156C* Augen offenbarten eine deutlichere, teilweise diffusere Proteinverteilung in den Kapillaren des Choroid. Im heterozygoten Auge konnten darüber hinaus knotenartige Verdickungen, die auf KollagenXVIII positive sub-RPE-Ablagerungen oder KollagenXVIII-Akkumulationen hinweisen, gefunden werden (Abb. 37C). Die Ergebnisse könnten ein Korrelat zu der dramatischen, fast 7-fachen Hochregulation dieses Moleküls auf Genebene darstellen. Zwischen KollagenXVIII und altersabhängigen Degenerationserscheinungen im Auge besteht ein deutlicher Zusammenhang. Untersuchungen an AMD-Spenderaugen konnten im Gegensatz zu den Befunden der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede in der KollagenXVIII-Proteinmenge im Vergleich zu Kontrollaugen nachweisen, das anti-angiogene KollagenXVIII-Spalprodukt Endostatin hingegen war in AMD-Augen signifikant erniedrigt. Die Autoren folgern daraus eine erhöhte Suszeptibilität der für die nasse Form der AMD typischen choroidalen Neovaskularisation. Dieser Umstand könnte im Umkehrschluss in der heterozygoten *S156C knock-in* Maus mit dafür verantwortlich sein, dass aufgrund der hohen Expressionsrate eine verstärkte Endotstatin-Menge choroidale neovaskuläre Vorgänge unterdrückt. KollagenXVIII ist ein integrales Proteoglykan in endothelialen und epithelialen Basalmembranen und übernimmt wichtige strukturerhaltende Funktionen (Halfter *et al.* 1998, Saarela *et al.* 1998). Die gealterte *ColXVIII-defiziente* Maus entwickelt massive Akkumulationen von sub-RPE-Depositionen, die den humanen AMD-Basallaminadepositionen sehr ähnlich sind (Marneros *et al.* 2004). Massiv gestörte ProkollagenXVIII-Expressionen könnten im Zusammenwirken mit mutiertem und Wildtyp-Timp3 ähnliche Malformationen auslösen.

Weitere immunhistochemische Untersuchungen offenbarten tendenziell erhöhte Antikörperreaktionen im Bereich RPE/BM/Choriokapillaris. Diese fanden sich vorzugsweise in der BM *Timp3-S156C* heterozygoter Augen für die Proteine LamininB2 und KollagenVI in Übereinstimmung mit den Expressionsdaten der qRT-PCR. Dies spricht für eine möglicherweise verstärkte Ablagerung von LamininB2 und KollagenVI in der BM betroffener Tiere. Die Daten differieren teilweise mit Studie von Chong *et al.* 2000, da TypVI-Kollagen-

positive sub-RPE-Ablagerungen im Gegensatz zu den Befunden beim SFD-Patienten im *S156C knock-in* Mausmodell nicht gefunden wurden. In SFD-Patienten wurden hingegen keine signifikanten Unterschiede in der Stärke der Immunofärbung für Laminin und KollagenVI im Vergleich zu Kontrollaugen gefunden (Chong *et al.* 2000). Knupp und Kollegen postulieren demgegenüber, dass KollagenVI der wahrscheinlichste Kandidat für SFD-typische doppelschichtige Akkumulationen kollagenen Materials im Bereich RPE/BM darstellt. Nach diesem Modell sind die doppelschichtigen Ablagerungen aus KollagenVI-Tetrameren aufgebaut, in denen die globulären Proteindomänen miteinander interagieren und das Netzwerk zusammenhalten (Knupp *et al.* 2001)

Die meisten SFD-bedingten TIMP3-Mutationen führen ein ungepaartes Cystein in den C-Terminus der Polypeptidkette ein, das zur Bildung höher molekularer Aggregate führt. Die MMP-inhibitorische Aktivität sowie die Fähigkeit von TIMP3, an die EZM zu binden, bleiben davon unbetroffen (Langton *et al.* 2000). Nach dem Modell von Knupp *et al.* könnte *S156C*-mutiertes TIMP3 entweder an die globulären Domänen von KollagenVI binden, oder an Bereiche der Tripelhelix, die die Kollagen-Tetramere miteinander verknüpfen. TIMP3 wäre demnach *cluster*-artig in das gestörte KollagenVI Netzwerk eingebunden. Das unnatürlich gebundene TIMP3 könnte vom normalen EZM-Metabolismus abgekoppelt werden, was die natürliche TIMP3-Umsatzrate drastisch erniedrigt und eine weitere Ansammlung ermöglicht. Andersherum könnte TIMP3 aber auch KollagenVI-Aggregate vor Degenerationsprozessen schützen (Knupp *et al.* 2001). Interessanterweise ist KollagenVI genau wie Elastin und Fibronectin in der zentralen BM Schicht lokalisiert. Diese Proteine machen zusammen mit ca. 23 % einen erheblichen Anteil der gesamten Proteinmenge der BM aus.

KollagenIV, KollagenXVIII und Laminin lokalisieren in der Basallamina des RPE und der Choriokapillaris (Marshall *et al.* 1998, Fukai *et al.* 2002). Die Basallamina des RPE ist in der heterozygoten BM genau wie die zentrale Elastika vollständig zerstört und ebenfalls TIMP3-immunoreaktiv. Ein ähnlicher strukturverletzender Effekt von mutiertem TIMP3 im Zusammenspiel mit Kollagenen vergleichbar der Zerstörung der zentralen, elektronendichten Schicht (Timp3 + Elastin) ist daher denkbar. Zusammenfassend deuten die Daten auf eine direkte oder indirekte Interaktion des SFD-mutierten TIMP3-Moleküls mit den untersuchten Strukturproteinen hin. Dies lässt den Rückschluss zu, dass S156C-TIMP3 in der BM eine bisher nicht bekannte Funktion erhält (Funktionsgewinnmutation, *gain of function mutation*), die maßgeblich für die Pathomechanismus der SFD verantwortlich ist, und bei Überschreitung eines Schwellenwertes im Verhältnis von Wildtyp zu mutiertem Protein, die beschriebenen Pathologien hervorruft.

4. Basalmembranveränderungen der Niere

Elektronenmikroskopische Analysen der Glomeruli von CD1-*S156C knock-in* Mäusen offenbarten distinkte Veränderungen der GBM und PDZF in *Timp3^{+/S156C}* und *Timp3^{S156C/S156C}* mutierten Glomeruli im Kontrast zu Wildtyp-Nieren. Ein Vergleich der ultrastrukturellen Pathologien der Basalmembranen der Niere und des Auges von *Timp3^{+/S156C}* Mäusen weist deutliche Gemeinsamkeiten auf. In beiden Geweben ist der typische mehrschichtige Aufbau der Basalmembranen zerstört und durch eine identische, homogen gräuliche in das entsprechende Epithel verlagerte extrazelluläre Masse charakterisiert. Im heterozygoten Auge ist die Lage der basalen RPE Mikrovilli verändert, während die PDZF der Niere geschrumpft wirken, und knotenartige, punktförmige intrazelluläre und membranständige Verdickungen aufweisen. Die Daten bestätigen im Mausmodell den erstmals 1989 von Duvall-Young *et al.* beschriebenen Zusammenhang zwischen humanen Nierenpathologien und altersabhängigen Veränderungen im Auge (Duvall-Young *et al.* 1989a und b), die durch Folgestudien bestätigt wurden (O'Brien *et al.* 1993, Lahbil *et al.* 2002). In Untersuchungen an einer Kohorte von Patienten, die unter Mesangiokapillarer Glomerulonephritis Typ II (MCGN II) leiden, wurde die Anwesenheit von Depositionen in der Choriokapillaris und der BM demonstriert, die die klinische Erscheinung von Drusen aufwiesen, histopathologisch aber die Charakteristika von Depositionen vergleichbar denen im Glomerulus zeigten (dunkle, elektronendichte Massen) (Duvall-Young *et al.* 1989a und b). Von O'Brien und Kollegen konnte zudem ein funktioneller Zusammenhang zwischen Augen- und Nierenleiden hergestellt werden, da die EOG-Ableitungen in drei von vier MCGN II-Patienten durch unnormal erniedrigte „Arden Ratios“ gekennzeichnet waren (O'Brien *et al.* 1993). Betrachtet man Größe, Ausdehnung und Lage der Depositionen im Glomerulus der mutierten *Timp3-S156C knock-in* Niere, kommen diese den Ablagerungen der humanen MCGN II am nächsten, wobei das EZM-Material in der GBM der mutierten *S156C* Mausniere wesentlich elektronendurchlässigere Eigenschaften als die erkrankte humane Niere besitzt (Abb. 66). Morphologische Ähnlichkeiten bestehen auch zur membranösen

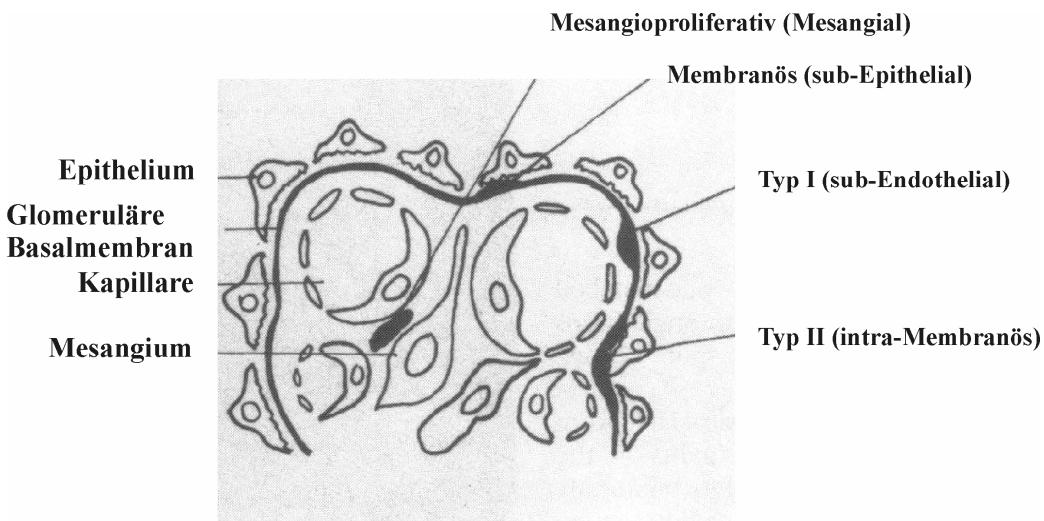


Abb. 66: Bevorzugte Stellen von Ablagerungen immunoreaktiven und elektronendichten Materials in verschiedenen Formen humaner Glomerulopathien (Abbildung verändert nach Duvall-Young *et al.* 1989b). Stark schematisierte Darstellung eines Nierenglomerulus mit Beispielen typischer pathologischer Ablagerungen extrazellulären Materials in verschiedenen Formen von Glomerulopathien.

Nephropathie, deren charakteristische Ablagerungen, kleinere, diskrete Depositionen zwischen der GBM und dem Epithel der PDZ darstellen, zwei Phänotypen, die unter Umständen schwierig zu differenzieren sind (Abb. 66). Bei der membranösen Nephropathie besteht kein signifikanter Zusammenhang zu pathologischen Veränderungen im Bereich des RPE und der Choriokapillaris im Auge (Duvall-Young *et al.* 1989b). Eine ganze Reihe weiterer familiärer Erkrankungen, die sowohl das Auge als auch die Niere betreffen, wurden beschrieben. Solche, die die innere Retina und das Choroid umfassen, wie beispielsweise das Alstrom Syndrome, welches pigmentierte Retinopathie, Fettleibigkeit, Diabetes Mellitus sowie eine Taubheit von Nervenfasern einbezieht, die oftmals mit Niereninsuffizienzen assoziiert sind (Alstrom *et al.* 1959, Millay *et al.* 1986, etc.). Das Alport Syndrom wird durch Lentikonus, Spherophakia, sensorineurale Taubheit, eine angeborene Nephropathie und manchmal pigmentierte Retinopathie mit oder ohne subretinalem Debris und Depositionen in der BM charakterisiert (Purriez *et al.* 1971, Davies PD 1970, Peterson *et al.* 1974). Für das Alport Syndrom existieren seit Mitte der 90er Jahre verschiedene Mausmodelle. Die Alport typischen EZM-Pathologien der Glomeruli im Mausmodell ähneln ebenfalls denen in *Timp3-S156C* Mäusen, sind aber nicht durch homogen gefärbtes EZM-Material sondern durch vervielfältigte Kollagenschichten („long-space-Kollagen“!) gekennzeichnet (Cosgrove *et al.* 1996, Miner and Sanes 1996). Abnormalitäten im Auge wurden bisher nicht beschrieben. Kausativ für die Alport Glomerulonephritis zeichnen sich unterschiedliche Mutationen im KollagenIV-Gen (Zhou *et al.* 1993). Es handelt sich um ein Molekül, das auch in der AMD- und SFD-Pathogenese eine entscheidende Rolle spielen könnte.

Strukturell sind die BM und GBM insofern homolog, als dass sie beide selektiv und direktional permeabel sind (Buchanan *and* Ellis 1964, Kaiser-Kupfer *et al.* 1986). Sie sind positiv

geladen und beinhalten einen hohen Heparansulfat-Gehalt (Carlson *et al.* 1980, Rennke *et al.* 1975) an den TIMP3 in der EZM kovalent gebunden wird (Blenis *et al.* 1983, Yu *et al.* 2000). Die beiden Membranen unterscheiden sich aber durch die Tatsache, dass die kollagenen Zonen der BM dicker sind als die der GBM. Die zentrale elektronendichte Schicht der GBM besteht ebenfalls wie fast alle Basalmembranen vorwiegend aus Elastin, Fibrillin, Fibronectin und KollagenVI. Die Tatsache, dass in der Zusammensetzung von KollagenIV speziell in den äußeren kollagenen Schichten der Basalmembranen der Niere, des Auges und einigen weiteren Geweben andere Kettenanordnungen im KollagenIV-Trimer gewählt werden (Gregory 2004) deutet zudem auf eine besondere Rolle von KollagenIV in der Pathogenese der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen EZM-Veränderungen im Auge und der Niere hin, zumal die KollagenIV Alport-Maus ebenfalls SFD-ähnliche EZM-Pathologien aufweist.

LamB2-defiziente Mäuse entwickeln ebenfalls einen schwerwiegenden die PDZ und GBM betreffenden proteinurischen Phänotyp (Jarad *et al.* 2006, Farquhar MG 2006). LamininB2 ist in der *Timp3-S156C knock-in* Maus auf Ebene der Transkription verändert. Eine homologe, durch die *S156C*-Mutation bedingte strukturbetreffende Pathogenese des Glomerulus wie sie für das Auge postuliert wird, ist für die Niere durchaus wahrscheinlich. Unklar bleibt jedoch weiterhin, warum in der Niere sowohl heterozygote als auch homozygote Mutationsträger betroffen sind, während im Auge ein dominant-negativer Effekt in heterozygoten *Timp3-S156C* Mäusen aufgedeckt wurde.

In den zahlreichen Studien zur SFD-Pathogenese ist bisher noch keine Korrelation zwischen den krankheitsbedingten Abnormalitäten des Auges und Nierenproblemen bei SFD-Patienten beschrieben worden. Dies ließe sich einerseits durch den Umstand erklären, dass SFD-Patienten keine pathologisch veränderten Nieren aufweisen, mögliche glomeruläre Abnormalitäten keine funktionellen Beeinträchtigungen der Niere zur Folge haben und daher unerkannt bleiben, oder die Progression der Degeneration so langsam verläuft, dass sie bis ins hohe Alter keine nachhaltigen Beeinträchtigungen der Nierenfunktion auslöst. Für die letzte Hypothese spricht die Tatsache, dass auch in der *Timp3-S156C knock-in* Niere keine signifikanten Veränderungen in den basalen Parametern der Nierentätigkeit wie der z.B. der glomerulären Filtrationsrate gefunden werden konnten. Veränderungen der glomerulären Filtrationsrate sind direkt mit Pathologien des eigentlichen Filtrationsapparates bzw. der eigentlichen Diffusionsbarriere im Glomerulus, der die PDZF verbindenden Schlitzmembran verbunden. Die oben beschriebenen PDZ-Abnormalitäten der Glomeruli scheinen daher keine Auswirkungen auf die basale Nierentätigkeit in *Timp3-S156C* Tieren auszuüben. Es zeigten sich lediglich eine tendenziell erhöhte Natrium- und Kaliumausscheidung in heterozygoten *knock-in* Mäusen sowie leicht, aber nicht signifikant erhöhte

Plasmareninkonzentrationen in 6 Wochen alten *Timp3^{+/S156C}* und *Timp3^{S156C/S156C}* Glomeruli. Die Tendenz einer erhöhten Reninausscheidung deutet auf eine sich entwickelnde Hypertonie hin. Viele bei Duvall-Young *et al.* analysierten MCGN II-Patienten entwickelten im Krankheitsverlauf Phasen mit Hypertonie (Duvall-Young 1989b). Weitere Untersuchungen an gealterten Tieren sind in diesem Zusammenhang von entscheidender Bedeutung.

Ophthalmoskopische Untersuchungen einer Serie von Patienten mit Glomerulonephritis mit und ohne Hypertension zeigte bei keinem der Patienten in der Fluoressenzangiographie des Augenfundus irgendeine Form von Abnormalitäten, wobei die Art der Glomerulopathie zu diesem Zeitpunkt noch nicht eindeutig diagnostiziert war (Miyake *et al.* 1981). Die Daten der Fluoreszenzangiographie sind in der *Timp3-S156C knock-in* Maus ebenfalls völlig unauffällig.

5. Untersuchungen zu den molekularen Ursachen der RS1

In der vorliegenden Studie auf immunohistochemischer Ebene gezeigt werden, dass in *Rs1h*-defizienten Mäusen eine Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen an P14 beginnt. Ab P18 ist ein massives Einwandern von Makrophagen vom RPE her in die innere Retina insbesondere in die Schisis-Bereiche der durch die Krankheit bedingten Aufsplittung der OPL/INL zu beobachten. Dieser pathologische Befund korreliert deutlich mit den *Microarray*-Analysen und qRT-PCR-Expressionsdaten (Raufregulation der relevanten Gene) zu den Zeitpunkten P11 und P14, die parallel zu den histologischen Untersuchungen an *Rs1h*-defizienten Mäusen durchgeführt wurden. An P11 und P14 werden eine Reihe von Genen reguliert, die auf Mikroglia-vermittelte Prozesse in der *Rs1h^γ* bedingten Pathologie schließen lassen (Gehrig *et al.* 2007). Verschiedene dieser Gene stehen in engem Zusammenhang mit der Immunantwort oder werden von Mikrogliazellen exprimiert. *Clec7a* ist ein Rezeptor, der über Erkennungsmuster β -Glukane in Pilzen und Pflanzen detektiert, und dessen Aktivierung letztlich inflammatorische Prozesse zur Folge hat (Brown *et al.* 2002, Brown *et al.* 2005). *Fcer1g* kodiert für die Gamma-Kette des IgE-Rezeptors CD23, der im Zusammenhang mit Allergien von großer Bedeutung ist (Rosenwasser *et al.* 2005). *Lysz* ist ein induzierbarer Marker der Phagozytose und wird während der Mikroglia-Aktivierung als Antwort auf neuronale Verletzungen exprimiert (Venezie *et al.* 1995). Das Chemokin *Ccl6* agiert als Mediator von Astrozyten- und Mikrogliamigration *in vitro*, während das sekretierte Phosphoprotein *Spp1* an der zellulären Befestigung beteiligt ist (Kanno *et al.* 2005, Rittling *et al.* 1999). Übereinstimmenderweise ist P14 auch der Zeitpunkt, an dem die ersten pathologischen Auffälligkeiten wie z.B. die Bildung Zysten-ähnlicher Strukturen in der inneren Retina, das Zerreißen der OPL und die Desorganisation und Fehllokalisierung von retinalen Zellen in *Rs1h^γ* Mäusen in Erscheinung treten (Weber *et al.* 2002). Zudem repräsentiert eine

erhöhte Expression des Intermediärfilament Proteins *Gfap* und die stark positiven Gfap-Antikörperfärbungen in der P18 und P24 *Rs1h^{-/-}* Retina eine reaktive Antwort von Müller Gliazellen und Astrozyten auf den degenerativen Prozess in der Netzhaut, der durch das Fehlen von Retinoschisin ausgelöst wird. Dementsprechend wurde eine konsistente Hochregulation von *Gfap* in einer Reihe weiterer Modelle für retinale Verletzungen unter anderem für das Glaukom (Ahmed *et al.* 2004, Steele *et al.* 2006), Netzhautabriß (Vazquez-Chona *et al.* 2004) und Diabetische Retinopathie (Gerhardinger *et al.* 2005) festgestellt.

5.1 Der Einfluss von early response gene 1 (*Egr1*) auf die Mikroglia/Makrophagen-Aktivierung in *Rs1h*-defizienten Mäusen

Egr1, welches bei P9 hoch reguliert wird (Gehrig *et al.* 2007) ist in einer breiten Spanne von zellulären Ereignissen involviert, die von Zellüberlebensstrategien über die Beteilung an pro- und anti-apoptotischen Prozessen bis hin zur Makrophagendifferenzierung reichen (Krishnaraju *et al.* 1995, Adamson *et al.* 2002). Die Expression inflammatorischer Mediatoren wie TNF-α oder dem MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) Protein werden durch *Egr1* induziert (Thiel *et al.* 2002, Yao *et al.* 1997, Yan *et al.* 2000). Zusammen mit *Tyrobp* kontrolliert *Egr1* die terminale Differenzierung und Aktivierung von Makrophagen (lentile *et al.* 1992, Krishnaraju *et al.* 2001, Aoki *et al.* 2000). Zur Aufklärung der downstream-Konsequenzen der *Egr1*-Aktivierung wurden Doppel-*knock-out* Mäuse, die defizient für *Egr1* und *Rs1h* sind, generiert. Eine histologische und immunohistochemische Analyse dieser Doppel-*knock-out* Mutanten ergab, dass diese nicht von *Rs1h*-defizienten Tieren zu unterscheiden sind, insbesondere im Hinblick auf die Histologie und Expressionsprofile für Mikroglia/Makrophagen und apoptoseverwandter Transkripte. Diese Experimente stimmen mit den Befunden überein, dass *Egr1^{-/-}* Mäuse keine offensichtlichen Defekte in der Makrophagendifferenzierung besitzen (Lee *et al.* 1995 und 1996). Demgegenüber zeigen Daten von *antisense*-Strategien, dass *Egr1* essentiell für das Zellwachstum und die Differenzierung von Makrophagen benötigt wird (Krishnaraju *et al.* 1995, Nguyen *et al.* 1993, Perez-Castillo *et al.* 1993). Die Kontroversität der Befunde könnte durch eine funktionelle Redundanz der verbleibenden Familienmitglieder *Egr2*, *Egr3* und *Egr4*, die oft koordiniert reguliert sind, erklärt werden (Sukhatme *et al.* 1991).

5.2 Die Rolle von *Casp1* bei der Mikroglia-/Makrophagen-Aktivierung in *Rs1h*-defizienten Mäusen

Es konnte gezeigt werden, dass die progressive Photorezeptordegeneration in der *Rs1h*-defizienten Maus eine Folge von apoptotischem Zelltod darstellt. Die Expression Apoptose-verwandter Gene wird an P16 initialisiert (Gehrig *et al.* 2006). Apoptose ist ein gemeinsamer finaler Signalweg in einer Anzahl verschiedener retinaler Degenerationen, die durch

mutationsbedingte Gendefekte beispielsweise, in den Genen Peripherin2 und Rhodopsin hervorgerufen werden (Chang *et al.* 1993). Für eine wachsende Anzahl von Tiermodellen für Photorezeptordegenerationen konnte die Apoptose ebenfalls als ein allgemeiner Indikator für den Zelltod etabliert werden (Chang *et al.* 1993, Liu *et al.* 1999, Bode and Wolfrum 2003, Doonan *et al.* 2003 etc.). Kontrovers diskutiert wird die Rolle und Involvierung von Caspasen bei der Initialisierung des Zelltods mit Berichten für Caspase-abhängige (Jomary *et al.* 2001, Bode and Wolfrum *et al.* 2003) und Caspase-unabhängige Ereignisse (Donovan and Cotter 2002, Donovan *et al.* 2001). In der *Rs1h*-defizienten Netzhaut konnte eine starke Erhöhung in der Expression der inflammatorischen Caspasen *Casp1*, *Casp11* und *Casp12* nachgewiesen werden (Gehrig *et al.* 2006). Diese Caspasen sind bekannt dafür, an der Reifung von Zytokinen, insbesondere von IL-1 β und IL-18 beteiligt zu sein (Martinon and Tschopp 2004). Beide Zytokine lösen Signalkaskaden aus, die letztlich für den apoptotischen Zelltod von Photorezeptorzellen verantwortlich sein könnten (Harris *et al.* 2002, Takeda and Ichijo 2002). Um diese Hypothese zu testen, wurden Doppel-*knock-out* Tiere für die Gene *Rs1h* und *Casp1* generiert. Falls apoptotische Vorgänge in *Rs1h*^{+/+} Mäusen direkt oder indirekt durch *Casp1* vermittelt würden, müssten zumindest in geringerem Umfang Modifikationen in den generellen apoptotischen Ereignissen in diesem Mausmodell gefunden werden. Sowohl die Größenordnung des apoptotischen Zelltods wie auch die Expression von charakteristischen Apoptosemarkern war zwischen *Rs1h*^{+/+} Mäusen mit und ohne *Casp1*-Defizienz nicht zu unterscheiden (Gehrig *et al.* 2006). In ähnlicher Weise zeigte die Anzahl an aktivierte Mikroglia/Makrophagen in der inneren Netzhaut keinerlei auffällige Differenzen in Abhängigkeit des *Casp1*-Genotyps. Die *Rs1h*-Defizienz sowohl auf heterozygotem wie homozygotem *Casp1* *knock-out* Hintergrund zeigte keine Unterschiede in der Anzahl aktiver Makrophagen. Die Befunde deuten darauf hin, dass *Casp1* wenn überhaupt nur eine untergeordnete Rolle im Prozess des apoptotischen Zelltods in der *Rs1h*^{+/+} Maus spielt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Photorezeptordegeneration in der *Rs1h*-defizienten Maus aufgrund extrinsischer Apoptose an P18 hervorgerufen wird. Der in der vorliegenden Studie definierte zeitliche Verlauf der Mikroglia-/Makrophagen-Aktivierung stellt heraus, dass diese beiden Effekte zeitlich eindeutig voneinander getrennt ablaufen. Gene, die mit der Immunantwort in Zusammenhang stehen, werden etwa ab P11 hochreguliert. Eine Genexpression von Apoptose-involvierten Genen beginnt demgegenüber frühestens ab P16. Daraus kann die Hypothese abgeleitet werden, dass Mikroglia/Makrophagen assoziierte Prozesse den Ereignissen programmierter Photorezeptordegeneration vorausgehen, oder diese sogar verursachen.

6. rAAV-mOP-RS1-Gentherapie am Mausmodell der RS1

Die Einbringung des humanen RS1-Proteins über einen adeno-assoziierten Vektor in die Photorezeptorzellen der *Rs1h*-defizienten Maus, einem Modell für die humane Retinoschisis, führte sowohl zu einer Restaurierung der Integrität der unterschiedlichen retinalen Schichten als auch der Erhaltung der Funktionsfähigkeit der Photorezeptoren. Die AAV-RS1-Behandlung konnte nicht nur die typische „negative“ ERG-b-Welle korrigieren, sondern ermöglichte auch eine Verbesserung der Visusfunktion des behandelten Auges. Trotz der Tatsache, dass der Vorgang der Vektorinjektion an sich relativ schwierig zu bewerkstelligen ist und daher genügend Raum für methodische Verbesserungen lässt, war es ganz erstaunlich, eine gegenüber dem vollständigen Verlust der ERG-Antworten in den nicht-behandelten Augen konstante, stabile Erhaltung des ERG-Profils über die gesamte Lebensspanne der Mäuse bis hin zu 20 Monaten als Folge einer einzigen Injektion des Vektorkonstrukts an P14 in die injizierten Augen zu beobachten. Die skotopischen Einzelblitz ERG-Ableitungen zeigten eine klare Erholung der negativen b-Welle und noch deutlichere Erfolge in photopischen ERGs mit dem größten Nutzen, der in den Flicker-Antworten und oszillatiorischen Potentialen gemessen werden konnte. Da von jedem dieser Elemente der elektrischen Weiterleitung des optischen Reizes angenommen wird, hauptsächlich als Photorezeptorantwort auf das Lichtsignal hervorgerufen zu werden, kann man annehmen, dass der eigentliche therapeutische Erfolg funktionelle Verbesserungen der inneren Netzhaut mit einschließt. Hier zeigt sich eine klare Korrelation der *in vivo* ERG/SLO-Daten mit den histologischen Befunden, die sich aufgrund des therapeutischen Eingriffs durch eine lebenslange Erhaltung der strukturellen Elemente der inneren Retina und der Eliminierung der Schisisbereiche an der Grenze der äußeren und inneren Kernschichten auszeichnet.

Dies deckt sich mit einer stabilen Expression des RS1-Proteins in den inneren Segmenten der Vektor-transfizierten Augen. Die allgemeine Verteilung der *RS1*-Expression in den behandelten Augen ist nahezu identisch mit dem Färbemuster in Wildtyp-Mäusen. Die gewonnenen Daten suggerieren, dass RS1 bei einer Verabreichung über den AAV-Vektor, ebenso wie als endogen exprimiertes Wildtyp-Protein in der Lage ist, in longitudinaler und lateraler Richtung an die normalen zellulären Zielstrukturen in der inneren Netzhaut zu wandern, und dort die entsprechenden Funktionen zu übernehmen. Dieses RS1-Verteilungsmuster wird ebenfalls über die gesamte Lebensspanne der behandelten Mäuse konstant erhalten und deckt sich sehr gut mit den SLO-Messungen an PM18. Die gewonnenen Erkenntnisse belegen anschaulich, dass nahezu der gesamte Augenfundus respektive die komplette Netzhaut der injizierten Augen von der Therapie profitiert haben.

Die Daten stehen jedoch im Kontrast zu den vorangegangenen Arbeiten von Zeng *et al.* (Zeng *et al.* 2004), die zwar einen ähnlichen Versuchsansatz gewählt, aber ein unterschiedliches *Rs1h*-Mausmodell generiert und einen anderen Vektor zum Einsatz gebracht haben. Nach erfolgreicher Applikation eines AAV2-Cytomegalovirus (CMV)-Rsh1 wurde in der Studie von Zheng *et al.* von hohen RS1-Expressionsniveaus in den Photorezeptoren und den Ganglienzellen berichtet, einer Gruppe von retinalen Neuronen, in denen normalerweise kein RS1 exprimiert wird (Zeng et al. 2004). Die Studien-abhängigen Differenzen reflektieren vermutlich die Unterschiede der verschiedenen experimentellen Versuchsansätze, der die Benutzung eines anderen Vektors und Promotors zugrunde liegt. Obwohl beide AAV Serotypen 2 und 5 Photorezeptor- und RPE-Zellen transduzieren, besitzt der Serotyp 5 Vektor bei einer Injektion in den sub-retinalen Bereich des Mausauge eine bedeutend höhere Effektivität in der spezifischen Transduktion von Photorezeptoren der Mausretina (Rabinowitz *et al.* 2002, Yang *et al.* 2002). Darüber hinaus wird die Spezifität der AAV-vermittelten Photorezeptortransduktion der Maus durch den Austausch des CMV durch den Stäbchen-spezifischen Maus Opsinpromotor, der in der vorliegenden Studie benutzt wurde, deutlich erhöht (Flannery *et al.* 1997). Zudem ist sehr gut dokumentiert, dass Serotyp 2 AAV-Vektoren retinale Ganglienzellen nach einer intra-vitrealen nicht jedoch nach einer sub-retinalen Injektion des Konstrukts transduzieren (Auricchio *et al.* 2001, Martin *et al.* 2003). Es ist daher möglich, dass die von Zeng *et al.* beobachtete Transduktion von Ganglienzellen ein „Auslaufen“ von Vektormaterial in den Bereich des Glaskörpers bei dem Injektionsvorgang wieder spiegelt.

Durch die photorezeptorspezifische Expression des AAV5-Opsin-Promotor Vektors ist es sehr wahrscheinlich, dass die Photorezeptoren auch tatsächlich die primäre Quelle für retinales RS1 darstellen. Es ist bedeutsam darauf hinzuweisen, dass in zusätzlichen ERG-Messungen zu dieser Studie, die von Dr. Min ausgeführt wurden, die morphologische Erholung der Struktur der inneren Netzhaut und der Photorezeptoren von Verbesserungen der visuellen Funktion begleitet werden (Min *et al.* 2005). Diese Befunde stehen erneut im Kontrast zur Studie von Zeng *et al.*, in der die Erholung der negativen b-Welle nicht mit deutlichen Verbesserungen der retinalen Integrität und Struktur begleitet wurden. Möglicherweise sind höhere Mengen an RS1 aufgrund der Vektor-, Serotyp- und Promotorauswahl für diese Hauptdifferenzen verantwortlich. Andererseits wurden die Tiere im Alter von 3 Monaten behandelt, zu einem Zeitpunkt, an dem bereits über 50 % der Photorezeptoren degeneriert sind (Zeng *et al.* 2004). In der vorliegenden Studie wurden die Tiere in einem ersten Versuchungsansatz zum Zeitpunkt P14 injiziert. In diesem Stadium der Erkrankung sind noch keine adulten Photorezeptoren abgestorben, da die hauptverantwortliche Apoptosewelle erst an P18 beginnt (Gehrig *et al.* 2006). Die Injektionen erfolgten in beiden Studien zu völlig unterschiedlichen Zeitpunkten der

Krankheitsprogression. Inzwischen ist eine Folgestudie aus der Arbeitsgruppe von Dr. Sieving erschienen, in der ebenfalls die Langzeiteffekte des therapeutischen Erfolgs in dem dort beschriebenen, unabhängigen *Rs1h*-defizienten Mausmodell aufgeschlüsselt wurden (Kjellstrom *et al.* 2007). Der experimentelle Versuchsansatz wurde insofern an die Ausgangssituation in der hier vorliegenden Arbeit angepasst, als dass die Vektorinjektion von Kjellstrom *et al.* auf das Stadium P14 vorverlegt wurde. Daraus resultierend konnten letztlich vergleichbare Ergebnisse zur vorliegenden Arbeit werden.

Eine einzige Injektion an P14 ermöglichte die lebenslange Erhaltung der negativen b-Welle im ERG, eine Erhaltung der Struktur und Integrität der Retina sowie eine stabile Expression von RS1 in den inneren Photorezeptorsegmenten behandelter Augen bis hin zu PM16 (Kjellstrom *et al.* 2007). Trotzdem scheinen Unterschiede aufgrund der unterschiedlichen Vektor- und Promotorbenutzung bestehen zu bleiben. Die korrekte Verteilung der RS1 Färbung durch die innere Retina, insbesondere in den Bereich der Bipolarzellen konnte von Kjellstrom *et al.* nur durch eine Serie von Z-Stapeln mit dem konfokalen Mikroskop relativ schwach nachgewiesen werden, wohin in der vorliegenden Arbeit die behandelten Augen von PM20 Tieren sehr starke und deutlich Signale in der INL bei „normaler“ Fluoreszenzmikroskopie aufwiesen (Abb. 56). Dieser Unterschied könnte sich auch auf die Plastizität der Photorezeptor- und Bipolarzellen in der AAV2-cytomegalovirus (CMV)-Rsh1 behandelten Netzhaut auswirken.

Rhodopsin-Antikörperfärbungen an 20 Monate alten rAAV-mOP-RS1-behandelten Tieren lassen auf lebenslang funktionsfähige Photorezeptoren schließen. Darüber hinaus scheint die synaptische Verschaltung der Photorezeptoren mit den Bipolarzellen an der Grenz OPL/INL teilweise, aber zumindest für eine funktionsfähige Reizweiterleitung des optischen Signals durch die Therapie geheilt werden zu können. In rAAV-mOP-RS1-behandelten Augen zeigte sich eine nahezu korrekte Lokalisation von Stäbchen- und Zapfensynapsen in der OPL an den Spitzen von leicht verlängerten dendritischen Auswüchsen der Horizontal- und Bipolarzellen in weiten Teilen der Netzhaut. Auf ultrastruktureller Ebene wurde nachgewiesen, dass die Synapsenmorphologie von beiden Photorezeptorzelltypen Zapfen, wie Stäbchen in der OPL vollständig mit der von Wildtyp-Synapsen übereinstimmt und keine pathologischen Veränderungen gefunden wurden. Diese Daten korrelieren mit der Restauration und lebenslangen Erhaltung der „negativen“ dunkel-adaptierten ERG-b-Welle, die als Indikator für eine Unterbrechung der synaptischen Transmission zwischen Photorezeptoren und ON-Bipolarzellen dienen kann (Miyake *et al.* 1986, Tremblay *et al.* 1995, Weber *et al.* 2002).

Die Studie von Haverkamp *et al.* zur synaptischen Plastizität in *CNGA3*-defizienten und *CNGA3/Rho* Doppel-*knock-out* Mäusen belegt zudem, dass funktionsfähige Bipolarzellsynapsen in der OPL eine Verschaltung mit funktionsfähigen prä-synaptischen Photorezeptorzellen benötigen (Haverkamp *et al.* 2006). Im rAAV-mOP-RS1-behandelten Auge konnte zudem ein Auswachsen von ON-Bipolarzellendendriten in die ONL beobachtet werden. Dieses Phänomen der Bildung sogenannter ektopischer Synapsen konnte erstmals 2004 in einem Mausmodell für eine Photorezeptordegeneration am Beispiel der *CNGA3/Rho* Doppel-*knock-out* Maus beobachtet werden (Claes *et al.* 2004) und ist inzwischen mehrmals als grundsätzliche „Schutz-Reaktion“ synaptischer Neuverschaltungen der Netzhaut als Folge von Degenerationsprozessen bestätigt worden (Cuenca *et al.* 2005, Haverkamp *et al.* 2006, Bayley *et al.* 2007). Ähnliche Effekte konnten in vollständig anderen Mausmodellen wie der *bassoon*-defizienten Maus (Dick *et al.* 2003) oder in der Katzen-Retina nach pathologischer Netzhautablösung (Lewis *et al.* 1998) beschrieben werden. Allerdings sind die molekularen Mechanismen, die für das Auswachsen der Neuriten und die Genese ektopischer Synapsen verantwortlich sind, in den diversen Tiermodellen weiterhin unklar. Es kann daher sein, dass die Bildung ektopischer Synapsen in der *Rs1h*-defizienten Vektorbehandelten Netzhaut als Schutz- bzw. Heilungseffekt aufgrund der wieder gewonnenen *RS1*-Expression auftritt. So könnten verbleibende, reduzierte Schisisbereiche zwischen den unterschiedlichen Kernschichten der Netzhaut überwunden werden, um eine vollständige Absättigung der Photorezeptoren mit den nachgeschalteten Neuronen zu gewährleisten. Für diese These spricht auch die Tatsache, dass in den unbehandelten Augen keine erhaltenen, normal lokalisierten, wie ektopische Synapsen gefunden werden konnten.

Andererseits könnte die Bildung ektopischer Synapsen in der ONL auch eine Folge verbleibender minder schwerer Degenerationsprozesse zwischen P14 und PM3 darstellen. Dies ist der Zeitpunkt der frühesten pan-retinalen *RS1*-Expression in der behandelten Netzhaut, die vermutlich aufgrund der ursprünglichen *Rs1h*-Defizienz nicht vollständig geheilt ist. Diese These wird durch den Prozess der Synapsenreifung während der Augenentwicklung gestützt. Eine entwicklungsbedingte, terminale Ausbildung der synaptischen Verbindungen für Zapfen ON-Bipolarzellendendriten erfolgt in der OPL zwischen P7 und P12 (Blanks *et al.* 1974). Stäbchen folgen einem sehr ähnlichen Reifungsprozess mit einer 3 bis 4 tägigen Verzögerung in der Formation reifer Synapsen zwischen P10 und P14 (Rich *et al.* 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der gewählte rAAV-mOP-RS1-Gen-therapeutische Ansatz effektiv die Visusfunktion und Wildtyp-Morphologie von *Rs1h*-defizienten Mäusen restaurieren kann, und sich dieser Erfolg über die gesamte Lebensspanne der behandelten Tiere erstreckt (Min *et al.* 2006, Seeliger *et al.* in

Vorbereitung). Insbesondere im Hinblick auf eine mögliche klinische Erprobung dieser Anwendung beim Menschen, ist die Frage nach einem therapeutischen Erfolg zu fortgeschrittenen Stadien der RS1 von besonderer Relevanz. Aus diesem Grund wurden *Rs1h*-defiziente Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten der phänotypischen Manifestationen bis hin zu einem Alter von 7 Monaten injiziert. Die rAAV-mOP-RS1-Injektion wurde auf Zeitpunkte verlegt, an denen bereits ca. 50 % - 70 % der Photorezeptoren abgestorben waren. *In vivo* ERG-Messungen zeigten eine Zunahme der b-Wellenamplituden der injizierten im Vergleich zu den nicht-injizierten Augen bis zu einem Alter von 1 Monat bei der Injektion. Injektionen zu späteren Zeitpunkten, wie z.B. PM2 und PM7, bei sehr weit fortgeschrittener Degeneration der Netzhäute betroffener Tiere, konnten keine nachhaltige Erholung der „negativen“ b-Welle in den behandelten Augen erreichen. Dies deutet darauf hin, dass ein therapeutischer Eingriff in den Spätstadien des Krankheitsverlaufs nicht ausreichend ist, eine adäquate Reizweiterleitung durch die geschädigte Retina zu gewährleisten, und eine Verbesserung der Visusfunktion zu ermöglichen. SLO-Analysen der Tiere waren nicht möglich, da die meisten Mäuse aufgrund der Injektionsprozedur schwere pathologische Veränderungen des vorderen Augenabschnitts wie Katarakte und weitere Linsentrübungen entwickelten, die eine Laser-basierte Darstellung des Augenfundus unmöglich machten.

In Kontrast zu den oben beschriebenen *in vivo* Daten erscheint der verbleibende Heilungseffekt auf histologisch, morphologischer Ebene in der Netzhaut dennoch relativ gut entwickelt zu sein. Zu jedem Zeitpunkt der Vektorinjektion wird das RS1-Protein stabil exprimiert und lokalisiert richtig in den Schichten der Photorezeptor- und Biporzellen. Darüber hinaus wurde zu jedem Injektionszeitpunkt eine signifikant höhere Anzahl an Photorezeptorzellen in den behandelten gegenüber den nicht behandelten Augen gefunden, und das bei einer Analyse der Tiere mit bis zu 8 monatiger Verzögerung nach dem therapeutischen Eingriff. Diese Ergebnisse reflektieren den Status des Krankheitsverlaufs bzw. das morphologische Bild der Netzhautdegeneration zum Zeitpunkt der Vektorinjektion mit einer 2 - 3 Wochen andauernden zeitlichen Verzögerung, die bereits in ähnlicher Weise für die funktionelle Erholung der b-Welle in den behandelten Augen beobachtet wurde (Min *et al.* 2005). Dies bedeutet konkret, dass die Anzahl an Photorezeptoren einer an PM7 behandelten Maus zum Zeitpunkt PM14 identisch mit der Anzahl der Photorezeptoren einer *Rs1h*-erkrankten Netzhaut zum Zeitpunkt PM7 ist

Die Daten der Studie deuten darauf hin, dass die rAAV-mOP-RS1-Gentherapie den Status der retinalen Degeneration sozusagen „einfriert“ und erfolgreich ein weiteres Absterben von Photorezeptorzellen ab dem Zeitpunkt der Injektion inklusive einer etwa 3-wöchigen Verzögerung verhindern kann. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in diesem

Rs1h-defizienten Mausmodell der größte therapeutische Nutzen in Bezug auf die Erhaltung von Morphologie und Visusfunktion der Netzhaut zum frühstmöglichen Therapiezeitpunkt bei einem Alter von P14 erreicht werden kann. Injektionen zu späteren Zeitpunkten bei voranschreitender Netzhautdegeneration resultierten in einer graduellen Abnahme des beobachteten Heilungseffekts in Abhängigkeit des Status der Krankheitsprogression. Die Injektionen sind aber dennoch erfolgreich genug, die verbleibende Morphologie zu erhalten und ein weiteres Absterben von Photorezeptorzellen zu verhindern. Unter Berücksichtigung der Aufschlüsselung eines Therapieerfolgs in Spätstadien der Krankheit, korrelieren die hier gewonnenen Daten erneut teilweise mit der oben genannten Studie von Zeng (Zeng *et al.* 2004). Der Austausch des RS1 Proteins durch Einführung über ein AAV-(2/2)-CMV-*Rs1h*-Konstrukt in erwachsene *Rs1h*-defiziente Mäuse zum Zeitpunkt PM3 konnte die pathologischen Manifestation in der retinalen Struktur nicht revertieren, aber erfolgreich die „negative“ b-Welle im ERG wiederherstellen. Bezüglich der morphologisch/histologischen Ergebnisse decken sich die Befunde der Zeng Studie mit denen der vorliegenden Arbeit und lassen ebenfalls ein „Einfrieren“ der Krankheitsprogression ab dem Zeitpunkt der Injektion zumindest auf morphologischer Ebene erkennen. Die dramatischen Unterschiede in den gemessenen ERG-b-Wellenamplituden der beiden Studien könnten sich als eine Konsequenz von Unterschieden im ERG-Messsystem zwischen dem Geräteaufbau der beiden Arbeitsgruppen herausstellen. Ferner haben viele Mäuse der Studie dieser Arbeit gerade bei Injektionen zu PM2 und PM7 Katarakte und Linsentrübungen entwickelt, ein Umstand, der eventuell die korrekte Reizweiterleitung der Messelektroden beeinflusst und suboptimale ERG-Daten generiert.

Lebersche Kongenitale Amaurose, die unter anderem durch Mutationen im *RPE65*-Gen hervorgerufen wird, ist ein weiteres Beispiel für eine Revertierung eines mutationsbedingten Funktionsverlusts und die Wiedererlangung der physiologischen Funktion nach erfolgreicher somatischer Generatztherapie. *RPE65* Hunde, ein Modell für Blindheit im Kindesalter zeigen deutliche Verbesserungen der Visusfunktion nach erfolgreicher Vektorapplikation, wie durch ERG-Messungen aufgedeckt werden konnte (Acland *et al.* 2001).

Eine weitere Studie konnte zeigen, dass das Potential für eine morphologische Verbesserung des behandelten Gewebes nach erfolgter Generatztherapie altersabhängig ist, und die Erfolge bei frühen Injektionszeitpunkten deutlich besser waren, als Injektionen zu späten Stadien der Degeneration (Sarra *et al.* 2001). Die *retinal degeneration slow* (*rds*) Maus, die homozygot eine Null-Mutation im *rds*/Peripherin-Gen trägt, und daher durch das vollständige Fehlen von funktionellem Peripherin charakterisiert ist, stellt ein Mausmodell für die autosomal-rezessive Retinitis Pigmentosa (RP) dar. Phänotypisch betrachtet, entwickeln *rds* Mäuse keine funktionsfähigen Photorezeptor-Außensegmente. Der Prozess des

Krankheitsverlaufs ist dem der RS1, wie er in unseren *Rs1h*-defizienten Mäusen beobachtet werden kann, sehr ähnlich. In der *Prph2^{Rd2/Rd2}* Maus beginnt die Degeneration der Netzhaut ungefähr zwei Wochen nach der Geburt mit einer Apoptosewelle, die vergleichbar mit derjenigen in der *Rs1h*-defizienten Maus, ihren Höhepunkt an P18 erreicht (Chang *et al.* 1993, Portera-Cailliau *et al.* 1994). Ungefähr 50 % der Photorezeptoren sterben zwischen P10 und PM1,5 ab, und weitere 15 % zwischen PM3 und PM4, eine weitere Gemeinsamkeit mit der *Rs1h*-defizienten Maus. Die Dicke der ONL wird von ca. 11 Kernlagen an P10 auf lediglich eine verbleibende Kernlage bei einem Alter von 12 Monaten reduziert (Sanyal and Jansen 1981). Auf funktioneller Ebene sind die ERG-Daten von *Prph2^{Rd2/Rd2}* Mäusen durch stark reduzierte a- und b-Wellen charakterisiert, die ab einem Alter von 2 Monaten nicht mehr nachgewiesen werden können (Reuther and Sanyal 1984). Sub-retinale Injektionen von rAAV-Peripherin2 unter der Kontrolle des Maus Rhodopsin-Promotors (AAV.Rho.prp2) führte zu sehr unterschiedlichen Erfolgen. Die Anzahl und Qualität der regenerierten Außensegmente war stark abhängig vom Alter der Mäuse bei der Injektion, dennoch war die Therapie erfolgreich genug, um zu einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung bei PM3 eine pan-retinale Expression des *prph2* Transgens zu gewährleisten und Photorezeptoren mit teilweise gesund ausgebildeten Außensegmenten zu generieren (Sarra *et al.* 2001).

Eine wirklich erfolgreiche Therapie sollte die Erhaltung der Struktur der Netzhaut sowie ihre Funktions- und Lebensfähigkeit umfassen. Aus diesem Grund bietet das *Rs1h*-defiziente Mausmodell ein geeignetes Werkzeug, den therapeutischen Nutzen einer Generatztherapie zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs für die menschliche RS1 zu prognostizieren. Die Klinik der RS1 zeigt eine große Variabilität in der Schwere der Krankheitsausprägung, wobei erschwerenderweise die unterschiedlichen kausativen Mutationen nicht mit dem Schweregrad und der Krankheitsprogression korrelieren (Eksandh *et al.* 2000, Pimenides *et al.* 2005, Shinoda *et al.* 2003, Simonelli *et al.* 2003). Die Visusfunktion bleibt oft von der Kindheit bis in die frühen 40er Jahre stabil, wenn sich die ersten Verschleißerscheinungen bemerkbar machen (Forsius *et al.* 1973, Pimenides *et al.* 2005, George *et al.* 1995). Unabhängig davon können zahlreiche Komplikationen wie Hämorrhagien des Glaskörpers oder Ablösungen der Netzhaut schon zu viel früheren Zeitpunkten zu schwerwiegenden Beeinträchtigungen der Sehfähigkeit führen, wie dies erst kürzlich für ein 9 Monate altes Kleinkind beschrieben wurde (George *et al.* 1996, Kellner *et al.* 1990, Prasad *et al.* 2006). Bei der RS1 variiert der Krankheitsbeginn von Patienten, die in der Kindheit lediglich durch eine Schielstellung des Auges und Nystagmus auffallen und solchen, die bereits im Schulalter von erheblichen Sehbeeinträchtigungen betroffen sind (George *et al.* 1995). Die Sehschärfe selbst variiert von 20/20 bis 20/600 und deutliche Unterschiede können zu allen Lebensaltern sogar innerhalb einer Familie mit derselben kausativen Mutation gefunden werden (Forsius *et al.* 1973). Darüber hinaus ist die klinische

Diagnose der RS1 ein Prozess mit vielen Herausforderungen und eine eindeutige Diagnose findet häufig erst nach dem Einsetzen der ersten pathologischen Symptome mit einer Verzögerung bis hin zu 8 Jahren statt (George *et al.* 1996). Heute wird daher verstärkt angenommen, dass sich die RS1 in den ersten zwei Lebensjahrzehnten manifestiert und bis in die 30er/40er Jahre stabilisiert, wobei deutliche Unterschiede im Verlauf und Schweregrad der Krankheit bestehen. In diesem Zusammenhang würde ein gentherapeutischer Ansatz beim Menschen, ähnlich wie im Mausmodell, unmittelbar zu Beginn der Erkrankung, die besten Heilungschancen bieten. Eine Behandlung zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt von RS1 bei eindeutiger Diagnose könnte dennoch helfen, eine weitere Verschlechterung zu verhindern und die verbleibende Sehkraft zu erhalten.

Dennoch sollten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit einer gewissen Vorsicht betrachtet werden. Das Mausmodell für die humane RS1 hat insofern Limitationen, als dass Mäuse keine Makula und Fovea besitzen. Bei vielen Patienten ist die Krankheit aber auf den Bereich der Fovea beschränkt, mit nur wenigen, milden Veränderungen in der Peripherie des Auges. Der Nutzen einer Gentherapie in diesen Patienten könnte limitiert sein, und es ist unwahrscheinlich, dass entwicklungsbedingte Abnormalitäten der Netzhaut durch die Gentherapie im Kindes- oder Erwachsenenalter korrigiert werden können (Sikkink *et al.* 2006). Ein weiterer wichtiger Kritikpunkt besteht darin, dass die *Rs1h*-defiziente Maus als Null-Mutante kein *Rs1h* exprimiert. Dies ist im Gegensatz zur menschlichen Erkrankung ein anderes Szenario, da die meisten RS1-Patienten Träger von Missense-Mutationen sind (The Retinoschisis Consortium 1998, Eksandh *et al.* 2000, Simonelli *et al.* 2003). Viele der Missense-Mutationen führen jedoch letztlich zu einer intrazellulären Zurückbehaltung des mutierten RS1-Proteins im endoplasmatischen Retikulum, so dass letztlich eine vergleichbare Situation wie bei einem vollständigen Fehlen von RS1 entsteht. Es besteht trotzdem die Möglichkeit, dass das mutierte RS1 einen dominant-negativen Effekt über das verbleibende Wildtyp-Protein ausübt, und zwar durch eine Blockierung seiner ursprünglichen Funktion, entweder durch die Beschlagnahmung und Inaktivierung des Wildtyp-Proteins in der Zelle, oder durch die Bildung von Oktameren zwischen Wildtyp und mutierten RS1-Molekülen. Die Expression von zwei Allelen in einer Zelle würde eine völlig neuartige Situation darstellen, da auch bei weiblichen Trägerinnen, die beide Allele, sowohl das Wildtyp als auch mutierte RS1-Allel tragen, durch X-Inaktivierung eines der beiden Allele in jeder Körperzelle abgeschaltet wird (Sikkink *et al.* 2006).

Zurzeit existiert keine Alternative zu einem Behandlungsversuch der RS1 mit Hilfe der somatischen Generatzer therapie. Es existieren allerdings Versuche einer palliativen Behandlung zur Eindämmung der Krankheitssymptome mit chemisch-medikamentösen Präparaten (Apushkin *et al.* 2006). Hierbei konnte durch eine Verabreichung von Dorzolamid,

einem Karboanhydrase-Hemmer, eine erfolgreiche Behandlung der Schisisbereiche im Auge betroffener Patienten erreicht werden. Normalerweise wird Dorzolamid zur Behandlung von erhöhtem Augeninnendruck, beim Offenwinkelglaukom und okulärer Hypertension eingesetzt. Bei RS1-Patienten konnte aber eine Reduzierung des Schweregrad der zystischen Läsionen der Fovea in zumindest einem Auge von 8 Patienten nach Verabreichung dieses Medikamentes verzeichnet werden. Es liegen jedoch keine Studien über Langzeiteffekte der Therapie und funktionelle Auswirkungen auf die Sehkraft der so behandelten Patienten vor (Apushkin *et al.* 2006).

Seit Jahrhunderten strebt die Medizin nach Heilung von pathologischen Zuständen, wobei dieser uralte Traum oft genug der Realität einer rein palliativen Symptombehandlung weichen muss. Heute halten wir jedoch innovative Werkzeuge in Händen, die in Verbindung mit einem stetig wachsenden Wissen um die molekularen Ursachen von Erkrankungen, Hoffnung wecken, dass sich dieser Traum in nicht allzu ferner Zukunft doch noch erfüllen könnte. In der vorliegenden Studie konnte am Mausmodell der RS1 gezeigt werden, dass ein einziger Behandlungszyklus eines AAV-vermittelten Generates ausreichend ist, um effektiv eine progrediente Zerstörung der Netzhaut - ansonsten eine unvermeidbare Konsequenz dieser Erkrankung - für die gesamte Lebensspanne der behandelten Tiere zu verhindern. Ebenso konnten Injektionen zu Spätstadien der Erkrankung ein weiteres Fortschreiten der Netzhautpathologien verhindern. Dies kommt einer kurativen Option zur Heilung der RS1 Erkrankung ein Stück näher, wenn auch vorerst nur im Mausmodell. Viele Fragen bedürfen hierbei ohne Zweifel noch unserer Aufmerksamkeit, es ist jedoch ein vielversprechender Schritt, um diesen Behandlungsansatz auch als Option für menschliche Patienten mit RS1 in Erwägung zu ziehen.

VI. Literatur

- Acland GM**, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 2001; 28: 92-95
- Adamson ED**, Mercola D. Egr1 transcription factor: multiple roles in prostate tumor cell growth and survival. *Tumour Biol* 2002, 23: 93-102
- Ahmed F**, Brown KM, Stephan DA, Morrison JC, Johnson EC, Tomarev SI. Microarray analysis of changes in mRNA levels in the rat retina after experimental elevation of intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004, 45: 1247-1258
- Alstrom CH**, Hallgren B, Nilsson CB. Retinal degeneration combined with obesity, diabetes mellitus and neuorogenous deafness. A specific syndrome (not hitherto described) from the Laurence-Moon-Bardet-Biedl syndrome. *Acta Psychiatr Scand*. 1959, 34 (suppl): 129
- Amour A**, Slocombe PM, Webster A, Butler M, Knight CG, Smith BJ, Stephens PE, Shelley C, Hutton M, Knauper V, Docherty AJ, Murphy G: TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett* 1998, 435:39-44
- Anand-Apte B**, Bao L, Smith R, Iwata K, Olsen BR, Zetter B, Apte SS: A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochem Cell Biol* 1996, 74:853-862
- Anand-Apte B**, Pepper MS, Voest E, Montesano R, Olsen B, Murphy G, Apte SS, Zetter B: Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997, 38:817-823
- Aoki N**, Kimura S, Takiyama Y, et al. The role of the DAP12 signal in mouse myeloid differentiation. *J Immunol* 2000, 165: 3790-3796
- Apte SS**, Olsen BR, Murphy G. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem* 1995, 270:14313-14318
- Apushkin MA**, Fishman GA, Janowicz MJ. Correlation of optical coherence tomography findings with visual acuity and macular lesions in patients with X-linked retinoschisis. *Ophthalmology* 2005; 112: 495-501.
- Auricchio A**, et al. Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model. *Hum Mol Genet* 2001, 10: 3075-3081
- Ashton N**, Sorsby A. Fundus dystrophy with unusual features: a histopathological study. *Br J Ophthalmol* 1951, 35:751-764
- Blaauwgeers HG**, Holtkamp GM, Rutten H, Witmer AN, Koolwijk P, Partanen TA, Alitalo K, Kroon ME, Kijlstra A, van Hinsbergh VW, Schlingemann RO: Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol* 1999, 155:421-428
- Baumgartner S**, Littleton JT, Broadie K. et al. A *Drosophila* neurexin is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function. *Cell* 1996, 87:1059-1068
- Bayley PR, Morgans CW**. Rod bipolar cells and horizontal cells form displaced synaptic contacts with rods in the outer nuclear layer of the nob2 retina. *J Comp Neurol* 2007, 500: 286-298
- Blanks JC**, Adinolfi AM, Lolley RN. Synaptogenesis in the photoreceptor terminal of the mouse retinae. *Eur J Neurosci* 1974, 11: 2121-2133
- Blenis J**, Hawkes SP: Transformation-sensitive protein associated with the cell substratum of chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80:770-774
- Bode C**, Wolfrum U: Caspase-3 inhibitor reduces apoptotic photoreceptor cell death during inherited retinal degeneration in tubby mice. *Mol Vis* 2003, 9: 144-150
- Bond M**, Murphy G, Bennett MR, Amour A, Knauper V, Newby AC, Baker AH: Localization of the death domain of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 to the N terminus. Metalloproteinase inhibition is associated with proapoptotic activity. *J Biol Chem* 2000, 275:41358-41363

- Brann MR**, Young WS. Localization and quantitation of opsin and transducin mRNAs in bovine retina by in situ-hybridization histochemistry. *FEBS Lett* 1986, 200: 275-278
- Bravo-Nuevo A**, Walsh N, Stone J. Photoreceptor degeneration and loss of retinal function in the C57BL/6-C2J mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45: 2005-2012
- Brosnahan DM**, Kennedy SM, Converse CA, Lee WR, Hammer HM. Pathology of hereditary retinal degeneration associated with hypobetalipoproteinemia. *Ophthalmology* 1994, 101: 38-45
- Brown GD**, Taylor PR, Reid DM, et al. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* 2002, 196: 407-414
- Brown GD**, Gordon S. Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cell Microbiol* 2005, 7: 471-479
- Bhutto IA**, Sahng KY, McLeod SD, Merges C, Fakai N, Olsen BR, Lutty GA. Localization of Collagen XVIII and the endostatin portion of collagen XVIII in aged human control eyes and eyes with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004, 45: 1544-1552
- Buchanan WS**, Ellis PP. Retinal separation in chronic glomerulonephritis. *Arch Ophthalmol* 1964, 71: 182-186
- Butler GS**, Apte SS, Willenbrock F, Murphy G. Human tissue inhibitor of metalloproteinases 3 interacts with both the N- and C-terminal domains of gelatinases A and B. Regulation by polyanions. *J Biol Chem* 1999, 274:10846-10851
- Campochiaro PA**, Hackett SF, Vinores SA: Growth factors in the retina and retinal pigmented epithelium. *Prog Ret Eye Res* 1996, 15:547-567
- Campochiaro PA**. Gene therapy for ocular neovascularization. *Curr Gene Ther.* 2007, 7:25-33. Review.
- Capon MRC**, Marshall J, Krafft JI, Alexander RA, Hiscott PS, Bird AC. Sorsby's fundus dystrophy: A light and electron microscopic study. *Ophthalmology* 1989, 96: 1755-1762
- Carlson EC**, Kenney MC. Morphological heterogeneity of isolated renal basement membranes. *Renal Physiol* 1980, 3: 288-297
- Chang GQ**, Hao Y, Wong F: Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds and rhodopsin mutant mice. *Neuron* 1993, 11: 595-605
- Claes E**, Seeliger MW, Michalakis S, Biel M, Humphries P, Haverkamp S. Morphological characterization of the retina of the CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} mutant mouse lacking functional cones and rods. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004, 45: 2039-2048
- Chong NHV**, Alexander RA, Gin T, Bird AC, Luthert PJ. TIMP-3, collagen, and elastin immunohistochemistry and histopathology of Sorsby's fundus dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, 41: 898-902
- Chong NHV**, Alexander RA, Gin T, Bird AC, Luthert PJ. TIMP-3, collagen, and elastin immunohistochemistry and histopathology of Sorsby's fundus dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004, 41: 898-902
- Chong NHV**, Keonin J, Luthert PJ, Frennesson CI, Weingeist DM, Wolf RL, Mullins RF, Hageman GS. Decreased thickness and integrity of the macular elastic layer of Bruch's membrane correspond to the distribution of lesions associated with age-related macular degeneration. *AJ Pathol* 2005, 166: 241-251
- Condon GP**, Brownstein S, Wang NS, Kearns JA, Ewing CC. Congenital hereditary (X-linked juvenile) retinoschisis. Histopathologic and ultrastructural findings in three eyes. *Arch Ophthalmol* 1986, 104: 576-583
- Cousins SW**, Espinosa-Heidmann DG, Alexandridou A, Sall J, Dubovy S, Csaky K. The role of aging, high fat diet and blue light exposure in an experimental mouse model for basal laminar deposit formation. *Exp Eye Res* 2002, 75:543-553
- Cosgrove D**, Meehan DT, Grunkemeyer JA, Kornak JM, Sayers R, Hunter WJ, Samuelson GC. Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome
- Cousins SW**, Marin-Castano ME, Espinosa-Heidmann DG, Alexandridou A, Striker L, Elliot S. Female gender, estrogen loss, and sub-RPE deposit formation in aged mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, 44:1221-1229
- Cruz-Munoz W**, Kim I, Khokha R: TIMP-3 deficiency in the host, but not in the tumor, enhances tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* 2006a, 25:650-655
- Cruz-Munoz W**, Sanchez OH, Di Grappa M, English JL, Hill RP, Khokha R. Enhanced metastatic dissemination to multiple organs by melanoma and lymphoma cells in Timp-3-/- mice. *Oncogene* 2006b, 25:6489-6496

- Cuenca N**, Pinila I, Sauve Y, Lund R. Early changes in synaptic connectivity following progressive photoreceptor degeneration in RCS rats. *Eur J Neurosci* 2005, 22: 9053-9058
- Davies PD**. Pigment dispersion in a case of Alport's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1970, 54: 557-561
- Della NG**, Campochiaro PA, Zack DJ: Localization of TIMP-3 mRNA expression to the retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 1996, 37:1921-1924
- Del Priore LV**, Hornbeck R, Kaplan HJ, Jones Z, Valentino TL, Mosinger-Ogilvie J, Swinn M. Debridement of the pig retinal pigment epithelium in vivo. *Arch Ophthalmol* 1995, 113:939-944
- Dick O**, tom Dieck S, Altrock WD, Ammermuller J, Weiler R, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstatter JH. The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina. *Neuron* 2003, 37: 775-786
- Donavan M**, Cotter TG. Caspase-independent photoreceptor apoptosis in vivo and differential expression of apoptotic proteases activating factor-1 and caspase-3 during retinal development. *Cell Death Differ* 2002, 9:1220-1231
- Donavan M**, Carmody RJ, Cotter TG: Light-induced photoreceptor apoptosis in vivo requires neuronal nitric-oxide synthase and guanylate cyclase activity and is caspase-3 -independent. *J Biol Chem* 2001, 276: 23000-23008
- Doonan F**, Donovan M, Cotter TG: Caspase-independent photoreceptor apoptosis in mouse models of retinal degeneration. *J Neurosci* 2003, 23: 5723-5731
- Dorey CK**, Wu GE, Ebenstein D, Garsd A, Weiter JJ. Cell loss in the aging retina. Relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989, 30: 1691-1699
- Drake CJ**, Hungerford JE, Little CD: Morphogenesis of the first blood vessels. *Ann N Y Acad Sci* 1998, 857:155-179
- Duvall-Young J**, McDonald MK, McKechnie NM. Fundus changes in (typell) mesangiocapillary glomerulonephritis simulating drusen: a histopathological report. *Br J Ophthalmol* 1989a, 73: 297-302
- Duvall-Young J**, Short CD, Raines MF, Gokal R, Lawler W. Fundus changes in mesangiocapillary glomerulonephritis type II: clinical and fluorescein angiographic findings. *Br J Ophthalmol* 1989b, 73: 900-906
- Eksandh LC**, Ponjavic V, Ayyagari R, Bingham EL, Hiriyanna KT, Andreasson S, et al. Phenotypic expression of juvenile X-linked retinoschisis in Swedish families with different mutations in the XLRS1 gene. *Arch Ophthalmol*; 2000 118: 1098-1104.
- Engbring JA**, Kleinmann HK. The basement membrane matrix in malignancy. *J Pathol* 2003, 200: 465-470
- Erickson AC**, Couchman JR. Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem* 2000, 48: 1291-1306
- Fariss RN**, Apte SS, Luthert PJ, Bird AC, Milam AH: Accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in human eyes with Sorsby's fundus dystrophy or retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 1998, 82:1329-1334
- Farquhar MG**. The glomerular basement membrane: not gone, just forgotten. *J Clin Invest* 2006, 116: 2090-2093
- Fedak PW**, Smookler DS, Kassiri Z, Ohno N, Leco KJ, Verma S, Mickle DA, Watson KL, Hojilla CV, Cruz W, Weisel RD, Li RK, Khokha R: TIMP-3 deficiency leads to dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2004, 110:2401-2409.
- Felbor U**, Stöhr H, Amann T, Schönherr U, Weber BHF. A novel Ser156Cys mutation in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) in Sorsby's fundusdystrophy with unusual clinical features. *Hum Mol Genet* 1995, 4: 2415-241
- Felbor U**, Stöhr H, Amann T, Schönherr H, Apfelstedt-Sylla E, Weber BHF. A independent Tyr168Cys mutation in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in Sorsby's fundus dystrophy. *J Med Genet* 1996, 33: 233-236
- Felbor U**, Suvanto EA, Forsius HR, Eriksson AW, Weber BHF. Autosomal recessive Sorsgy fundus dystrophy revisited: Molecular evidence for dominant inheritance. *Am J Hum Genet* 1997, 60: 57-62
- Flannery JG**, et al. Efficient photoreceptor-targeted gene expression in vivo by recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci* 1997, 94: 6916-6921

- Forsius H**, Krause U, Helve J, Voupala V, Mustonen E, Vainio-Mattila B, Fellman J. Visual acuity in 183 cases of X-chromosomal retinoschisis. *Can J Ophthalmol* 1973, 8: 385-393
- Fu L**, Garland D, Yang Z, Shukla D, Rajendran A, Pearson E, Stone EM, Zhang K, Pierce EA. The R345W Mutation in *EFEMP7* is pathogenic, and causes AMD-like deposits in mice. *Oxford University Press* 2007
- Fukai N**, Eklund L, Marneros AG, et al. Lack of collagen XVIII/endostatin results in eye abnormalities. *EMBO J* 2002, 21: 1535-1544
- Gehrig A**, Janssen A, Horling F, Grimm C, Weber BHF. The role of caspases in photoreceptor cell death of retinoschisin-deficient mouse. *Cytogenet Genome Res* 2006; 115: 35-44.
- Gehrig A**, Langmann T, Horling F, Janssen A, Bonin M, Walter M, Poths S, Weber BH. Genome-wide expression profiling of the retinoschisin-deficient retina in early postnatal mouse development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007, 48: 891-900
- George ND**, Yates JR, Moore AT. X linked retinoschisis. *Br J Ophthalmol* 1995, 79: 697-702
- George ND**, Yates JR, Moore AT. Clinical features in affected males with X-linked retinoschisis. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 274-280.
- Gerhardinger C**, Costa MB, Coulombe MC, Toth I, Hoehn T, Grosu P. Expression of acute-phase response proteins in retinal Müller cells in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005, 46: 349-357
- Gill SE**, Pape MC, Khokha R, Watson AJ, Leco KJ. A null mutation for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (Timp-3) impairs murine bronchiole branching morphogenesis. *Dev. Biol* 2003, 261:313-323
- Gottsch JD**, Bynoe LA, Harlan JB, Rencs EV, Green WR. Light-induced deposits in Bruch's membrane of protoporphyrinic mice. *Arch Ophthalmol* 1993, 111:126-129
- Grayson C**, Reid SN, Ellis JA, Rutherford A, Sowden JC, Yates JRW, et al.. Retinooschisin, the X-linked retinoschisin protein, is a secreted photoreceptor protein, and is expressed and released by Weri-Rb1 cells. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1873-1879
- Gregory MC**. Alport Syndrome and thin basement membrane nephropathy: Unraveling the tangledstrands of type IV collagen
- Haas J**. Über das Zusammenvorkommen von Veränderungen der Retina und Choroidea. *Arch Augenheilkd* 1898, 37: 343-348
- Hageman GS**, Luthert PJ, Chong VNH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2001, 705-732
- Halfter W**, Dong S, Schurer B, Cole GJ. Collagen XVIII is a basement membrane heparin sulphate proteoglycan. *J Biol Chem* 1998, 273: 25404-25412
- Harris C**, Maroney AC, Johnson EM: Identification of JNK-dependent and -independent components of cerebellar granule neuron apoptosis. *J Neurochem* 2002, 83: 992-1001
- Haverkamp S**, Michalakis S, Claes E, Seeliger MW, Humphries P, Biel M, Feigenspan A. Synaptic plasticity in CNGA3 (-/-) mice: cone bipolar cells react on the missing cone input and form ectopic synapses with rods. *J Neurosci* 2006, 26: 5248-5255
- Hewitt AW**, FitzGerald LM, Scotter LW, Mulhall LE, McKay JD, Mackey DA. Genotypic and phenotypic spectrum of X-linked retinoschisis in Australia. *Clin Exp Ophthalmol* 2005, 33: 233-239
- Huang H**, McIntosh J, Hoyt DG. An efficient, nonenzymatic method for isolation and culture of murine aortic endothelial cells and their response to inflammatory stimuli. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2003, 39:43-50.
- Iannaccone A**, Mura M, Dyka FM, Ciccarelli ML, Yashar BM, Ayyagari R, Jablonski MM, Molday RS. An unusual X-linked retinoschisis phenotype and biochemical characterization of the W112C RS1 mutation
- Ientile R**, Merendino RA, Fabiano C, Di Giorgio RM, Macaione S. Polyamines are involved in retinoic acid-mediated induction of tissue transglutaminase in human peripheral blood monocytes. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1992, 77: 313-326

- Ivert L**, Keldbye H, Gouras P. Age-related changes in the basement membrane of the retinal pigment epithelium of the Rpe65(-/-) and wild-type mice. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 2005; 243: 250-256
- Jablonski MM**, Dalke C, Wang X, Lu L, Manly KF, Pretsch W, et al. An ENU-induced mutation in Rs1h causes disruption of retinal structure and function. Mol Vis 2005; 11: 569-581.
- Jacobson SG**, Cideciyan AV, Regunath G, Rodriguez FJ, Vandenburg K, Sheffield VC, Stone EM. Night blindness in Sorsby's fundus dystrophy reversed by vitamin A. Nat Genet 1995; 11: 27-32
- Jacobson SG**, Cideciyan AV, Bennett J, Kingsley RM, Sheffield VC, Stone EM. Novel mutation in the *TIMP3* gene causes Sorsby fundus dystrophy. Arch Ophthalmol 2002; 120: 376-379
- Jarad G**, Cunningham J, Shaw AS, Miner JH. Proteinuria precedes podocyte abnormalities in Lamb2^{-/-} mice, implicating the glomerular basement membrane as an albumin barrier. J Clin Invest 2006; 116: 2272-2279-
- Joiner C**, Neal MJ, Iwata K, Jones SE. Localization of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in neurodegenerative retinal disease. Neuroreport 1997; 8: 2169-2172
- Joiner C**, Neal MJ, Jones SE. Characterization of cell death pathways in murine retinal neurodegeneration implicates cytochrome c release, caspase activation, and bid cleavage. Mol Cell Neurosci 2001; 18: 335-346
- Kaiser-Kupfer MI**, Casmiso RC, Mincler DS, Gahl WA. Long term ocular manifestations of nephropathic cystinosis. Arc Ophthalmol 1986; 104: 706-711
- Kahn NW**, Jamison JA, Kemp JA, Sieving PA. Analysis of photoreceptor function and inner retinal activity in juvenile X-linked retinoschisis. Vision Res 2001; 41: 3931-3942
- Kalmus H**, Seedburgh D. Probable common origin of a hereditary fundus dystrophy (Sorsby's familial pseudoinflammatory macular dystrophy) in an English and Australian family. J Med Genet 1976; 13: 271-276
- Kamei M**, Hollyfield JG. TIMP-3 in Bruch's membrane: changes during aging and in age-related macular degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999; 40: 2367-2375
- Kanno M**, Suzuki S, Fujiwara T, et al. Functional expression of CCL6 by rat microglia: a possible role of CCL6 in cell-cell communication. J Neuroimmunol 2005; 167: 72-80
- Karnovsky MJ**. The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. J Cell Biol 1967; 35:213-236
- Katz ML**, Robison WG. Age-related changes in the retinal pigment epithelium of pigmented rats. Exp Eye Res 1984; 38:137-151
- Kawakami A**, Kitsukawa T, Takagi S, Fujisawa H. Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. J Neurobiol 1995; 29: 1-17
- Kjellstrom S**, Bush RA, Zeng Y, Takada Y, Sieving PA. Retinoschisin gene therapy and natural history in the *Rs1h*-KO Mouse: Long-term rescue from retinal degeneration
- Kellner U**, Brummer S, Foerster MH, Wessing A. X-linked congenital retinoschisis. Graefe's Archive Ophthalmol 1990; 228: 432-437.
- Klein LS**, Brownstein S, de Wolff-Rouendaal D. A histopathological, ultrastructural and immunohistochemical study of congenital hereditary retinoschisis. Can ophthalmol. 1996; 31:301-10
- Klein R**, Klein BE, Linton KL. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. Ophthalmology 1992; 99: 933-943
- Klein D**. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. Trends Mol Med 2002; 8: 257-260
- Kliffen M**, Lutgens E, Daemen MJAP, de Muinck ED, Mooy CM, de Jong PTVM. The APO*E3-Leiden mouse as an animal model for basal laminar deposit. Br J Ophthalmol 2000; 84:1415-1419
- Knupp C** and Squire JM. A new twist in the collagen story: The type VI segmented supercoil. EMBO J, 20: 372-376
- Knupp C**, Chong VNH, Munro PMG, Luthert PJ, SquireJM. Analysis of Collagen VI assenblies associated with Sorsby's Fundus Dystrophy. J Struct Biol 2002; 137: 31-40

- Korte GE**, Reppucci V, Henkind P: RPE destruction causes choriocapillary atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984, 25:1135-1145
- Kuntz CA**, Jacobson SG, Cideciyan AV, et al. Sub-retinal pigment epithelial deposits in a dominant late-onset retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996, 37: 1772-1782
- Krishnaraju K**, Nguyen HQ, Liebermann DA, Hoffman B. The zink finger transcription factor Egr-1 potentiates macrophage differentiation of hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 1995, 15: 5499-5507
- Krishnaraju K**, Hoffman B, Liebermann DA. Early growth response gene 1 stimulates development of hematopoietic progenitor cells along the macrophage lineage at the expense of the granulocyte and erythroid lineages. *Blood* 2001, 97: 1298-1305
- Krumpaszyk HG**, Klauß V. Epidemiology of blindness and eye disease. *Ophthalmologica* 1996, 210: 1-84
- Kwakkenbos MJ**, Kop EN, Stacey M, Matmati M, Gordon S, Lin HH, Hamann J. The EGF-TM7 family: a postgenomic view. *Immunogenetics* 2004, 55: 655-666
- Lahbil D**, Rais L, Hamdani M, El Kettani A, Laouissi N, Zaghloul K, Amraoui A. Atteinte oculaire au cours de la glomérulonéphrite membrano-proliférative type II. *J Fr. Ophthalmol* 2002, 25: 949-954
- Lambert E**, Dasse E, Haye B, Petitfrère E: TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004, 49:187-98
- Langton KP**, Barker MD, McKie N. Localization of the functional domains of human tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and the effects of a Sorsby's fundus dystrophy mutation. *J Biol Chem* 1998, 273: 16778-16781
- Langton KP**, McKie N, Curtis A, Goodship JA, Bond PM, Barker MD, Clarke M. A novel tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mutation reveals a common molecular phenotype in Sorsby's fundus dystrophy. *J Biol Chem* 2000, 275: 27027-27031
- Langton KP**, McKie N, Smith BM, Brown NJ, Barker MD. Sorsby's fundus dystrophy mutations impair turnover of TIMP-3 by retinal pigment epithelial cells. *Hum Mol Genet* 2005, 14: 3579-3586
- Leco KJ**, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP, Edwards D. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* 1994, 269:9352-9360
- Leco KJ**, Waterhouse P, Sanchez OH, Gowing KL, Poole AR, Wakeham A, Mak T W, Khokha R. Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest* 2001, 108:817-829
- Lee SL**, Tourtellotte LC, Wesselschmidt RL, Milbrandt J. Growth and differentiation proceeds normally in cells deficient in the immediate early gene NGFI-A. *J Biol Chem* 1995, 270: 9971-9977
- Lee SL**, Wang Y, Milbrandt J. Unimpaired macrophage differentiation and activation in mice lacking the zinc finger transplantation factor NGFI-A (EGR1). *Mol Cell Biol* 1996, 16: 4566-4572
- Lee S**, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol* 2005, 169:681-191
- Leonard DS**, Zhang XG, Panizzo G, Sugino IK, Zarbin MA. Clinicopathologic correlation of localized retinal pigment epithelium debridement. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997, 38:1094-1109
- Lewis GP**, Erickson PA, Guerin CJ, Anderson DH, Fisher SK. Basic fibroblast growth factor: a potential regulator of proliferation and intermediate filament expression in the retina. *J Neurosci* 1992, 12: 3968-3978
- Lewis GP**, Lindberg KA, Fisher SK. Neurite outgrowth from bipolar and horizontal cells after experimental detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998, 39: 424-434
- Lin RJ**, Blumenkranz MS, Binkley J, Wu K, Vollrath D. A novel His158Arg Mutation in TIMP3 causes late-onset form of Sorsby Fundus Dystrophy. *AJ Ophthalmol* 2006, 142:840-848e3
- Lincoln DW**, Larsen AM, Phillips PG, Bove K. Isolation of murine aortic endothelial cells in culture and the effects of sex steroids on their growth. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2003, 39:140-5.
- Liu C**, Li Y, Peng M, Laties AM, Wen R: Activation of caspase-3 in the retina of transgenic rats with the rhodopsin mutation s334ter during photoreceptor degeneration. *J Neurosci* 1999, 19: 4778-4785

- Liu X, Ye X, Yanoff M, Li W:** Regulatory effects of soluble growth factors on choriocapillaris endothelial growth and survival. *Ophthalmic Res* 1998; 30:302-313
- Liu W, Saint DA.** Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 347-535
- Mahmoodi M, Sahebjam S, Smookler D, Khokha R, Mort JS:** Lack of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 results in an enhanced inflammatory response in antigen-induced arthritis. *Am J Pathol* 2005; 166:1733-1740
- Majji AB, Cao J, Chang KY, Hayashi A, Aggarwal S, Grebe RR, de Juan Jr E.** Age-related retinal pigment epithelium and Bruch's membrane degeneration in senescence-accelerated mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:3936-3942
- Manchot WA.** Pathology of hereditary juvenile retinoschisis. *Arch Ophthalmol* 1972; 88:131-138
- Marmorstein LY, McLaughlin PJ, Peachey NS, Sasaki T, Marmorstein AD.** Formation and progression of sub-retinal pigment epithelium deposits in Efemp1 mutation knock-in mice: a model for the early pathogenic course of macular degeneration. Oxford University Press 2007
- Marneros AG, Keene DR, Hansen U, et al.** Collagen XVIII/endostatin is essential for vision and retinal pigment epithelial function. *EMBO J* 2004; 23: 1-10
- Marneros AG, Fan J, Yokoyama Y, Gerber HP, Ferrara N, Crouch RK, Olsen BR.** Vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium is essential for choriocapillaris development and visual function. *Am J Pathol* 2005; 167:1451-1459
- Marshall J, Hussain AA, Starita C, Moore DJ, Patmore AL.** Aging and Bruch's membrane. In Marmor, MF and Wolfensberger TJ (Eds.). *The Retinal Pigment Epithelium*. 1998, 669-692. Oxford Univ Press. New York
- Martin KR, et al.** Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 4357-4365
- Martinon F, Tschopp J:** Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 2004; 117: 561-574
- Millay RH, Weleber RG, Heckenlively JR.** Ophthalmic and systemic manifestations of Alstrom's disease. *Am J Ophthalmol* 1986; 102: 482-490
- Minami Y, Ishiko S, Takai Y et al.** Retinal changes in juvenile X-linked retinoschisis using three dimensional optical coherence tomography. *Br J Ophthalmol* 2005; 89: 1663-1664
- Min JK, Han KY, Kim EC, Kim YM, Lee SW, Kim OH, Kim KW, Gho YS, Kwon YG.** Capsaicin inhibits in vitro and in vivo angiogenesis. *Cancer Res.* 2004; 15;64:644-51.
- Min SH, Molday LL, Seeliger MW, Dinulescu A, Timmers AM, Tonagel F, Tanimoto N, Weber BHF, Molday RS, Hauswirth WW.** Prolonged recovery of retinal structure/function after gene therapy in an Rs1h-deficient mouse model of X-linked juvenile retinoschisis. *Mol Ther* 2005; 12: 644-651
- Miner JH, Sanes JR.** Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(VI): Implications for Alport syndrome. *J Cell Biol* 1996;135: 1403-1413
- Mishima H, Hasebe H.** Some observations in the fine structure of age changes of the mouse retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1978; 209:1-9
- Mishima H, Kondo K.** Ultrastructure of age changes in the basal infoldings of aged mouse retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 1981; 33:75-84
- Miyake K, Maeda K, Imai T, et al.** Vitreous fluorophotometry in diseased blood retinal barriers III. Chronic glomerulonephritis part 1. *J Clin Ophthalmol (Japan)* 1981; 35: 53-59
- Miyake Y, Ichikawa K, Shiose Y, Kawase Y.** Hereditary macular dystrophy without visible fundus abnormality. *Am J Ophthalmol* 1989; 108: 292-299
- Mohammed FF, Smookler DS, Taylor SE, Fingleton B, Kassiri Z, Sanchez OH, English JL, Matrisian LM, Au B, Yeh WC, Khokha R:** Abnormal TNF activity in Timp3-/- mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. *Nat Genet* 2004; 36:969-977
- Molday LL, Hicks D, Sauer CG, Weber BH, Molday RS.** Expression of X-linked retinoschisis protein RS1 in photoreceptor and bipolar cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 816-825.

- Molday RS.** Focus on Molecules. Retinoschisin (RS1). *Exp Eye Res* 2007; 84: 227-228.
- Mooy CM,** Van Den Born LI, Baarsma S, Paridaens DA, Kraaijenbrink T, Bergen A, Weber BH. Hereditary X-linked juvenile retinoschisis: a review of the role of Muller cells. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 979-984.
- Muller PY,** Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* 2002; 32: 1372-1374
- Nakatsu MN,** Sainson RC, Perez-del-Pulgar S, Aoto JN, Aitkenhead M, Taylor KL, Carpenter PM, Hughes CC: VEGF(121) and VEGF(165) regulate blood vessel diameter through vascular endothelial growth factor receptor 2 in an in vitro angiogenesis model. *Lab Invest* 2003; 83:1873-1885
- Nguyen HQ,** Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* 1993; 72: 197-209
- Nicosia RF,** Ottinetti A: Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest* 1990; 63:115-122
- Ntayi C,** Labrousse AL, Debret R, Birembaut P, Bellon G, Antonicelli F, Hornebeck W, Bernard P. Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J Invest Dermatol.* 2004; 122:256-65.
- O'Brien C,** Duvall-Young J, Brown M, Short C, Bone M. Electrophysiology of type II mesangiocapillary glomerulonephritis with associated fundus abnormalities. *Br J Ophthalmol* 1993; 77: 778-780
- Patel N,** Adewoyin T, Chong NV. Age-related macular degeneration: a perspective on genetic studies. *Eye* 2007; 1-9
- Peachey NS,** Fishman GA, Derlacki DJ, Brigell MG. Psychophysical and electroretinographic findings in X-linked juvenile retinoschisis. *Arch Ophthalmol* 1987; 105: 513-516
- Perez-Castillo A,** Pipaon C, Garcia I, Alemany S. NGFI-A gene expression is necessary for T lymphocyte proliferation. *J Biol Chem* 1993; 268: 19445-19450
- Peterson WS,** Albert DM. Fundus changes in the hereditary nephropathies. *Ophthalmology* 1974; 78: 762-771
- Pimenides D,** George ND, Yates JR et al. X-linked retinoschisis: clinical phenotype and RS1 genotype in 86 UK patients. *J Med Genet* 2005; 42: e35
- Pool S,** Firtel RA, Lamar E, Rowekamp W. Sequence and expression of the discoidin I gene family in Dictyostelium discoideum. *J Mol Biol* 1981; 153: 273-289
- Polkinghorne PJ,** Capon MRC, Berninger T, Lyness AL, Sehmi K, Bird AC Sorsby's fundus dystrophy: a clinical study. *Ophthalmology* 1989; 96: 1763-1768
- Portera-Cailliau C,** Sung CH, Nathans J, Adler R. Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 974-978.
- Prasad A,** Wagner R, Bhagat N. Vitreous hemorrhage as the initial manifestation of X-linked retinoschisis in a 9-month-old infant. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2006; 43: 56-8.
- Prenner JL,** Capone A Jr, Ciaccia S, Takada Y, Sieving PA, Trese MT. Congenital X-linked retinoschisis classification system. *Retina* 2006; 26: s61-s64
- Purriez P,** Dreys M, Pascale E, et al. Familial hereditary nephropathy (Alport's syndrome). *Am J Med* 1971; 49: 753-773
- Qi JH,** Ebrahem Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, Baker A, Anand-Apte B. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med* 2003; 9:407-415
- Rabinowitz JE** et al. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 2002; 76: 791-801
- Rakoczy PE,** Zhang D, Robertson T, Barnett NL, Papadimitriou J, Constable IJ, Lai C-M. Progressive age-related changes similar to age-related macular degeneration in a transgenic mouse model. *Am J Pathol* 2002; 161:1515-1524

- Reid SN**, Akhmedov NB, Piriev NI, et al. The mouse X-linked juvenile retinoschisis cDNA: expression in photoreceptors. *Gene* 1999; 227: 257-266
- Rennke HG**, Cotran RS, Venkatachalam MA. Role of the molecular charge in glomerular permeability. Tracer studies with cationised ferritins. *J Cell Biol* 1975; 67: 638-646
- Reuter JH**, Sanyal S. Development and degeneration of retina in rds mutant mice: the electroretinogram. *Neurosci Lett* 1984; 48: 231-237
- Rich KA**, Zhan Y, Blanks JC. Migration and synaptogenesis of cone photoreceptors in the developing mouse retina. *J Comp Neurol* 1997; 388: 47-63
- Risau W**. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671-674
- Rittling SR**, Denhardt DT. Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice. *Exp Nephrol* 1999; 7: 103-113
- Rivera A**, White K, Stohr H, Steiner K, Hemmrich N, Grimm T, et al. A comprehensive survey of sequence variation in the ABCA4 (ABCR) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 800-813
- Robson JG** and Frishman LJ. Dissecting the dark-adapted electroretinogram. *Doc Ophthalmol* 1998; 95: 187-215
- Roesch MT**, Ewing CC, Gibson AE, Weber BHF. The natural history of X-linked retinoschisis. *Can J Ophthalmol* 1998; 33: 149-158
- Rozet JM**, Gerber S, Ducrocq D, Hamel C, Dufier JL, Kaplan J. Les dystrophies maculaires héréditaires. *J Fr Ophthalmol* 2005; 28 : 113-124
- Ruiz A**, Brett P, Bok D. TIMP-3 is expressed in the human retinal pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226: 467-474
- Rundhaug JE**: Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005; 9:267-285
- Saarela J**, Rehn M, Oikarinen A, Auti-Harmainen H, Pihlajaniemi T. The short and long forms of type XVIII collagen in basement membrane zones in humans. *Am J Pathol* 1998; 153: 611-626
- Saint-Geniez M**, D'Amore PA. Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol* 2004; 48:1045-1058
- Saint-Geniez M**, Maldonado A, D'Amore PA: VEGF expression and potential function in the choroid during development and in the adult. *Invest Ophthal Vis Sci* 2006; 47:3135-3142
- Sakamoto T**, Sakamoto H, Murphy TL, Spee C, Soriano D, Ishibashi T, Hinton DR, Ryan SJ. Vessel formation by choroidal endothelial cells in vitro is modulated by retinal pigment epithelial cells. *Arch Ophthalmol* 1995; 113:512-520
- Sambrock J**, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, Cold Spring Harbor, New York
- Sanyal S**, Jansen H. Abscence of receptor outer segments in the retina of rds mutant mice. *Neurosci Lett* 1981; 21: 23-26.
- Sarra GM**, Stephens C, de Alwis M, Bainbridge JW, Smith AJ, Thrasher AJ, Ali RR. Gene replacement therapy in the retinal degeneration slow (rds) mouse: the effect on retinal degeneration following partial transduction of the retina. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2353-2361.
- Sauer CG**, Gehrig A, Warnecke-Wittstock R, Marquardt A, Ewing CC, Gibson A, et al. Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. *Nat Genet* 1997; 17: 164-170
- Saunders WB**, Bohnsack BL, Faske JB, Anthis NJ, Bayless KJ, Hirschi KK, Davis GE. Coregulation of vascular tube stabilization by endothelial cell TIMP-2 and pericyte TIMP-3. *J Cell Biol* 2006; 175:179-191
- Schwesinger C**, Yee C, Rohan RM, Joussen AM, Fernandez A, Meyer TN, Poulaki V, Ma JJ, Redmond TM, Liu S, Adamis AP, D'Amato RJ. Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol* 2001; 158:1161-1172
- Shinoda K**, Ishida S, Oguchi Y, Mashima Y. X-linked juvenile retinoschisis associated with XLRS1 mutation. *Ophthalmic Genet* 2000; 21: 171-180.

- Seeliger MW**, et al. New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 2001, 29: 70-74
- Seeliger MW**, Beck SC, Pereyra-Muñoz N, Dangel S, Tsai JY, Luhmann UF, et al. In vivo confocal imaging of the retina in animal models using scanning laser ophthalmoscopy. *Vision Res* 2005; 45: 3512-3519.
- Simonelli F**, Cennamo G, Testa F, de Crecchio G, Nesti A, Manitto MP, et al. Clinical features of X linked juvenile retinoschisis associated with new mutations in the XLRS1 gene in Italian families. *Br J Ophthalmol* 2003; 87: 1130-1134.
- Sikkink SK**, Biswas S, Parry NR, Stanga PE, Trump D. X-linked retinoschisis: an update. *J Med Genet* 2007, 44: 225-232
- Smith SB**, Brodjan S, Desai S, Sarthy V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is synthesized in the early stages of the photoreceptor cell degeneration of the mivit/mivit (vitiligo) mouse. *Exp Eye Res* 1997, 64: 645-650
- Soboleva G**, Geis B, Schrewe H, Weber BH: Sorsby fundus dystrophy mutation Timp3(S156C) affects the morphological and biochemical phenotype but not metalloproteinase homeostasis. *J Cell Physiol* 2003, 197:149-156
- Sorsby A**, Mason MEJ, Gardener N. A fundus dystrophy with unusual features. *Br J Ophthalmol*. 1949, 33: 67-97
- Springer ML**, Chen AS, Kraft PE, Bednarski M, Blau HM. VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults. *Mol Cell* 1998, 2:549-558
- Steele MR**, Imman DM, Calkins DJ, Horner PJ, Vetter ML. Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006, 47: 977-985
- Sukhatme VP**. The Egr family of nuclear signal transducers. *Am J Kidney Dis* 1991, 17: 615-618
- Tabata Y**, Isashiki Y, Kamimura K, Nakao K, Ohba N. novel splice site mutation in the tissue inhibitor of the metalloproteinases-3 gene in Sorsby's fundus dystrophy with unusual clinical features. *Hum Genet* 1998, 179-182
- Takeda K**, Ichijo H: Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells* 2002, 7: 1099-1111
- Thiel G**, Cibelli G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol* 2002, 193: 287-292
- The retinoschisis consortium**. Functional implications of the spectrum of mutations found in 234 cases with X-linked juvenile retinoschisis. *Hum Mol Genet* 1998, 7: 1185-1192
- Tremblay F**, Laroche RG, De Becker I. The electroretinographic diagnosis of the incomplete form of congenital stationary night blindness. *Vision Res* 1995, 35: 2383-2393
- Ugarte M**, Hussain AA, Marshall J. An experimental study of the elastic properties of the human Bruch's membrane-Choroid complex: relevance to ageing. *Br J Ophthalmol* 2006, 90: 621-626
- Vandesompele J**, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genom Biol research* 3 2002, 0034.1-0034.11 (<http://www.genomebiology.com>)
- Vazquez-Chona F**, Song BK, Geisert EE Jr. Temporal changes in gene expression after injury in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004, 45: 2737-2746
- Venezie RD**, Toews AD, Morell P. Macrophage recruitment in different models of nerve injury: lysozyme as a marker for active phagocytosis. *J Neurosci Res* 1995, 40: 99-107
- Vranka JA**, Johnson E, Zhu X, et al. Discrete expression and distribution pattern of TIMP-3 in the hu110man retina and choroid. *Curr Eye Res* 1997, 16: 102
- Takada Y**, Fariss RN, Tanikawa A, Zeng Y, Carper D, Bush R, Sieving PA. A retinal neuronal development wave of retinoschisin expression begins in ganglion cells during layer formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004, 45: 3302-33012
- Wang T**, Waters CT, Rothman AM, Jakins TJ, Romisch K, Trump D. Intracellular retention of mutant retinoschisin is the pathological mechanism underlying X-linked retinoschisis. *Hum Mol Genet* 2002, 11: 3097-3105

- Weber BH**, Vogt G, Wolz W, Ives EJ, Ewing CC. Sorsby's fundus dystrophy is genetically linked to chromosome 22. *Nature Genet* 1994a, 7: 158-161
- Weber BH**, Vogt G, Pruett RC, Stohr H, Felbor U. Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy. *Nat Genet* 1994b, 8:352-356
- Weber BH**, Lin B, White K, Kohler K, Soboleva G, Herterich S, Seeliger MW, Jaissle GB, Grimm C, Reme C, Wenzel A, Asan E, Schrewe H: A mouse model for Sorsby fundus dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002, 43:2732-2740
- Weber BHF** and Kellner U. X-linked juvenile Retinoschisis. *Ophthalmology Research: Retinal Degenerations: Biology, Diagnostics and Therapeutics*, Humana Press Inc. 2006, Totowa, N
- Wieacker P**, Wienker TF, Dallapiccola B, Bender K, Davies KE, Ropers HH. Linkage relationship between Retinoschisis, Xg, and a cloned DNA sequence from the distal short arm of the X chromosome. *Hum Genet* 1983, 64: 143-145
- Wild A**, Ramaswamy A, Langer P, Celik I, Fendrich V, Chaloupka B, Simon B, Bartsch DK. Frequent methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene in pancreatic endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88:1367-1373
- Wu WW**, Molday RS. Defective discoidin domain structure, subunit assembly, and endoplasmic reticulum processing of retinoschisin are primary mechanisms responsible for X-linked retinoschisis. *J Biol Chem* 2003 278: 139-28, 146
- Wu WW**, Wong JP, Kast J, Molday RS. RS1, a discoidin domain-containing retinal cell adhesion protein associated with X-linked retinoschisis, exists as a novel disulfide-linked octamer. *J Biol Chem* 2005; 280: 10721-1030.
- Wood WI**, Capon DJ, Simonsen CC et al. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 1984, 312: 330-337
- Yan SF**, Fujita T, Lu J, et al. Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat Med* 2000, 6: 1355-1361
- Yang GS**, et al. Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus. Effects of viral capsid and genome size. *J Virol* 2002, 76: 7651-7660
- Yanoff M**, Kertesz-Rahn E, Zimmermann LE. Histopathology of juvenile retinoschisis. *Arch Ophthalmol* 1968, 79: 49-53
- Yao J**, Mackman N, Edgington TS, Fan ST. Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor-alpha promoter in human monocytic cells: regulation by Egr-1, c-Jun, and NF-kappaB transcription factors. *J Biol Chem* 1997, 272: 17795-17801
- Yu WH**, Yu SC, Meng Q, Brew K, Woessner JF. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Bio Chem* 2000, 275: 31226-31232
- Zhao H**, Bernardo MM, Osenkowski P, Sohail A, Pei D, Nagase H, Kashiwagi M, Soloway PD, De Clerck YA, Fridman R: Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem* 2004 279:8592-8601
- Zhao S**, Overbeek PA. Regulation of choroid development by the retinal pigment epithelium. *Mol Vis* 2004, 7:277-282
- Zhou J**, Mochizuki T, Smeets H, Antignac C, Laurila P, de Peape A, Tryggvason K. Deletion of the paired $\alpha 5$ [IV] and $\alpha 6$ (IV) collagen genes in inherited smooth muscle tumors. *Science* 1993, 261: 1167-1169
- Zeng Y**, Takada Y, Kjellstrom S, Hiriyanna K, Tanikawa A, Wawrousek E, et al. RS-1 Gene Delivery to an Adult Rs1h Knockout Mouse Model Restores ERG b-Wave with Reversal of the Electronegative Waveform of X-linked Retinoschisis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 3279-3285.

C. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
aa	Aminosäuren
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease domain</i>
ADAMTS	<i>a disintegrin-like and metallopeptidase with thrombospondin typepe 1 motif</i>
AEC	Endothelzellen der Aorta (<i>aortic endothelial cells</i>)
AF	Autofluoreszenz
AMD	Alters-abhängige Makuladegeneration
APS	Amoniumpersulfat
ARA	Aortenring Assay
ARVO	<i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
ATPase	Adenosin-Triphosphatase
BL	Basallamina
BK	Bowmansche Kapsel
BM	Bruchsche Membran
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
<i>Casp1</i>	<i>Caspase 1</i>
CC	Choriokapillaris
<i>Ccl6</i>	<i>(C-C motif) ligand 6 gene</i>
cDNA	komplementäre DNA
cd*s	<i>candle light units</i>
<i>CNGA3</i>	<i>cyclic nucleotide gated channel alpha 3 gene</i>
Ch	Choroid
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CL	kollagene Schicht
<i>Clec7</i>	<i>C-type lectin domain family 7 gene</i>
CMV	Cytomegalovirus
CNV	choroidale Neovaskularisation
<i>Crx</i>	<i>murines Ortholog zu CRX (cone-rod homebox-containing gene)</i>
CSNB	kongenitale stationäre Nachtblindheit

CtBP2	<i>C-terminal binding protein 2</i>
DA	Dunkel-Adaption
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Differentieller Interferenzkontrast
DIG	Digoxygenin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
<i>D.discoideum</i> <i>Dictyostelium discoideum</i>	
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxynucleotid-5'-triphosphat
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBM	basales Medium für Endothelzellen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Endothelzelle
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
<i>EFEMP1</i>	<i>EGF-containing fibulin like extracellular matrix protein 1</i>
<i>EGR1</i>	<i>early response gene 1</i>
EL	elastische Schicht, Lumen des Endothel
EM	Elektronenmikroskop(ie)
EN	Endothel
EOG	Elektrookulogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERG	Elektroretinogramm
<i>ERK</i>	<i>extracellular signal-related kinase</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung</i>
<i>Fcer1g</i>	<i>Fc IgE receptor,gamma chain gene</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FA	Fluoreszenz-Angiographie
fE	fenestriertes Endothel

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G	Guanosin
GBM	glomeruläre Basalmembran
GCL	Ganglienzellschicht (ganglion cell layer)
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
H	Horizontalzelle
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinetansulfonsäure
HHG	Haushaltsgen (housekeeping gene)
HPLC	Hochdruck Flüssigkeits Chromatographie
Hz	Herz
ICGA	Indocyanin-Angiographie
Ig	Immunglobulin
ILM	innere limitierende Membran (<i>inner limiting membrane</i>)
IMG	Immunogold-Färbung
INL	innere Kernschicht (<i>inner nuclear layer</i>)
IPL	innere plexiforme Schicht (<i>inner plexiform layer</i>)
IS	innere Photorezeptorsegmente (<i>inner segments</i>)
ISI	Stimulus Zwischenintervall
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LA	Licht-Adaption
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LM	Lichtmikroskopie
L-ORMD	<i>late-onset retinal degeneration</i>
<i>LsyZ</i>	<i>lysozyme Z gene</i>
M	Molar (mol/l); Mitochondrium
m	Milli ($\times 10^{-3}$)
m ²	Quadratmeter
μ	Mikro ($\times 10^{-6}$)
mA	Milliampere
MAB	Maleinsäurepuffer
MCGN II	Mesangiokapillarer Glomerulonephritis Typ II
MHEC	<i>mouse heart endothelial cells</i>
min	Minute

mm	Millimeter
ML	Malatia Levantine
MMP	Matrix Metalloproteinase
MNE	Maß für die relative Genexpression
mol	Molarität
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MZ	Mesangiumzelle
N	Normal
n	Nano ($\times 10^{-9}$)
NCBI	<i>US National Center for Biotechnology Information</i>
NFL	Nervenfaserschicht
nm	Nanometer
NTE	Natrium-Tris-EDTA Puffer
NTM	Natrium-Magnesium-Tris Puffer
OAc	Acetat
OCT	Optische Kohärenztomographie (<i>optical coherence tomography</i>)
ONL	äußere Kernschicht (<i>outer nuclear layer</i>)
OP	oszillatorisches Potential
OPL	äußere plexiforme Schicht (<i>outer plexiform layer</i>)
OS	äußere Photorezeptorsegmente (<i>outer segments</i>)
p	Piko ($\times 10^{-12}$)
P	postnataler Tag
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDZ	Podozyten
PDZF	Podozytenfortsätze
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PH	photopisch
PKC α	<i>Protein kinase C alpha</i>
PNA	<i>peanut agglutinin</i>
Prph2	<i>peripherin 2 gene</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	rekombinant
Rb	<i>Ribbon Synapse</i>

rcf	Zentrifugationskraft
RDS	<i>retinal degeneration slow</i>
RF	Infrarot
Rho	Rhodopsin
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RP	Retinitis Pigmentosa
RPE	retinales Pigmentepithel
RPL4	Ribosomales Protein L4
RS	X-gebundene juvenile Retinoschisis
<i>RS1</i>	Retinoschisis assoziiertes Gen (Alias: XLRS1) ; Retinoschisin
<i>Rs1h</i>	<i>murines RS1 Ortholog</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SC	skotopisch
SD	Standardabweichung
SDHA	Succinat Dehydrogenase Komplex Untereinheit A
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SFD	Sorsby Fundusdystrophie
SLO	<i>scanning-laser ophthalmoscopy</i>
SM	Schlitz Membran
SSC	Natrium-Citrat Puffer
<i>Ssc1</i>	<i>secreted phosphoprotein 1 gene</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
T	Thymidin
T _A	Anlagerungstemperatur
Tab.	Tabelle
<i>TACE</i>	<i>TNF-α-cleaving enzyme</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylamin
TIMP3	Gewebsinhibitor der Metalloproteasen-3
T _m	Schmelztemperatur
TNF-α	<i>Tumor-Nekrosisfaktor-α</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Tu	Nierentubuli

<i>Tyrobp</i>	<i>Tyrosine kinase binding protein</i>
U	Einheit (unit); Uracil
US	Abfluß des Primärharns (urinary space)
UTR	nichttranslatierte Region
UV	ultraviolet
V	Volt
<i>VEGF</i>	<i>vascular endothelial growth factor</i>
<i>VEGFR2</i>	<i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
Vol	Volumen
v/v	Volumenanteil einer Flüssigkeit in einer Lösung (volume per volume)
WM	<i>whole mount</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom, 4-Chlor, 3-Indoxyl-β-D-Galactosid
z.B.	zum Beispiel
Zy	Zymographie

D. Anhang

1. Nachweis der *Timp3*-targetierten Mäuse, die für die Arbeiten zu IV. 1.-5. benutzt wurden

Identitätsnummer (ID)	Genotyp	Alter zum Untersuchungszeitpunkt	experimentelle Verwendung
E2 +/+	<i>Timp3</i> ^{+/+}	18 Monate	LM, Abb. 13
C1 -/-	<i>Timp3</i> ^{-/-}	18 Monate	LM, Abb. 13
KO281	<i>Timp3</i> ^{+/+}	6 Monate	EM, Abb. 13
KO043	<i>Timp3</i> ^{-/-}	6 Monate	EM, Abb. 13
KO281	<i>Timp3</i> ^{+/+}	3/6 Monate	SLO, EM, Abb. 14
KO043	<i>Timp3</i> ^{-/-}	3/6 Monate	SLO, EM, Abb. 14
CO1381	<i>Timp3</i> ^{+/+}	4 Wochen	SLO, Abb. 14
CO1377	<i>Timp3</i> ^{-/-}	4 Wochen	SLO, Abb. 14
CO46.14	<i>Timp3</i> ^{+/+}	4 Wochen	Zy, IHC, Abb. 15
CO46.3	<i>Timp3</i> ^{-/-}	4 Wochen	Zy, IHC, Abb. 15
CO50.2	<i>Timp3</i> ^{+/+}	6 Wochen	IHC, Abb. 16
CO51.3	<i>Timp3</i> ^{-/-}	6 Wochen	IHC, Abb. 16
KO1375	<i>Timp3</i> ^{+/+}	4 Wochen	ARA, Abb. 17
KO1376	<i>Timp3</i> ^{-/-}	4 Wochen	ARA, Abb. 17
KO1382	<i>Timp3</i> ^{-/-}	4 Wochen	ARA, Abb. 17
CD1168	<i>Timp3</i> ^{+/+}	4 Wochen	ARA, Abb. 21
CD1164	<i>Timp3</i> ^{ST156C/ST156C}	4 Wochen	ARA, Abb. 21
KO1366	<i>Timp3</i> ^{-/-}	4 Wochen	ARA, Abb. 21
CD682	<i>Timp3</i> ^{+/+}	12 Monate	SLO, Abb. 25
CD683	<i>Timp3</i> ^{+/ST156C}	12 Monate	SLO, Abb. 25
CD687	<i>Timp3</i> ^{ST156C/ST156C}	12Monate	SLO, Abb. 25
CD1102	<i>Timp3</i> ^{+/+}	2 Monate	EM, Abb. 26, 27
CD700	<i>Timp3</i> ^{+/ST156C}	2 Monate	EM, Abb. 26
CD1101	<i>Timp3</i> ^{ST156C/ST156C}	2 Monate	EM, Abb. 26
CD1107	<i>Timp3</i> ^{ST156C/ST156C}	2 Monate	EM, Abb. 27
CD1106	<i>Timp3</i> ^{+/ST156C}	2 Monate	EM, Abb. 27
CD1130	<i>Timp3</i> ^{+/+}	18 Monate	IHC, Abb. 28, 37
CD1133	<i>Timp3</i> ^{+/ST156C}	18 Monate	IHC, Abb. 28, 37
CD1132	<i>Timp3</i> ^{ST156C/ST156C}	18 Monate	IHC, Abb. 28, 37
CD7.14	<i>Timp3</i> ^{+/+}	3 Monate	IMG, Abb. 30, 31
CD8.4	<i>Timp3</i> ^{+/ST156C}	3 Monate	IMG, Abb. 30, 31
CD8.14	<i>Timp3</i> ^{ST156C/ST156C}	3 Monate	IMG, Abb. 30, 31
CD1070	<i>Timp3</i> ^{+/+}	6 Wochen	WM, Abb. 32
CD1192	<i>Timp3</i> ^{+/ST156C}	6 Wochen	WM, Abb. 32
CD1185	<i>Timp3</i> ^{ST156C/ST156C}	6 Wochen	WM, Abb. 32

CD2105	<i>Timp3</i> ^{+/+}	6 Wochen	qRT-PCR, Abb. 33-36
CD2112	<i>Timp3</i> ^{+/+}	6 Wochen	qRT-PCR, Abb. 33-36
CD2115	<i>Timp3</i> ^{+/+}	6 Wochen	qRT-PCR, Abb. 33-36
CD2002	<i>Timp3</i> ^{+/S156C}	6 Wochen	qRT-PCR, Abb. 33-36
CD2004	<i>Timp3</i> ^{+/S156C}	6 Wochen	qRT-PCR, Abb. 33-36
CD2006	<i>Timp3</i> ^{+/S156C}	6 Wochen	qRT-PCR, Abb. 33-36
CD2003	<i>Timp3</i> ^{S156C/S156C}	6 Wochen	qRT-PCR, Abb. 33-36
CD2005	<i>Timp3</i> ^{S156C/S156C}	6 Wochen	qRT-PCR, Abb. 33-36
CD2008	<i>Timp3</i> ^{S156C/S156C}	6 Wochen	qRT-PCR, Abb. 33-36
CO2107	<i>Timp3</i> ^{-/-}	6 Wochen	qRT-PCR, Abb. 33
CO2109	<i>Timp3</i> ^{-/-}	6 Wochen	qRT-PCR, Abb. 33
CO2110	<i>Timp3</i> ^{-/-}	6 Wochen	qRT-PCR, Abb. 33
CD16.5	<i>Timp3</i> ^{+/+}	6 Wochen	LM, EM, Abb. 38, 39
CD16.4	<i>Timp3</i> ^{+/S156C}	6 Wochen	LM, EM, Abb. 38, 39
CD16.3	<i>Timp3</i> ^{S156C/S156C}	6 Wochen	LM, EM, Abb. 38, 39
CD39.1	<i>Timp3</i> ^{+/+}	6 Wochen	Analyse Nierenparameter, Abb. 40, 41
CD39.4	<i>Timp3</i> ^{+/+}	6 Wochen	Analyse Nierenparameter, Abb. 40, 41
CD41.3	<i>Timp3</i> ^{+/+}	6 Wochen	Analyse Nierenparameter, Abb. 40, 41
CD39.2	<i>Timp3</i> ^{+/S156C}	6 Wochen	Analyse Nierenparameter, Abb. 40, 41
CD39.3	<i>Timp3</i> ^{+/S156C}	6 Wochen	Analyse Nierenparameter, Abb. 40, 41
CD41.6	<i>Timp3</i> ^{+/S156C}	6 Wochen	Analyse Nierenparameter, Abb. 40, 41
CD39.14	<i>Timp3</i> ^{S156C/S156C}	6 Wochen	Analyse Nierenparameter, Abb. 40, 41
CD39.5	<i>Timp3</i> ^{S156C/S156C}	6 Wochen	Analyse Nierenparameter, Abb. 40, 41
CD41.4	<i>Timp3</i> ^{S156C/S156C}	6 Wochen	Analyse Nierenparameter, Abb. 40, 41
WT2	<i>Timp3</i> ^{+/+}	2 Monate	LM, EM, Abb. 42, 43
BC2.5	<i>Timp3</i> ^{+/S156C}	2 Monate	LM, EM, Abb. 42, 43
BC2.2	<i>Timp3</i> ^{S156C/S156C}	2 Monate	LM, EM, Abb. 42, 43

2. Nachweis der Rs1h-AAV Mäuse, die für die Arbeiten zu IV. 7.1. - 7.2 benutzt wurden

Identitätsnummer (ID)	Genotyp	Alter bei Injektion (Monate)	Alter zum Untersuchungszeitpunkt (Monate)	ERG-Auswertung	SLO-Auswertung	IHC-Auswertung
#1484	Rs1h(-/y)-AAV	0.5	2	+	+	-
#1486	Rs1h(-/y)-AAV	0.5	2	+	+	-
#1492	?	0.5	9	+	+	+, Abb. 50, 51
#1493	?	0.5	9	+	+	-
#1494	?	0.5	9	+	+	+
#1490	Rs1h(-/-)-AAV	0.5	11	-	-	-
#1496	Rs1h(-/y)-AAV	0.5	14	+	+	+
#1498	Rs1h(-/y)-AAV	0.5	14	+	+	-
#1483	Rs1h(-/y)-AAV	0.5	14	+	+	-

#1485	Rs1h(-/y)-AAV	0.5	14	+	+	-
#1487	Rs1h(-/-)-AAV	0.5	14	+	+	-
#1488	Rs1h(-/y)-AAV	0.5	14	-	-	-
#1489	Rs1h(-/-)-AAV	0.5	14	+	+	-
#1495	Rs1h(-/y)-AAV	0.5	19	+	+	+, Abb. 56
#1497	Rs1h(-/y)-AAV	0.5	19	+	+	+, Abb. 55, 57, 58
#1499	Rs1h(-/y)-AAV	0.5	19	+	+	+
#1491	Rs1h(-/-)-AAV	0.5	21	+	+	+
#1500	Rs1h(-/-)-AAV	0.5	21	+	+	+

3. Nachweis der Rs1h-AAV Mäuse, die für die Arbeiten zu IV. 7.3 benutzt wurden

Identitätsnummer (ID)	Genotyp	Alter bei Injektion (Monate)	Alter zum Untersuchungszeitpunkt (Monate)	ERG-Auswertung	IHC-Ausertung
#1936	Rs1h(-/y)-AAV	0,5	4	+	+
#1937	Rs1h(-/y)-AAV	0,5	4	+	+
#1938	Rs1h(-/y)-AAV	0,5	4	+	+
#1939	Rs1h(-/y)-AAV	0,5	4	-	+
#1940	Rs1h(-/-)-AAV	0,5	4	-	+, Abb. 61
#1941	Rs1h(-/-)-AAV	0,5	4	-	+
#1942	Rs1h(-/-)-AAV	0,5	4	+	+
#1943	Rs1h(-/-)-AAV	0,5	4	+	+
#1944	Rs1h(-/-)-AAV	0,5	4	-	+, Abb. 61
#1925	Rs1h(-/-)-AAV	1	9	+	+, Abb. 61
#1926	Rs1h(-/-)-AAV	1	9	+	+
#1927	Rs1h(-/-)-AAV	1	9	-	+ Abb. 25
#1928	Rs1h(-/-)-AAV	1	9	+	+
#1929	Rs1h(-/-)-AAV	1	9	-	+
#1930	Rs1h(-/-)-AAV	1	9	+	+
#1931	Rs1h(-/-)-AAV	1	9	+	+
#1933	Rs1h(-/y)-AAV	1	9	+	+
#1934	Rs1h(-/y)-AAV	1	9	+	+
#1935	Rs1h(-/y)-AAV	1	9	-	+
#1916	Rs1h(-/-)-AAV	2	10	+	+
#1917	Rs1h(-/-)-AAV	2	10	-	+, Abb. 61
#1919	Rs1h(-/-)-AAV	2	10	+	+
#1920	Rs1h(-/-)-AAV	2	10	+	+, Abb. 61
#1924	Rs1h(-/-)-AAV	2	10	+	+
#1946	Rs1h(-/y)-AAV	2	10	-	+
#1948	Rs1h(-/-)-AAV	2	10	+	+

#1907	Rs1h(-/y)-AAV	7	14,5	+	+
#1908	Rs1h(-/y)-AAV	7	14,5	-	+
#1909	Rs1h(-/y)-AAV	7	14,5	-	+
#1910	Rs1h(-/y)-AAV	7	14,5	+	+
#1911	Rs1h(-/y)-AAV	7	14,5	-	, Abb. 61
#1913	Rs1h(-/y)-AAV	7	14,5	+	+
#1915	Rs1h(-/y)-AAV	7	14,5	+	+
#87.1	Rs1h(-/y)-AAV	-	0,5	-	+
#87.14	Rs1h(-/y)-AAV	-	0,5	-	+
#72.2	Rs1h(--)-AAV	-	1,5	-	+
#72.3	Rs1h(--)-AAV	-	1,5	-	+
#49.1	Rs1h(-/y)-AAV	-	4,5	-	+
#49.14	Rs1h(-/y)-AAV	-	4,5	-	+
#24.1	Rs1h(-/y)-AAV	-	6	-	+
#24.14	Rs1h(-/y)-AAV	-	6	-	+
#7.4	Rs1h(--)	-	10	-	+
#8.1	Rs1h(--)	-	10	-	+
WT1	Rs1h(++)	-	4	-	+
WT2	Rs1h(++)	-	4	-	+
WT3	Rs1h(++)	-	4		+
WT4	Rs1h(++)	-	4	-	, Abb. 61
WT1	Rs1h(++)	-	9	-	+
WT2	Rs1h(++)	-	9	-	+
WT3	Rs1h(++)	-	9	-	, Abb. 61
WT1	Rs1h(++)	-	13	-	+
WT2	Rs1h(++)	-	13	-	+
WT3	Rs1h(++)	-	13	-	, Abb. 61
WT4	Rs1h(++)	-	13	-	+

E. Publikationen

1. Begutachtete Veröffentlichungen

Fogarasi M, **Janssen A**, Weber BHF, Stohr H. Dissection of TIMP3 function. *Matrix Biology*. 2008 Feb. [Epub ahead of print]

Janssen A, Hoellenriegel J, Fogarasi M, Schrewe H, Seeliger MW, Tamm ER, May CA, Weber BHF, Stohr H. Tissue inhibitor of metalloproteases-3 (TIMP3) deficiency leads to abnormal vessel formation in the choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Apr. [Epub ahead of print]

Gehrig A, **Janssen A**, Horling F, Grimm C, Weber BH. The role of caspases in photoreceptor cell death of the retinoschisin-deficient mouse. *Cytogenet Genome Res*. 2006; 115(1):35-44.

Gehrig A, Langmann T, Horling F, **Janssen A**, Bonin M, Walter M, Poths S, Weber BH. Genome-wide expression profiling of the retinoschisin-deficient retina in early postnatal mouse development. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48(2):891-900

Seok H. Min, Laurie L. Molday, Mathias W. Seeliger, Astra Dinculescu, Adrian M. Timmers, **Janssen A**, Felix Tonagel, Naoyuki Tanimoto, Bernhard H. F. Weber, Robert S. Molday, William W. Hauswirth. Prolonged recovery of retinal structure and function after gene therapy in an Rs1h-deficient mouse model of human X-linked juvenile retinoschisis. *Mol Ther*. 2005; 12(4):644-651

Molday LL, Min SH, Seeliger MW, Wu WW, Dinculescu A, Timmers AM, **Janssen A**, Tonagel F, Hudl K, Weber BH, Hauswirth WW, Molday RS. Disease mechanisms and gene therapy in a mouse model for X-linked retinoschisis. *Adv Exp Med Biol*. 2006; 572:283-289

Janssen A, Leonhardt T, Seeliger MW, Weber BHF. Gentherapie. Erhellende Langzeiteffekte am Mausmodell der juvenilen Retinoschisis. *BIOspektrum*. 2006; 6:603-605

Janssen A, Seok H. Min, Laurie L. Molday, Naoyuki Tanimoto, Mathias W. Seeliger, William W. Hauswirth, Robert S. Molday, and Bernhard H.F. Weber. Effect of late-stage therapy on disease progression in rAAV-mediated rescue of photoreceptor cells in the retinoschisin-deficient mouse. *Mol Ther*. 2008; 16(6):1010-1017

Fritsche LG, Loenhardt T, **Janssen A**, Fisher SA, Rivera A, Keilhauer C, Weber BHF. Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA. *Nature Genet*. 2008 May. [Epub ahead of print]

2. Kongressbeiträge

Janssen A, Fogarasi M, Bathke B, Weber BHF. Gene-targeted mouse models Timp3(S156C), Timp3(S156M), Timp3(-/-) to investigate the role of TIMP3 in angiogenesis. Poster presentation, GfH-Kongress 2005

Gehrig A, **Janssen A**, Grimm C, Samardzija M, Weber BHF. Analysis of the molecular events underlying the early degeneration of photoreceptors in a mouse model of X-linked juvenile retinoschisis. Poster presentation, GfH-Kongress 2005

Weber BHF, **Janssen A**, Schrewe H, Seeliger M, Molday RS, Min SH, Hauswirth WW. Rescue of photoreceptor degeneration in a genetic mouse model of X-linked juvenile retinoschisis. Selected oral presentation, GfH-Kongress 2005

Janssen A, Schrewe H, Tonagel F, Seeliger M, Tamm E, May A, Weber BHF. Abnormalities of vessel formation in a mouse model of Timp3-deficiency. Poster presentation, Pro Retina Potsdam Meeting 2005

Weber BHF, **Janssen A**, Schrewe H, Seeliger M, Molday RS, Min SH, Hauswirth WW. Rescue of photorecinn an genetic mouse model of X-linked juvenile retinoschisis. Selected oral presentation, Pro Retina Potsdam Meeting 2005

Janssen A, Seeliger M, Haverkamp S, Molday RS, Min SH, Hauswirth WW, Weber BHF. Long-term follow-up of AAV-mediated gene replacement therapy in a mouse model for X-linked juvenile retinoschisis (RS). Poster presentation, GfH-Kongress 2006

Janssen A, Seeliger M, Haverkamp S, Molday RS, Min SH, Hauswirth WW, Weber BHF. Long-term follow-up of AAV-mediated gene replacement therapy in a mouse model for X-linked juvenile retinoschisis (RS). Poster presentation, Pro Retina Potsdam Meeting 2006

Janssen A, Fogarasi M, Heiner S, Seeliger M, Tamm E, May A, Stoehr H, Weber BHF. Timp3-deficient and Timp3-S156C knock-in mice as models to study the role of TIMP3 in VEGF-mediated angiogenesis. Poster presentation, GfH-Kongress 2007

Langmann T, Walczak Y, **Janssen A**, Weber BHF. TLR4- and Egr1-dependent regulatory networks control retinal microglia activationin the mouse model for X-linked juvenile retinoschisis. Poster presentation, GfH-Kongress 2007

F. Lebenslauf

**Andreas Janßen
geb. 13.11.1977 in Kleve, NRW**

	Schule
1984-1988	Grundschule Xanten (NRW)
1988-1994	Realschule Xanten
1994-1997	Wirtschaftsgymnasium Kleve, Abitur
1997-1998	Zivildienst Zivildienst im Altenpflegeheim Kalkar (NRW)
1998-1999	Ausbildung Ausbildung beim Finanzamt Moers (NRW) im gehobenen nichttechnischen Dienst, freiwillige Entlassung aus dem Dienst im zweiten Ausbildungsjahr
11/99 - 05/2001 06/2001 - 02/2004	Studium Biologiestudium, Universität Bayreuth, Vordiplom Biologiestudium, Universität Würzburg, Diplom

Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Zell- und Entwicklungsbiologie,
Humangenetik

Inhalt des Studiums
Vertiefung humangenetischer Methoden in den Bereichen

- DNA-Analyse
- Transkriptionsstudien (qRT-PCR-Analysen)
- Histologie/Immunohistochemie

Thema der Diplomarbeit:

„Untersuchungen zur Transkriptionsaktivität ausgesuchter Signalwege im Aderhaut-/Netzhautkomplex Timp3-defizienter Mäuse“

02/2004 - 2008 beruflicher Werdegang/ Promotion

wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Humangenetik
Regensburg, Arbeitsgruppe Prof. Weber

Thema der Doktorarbeit:

„Untersuchungen zu den molekularen Ursachen der beiden Makulopathien Sorsby Fundusdystrophie und X-gebundene juvenile Retinoschisis“

Kooperationen mit Prof. Dr. Tamm, Institut für Anatomie,
Universität Regensburg; Prof. Dr. May, Institut für Anatomie,
Universität Dresden; Prof Dr. Seeliger, Universitätsaugenklinik
Tübingen, PD Dr. Schweda, Institut für Physiologie, Universität
Regensburg und PD Dr. Haverkamp, MPI für Hirnforschung
Frankfurt am Main

- | | |
|---------------------------|---|
| 04/05 2000 | Praktika im Studium
Praktikum am MPI für Molekulare Physiologie Dortmund (NRW) |
| 01/2001 - 05/ 2003 | Studentische Hilfskraft am Institut für Humangenetik Prof. Weber,
Universität Würzburg |