

Molekulare Charakterisierung der Funktion von Norrin in der Netzhaut des Säugetiers



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der naturwissenschaftlichen Fakultät III
-Biologie und Vorklinische Medizin-
der Universität Regensburg

Durchgeführt am Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Roswitha Seitz
im März 2010

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Ernst R. Tamm

Promotionsgesuch eingereicht am 23. Februar 2010

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Richard Warth

1. Gutachter: Prof. Dr. Ernst Tamm

2. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

3. Prüfer: Prof. Dr. Armin Kurtz

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Norrin - Das <i>Norrie Disease Pseudoglioma</i> Genprodukt.....	1
1.2 Okulärer Phänotyp des Norrie-Syndroms im Menschen und im Tiermodell.....	3
1.3 Der „Norrin/β-Catenin-Signalweg“	7
2 Zielsetzung der Arbeit.....	10
3 Material und Methoden	11
3.1 Grundausstattung	11
3.2 Materialen und Methoden der Molekularbiologie.....	12
3.2.1 Reagenzien für die Molekularbiologie	12
3.2.2 Oligonukleotide	14
3.2.3 Klonierung des pSNOS-Plasmids	16
3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	17
3.2.5 Expressionsanalysen.....	18
3.2.5.1 Prinzip der Expressionsanalyse mittels konservativer RT-PCR und quantitativer real-time RT-PCR	18
3.2.5.2 RNA-Isolation aus Zellen und Gewebe	19
3.2.5.3 cDNA-Herstellung.....	21
3.2.5.4 Konservative RT-PCR und quantitative real-time RT-PCR	22
3.3 <i>In vitro</i> Versuche	25
3.3.1 Allgemeine Arbeitstechniken, Grundausstattung und Reagenzien in der Zellkultur	25
3.3.2 Verwendete Zelllinien und deren Kulturbedingungen	27

3.3.3 Allgemeine Zellkulturtechniken	28
3.3.4 Zellzahlbestimmung mit der NEUBAUER-Zählkammer	29
3.3.5 Behandlung von Zellen	29
3.3.6 Kultivierung von EBNA-pSNOS-Zellen.....	30
3.3.6.1 Transfektion von Hek-293-EBNA-Zellen mit dem Expressionsvektor pSNOS.....	30
3.3.6.2 Kultivierung von EBNA-pSNOS.....	30
3.3.7 Proliferationsmessungen	31
3.3.8 Bestimmung der Zellviabilität mittels WST-1-Reagenz	32
3.3.9 Migrationsverhalten	33
3.3.10 „Tube Formation“-Angiogenese Assay	35
3.3.11 Kultivierung von Müllerzellen.....	37
3.3.11.1 Isolation und Charakterisierung von Müllerzellen.....	37
3.3.11.2 Herstellen von konditioniertem Müllerzellmedium	38
3.3.12 Differenzierung und Behandlung von RGC-5	38
3.3.13 Luciferase Assay	39
3.4 In vivo Versuche.....	43
3.4.1 Versuchstiere und Tierhaltung.....	43
3.4.2 Gewebepräparation aus Maus und Ratte	43
3.4.3 Intravitreale Injektionen	44
3.4.3.1 Das NMDA-Schadensmodell.....	45
3.4.3.2 Auswertung des Netzhautschadens mittels TUNEL-Assay.....	45
3.4.3.3 Auswertung der Semidünnschnitte.....	46
3.5 Proteinbiochemische Techniken	48
3.5.1 Reagenzien, Geräte und Materialen.....	48
3.5.2 Gewinnung von humanem rekombinanten Norrin.....	50
3.5.2.1 Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinantem Norrin.....	50
3.5.2.2 Protein-Dialyse	50
3.5.2.3 Konzentration und Bioaktivität des isolierten Proteins	51

3.5.3 Isolation von Gesamtprotein aus Zellen und Gewebe mit der RIPA-Methode	51
3.5.4 Isolation von Kernproteinen aus HRMEC	52
3.5.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Assay.....	53
3.5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
3.5.6.1 Silberfärbung der SDS-PAGE	56
3.5.6.2 Blotten auf PVDF-Membranen (Semidry und Dot Blot).....	58
3.5.7 Immunologische Färbemethoden	60
3.5.7.1 Antikörper	60
3.5.7.2 Nachweis spezifischer Proteinbanden im Western Blot und Dot Blot	61
3.5.7.3 Coomassie-Färbung als Ladungskontrolle für Dot Blots	63
3.5.7.4 Immunzytochemische Färbungen	64
3.6 Histologische Arbeitstechniken	66
3.6.1 Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten	67
3.6.2 Einbettung in Epon und Herstellung von Semidünnschnitten	68
3.6.3 Histologische Färbungen	68
3.7 Mikroskopie	69
3.8 Auswertung und Statistik	69
4. Ergebnisse	70
4.1 Expression, Aufreinigung und Untersuchung der biologischen Aktivität von rekombinantem humanen Norrin.....	70
4.1.1 Klonierung und Expression von rekombinantem humanen Norrin	70
4.1.2 Aufreinigung von rhNorrin aus dem Zellüberstand von EBNA-pSNOS Zellen.....	72
4.1.3 rhNorrin aktiviert den klassischen Wnt/β-Catenin-Signalweg in mikrovaskulären Endothelzellen.....	74

4.2 Die angiogene Wirkung von Norrin auf mikrovaskuläre Endothelzellen.....	77
4.2.1 Norrin induziert die Proliferation von mikrovaskulären Endothelzellen	77
4.2.2 Norrin vermittelt seinen proliferativen Effekt in HRMEC über die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalweges	79
4.2.3 Norrin steigert die Viabilität von Endothelzellen <i>in vitro</i>.....	79
4.2.4 Norrin induziert die Migration von mikrovaskulären Endothelzellen	81
4.2.4.1 Norrin stimuliert die Migration von HDMEC <i>in vitro</i>	82
4.2.4.2 Norrin stimuliert die Migration von HRMEC <i>in vitro</i>	83
4.2.5 Norrin fördert die Bildung kapillarähnlicher Strukturen <i>in vitro</i> („Tube Formation“).....	85
4.3 Wirkung von Norrin bei akutem Netzhautschaden	88
4.3.1 NMDA induziert eine konzentrationsabhängige Schädigung retinaler Ganglienzellen	88
4.3.2 Norrin vermindert die NMDA-induzierte Apoptose retinaler Ganglienzellen	89
4.3.3 Norrin vermindert den NMDA-induzierten exzitotoxischen Verlust von retinalen Ganglienzellen	90
4.3.4 Die Norrin-vermittelte protektive Wirkung auf retinale Ganglienzellen kann durch DKK-1 gehemmt werden	94
4.3.5 Norrin aktiviert den Wnt/β-Catenin-Signalweg in Retinae.....	96
4.3.6 NMDA induziert die Expression von Norrin in der Retina	98
4.3.7 Norrin aktiviert das Lif/Edn2-System der Retina	98
4.3.8 Norrin induziert die Expression neurotropher Faktoren in der gestressten Retina.....	101
4.3.9 Die Norrin-induzierte Expression neurotropher Faktoren ist von zusätzlichen Stress-Signalen abhängig	104
4.4 Die Wirkung von Norrin auf Müllerzellen.....	106

4.4.1 Isolierung und Charakterisierung von Müllerzellen aus der Retina von Ratten	106
4.4.2 Norrin aktiviert den Wnt/β-Catenin-Signalweg in Müllerzellen	108
4.4.3 Norrin induziert die Expression neurotropher Faktoren in Müllerzellen	110
4.4.4 Konditionierter Zellüberstand der Müllerzellen wirkt neurotroph auf RGC-5 Zellen	112
4.5 Interaktionen zwischen Transforming Growth Factor-β und Norrin	115
4.5.1 Norrin reduziert die TGF-β1 vermittelte Luciferase-Induktion in MLECs.....	115
4.5.2 Norrin reduziert die von TGF-β1 vermittelte PAI-1-Expression in HRMEC.....	117
4.5.3 Die Hemmung von TGF-β1 durch Norrin wird über den Wnt/β-Catenin-Signalweg vermittelt	117
4.5.4 TGF-β1 reduziert die Norrin-induzierte Proliferation von HRMEC.	118
4.5.5. Kreuzung von βB1-TGF-β1-Mäusen mit βB1-Norrin-Mäusen	120
5 Diskussion	123
5.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem humanen Norrin	123
5.2 Die angiogene Wirkung von Norrin auf mikrovaskuläre Endothelzellen <i>in vitro</i>.....	126
5.3 Neuroprotektive Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen	131
5.4 Die Wechselwirkung zwischen dem Norrin- und dem TGF-β1-Signalweg	136

6 Ausblick.....	139
7 Zusammenfassung.....	142
8 Anhang	144
8.1 Literaturverzeichnis	144
8.2 Allgemeines Abkürzungsverzeichnis	154
8.3 Abkürzungen/Proteinsymbole.....	156
8.4 Tabellenverzeichnis	157
8.5 Abbildungsverzeichnis	158
8.6 Danksagung.....	160
8.7 Erklärung	162

1 Einleitung

1.1 Norrin - Das *Norrie Disease Pseudoglioma* Genprodukt

Das Norrie-Syndrom oder auch Norrie-Warburg-Syndrom wurde zum ersten Mal 1927 von dem dänischen Arzt Gordon Norrie beschrieben. Er charakterisierte eine Form der kongenitalen Blindheit, die im Verlauf der Erkrankung zu einer beidseitigen Atrophie des Augen (*Phthisis bulbi*) führt (Norrie 1927). Das Norrie-Syndrom ist durch eine Fehlentwicklung der Neuroretina und des Glaskörpers gekennzeichnet (Warburg 1968). Das Spektrum der pathologischen Veränderungen ist breit und beinhaltet unter anderem die fehlende Zurückbildung der fotalen hyaloidalen Blutgefäße, Netzhautablösung und die Entwicklung retinaler Pseudotumore (Pseudogliom). Die fortschreitende Netzhautablösung kann im weiteren Verlauf zur Atrophie des Auges führen (Warburg 1975, Berger 1998). In den 60er Jahren beschrieb Warburg zwei weitere Symptome, die mit dem Norrie-Syndrom assoziiert sind. Bei etwa einem Drittel der Erkrankungen ist neben der angeborenen beidseitigen Blindheit auch eine geistige Retardierung mit unterschiedlich starker Ausprägung und/oder eine progressive sensorisch-neurale Taubheit zu beobachten (Warburg 1968). Insgesamt ist aber das Auge das primär betroffene Organ bei dieser seltenen Erkrankung.

Anfang der 90er Jahre konnte der für das Norrie-Syndrom verantwortliche Genlokus (Xp11.4-p11.2) identifiziert werden. Verschiedene Mutationen im *Norrie Disease Pseudoglioma* (*NDP*)-Gen sind ursächlich für diese X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Die Variabilität im Mutationsspektrum des *NDP*-Gens spiegelt sich auch in den unterschiedlichen Ausprägungen des Norrie-Syndroms wider (Berger *et al.* 1992, Meindl *et al.* 1992). Neben dem Norrie-Syndrom sind drei weitere Augenerkrankungen bekannt, die mit Mutationen im *NDP*-Gen assoziiert sind: die familiäre exsudative Vitreopathie (FEVR), Morbus Coats und Frühgeborenenretinopathie. Bei allen vier Erkrankungen wird eine fehlerhafte Entwicklung der retinalen Blutgefäße beobachtet (Chen *et al.* 1993, Black *et al.* 1999, Rehm *et al.* 1997, Shastry *et al.* 1997).

Die genaue Funktion des *NDP*-Genprodukts Norrin ist bis heute allerdings weitestgehend ungeklärt (Ortholog der Maus *Ndph*). Humanes Norrin ist ein 133 Aminosäuren (AS) umfassendes Polypeptid, murines Norrin dagegen besteht aus 131 AS. Die Proteinsequenzen von humanem und murinem Norrin sind zu ca. 94 % identisch (Berger *et al.* 1996).

Erste Erkenntnisse über eine mögliche Funktion und Lokalisation lieferten 3D-Strukturanalysen des Proteins. Die Aminosäuresequenz von Norrin lässt auf zwei charakteristische Domänen schließen: eine 24 Aminosäuren umfassende N-terminale Signalsequenz und eine cysteinreiche Domäne am C-Terminus (Meindl *et al.* 1992).

Das Vorhandensein eines Signalpeptids legte die Vermutung nahe, dass es sich bei Norrin um ein sezerniertes Protein handelt, was auch bestätigt werden konnte (Perez-Vilar und Hill 1997, Smallwood *et al.* 2007). Neben der Sekretion zeigten verschiedene Arbeitsgruppen zudem, dass Norrin an die extrazelluläre Matrix binden kann (Perez-Vilar und Hill 1997, Xu *et al.* 2004, Smallwood *et al.* 2007). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass Norrin ein parakrines Signalmolekül ist.

Am C-Terminus der Norrin-Proteinsequenz befinden sich zahlreiche Cysteinreste. Computeranalysen legen eine Tertiärstruktur für Norrin nahe, ähnlich der des Transforming Growth Factor- β und anderer Wachstumsfaktoren mit Cystein-Knot-Motiv (Meitinger *et al.* 1993). Die Zuteilung von Norrin zu den Cystein-Knot-Wachstumsfaktoren wird dadurch bekräftigt, dass viele pathogene Mutationen im *NDP*-Gen im Bereich konservierter Cysteinreste lokalisiert sind. Diese Mutationen könnten mit der Zerstörung des Cystein-Knots einhergehen und somit für einen Funktionsverlust von Norrin verantwortlich sein (Meindl *et al.* 1992, Drenser *et al.* 2007).

Durch Northern Blot und RT-PCR Analysen konnte die Expression von Norrin in der Retina, im Gehirn, im Innenohr und den Gonaden von Mäusen lokalisiert werden (Berger *et al.* 1996, Hartzler *et al.* 1999, Rehm *et al.* 2002, Luhmann *et al.* 2005). Da Mutationen im *NDP*-Gen primär das Auge bzw. die Retina betreffen, wurde in den letzten Jahren der Frage nachgegangen, welche Zellen der Netzhaut Norrin hauptsächlich bilden. Mittels *in situ* Hybridisierungen wurde die für Norrin kodierende mRNA in den retinalen Ganglienzellen, sowie in der inneren und der äußeren Körnerschicht nachgewiesen (Berger *et al.* 1996, Hartzler *et al.* 1999). Dagegen zeigten Ye *et al.* mit Hilfe von Knockin-Mäusen und eines Reportergens, das in das Exon2 des *Ndph*-Gens kloniert wurde, dass Norrin in der Mausretina hauptsächlich in den Zellen der Müller Glia, nicht aber in retinalen Ganglienzellen oder Astrozyten gebildet wird (Ye *et al.* 2009).

1.2 Okulärer Phänotyp des Norrie-Syndroms im Menschen und im Tiermodell

Mutationen des *NDP*-Gens stehen immer im Zusammenhang mit einer fehlerhaften Entwicklung der retinalen Blutgefäße. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Norrin einen wichtigen Einfluss auf die Angiogenese in der Netzhaut hat (Chen *et al.* 1993, Rehm *et al.* 1997, Riveiro-Alvarez *et al.* 2005).

Das retinale Gefäßsystem entwickelt sich bei Menschen und Mäusen prinzipiell ähnlich. Allerdings ist die Entwicklung beim Menschen bei der Geburt bereits abgeschlossen, bei der Maus läuft sie dagegen zwischen den postnatalen Tagen 1 und 20 ab (Connolly *et al.* 1988, Fruttiger 2002). Beim Mensch, wie bei der Maus, beginnt die Ausbildung des primären retinalen Gefäßnetzes an der Eintrittsstelle des *Nervus opticus*. Von hier aus wachsen Blutgefäße zwischen der Ganglienzellschicht und der Nervenfaserschicht in die Peripherie aus, bis sie die gesamte Netzhaut umspannen. Die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und der von Astrozyten sezernierte pro-angiogene Wachstumsfaktor Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) regulieren die Ausbildung dieses primären Gefäßplexus (Stone *et al.* 1995, Neufeld *et al.* 1999). Aus dem primären Gefäßnetz wachsen in zwei Schritten die tiefen retinalen Gefäße aus. Das erste tiefen Kapillarnetz verzweigt sich in die äußere plexiforme Schicht der Netzhaut. Im zweiten Schritt der Entwicklung der tiefen Gefäße wachsen Kapillaren in die innere plexiforme Schicht ein (Connolly *et al.* 1988, Fruttiger 2002).

Um die Funktion von Norrin genauer untersuchen zu können, wurde von Berger *et al.* eine Norrin-defiziente Maus (*Ndp*^{y/-}) etabliert, bei der das murine Ortholog des *NDP*-Gens, das *Norrie Disease Pseudoglioma Homolog* (*Ndph*), mit Hilfe gezielter homologer Rekombination ausgeschaltet wurde. Untersuchungen der *Ndp*^{y/-}-Maus deuten darauf hin, dass Norrin eine essentielle Funktion bei der Entwicklung von retinalen Gefäßen hat. *Ndp*^{y/-}-Mäuse entwickeln zwar den primären Gefäßplexus, zeigen aber einen Verlust des tiefen Kapillarbetts in der Netzhaut (Richter *et al.* 1998, Abb. 1B, C). Der Verlauf des Elektroretinogramms (ERG) von *Ndp*^{y/-}-Mäusen zeigte, dass der Phänotyp der Tiere letztlich zu einem Funktionsverlust der Netzhaut und damit zur Erblindung der Tiere führt (Ruether *et al.* 1997).

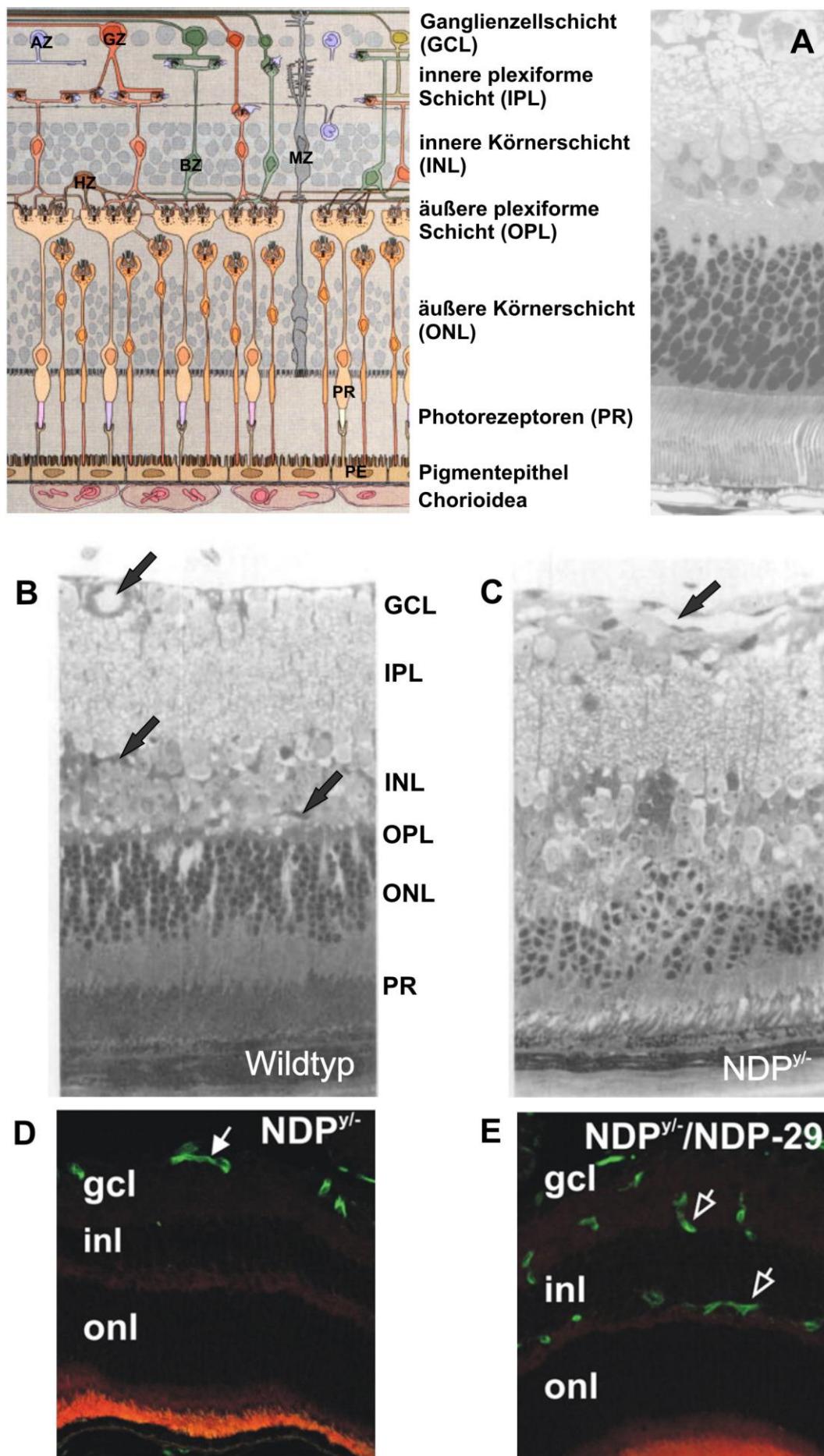


Abb. 1: Okulärer Gefäßphänotyp der *Ndp^{y/-}*-Maus. A: Übersicht über den Aufbau der Retina beim Säugetier. Modifiziert nach Prof. Dr. Wagner, Tübingen. B, C: Vergleichende Histologie von erwachsenen Wildtyp- und *Ndp^{y/-}*-Mäusen. *Ndp^{y/-}*-Mäuse zeigen neben einem Verlust der tiefen retinalen Gefäße in der inneren und äußeren plexiformen Schicht auch eine reduzierte Anzahl an retinalen Ganglienzellen (Pfeile: Blutgefäße). Nach Richter *et al.* 1998. D, E: Lectinfärbung der retinalen Blutgefäße (grün). Durch die Kreuzung der *Ndp^{y/-}*-Mäuse mit den β B1-Norrin (NDP-29) Überexpressionsmäusen wachsen wieder Blutgefäße in die tiefen Schichten der Retina ein (Pfeile). Nach Ohlmann *et al.* 2005. AZ=Amakrinzelle, BZ=Bipolarzelle, GZ=Ganglienzelle, HZ=Horizontalzelle, MZ=Müllerzelle, PR=Photorezeptorzelle.

Ein weiteres Tiermodell an dem die Funktion von Norrin untersucht wurde, ist die β B1-Norrin-Maus, die ektopes Norrin unter der Kontrolle des linsenspezifischen β B1-Crystallin-Promoters exprimiert (Ohlmann *et al.* 2005). Diese Mäuse zeigen ein gesteigertes Gefäßwachstum in der *Tunica vascularis lentis*, die die Linse während ihrer Entwicklung umgibt und sie versorgt. Auch konnte der Gefäßphänotyp von *Ndp^{y/-}*-Mäusen durch deren Kreuzung mit β B1-Norrin Mäusen vollständig aufgehoben werden. Die Gefäße wuchsen wieder in die tiefen Schichten der Netzhaut ein und bildeten ein normales retinales Kapillarbett (Ohlmann *et al.* 2005, Abb. 1D, E). Interessanterweise wurde hier keine abnorme Vaskularisierung der Netzhaut beobachtet, wie es bei Überexpression anderer angiogener Faktoren wie VEGF oft der Fall ist (Pierce *et al.* 1995). Neben der Wiederherstellung eines retinalen Gefäßsystems zeigten die doppeltransgenen Tiere ein nahezu normales ERG. Dies deutet darauf hin, dass auch die Funktion der Netzhaut wiederhergestellt werden konnte (Ohlmann *et al.* 2005). Insgesamt liefert die aktuelle Datenlage Hinweise auf eine potente angiogene Funktion von Norrin.

Bemerkenswerterweise deutet der Phänotyp von *Ndp^{y/-}*-Mäusen darauf hin, dass Norrin neben seiner angiogenen Wirkung auch eine neuroprotektive oder neurotrophe Wirkung für retinale Ganglienzellen haben könnte. So zeigen *Ndp^{y/-}*-Mäuse neben dem schon beschriebenen Gefäßphänotyp auch neuronale Veränderungen wie eine fehlerhafte Anordnung der inneren nukleären Schicht, der Photorezeptoren oder einen Verlust der Außensegmente. Vor allem aber konnte ein progressiver Verlust an retinalen Ganglienzellen beobachtet werden (Berger *et al.* 1996, Richter *et al.* 1998). Diese Befunde korrelieren mit Daten der histologischen Untersuchung einer Biopsie eines sechs Monate alten Säuglings mit Norrie-Syndrom.

So beschrieben Schröder *et al.* neben einer vaskulären Fehlbildung auch einen massiven Verlust an retinalen Ganglienzellen (Schröder *et al.* 1997).

Diese Befunde könnten mehrere Ursachen haben. Prinzipiell könnte der Verlust an Neuronen in der *Ndp^{Y/+}*-Netzhaut durch die mangelnde Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff aufgrund der fehlenden intraretinale Kapillaren erklärt werden. Dagegen spricht jedoch, dass die Zellen der inneren Körnerschicht nur sehr vereinzelt degenerieren, obwohl gerade dieses Areal kaum von Blutgefäßen erreicht wird. Die retinalen Ganglienzellen jedoch, die unmittelbaren Kontakt mit den Gefäßen auf der Netzhautoberfläche haben, die in *Ndp^{Y/+}*-Netzhaut noch angelegt werden, und daher gut versorgt sein sollten, sind aber die primär betroffenen Neurone, die degenerieren. Was ebenfalls gegen eine mangelnde Versorgung als Grund für neuronale Degeneration in der Retina spricht, ist die Beobachtung, dass auch teilweise die Photorezeptoren betroffen sind. Diese werden nicht durch das tiefe Kapillarbett mit Nährstoffen versorgt, sondern von der Choroidea. Die Choroidea der *Ndp^{Y/+}*-Tiere zeigt jedoch im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen keine Veränderungen in der Struktur oder der Funktionalität (Richter *et al.* 1998). Eine weitere Ursache für den neuronalen Phänotyp der *Ndp^{Y/+}*-Retina könnten Toxine sein, die in die Netzhaut gelangen, da hier die Gefäße, die der Ganglienzellschicht aufliegen, fenestriert sind. Durch diese pathologisch erhöhte Permeabilität der Gefäße kann die Blut-Retina-Schranke nicht aufrechterhalten werden und Schadstoffe können ungehindert in das Gewebe eindringen. Dies könnte erklären, warum vermehrt retinale Ganglienzellen degenerieren (Richter *et al.* 1998). Für eine neuroprotektive Funktion von Norrin sprechen auch Beobachtungen an β B1-Norrin-Mäusen in denen die Anzahl an retinalen Ganglienzellen pro 100 μm Retina signifikant erhöht ist, verglichen mit den Wildtyp-Geschwistertieren. Zusätzlich kann durch die Kreuzung der Überexpressionsmäuse mit den *Ndp^{Y/+}*-Mäusen deren Verlust an retinalen Ganglienzellen aufgehoben werden. Doch auch diese Beobachtungen sprechen nicht eindeutig für einen protektiven Effekt von Norrin. Die Retina der β B1-Norrin Tiere bzw. deren Ganglienzellschicht ist deutlich verdickt. Dies könnte jedoch ein Nebeneffekt sein, der durch die verkleinerten Augen der transgenen Tiere hervorgerufen wird (Ohlmann *et al.* 2005).

Zusammenfassend deuten mehrere Beobachtungen darauf hin, dass eine neurotrophe oder neuroprotektive Funktion von Norrin durchaus möglich ist, eine experimentelle Klärung dieser Frage steht allerdings aus und war Ziel dieser Arbeit.

1.3 Der „Norrin/β-Catenin-Signalweg“

Bislang sind vier unterschiedliche Augenerkrankungen bekannt, die mit Mutationen im *NDP*-Gen assoziiert sind. Diesen Erkrankungen ist gemein, dass sie mit einer fehlerhaften retinalen Angiogenese einhergehen. Eine davon ist die familiäre exsudative Vitreoretinopathie (FEVR). FEVR ist eine genetisch sehr heterogene Erkrankung, bei der die Blutgefäße der peripheren Netzhaut unvollständig ausgebildet sind. Neben X-chromosomal rezessiven Erbgängen, die auf Mutationen im *NDP*-Gen zurückzuführen sind, wird diese Erkrankung auch autosomal-dominant vererbt. Hierbei ist FEVR mit Mutationen im Frizzled4 (*Fzd4*)-Gen oder im Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 (*LRP5*)-Gen assoziiert (Chen *et al.* 1993, Robitaille *et al.* 2002, Jiao *et al.* 2004). *LRP5*-, *Fzd4*- und *NDP*-defiziente Mäuse zeigen zudem einen ähnlichen retinalen Gefäßphänotyp (Richter *et al.* 1998, Xu *et al.* 2004, Xia *et al.* 2008).

So zeigt der Vergleich des Phänotyps von *Fzd4*^{-/-}- und *Ndp*^{-/-}-Mäusen, dass beide Linien keine tiefen retinalen Gefäße entwickeln. Zudem ist die Vaskularisierung der *Stria vascularis* und des *Cerebellums* fehlerhaft (Richter *et al.* 1998, Rehm *et al.* 2002, Xu *et al.* 2004).

Wegen der ähnlichen Auswirkungen der Mutationen in den jeweiligen Genen lag die Vermutung nahe, dass die Genprodukte Teil eines gemeinsamen Signalwegs sein könnten. Anhand von Bindungsstudien konnten Xu *et al.* zeigen, dass Norrin mit hoher Affinität an den *Fzd4*-Rezeptor bindet. Im Rahmen dieser Studie wurde zudem gezeigt, dass Norrin zusammen mit *Fzd4* und *LRP5* den kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren kann (Xu *et al.* 2004). Ausführlichere Bindungsstudien zwischen murinem Norrin und den Proteinen *Fzd1*-*Fzd10* ergaben, dass Norrin alleine an *Fzd4* bindet. Da viele extrazelluläre Signalmoleküle die zusätzliche Bindung an Heparin oder Heparansulfat zur Rezeptorbindung/-aktivierung brauchen, wurde zusätzlich der Einfluss von Heparin auf die *Fzd4*/Norrin-Interaktion untersucht. Durch die Zugabe von Heparin konnte die Bindung zwischen *Fzd4* und Norrin um das etwa 10-fache verstärkt werden (Smallwood *et al.* 2007).

Der durch den *Fzd4/LRP5/Norrin*-Komplex aktivierte kanonische Wnt/β-Catenin-Signalweg ist einer von drei bekannten Signalwegen, der durch die Bindung eines Wnt-Lipoproteins an einen Frizzled Transmembranrezeptor aktiviert werden kann. Zentrales Protein in dieser Signalkaskade ist β-Catenin. β-Catenin wird konstitutiv von der Zelle gebildet. Freies zytoplasmatisches β-Catenin wird in einem

Abbaukomplex gebunden, phosphoryliert, ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut. Nach der Bindung eines Wnt-Moleküls an einen Fzd-Rezeptor aktiviert dieser das Protein Dishevelled (Dsh), das den β -Catenin-Abbaukomplex destabilisiert. Als Folge wird β -Catenin nicht mehr abgebaut und kann sich im Zytoplasma anreichern. Freies stabilisiertes zytoplasmatisches β -Catenin transloziert in den Nukleus und reguliert dort zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren verschiedene Zielgene (Gordon und Nusse 2006), Abb. 2).

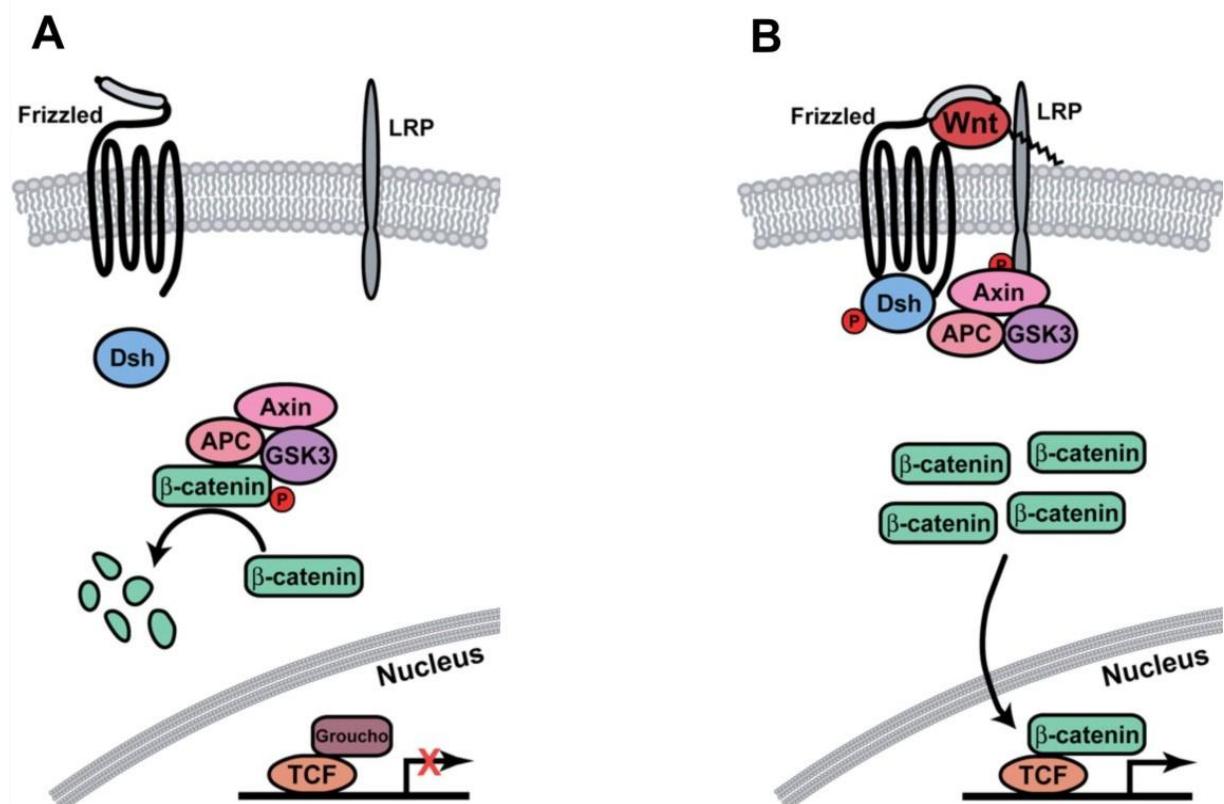


Abb. 2: Vereinfachtes Schema des kanonischen β -Catenin/Wnt-Signalwegs. A: β -Catenin wird konstitutiv gebildet, im Abbaukomplex festgehalten und kontinuierlich für den Abbau im Proteasom markiert. B: Wird ein Frizzled-Rezeptor durch die Bindung seines Liganden aktiviert, wird der Abbaukomplex zum Rezeptor rekrutiert. Freies β -Catenin kann sich im Zytosol ansammeln und letztlich in den Zellkern translozieren. Nach Gordon und Nusse 2006.

Die Wnt-Signalwege haben bei unterschiedlichsten Entwicklungsvorgängen und physiologischen Prozessen eine Schlüsselrolle inne, weshalb sie selbst streng reguliert werden. Modulatoren der Wnt-Signale sind zum Beispiel die Proteine der Dickkopf (DKK) Familie. Bislang ist nur die Rolle von DKK-1 weitestgehend geklärt. DKK-1 ist ein Ligand für die Fzd-Kozeptoren LRP5/6. Durch die Bindung von

DKK-1 an LRP5/6 leitet es dessen Internalisierung ein. Dadurch wird die Bildung eines aktiven LRP5/6-Fzd-Wnt-Signalkomplexes verhindert. Letztlich wird durch die Bindung von DKK-1 an LRP5/6 spezifisch der kanonische Wnt/β-Catenin-Signalweg gehemmt, ohne weitere Wnt/Fzd-vermittelte Signale zu beeinflussen (Mao *et al.* 2001, Zorn 2001). Die Mechanismen der anderen Mitglieder der DKK-Familie (DKK-2, -3 und -4) sind noch weitestgehend ungeklärt. DKK-2 und DKK-3 scheinen aber keine Antagonisten, sondern Synergisten des Wnt/β-Catenin-Signalwegs zu sein (Wu *et al.* 2000, Nakamura *et al.* 2007).

Neuere Untersuchungen identifizierten Tetraspanin12 (TSPAN12) als eine weitere Komponente des Norrin-Rezeptorkomplexes. Die Familie der TSPANs sind Vier-Transmembran-Proteine. Untersuchungen an verschiedenen Mitgliedern dieser Proteinfamilie deuten darauf hin, dass diese TSPAN-angereicherte Mikrodomänen (TEMs) in der Plasmamembran bilden, die als Signalplattform dienen. Junge *et al.* konnten zeigen, dass die Anwesenheit von TSPAN spezifisch den Norrin/β-Catenin-Signalweg verstärkt, ohne den Wnt/β-Catenin-Signalweg zu beeinflussen. Zudem zeigt die TSPAN12-defiziente (*TSPAN12*^{-/-}) Maus einen ähnlichen okulären Phänotyp, wie dies bereits für *LRP5*^{-/-}, *Ndp*^{Y/Y}- und *Fzd4*^{-/-}-Mäuse beschrieben wurde (Junge *et al.* 2009). Zusätzlich wurde kürzlich eine Mutation im TSPAN12 Genlocus beschrieben, die mit FEVR in Verbindung steht. Dies unterlegt den Zusammenhang von TSPAN12 mit dem Fzd4/LRP5/Norrin-Signalkomplex (Poulter *et al.* 2010).

2 Zielsetzung der Arbeit

Der Phänotyp des Norrie-Syndroms und die Untersuchungen an *Ndp^Y*- und β B1-Norrin-Mäusen deuten auf eine angiogene Wirkung von Norrin hin. Allerdings konnte diese Hypothese bislang nicht direkt bestätigt werden. Durch die Etablierung eines Expressionssystems zur Produktion und Isolation von rekombinantem humanem Norrin sollte zunächst das angiogene Potential von Norrin *in vitro* durch Experimente an mikrovaskulären Endothelzellen untersucht werden.

Das nächste Ziel der Arbeit war es, einer möglichen neuroprotektiven Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen nachzugehen und diese *in vitro* und *in vivo* zu analysieren.

Schließlich sollte, aufgrund der postulierten Strukturähnlichkeiten zwischen TGF- β 1 und Norrin, der Frage nachgegangen werden, ob Interaktionen zwischen beiden Signalmolekülen bestehen.

Im Einzelnen wurden folgende Ziele verfolgt:

- 1.) Die Etablierung eines eukaryontischen Systems zur Expression und Isolation von humanem rekombinantem Norrin.
- 2.) Die Untersuchung des angiogenen Potentials von humanem rekombinantem Norrin *in vitro*.
- 3.) Die Untersuchung des neuroprotektiven Potentials von humanem rekombinantem Norrin *in vitro* und *in vivo*.
- 4.) Untersuchung der Wechselbeziehung zwischen Norrin und TGF- β 1 durch *in vitro* und *in vivo* Experimente.

3 Material und Methoden

3.1 Grundausstattung

Materialien/Geräte	Bezugsquelle
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Glaswaren	Schott, Roth, VWR
Handschuhe Latex	Roth, Karlsruhe
Handschuhe Nitrile	VWR, Darmstadt
Inolab pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
Memmert Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Giessen
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA
Multi-Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0 ml	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pipetman Pipetten	Gilson, Den Haag, Niederlande
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht
Pipettierhilfe Macroman™	Gilson, Den Haag, Niederlande
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Kelheim
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Sunrise-Basic ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH, Grodig, Österreich
Systec V75 Autoklav	Systec GmbH, Wettenburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 1: Grundausstattung

3.2 Materialen und Methoden der Molekularbiologie

3.2.1 Reagenzien für die Molekularbiologie

Reagenzien	Bezugsquelle
10 x PCR-Puffer	Bioline, Luckenwalde
Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Borat (Natrumtetraborat)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
DNA-Standards	New England Biolabs, Frankfurt
dNTPs	Bioline, Luckenwalde
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ficoll	Serva, Heidelberg
Fluorescein	Qiagen, Hilden
Hot_start Taq	Qiagen, Hilden
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad, München
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (25 mM)	Qiagen, Hilden
Microseal® „B“ Film	Biorad, München
PCR Plates, 96 Well iCycler IQ	Biorad, München
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAmp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
SYBR-Green I	Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase	Bioline, Luckenwalde
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
TRIzol®-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Wasser Rotisolv (RNase-frei)	Roth, Karlsruhe

Xylencyanol FF	Roth, Karlsruhe
Materialien/Geräte	Bezugsquelle
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nürnbrecht
Elektrophoresekammer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
IQ5 Multicolor Real-time PCR Detection System + iCycler	BioRad, München
Mastercycler gradient, personal	Eppendorf, Hamburg
Power Supply	Consort, Turnhout, Belgien
Zellschaber	Sarstedt, Nürnbrecht

Tabelle 2: Reagenzien, Materialien und Geräte der Molekularbiologie

3.2.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotidprimer wurden über die Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die für die Klonierung des pSNOS Vektors und für die konservative RT-PCR benötigten Primer wurden mit Hilfe des Programms *Vector NTI* entworfen.

Die in der quantitativen real-time RT-PCR eingesetzten Primer wurden mit Hilfe des Roche Applied Science *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* ermittelt.

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
Klonierung			
Norrin-cDNA	Human	fw	CCTCCCTCTGCTGTTCTTCT
		rev	CAGTCGCTGGCTGTGAGTA
Norrin-HindIII/Xhol	Human	fw	GTCGAAGCTTAAACGGACAGCTCATTCA
		rev	ATAATG
			GGTACTCGAGAGGAATTGCATTCTCGCA
konservative RT-PCR			
β-Actin	Rattus norvegicus	fw	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA
		rev	CTCCTTAATGTCACGATTTC
Carboanhydrase	Rattus norvegicus	fw	ACTCCCAGGACTTGCAGTG
		rev	GAGTGGTCAGAGAGGCCAGGA
GFAP	Rattus norvegicus	fw	GAGAGGGACAATCTCA
		rev	TGTGAGGTCTGCAAACATTGG
Glutamin Synthetase	Rattus norvegicus	fw	TGAACAAAGGCATCAAGCAG
		rev	CCTGTTCCATTCCAAACCAG
Vimentin	Rattus norvegicus	fw	AGGTGGATCAGCTCACCAAT
		rev	TTGGCAGCCACACTTCATA
quantitative real-time RT-PCR			
BDNF	Mus musculus	fw	AGTCTCCAGGACAGCAAAGC
		rev	TGCAACCGAAGTATGAAATAACC
FGF-2	Mus musculus	fw	CGGCTCTACTGCAAGAACG
		rev	TTTCTTGTCAACCTCTGGCTGTA
CNTF	Mus musculus	fw	TTGATTCCACAGGCACAAAA
		rev	CCCTGCCTGACTCAGAGGT
Edn2	Mus musculus	fw	ACCTCCTCCGAAAGCTGAG
		rev	TTTCTTGTCAACCTCTGGCTGTA
GAPDH	Mus musculus	fw	TGTCCGTCGTGGATCTGAC
		rev	CCTGCTTCACCACCTCTTG
GFAP	Mus musculus	fw	ACAGACTTCTCCAACCTCCAG
		rev	CCTTCTGACACGGATTGGT
LEDGF	Mus musculus	fw	GGCCAGCAGTAAGACAAAGC
		rev	TGAAGTCTGCCGACCTAGTTAT
Lif	Mus musculus	fw	AAACGGCCTGCATCTAAGG
		rev	AGCAGCAGTAAGGGCACAAT

Norrin	Mus musculus	fw	CCCACTGTACAAATGTAGCTCAA
		rev	AGGACACCAAGGGCTCAGA
VEGF120	Mus musculus	fw	GGAGAGATGAGCTTACAGCA
		rev	CTGAACAAGGCTCACAGTCATTT
VEGF164	Mus musculus	fw	GGAGAGATGAGCTTACAGCA
		rev	CCTTGGCTTGTACATTTTCT
BDNF	Rattus norvegicus	fw	AGCGCGAATGTGTTAGTGGT
		rev	GCAATTGTTGCCTCTTTTCT
FGF-2	Rattus norvegicus	fw	CGGTACCTGGCTATGAAGGA
		rev	GCGTTCAAAGAAGAAACACTCTT
Brn3b	Rattus norvegicus	fw	CAGCAGTCCAGCAGCAGT
		rev	CATCCAGACCGGCCGAATA
CD31	Rattus norvegicus	fw	TGGATAATTGCCACTCTCACC
		rev	TTACCCGACAGGATGGAGAT
CNTF	Rattus norvegicus	fw	GACCTGACTGCTCTATGGAATCT
		rev	GCCTGGAGGTTCTCTTGGGA
Cyclophilin A	Rattus norvegicus	fw	AGCACTGGGGAGAAAGGATT
		rev	CCATTATGGCGTGTGAAGTC
Edn2	Rattus norvegicus	fw	GTGCCACCTCTGCCATC
		rev	CCCTGGCTACTTGAGGTGAC
GDNF	Rattus norvegicus	fw	CTAAGATGAAGTTATGGGATGTCG
		rev	CTTCGAGAAGCCTCTTACCG
Grm6	Rattus norvegicus	fw	CGCAACTAGTCATCACCTTCG
		rev	CCCCAGCCATGCTATCAC
Iba1	Rattus norvegicus	fw	CCGAGGAGACGTTAGTTACTC
		rev	TGGCTTCTGGTGTCTTGT
LEDGF	Rattus norvegicus	fw	CAAGCAGGAGGAACAAATGG
		rev	TTCTGGCTCTTCATC
Lif	Rattus norvegicus	fw	TGCCAATGCCCTCTTATTT
		rev	CCGATACAGCTGACCAACT
Opsin	Rattus norvegicus	fw	CCATCTACAACCCAATCATCTACA
		rev	CGGCAAGAACCCACTGGGAG
PEDF	Rattus norvegicus	fw	GGACTCTGATCTCAACTGCAAG
		rev	AAGTTCTGGGTACCGTCAG
Syntaxin	Rattus norvegicus	fw	CAAAGTTCGCTCCAAGCTAAA
		rev	GACGAGCGGTTCAGACCTT
RPL32	Rattus norvegicus	fw	ATCTGTTTGCAGCATCAT
		rev	TTCCGCCAGTTCGCTTA
Tyrosinase	Rattus norvegicus	fw	TACTCAGCCCAGCGTCCTT
		rev	GGCTATTATACTCTTGATCTGCTG
VEGF164	Rattus norvegicus	fw	GCCAGCACATAGGAGAGATGAGC
		rev	CAAGGCTCACAGTGATTTCTGG

Tabelle 3: Liste der verwendeten PCR- und qPCR-Oligonukleotidprimer. fw = forward (vorwärts), rev = reverse (rückwärts)

3.2.3 Klonierung des pSNOS-Plasmids

Die Klonierungsstrategie wurde mit Hilfe des Programms *VektorNTI* von Invitrogen (Karlsruhe) erstellt. Die Plasmide ZeroBlunt®TOPO® und pSeqTag2 wurden ebenfalls von Invitrogen bezogen. Die Sequenzierungen wurden von der Firma Geneart AG (Regensburg) durchgeführt.

Zunächst wurde RNA aus humanen retinalen Pigmentepithel (RPE)-Zellen isoliert und diese mittels RT-PCR mit den Primern Norrin-cDNA-fw und Norrin-cDNA-rev in cDNA umgeschrieben.

Es erfolgte eine Zwischenklonierung in den ZeroBlunt®TOPO®-Vektor mit anschließender Sequenzierung.

Durch eine PCR mit dem Primerpaar Norrin-HindIII/Xhol-fw und Norrin-HindIII/Xhol-rev erfolgte die Amplifikation der Norrin cDNA ohne das endogene Signalpeptid und das Einfügen der Schnittstellen HindIII und Xhol.

Nach dem Verdau des PCR-Produktes und des Vektors pSeqTag2 mit HindIII und Xhol erfolgte die Ligation von beiden (→pSNOS). Nach der Ligation wurde der pSNOS-Vektor sequenziert.

Für die Klonierung wurden folgende Standardprotokolle der Molekularbiologie verwendet:

Verwendete Kits	Wofür
Wizard® PlusSV Minipreps DNA Purification System, Promega	Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten E. coli Bakterien
Endofree™ Plasmid Giga Protocol, Qiagen	Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA zur Transfektion von Hek-293-EBNA-Zellen
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Biosciences	Isolierung der PCR-Produkte aus Agarose Gelen

Transformation von E. coli

Die kompetenten Zellen E. coli wurden von New England Biolabs bezogen (Frankfurt).

200 µl kompetenter Zellen wurden mit 10 µl Ligationsansatz 30 Minuten auf Eis gestellt. Darauf folgte ein zwischen 90 und 120 Sekunden langer Hitzeschock bei 42 °C. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen 45 bis 60 Minuten bei 37 °C geschüttelt und anschließend abzentrifugiert. Nach Entnahme von 900 µl Überstand wurde das Pellet in den verbleibenden 100 µl resuspendiert, auf Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Ligation

Die Ligation wurde mit der T4-Ligase von Promega (Mannheim) durchgeführt. Die Ligation erfolgte für vier Stunden bei 16 °C.

Restriktionsverdau

Alle Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. Die DNA wurde bei 37 °C für ½ - 1 Stunde verdaut.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um die DNA-Fragmente eines Probeverdaus, die Qualität isolierter RNA oder das Produkt einer RT-PCR überprüfen zu können, wurde eine Gelelektrophorese in einer horizontalen Elektrophoresekammer durchgeführt.

Für das Gel wurde 1 g Agarose durch Aufkochen in einer Mikrowelle in 100 ml 1x TBE-Puffer vollständig gelöst und im Anschluß auf ca. 60 °C abgekühlt. Vor dem Gießen des Gels wurden 5 µl einer 0,01 %-igen Ethidiumbromid-Lösung zum Ansatz gegeben. Sobald das Gel ausgehärtet war, wurde die Elektrophoresekammer mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt, so dass das Gel gerade bedeckt war.

Die zu untersuchenden Proben wurden mit 4x Probenpuffer gemischt und in die Taschen des Gels geladen.

Die Elektrophorese wurde 30-60 Minuten (je nach Fragmentgröße) mit einer Spannung von 130 V durchgeführt. Durch das Bromphenolblau im Probenpuffer konnte die Wanderstrecke der Proben abgeschätzt werden. Nach Auftrennung der DNA oder RNA wurde das Gel aus der Apparatur entnommen und unter UV-Bestrahlung in einem Transilluminator mit einem Kamerasystem dokumentiert.

TBE, 10x	
Tris	108 g
Borat	55 g
EDTA (0,5 M), pH 8	40 ml
in H ₂ O dest. lösen, ad 1 l	
Auftragspuffer, 4x	
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol FF	0,25 % (w/v)
Ficoll	15 % (w/v)

Tabelle 4: Puffer für Gelelektrophorese

3.2.5 Expressionsanalysen

Isolierte Müllerzell-Kulturen wurden mittels vergleichender Expressionsanalyse zur Gesamtretina charakterisiert. Der Einfluss von Norrin, TGF- β 1 und/oder DKK-1 auf die Expression neurotropher Faktoren in Müllerzellen und Retinae wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR untersucht.

3.2.5.1 Prinzip der Expressionsanalyse mittels konservativer RT-PCR und quantitativer real-time RT-PCR

Expressionsanalysen wurden mittels konservativer RT-PCR und quantitativer real-time RT-PCR durchgeführt. Bei beiden Methoden wird *complementary DNA* (cDNA), die durch das Enzym reverse Transkriptase aus mRNA synthetisiert wurde, als Ausgangsmaterial für die PCR verwendet.

Bei der konservativen RT-PCR kann man so die Transkription bestimmter Gene in Geweben oder Zellen nachweisen. Hierzu wird mit spezifischen Primern ein zu untersuchendes Transkript mittels eines einfachen PCR-Programms amplifiziert. Die dabei entstehenden Produkte, die etwa 300 - 1000 bp groß sind, werden zur Analyse mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

Bei der quantitativen real-time RT-PCR kann die Expression eines Gens quantifiziert werden. Hierzu wird die exponentielle Vermehrung des PCR-Produktes kontinuierlich, fluoreszenz-basiert gemessen. Ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green I) wird in den entstehenden PCR-Produkten eingelagert und dort durch einen Laser angeregt. Die Intensität der emittierten Fluoreszenz wird über einen Detektor ermittelt. Die Fluoreszenz ist dabei proportional zur vorhandenen DNA-Menge, da sich SYBR-Green ausschließlich in doppelsträngige DNA einlagert und ungebunden nur schwach fluoresziert. Auf diese Weise kann das entstehende Produkt schon während der PCR sichtbar gemacht werden.

Der „cycle-threshold“ (C_T)-Wert gibt den Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz den Hintergrundwert überschreitet. Ab diesem Zyklus kann die exponentielle Zunahme des Produkts beobachtet werden. Der C_T -Wert ist abhängig von der eingesetzten cDNA-Konzentration des untersuchten Gens. Daher kann an Hand des C_T -Wertes eine quantitative Aussage über die ursprünglich eingesetzte mRNA-Menge gemacht werden. Um evtl. entstandene Primerdimere von dem gesuchten Produkt unterscheiden zu können, wird nach der Amplifikation eine Schmelzkurve der Produkte erstellt.

Zur relativen Quantifizierung wird das untersuchte Gen in seiner Expression zu einem Referenzgen ins Verhältnis gesetzt. Als Referenzgen eignen sich „Housekeeping“- oder Referenz-Gene, die sich in ihrem Expressionsniveau möglichst wenig verändern.

3.2.5.2 RNA-Isolation aus Zellen und Gewebe

Für Expressionsanalysen mittels RT-PCR musste die RNA aus HRMEC, Müllerzellen und Retinae isoliert werden. RNA wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi isoliert (Chomczynski und Sacchi 1987). Zum Aufschluss der Zellen und dem Lösen der Zellkomponenten wurde das TRIzol[®]-Reagenz verwendet. Das TRIzol[®]-Reagenz ist eine einphasige Lösung mit Phenol und Guanidinethiohcyanat. Mit Hilfe von Chloroform wird das Homogenat in drei Phasen aufgetrennt. Die RNA wird dann mit Isopropanol aus der wässrigen Phase ausgefällt.

Kurzprotokoll zur RNA-Isolation mit TRIzol®-Reagenz

- 300 µl bzw. 700 µl TRIzol®-Reagenz auf Zellen/Gewebe geben
- Zellen mit Zellschaber ablösen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen. Retinae mit einem Mikrohomogenisator zerkleinern
- 200 µl Chloroform pro ml TRIzol® zugeben, kräftig schütteln
- 20 Minuten auf Eis inkubieren
- 20 Minuten bei 4 °C bei 13200 Upm zentrifugieren
- Wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen
- Wässrige Phase 1:1 mit Isopropanol mischen, kräftig schütteln
- Über Nacht bei -20 °C RNA ausfällen
- 20 Minuten bei 4 °C bei 13200 Upm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 500 µl 70 % Ethanol aufnehmen, kräftig schütteln
- Für 5 Minuten bei 4°C bei 13200 Upm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet je nach Größe in 10 - 20 µl RNase-freiem Wasser lösen, bei -80 °C lagern

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mittels Photometer gemessen. Dazu wurden 2 µl der RNA mit 98 µl RNase-freiem Wasser verdünnt, in eine Küvette überführt und die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die RNA-Konzentration wurde durch die Multiplikation der Extinktion mit dem Methodenfaktor RNA (40 µg/ml) und dem RNA-Verdünnungsfaktor errechnet. Um die Reinheit der RNA bestimmen zu können, wurde die Extinktion bei 260 und 280 nm gegen RNase-freies Wasser ermittelt. Bei einem Wert des Quotienten E_{260}/E_{280} zwischen 1,8 und 2 wurde die RNA als rein betrachtet.

Um die isolierte RNA auf Degradation hin zu überprüfen, wurde 1 µl isolierte Gesamt-RNA auf einem 1 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt.

Die RNA galt als degradationsfrei bzw. geeignet für die weitere Verwendung, wenn die 18S- und 28S-rRNA Svedberg-Banden klar zu erkennen waren und kein RNA-Schmier, als Zeichen fragmentierter RNA, auf dem Gel sichtbar wurde.

War die isolierte RNA ausreichend rein und nicht degradiert, konnte sie für die cDNA-Synthese verwendet werden.

3.2.5.3 cDNA-Herstellung

Mittels reverser Transkription ist es möglich, RNA in cDNA umzuwandeln. In dieser Form sind die Informationen, die ursprünglich auf der RNA gespeichert waren, stabiler konserviert und lassen sich mit PCR-Techniken analysieren. Als Primer wurden oligo-dT-Ketten verwendet, um so hauptsächlich mRNA mit polyA-Schwanz zu transkribieren. Für die Durchführung der cDNA-Synthese wurde das „iScript cDNA Synthese Kit“ verwendet. Dabei kam eine reverse Transkriptase ohne RNase-Aktivität zum Einsatz.

Um DNA-Verunreinigungen der RNA abschätzen zu können, wurden pro RNA-Probe zwei Ansätze, einmal mit reverser Transkriptase (+RT) und einmal ohne reverse Transkriptase (-RT), angesetzt.

Reaktionsansatz	+RT	-RT
0,5 µg RNA	7,5 µl	10 µl
H ₂ O		
5x iScript™ Reaction Mix	2µl	-
iScript™ Reverse Transcriptase	0,5 µl	-

Die reverse Transkription wurde in einem Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Schritt	25 °C	5 min
2. Schritt	42 °C	30 min
3. Schritt	85 °C	5 min
4. Schritt	10 °C	∞

Die cDNA-Synthese erfolgte im 2. Schritt bei 42 °C. Im 3. Schritt wurde die Reverse Transkriptase bei 85 °C inaktiviert. Die fertige cDNA wurde bei -20 °C für RT-PCR-Analysen aufbewahrt.

3.2.5.4 Konservative RT-PCR und quantitative real-time RT-PCR

Durchführung der konservativen RT-PCR

Für die Charakterisierung der isolierten Müllerzellen wurde die Expression verschiedener Retina-spezifischer Transkripte (siehe Tab.1) in den isolierten Zellen mit der Expression in der Gesamtretina der Ratte verglichen.

Hierfür wurde jeweils +RT bzw. -RT pro Ansatz eingesetzt. β -Actin wurde als Ladungskontrolle eingesetzt.

PCR-Programm für die RT-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Schritt	94 °C	2 min
2. Schritt	94 °C	45 sec
3. Schritt	50 °C	45 sec
4. Schritt	72 °C	45 sec
5. Schritt	72 °C	5 min
6. Schritt	10°C	∞

Schritt 2 - 4: 22-27 Zyklen

Durchführung der quantitativen real-time RT-PCR

Mittels quantitativer real-time RT-PCR wurden Expressionsstudien an behandelten HRMEC, Müllerzellen und Retinae durchgeführt. Zudem wurde die Reinheit isolierter Müllerzellen durch vergleichende Expressionsanalysen mit Rattenretina überprüft.

Die quantitative Expressionsanalyse mittels real-time RT-PCR erfolgte in einem *iQ5 Multicolor Realtime-PCR Detection System* mit *iCycler* im 96-Well-Format. Zur Detektion der vom jeweiligen Transkript abgeleiteten dsDNA wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I verwendet.

Für die relative Quantifizierung wurde die cDNA von GNB2L (HRMEC), GAPDH (Retina) oder CypA (Müllerzellen) als Referenz-Gen zur Normalisierung der cDNA-Menge gewählt (Tab.1).

Für jedes Kandidatengen wurden pro Lauf und zu untersuchender cDNA-Probe (+RT) zwei Replikate der Reaktion durchgeführt. Dazu kam eine entsprechende

Reaktion des zugehörigen -RT-Ansatzes, um mögliche DNA-Kontaminationen auszuschließen. Zusätzlich wurde für jedes Primerpaar eine Wasser/Negativkontrolle pipettiert.

Zunächst wurde jede cDNA-Probe (+RT) und zugehöriger -RT-Ansatz mit einer speziellen Master-Mix-Lösung versetzt. Die so entstandenen +RT- und -RT-Ansätze wurden nach einem bestimmten Schema zu je 15 µl in die 96-Loch-Mikrotiterplatte vorgelegt. Im Anschluß wurden je 5 µl eines Primer-Mix, der die spezifischen Primer des zu untersuchenden Gens enthielt, zugegeben.

Master-Mix cDNA-Ansatz (für je 16 Reaktionsansätze)

9 µl	cDNA-Probe (+RT, -RT oder RNase-freies Wasser)
36 µl	10x PCR-Puffer
14,6 µl	MgCl ₂ (25 mM)
3 µl	dNTPs (25 mM)
4,5 µl	Sybr-Green I
0,4 µl	Fluorescein
1,5 µl	Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
201 µl	RNase-freies Wasser

Primer Mix

121 µl	RNase-freies Wasser
2 µl	Primer forward (1 µM)
2 µl	Primer reverse (1 µM)

Die Mikrotiterplatte wurde mit Hilfe einer Klebefolie nach oben hin abgedichtet und in das Gerät eingesetzt. Nach Eingabe des Platten-Pipettierschemas und der PCR-Parameter wurde das PCR-Programm gestartet:

Programm für die real-time PCR		
Schritt	Temperatur	Dauer
1. Schritt (1x)	95 °C	15 min
2. Schritt (40x)	95 °C	10 sec
	60 °C	40 sec
3. Schritt (1x)	95 °C	1 min
4. Schritt (1x)		1 min
5. Schritt (81x)	55 °C	6 sec
	55 °C	
	+0,5 °C je Zyklus (Schmelzkurve)	

Die Amplifikations- bzw. Schmelzdaten wurden mit der *iCycler iQ Optical System Software Vers. 3.0a* erhoben und mit dem Tabellenkalkulationsprogramm *Excel* ausgewertet. Die relative Expression der Transkripte wurde nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet (Livak und Schmittgen 2001).

Hierfür wurden die relativen cDNA Spiegel X des Zielgens auf die C_T -Werte des Referenzgens normalisiert und auf die Menge der Standardbedingung bezogen. Die Formeln für die Berechnung lauten:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Referenzgen}) - C_T (\text{Zielgen}) \quad (1)$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Standardbedingung}) - \Delta C_T (\text{Konditionierte Bedingung}) \quad (2)$$

$$X = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (3)$$

3.3 *In vitro* Versuche

3.3.1 Allgemeine Arbeitstechniken, Grundausstattung und Reagenzien in der Zellkultur

Sowohl die Kultivierung als auch die Behandlung der verwendeten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle verwendeten Kunststoffmaterialien waren steril verpackt. Die genutzten Glaswaren wurden vor Gebrauch autoklaviert und die verwendeten Lösungen und Puffer wurden steril filtriert. Die Herstellung steriler Lösungen und Medien sowie der Wechsel des Mediums und die Behandlung der Zellen wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in speziellen Brutschränken bei konstanter Temperatur und CO₂-Konzentration in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre.

Das Zellkulturmedium wurde, je nach Versuch und Zelllinie, alle zwei bis drei Tage erneuert.

Reagenzien/Medium	Firma
BrdU-Cell-Proliferation-ELISA (colorimetric)	Roche, Mannheim
DMEM 4500	PAA, Pasching, Österreich
DMEM + Glutamax II	PAA, Pasching, Österreich
Ethanol, absolute	Roth, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum	Invitrogen, Karlsruhe
Collagenase A	Sigma, Taufkirchen
Geneticinsulfat G418	Roth, Karlsruhe
Gentamycin (5 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Hygromycin B (50 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Natrium-L-Glutamat	AppliChem, Darmstadt
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Matrigel® (Growth Factor Reduced)	BD Bioscience, Heidelberg
Microvascular Endothelial Cell Growth Medium (MECM)	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe

Supplement Mix für Endothelmedium	PAA, Pasching, Österreich
Trypanblaulösung (0,08 %)	Sigma, Taufkirchen
Trypsin/EDTA (0,05 %)	Invitrogen, Karlsruhe
WST-1 Reagenz (Water Soluble Tetrazolium)	Roche, Mannheim
Material/Geräte	Firma
Neubauer Zählkammer improved	Mäntzel-Gläser, Braunschweig
Deckglas optisch plan für Haemazytometer	Mäntzel-Gläser, Braunschweig
Sunrise-basic ELISA-Reader	Tecan Austria, Grodig, Österreich
Kulturflaschen, Objektträger für die Zellkultur	
Well-Platten	Nunc, Roskilde, Dänemark
Spinnerflaschen	Schott, Mainz
Rotilabo 0,22 µM Spritzenfilter	Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Sarstedt, Nürnbrecht
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Julabo SW20 Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Hera Cell 150 Brutschrank	Heraeus, Hanau
Hera Cell 150 Sterilbank	Heraeus, Hanau
Kryo Einfriergerät	Nunc, Roskilde, Dänemark
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nürnbrecht

Tabelle 5: Reagenzien, Materialien und Geräte der Molekularbiologie

3.3.2 Verwendete Zelllinien und deren Kulturbedingungen

Zelllinien (adhärent)	Bezugsquelle	Zusammensetzung des Kulturmediums/c (CO ₂)
	Verwendung	
Hek-293-EBNA: immortalisierte, embryonale Nierenzellen, die das EBNA-1 Protein des Epstein Barr- Virus konstitutiv exprimieren	Invitrogen, Karlsruhe	500 ml DMEM +GlutaMaxII 25 ml FCS 3 ml Hygromycin B
	Eukaryotisches Expressionssystem	2,5 ml G418 1 ml Gentamycin 7 % CO ₂
Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC, primäre Zellen)	Provitro, Berlin	500 ml MECM 38 ml Supplement-Mix
	Expressionsanalysen, Angiogenese <i>in vitro</i> Experimente	5 ml Penicillin- Streptomycin 5 % CO ₂
Humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen (HRMEC, primäre Zellen)	Cell-Systems, Kirkland, USA	500 ml Microvascular Endothelial Cell Growth Medium 38 ml Supplement-Mix
	Expressionsanalysen, Angiogenese <i>in vitro</i> Experimente	5 ml Penicillin- Streptomycin 100 ng/l Erythromycin 5 % CO ₂
Mink Lung Epethelial Cells (MLEC, immortalisierte Zellen, die stabil mit dem PAI/L-Plasmid transfiziert sind)	Abe <i>et al.</i> 1994	500 ml DMEM + GlutaMaxII 50 ml FCS 2,5 ml G418 7 % CO ₂
	TGFβ-1 sensibler Luciferase Assay	
Müllerzellen aus der Ratte (primäre Zellen)	eigene Isolation	500 ml DMEM + GlutaMax™-II 5 ml L-Glutamin 200mM 5 ml Penicillin/ Streptomycin
	Expressionsanalysen, <i>in vitro</i> Assays	50 ml FCS 5 % CO ₂
retinale Ganglienzellen aus der Ratte (RGC-5, immortalisiert)	Krishnamoorthy <i>et al.</i> 2001	500 ml DMEM + GlutaMaxII 50 ml FCS 5 ml Penicillin/ Streptomycin 5 % CO ₂

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien

3.3.3 Allgemeine Zellkulturtechniken

Passagieren (Splitten)

- Medium absaugen
- Zellen zweimal mit PBS spülen. PBS absaugen
- Zugabe von etwa 1 ml 0,05 % Trypsin/EDTA
- Mikroskopkontrolle!
- Sobald sich die Zellen abrunden und sich von der Oberfläche lösen: Abstoppen der Trypsinierung durch Zugabe von 5 ml serumhaltigem Kulturmedium
- Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt
- 5 Minuten Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 1000 Upm

Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis von 1:3 bis 1:20 auf neue Zellkulturflaschen ausgesät.

Einfrieren und Lagern

Zellen, die sich vorübergehend nicht im Versuch befanden, wurden bis zum späteren Gebrauch eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert, also von der Kulturflasche abgelöst. Nach der Zentrifugation wurde das Medium nahezu vollständig abgesaugt, und die Zellen in 2 ml DMSO-haltigem Einfriermedium (10 % DMSO, 10 % FCS in DMEM 4500) resuspendiert und in Kryoröhrchen pipettiert.

Die Kryoröhrchen wurden in ein Einfriergefäß gegeben und über Nacht bei -80 °C langsam eingefroren (-1 °C/Minute). Zur endgültigen Lagerung wurden die Zellen nach 24 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und unter leichtem Schütteln schnell in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Diese Zellsuspension wurde sofort in ein 15 ml Reaktionsgefäß, in das bereits 5 ml Medium vorgelegt wurden, überführt. Nach kurzem Resuspendieren der Zellen wurde fünf Minuten bei 1000 Upm zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde vollständig abgesaugt, die Zellen anschließend in 10 ml Medium resuspendiert und vollständig in eine T-75 Zellkulturflasche ausgesät.

3.3.4 Zellzahlbestimmung mit der NEUBAUER-Zählkammer

Um eine genaue Kontrolle der Proliferation zu gewährleisten und um für Experimente exakte Zellzahlen vorzugeben, wurden die Zellen vor der Aussaat gezählt, dies erfolgte mittels einer NEUBAUER-Zählkammer.

Von der zu untersuchenden Zellsuspension wurden 25 µl abgenommen und mit gleichem Volumen einer 0,08 %-igen Trypanblaulösung gemischt. Bereits abgestorbene Zellen konnten durch Trypanblau angefärbt werden und gingen nicht mit in die Zählung ein.

Nachdem die Zellsuspension in die Zählkammer gefüllt wurde, erfolgte die Auszählung von vier Gruppenquadranten der Kammer unter dem Mikroskop. Das Volumen eines Gruppenquadrats ist 0,1 µl. Da die Zellen durch die Trypanblaulösung 1:2 verdünnt wurden, konnte die Zellzahl nach folgender Formel berechnet werden:

$$(\text{Zellzahl in vier Gruppenquadranten}/4) \times 10^3 = \text{Zellzahl pro } \mu\text{l Medium}$$

3.3.5 Behandlung von Zellen

Die Behandlung von Zellen für *in vitro* Versuche oder zum Zweck Protein oder RNA aus ihnen zu isolieren, erfolgte fast ausschließlich an Zellen, die über Nacht in serumfreiem Mangelmedium kultiviert wurden. Dies war nötig, um den Stoffwechsel der Zellen zu minimieren und alle Zellen in den gleichen Grundzustand zu bringen.

In Tabelle 7 sind alle Wachstumsfaktoren bzw. Reagenzien zusammengefasst, mit denen im Rahmen dieser Arbeit Zellen stimuliert wurden.

Faktor/Stimulus	eingesetzte Konzentration	Funktion	Firma
Norrin (rhNorrin)	20 – 40 ng/ml	Wachstumsfaktor	-
Mitomycin C	5 µg/ml	Zytostatikum	Sigma, Taufkirchen
Staurosporin (SS)	200 nM	Kinaseinhibitor	Alexis Biochemicals, San Diego, USA
Dickkopf-1 (DKK-1)	100 ng/ml	Inhibitor von LRP5/6	R&D, Wiesbaden
Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1)	0,25 – 1,5 ng/ml	Wachstumsfaktor	R&D, Wiesbaden

Tabelle 7: Faktoren zur Zellbehandlung

3.3.6 Kultivierung von EBNA-pSNOS-Zellen

3.3.6.1 Transfektion von Hek-293-EBNA-Zellen mit dem Expressionsvektor pSNOS

Die Hek-293-EBNA-Zellen wurden mit dem pSNOS-Plasmid mit Hilfe von Lipofektamin transfiziert.

Kurzprotokoll:

- Hek-293-EBNA-Zellen auf einer 6-Well-Platte bis zu einer ca. 80 %igen Konfluenz kultivieren
- 250 µl DMEM (ohne FCS) + 4 µg pSNOS-Plasmid
- 10 µl Lipofektamin in 250 µl DMEM (ohne FCS) 5 Minuten bei Raumtemperatur
- Plasmid- und Lipofektaminansatz mischen und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Zellen vier Stunden bei 37 °C mit dem Transfektionsansatz inkubieren
- Nach der Inkubation den Transfektionsansatz absaugen und DMEM + FCS auf die Zellen geben
- Nach zwei Tagen: Beginn der Selektion mit Hygromycin (300 µg/ml)

3.3.6.2 Kultivierung von EBNA-pSNOS

Nach der Kontrolle des Transformationserfolges wurden zwei verschiedene Kultivierungsformen für die stabil transfizierten 293-EBNA-Zellen etabliert:

(1) Konventionelle Monolayer-Kulturen in speziellen dreikammerigen Zellkulturflaschen, sog. „Triple-Flasks“. (2) Suspensionskulturen in sterilen, mit einer Rührvorrichtung ausgestatteten Spinnerflaschen. Für die Kultivierung der Zellen wurde in beiden Fällen serumhaltiges EBNA-Medium verwendet. Um das rekombinante Protein im Zellüberstand ernten zu können, wurde das EBNA-Medium gegen serumfreies Medium ausgewechselt. Dies erfolgte in beiden Systemen in Verbindung mit zweimaligem Waschen mit 1x PBS. Bei der Suspensionskultur wurden die Zellen hierfür sedimentiert und der jeweilige Überstand vorsichtig abdekantiert. Nach dreitägiger Inkubation bei 37 °C wurde der serumfreie Zellüberstand geerntet und neues, serumhaltiges Medium zu den Zellen gegeben. Das geerntete Medium wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Für

die Langzeitkultivierung wurden die 293-EBNA-Zellen nach jedem Serumentzug für mindestens vier Tage in serumhaltigem Medium kultiviert.

3.3.7 Proliferationsmessungen

Mit Hilfe des kolorimetrischen „BrdU-Cell-Proliferation-ELISA“ der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) wurde der Einfluss von rhNorrin auf die Proliferation von mikrovaskulären Endothelzellen untersucht.

Prinzip der Proliferationsmessung mittels BrdU-ELISA

Das Thymidin-Analogon Bromdeoxyuridin (BrdU) wird während der Synthesephase des Zellzyklus kompetitiv zum Thymidin in die zelluläre DNA eingebaut. Die Detektion des eingebauten BrdU erfolgt über eine Antikörperreaktion an einzelsträngiger DNA, die durch chemische Denaturierung erreicht wird. Der verwendete BrdU-Antikörper ist mit einer Peroxidase (POD) konjugiert. Die Menge des umgesetzten Substrats Tetramethylbenzidin (TMB) in einen chromogenen Komplex durch die POD gibt Aufschluß darüber, wieviel BrdU in die zelluläre DNA eingebaut wurde. Nach dem Abstoppen der Reaktion kann die Menge des entstandenen Farbstoffs spektralphotometrisch am ELISA-Reader gemessen werden. Die Höhe der Extinktion ist direkt proportional zur DNA-Synthese und somit zur Zellproliferation.

Versuchsdurchführung BrdU-ELISA (Kurzprotokoll)

- Ausgangskonzentration der Zellen: 4×10^3 Zellen/Well (96-Well Platte)
- Zellen 24-72 Stunden mit unsupplementiertem, BrdU-haltigem Medium inkubieren (*BrdU-Labeling Solution 1:1000*); je nach Behandlung wurde rhNorrin und/oder DKK-1 dem Medium zugegeben
- Nach der Behandlung wurden die Zellen 30 Minuten mit 200 μ l *Fix-Denat* bei Raumtemperatur inkubiert.
- Fix-Denat abklopfen und pro Well mit 100 μ l *anti-BrdU-POD* und 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Dreimal mit jeweils 200 μ l *Waschlösung* waschen
- Je Well 100 μ l *Substratlösung* (TMB) zugeben und für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Je Well 25 μ l 1 M H_2SO_4

Die quantitative Auswertung erfolgte in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenz-Wellenlänge von 690 nm.

Zellzählungen

Um die Ergebnisse, die mittels BrdU-ELISA gewonnen werden konnten, abzusichern, wurden zusätzliche Zellzählungen durchgeführt. Dazu wurden Endothelzellen, wie zuvor beschrieben, auf 96-Well-Platten ausgesät und mit rhNorin behandelt. Jedoch erfolgte nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit keine denaturierende Auswertung mittels BrdU-ELISA, sondern eine Zellzahlbestimmung in der NEUBAUER-Zählkammer.

3.3.8 Bestimmung der Zellviabilität mittels WST-1-Reagenz

Mit Hilfe des „Cell Proliferation Reagent WST-1“ (Roche, Mannheim) wurde der Einfluss von rhNorin auf die Viabilität von mikrovaskulären Endothelzellen untersucht.

Prinzip des WST-1-Zellviabilitätstests

Das wasserlösliche, schwach rote Tetrazoliumsalz WST-1 (4-[(3-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat) wird von zellulären mitochondrialen Dehydrogenasen, dem Succinat-Tetrazolium-Reduktase System, in ein dunkelrotes Formazan umgewandelt, dessen Farbintensität durch Absorptionsmessung quantifiziert werden kann. Die Aktivität der Dehydrogenasen ist abhängig von dem Stoffwechselstatus der Zellen und somit ein Indikator für deren Vitalität. Der Vorteil des Viabilitätstests mit WST-1 ist, dass das entstehende Formazan wasserlöslich und nicht toxisch für die Zellen ist, wodurch die Zellen für weitere Versuche benutzt werden können.

Versuchsdurchführung WST-1 (Kurzprotokoll)

- Ausgangskonzentration der Zellen: 8×10^3 Zellen/Well (96-Well Platte)
- Zellen 72-144 Stunden mit 100 µl unsupplementiertem Medium mit oder ohne rhNorin inkubieren; Zellen mit 6-tägiger Inkubationszeit erhielten nach drei Tagen frisches Medium

- Am Ende der Inkubationszeit wurde jedes Well mit 10 µl WST-1-Reagenz (Δ 1:10 Verdünnung) versetzt
 - Inkubation für weitere 30 Minuten bei 37 °C
- Die Auswertung erfolgte durch Absorptionsmessung bei 450 nm gegen eine Referenz-Wellenlänge von 690 nm am ELISA-Reader.

Zur Kontrolle der kolorimetrisch ermittelten Daten wurden zusätzliche Zellzählungen durchgeführt. Hierfür dienten die unmittelbar aus der WST-1-Messung stammenden Zellen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels NEUBAUER-Zählkammer.

3.3.9 Migrationsverhalten

Das Migrationsverhalten von HDMEC und HRMEC wurde mit Hilfe des nach Liang (Liang *et al.* 2007) modifizierten „Scratch-Assay“ untersucht. Dieses *in vitro* Modell ermöglichte den Einfluss von rhNorrin auf das Migrationsverhalten von Endothelzellen abzuschätzen.

Prinzip des „Scratch Assay“

In vitro kann die Migration von Zellen in unterschiedlichen Modellen betrachtet werden. Der „Scratch Assay“ oder auch *in vitro* Wundheilungstest stellt eine einfache Methode zur quantitativen Untersuchung der Migration von Endothelzellen dar. Hierfür werden Endothelzellen aus dem Bereich eines konfluenten Zellrasens mechanisch entfernt und das Einwandern der Zellen aus dem Zellrasen in diesen Bereich beobachtet (Murohara *et al.* 1999).

Durchführung und Auswertung des „Scratch Assay“

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden durch Trypsinierung aus einer T-75 Zellkulturflasche abgelöst und zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Im Anschluss an eine Zellzahlbestimmung wurden 4×10^4 Zellen auf Zellkulturschalen mit $8,8 \text{ cm}^2$ Kultivierungsfläche ausgesät. Durch die hohe Zelldichte bei der Aussaat lag bereits nach kurzer Inkubationszeit (etwa zwei Tage) ein konfluenter Zellrasen vor. Mit Erreichen der Konfluenz erfolgte, nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS, ein Austausch des Kulturmediums, das nun kein Supplement mehr enthielt. Nach 24-

stündiger Inkubation wurden mit einer sterilen 200 μ l Pipettenspitze, die einen Spitzendurchmesser von ca. 800 μ m besitzt, fünf kurze Kratzer („Scratch“) quer in jede Zellkulturschale gezogen. Die so abgelösten Zellen wurden mitsamt Kulturmedium vorsichtig abgesaugt. Anschließend erfolgte die Stimulation mit rhNorin. Dazu wurden auf den mit Läsionen versehenen Zellrasen jeder Kulturschale 1,5 ml un supplementiertes Kulturmedium mit dem Zusatz von 40 ng/ml rhNorin gegeben. Kontrollen erhielten lediglich un supplementiertes Medium. Zur weiteren Aufklärung des Norrin-Signalwegs wurden HRMEC zusätzlich mit DKK-1 inkubiert. Alle Experimente wurden mehrmals als Duplikate mit je fünf Kratzern durchgeführt. Weiterhin kam das Zytostatikum Mitomycin C zum Einsatz. Mitomycin C interkaliert in die DNA und führt durch die kovalente Verknüpfung von DNA-Einzelsträngen zur Blockade der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen. Aus der damit verbundenen Reduktion der Proteinproduktion resultiert eine weitestgehende Hemmung der Zellteilung (Shatkin *et al.* 1962). Versuche mit Mitomycin C wurden an HRMEC durchgeführt. Diesbezüglich wurde dem bereits zuvor beschriebenen Behandlungsschema (Kontrolle, rhNorin) zusätzlich Mitomycin C in einer Konzentration von 5 μ g/ml hinzugefügt.

Im unmittelbaren Anschluß an die Behandlung wurden die Läsionen im Zellrasen am Phasenkontrastmikroskop bei 100-facher Vergrößerung photographisch dokumentiert. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte eine weitere Photo-Dokumentation.

Zur quantitativen Auswertung der Versuche wurde das Bildbearbeitungs- und Analyseprogramm *Axiovision 3.0* verwendet. Mit diesem Programm erfolgte die Bildaufnahme, Bildverarbeitung, Bildarchivierung sowie die interaktive Messung. Im Fall der „Scratch-Assays“ wurde mit dem Messwerkzeug Kontur („Spline“) gearbeitet, mit dessen Hilfe die unterschiedlich geformten Läsionen umfahren bzw. die Läsionslängen festgelegt werden konnten. Das Computerprogramm ermittelte aus der umrandeten Kontur die Läsionsfläche in μm^2 sowie die Länge der Läsion in μm . Durch die Berechnung der Differenzen in den einzelnen Läsionsflächen nach 0 Stunden (A_0) und nach 24-stündiger (A_{24}) Inkubation erhielt man die jeweilige Migrationsfläche (ΔA). Um zusätzlich der Tatsache Rechnung zu tragen, dass die Läsionen in ihrer Länge variierten, wurde die Berechnung der Migrationsfläche in Abhängigkeit von der jeweiligen Läsionslänge (s) durchgeführt.

$$A_0 - A_{24} / s = \Delta A / s$$

Um den Einfluss von Norrin zu ermitteln, wurden die gemittelten ($\Delta A/s$)-Werte der unterschiedlich behandelten Zellen mit Kontrollzellen verglichen und ins Verhältnis gesetzt.

3.3.10 „Tube Formation“-Angiogenese Assay

Um das angiogene Potential von rhNorrin zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Test zur Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen aus Endothelzellen etabliert. Basis des Testsystems war das extrazelluläre Matrixpräparat GFR (Growth Factor Reduced) Matrikel®.

Prinzip des Tube Formation Assay

Die erste Studie zur *in vitro* Angiogenese wurde 1980 von Folkman und Haudenschild (Folkman und Haudenschild 1980) publiziert, die nach einer Langzeitkultivierung von mikrovaskulären Endothelzellen deren Organisation in kapillarähnlichen Strukturen mit einem zentralen Lumen beobachteten. Seitdem wurden mehrere *in vitro* Modelle mit Endothelzellen aus unterschiedlichen Geweben, Organen und Gefäßen entwickelt, welche zum besseren Verständnis der Angiogenese beigetragen haben (Jain *et al.* 1997, Auerbach *et al.* 2000, Vailhé *et al.* 2001). Grundsätzlich unterscheidet man zwischen zwei- und dreidimensionalen Modellen (Vailhé *et al.* 2001). In zweidimensionalen Modellen werden Endothelzellen in Kulturschalen ausgesät, welche mit adhäsiven Proteinen (Feder *et al.* 1983, Pelletier *et al.* 2000) oder auch Gelen aus Fibrin, Kollagen oder Matrikel® (Kubota *et al.* 1988, Vailhé *et al.* 1998) beschichtet sind. In zweidimensionalen Modellen bilden sich kapillarähnliche Strukturen planar zur Kulturschalenoberfläche, also nur in einer Ebene, aus.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Beschichtung mit Growth Factor Reduced GFR Matrikel®, einem löslichen Basalmembranpräparat, das aus dem Tumor der Engelbreth-Holm-Swarm Sarkom Maus hergestellt wird. Dieser Tumor ist reich an extrazellulären Matrix-Proteinen und stellt als Matrix alle wichtigen Substrate für die Untersuchung kapillarähnlicher Strukturen bereit. In Matrikel®-basierten Kurzzeitmodellen kann die Bildung kapillarähnlicher Strukturen innerhalb von 12 - 48 Stunden beobachtet werden (Kubota *et al.* 1988, Vailhé *et al.* 1998).

Durchführung des Tube Formation Assay

Die Handhabung des Matrigel® erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das Gel wurde über Nacht bei 4 °C aufgetaut und für Experimente mit dem gleichen Volumen an eiskaltem nicht-supplementiertem Endothelmedium versetzt (\cong 1:1 Verdünnung).

Zusätzlich wurde rhNorrin in einer Konzentration von 40 ng/ml zur Matrigel®: Endothelmedium-Mischung gegeben. Für Kontrollansätze wurde kein rhNorrin zugegeben. Jeweils 300 μ l der entsprechenden Mischung wurden in Vertiefungen einer 24-Well-Platte vorgelegt und zur Verfestigung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit wurden HRMEC abtrypsiniert und durch Zentrifugation isoliert. Die isolierten Zellen wurden durch zwei weitere Zentrifugationsschritte, bei denen die Zellen in je 10 ml 1x PBS resuspendiert wurden, von Resten des Kulturmediums befreit.

Das Zellpellet wurde in 2 ml nicht-supplementiertem Endothelmedium gelöst. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden je 5×10^4 Zellen in einem Volumen von 400 μ l unsupplementiertem Endothelmedium auf die mit Matrigel® beschichteten Kavitäten gegeben und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. In das Kulturmedium von Zellen, die auf Matrigel® mit rhNorrin inkubiert wurden, wurde zusätzlich 40 ng/ml rhNorrin gegeben.

Die Dokumentation und Analyse der durch Endothelzellen *in vitro* gebildeten Strukturen erfolgte mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops und des Bildbearbeitungssystems *Axiovision 3.0*. Hierfür wurden je Plattenvertiefung drei Panoramaübersichten, bestehend aus je neun Einzelbildern bei einer 100-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die in *Axiovision 3.0* integrierten Messwerkzeuge ermöglichen die Quantifizierung derjenigen Strukturen, die als kapillarähnliche Strukturen definiert waren. Zur Quantifizierung wurde deren Länge und Fläche in jedem Bildausschnitt bestimmt und die erhobenen Daten auf je einen Quadratzentimeter Kultivierungsfläche bezogen.

Definition „kapillarähnliche Strukturen“

Der Begriff „kapillarähnliche Strukturen“ für endotheliale, tubuläre Formationen wurde erstmals von Folkman und Haudenschild (Folkman und Haudenschild 1980) verwendet.

Obwohl die Bildung kapillarähnlicher Strukturen in zahlreichen Modellen der *in vitro* Angiogenese beschrieben wurde, besteht bis heute keine einheitliche Definition. Im hier vorgestellten *in vitro* Modell der Angiogenese erfolgte die Definition in Anlehnung an eine Methode von Nehls und Drenckhahn (Nehls und Drenckhahn 1995). Als kapillarähnliche Struktur wurde ein Endothelstrang definiert, an dem mindestens drei Endothelzellreihen beteiligt waren. Allerdings konnten bei der phasenkontrastmikroskopischen Untersuchung aufgrund der dreidimensionalen Organisation der Endothelzellen nicht immer die einzelnen Zellen identifiziert werden. Daher wurde für diese Arbeit eine Definition auf der Basis des Durchmessers verwendet. Hierfür wurde mit Hilfe des Bildbearbeitssystems *Axiovision 3.0* der Durchmesser von 20 strangartigen Strukturen ermittelt, bei denen phasenkontrastmikroskopisch eindeutig drei beteiligte Endothelzellreihen nachgewiesen werden konnten. Anschließend wurde das arithmetische Mittel der ermittelten Durchmesser berechnet, welches bei ca. 28 µm (27,93 µm) lag. Somit wurden bei der Quantifizierung von kapillarähnlichen Strukturen nur die endothelialen, strangartigen Formationen berücksichtigt, deren Durchmesser mindestens 28 µm betrug. Zusätzlich wurde an Semidünnschnitten überprüft, ob bei kapillarähnlichen Strukturen Lumenbildung auftrat.

3.3.11 Kultivierung von Müllerzellen

Um den direkten Einfluss von Norrin auf Müllerzellen untersuchen zu können, wurde eine primäre Müllerzellkultur aus der Rattenretina etabliert.

3.3.11.1 Isolation und Charakterisierung von Müllerzellen

Die Anreicherung von Müllerzellen erfolgte gemäß einer Methode von Hicks und Courtois (Hicks und Courtois 1990). Wistar-Ratten wurden zwischen den postnatalen Tagen 8 und 12 (p 8-12) getötet und die Augen enukleiert. Die präparierten Augen wurden über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur in serumfreiem Müllerzellmedium belassen. Am nächsten Tag wurde die Cornea durchstochen und die Augen daraufhin in eine Verdaulösung überführt, und dort für 60 Minuten bei 37

°C inkubiert. Im Anschluss wurde der vordere Augenabschnitt mit dem Ciliarkörper entfernt und die Linse aus dem hinteren Augenabschnitt herausgelöst. Die Netzhaut wurde vorsichtig von dem darunterliegenden Pigmentepithel abgelöst, mit einer sterilen Rasierklinge in kleine Fragmente zerlegt und am Boden einer Zellkulturschale verteilt. Auf die verteilten Retinastücke wurde vorsichtig ein steriles Deckglas aufgelegt, leicht angedrückt und mit 2,5 ml serumhaltigem Müllerzellmedium überschichtet. Nach mehrtägiger Inkubation bei 37 °C wurden retinale Aggregate und Ablagerungen durch kraftvolles Pipettieren mit Medium abgespült. Nach mehrmaligem Wiederholen dieses Vorganges unter mikroskopischer Kontrolle blieb eine gereinigte Population von Müllerzellen auf dem Boden der Kulturschale zurück. Die verbliebenen Zellen wurden abtrypsinert und in Zellkulturflaschen mit serumhaltigem Müllerzellmedium kultiviert.

Zur Bestimmung des Anreicherungserfolgs bzw. der Reinheit der kultivierten Müllerzellen wurden Expressionsanalysen und immunzytochemische Färbungen durchgeführt.

3.3.11.2 Herstellen von konditioniertem Müllerzellmedium

Konfluente Müllerzellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert mit oder ohne Zugabe von rhNorrin.

Wenn in der Folge Versuche an RGC-5 Zellen geplant waren, wurde nach acht Stunden das Medium gegen frisches serumfreies Medium ausgetauscht, um das Versuchsergebnis nicht durch das eventuell noch enthaltene rhNorrin zu verfälschen. Nach 24 Stunden wurde der konditionierte Zellüberstand abgenommen und für Dot Blot Analysen verwendet oder in Zellkulturversuchen mit RGC-5 eingesetzt.

3.3.12 Differenzierung und Behandlung von RGC-5

RGC-5 ist eine immortalisierte retinale Ganglienzelllinie aus der Ratte. Diese Zellen exprimieren Ganglienzell-typische Marker wie Thy-1 oder NMDA-Rezeptoren. Trotzdem unterscheiden sich diese Zellen durch ihre Morphologie und ihre Fähigkeit zur Proliferation deutlich von untransformierten Ganglienzellen. Um aussagekräftige *in vitro* Versuche mit RGC-5 durchführen zu können, wurden diese nach der von Frassetto *et al.* (Frassetto *et al.* 2006) vorgestellten Methode differenziert. Hierzu wurden die Zellen mit dem unspezifischen Kinaseinhibitor Staurosporin (200 nM für eine Stunde) behandelt.

Die differenzierten Zellen zeigten neben einem Proliferationsstop bereits wenige Minuten nach Beginn der Behandlung ein Auswachsen zahlreicher Dendriten und Axonen, mit denen sie Kontakt zu ihren Nachbarzellen aufnahmen. Zudem bewirkte die Differenzierung eine abgerundete, erhöhte Form des Zellsomas. Somit wiesen differenzierte Zellen eine mit Neuronen vergleichbare Morphologie auf, die sich sehr stark von proliferierenden RGC-5 unterschied.

Um die protektive Wirkung von konditioniertem Müllerzellmedium auf RGC-5 zu untersuchen, wurden in ihnen nach der Differenzierung und einer 16-stündigen Regenerationsphase durch Entzug jeglicher Wachstumsfaktoren (Inkubation in serumfreiem Medium) Apoptose induziert (Charles *et al.* 2005). Die Kontrollzellen wurden 24 Stunden in serumfreiem Mangelmedium kultiviert, eine Versuchsgruppe in konditioniertem Medium unbehandelter Müllerzellen und eine dritte Gruppe in konditioniertem Medium rhNorrin-behandelter Müllerzellen. Nach der Inkubation wurde die Zellviabilität mittels WST-1 Assay bestimmt.

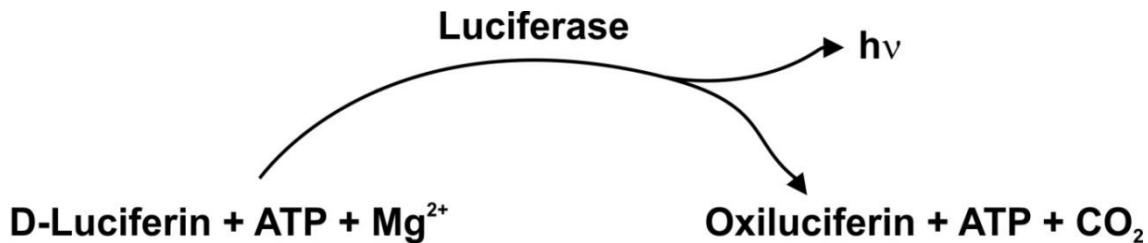
3.3.13 Luciferase Assay

Mit einem TGF- β -sensitiven Luciferase-Reporter Assay wurde der Einfluss von Norrin auf den TGF- β 1-Signalweg untersucht.

Prinzip des Luciferase Assays

Diese Experimente wurden mit einer Lungenepithezellinie aus Nerz (MLEC) durchgeführt. MLECs wurden von Abe *et al.* mit einem Konstrukt stabil transfiziert, das das Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle eines trunkierten PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) Promoters exprimiert (Abe *et al.* 1994). Der Vorteil des trunkierten Promoters ist seine Transforming Growth Factor β (TGF- β) Spezifität. Andere Wachstumsfaktoren, wie etwa Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) können diesen trunkierten Promoter nicht aktivieren. Das heißt, die Menge an gebildeter Luciferase ist direkt proportional zur Menge an aktivem TGF- β .

Die Messung der Menge an Luciferase erfolgt über die Messung ihrer Aktivität, also ihrer Fähigkeit ihr Substrat D-Luciferin umzusetzen. Bei dieser ATP-abhängigen Oxidation kommt es zu einer Quantenemission. Diese Lichtquanten können im Luminometer gemessen werden.



Durchführung des Luciferase Assays (Kurzprotokoll)

- Ausgangskonzentration der Zellen: 2×10^4 Zellen/Well (96-Well Platte)
- Inkubation der Zellen in serumfreien Medium für 20 h. Die Zellen wurden mit rhNorrin, TGF- β 1 und/oder DKK-1 inkubiert
- Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen. PBS abklopfen.
- 50 μ l Lysispuffer pro Well. 30 Minuten bei 4 °C inkubieren
- Lysat auf Raumtemperatur erwärmen
- Lysatproben in 5 ml Rundboden-Röhrchen überführen
- Messung der Luciferase Aktivität im Luminometer:
 - Assaypuffer + CoA + ATP + D-Luciferin in das Luminometer füllen
 - Röhrchen mit Lysatproben in die Meßkette des Luminometers spannen
 - Für die Messung wurden jeweils 100 μ l Assaypuffer je Probe (50 μ l) eingespritzt

Die Messung erfolgte zwei Sekunden nach der Mischung von Probe und Assaypuffer. Die Luciferase-Aktivität wurde über eine Zeitspanne von drei Sekunden gemessen. Hierbei maß der Luminometer die Menge an emittiertem Licht und gab diese in RLU (Relative Light Units) an.

Zur Auswertung wurden alle Einzelmessungen einer Versuchsgruppe zusammengefasst und in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt.

Reagenz	Bezugsquelle
ATP, 2Na (Adenosin 5'-Triphosphat, Disodium)	Merck, Darmstadt
CoA (Coenzym A Trilithium Salz)	AppliChem, Darmstadt
DCTA (trans-1,2-Diamino Cyclohexantetraessigsäure)	Sigma, Taufkirchen
D-Luciferin	p.j.k., Kleinblittersdorf
DTT (DL-Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Magnesium-Carbonat Hydroxid (x5 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulphat (MgSO ₄)	Roth, Karlsruhe
Tricin	Merck, Darmstadt
Tris/HCl	Invitrogen, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Material/Geräte	Bezugsquelle
Auto Lumat LB953	Berthold Detection Systems, Pforzheim
Rundboden-Röhrchen, 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht

Tabelle 8: Reagenzien, Materialien und Geräte für den Luciferase-Assay

Lysepuffer		Assaypuffer	
Tris-HCl	25 mM	Tricin	20 mM
DTT	4 mM	Mg-Carbonat Hydroxid (x 5H ₂ O)	1,07 mM
DCTA	3,5 mM	EDTA	0,1 mM
Triton-X-100	1 % (v/v)	MgSO ₄	2,67 mM
Glycerin	10 % (v/v)	DTT	33 mM
pH-Wert 7,8		pH-Wert 7,8 - 8,0	
Kurz vor der Messung zugeben:			
		CoA	300 µM
		ATP	500 µM
		D-Luciferin	500 µM

Tabelle 9: Puffer Luciferase Assay

3.4 *In vivo* Versuche

3.4.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Wildtyp-Versuchstiere wurden von Charles River (Sulzberg) bezogen. Für die Isolation von Müllerzellen wurden Wistar-Ratten verwendet. Die intravitrealen Injektionen wurden an Bl6/c57 Mäusen durchgeführt.

Für die Untersuchungen der Beziehung zwischen TGF- β 1- und Norrin-Signalweg wurden β B1-Norrin- und β B1-TGF- β 1-Mäuse untersucht. Beide Linien wurden von der Arbeitsgruppe Tamm etabliert.

Alle Versuchstiere wurden im Einklang mit dem „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“ behandelt. Es wurde stets auf für Nager optimale Haltungsparameter geachtet (Temperatur 23 °C ± 2 °C, relative Luftfeuchtigkeit 55 % ± 5 %, Hell-Dunkelintervall 12 Stunden, Futter und Wasser ad libitum).

3.4.2 Gewebepräparation aus Maus und Ratte

Augen- und Opticuspräparation für die Histologie

Die Versuchstiere wurden durch eine kurzzeitige Inhalation von Isofluran betäubt und anschließend durch eine zervikale Dislokation getötet. Die Augen wurden mit Hilfe einer stumpfen Pinzette enukleiert.

Zur Vorbereitung für die Einbettung in Paraffin oder Epon wurden die Augen in das jeweiligen Fixans (Kap. 3.6) überführt. Um eine Fixierung des gesamten Auges zu gewährleisten, wurde mit einer Kanüle die Cornea perforiert.

Retinapräparation für RNA- und Proteinisolation

Für die Isolation von Protein und RNA aus der Retina wurde diese wie folgt präpariert:

Nachdem die Tiere getötet und die Augen enukliert wurden, wurde mit einer Federschere eine zirkuläre Inzision zur Trennung des vorderen Augenabschnittes hinter dem Ciliarkörper durchgeführt. Nachdem die Linse vorsichtig aus dem Augenbecher entfernt wurde, wurde der hintere Augenbecher radiär eingeschnitten und ausgebreitet. Nun wurde die Retina vorsichtig vom RPE gelöst und umgehend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

3.4.3 Intravitreale Injektionen

Mit dem NMDA-Schadensmodell wurde gearbeitet, um das neuroprotektive Potential von Norrin untersuchen zu können.

Durchführung der intravitrealen Injektionen

Für die intravitreale Injektion wurden die Tiere durch eine Isofluran-Inhalationsnarkose anästhesiert und ihre Augen mit einer 10 %-igen Jod-Lösung desinfiziert. Eine mit einer 25 µl Hamiltonpipette verbundene Nadel (35 G) wurde am Augenäquator durch die Sklera in Richtung *Nervus opticus* in den Glaskörper eingeführt. Über die Hamiltonspritze wurden schließlich 3 µl der zu testenden Substanz in den Glaskörper injiziert. Die Nadel wurde nach etwa 20 Sekunden wieder aus dem Auge entfernt. Diese Verzögerung sollte dem Auge die Möglichkeit geben, den durch die Injektion bedingten erhöhten Augeninnendruck auszugleichen.

Nach Entfernen der Nadel wurde das Auge antiseptisch behandelt (Isopto Max).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Augen und deren *Nervi optici* untersucht, die eine intravitrale Injektion von PBS, rhNorrin, NMDA, DKK-1 oder eine Kombination aus rhNorrin/NMDA, DKK-1/NMDA oder rhNorrin/DKK-1/NMDA erhielten. Pro Maus wurden jeweils beide Augen injiziert, wobei ein Auge immer die jeweilige Kontrollbehandlung erhielt.

Injektabilia	Funktion	verwendete Konzentration	Firma
Dickkopf-1 (DKK-1)	Inhibitor von LRP5/6	100 ng/ml	R&D, Wiesbaden
N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)	Glutamat analogon	10 mM	Sigma, Taufkirchen
Norrin (rhNorrin)	Wachstumsfaktor	5 ng/µl	-
PBS	-	-	Invitrogen, Karlsruhe
Narkose/ Antiseptikum	Funktion	Firma	
Isofluran	Anästhetikum	Baxter, Unterschleißheim	
Isopto Max	Antiseptikum	Alcon Pharma, Freiburg	
Sepso® J (Polyvidon-Jod)	Antiseptikum	Braun, Melsungen	
Material	Firma		
Nadel (beveled needle 35 G)	W. P. I., Berlin		
Hamiltonspritze	Roth, Karlsruhe		

Tabelle 10: Material und Reagenzien für intravitreale Injektionen

3.4.3.1 Das NMDA-Schadensmodell

Das NMDA-Schadensmodell basiert auf der spezifischen exzitotoxischen Schädigung retinaler Ganglienzellen. Das Glutamat analogon NMDA ist ein synthetischer Agonist für NMDA-Glutamatrezeptoren. Die NMDA-Rezeptoren sind mit einem Ca^{2+} -Kanal gekoppelt. Durch Bindung von NMDA an seinen Rezeptor wird der Ionenkanal geöffnet, und es kommt daraufhin zu einem Ca^{2+} -Influx.

Da NMDA kein natürlicher Ligand ist, fehlen entsprechende Mechanismen, die zu einer Inaktivierung des NMDA-Rezeptorkomplexes führen. Dadurch kommt es zu einer unnatürlich langen Öffnung des Ca^{2+} -Kanals.

Durch den exzessiven Einstrom des sekundären Messengers Ca^{2+} werden mehrere intrazelluläre Signalwege beeinflusst, was letztendlich zu einer Aktivierung der Apoptose-Signalkaskade führt. Der genaue Mechanismus, über den NMDA seinen exzitotoxischen Schaden vermittelt, ist bislang aber unklar (Shen *et al.* 2006).

3.4.3.2 Auswertung des Netzhautschadens mittels TUNEL-Assay

24 Stunden nach NMDA-Injektion wurden apoptotische Zellen an Sagittalschnitten des Auges mit dem „Dead-end TUNEL-Assay“ von Promega (Promega, Mannheim) markiert.

Prinzip TUNEL-Assay

Mit Hilfe der TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) ist es möglich apoptotische Zellen zu markieren. In apoptotischen Zellen wird als einer der letzten Schritte die DNA durch die Aktivität der Endonukleasen fragmentiert. Die dabei freiwerdenden Hydroxylgruppen können durch das Enzym Terminale Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) mit markierten dNTPs markiert werden.

Im Falle des verwendeten Assays wurden die 3'OH-Enden der fragmentierte DNA mit Fluoreszein-12-UTPs markiert.

Durchführung TUNEL-Assay (Kurzprotokoll)

Drei Wochen nach intravitrealer NMDA-Injektion wurden die behandelten Augen in Paraffin eingebettet und sagittale Schnitte von ihnen angefertigt. Für den Versuch wurden nur Schnitte benutzt, die zentral durch das Auge verliefen, bei denen also sowohl Iris als auch Papille zu sehen waren.

- Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte
- Zweimal mit PBS waschen
- Fixierung der Schnitte für 15 Minuten mit 4 % PFA
- Zweimal mit PBS waschen
- Andauen des Gewebes mit Proteinase K (20 µg/ml) für 8 Minuten
- Fixierung der Schnitte für 5 Minuten mit 4 % PFA
- Inkubieren mit *Equilibration Buffer* für 10 Minuten (ca. 100 µl Puffer pro Schnitt)
- Ca. 50 µl *TdT-Reaction Mix* pro Schnitt
- Inkubation für 60 Minuten im Dunkeln bei 37 °C
- Schnitte mit 2x SSC für 15 Minuten waschen
- Dreimal 5 Minuten mit PBS waschen
- Schnitte mit Fluorescent Mounting Medium (+DAPI) eindeckeln

Die TUNEL-markierten Schnitte wurden mit Hilfe eines Zeiss Fluoreszenzmikroskops aufgenommen. Die Anzahl der Gesamtzellen in der Ganglienzellschicht (DAPI-Kanal) und die Anzahl TUNEL-markierter Zellkerne (GFP-Kanal) wurden mit Hilfe der „Count-and-Tag“ Funktion des Programms *IT ImageTool* bestimmt.

3.4.3.3 Auswertung der Semidünnschnitte

Um die Auswirkungen verschiedener Injektabilia auf morphologische Veränderungen in der Netzhaut bzw. auf die Gesamtzahl der Axone im *Nervus opticus* zu bestimmen, wurden drei Wochen nach Injektion sagittale Semidünnschnitte (1 µm) durch das Auge bzw. Querschnitte durch den *Nervus opticus* angefertigt.

Die Semidünnschnitte der Augen wurden anschließend nach Richardson gefärbt, die Semidünnschnitte der *Nervi optici* mit Paraphenyldiamin. Nach Kontrastierung der Schnitte erfolgte die Auswertung. Mit Hilfe eines Zeiss Lichtmikroskops und der Axiovision 3.0 Software wurden zunächst Panoramaaufnahmen der Semidünnschnitte angefertigt.

Die Auszählung der Axone erfolgte mit der Zählfunktion „Count-and-Tag“ des Programms *IT ImageTool*. Um eine Interpretation durch den Experimentator auszuschließen, wurden ausnahmslos alle Axone mitgezählt, auch jene, deren

Myelinscheiden dunkler anfärbten. Die Gesamtzahl der Axone wurde relativ zur jeweiligen Kontrolle dargestellt.

Die Bestimmung der Anzahl der Perikarya pro Retinaabschnitt erfolgte ebenfalls mit dem Programm *IT Image Tool*. Die Fläche der inneren plexiformen Schicht wurde mit dem Messwerkzeug Kontur der *Axiovision* Software bestimmt.

3.5 Proteinbiochemische Techniken

3.5.1 Reagenzien, Geräte und Materialen

Reagenzien	Bezugsquelle
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidisulfat (APS), 10 % (w/v)	Roth, Karlsruhe
BC Assay Reagenz A+B	Montlucon, Frankreich
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Coomassie®Brillantblau R250	Sigma, Taufkirchen
Deoxycholsäure	Roth, Karlsruhe
DL-Dithiotreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure, glazial	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd, 25 % in Wasser	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Heparin-Agarose (aqueous ethanol solution)	Sigma, Taufkirchen
HEPES	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat ($Na(CH_3COO)$)	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natrium-EDTA	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$), pentahydrat	Sigma, Taufkirchen
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
Protease Inhibitor Mix M	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
SDS (Sodium Dodecyl Sulphat)	Roth, Karlsruhe

Silbernitrat (AgNO ₃)	Roth, Karlsruhe
Roti®-Free Stripping-Puffer	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
Tergitol	Sigma, Taufkirchen
Tris Ultrapure, MB Grade	Usb Corporation, Cleveland , USA
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Geräte/Material	Bezugsquelle
Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06	Raytest, Straubenhardt
ELISA-Reader	Tecan, Mainz
Empty Columns	Biorad, München
LAS 3000	Fujifilm, Düsseldorf
Mikrohomogenisator	Roth, Karlsruhe
Minifold I-SRC96-Dot Blot	Schleicher & Schüll, Dassel
Power Supply	Consort, Turnhout, Belgien
PVDF-Western Blot Membran	Roche, Mannheim
Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Spectra Pov7 Dialyseschlauch MWCO 2000	Spectrum Medical Industries, Houston, USA
Vertikale Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Zellschaber (Cell Scraper)	Sarstedt, Nürnbrecht

Tabelle 11: Reagenzien, Material und Geräte für Proteinbiochemie

3.5.2 Gewinnung von humanem rekombinannten Norrin

3.5.2.1 Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinantem Norrin

Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins erfolgte aus dem „konditionierten“ serumfreien Zellüberstand der Norrin exprimierenden Zellen (EBNA-pSNOS) mit Hilfe einer Affinitätschromatographie unter Verwendung von Heparin-Agarose.

30 µl Heparin-Agarose wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit 10 ml H₂O dest. versetzt und bei 1000 Upm für eine Minute zentrifugiert. Das entstandene Agarose-Pellet wurde, nachdem es in 10 ml 1x PBS gelöst wurde, für 10 Minuten bei 4 °C unter Schwenken äquilibriert. Anschließend wurde die Agarose-Suspension zu 500 ml konditioniertem Medium gegeben und für 30 Minuten unter Schwenken bei 4 °C inkubiert.

Diese Heparin-Medium-Suspension wurde auf eine Chromatographiesäule gegeben, der Durchfluß wurde verworfen. Die Matrix der Säule wurde zweimal mit mindestens 20 ml 1x PBS gewaschen, der Durchfluß wurde wiederum verworfen. Die Elution des Proteins erfolgte mit 1 M und 2 M NaCl-Lösungen. Hierbei wurde zweimal mit 1 ml 1 M NaCl in 1x PBS, anschließend mit zweimal 1 ml 2 M NaCl in 1x PBS eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden getrennt voneinander gesammelt.

Die eluierten Fraktionen wurden auf Reinheit und Spezifität des rekombinanten Proteins überprüft. Dies erfolgte mit Hilfe von SDS-PAGE auf 15 %-igen Gelen mit anschließender Silberfärbung und Western-Blot Analyse. Die Fraktionen, die das Protein in möglichst reiner Form enthielten, wurden vereinigt und dialysiert.

3.5.2.2 Protein-Dialyse

Nach 10-minütiger Vorinkubation mit H₂O dest. wurde der Dialyseschlauch mit dem Protein-Eluat befüllt und beidseitig verschlossen. Die Dialyse erfolgte gegen 2,5 Liter 1x PBS über Nacht bei 4 °C unter ständigem Rühren. Das Dialysat wurde aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.5.2.3 Konzentration und Bioaktivität des isolierten Proteins

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden quantitative Silbergele angefertigt. Im Unterschied zur Herstellung anderer Silbergele wurde hierfür eine BSA-Standardreihe mit definierten Proteinmengen von 16, 32, 63, 125 und 250 ng zusammen mit je einem 15 µl und 30 µl Aliquot des Dialysats auf das Gel aufgetragen. Um beide Proteine trotz ihrer unterschiedlichen Größe (BSA ca. 70 kDa, rhNorrin 17 kDa) gut auftrennen zu können, wurde ein Gradientengel aus einem 15 %-igen und einem 8 %-igen SDS-Sammelgel angefertigt.

Zusätzliche Bestimmungen mit dem BCA-Assay erwiesen sich aufgrund der geringen Proteinkonzentrationen in den meisten Fällen als nur bedingt verwendungsfähig.

Zum Nachweis der biologischen Aktivität des isolierten Proteins wurde jede dialysierte Proteinaufreinigung einem Proliferations-Assay unter Verwendung von Bromdeoxyuridin (BrdU) unterzogen. Die Proliferationsmessung erfolgte als Achtfachbestimmung in einer 96er-Well-Platte. Für diesen Zweck wurden HRMEC-Zellen für 24 Stunden mit rekombinantem Norrin inkubiert. Proteinisolate galten als biologisch aktiv, sobald die mit ihnen behandelten Zellen eine relative Proliferationssteigerung von mindestens 40 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen zeigten. Die Proliferationsraten der HRMEC wurde mittels studentischem T-Test auf Signifikanz untersucht ($p < 0,05$).

3.5.3 Isolation von Gesamtprotein aus Zellen und Gewebe mit der RIPA-Methode

Isolierte Proteine aus Müllerzellen und Retinae wurden mittels Immunoblot auf die Menge an FGF-2, CNTF und β-Catenin hin untersucht.

Aus behandelten Zellen bzw. Retinae wurde das Gesamtprotein mit Hilfe des RIPA-Puffers isoliert. Dazu wurden 300 µl RIPA-Puffer pro 6er-Well oder Retina mit Protease-Inhibitor-Mix (1:1000 Verdünnung) zu den Zellen/dem Gewebe gegeben und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Gewebe wurde zusätzlich mit einem Mikrohomogenisator aufgeschlossen. Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers geerntet.

Nach Überführung der entstandenen Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden nicht gelöste Zell- bzw. Gewebebestandteile 10 Minuten bei 11000 Upm

sedimentiert. Der das Gesamtprotein enthaltende Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C bzw. -80 °C für Western Blot Analysen aufbewahrt.

RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay)-Puffer	
NaCl	150 mM
Tergitol	1 % (v/v)
Deoxycholsäure	0,5 % (w/v)
SDS	0,1 % (w/v)
Tris (pH 8)	50 mM

Tabelle 12: RIPA-Puffer

3.5.4 Isolation von Kernproteinen aus HRMEC

Kernproteine wurden mittels Immunoblot auf die Menge an nukleärem β-Catenin hin untersucht.

Das Kulturmedium wurde aus den Kulturflaschen abgekippt, der Zellrasen durch einmaliges Waschen mit 10 ml 1x PBS von Mediumrückständen befreit. Die Zellen wurden mit 1,5 ml 1x PBS überschichtet und mittels Zellschaber in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überfuhr. Durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 3500 Upm wurden die Zellen pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl hypotonischen Puffer resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 Minuten, 3500 Upm) und der Entfernung des Überstandes, wurde das Sediment vorsichtig mit 80 µl hypotonischem Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mittels Mikrohomogenisator aufgeschlossen. Die Kontrolle der Zellyse erfolgte mit einem Trypanblau-versetzten Aliquot unter dem Mikroskop. Mindestens 80 % der Zellen waren lysiert.

Das Zellhomogenat zentrifugierte für 15 Minuten bei 5000 Upm, der resultierende Überstand wurde abgezogen. Er stellte den zytoplasmatischen Extrakt dar. Die als Sediment verbliebenen Zellkerne wurden in 30 µl Niedrigsalzpuffer gelöst und in Folge langsam und unter kontinuierlichem Schwenken mit 30 µl Hochsalzpuffer versetzt. Nach einer halbstündigen Inkubation auf einem Thermoschüttler lagen alle Kerne in lysierter Form vor. Abschließend wurde für 45 Minuten bei 13200 Upm zentrifugiert.

Der Überstand stellte den Kernextrakt dar. Dieser wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Puffer für die Kernproteinisolierung	Zusammensetzung
Hochsalzpuffer	20 mM HEPES, pH 7,9 bei 4 °C 25 % Glycerin 1,5 mM MgCl ₂ 1,2 M KCl 0,2 mM EDTA 0,2 mM PMSF* 0,2 mM DTT*
Hypotonischer Puffer	10 mM HEPES, pH 7,9 bei 4 °C 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 0,2 mM PMSF* 0,5 mM DTT*
Niedrigsalzpuffer	20 mM HEPES, pH 7,9 bei 4 °C 25 % Glycerin 1,5 mM MgCl ₂ 20 mM KCl 0,2 mM EDTA 0,2 mM PMSF* 0,2 mM DTT*

* Zugabe kurz vor Gebrauch

Tabelle 13: Puffer für die Isolation von Kernproteinen.

Der gewonnene Kernextrakt diente der Western-Blot-Analyse des nukleären β -Catenin-Spiegels von HRMEC.

3.5.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Assay

Mit Hilfe des BCA-Assays wurde die Menge an Gesamtprotein in Proben bestimmt, die mittels Immunoblot untersucht werden sollten. So war es möglich gleiche Mengen an Protein im Versuch einzusetzen.

Der BCA-Assay basiert auf der Bildung von Cu²⁺-Komplexen mit den vorhandenen Proteinen unter alkalischen Bedingungen, welche eine Reduktion des Cu²⁺ zu Cu¹⁺ zur Folge haben. Die Menge des reduzierten Kupfers ist dabei proportional zur Menge des vorhandenen Proteins. Mit Hilfe der Bicinchoninsäure (BCA), die unter

alkalischen Bedingungen violette Komplexe mit Kupfer (I) bildet und die bei einer Messung der optischen Dichte bei 560 nm nachgewiesen werden kann, wird indirekt das vorhandene Protein sichtbar gemacht. Als Eichkurve wird eine Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

Eine BSA-Stammlösung (2 mg/ml) wurde hierfür mit dem jeweiligen Puffer der Proteinproben (z.B. RIPA) auf folgende Standardkonzentrationen verdünnt: 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200 und 100 µg/l.

Jeweils 10 µl der Proteinproben (unverdünnt und 1:2 verdünnt) und der Standardkonzentrationen wurden auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 200 µl BCA-Lösung (Reagenz A:Reagenz B = 50:1) versetzt. Jeder Ansatz wurde dabei doppelt pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Proteinbestimmung in einem ELISA-Reader durchgeführt. Dabei wurde die Extinktion bei 560 nm photometrisch gemessen und mit der Eichgeraden verglichen, um so die Proteinkonzentration abschätzen zu können. Die endgültige Proteinkonzentration ergab sich aus dem Mittelwert der Einzelmessungen.

3.5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine für die Western Blot Analysen wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bewerkstelligt. Die Gelelektrophorese sowie die Herstellung der Polyacrylamidgele wurde nach der Methode von Laemmli durchgeführt (Laemmli 1970). Zum Gießen eines Gels wurde eine horizontale Gelapparatur verwendet.

Puffer für die SDS-PAGE

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
SDS-Lösung, 10 % (w/v)	10 g SDS in H ₂ O dest. lösen ad 100 ml
SDS-PAGE-Laupuffer, 10x	250 mM Tris/HCl 400 mM Glycin 1 % (w/v) SDS in H ₂ O dest. lösen ad 1 l
SDS-Probenpuffer, 4x	0,25 M Tris/HCl, pH 6,8 30 % Glycerin 8 % (w/v) SDS 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 10 % β-Mercaptoethanol
10 x Elektrodenpuffer	250 mM Tris/HCl 400 mM Glycin 1 % (w/v) SDS in H ₂ O dest. lösen ad 1 l
Tris/HCl, 1,0 M, pH 6,8	121,14 g Tris in H ₂ O dest. lösen pH einstellen ad 1 l
Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8	181,71 g Tris in H ₂ O dest. lösen pH einstellen ad 1 l

Tabelle 14: Puffer für die SDS-PAGE

Zusammensetzung der SDS-Gele

10 % Trenngele wurden für den Nachweis von β-Catenin verwendet. 15 % Trenngele dagegen waren für den Nachweis der Wachstumsfaktoren FGF-2, CNTF und Norrin nötig. Für die semiquantitative Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten rhNorrins wurden Gradientengele benötigt. Hierzu wurden erst 2,5 ml eines 10 %-igen Trenngels, dann 2,5 ml eines 15 %-igen Trenngels mit einer serologischen Pipette aufgezogen. Um einen Gradienten zwischen beiden Gelen zu erhalten, wurde etwas Luft angesaugt. Die aufsteigenden Luftblasen durchmischten beide Trenngele partiell. Dann wurde das Gradientengel vorsichtig zwischen die beiden Glasplatten der Gelapparatur pipettiert.

	Sammelgel (1 ml Ansatz)	Trenngel 10 % (5 ml Ansatz)	Trenngel 15 % (5 ml Ansatz)
H ₂ O dest.	0,68 ml	1,9 ml	1,1 ml
Rotiphorese® Gel 30	0,17 ml	1,7 ml	2,5 ml
Tris/HCl, 1 M, pH 6,8	0,13 ml	-	-
Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8	-	1,3 ml	1,3 ml
10 % SDS	0,01 ml	0,05 µl	0,05 µl
10 % APS	0,01 ml	0,05 µl	0,05 µl
TEMED	0,001 ml	0,002 µl	0,002 µl

Tabelle 15: Zusammensetzung der SDS-Gele

Fertige, auspolymerisierte Gele wurden nach Anleitung in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Puffertank mit 1x Elektrodenpuffer aufgefüllt. Die Proben, die eine einheitliche Proteinmenge (je nach Versuch mit 15 µg – 80 µg Protein) besaßen, wurden in die Geltaschen geladen. In eine Geltasche wurde 5 µl Proteinmolekulargewichtsmarker pipettiert.

Die Auf trennung durch Gelelektrophorese erfolgte bei 20 mA (pro Gel) für 55-75 Minuten.

3.5.6.1 Silberfärbung der SDS-PAGE

Die Silberfärbung wurde zur Untersuchung des Reinheitsgrades und zur semiquantitativen Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten rhNorris benutzt. Da die Silberfärbung von Polyacrylamidgelen eine sehr sensitive Methode ist um Proteine unspezifisch anzufärben, die Nachweisgrenze liegt bei 1 bis 5 µg, wurde sie benutzt, um den Aufreinigungserfolg von rhNorrin zu überprüfen bzw. die Konzentration von rhNorrin in den Eluaten zu bestimmen. Die hier verwendete Methode beruht auf Heukeshoven und Dernick (Heukeshoven und Dernick 1988).

Kurzprotokoll Silberfärbung:

Alle Schritte des Protokolls erfolgten auf einem Schüttler.

- 30 Minuten Fixierlösung I
- Dreimal 5 Minuten waschen mit H₂O dest.
- 20 Minuten Silberlösung
- Zweimal 1 Minute mit H₂O dest. waschen
- 5 bis 20 Minuten Entwicklerlösung
- 10 Minuten Stopp-Lösung
- Das Gel kann bis zu 6 Monate in Aufbewahrlösung konserviert werden

Silberfärbung Puffer	Zusammensetzung
Fixierlösung I	400 ml Ethanol 100 ml Eisessig mit H ₂ O dest. ad 1 l
Fixierlösung II	300 ml Ethanol 68 g Natriumacetat, Anhydrid 2 g Natriumthiosulphat Pentahydrat mit H ₂ O dest. ad 1 l 500 µl 25 % Glutaraldehyd pro 100 ml *
Silberlösung	2,5 g Silbernitrat mit H ₂ O dest. ad 1 l 40 µl Formaldehyd pro 100 ml *
Entwicklerlösung	25 g Natriumcarbonat, Anhydrid mit H ₂ O dest. ad 1 l 20 µl Formaldehyd pro 100 ml *
Stopp-Lösung	15 g Natrium-EDTA mit H ₂ O dest. ad 1 l
Aufbewahrlösung	300 ml Ethanol 40 ml Glycerol mit H ₂ O dest. ad 1 l

*kurz vor Gebrauch zugeben

Tabelle 16: Puffer für die Silberfärbung

3.5.6.2 Blotten auf PVDF-Membranen (Semidry und Dot Blot)

Für den Transfer (Blotten) von Proteinen auf eine PVDF-Membran mußte diese zunächst entsprechend vorbereitet werden. Zunächst wurde die Membran auf die entsprechende Größe zugeschnitten. Für den Transfer im Semidry-Verfahren bedeutet das 9x7 cm Blot und 12x7 cm im Dot Blot. Die Membran wurde zuerst für einige Sekunden mit Methanol vorbehandelt, anschließend zwei Minuten in H₂O dest. gewaschen und schließlich fünf Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Zum Blotten wurde zusätzlich Whatman-Filterpapier benötigt, fünf Stück für die Semidry-Methode, ein Stück für den Dot Blot. Die Whatman-Papiere wurden ebenfalls in Transferpuffer eingelegt.

10x Transferpuffer	
Tris	5,8 g
Glycin	2,9 g
Methanol	200 ml
SDS	3,7 ml 10 % (w/v)
in H ₂ O dest. lösen, ad 1 l	

Tabelle 17: Zusammensetzung 10x Transferpuffer

Die Semidry-Blot Methode wurde benutzt, um (1) Kernproteinisolationen, Retina- oder Müllerzell-Gesamtprotein mittels Western-Blot-Analyse auf ihren β-Catenin-Gehalt hin zu untersuchen oder (2) rhNorrin im Laufe der Expression in pSNOS oder während der Aufreinigung nachzuweisen.

Im Semidry-Blot wurden Proteine nach der Auftrennung in der SDS-PAGE durch anlegen eines elektrischen Feldes auf eine PVDF-Membran transferiert.

Aufbau Semidry Blot:

Kathode (-)
3 Lagen Whatman-Papier
Trenngel mit Proteinen
PVDF-Membran
2 Lagen Whatman-Papier
Anode (+)

Beim Zusammenbau des Semidry Blots wurde darauf geachtet, dass sich zwischen Membran und Gel keine Luftblasen befanden, die den Proteintransfer behindern könnten. Geblottet wurde für 90 Minuten bei 25 V.

Die Dot-Blot-Methode wurde eingesetzt um FGF-2 und CNTF im Gesamtprotein von Müllerzellen, behandelten Retinae und in konditioniertem Müllerzellmedium nachzuweisen. Hierbei wurden die vorbereiteten Proben mittels Vakuumfiltration auf eine PVDF-Membran transferiert.

Aufbau Dot Blot:

96-Loch Aufsatz	
PVDF-Membran	
Whatman-Papier	
Filterträgerplatte	
Vakuumkammer	→ Wasserstrahlpumpe

Nachdem die zu untersuchenden Proteinproben zusammen mit 4 x SDS-Probenpuffer 10 Minuten im Wasserbad aufgekocht wurden, konnten sie bei angeschalteter Wasserstrahlpumpe geladen werden. Hierzu wurden jeweils 80 µg Gesamtprotein bzw. 300 µl konditioniertes Medium in den 96-Loch Aufsatz pipettiert

3.5.7 Immunologische Färbemethoden

3.5.7.1 Antikörper

Primärantikörper	Klonalität	Verwendung	Bezugsquelle
rabbit anti h β -Catenin	polyklonal	WB, IC	Sigma, Taufkirchen
goat anti-mCD31	polyclonal	IC	R&D, Wiesbaden
rabbit anti-hCNTF	polyklonal	DB, WB	Santa Cruz, Heidelberg
mouse anti-hGAPDH-HRP	monoklonal	WB	Abcam, Cambridge, UK
rabbit anti-bGFAP	polyklonal	IC	Signet, Hamburg
rabbit anti-hFGF-2	polyklonal	DB, WB	Santa Cruz, Heidelberg
rabbit anti-mGlutaminsynthetase	polyklonal	IC	Sigma, Taufkirchen
rabbit anti-His	polyclonal	WB	ABR, Bonn
goat anti-hNorrin	polyklonal	WB	R&D, Wiesbaden
mouse anti-bRPE65	monoklonal	IC	Abcam, Cambridge, UK
anti-hVimentin	polyklonal	IC	Sigma, Taufkirchen
Sekundärantikörper/ Tertiärantikörper	Konjugation	Verwendung	Bezugsquelle
chicken anti-goat	HRP	WB	Santa Cruz, Heidelberg
chicken anti-rabbit	HRP	WB, DB	Santa Cruz, Heidelberg
chicken anti-mouse	HRP	WB	Santa Cruz, Heidelberg
goat anti-rabbit	Biotin	IC	Linaris, Wertheim-Bettingen
goat anti-mouse	Biotin	IC	Linaris, Wertheim-Bettingen
horse anti-goat	Biotin	IC	Linaris, Wertheim-Bettingen
Streptavidin	Alexa Fluor [®] 488	IC	Mo Bi Tec, Göttingen

Tabelle 18: Verwendete Antikörper für Western Blot Analysen (WB), Dot Blot Analysen (DB) und Immunzytochemie (IC). b=Bovine, h=human, m=mouse

3.5.7.2 Nachweis spezifischer Proteinbanden im Western Blot und Dot Blot

Bei den Western-Blot-Analysen wurde die Höhe der detektierten Banden mit Hilfe des Proteinmolekulargewichtsmarkers PageRuler™ Prestained Protein Ladder bestimmt.

Zum Nachweis der spezifischen Proteinbanden wurde ein Primärantikörper gegen das gesuchte Protein hinzugefügt. Dieser Antikörper reagierte mit dem entsprechenden Antigen. Der gebildete Antikörper-Antigen-Komplex wurde dann von einem, für den Primärantikörper spezifischen Sekundärantikörper gebunden. Durch die Koppelung des Sekundärantikörpers mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) konnte dieser, bei Zugabe von Luminol, durch ein Chemilumineszenz-Signal detektiert werden. Dieses Lumineszenzsignal tritt bei Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form auf, welche durch die Meerrettich-Peroxidase katalysiert wird.

Konkret wurden die Membranen nach dem Semidry-Blot zunächst über Nacht bei 4 °C blockiert. Danach wurde der Primärantikörper über Nacht bei 4 °C zugegeben und anschließend dreimal für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Der HRP konjugierte Sekundärantikörper wurde ebenfalls für 1 Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Daraufhin wurde noch dreimal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Bei allen Schritten wurden die Membranen in den Lösungen geschüttelt.

Zur Detektion über die Meerrettich-Peroxidase wurden die Membranen nach dem letzten Waschschritt mit 1 ml HRP Substrate Luminol Reagent und HRP Peroxidase Solution (1:1 gemischt) (Millipore Corporation, Billerica, USA) in eine Folie eingeschlagen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Chemilumineszenzsignal wurde mit der LAS 3000 (Fujifilm, Düsseldorf) digital aufgenommen und entsprechend in Graustufen umgesetzt. Die Analyse und Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale wurde mit der Software *Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06* bewerkstelligt.

Kurzprotokolle Western Blot und Dot Blot

3 % MM	1 h RT
rabbit anti-FGF-2 1:1000 in 1 % MM	üN 4 °C
chicken anti-rabbit 1:1000 in 1 % MM	1h RT
5 % BSA	1 h RT
rabbit anti-β-Catenin 1:1000 in 5 % MM	üN 4 °C
chicken anti-rabbit 1:1000 in 1 % MM	1 h RT
3 % MM	1 h RT
rabbit anti-CNTF 1:1000 in 1 % MM	üN 4 °C
chicken anti-rabbit 1:1000 in 1 % MM	1 h RT
5 % BSA	1 h RT
goat anti-Norrin 1:500 in 0,5 % BSA	üN 4 °C
chicken anti-goat HRP 1:1000 in 0,5 % BSA	1 h RT
3 % MM	1 h RT
rabbit anti-His 1:1000 in 1 % MM	2 h RT
chicken anti-rabbit 1:1000 in 1 % MM	1 h RT

alle Antikörper wurden in TBS-T angesetzt

AK: Antikörper, MM: Magermilch, RT: Raumtemperatur, h: Stunde, üN: über Nacht

Tabelle 19: Kurzprotokolle Western Blot und Dot Blot

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
TBS, 10x, pH 7,4	30 g Tris/HCl 80 g NaCl 2 g KCl mit H ₂ O dest. ad 1 l, autoklavieren
TBS-T, 1x	100 ml 10x TBS 0,05 % (v/v) Tween 20 mit H ₂ O dest. ad 1 l

Tabelle 20: Zusammensetzung von TBS und TBS-T

3.5.7.3 Coomassie-Färbung als Ladungskontrolle für Dot Blots

Der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brilliant Blue R 250 lagert sich an basische Seitenketten der Aminosäuren und färbt so Proteine unspezifisch an. Dadurch kann das aufgetragene Gesamtprotein auf PVDF-Membranen nachgewiesen werden. Die Coomassie-Färbung kann als Ladungskontrolle nach immunologischen Färbungen wie Western oder Dot Blot herangezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Coomassie-Färbung als Ladungskontrolle für die Dot Blot Analysen herangezogen. Hierfür wurden die PVDF-Membranen nach der immunologischen Analyse zunächst gestript, also der Primär- und Sekundärantikörper von der Membran gelöst, um das Ergebnis der Ladungskontrolle nicht zu verfälschen. Hierfür wurde die PVDF Membran zweimal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Nach Inkubation der Membran in Roti®-Free Stripping-Puffer für 30 Minuten bei 56 °C wurde diese abermals zweimal mit TBS-T gewaschen.

Zum Färben wurde die Membran 10 bis 30 Minuten in Coomassie-Färbelösung eingelegt. Nachdem die Membran im Anschluß über Nacht entfärbt wurde, konnte sie getrocknet und im LAS 3000 digital aufgenommen werden. Zur Bestimmung der geladenen Proteinmenge wurde die Intensität der Färbung densitometrisch mit der Software *Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06* bestimmt.

Coomassie-Färbelösung	Coomassie-Entfärbelösung
40 ml Methanol	500 ml Methanol
2 ml Essigsäure (Eisessig)	10 ml Essigsäure
0,2 g Coomassie-Brilliant Blue R250	mit H ₂ O dest. auffüllen, ad 1 l
mit H ₂ O dest. auffüllen, ad 100 ml	

Tabelle 21: Lösungen für die Coomassie-Färbung

Densitometrische Auswertung von Immunoblot Analysen und der Coomassie Ladungskontrolle

Um mögliche Änderungen im Proteingehalt spezifischer Proteine nachzuweisen wurden die Signalintensitäten der Immunoblot-Analysen und der Coomassie-gefärbten PVDF-Membranen mit der LAS 3000 Kamera digital aufgenommen und mit Hilfe der Software *Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06* densitometrisch vermessen.

Hierzu wurden gleich große Messfelder über die einzelnen Banden gelegt. Die Hintergrundfärbung wird von dem Integral der einzelnen Farbflächen und -intensitäten abgezogen.

3.5.7.4 Immunzytochemische Färbungen

Reagenzien/ Materialen	Bezugsquelle
Deckgläschchen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg
Küvetten	Schott, Mainz
Vectashield Mounting Medium mit DAPI	Linaris, Wertheim

Tabelle 22: Reagenzien und Materialen für die immunzytochemischen Färbungen

Mit Hilfe von immunzytochemischen Färbungen können Proteine spezifisch in Zellen lokalisiert werden. Für die bei der Arbeit verwendete indirekte Immunfluoreszenz wurden ein Primärantikörper und ein Sekundärantikörper verwendet. Der Primärantikörper bindet an das gesuchte Antigen, während sich der Sekundärantikörper an ein Epitop des Primärantikörpers anlagert. Über eine Biotinylierung des Sekundärantikörpers können Streptavidin-Moleküle, die mit dem Fluorochrom Alexa 488 gekoppelt sind, gebunden werden.

Neben der indirekten Immunfluoreszenz kam für die direkte Markierung der DNA des Zellkerns der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI zum Einsatz. Mit Hilfe der Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mit Licht entsprechender Wellenlänge (Alexa 488: 488 nm, DAPI: 381 nm) wurde die Lage der Antikörperkomplexe bzw. des interkalierenden Farbstoffs sichtbar gemacht. Dabei wurde das emittierte Licht durch einen entsprechenden, für die spezifische Wellenlänge durchlässigen, Filter unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Immunzytochemische Färbungen wurden durchgeführt um isolierte Müllerzellen zu charakterisieren, bzw. um β -Catenin in HRMEC und Müllerzellen nach der Behandlung mit rhNorrin nachweisen zu können. Für die Färbung wurden Zellen auf Objektträger ausgesät. Um immunzytochemische Färbungen durchzuführen, sollte die Konfluenz der Zellen bei etwa 60 - 70 % liegen.

Kurzprotokolle Immunzytochemie	
2 % BSA	1 h bei RT
rabbit anti-β-Catenin 1:500 in 1 % BSA	üN bei 4 °C
anti-rabbit-Biotin 1:500 in 1 % BSA	1 h RT
anti-Streptavidin-Alexa488 1:1000 in 1 % BSA	1 h RT
1 % MM	1 h bei RT
goat anti-CD31 1:500 in 0,5 % MM	üN bei 4 °C
anti-goat-Biotin 1:500 in 0,5 % MM	1 h RT
anti-Streptavidin-Alexa488 1:1000 in 0,5 % MM	1 h RT
3 % BSA	1 h bei RT
rabbit anti-GFAP 1:40 in 0,3 % BSA	üN bei 4 °C
anti-rabbit-Biotin 1:500 in 0,3 % BSA	1 h RT
anti-Streptavidin-Alexa488 1:1000 in 0,3 % BSA	1 h RT
1 % MM	1 h bei RT
rabbit anti-Glutaminsynthetase 1:500	üN bei 4 °C
anti-rabbit-Biotin 1:500 in 0,5 % MM	1 h RT
anti-Streptavidin-Alexa488 1:1000 in 0,5 % MM	1 h RT
1 % MM	1 h bei RT
goat anti-Vimentin 1:500 in 0,5 % MM	üN bei 4 °C
anti-goat-Biotin 1:500 in 0,5 % MM	1 h RT
anti-Streptavidin-Alexa488 1:1000 in 0,5 % MM	1 h RT
1 % MM	1 h bei RT
anti-RPE65 1:500 in 0,5 % MM	üN bei 4 °C
anti-goat-Biotin 1:500 in 0,5 % MM	1 h RT
anti-Streptavidin-Alexa488 1:1000 in 0,5 % MM	1 h RT

PhP: Phosphatpuffer, MM: Magermilch, RT: Raumtemperatur, h: Stunde, üN: über Nacht

Tabelle 23: Kurzprotokolle für die Immunzytochemie

3.6 Histologische Arbeitstechniken

Reagenzien	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt
Bleicitrat	Merck, Darmstadt
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Merck, Darmstadt
2-Dodecenylsuccinic-acid-anhydride (DDSA)	Merck, Darmstadt
2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl) Phenol (DPM-30)	Serva, Heidelberg
Epon	Serva, Heidelberg
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycidether	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
MNA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Osmiumtetroxid	Merck, Darmstadt
Paraffin	Engelbrecht, München
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
1,4-p-phenylen diamin	Sigma, Taufkirchen
Pioloform	Plano, Marburg
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Materialien/Geräte	Bezugsquelle
Einbettautomat EM TP (Epon)	Leica, Wetzlar
Einbettautomat HMP110 (Paraffin)	Microm, Waldorf
Slotgrids/Kupfergrids	Plano, Marburg
Supercut 2050 (Paraffin)	Reichert-Jung, Kirchseeon
Ultracut E-Ultramikrotom (Epon)	Reichert-Jung, Kirchseeon

Tabelle 24: Reagenzien, Material und Geräte für die Histologie

Puffer	Zusammensetzung
4 % PFA (Paraformaldehyd) (Fixans für die Paraffineinbettung)	4 g PFA 100 ml PhP unter Rühren und Erwärmen lösen pH 7,4
Cacodylatpuffer	20,14 g Cacodylsäure, in 0,5 l H ₂ O dest. pH 7,2
EM-Fixans	2,5 % Paraformaldehyd 2,5 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer
Phosphatpuffer (PhP) 0,1 M	P1: Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O: 35,6 g auf 2 l P2: NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O: 13,8 g auf 1 l P1:P2 = 5:1 pH 7,4
Stammlösung A	62 ml Glycidether 100 100 ml DDSA
Stammlösung B	100 ml Glycidether 100 89 ml MNA

Tabelle 25: Puffer für die Histologie

3.6.1 Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten

Die Herstellung von Paraffinschnitten erfolgte für die TUNEL-Färbung nach NMDA-Injektion.

Für die Einbettung in Paraffin wurden die enukleierten Augen in 4 % PFA für mindestens 4 h immersionsfixiert und danach dreimal 10 Minuten mit 0,1 M Phosphatpuffer gespült. Die Einbettung erfolgte im Einbettautomaten über Isopropanol (50, 70, 80, 96 und 100 % jeweils 1-2 Stunden), Xylol (2x 1 Stunde 100 %) in Paraffin (4 Stunden Paraffin, 6 Stunden Paraffin).

Die eingebetteten Augen wurden anschließend auf Holzblöckchen fixiert. Von den Augen wurden mit Hilfe des Supercut-Mikrotoms Schnitte von etwa 5 µm angefertigt.

3.6.2 Einbettung in Epon und Herstellung von Semidünnschnitten

Für die Einbettung in Epon wurden die enukleierten Augen in EM-Fixanz für mindestens 12 h immersionsfixiert und in Cacodylatpuffer mehrfach für mehrere Stunden gespült. Die Augen wurden in 1 % Osmiumtetroxid nachfixiert. Das Osmium wurde mit Cacodylatpuffer ausgewaschen und die Augen in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70, 80, 90, 100 %) entwässert. Die Einbettung erfolgte im Einbettautomaten über Aceton nach Standardmethode: Ethanol/Aceton 1:1; 100 % Aceton; Epon/Aceton 1:2; Epon/Aceton 2:1; 100 % Epon; Aushärten im Brutschrank 24 Stunden bei 60 °C und 48 Stunden bei 90 °C. Für die Einbettung wurden Stammlösung A und Stammlösung B im Verhältnis 1:1 mit 2 % Beschleuniger DMP-30 verwendet. Von den Augen wurden zunächst Semidünnschnitte (1 µm) angefertigt und lichtmikroskopisch betrachtet. Von ausgewählten Regionen wurden Ultradünnschnitte (60 nm) mit Hilfe des „Ultracut E“-Ultramikrotoms angefertigt. Diese wurden auf Kupfergrids bzw. mit Pioloform überzogene Slotgrids aufgefangen, mit Uranylacetat (10 %, 10 Minuten) und Bleicitrat (5 %, 10 Minuten) unter Lichtabschluss kontrastiert.

3.6.3 Histologische Färbungen

Färben von sagittalen Augenschnitten

Sagittale Semidünnschnitte von Augen wurden nach Richardson gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte 15 – 30 Sekunden bei 60 °C mit der Gebrauchslösung überschichtet. Die Gebrauchslösung wurde wieder gut mit H₂O dest. abgespült.

Färbelösung nach Richardson

Stammlösung I	1 % Azur II: 5 g in 500 ml H ₂ O dest.
Stammlösung II	1 % Methylenblau: 5 g Methylenblau in 500 ml 1 % Borax
Gebrauchslösung	1 Teil Stammlösung I + 1 Teil Stammlösung II + 2 Teile H ₂ O dest.

Kontrastierung der *Nervi optici*

Nervi optici wurden mit Paraphenylendiamin nach folgendem Protokoll kontrastiert:

- 500 mg Paraphenylendiamin in 50 ml Ethanol (absolut) lösen
- Paraphenylendiamin-Lösung drei Tage bei Tageslicht stehen lassen, bis sie dunkel wird
- Semidünnsschnitte bei Raumtemperatur 2-3 Minuten färben
- Nach der Färbung Schnitte mit Ethanol (absolut) spülen

3.7 Mikroskopie

Licht- und Fluoreszenzmikroskopie/Konvokalmikroskopie

Die Analyse der Paraffin- und Semidünnsschnitte erfolgte mit Hilfe des *Axio Imager Z1-Mikroskops* (Carl Zeiss, Göttingen). Die konvokalen Bilder wurden mit Hilfe des *LSM170-Mikroskops* aufgenommen (Carl Zeiss, Göttingen).

Elektronenmikroskopie

Die angefertigten Ultradünnsschnitte wurden mit einem Zeiss EM 10 Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) betrachtet (Zeiss, Oberkochen). Die Beschleunigungsspannung betrug immer 120 kV. Die Belichtungszeit schwankte zwischen 600 ms und 1000 ms.

3.8 Auswertung und Statistik

Die Auswertung der numerischen Daten sowie deren graphische Darstellung erfolgte mittels *Microsoft® Excel* (Microsoft® Corporation, Redmond, USA).

Für die statistische Analyse der *in vitro* Versuche, die mindestens dreimal durchgeführt wurden, kam der studentische T-Test zum Einsatz. Statistisch signifikante Unterschiede wurden für $p < 0,05$ und statistisch hoch signifikante Unterschiede für $p < 0,001$ angenommen. In den Diagrammen wurde dies mit *für $p < 0,05$ bzw. ** für $p < 0,001$ vermerkt. Hierzu wurde *CorelDraw®* (Corel® Corporation, Ottawa, Canada) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Expression, Aufreinigung und Untersuchung der biologischen Aktivität von rekombinantem humanen Norrin

4.1.1 Klonierung und Expression von rekombinantem humanen Norrin

Um die Wirkungsweise des Wachstumsfaktors Norrin *in vitro* und *in vivo* genauer untersuchen zu können, war das erste Ziel dieser Arbeit rekombinantes humanes Norrin (rhNorrin) zu gewinnen.

Zu diesem Zweck sollte die für humanes Norrin (*Norrie disease pseudoglioma, NDP*) codierende cDNA in den Expressionsvektor pSEC-TAG kloniert werden. Hierfür wurde zunächst RNA aus humanen retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) isoliert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die cDNA für Norrin wurde daraufhin in den ZeroBlunt® TOPO® Vektor kloniert. Durch automatische Sequenzierung in beide Richtungen wurden Mutationen in der cDNA-Sequenz ausgeschlossen.

Um eine verstärkte Sekretion des rekombinanten Proteins zu erreichen, wurde das endogene Signalpeptid durch das Ig κ- Signalpeptid ersetzt. Dazu mußte zunächst die genaue Lage der für das Signalpeptid codierenden Sequenz mit Hilfe des Programms SignalP 3.0 vom Center For Biological Sequence Analysis (Technische Universität Dänemark, DTU) identifiziert werden. Die Analyse zeigte, dass sich das Signalpeptid mit hoher Wahrscheinlichkeit in den ersten 24 Aminosäuren befindet.

Durch eine erneute PCR wurden die Schnittstellen HindIII am 5'- und Xhol am 3'- Ende eingebracht und die Sequenz für das endogene Signalpeptid aus der cDNA entfernt. Erneut wurden Mutationen mittels Sequenzierung ausgeschlossen.

Mithilfe der eingebrachten Restriktionsschnittstellen wurde die cDNA für Norrin ohne das endogene Signalpeptid in den Vektor pSeqTag2 kloniert. Am 5'-Ende war das Originalsignalpeptid nun durch den murinen Ig κ-Leader ersetzt und am 3'-Ende war die Sequenz für ein 6xHis- und ein c-myc-Epitop angefügt worden. Abschließend wurde das fertige Plasmid (pSNOS: pSeqTag2 mit Norrin ohne Signalpeptid) nochmals zur Sequenzierung gegeben (Abb. 3). Das berechnete Molekulargewicht des rekombinanten Norrins lag bei ca. 17 kDa.

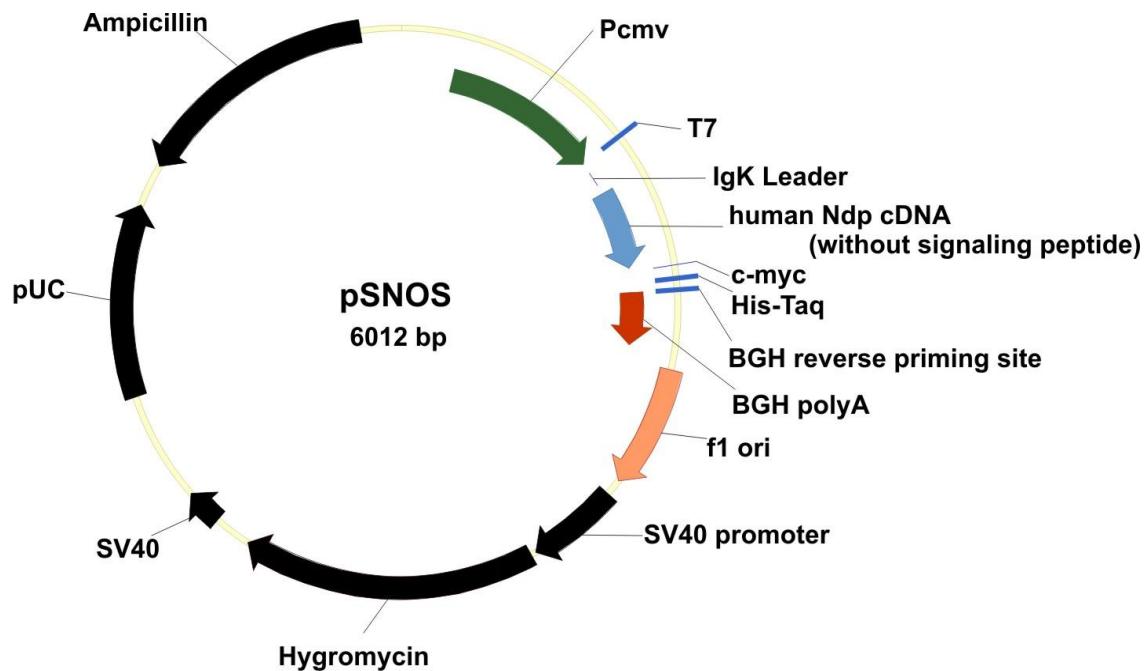


Abb. 3: Der Expressionsvektor pSNOS. Das endogene Signalpeptid wurde durch den IgK Leader ersetzt. Dem rekombinanten Protein wurde am C-terminalen Ende ein c-myc- und ein 6xHis-tag angehängt. Die Selektion der transfizierten Hek-293-EBNA Zellen erfolgte durch die auf dem Plasmid enthaltene Hygromycinresistenz.

Nach erfolgreicher Klonierung wurden Hek-293-EBNA-Zellen mit dem pSNOS-Plasmid transfiziert (→ EBNA-pSNOS). Hek-293-EBNA-Zellen exprimieren konstitutiv das EBNA-1 Protein des Epstein-Barr-Virus und unterstützen so die episomale Replikation der transfizierten DNA, was zu einer höheren Proteinausbeute führen soll.

Nach einer Selektionsphase von etwa vier Wochen mit Hygromycin wurden konfluente EBNA-pSNOS-Zellen zwei Tage in serumfreien Medium kultiviert. Nach diesem Zeitraum wurde der Zellüberstand abgenommen und im Western Blot auf die Expression von rekombinantem Norrin hin untersucht.

Sowohl mit einem gegen das His-Epitop des rekombinanten Proteins, als auch mit einem spezifisch gegen Norrin gerichteten Antikörper konnte das Protein im Zellüberstand der EBNA-pSNOS-Zellen mittels Immunoblot detektiert werden (Abb. 4). In der Western Blot Analyse wurde gelegentlich eine zusätzliche Bande bei etwa 16 kDa detektiert, die vermutlich auf post-transkriptionale Modifikationen zurückzuführen ist.

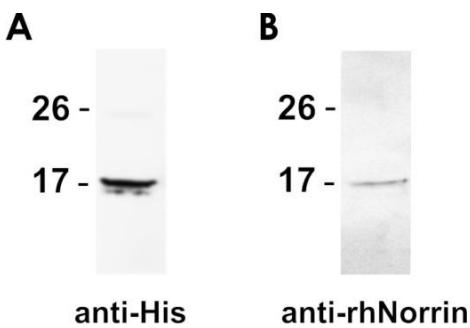


Abb. 4: Die Expression rhNorris durch EBNA-pSNOS-Zellen. Western Blot Analysen mit einem gegen den His-Tag gerichteten (A), sowie mit einem anti-rhNorris Antikörper (B).

4.1.2 Aufreinigung von rhNorris aus dem Zellüberstand von EBNA-pSNOS Zellen

Die Aufreinigung des überexprimierten Proteins erfolgte affinitätschromatographisch aus serumfreiem konditionierten Zellkulturmedium von EBNA-pSNOS-Zellen. Da die mittels Modellberechnungen vorhergesagte carboxyterminale cysteinreiche Domäne („Cysteine-Knot“) von Norrin die Bindung an Heparin prinzipiell ermöglichte, wurde der Versuch unternommen rhNorris mit Hilfe von Heparin-Agarose aufzureinigen. Nach Optimierung der eingesetzten Agarosemenge und der Inkubationszeiten gelang die Bindung des rekombinanten Proteins an Heparin-Agarose. Nach der Bindung wurde der rhNorris-Heparin-Agarose-Komplex gründlich mit PBS gewaschen und rhNorris konnte durch 1-2 M NaCl in PBS wieder von der Agarose eluiert werden.

Um den Erfolg der Aufreinigung zu überprüfen, wurden die Reinheit und Spezifität der Eluate mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung (Abb. 5A) bzw. Immunoblotanalyse (B) durchgeführt. Dazu wurden jeweils 30 µl der verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung auf die SDS-PAGE aufgetragen.

Wie man in Abb. 5A sieht, konnte nicht bei jeder Aufreinigung das gesamte rhNorris im Zellüberstand an die Heparin-Agarose gebunden werden. Je nach Vitalität und dadurch Produktivität der aktuellen EBNA-pSNOS-Passage variierte die Menge an rhNorris im Zellüberstand. In der exemplarischen Silberfärbung in Abb. 5A erkennt man beispielsweise bei etwa 17 kDa noch eine deutliche Bande im Durchlauf, die wohl zumindest zum Teil rhNorris darstellt. Nach den Waschschritten erfolgten drei Elutionsschritte. Bei allen drei Fraktionen der Elution konnte man bei 17 kDa eine prominente Bande erkennen. In Elution 1 und 2 waren aber zudem noch deutliche Nebenbanden bei ca. 24 bis 35 kDa sichtbar. Nur Elution 3 wurde in diesem Fall für

Versuche eingesetzt, da hier außer der Bande bei 17 kDa keine weiteren Proteinbanden im Silbergel zu erkennen waren. Um die Spezifität der Eluate zu überprüfen, wurden parallel Western Blot Analysen durchgeführt. Sowohl mit einem anti-rhNorrin-Antikörper (Abb. 5B) als auch mit einem anti-His Antikörper (Abb. 5C) konnten spezifische Banden bei 17 kDa, der Höhe von rhNorrin, in den Eluaten detektiert werden. Im Silbergel fällt auf, dass die Bande bei 17 kDa in den Elutionsfraktionen nicht scharf erscheint. Ebenso wurden in den Western Blot Analysen neben der Hauptbande bei 17 kDa noch kleinere Banden sichtbar. Diese verschwanden nach der Dialyse gegen PBS und sind wohl auf das veränderte Laufverhalten aufgrund des hohen Salzgehalts der Elutionen zurückzuführen.

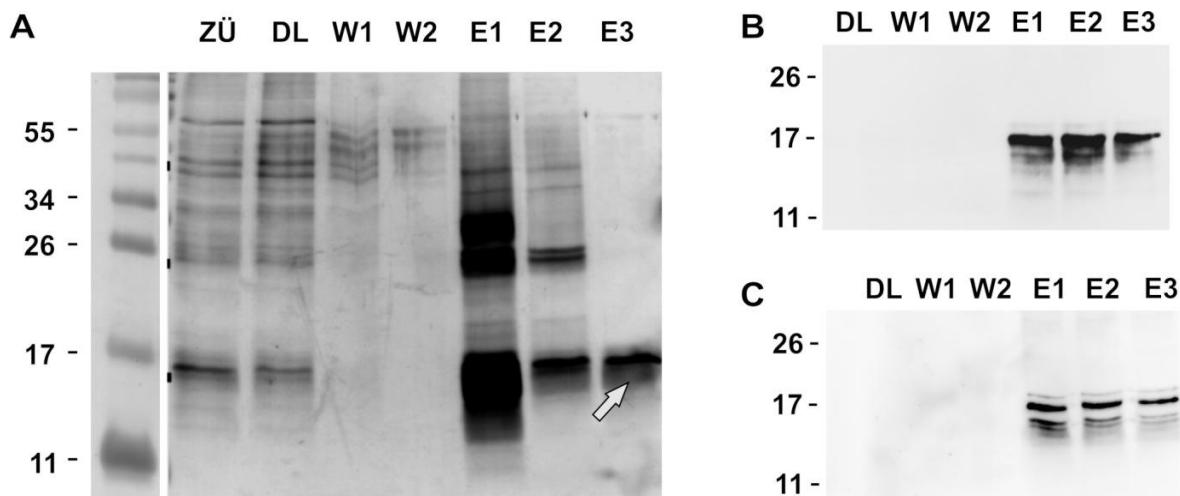


Abb. 5: Aufreinigungserfolg von rhNorrin. A: SDS-PAGE nach Silberfärbung einer repräsentativen Aufreinigung. ZÜ = Zellüberstand, DL = Durchlauf, W1/W2 = Waschschritte, E1-3 = Elutionen. In E3 lag rhNorrin in ausreichender Reinheit und Menge vor (Pfeil). B und C zeigen die Western Blot Analysen der Aufreinigungsfraktionen mit einem anti-rhNorrin (B) und einem anti-His Antikörper (C). Das Molekulargewicht des rekombinanten Proteins liegt bei etwa 17 kDa.

Da das rekombinante Protein sowohl in Zellkulturexperimenten als auch im Tierversuch eingesetzt werden sollte, musste die Salzkonzentration der gereinigten Fraktionen auf eine physiologische Osmolarität angeglichen werden. Dazu wurden Elutionen, die frei von Verunreinigungen waren, gegen PBS dialysiert.

Abschließend wurden zur Bestimmung der Proteinkonzentration quantitative Silbergele von den dialysierten Fraktionen angefertigt (Abb. 6). Hierfür wurden gleichzeitig zu den Eluaten bekannte Konzentrationen an BSA als Proteinstandard

auf die SDS-PAGE aufgetragen. Pro durchgeföhrter Aufreinigung konnte in der Regel 1 ml einer 8 - 30 µg/ml-haltigen rhNorin-Lösung isoliert werden

Ebenfalls durchgeföhrte BCA-Proteinkonzentrationsbestimmungen fielen aufgrund der teilweise zu geringen Proteinmengen zu ungenau aus und waren deshalb nur bedingt aussagekräftig.

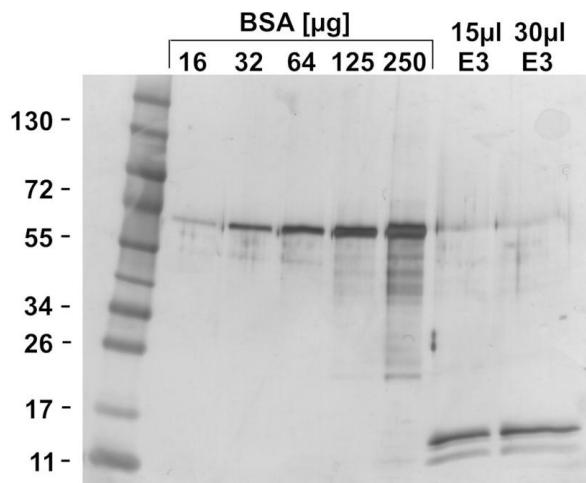


Abb. 6: Konzentrationsbestimmung von rhNorin mittels semiquantitativer Silberfärbung. Aufgetragen wurden eine BSA-Verdünnungsreihe als Mengenstandard und 15 bzw. 30 µl einer aufgereinigten und dialysierten Fraktion.

Nach der erfolgreichen Isolation von rhNorin wurde im Folgenden die Bioaktivität des aufgereinigten Proteins untersucht.

4.1.3 rhNorin aktiviert den klassischen Wnt/β-Catenin-Signalweg in mikrovaskulären Endothelzellen

Aus bisherigen Publikationen ist bekannt, dass Norrin durch die Bindung an den Frizzled 4 (Fzd4)-Rezeptor, den Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (LRP) 5-Korezeptor und Tetraspanin (TSPAN) 12 den kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalweg aktivieren kann (Xu *et al.* 2004, Junge *et al.* 2009).

Um die Bioaktivität von rhNorin zu testen, wurde daher dessen Fähigkeit den Wnt/β-Catenin-Signalweg zu aktivieren überprüft. Da in weiterführenden Experimenten mit mikrovaskulären Endothelzellen gearbeitet werden sollte, wurden hierfür retinale mikrovaskuläre Endothelzellen (HRMEC) herangezogen.

Um eine Erhöhung des β -Catenin-Spiegels im Nukleus zu überprüfen, sollten Kernproteine isoliert und mittels Immunoblot untersucht werden.

Hierzu wurden HRMEC zwei Stunden mit 20 bzw. 40 ng/ml rhNorrin inkubiert. Nach Inkubation wurden die Kernproteine isoliert und in der Western Blot Analyse auf β -Catenin hin untersucht. In unbehandelten Kontrollzellen fand sich ein schwaches, aber spezifisches Signal für β -Catenin. Nach der Stimulation mit rhNorrin zeigte sich ein deutlicher dosisabhängiger Anstieg der Menge an nukleärem β -Catenin in HRMEC (Abb. 7A).

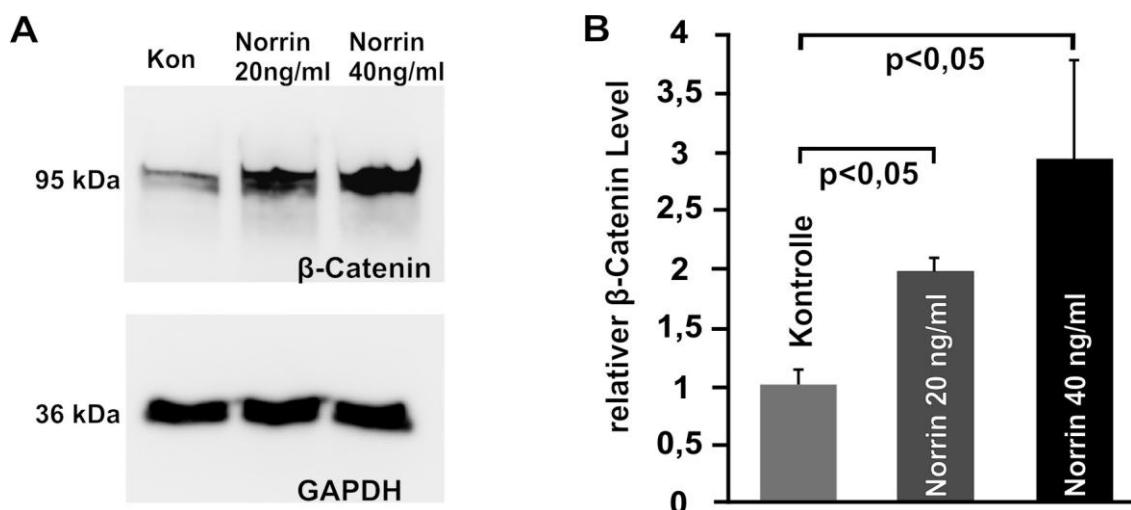


Abb. 7: Norrin aktiviert den klassischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg in HRMEC. A: Repräsentative Western Blot Analyse der nukleären Menge an β -Catenin in HRMEC nach Stimulation mit 20 bzw. 40 ng/ml rhNorrin mit dazugehöriger GAPDH-Ladungskontrolle. B: Densitometrische Auswertung dreier unabhängiger Western Blot Experimente gegen β -Catenin. n = 3, Mittelwert \pm SEM.

Die densitometrische Auswertung ergab, dass die Behandlung mit 20 ng/ml rhNorrin zu einer etwa 1,7-fachen Erhöhung des β -Catenin-Levels in den Zellkernen der Endothelzellen führt. Dieser Anstieg konnte durch die Erhöhung der Konzentration von rhNorrin auf 40 ng/ml nochmals um ca. das Doppelte angehoben werden (Abb. 7B).

In einem parallelen Ansatz wurden nach zweistündiger Behandlung von HRMEC mit rhNorrin (40 ng/ml) immunzytochemische Färbungen mit anti- β -Catenin durchgeführt (Abb. 8). Die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung zeigte, dass das β -Catenin-Signal in den Kontrollzellen relativ schwach war. Durch die Behandlung mit rhNorrin

nahm die Intensität des β -Catenin-Signals, insbesondere im perinukleärem Zytoplasma und im Bereich der fokalen Kontakte, deutlich zu.

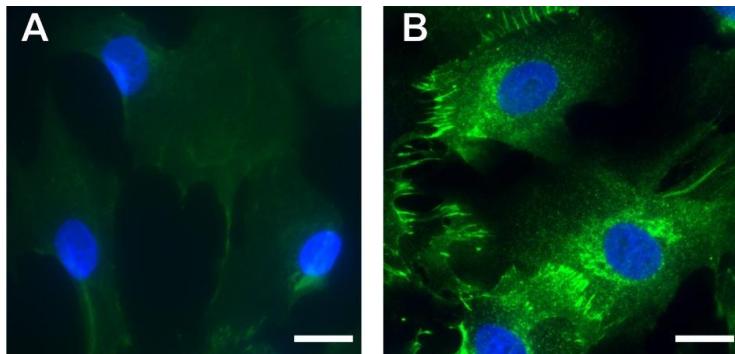


Abb. 8: Immunzytochemische Färbung für anti- β -Catenin (grün) in HRMEC nach 2-stündiger Behandlung mit 40 ng/ml rhNorrin (B) und entsprechend un behandelten Kontrollzellen (A). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Messbalken = 20 μ m.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass rhNorrin den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg in HRMEC aktivieren kann und somit von einer Bioaktivität des aufgereinigten Proteins ausgegangen werden kann.

Nachdem die Bioaktivität von rhNorrin bestätigt werden konnte, sollte nun in weiterführenden Experimenten seine angiogene Wirkung auf Endothelzellen untersucht werden.

4.2 Die angiogene Wirkung von Norrin auf mikrovaskuläre Endothelzellen

Bisherige Untersuchungen an Patienten, die an einem Norrie-Syndrom leiden und die Analyse von Tiermodellen ließen eine angiogene Wirkung von Norrin vermuten (Rehm *et al.* 1997, Richter *et al.* 1998, Rehm *et al.* 2002, Ohlmann *et al.* 2004, Ohlmann *et al.* 2005). Die Bestätigung einer direkten angiogenen Wirkung von Norrin durch funktionelle Analysen in Zellkulturexperimenten fehlte aber bislang.

Durch die folgenden Experimente sollte die angiogene Wirkung von Norrin auf mikrovaskuläre Endothelzellen der Retina (HRMEC) und der Haut (HDMEC) analysiert werden. Hierfür wurde die Wirkung von rhNorrin auf die Proliferation und die Migration von HRMEC und HDMEC untersucht. Zudem wurde analysiert, ob rhNorrin die Bildung kapillarähnlicher Strukturen in HRMEC induzieren kann.

Diese drei Versuchsansätze gelten als typische *in vitro* Angiogenese Assays, die wichtige Hinweise zur Abschätzung des angiogenen Potentials einer Substanz liefern (Folkman und Haudenschild 1980, Auerbach *et al.* 2003).

4.2.1 Norrin induziert die Proliferation von mikrovaskulären Endothelzellen

Die Zellproliferation wurde mit Hilfe des Einbaus des Thymidinanalogs Bromdesoxyuridine (BrdU) in sich teilende Zellen untersucht.

Hierzu wurden HDMEC bzw. HRMEC in 96er-Well-Platten ausgesät und für 24, 36, 48 oder 72 Stunden mit rhNorrin in einer Konzentration von 40 ng/ml inkubiert.

Die Inkubation mit rhNorrin induzierte nach 24 Stunden einen deutlichen proliferativen Effekt, der bis zu 36 Stunden nach Stimulationsbeginn anhielt (HDMEC) bzw. noch gesteigert werden konnte (HRMEC) (Abb. 9). Lediglich in diesem Zeitfenster bewirkte rhNorrin eine klare Zunahme der Proliferationrate. Nach fortgesetzter Behandlung von 48 bis 72 Stunden war der proliferative Effekt von rhNorrin deutlich geringer bzw. nicht mehr nachweisbar.

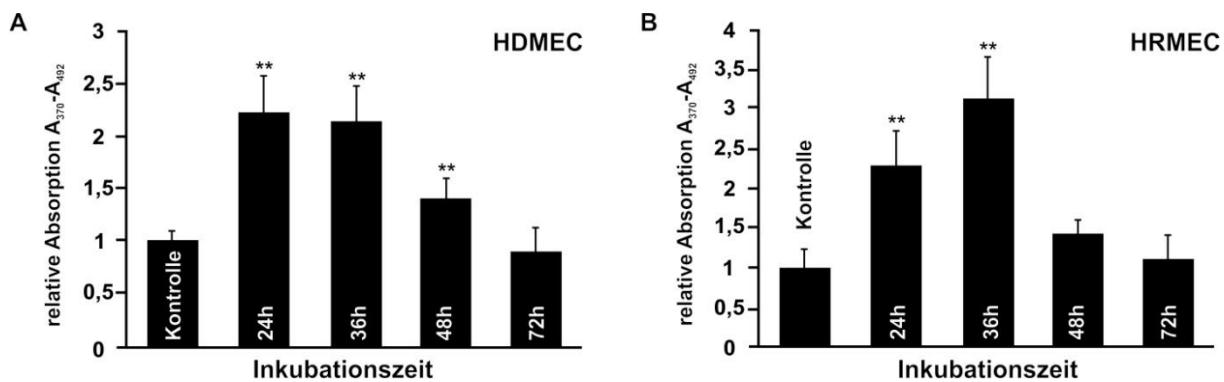


Abb. 9: Norrin fördert die Proliferation mikrovaskulärer Endothelzellen. HDMEC (A) bzw. HRMEC (B) wurden für 24, 36, 48 oder 72 Stunden mit 40 ng/ml rhNorrin inkubiert und die Proliferationsrate mittels BrdU-ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte von jeweils zwei unabhängigen Experimenten. $n = 24$, Mittelwert \pm SEM, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$.

Um zu analysieren, ob die beobachtete Steigerung der Proliferation konzentrationsabhängig ist, wurden in den Folgeversuchen HRMEC und HDMEC 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an rhNorrin behandelt (10, 20 und 40 ng/ml).

Bereits ab einer Konzentration von 10 ng/ml rhNorrin zeigte sich eine geringe, aber signifikante Zunahme der Proliferation, die durch Erhöhung der rhNorrin-Konzentration weiter anstieg. Letztlich konnte die Behandlung mit 40 ng/ml rhNorrin die Proliferationsrate bei beiden Zelllinien um mehr als Doppelte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen steigern (Abb. 10).

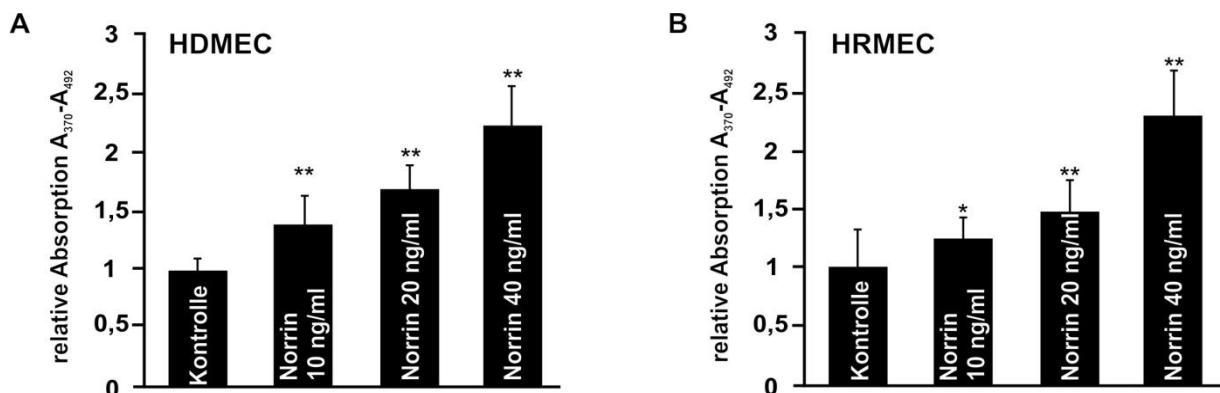


Abb. 10: rhNorrin induziert die Proliferation mikrovaskulärer Endothelzellen konzentrationsabhängig. HRMEC bzw. HDMEC wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von rhNorrin (10 bis 40 ng/ml) inkubiert und die Proliferationsrate mittels BrdU-ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte von zwei (HDMEC) bzw. drei (HRMEC) unabhängigen Experimenten. HDMEC: $n = 12$, HRMEC: $n = 36$, Mittelwert \pm SEM, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$.

4.2.2 Norrin vermittelt seinen proliferativen Effekt in HRMEC über die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalweges

Um zu untersuchen, ob die durch Norrin induzierte gesteigerte Proliferation über den kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalweg vermittelt wird, wurde die Fzd-Signaltransduktion mit Hilfe des LRP5/6-Inhibitors Dickkopf-1 (DKK-1) gehemmt. DKK-1 bindet an den Fzd Korezeptor LRP5/6 und leitet so dessen Internalisierung ein. Dadurch wird die Bildung eines aktiven Fzd/LRP-Rezeptorkomplexes und somit die Signaltransduktion in die Zelle verhindert (Mao *et al.* 2001, Zorn 2001).

Hierfür wurden HRMEC 24 Stunden mit 40 ng/ml rhNorrin, 100 ng/ml DKK-1 oder einer Kombination aus beiden inkubiert. Nach 24-stündiger Inkubation mit rhNorrin alleine fand sich erwartungsgemäß eine deutliche Steigerung der Proliferation. Demgegenüber konnte durch die zusätzliche Behandlung mit DKK-1 die Norrin-induzierte Proliferation nahezu vollständig aufgehoben werden (Abb. 11). DKK-1 alleine hatte keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen.

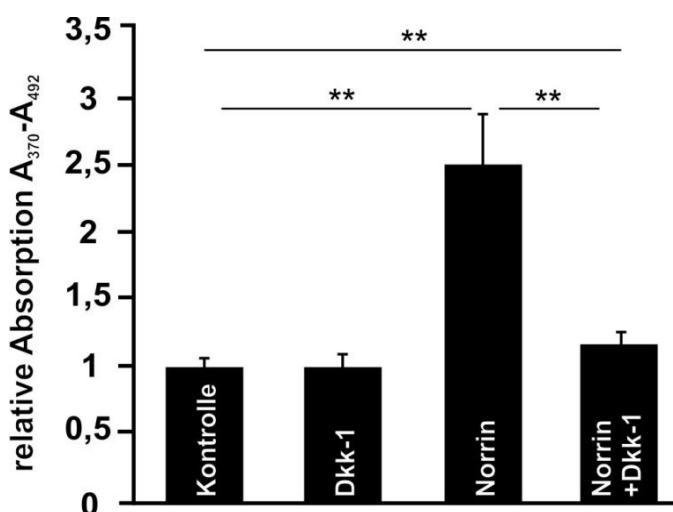


Abb. 11: Die durch Norrin-induzierte Proliferation von HRMEC kann durch DKK-1 gehemmt werden. HRMEC wurden für 24 Stunden mit rhNorrin (40 ng/ml), mit DKK-1 (100 ng/ml) oder einer Kombination aus beiden inkubiert. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. $n = 18$, Mittelwert \pm SEM, **: $p < 0,001$.

4.2.3 Norrin steigert die Viabilität von Endothelzellen *in vitro*

Um den Einfluss von rhNorrin auf die Stabilität von mikrovaskulären Endothelzellen zu untersuchen, wurden Analysen mit dem wasserlöslichen Tetrazoliumsalz WST-1 (water soluble tetrazolium) nach Behandlung mit rhNorrin durchgeführt. Durch die Umsetzung von WST-1 (schwach rot) in sein Formazan (dunkelrot), katalysiert durch das mitochondriale Succinat-Tetrazolium Dehydrogenase System, wird eine intakte Atmungskette nachgewiesen, was Aufschluß über die Viabilität der Zellen gibt.

Hierfür wurden HDMEC bzw. HRMEC für 72 bzw. 144 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von rhNorrin (10, 20 und 40 ng/ml) behandelt. Bei einer Inkubation von 144 Stunden wurde dem Medium nach drei Tagen erneut rhNorrin zugegeben. Nach 72-stündiger Inkubation zeigten beide Zelllinien eine gesteigerte Viabilität der rhNorrin-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 12). Dies bedeutete bei einer Inkubation mit 10 ng/ml Norrin bereits eine Steigerung von etwa 30 %. Die Viabilität der Zellen erhöhte sich dosisabhängig mit zunehmender rhNorrin-Konzentration. Bei 40 ng/ml rhNorrin fanden sich fast doppelt so viele vitale Zellen als bei den unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 12). Diese Unterschiede erwiesen sich als statistisch hoch signifikant.

Nach einer 144 Stunden dauernden Inkubation zeigten rhNorrin-behandelte Zellen ebenfalls eine erhöhte Überlebensrate, allerdings war dieser Effekt bei HDMEC wesentlich geringer ausgeprägt verglichen mit den 72 Stunden Werten (Abb. 12A) HRMEC dagegen zeigten keinen deutlichen Unterschied zwischen der Behandlungsdauer von 72 und 144 Stunden (Abb. 12B).

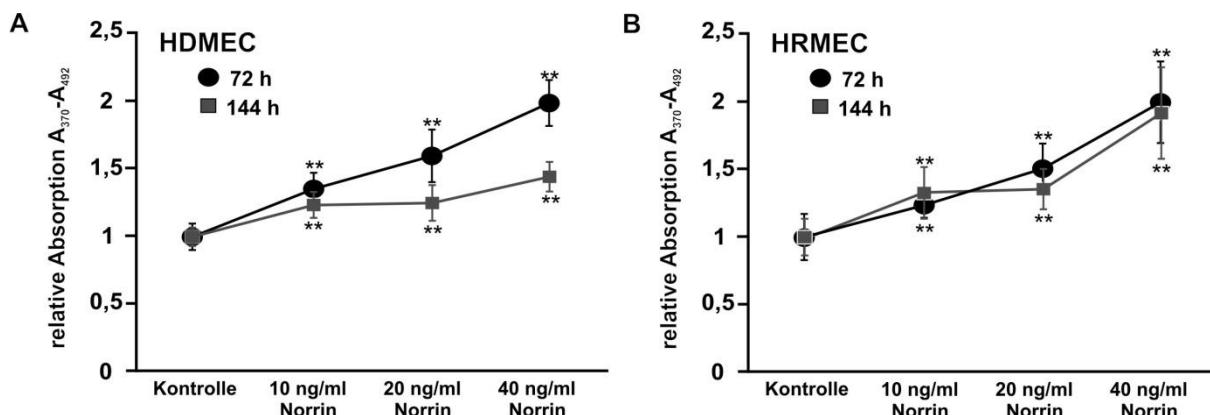


Abb. 12: Norrin steigert die Viabilität mikrovaskulärer Endothelzellen. HDMEC (A) und HRMEC (B) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an rhNorrin (10 bis 40 ng/ml) inkubiert und die Viabilität der Zellen nach 72- bzw. 144-stündiger Inkubation mittels WST-1 bestimmt. Gezeigt sind die Ergebnisse von jeweils drei unabhängigen Experimenten. n = 36, Mittelwert \pm SEM, **: p < 0,001.

Um die mittels WST-1-Assay gewonnenen Daten in einer weiteren unabhängigen Untersuchung zu bestätigen, wurden Zellzählungen nach 72- und 144-stündiger Inkubation mit rhNorrin durchgeführt (Abb. 13). Bei beiden Zelllinien konnten erhöhte Gesamzellzahlen in Abhängigkeit von der Norrin-Konzentration gemessen werden. Bei einer Inkubation mit 40 ng/ml Norrin fanden sich nach 72-stündiger Behandlung

ca. 70 % mehr Zellen, nach 144 Stunden ca. 40 %. Somit stützen die Zellzahlbestimmungen die mittels WST-1 erhobenen Daten. Des Weiteren wurde bestätigt, dass ein Anstieg der Stoffwechselrate auch tatsächlich mit einer erhöhten Zellzahl korrelierte.

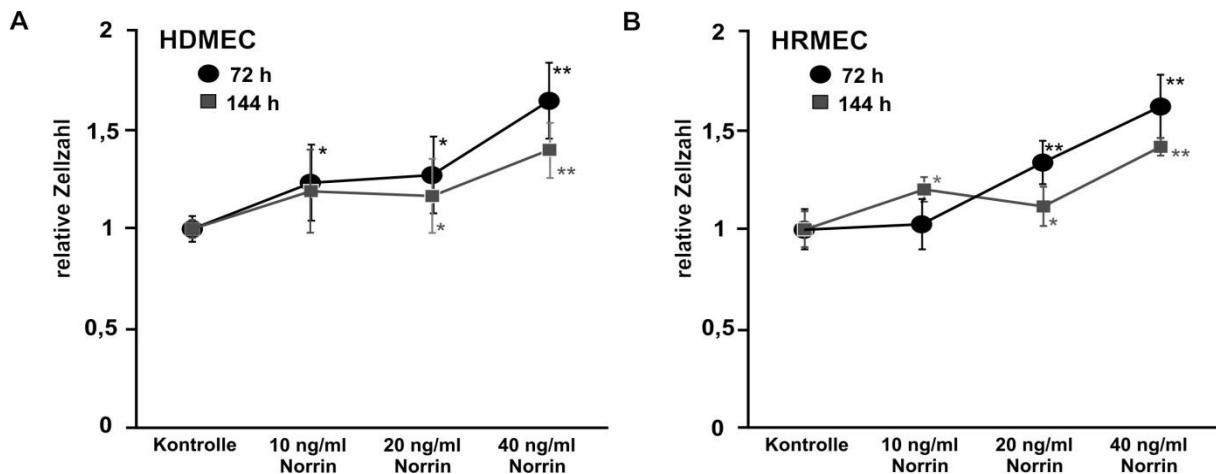


Abb. 13: Norrin erhöht die Anzahl vitaler mikrovaskulärer Zellen nach Serumzug. HDMEC und HRMEC wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von rhNorrin (10 - 40 ng/ml) inkubiert und nach 72 bzw. 144 Stunden die Zellzahl bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte von jeweils zwei unabhängigen Experimenten. $n = 16$, Mittelwert \pm SEM, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$.

4.2.4 Norrin induziert die Migration von mikrovaskulären Endothelzellen

Neben der Proliferation ist die Migration von Endothelzellen ein weiterer wichtiger Parameter zur Untersuchung der angiogenen Eigenschaften von Norrin *in vitro*. Deshalb wurden in den nachfolgenden Experimenten die Auswirkungen einer Norrin-Stimulation auf das Migrationsverhalten von Endothelzellen untersucht. Sämtliche Migrationsstudien wurden in Form von *in vitro* Wundheilungstests, den sog. Scratch Assays, durchgeführt. Hierfür wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze Läsionen („scratch“) in den konfluenten Zellrasen von HDMEC und HRMEC gekratzt. Die Zellen wurden 24 Stunden mit oder ohne 40 ng/ml rhNorrin im Medium inkubiert. Für die Auswertung der Migration wurden zum Zeitpunkt Null und am Ende der Inkubation phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Läsionsfläche gemacht und daraus die relative Migrationsfläche (ΔA) errechnet.

4.2.4.1 Norrin stimuliert die Migration von HDMEC *in vitro*

Zunächst wurden mit Läsionen versehene konfluente Monolayer von HDMEC mit rhNorrin (40 ng/ml) behandelt. Nach 24 Stunden fiel bereits bei der Betrachtung der Zellen durch das Phasenkontrastmikroskop ein deutlicher Unterschied im Migrationsverhalten von rhNorrin-behandelten und unbehandelten Zellen auf (Abb. 14A, B). Nach 24-stündiger Inkubation war die Migrationsfront von behandelten Zellen weiter in den Läsionsbereich vorgedrungen als bei den entsprechenden Kontrollen. Auch fand sich bei Norrin-behandelten Zellen eine verstärkte Einwanderung einzelner Zellen in den Läsionsbereich (Abb. 14A, B).

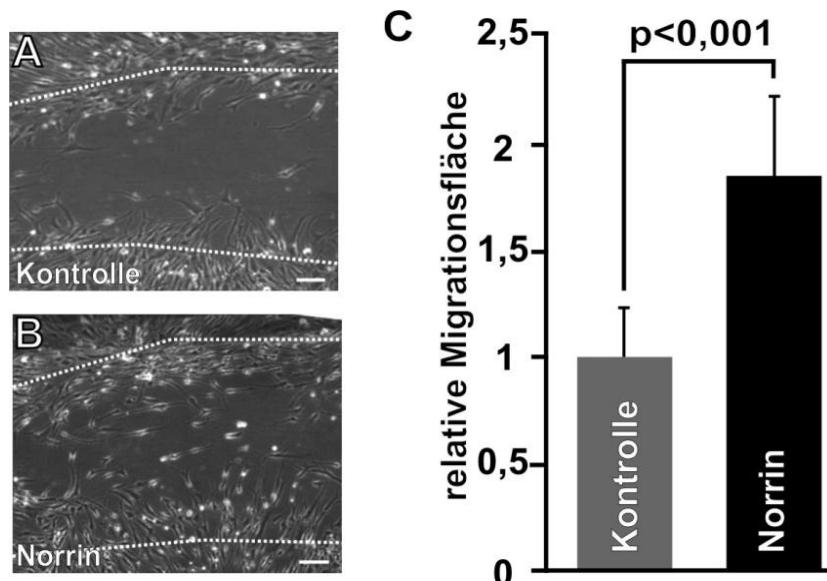


Abb. 14: Norrin induziert die Migration von HDMEC. Exemplarische phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen des *in vitro* Wundheilungstests bei HDMEC nach 24 Stunden Inkubation ohne (A) und mit rhNorrin (40 ng/ml) (B). Messbalken = 100 μ m, weiß gestrichelte Linie = Läsionsfront bei Versuchsbeginn. C: Auswertung der Migrationsflächen. Gezeigt ist die Zusammenfassung dreier unabhängiger Experimenten. n = 30, Mittelwert \pm SEM.

Die semiquantitative Analyse der Läsionsbilder zeigte durch die Inkubation mit rhNorrin einen signifikanten Anstieg der durchschnittlichen Migration um ca. 80 % im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen (Abb. 14C).

4.2.4.2 Norrin stimuliert die Migration von HRMEC *in vitro*

Auch an HRMEC wurde der Einfluss von Norrin auf die Migration der Zellen im *in vitro* Wundheilungstest untersucht. Wieder wurden die Zellen nach dem Setzen der Läsionen mit 40 ng/ml rhNorrin inkubiert und der Fortschritt der Migration nach 24 Stunden analysiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle.

Bei HRMEC fiel ebenfalls bei der rein qualitativen Begutachtung der Läsionen nach Behandlung mit rhNorrin für 24 Stunden auf, dass die Endothelzellen weiter in den Läsionsbereich eingewandert waren als bei entsprechenden Kontrollen. Insgesamt waren die Ergebnisse hier aber weniger deutlich als bei vergleichbaren Experimenten mit HDMEC. Dennoch zeigte die semiquantitative Auswertung der Migrationsfläche eine hochsignifikante Zunahme der Migration von mehr als 40 % im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 15A, B, D).

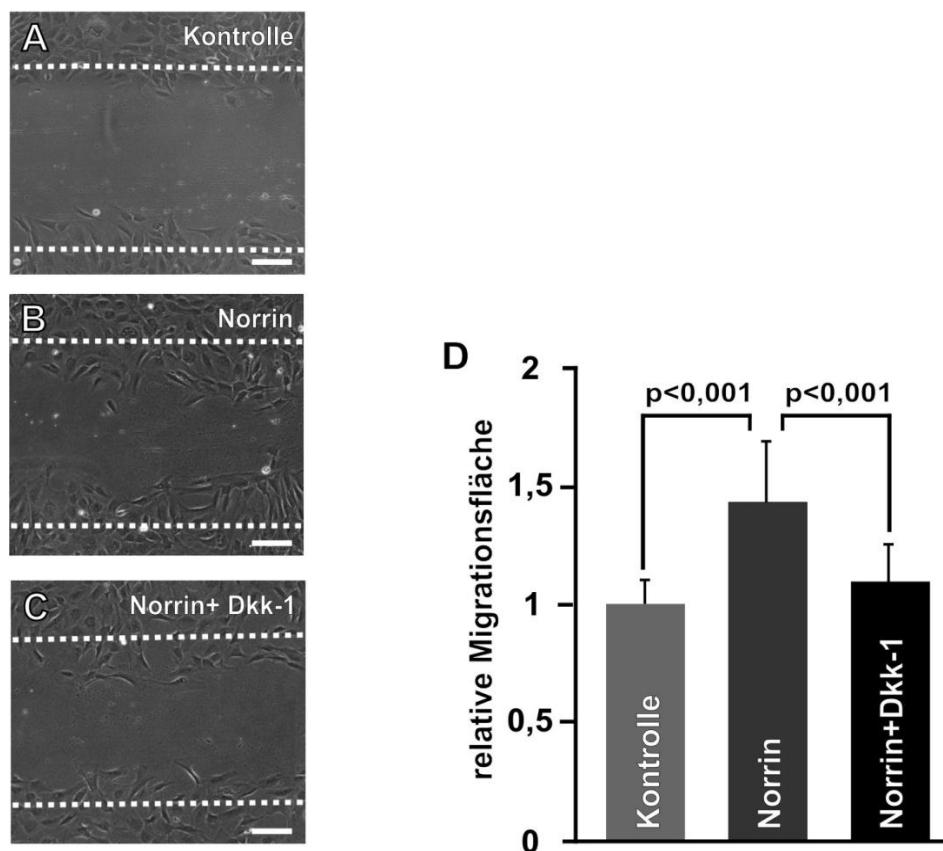


Abb. 15: Norrin induziert die Migration von HRMEC. Exemplarische phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen des *in vitro* Wundheilungstests bei HRMEC nach 24 Stunden Inkubation ohne (A), mit rhNorrin (40 ng/ml) (B) und einer Kombination aus rhNorrin und DKK-1 (100 ng/ml) (C). Messbalken = 100 μ m, weiß gestrichelte Linie = Läsionsfront bei Versuchsbeginn. D: Semiquantitative Auswertung der Migrationsflächen. Gezeigt ist die Zusammenfassung aus drei unabhängigen Experimenten. n = 30, Mittelwert \pm SEM.

Um zu untersuchen, ob die Norrin-vermittelte Migration über den kanonischen Wnt-Signalweg aktiviert wird, wurden die Zellen zusätzlich mit dem LRP-Inhibitor Dickkopf-1 (DKK-1, 100 ng/ml) inkubiert.

HRMEC, die zusätzlich mit DKK-1 behandelt wurden, zeigten ein deutlich verringertes Migrationsverhalten als nur mit rhNorrin behandelte Zellen. Im Verhältnis zu unbehandelten Zellen fand sich lediglich eine um ca. 10 % gesteigerte Migration. Die verminderte Migration von rhNorrin/DKK-1-behandelten Zellen erwies sich im Vergleich zu nur mit rhNorrin-behandelten Zellen als statistisch hoch signifikant (Abb. 15B, C, D).

Wie bereits zuvor beschrieben, übte Norrin einen proliferativen Effekt auf HRMEC aus. Deshalb sollte überprüft werden, ob die beobachteten Ergebnisse des Scratch-Assays tatsächlich auf migrative Prozesse zurückzuführen sind. Hierfür wurden HRMEC zusätzlich zur rhNorrin-Behandlung mit 5 µg/ml des Zytostatikums Mitomycin C, das zur nahezu vollständigen Hemmung der Zellteilung führt, behandelt.

Bei diesem Versuch können die allein mit Mitomycin C behandelten Zellen als Kontrollen zu den Mitomycin C plus rhNorrin-behandelten Zellen gesehen werden. Obwohl es bei mit Mitomycin C inkubierten Zellen zu einer geringen Abnahme der absoluten Migration um etwa 10 % kommt, verändert sich das Verhältnis der Migrationsfläche innerhalb der Gruppen zwischen Kontrollen und Norrinbehandlung kaum (Abb. 16). Norrin-stimulierte Zellen zeigten weiterhin eine um ca. 33 % erhöhte Migration im Vergleich zu entsprechend „unbehandelten“ Kontrollzellen. Die oben beobachteten Effekte können also als echte Migration gewertet werden.

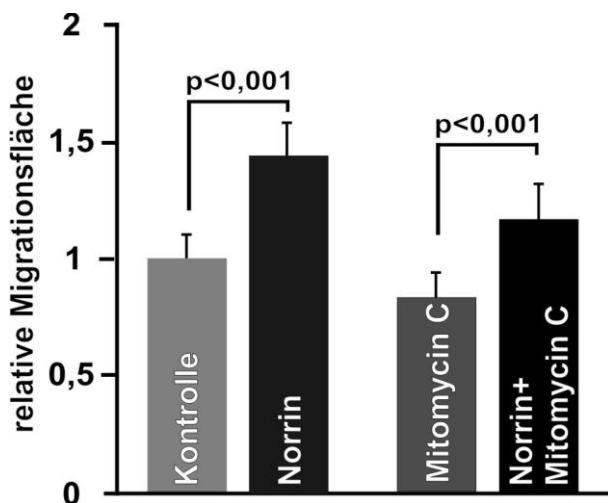


Abb. 16: Quantifizierung der Migration von HRMEC nach 24 Stunden Inkubation mit 40 ng/ml rhNorrin alleine oder 40 ng/ml rhNorrin mit 5 µg/ml Mitomycin C im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen. Gezeigt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten. $n = 20$, Mittelwert \pm SEM.

Zusammenfassend fand sich sowohl bei HDMEC als auch bei HRMEC nach Behandlung mit Norrin eine gesteigerte Migration. Die erhobenen Daten deuten darauf hin, dass diese Norrin-induzierte Migration durch die Aktivierung des kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalwegs vermittelt wird.

4.2.5 Norrin fördert die Bildung kapillarähnlicher Strukturen *in vitro* („Tube Formation“)

Nachdem zentrale funktionelle Prozesse von Endothelzellen während der Angiogenese, wie das Proliferations- und Migrationsverhalten sowie das Überleben der Zellen und der Einfluss von Norrin hierauf *in vitro* untersucht worden waren, sollte nun überprüft werden, ob Norrin die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen, die sog. Tube Formation, fördern kann. Hierfür wurde ein etabliertes Verfahren verwendet, bei dem die mikrovaskulären Endothelzellen auf eine extrazelluläre Matrix ausgesät werden, in der die Menge an Wachstumsfaktoren nahezu vollständig reduziert ist (Growth Factor Reduced Matrigel). Die kapillarähnlichen Endothelformationen wurden morphometrisch analysiert und quantifiziert. Als kapillarähnliche Strukturen wurden nur die Formationen gewertet, die einen Durchmesser von mindestens 28 µm aufwiesen.

Nach 24-stündiger Kultivierung von HRMEC auf Matrigel zeigte sich sowohl bei unbehandelten als auch bei Norrin-behandelten Zellen ein Geflecht aus Endothelstrukturen (Abb. 17). In unbehandelten Kulturen fanden sich feine

Zellfortsätze zwischen den HRMEC im Sinne von Zell-Zell-Kontakten und wenige Zusammenschlüsse von Endothelzellen im Sinne von kapillarähnlichen Strukturen (Abb. 17A, B). Demgegenüber sah man nach der Behandlung mit rhNorrin eine deutliche Zunahme von kapillarähnlichen Strukturen, die sich aus einem Zusammenschluß von Endothelzellen ausbilden (Abb. 17C, D).

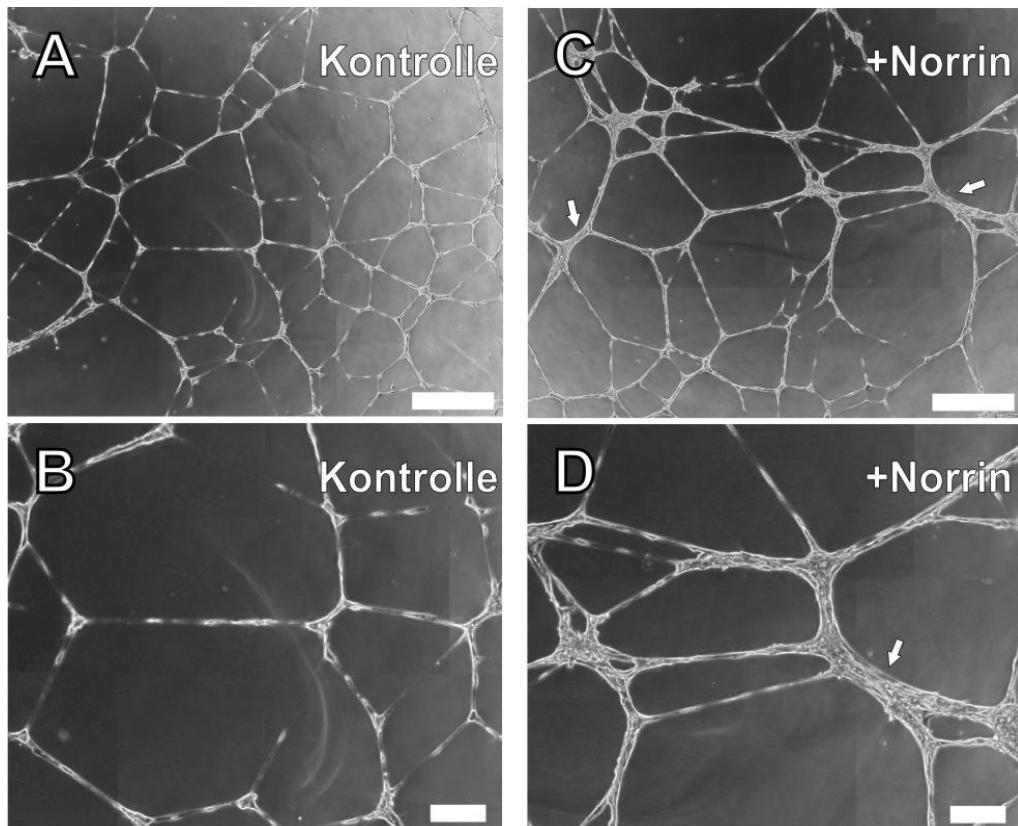


Abb. 17: Norrin induziert die Bildung kapillarähnlicher Strukturen von HRMEC *in vitro*. Exemplarische phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen des *in vitro* Angiogenesetests. Nach 24-stündiger Kultivierung von HRMEC auf Matrikel ohne (A, B) und mit (C, D) rhNorrin (40 ng/ml). Zusammenschlüsse der Zellen im Sinne von kapillarähnlichen Strukturen (Pfeile) waren deutlich vermehrt bei rhNorrin-behandelten Zellen. Messbalken = 400 µm (A, C) bzw. 100 µm (B, D).

Norrin-behandelte Zellen bildeten durchschnittlich Tubes mit einer Länge von ca. 32 mm pro cm² Kultivierungsfläche, während bei unbehandelten Zellen lediglich eine Länge von ca. 19 mm pro cm² beobachtet werden konnte. Somit fand sich bei Norrin-behandelten Zellen eine deutliche Längenzunahme für kapillarähnliche Strukturen von ca. 70 % gegenüber unbehandelten Kontrollen (Abb. 18A). Auch bei der Auswertung der Fläche der kapillarähnlichen Strukturen zeigten Norrin-behandelte

Zellen mit ca. $1,4 \text{ mm}^2$ pro cm^2 Kultivierungsfläche eine deutliche Zunahme der Formationen um ca. 100 % gegenüber unbehandelten Zellen mit $0,7 \text{ mm}^2$ pro cm^2 Kultivierungsfläche (Abb. 18B). Dieser Unterschied erwies sich als statistisch signifikant.

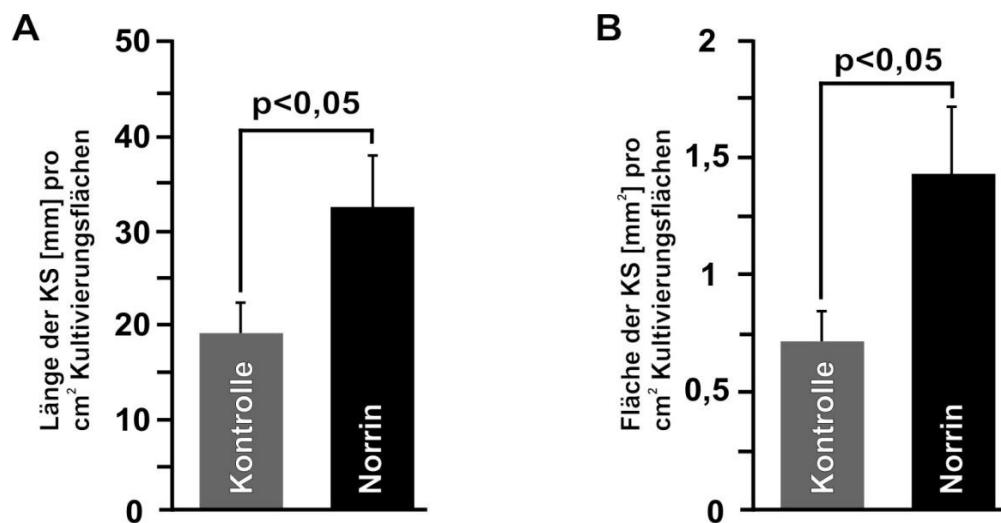


Abb. 18: Quantifizierung der Länge (A) und Fläche (B) von kapillarähnlichen endothelialen Strukturen (KS) nach 24 Stunden Inkubation mit 40 ng/ml rhNorin im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. $n = 9$, Mittelwert \pm SEM.

Zur Analyse, ob die untersuchten kapillarähnlichen Strukturen tatsächlich ein Lumen aufweisen und somit wirklich als kapillarähnlich gewertet werden können, wurden Semidünnschnitte der endothelialen Strukturen angefertigt. Diese ließen eine deutliche Lumenbildung innerhalb der Strukturen erkennen (Abb. 19).



Abb. 19: Die durch Norrin induzierten kapillarähnlichen Strukturen weisen ein Lumen auf. Exemplarischer Semidünnschnitt einer kapillarähnlichen endothelialen Struktur nach 24-stündiger Inkubation mit 40 ng/ml rhNorrin. E = Endothelzellen, L = Lumen; Messbalken = 10 μm .

4.3 Wirkung von Norrin bei akutem Netzhautschaden

Norrin-defiziente (*Ndp^{Y-1}*) Mäuse zeigen neben dem vaskulären Phänotyp auch einen chronischen Verlust retinaler Ganglienzellen (RGC) (Richter *et al.* 1998). Da dieser Verlust durch die Kreuzung mit Tieren, die eine Überexpression von ektopen Norrin unter der Kontrolle des linsenspezifischen β B1-Crystallin-Promoters aufweisen, komplett aufgehoben wird (Ohlmann *et al.* 2005), sollte die Funktion von Norrin im Rahmen einer akuten Schädigung der retinalen Ganglienzellen untersucht werden.

4.3.1 NMDA induziert eine konzentrationsabhängige Schädigung retinaler Ganglienzellen

Zur akuten Schädigung retinaler Ganglienzellen wurde das Modell der exzitotoxischen Schädigung durch NMDA an der Maus verwendet.

Hierfür wurde das synthetische Glutamat analogon NMDA intravitreal ins Mausauge injiziert, welches dort an Ionenkanal-gekoppelte NMDA-Glutamat-Rezeptoren bindet und diese somit dauerhaft öffnet. Dies führt zu einem exzessiven Ca^{2+} -Influx, was letztendlich eine Apoptose induziert (Shen *et al.* 2006). NMDA-Rezeptoren kommen im Auge fast ausschließlich in den retinalen Ganglienzellen vor, wodurch der gesetzte Schaden relativ spezifisch ist, lediglich eine Subpopulation von amakrinen Zellen exprimiert neben den Ganglienzellen NMDA-Rezeptoren (Jakobs *et al.* 2007). Da der dosisabhängige Verlust neuronaler Zellen nach intravitrealer NMDA-Injektion auf apoptotische Vorgänge zurückgeführt werden kann (Li *et al.* 1999), wurden zunächst je 3 μl unterschiedlicher Konzentrationen an NMDA (1, 10, 50 und 100 mM) in den Gläskörper von Bl6/c57 Mäusen injiziert und der verursachte Schaden 24 Stunden nach der Injektion mittels TUNEL-Analyse beurteilt.

Die Injektion von 1 mM NMDA zeigte nur eine geringe Anzahl TUNEL-positiver Zellen in der retinalen Ganglienzellschicht und der inneren Körnerschicht. Erst ab einer Konzentration von 10 mM waren mehr als 50 % der Zellen in der Ganglienzellschicht apoptotisch, was einer substantiellen Schädigung entspricht. Bei einer weiteren Steigerung der NMDA-Konzentration auf 50 mM bzw. 100 mM waren nahezu sämtliche Zellen der Ganglienzellschicht TUNEL-positiv.

Das Ziel der Untersuchungen war, einen möglichen protektiven Effekt von Norrin nachzuweisen, deshalb sollte ein deutlicher und reproduzierbarer, aber kein absoluter Verlust der Axone induziert werden. Aus diesem Grund wurden bei allen

weiteren Versuchen 3 μ l einer 10 mM NMDA-Lösung intravitreal ins Mausauge injiziert.

4.3.2 Norrin verhindert die NMDA-induzierte Apoptose retinaler Ganglienzellen

Um zu untersuchen, ob Norrin einen Effekt auf die durch NMDA-induzierte Apoptose der retinalen Ganglienzellen hat, wurde NMDA in Kombination mit 5 ng/ μ l rhNorrin intravitreal injiziert. Das Partnerauge erhielt lediglich eine NMDA-Injektion. Zusätzlich erhielten Kontrolltiere eine alleinige PBS-Injektion.

24 Stunden nach Behandlung wurden die Augen enukleiert und in Paraffin eingebettet. In den davon angefertigten Sagittalschnitten des Auges wurden die apoptotischen Zellkerne mittels TUNEL-Analyse markiert.

Nach Injektion von PBS sah man vereinzelte TUNEL-positive Zellen in der äußeren Körnerschicht, vermutlich auf Grund von spontanen Apoptosen der Photorezeptoren. In der Ganglienzellschicht und der inneren Körnerschicht fanden sich keine apoptotischen Zellen (Abb. 20A).

Nach NMDA-Injektion zeigte sich erwartungsgemäß eine hohe Anzahl TUNEL-positiver Zellen sowohl in der Ganglienzellschicht als auch in der inneren Körnerschicht. Durch die gleichzeitige Injektion von rhNorrin war die Anzahl an apoptotischen Zellen in beiden Netzhautschichten deutlich geringer (Abb. 20B, C). Die Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl in der Ganglienzellschicht zeigte, dass durch NMDA-Injektion in etwa bei 65 % der Zellen eine Apoptose induziert wurde. Durch die zusätzliche rhNorrin-Behandlung konnte diese Anzahl um ca. 30 % reduziert werden (Abb. 20D).

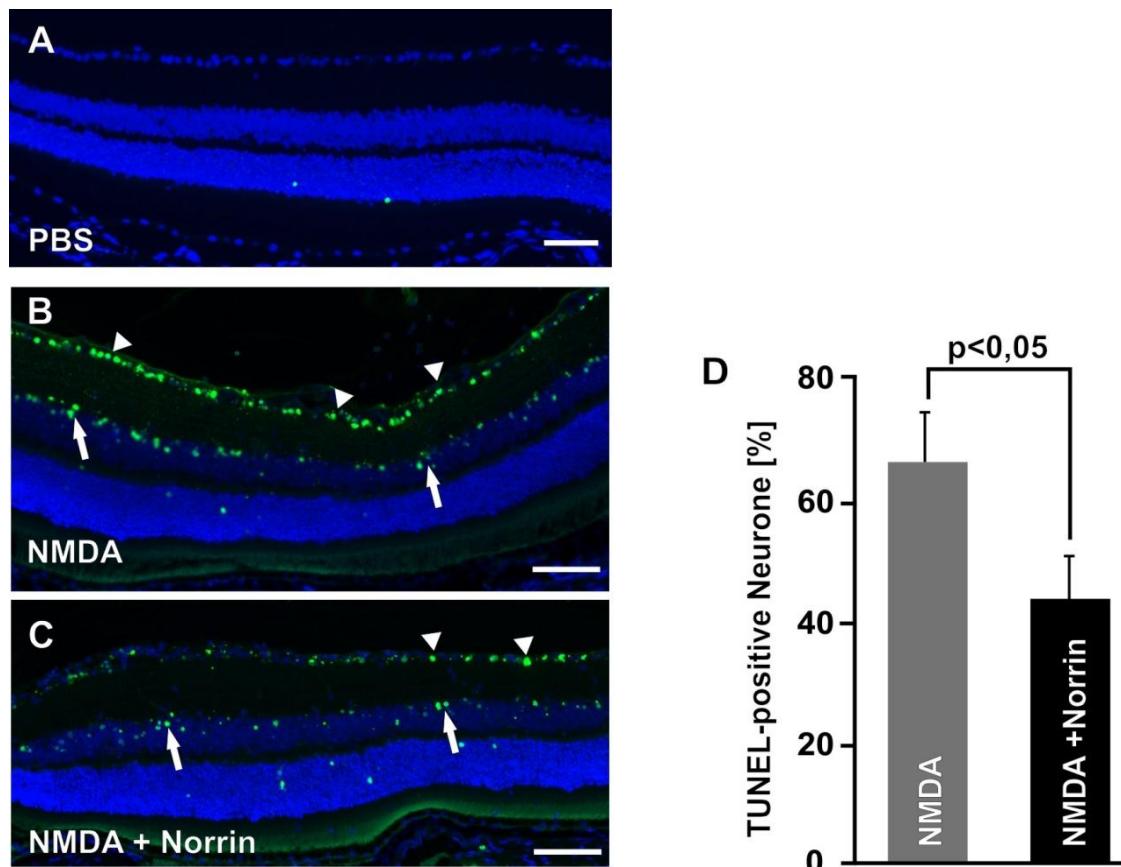


Abb. 20: Norrin vermindert die Anzahl NMDA-induzierter Apoptosen in den retinalen Neuronen. A-C: TUNEL-Färbung sagittaler Schnitte der Retina 24 Stunden nach intravitrealer Injektion. Erwartungsgemäß zeigte die Injektion von 3 μ l PBS in den Glaskörper lediglich spontane Apoptosen der Photorezeptoren (A). Nach Injektion von NMDA (10 mM) fanden sich sowohl in der Ganglienzellschicht (Pfeilspitzen), als auch in der inneren Körnerschicht (Pfeile) TUNEL-positive Zellen (B, C). Die Anzahl positiver Zellen wurde durch die zusätzliche Injektion von rhNorrin (5 ng/ μ l) schon mikroskopisch deutlich reduziert (C). grün: TUNEL-positive Zellen, blau: DAPI-Färbung, Messbalken = 50 μ m. Die Anzahl an TUNEL-positiven Zellen wurde an Sagittalschnitten quantifiziert und auf die Gesamtzahl an Zellen der Ganglienzellschicht bezogen. Durch die zusätzliche Injektion von rhNorrin wurde die Anzahl an apoptotischen Zellen in der Ganglienzellschicht um etwa 30 % reduziert (D). n = 5, Mittelwert \pm SEM.

4.3.3 Norrin verhindert den NMDA-induzierten exzitotoxischen Verlust von retinalen Ganglienzellen

Um den tatsächlichen Umfang der Norrin-vermittelten Protektion auf retinale Ganglienzellen abschätzen zu können, wurde in den Folgeexperimenten die Gesamtzahl der Axone im *Nervus opticus* nach NMDA-Injektion mit und ohne rhNorrin bestimmt.

Da retinale Ganglienzellen in der Netzhaut sehr unterschiedlich verteilt sind, wurde, um das absolute Ausmaß der Schädigung zu analysieren, die Gesamtanzahl der Axone im *N. opticus* nach intravitrealer Injektion von NMDA bestimmt.

Drei Wochen nach NMDA- und NMDA/rhNorrin-Injektion wurden die Augen präpariert und Semidünnschnitte der *N. optici* angefertigt. Als Kontrollen wurden zusätzlich Tiere nur mit PBS injiziert, um die Anzahl von Axonen ohne NMDA-Behandlung einschätzen zu können (Abb. 21A, B). Nach Injektion von PBS fand sich das Bild eines gesunden *N. opticus*. Die Axone lagen gleichförmig und dicht nebeneinander. Der Anteil an glialem Gewebe im Nerv war gering und die Myelinscheiden der Axone erschienen gleichmäßig gefärbt und intakt. Demgegenüber zeigten *N. optici* von NMDA-behandelten Augen ausgedehnte gliale Narbenfelder (Sterne in Abb. 21D) sowie einen massiven Verlust an Axonen. Zusätzlich fanden sich eine Vielzahl von intensiv gefärbten Axonen. Nach der zusätzlichen Injektion von rhNorrin fiel bereits bei der lichtmikroskopischen Betrachtung auf, dass die Fläche glialer Vernarbung und auch der Verlust an Axonen wesentlich geringer war, als bei den nur mit NMDA behandelten *N. optici* (Abb. 21C-F). Auch bei NMDA/rhNorrin behandelten Augen fanden sich Axone, deren Myelinscheiden intensiver anfärbten. In der elektronenmikroskopischen Betrachtung zeigte sich in der überwiegenden Anzahl der Axone eine intakte Struktur mit Mitochondrien und Neurofilamenten, so dass hier von gesunden Axonen ausgegangen wurde (Abb. 21G). Die intensivere Färbung mancher Axone deutete auf eine Schädigung der Axone und die damit verbundenen Umbauprozesse der Myelinscheiden hin (Abb. 21D,F und H).

Zur Quantifizierung des Schadens wurde die gesamte Anzahl an Axonen in allen drei Versuchsgruppen ermittelt. Hierbei fand sich in Sehnerven von nur mit PBS injizierten Augen eine Gesamtzahl an Axonen von ca. 42000. Drei Wochen nach Injektion von NMDA reduzierte sich die Anzahl der Axone auf ca. 11000, was in etwa einem Viertel der Ausgangszahl bei PBS-injizierten Kontrollaugen entsprach. Bei gleichzeitiger zusätzlicher Injektion von rhNorrin überlebten, verglichen mit alleiniger NMDA Behandlung des Auges, etwa 80 % mehr Axone (Abb. 21E). Dieser durch rhNorrin induzierte Effekt war signifikant.

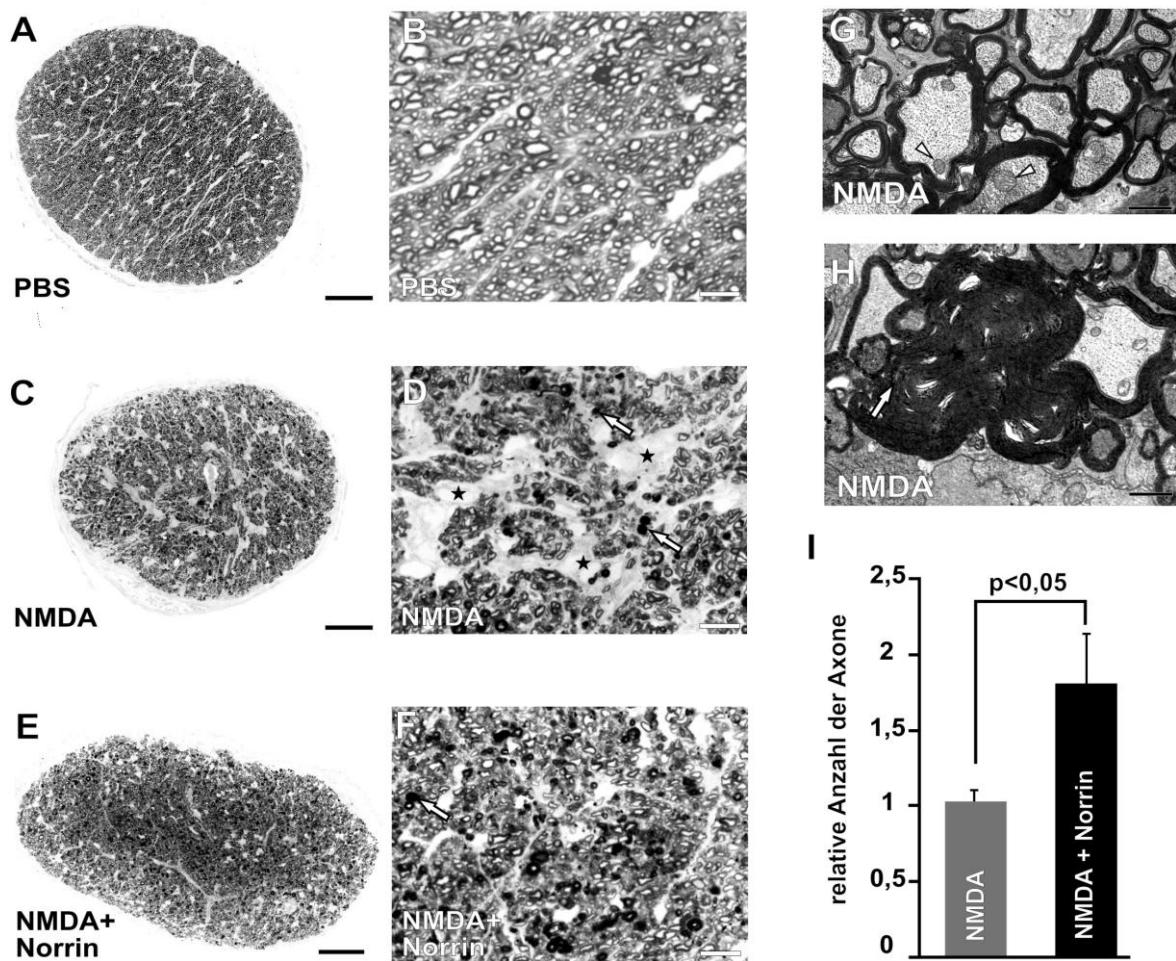


Abb. 21: Norrin vermindert den NMDA-induzierten Verlust von retinalen Ganglienzellen. A-F: Exemplarische sagittale Semidünnschnitte durch den *Nervus opticus*. Nach Injektion von 3 μ l PBS in den Glaskörper zeigte die lichtmikroskopische Betrachtung keine Auffälligkeiten in der Morphologie des *N. opticus*. Die Anzahl an Axonen betrug in etwa 42000 (A, B). Im Vergleich dazu fielen drei Wochen nach intravitrealer Injektion von NMDA (10mM) (C, D) oder von NMDA plus Norrin (5 ng/ μ l) (E, F) die Areale glialer Vernarbung (Sterne) und der massive Verlust an Axonen auf. Beides war nach zusätzlicher rhNorin-Injektion wesentlich geringer und näherte sich schon fast dem Ausgangszustand an. In den beiden NMDA Versuchsgruppen findet man Axone, die eine intensivere Färbung ihrer Myelinscheide aufweisen, was auf eine Degeneration der Markscheiden nach Degeneration der retinalen Ganglienzellen hindeutet. G, H: Repräsentative Transmissions-Elektronenmikroskop-Aufnahme der verbliebenen Axone nach exzitotoxischer Schädigung der retinalen Ganglienzellen. Es zeigte sich, dass die überwiegende Anzahl der Axone eine gesunde Morphologie der Mitochondrien (Pfeilspitze), Mikrotubuli als auch der Neurofilamente aufweisen. Die in D und F beobachteten dunkel gefärbten Myelinscheiden (Pfeile) bestehen aus sich auflockerndem Myelin, was auf degenerative Axone hinweist (H). Messbalken: A, C, E = 50 μ m; B, D, F = 10 μ m; G = 1 μ m; H = 1,5 μ m). Die Quantifizierung der Axone ergab, dass in den rhNorin behandelten *N. optici* in etwa 80 % mehr Axone überlebten (I). n=7, Mittelwert \pm SEM.

Da der Verlust der Axone eine Folge der Degeneration retinaler Ganglienzellen ist, wurden ebenfalls drei Wochen nach Injektion sagittale Semidünnschnitte der injizierten Augen angefertigt und die Anzahl an retinalen Ganglienzellen ermittelt.

Bereits bei der lichtmikroskopischen Betrachtung fiel auf, dass in NMDA-injizierten Augen weniger Perikarya in der Ganglienzellschicht zu erkennen sind als in den zusätzlich mit rhNorin injizierten Partneraugen (Abb. 22A, B, D, E).

Zur Quantifizierung wurde die gesamte Anzahl der Perikarya ermittelt und in Bezug zur Gesamtlänge der Retina dargestellt. Augen, die zusätzlich mit rhNorin behandelt wurden, wiesen etwa 55 % mehr retinale Ganglienzellen auf, verglichen mit Augen, die eine alleinige NMDA-Injektion erhielten (Abb. 22C).

Neben den Perikarya der Ganglienzellschicht wurde auch die Fläche der inneren plexiformen Schicht ausgemessen. In diesem Bereich befinden sich die Synapsen zwischen retinalen Ganglienzellen und Bipolarzellen. Die Fläche der inneren plexiformen Schicht war in den mit rhNorin behandelten Augen um etwa 35 % größer als in den nur mit NMDA behandelten Augen (Abb. 22F).

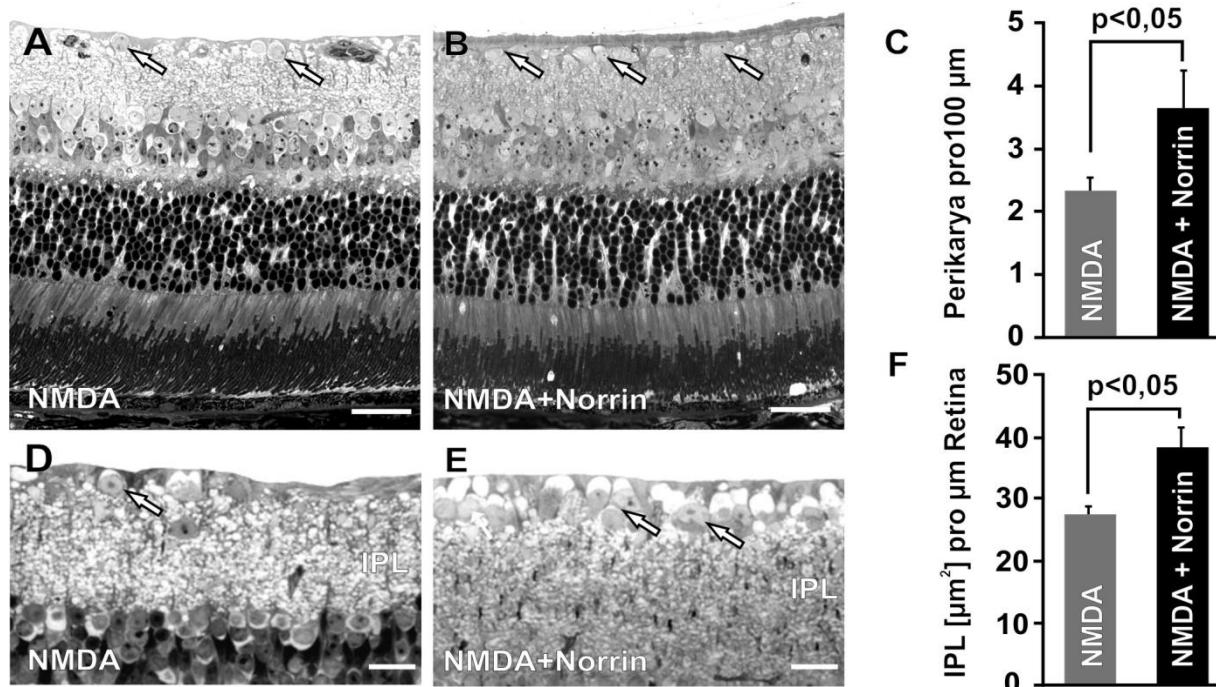


Abb. 22: Norrin schützt gegen den Verlust von neuronalen Zellen nach NMDA-Schädigung. Exemplarische sagittale Semidünnschnitte durch die Retina drei Wochen nach Injektion von 3 μ l NMDA (10 mM) (A, D) oder NMDA (10 mM) plus rhNorin (5 ng/ μ l) (B, E). Die Anzahl der Perikarya in der Ganglienzellschicht (C) und die Fläche der inneren plexiformen Schicht (IPL) (F) wurden in der ganzen Zirkumferenz der Retina bestimmt und als Anzahl der Perikarya pro 100 μ m Retina (C) oder als Fläche der IPL pro μ m Retina (F) dargestellt. Augen, in die nur NMDA injiziert wurde zeigten deutlich weniger Perikarya in der Ganglienzellschicht (Pfeile) und eine dünnerne IPL verglichen mit ihren Partneraugen, die zusätzlich rhNorin erhalten hatten. Messbalken A, B = 25 μ m; D, E = 10 μ m. C, F: jeweils n = 7, Mittelwert \pm SEM.

4.3.4 Die Norrin-vermittelte protektive Wirkung auf retinale Ganglienzellen kann durch DKK-1 gehemmt werden

Da Norrin, wie bereits oben beschrieben, den kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalwegs aktivieren kann, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die von Norrin induzierte Neuroprotektion ebenfalls über diesen Signalweg vermittelt wird.

Hierfür wurde DKK-1 (5 µg/µl) zusätzlich zu NMDA bzw. NMDA/rhNorrin intravitreal injiziert.

Um einen Einfluss von DKK-1 auf den endogenen Wnt/β-Catenin-Signalweg auszuschließen, wodurch eventuell eine Hemmung der Norrin-vermittelten Protektion vorgetäuscht werden könnte, wurden Vorversuche durchgeführt, bei denen DKK-1 zusammen mit NMDA intravitreal injiziert wurde. Das Kontrollauge erhielt eine alleinige NMDA-Injektion. Die Betrachtung und Quantifizierung der Axone der *N. optici* drei Wochen nach Injektion zeigten keinen wesentlichen Unterschied zwischen Kontroll- und DKK-injizierten Augen, weder an der Morphologie der *N. optici* noch an der Anzahl der Axone durch zusätzliche DKK-1-Injektion (Abb. 23).

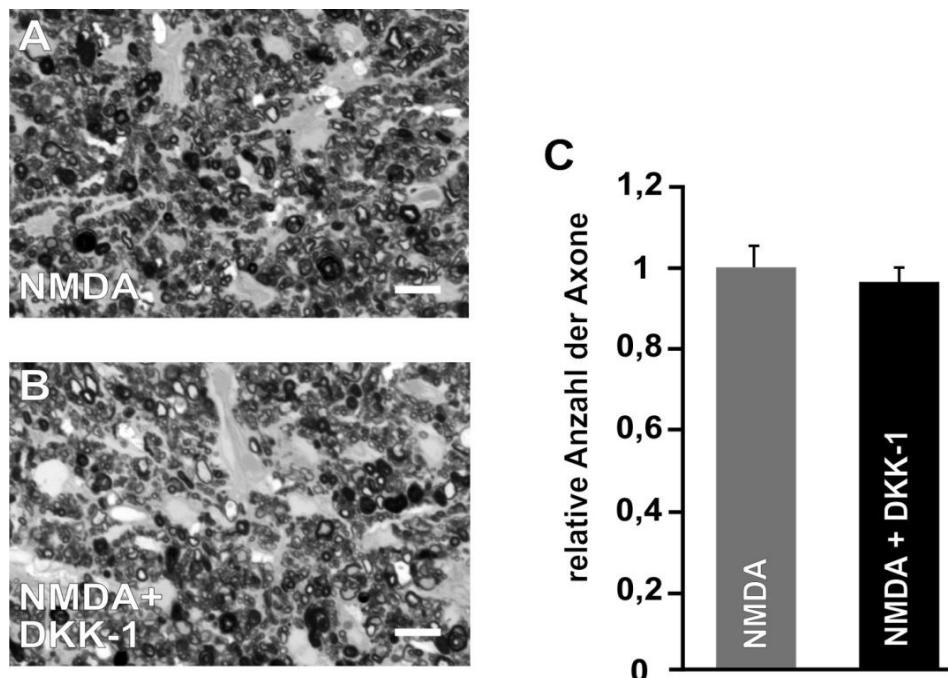


Abb. 23: Der durch NMDA induzierte Verlust an Axonen wird nicht durch die Hemmung des endogenen Wnt/β-Catenin -Signalwegs beeinflusst. Drei Wochen nach der intravitrealen Injektion von 3 µl NMDA (10 mM; A). bzw. NMDA plus DKK-1 (5 µg/µl; B), wurden die *N. optici* analysiert. Morphologisch konnte kein Unterschied der beiden Versuchsgruppen festgestellt werden (A, B). Auch durch die Quantifizierung ergab sich kein signifikanter Einfluss von DKK-1 auf die Anzahl der Axone (C). n=3, Mittelwert ± SEM.

Nachdem ein Einfluss von DKK-1 auf das Überleben der retinalen Ganglienzellen nach NMDA-Injektion ausgeschlossen werden konnte, wurden in den folgenden Experimenten die *N. optici* von NMDA/rhNorrin- und NMDA/rhNorrin/DKK-1-injizierten Augen miteinander verglichen.

Wie bereits beschrieben, zeigten die NMDA/rhNorrin-behandelten Augen ein moderates Ausmaß an Degeneration des *N. opticus*. Im Vergleich dazu war das Bild des verursachten Schadens bei zusätzlicher Injektion von DKK-1 ähnlich dem gesetzten Schadens bei alleiniger NMDA-Injektion. Etwa 70 % mehr Axone wurden in den NMDA/rhNorrin-behandelten Optici gezählt verglichen mit der Anzahl der Axone NMDA/rhNorrin/DKK-1-behandelter Augen (Abb. 24).

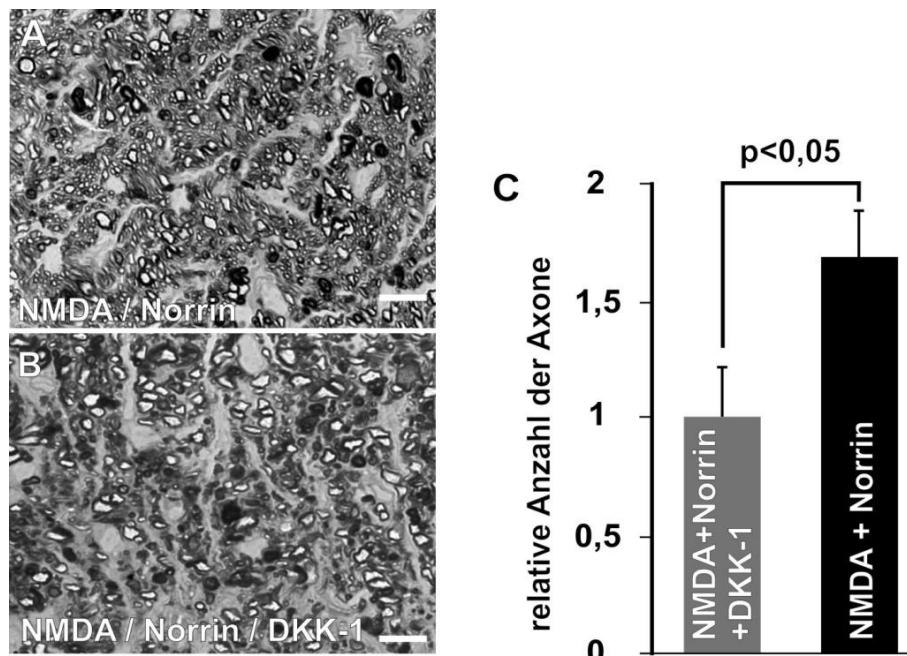


Abb. 24: Norrin vermittelt seinen protektiven Effekt durch Aktivierung des kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalwegs. Sagittale Semidünnsschnitte durch den *N. opticus* der Maus drei Wochen nach Injektion von NMDA (10 mM) plus rhNorrin (5 ng/μl; A) bzw. NMDA/rhNorrin plus DKK-1 (5 μg/μl; B). Messbalken = 10 μm. Die Quantifizierung der Axone ergab einen deutlichen Verlust der rhNorrin-induzierten Protektion durch die Inhibition des LRP5/6-Rezeptors durch DKK-1 (C). n = 4, Mittelwert ± SEM.

4.3.5 Norrin aktiviert den Wnt/β-Catenin-Signalweg in Retinae

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass der protektive Effekt von Norrin durch den Inhibitor DKK-1 geblockt werden kann. Deshalb sollte im Folgenden auf Proteinebene untersucht werden, ob Norrin den Wnt/β-Catenin-Signalweg in der Retina aktiviert.

Hierfür wurde rhNorrin alleine oder in Kombination mit NMDA in den Glaskörper injiziert. Kontrollaugen erhielten je nach Behandlung PBS oder NMDA. Das retinale Gesamtprotein wurde jeweils drei Stunden nach Injektion isoliert und mittels Western Blot Analyse auf β-Catenin hin untersucht.

Um den direkten Einfluss von rhNorrin auf den Wnt/β-Catenin-Signalweg in der Retina zu untersuchen, wurden zunächst Augen mit rhNorrin injiziert. Als Kontrolle erhielt das jeweilige Partnerauge eine PBS-Injektion. Verglichen zu den Kontrollaugen stieg der β-Catenin Gehalt in den rhNorrin-behandelten Augen deutlich an. Die densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse ergab einen signifikanten rhNorrin-induzierten Anstieg des β-Catenin um das etwa Dreifache (Abb. 25A, D).

Um nun den Einfluss von NMDA auf den Wnt-Signalweg abzuschätzen, wurde NMDA in den Glaskörper injiziert, das Partnerauge erhielt eine PBS-Injektion. Nach drei Stunden wurden retinale Proteine isoliert und mittels Immunoblot auf β-Catenin hin untersucht. Nach der Injektion von PBS fand sich eine schwache, aber deutliche Bande für β-Catenin. Durch die Behandlung mit NMDA nahm die Intensität des Signals etwas zu. Die densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen zeigte eine Zunahme um ca. 50 % des β-Catenin-Spiegels nach NMDA Behandlung. Dieser Anstieg war nicht signifikant, dennoch könnte die geringe Zunahme darauf hindeuten, dass nach der Schädigung der Netzhaut durch NMDA der Wnt/β-Catenin-Signalweg leicht aktiviert wird (Abb. 25B, D).

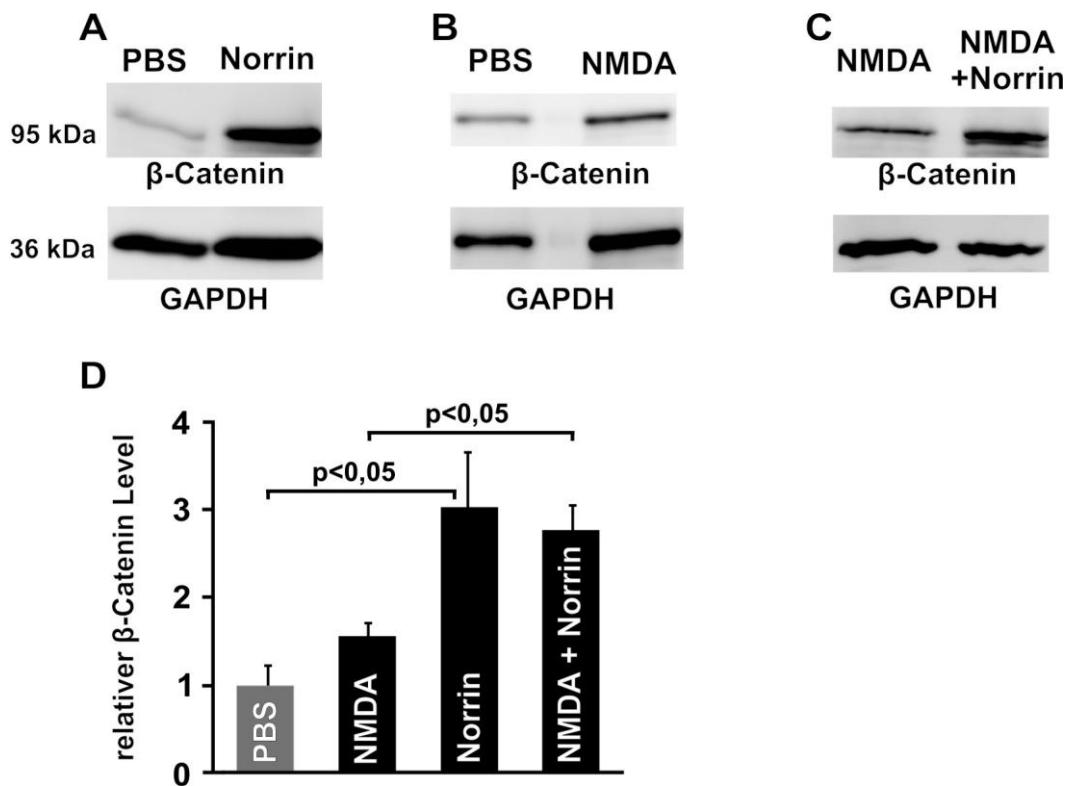


Abb. 25: Norrin erhöht den β -Catenin-Spiegel in der geschädigten und der gesunden Retina. Drei Stunden nach intravitrealer Injektion von jeweils 3 μ l rhNorrin (5 ng/ μ l), NMDA (10 mM), rhNorrin/NMDA oder PBS wurden Proteine der Retina mittels Western Blot Analyse auf den β -Catenin Gehalt hin untersucht. A-C zeigt pro Versuchsgruppe jeweils eine exemplarische β -Catenin Western Blot Analyse mit dazugehöriger GAPDH-Ladungskontrolle. D: Densitometrische Quantifizierung des β -Catenin Signals. $n = 3$, Mittelwert \pm SEM.

Da rhNorrin alleine den β -Catenin-Spiegel in der gesunden Retina deutlich anheben konnte, sollte als nächstes untersucht werden, ob diese Wirkung ebenfalls nach einer akuten Schädigung der Retina nachgewiesen werden kann. Hierzu wurde rhNorrin in Kombination mit NMDA in den Glaskörper injiziert. Das Partnerauge erhielt eine alleinige NMDA-Injektion. Auch hier sah man in der Western Blot Analyse einen eindeutigen Anstieg retinalen β -Catenins durch rhNorrin/NMDA, verglichen mit alleiniger NMDA-Injektion. Die Zunahme nach der densitometrischen Auswertung der Immunoblot Analysen zeigte eine Zunahme um etwa 80 % nach rhNorrin-Injektion in der geschädigten Retina (Abb. 25C, D).

4.3.6 NMDA induziert die Expression von Norrin in der Retina

Nachdem gezeigt wurde, dass exogenes Norrin retinale Ganglienzellen schützen kann, stellte sich die Frage, ob die Netzhaut auf eine akute NMDA-induzierte Schädigung mit der vermehrten Expression von endogenem Norrin reagiert. Um dies zu überprüfen, wurde Mäusen PBS bzw. NMDA intravitreal injiziert. Sieben Stunden nach Injektion wurde retinale Gesamt-RNA isoliert und mittels quantitativer real-time RT-PCR die Änderungen in der Norrin-Expression analysiert.

Die Injektion von NMDA führte zu einer fast 5-fach erhöhten Expression von endogenem Norrin in der Netzhaut, verglichen mit PBS-injizierten Augen (Abb. 26).

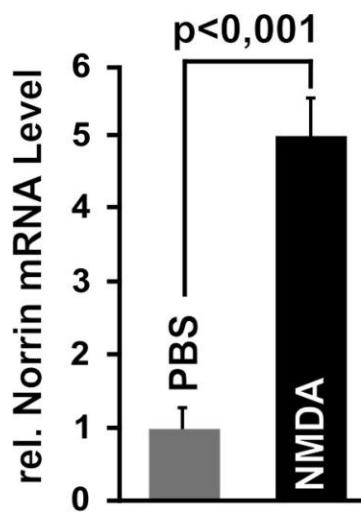


Abb. 26: NMDA induziert die Expression von Norrin in der Retina. Quantitative real-time RT-PCR Analyse von retinaler RNA sieben Stunden nach intravitrealer Injektion von PBS bzw. NMDA. n = 6. Mittelwert \pm SEM

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass nicht nur ektopest Norrin neuroprotektiv wirkt, sondern endogenes Norrin durchaus unter Stressbedingungen in retinalen Signalkaskaden eine Rolle spielen könnte.

4.3.7 Norrin aktiviert das Lif/Edn2-System der Retina

Das Zusammenspiel von Leukemia Inhibitory Factor (Lif) und Endothelin-2 (Edn2) ist als wichtiges Signalsystem einer protektiven Antwort nach akutem oder chronischem Netzhautschaden bekannt. In dem von Rattner und Nathans postulierten Modell reagieren Photorezeptoren auf eine Schädigung mit der Produktion und Sekretion von Edn2. Dies führt zur Aktivierung der Müllerzellen, die daraufhin vermehrt den neurotrophen Faktor FGF-2 produzieren (Rattner und Nathans 2005). Dieses Modell wurde von Joly *et al.* um den Faktor Lif erweitert. Lif wird als Folge eines

Photorezeptorschadens von einer Subpopulation der Müllerzellen exprimiert. Lif wiederum regt die Produktion von Edn2 in Photorezeptoren an. Ein positiver Feedback-Loop wird in Gang gesetzt. Wird Edn2 nun von den Photorezeptoren gebildet, werden weitere Müllerzellen aktiviert und zur Produktion von Lif angeregt. Dies führt schließlich zu einem erhöhten Spiegel des neurotrophen Faktors FGF-2, der von den aktivierte Müllerzellen gebildet wird (Joly *et al.* 2008).

Dieses für Photorezeptoren beschriebene Modell sollte nun im Zusammenhang mit der exzitoxischen Schädigung retinaler Ganglienzellen untersucht werden.

Die Schädigung der Netzhaut hat in der Regel die Aktivierung von Müllerzellen zur Folge, die letztlich mit der vermehrten Expression protektiver Wachstumsfaktoren reagieren. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) gilt als Marker für die Aktivierung von Müllerzellen bei retinalem Stress (Lewis und Fisher 2003, Bringmann *et al.* 2006). Um nun den Einfluss von NMDA bzw. rhNorrin auf die Expression von GFAP zu untersuchen, wurden drei Gruppen intravitrealer Injektionen vorgenommen: (1) PBS bzw. rhNorrin, (2) PBS bzw. NMDA und (3) NMDA bzw. NMDA/rhNorrin. Sieben Stunden nach Injektion wurde die retinale RNA isoliert und mittels quantitativer real-time RT-PCR analysiert.

Sieben Stunden nach NMDA-Injektion zeigte sich, dass die mRNA für GFAP, im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrollretinae, um das etwa 2,5-fache erhöht war. Eine zusätzliche Injektion von rhNorrin konnte die GFAP mRNA-Expression nochmals signifikant anheben. Eine alleinige rhNorrin-Injektion hatte dagegen keinen Einfluss auf die GFAP-Expression (Abb. 27).

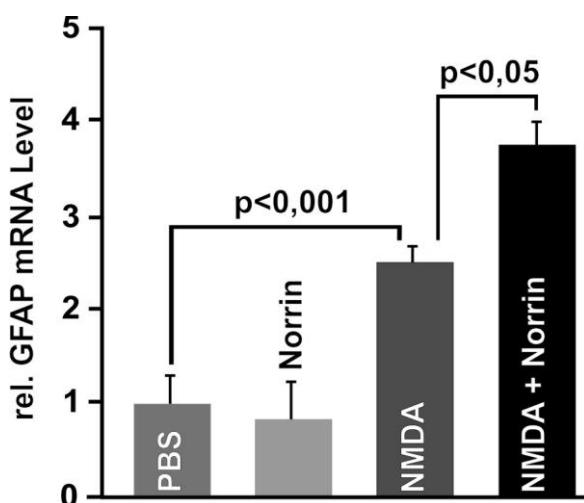


Abb. 27: Norrin kann die Expression von GFAP nach einer akuten Netzhautschädigung zusätzlich erhöhen. Sieben Stunden nach intravitrealer Injektion von 3 μ l PBS, rhNorrin (5 μ g/ μ l), NMDA (10 mM) oder NMDA/rhNorrin wurde retinale RNA mittels quantitativer real-time RT-PCR analysiert. $n \geq 4$, Mittelwert \pm SEM

Diese Daten deuten darauf hin, dass Norrin Müllerzellen nach retinaler Schädigung zusätzlich aktivieren kann. In weiteren quantitativen real-time RT-PCR Analysen sollte nun untersucht werden, ob die Expression von Lif und Edn2 ebenfalls durch Norrin beeinflusst wird.

Hierbei zeigte sich, dass NMDA zu einer nahezu 6-fach erhöhten Expression von Lif und Edn2 führt. Eine zusätzliche Injektion von rhNorrin konnte die Expression von Lif auf das insgesamt 9,3-fache und die Expression von Edn2 sogar auf das 13,6-fache erhöhen, im Vergleich zu einer alleinigen NMDA-Injektion (Abb. 28). Demgegenüber hatte die alleinige Injektion von rhNorrin keinen oder nur geringen Einfluss auf die Expression der beiden Faktoren (Abb. 28).

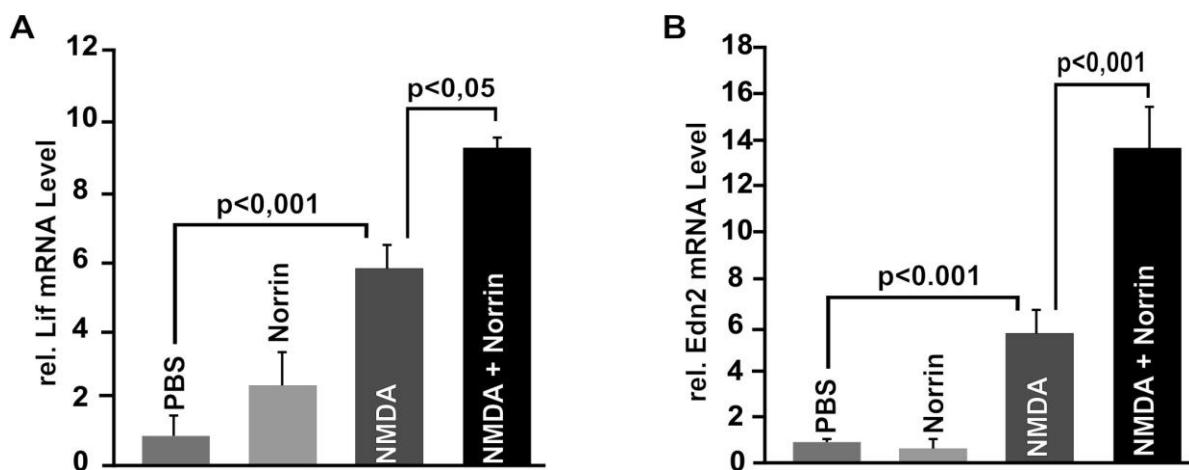


Abb. 28: Norrin kann die Expression von Lif und Edn2 in der Retina nach akuter Schädigung zusätzlich erhöhen. Relative Expression von Lif und Edn2 nach intravitrealer Injektion von 3 μ l PBS, rhNorrin (5 μ g/ μ l), NMDA (10 mM) oder NMDA/rhNorrin. $n \geq 4$, Mittelwert \pm SEM.

Diese Daten deuten darauf hin, dass Norrin nicht nur in der Lage ist Müllerzellen in der geschädigten Netzhaut zusätzlich zu aktivieren, sondern greift auch in den von Müllerzellen unterstützten Lif/Edn2-Signalweg ein. Somit könnte dieser Signalweg eine allgemeinere Rolle bei Netzhautdegeneration einnehmen als bislang angenommen.

4.3.8 Norrin induziert die Expression neurotropher Faktoren in der gestressten Retina

Das Lif/Edn2-System induziert im Rahmen einer Netzhautdegeneration die FGF-2-Expression. Von FGF-2 sowie einigen anderen Faktoren ist bekannt, dass sie protektiv auf die Neurone der Netzhaut wirken können, indem sie beispielsweise apoptotische Signalkaskaden hemmen (Chaum 2003, Lebrun-Julien und Di Polo 2008). Ob Norrin Einfluss auf die Regulierung neurotropher Faktoren nimmt, wurde im Folgenden untersucht.

Um die Wirkung von Norrin auf die Expression neurotropher Faktoren in der geschädigten Retina zu untersuchen, wurde NMDA bzw. NMDA/Norrin in den Glaskörper von Mausaugen injiziert. Die Isolation retinaler RNA erfolgte sieben Stunden nach Behandlung und wurde daraufhin mittels quantitativer real-time RT-PCR auf die Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Lens Derived Growth Factor (LEDGF), Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) und Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) hin untersucht.

Die Splicevarianten VEGF 120 und 164 zeigten keinen Unterschied in der Expression zwischen NMDA- und NMDA/rhNorrin-Injektionen. Dagegen war die Expression von mRNA für LEDGF, BDNF, FGF-2 und CNTF nach zusätzlicher Injektion von rhNorrin deutlich erhöht (Abb. 29).

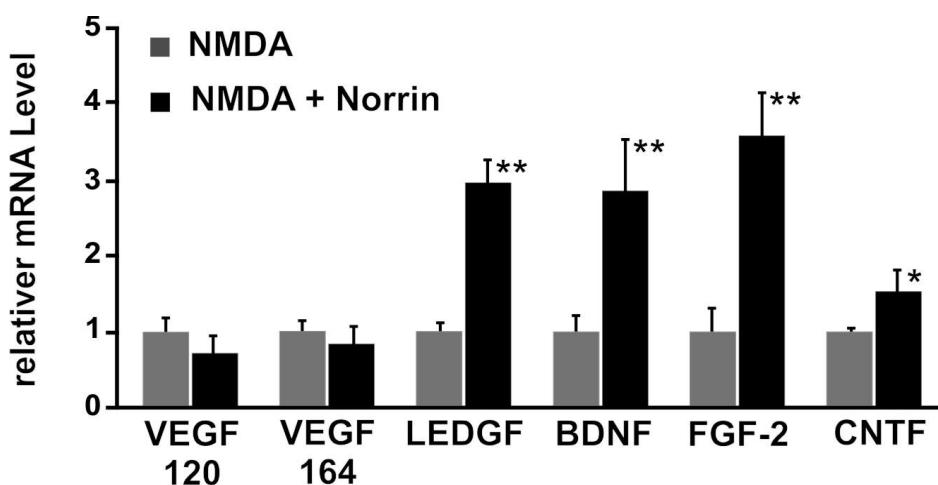


Abb. 29: Norrin induziert die Expression neurotropher Faktoren in der geschädigten Retina. Quantitative real-time RT-PCR sieben Stunden nach NMDA- bzw. NMDA/rhNorrin-Injektion. $n \geq 4$, Mittelwert \pm SEM, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$.

Um zu untersuchen, ob die gesteigerte Transkription neurotropher Faktoren auch zu einer gesteigerten Translation führt, wurden exemplarisch die beiden Faktoren FGF-2 und CNTF in Immunoblot Analysen untersucht.

Zunächst wurde die Spezifität des anti-FGF-2 und anti-CNTF Antikörpers mittels Western Blot Analyse von retinalen Proteinen untersucht. Der anti-FGF-2 Antikörper detektierte eine Dimerbande bei etwa 36 kDa, der anti-CNTF Antikörper eine Bande bei ca. 22 kDa, was dem Molekulargewicht des Proteins entspricht (Abb. 30A, D). Da beide Antikörper außer den spezifischen Proteinbanden keine weiteren Nebenbanden detektierten, konnten für die weiteren Untersuchungen Dot Blot Analysen durchgeführt werden. Dies war nötig, da Wachstumsfaktoren nur in relativ geringer Menge im Gewebe vorliegen. Durch die Dot Blot Technik war es möglich größere Volumina, also größere Mengen an Gesamtprotein, für die Immunoblot Analyse einzusetzen. Somit wurde die Quantifizierung erheblich erleichtert.

24 Stunden nach der Injektion von NMDA bzw. NMDA/rhNorrin wurden retinale Proteine isoliert und mittels Dot Blot Analyse untersucht. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg des FGF-2-Signals nach Injektion von zusätzlichem rhNorrin, verglichen zur alleinigen Injektion von NMDA. Die densitometrische Auswertung ergab einen Anstieg um das nahezu Vierfache (Abb. 30B, C). Auch die Proteinmenge an CNTF zeigte in der Tendenz einen leichten Anstieg in der Dot Blot Analyse, der allerdings in der densitometrischen Auswertung nicht signifikant war (Abb. 30E, F).

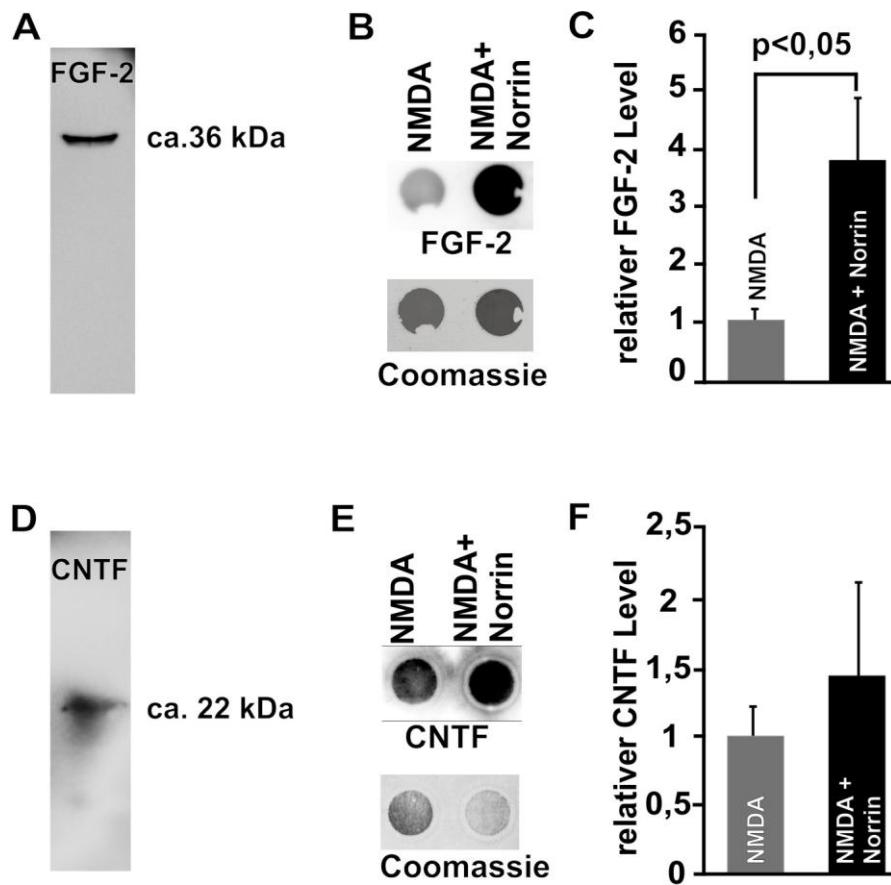


Abb. 30: Norrin erhöht die Proteinmenge an FGF-2. A, C: Western Blot Analysen retinaler Proteine für FGF-2 (A) und CNTF (D). B, E: Exemplarische Dot Blot Analysen retinaler Proteine 24 Stunden nach Injektion von 3 μ l NMDA (10 mM) bzw. NMDA/rhNorrin (5 ng/ μ l) auf FGF-2 (B) bzw CNTF (E) mit dazugehöriger Coomassie Ladungskontrolle. C, F Densitometrische Auswertungen der Dot Blot Analysen. $n = 7$, Mittelwert \pm SEM.

4.3.9 Die Norrin-induzierte Expression neurotropher Faktoren ist von zusätzlichen Stress-Signalen abhängig

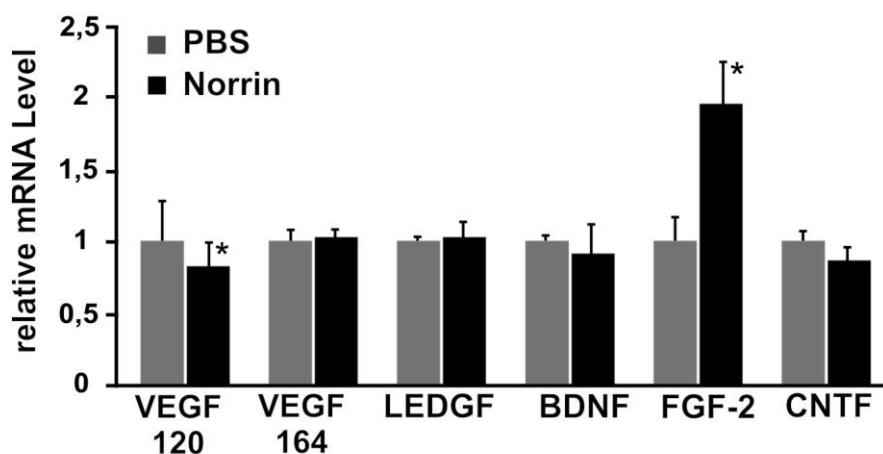
Nachdem gezeigt wurde, dass Norrin in Kombination mit NMDA, also einem akuten retinalen Schaden, die Expression einiger neurotropher Faktoren induzieren kann, wurde im Folgenden untersucht, ob Norrin alleine dieselbe Wirkung auf die Expression dieser Faktoren hat.

Wie zuvor beschrieben, wurde sieben Stunden nach intravitrealer Injektion von PBS bzw. rhNorrin die Gesamt-RNA der Retina isoliert und mittels quantitativer real-time RT-PCR untersucht (Abb. 31A). Die mRNA-Level von VEGF164, LEDGF, BDNF und CNTF wurden von der alleinigen rhNorrin-Injektion nicht beeinflusst. Das Transkript der Splice-Variante VEGF120 wurde durch rhNorrin auf etwa 85 % reduziert, verglichen mit der Transkriptmenge nach PBS-Injektion. Als einziger der untersuchten Faktoren wurde der mRNA-Level von FGF-2 um das etwa 1,9-fache erhöht.

Dieser Befund konnte auch auf Proteinebene mittels Dot Blot Analyse bestätigt werden (Abb. 31B, C). Die Menge an retinalem FGF-2 erhöhte sich durch die rhNorrin-Injektion auf das etwa Zweifache.

Diese Daten deuten darauf hin, dass rhNorrin alleine die Expression neurotropher Faktoren nicht induzieren kann. Dazu ist ein zusätzlicher Stimulus notwendig. Die Expression von FGF-2 scheint dagegen, zumindest zum Teil, über einen stress-unabhängigen Mechanismus reguliert zu werden.

A



B

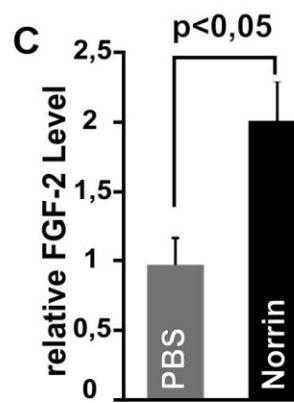
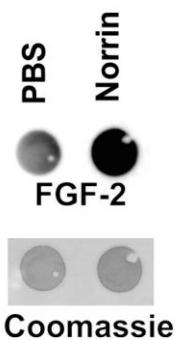


Abb. 31: Norrin kann die Expression von FGF-2 in der gesunden Retina induzieren. A: Quantitative real-time RT-PCR Analyse verschiedener neurotropher Faktoren in der Retina sieben Stunden nach intravitrealer Injektion von PBS oder rhNorrin (5 ng/μl). $n \geq 4$, Mittelwert \pm SEM. B: Exemplarische FGF-2 Dot Blot Analyse retinaler Proteine 24 Stunden nach Injektion mit dazugehöriger Coomassie Ladungskontrolle. C: Densitometrische Auswertung der Dot Blot Analysen. $n = 7$, Mittelwert \pm SEM, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$.

Die Menge an neurotrophen Faktoren bei akutem retinalen Stress ist vor allem auf deren Expression in Müller Gliazellen zurückzuführen, die somit eine wichtige Rolle bei der Neuroprotektion einnehmen (Bringmann *et al.* 2006). Ye *et al.* konnten zeigen, dass auch der Wachstumsfaktor Norrin von Müllerzellen gebildet wird (Ye *et al.* 2009). Wie hier unter Punkt 4.3.7 gezeigt, ist Norrin in der Lage die Expression von GFAP zu steigern, ein maßgeblicher Indikator für die Aktivierung von Müllerzellen. Um zu untersuchen, ob Norrin in Müllerzellen die Expression neurotropher Faktoren stimulieren kann, wurden für die folgenden Experimente Müllerzellen aus der Rattenretina isoliert und in *in vitro* Versuchen Norrins Wirkung auf diese primären Müllerzellen gezeigt.

4.4 Die Wirkung von Norrin auf Müllerzellen

4.4.1 Isolierung und Charakterisierung von Müllerzellen aus der Retina von Ratten

Die Anreicherung von Müllerzellen erfolgte gemäß einer Methode von Hicks und Courtois (Hicks und Courtois 1990). Hierfür wurden zerkleinerte und angedauta Retinae von Ratten in Kulturschalen mit Zellkulturmedium inkubiert. Nachdem genügend Zellen aus der Retina ausgewachsen waren (Abb. 32), wurden retinale Aggregate sowie morphologische Nicht-Müllerzellen unter mikroskopischer Kontrolle mechanisch mit Hilfe einer Pipettenspitze vom Boden abgelöst. Durch mehrmaliges Wiederholen dieses Vorganges wurden die Müllerzellen nach und nach angereichert. Auswachsende Müllerzellen konnten durch ihre typische längliche, keulenförmige Form gut von anderen Zellen wie Mikroglia und Endothelzellen unterschieden werden.

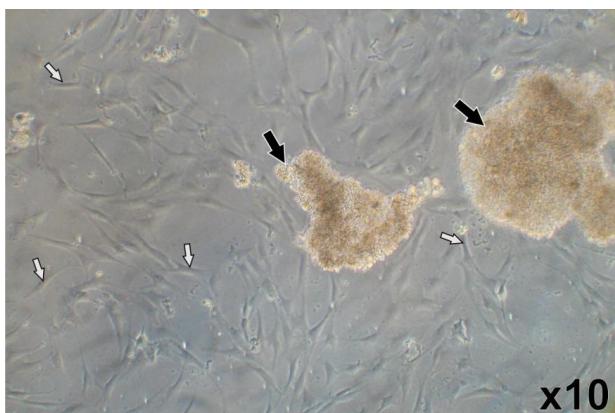


Abb. 32: Isolation von primären Müllerzellen aus der Rattenretina. Exemplarisches Beispiel einer fünf Tage alten Retinakultur. Aus den Retinafragmenten (schwarze Pfeile) wachsen nach drei bis fünf Tagen in Kultur die ersten Zellen aus. Durch mehrmaliges mechanisches Entfernen aller Zellen, die morphologisch nicht als Müllerzellen einzuordnen sind, werden diese nach und nach angereichert. Weiße Pfeile: morphologische Müllerzelle.

Zur Überprüfung der Reinheit der angereicherten Müllerzellkultur wurden semiquantitative konservative RT-PCR und quantitative real-time RT-PCR Analysen durchgeführt. Diese bestanden aus vergleichenden Expressionsanalysen zwischen der Müllerzellkultur und der Rattenretina. Untersucht wurde die Expression typischer Müllerzell-spezifischer Transkripte und anderer retinaler Zelltypen (Photorezeptorzellen, retinale Endothelzellen, retinale Pigmentepithelzellen u.a.). Durch das relative Expressionsverhältnis der Transkripte zwischen Retina und Müllerzellen wurde die Reinheit der angelegten Zellkultur abgeschätzt.

Die mittels konservativer RT-PCR erhobenen Daten zeigten, dass die in Kultur angereicherten Zellen eine Gruppe von Müllerzell-charakteristischen Transkripten, wie Carboanhydrase (CA), Glutaminsynthetase (GS), Vimentin (Vim) und Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) exprimierten (Abb. 33A). GFAP gilt eigentlich vorwiegend als typischer Marker für Astrozyten, wird aber auch, wie bereits oben beschrieben, von aktivierten Müllerzellen exprimiert. Die Expression von GFAP von kultivierten Müllerzellen ist durchaus typisch und ist als eine durch die Zellkultur bedingte Expression anzusehen (McGillem *et al.* 1998, Yi *et al.* 2007).

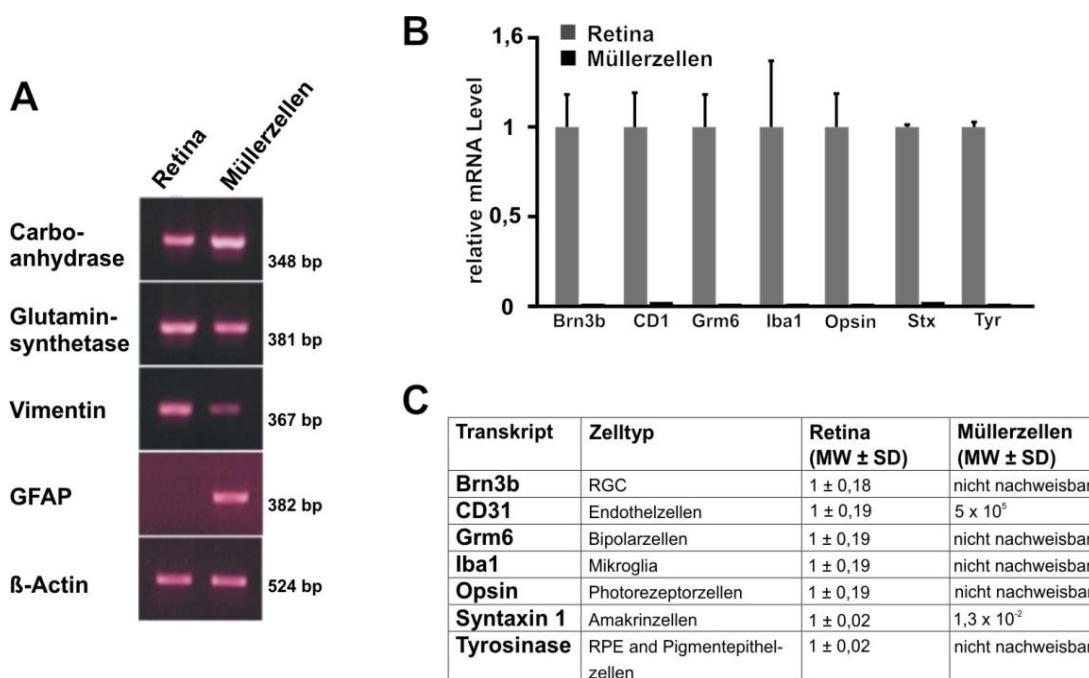


Abb. 33: Vergleichende Expressionsanalysen zwischen Rattenretina und der primären Müllerzellkultur. Die Reinheit der Müllerzellkultur wurde mittels konservativer RT-PCR (A) und quantitativer real-time RT-PCR (B, C) analysiert. Untersucht wurde die Expression Retina-spezifischer Transkripte. Die Marker für Endothelzellen (CD31) und für Amakrinzellen (Syntaxin1, Stx) konnten in der quantitativen real-time PCR im geringen Maße nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu den RT-PCR-Analysen konnten Vimentin, GS und GFAP auch in immunzytochemische Färbungen der Müllerzellkultur nachgewiesen werden. Alle drei Proteine wurden von einem Großteil der isolierten Zellen exprimiert (Abb. 34A-C). Im Gegensatz dazu konnten entsprechende Transkripte für Photorezeptorzellen (Opsin), bipolare Zellen (Grm6), retinale Ganglienzellen (Brn3b), retinales Pigmentepithel/pigmentiertes Ziliarepithel (Tyrosinase), Mikroglia (Iba1) in der

quantitativen real-time RT-PCR nicht nachgewiesen werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Monolayer-Kultur tatsächlich aus angereicherten Müllerzellen bestand und nicht mit den oben genannten Zellen kontaminiert war. Lediglich sehr geringe Transkriptmengen an CD31 und Syntaxin1 konnten detektiert werden. CD31 ist charakteristisch für Endothelzellen und Syntaxin1 für amakrine Zellen. Somit ist davon auszugehen, dass die etablierte Müllerzellkultur in hohem Maße rein war (Abb. 33B, C).

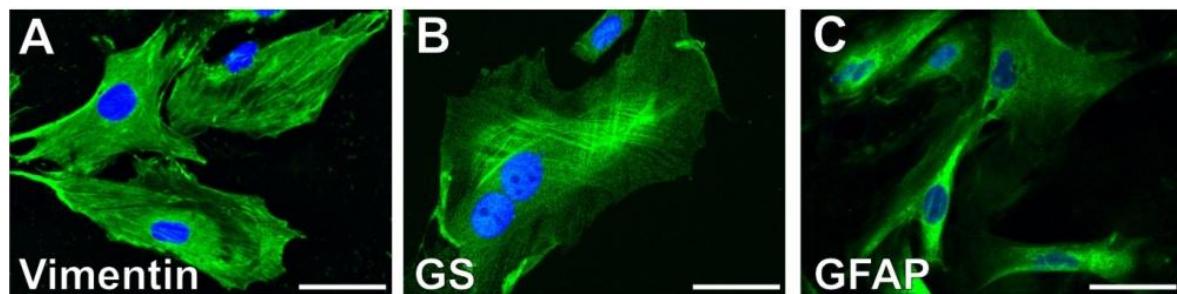


Abb. 34: Immunzytochemische Färbungen der primären Müllerzellkultur. Die für Glia Müllerzellen typischen Proteine Vimentin (A), Glutaminsynthetase (GS, B) und Glial Fibrillary Acid Protein(GFAP, C) konnten nachgewiesen werden. grün: Vimentin, GS oder GFAP; blau: DAPI, Messbalken = 50 µm

4.4.2 Norrin aktiviert den Wnt/β-Catenin-Signalweg in Müllerzellen

Zunächst sollte untersucht werden, ob die isolierten Müllerzellen auf eine Norrin-Stimulation mit einer Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalweges reagieren können. Hierzu wurden Müllerzellen zwei Stunden mit rhNorrin behandelt. Die Isolation der Kernproteine brachte für weitere Western Blot Analysen eine zu geringe Ausbeute, deshalb wurde im Folgenden Gesamtprotein isoliert und analysiert. Zusätzlich wurden immunzytochemische Färbungen für β-Catenin an Müllerzellen nach zweistündiger Inkubation mit rhNorrin durchgeführt.

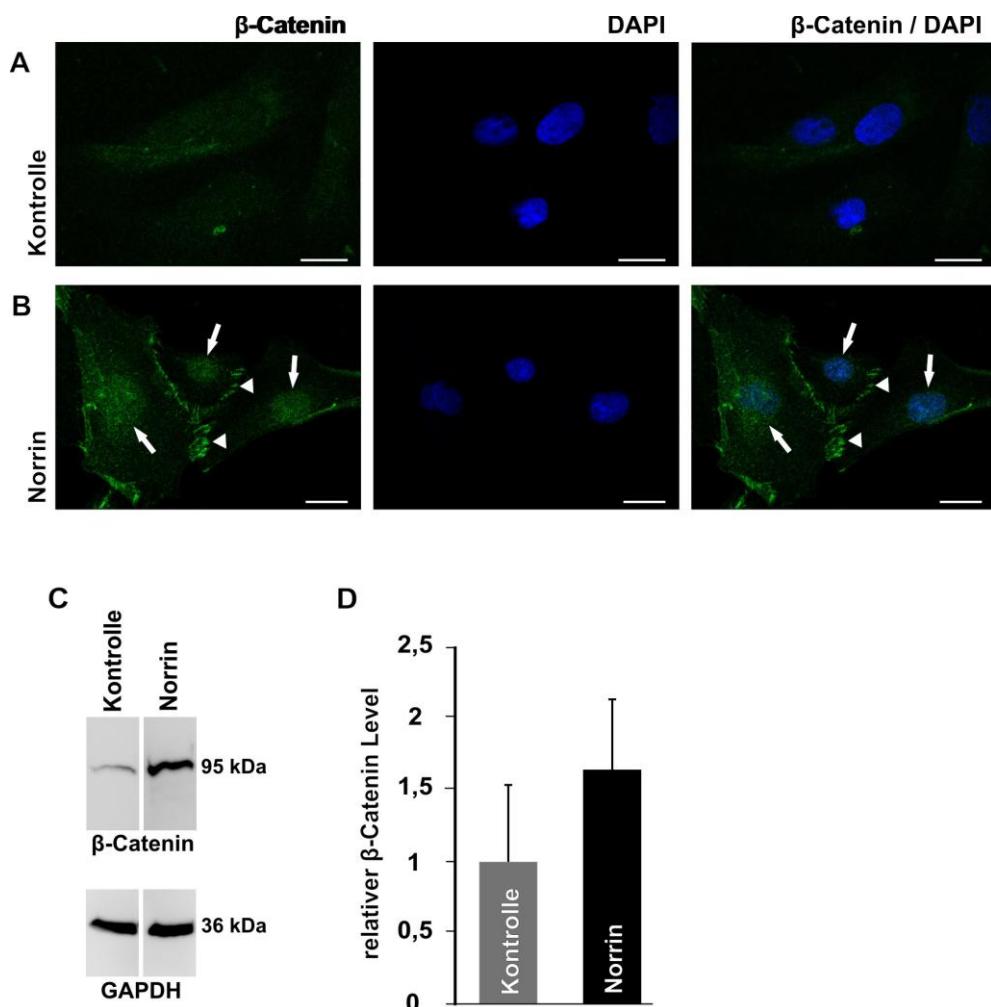


Abb. 35: Norrin führt zur Stabilisierung von β -Catenin in Müllerzellen. Immunzytochemische Färbungen mit anti- β -Catenin von unbehandelten Müllerzellen (A) und von Müllerzellen, die drei Stunden mit 40 ng/ml rhNorrin (B) behandelt wurden. grün: β -Catenin, blau: DAPI. C: Exemplarische β -Catenin Western Blot Analyse von Gesamtprotein aus unbehandelten Müllerzellen und aus Müllerzellen die drei Stunden mit rhNorrin behandelt wurden. Die Ladungskontrolle erfolgte durch GAPDH. D: Densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen. $n = 3$, Mittelwert \pm SEM.

Die immunzytochemischen Färbungen zeigten eine deutliche Färbung für β -Catenin im Nukleus und im perinukleären Zytoplasma der rhNorrin-behandelten Zellen, verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen. Zusätzlich sah man nach der Stimulation mit rhNorrin eine intensive Färbung im Bereich der fokalen Kontakte (Abb. 35A, B). Die Western Blot Analysen zeigten ebenfalls einen Anstieg der β -Catenin-Menge nach Norrinbehandlung. Dieser war in der densitometrischen Auswertung dreier Einzelexperimente allerdings nicht signifikant (Abb. 35C, D).

4.4.3 Norrin induziert die Expression neurotropher Faktoren in Müllerzellen

Um zu überprüfen, ob Müllerzellen eine Quelle der von Norrin induzierten neurotropen Faktoren in der Retina sind, wurde die Expression verschiedener Faktoren nach Behandlung von Müllerzellen mit rhNorrin analysiert.

Hierfür wurden Müllerzellen sieben Stunden in mit rhNorrin (40 ng/ml) versetztem serumfreien Kulturmedium inkubiert. Die Kontrollen erhielten dagegen serumfreies Medium ohne Zusätze.

Nach der Inkubation wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Darauf wurde die Expression verschiedener Transkripte mittels quantitativer real-time RT-PCR untersucht (Abb. 36). Die Expression von VEGF164, GDNF (Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor) und LEDGF änderte sich durch die rhNorrin-Behandlung nicht, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Dagegen wurden die mRNA-Level für Lif, PEDF (Pigment Epithelium Derived Growth Factor), BDNF, FGF-2 und CNTF signifikant erhöht.

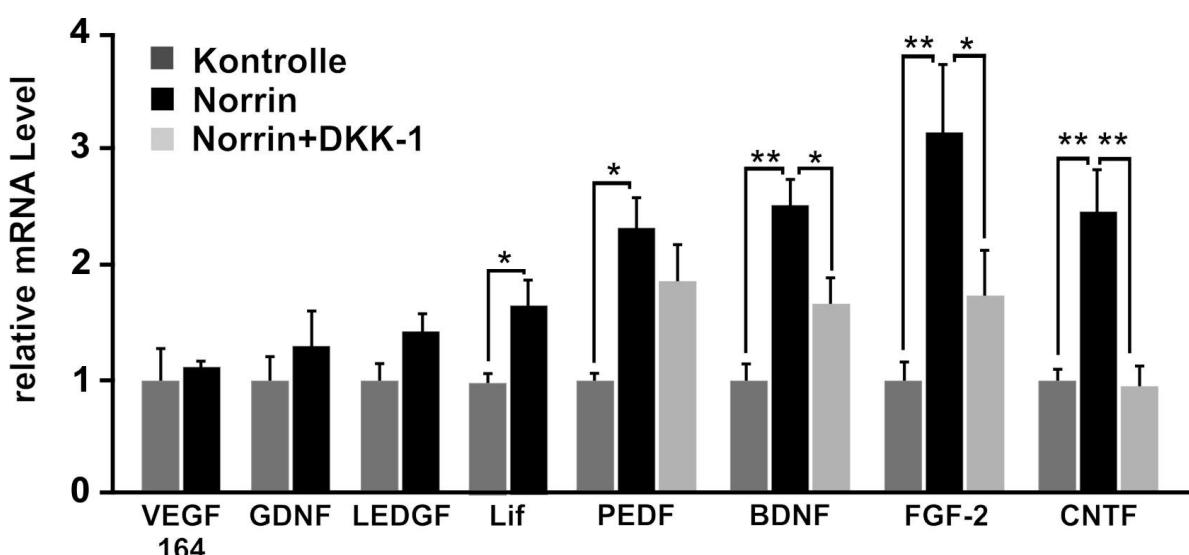


Abb. 36: Norrin induziert die Expression neurotropher Faktoren in Müllerzellen über den Wnt/β-Catenin-Signalweg. Quantitative real-time RT-PCR Analyse für neurotrophe Faktoren in der RNA von Müllerzellen nach sieben Stunden Inkubation mit rhNorrin (40ng/ml) oder rhNorrin plus DKK-1 (100 ng/ml). n ≥ 4; Mittelwert ± SEM, *: p < 0,05, **: p < 0,001.

Um die Rolle des Wnt/β-Catenin-Signalweges bei der von Norrin vermittelten Induktion der Expression neurotropher Faktoren in Müllerzellen zu untersuchen, wurden zusätzlich Zellen mit einer Kombination aus rhNorrin und DKK-1 (100 ng/ml) behandelt. Nach dieser Koinkubation wurde die Expression von PEDF, BDNF, FGF-2 und CNTF in der quantitativen real-time RT-PCR untersucht und mit Norrin-behandelten und Kontrollzellen verglichen. Bei allen Faktoren sank die Expression durch die Behandlung mit DKK-1, dies war aber nur bei BDNF, FGF-2 und CNTF signifikant. Die Expression von CNTF fiel sogar wieder auf das Kontrollniveau ab (Abb. 36).

Auch in Müllerzellen sollte untersucht werden, ob der gesteigerten Transkription der Wachstumsfaktoren ebenfalls eine Erhöhung dieser Faktoren auf Proteinebene folgt. Exemplarisch wurden hierfür die beiden Faktoren FGF-2 und CNTF untersucht. Für diese Untersuchungen wurde Gesamtprotein von Müllerzellen isoliert, die 24 Stunden in serumfreien Medium mit oder ohne rhNorrin (40 ng/ml) kultiviert wurden. Das Gesamtprotein wurde mittels Dot Blot Analysen untersucht (Abb. 37). In der Dot Blot Analyse sah man einen deutlichen Anstieg von FGF-2 (Abb. 37A) und CNTF (Abb. 37C) im Gesamtprotein, verglichen zur Kontrolle. Die densitometrische Auswertung der Blots ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen rhNorrin-Behandlung und Kontrolle (Abb. 37B, D).

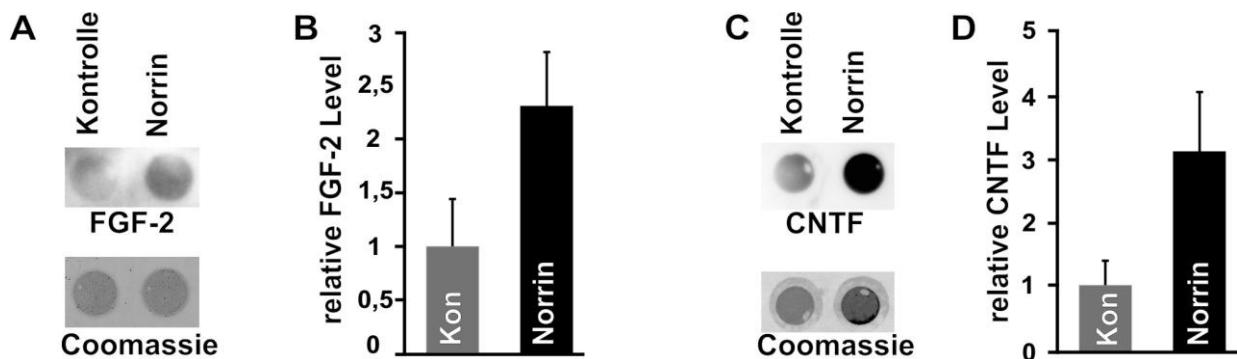


Abb. 37: Norrin erhöht die Menge an FGF-2 und CNTF im Gesamtprotein der Müllerzellen. A, C: Exemplarische Dot Blot Analysen von Gesamtprotein aus unbehandelten Müllerzellen und Müllerzellen, die 24 Stunden mit 40 ng/ml rhNorrin behandelt wurden. Die Ladungskontrolle erfolgte über eine Coomassie-Färbung. B, D: Densitometrische Auswertung der Dot Blot Analysen. n = 7, Mittelwert \pm SEM.

Eine ebenso wichtige Frage war, ob die erhöhte Expression der neurotropen Faktoren auch mit einer erhöhten Sekretion der Proteine einhergeht. Deshalb wurde neben dem Gesamtprotein der Müllerzellen auch der Zellüberstand nach 24 Stunden Behandlung mittels Dot Blot Analyse untersucht.

FGF-2 sowie CNTF konnten im konditionierten Medium der mit rhNorrin behandelten Zellen im erhöhten Maße nachgewiesen werden (Abb. 38A, C). Die densitometrische Auswertung ergab, dass die Menge an FGF-2 im Medium nach rhNorrin-Behandlung in etwa doppelt so hoch als im Zellüberstand von unbehandelten Zellen war. Die CNTF-Menge konnte sogar um das über Dreifache erhöht werden (Abb. 38B, D).

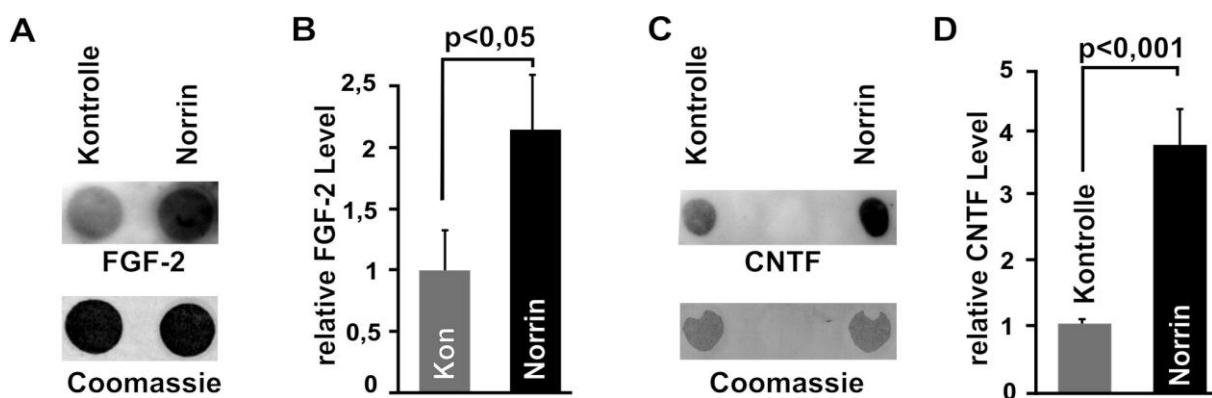


Abb. 38: Norrin führt zu einer erhöhten Menge an sezerniertem FGF-2 und CNTF im Zellüberstand von Müllerzellen. A, C: Exemplarische Dot Blot Analysen des Zellüberstandes von Müllerzellen die 24 Stunden mit und ohne 40 ng/ml rhNorrin im Medium inkubiert wurden. Die Ladungskontrolle erfolgte über eine Commasie-Färbung. B, D: Densitometrische Auswertung der Dot Blot Analysen. $n \geq 7$, Mittelwert \pm SEM

4.4.4 Konditionierter Zellüberstand der Müllerzellen wirkt neurotroph auf RGC-5 Zellen

Eine neuroprotektive Wirkung von Norrin wurde nachgewiesen und zudem ein möglicher Mechanismus, die Induktion der Expression von neurotropen Faktoren in Müllerzellen, aufgedeckt. Nachdem auch im konditionierten Medium von rhNorrin-behandelten Müllerzellen eine erhöhte Menge an FGF-2 und CNTF nachgewiesen werden konnte, sollte die neurotrophe Wirkung des konditionierten Mediums, und damit die indirekte neuroprotektive Funktion von Norrin, *in vitro* untersucht werden. Hierfür wurden Versuche an immortalisierten retinalen Ganglienzellen der Ratte, RGC-5, durchgeführt. Diese Zellen exprimieren verschiedene Ganglienzellmarker, wie zum Beispiel Thy1, sie unterscheiden sich aber von primären retinalen

Ganglienzellen zum einen morphologisch, zum anderen durch ihre Fähigkeit zur Proliferation. Um RGC-5-Zellen als sinnvolles *in vitro* Modell nutzen zu können, wurde ihre Differenzierung vor Versuchsbeginn nach der von Frassetto *et al.* (Frassetto *et al.* 2006) vorgestellten Methode mit Staurosporin induziert (Abb. 39).

Für die Differenzierung wurden die Zellen eine halbe Stunde mit 200 nM Staurosporin stimuliert. Nach dieser Inkubation sah man eine deutliche Veränderung der Morphologie von RGC-5 Zellen, die sich deutlich von undifferenzierten Zellen unterschied. Unter anderem konnte man die Abrundung des Zellsomas beobachten, zudem begannen zahlreiche dendriten- und axonähnliche Strukturen auszuwachsen (Abb. 39B).

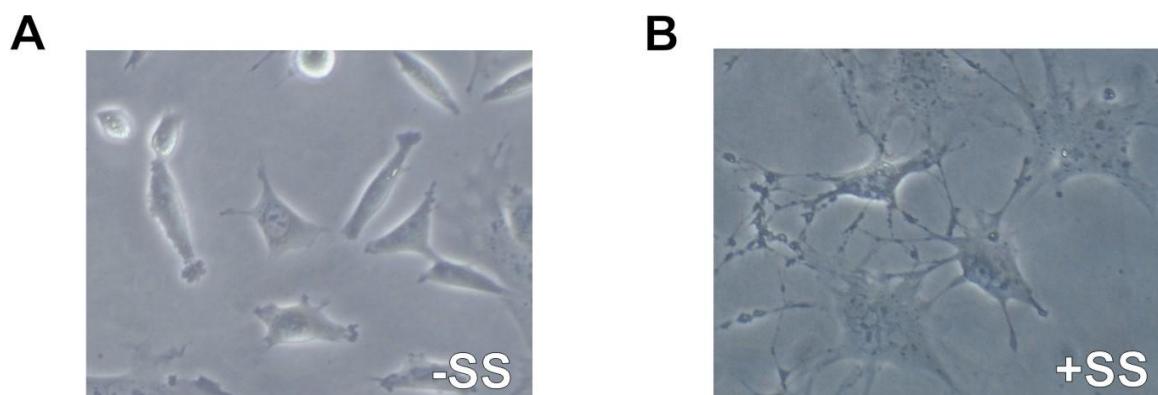


Abb. 39: Differenzierung der RGC-5 durch Staurosporin. Undifferenzierte RGC-5 (A) wurden für eine halbe Stunde mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin (SS, 200 nM) inkubiert. Nach der Differenzierung zeigten die Zellen eine deutlich veränderte Morphologie (B).

Nach der Differenzierung wurden die Zellen über Nacht in serumhaltigem Kulturmedium inkubiert, da in dieser Phase die Expression RGC-spezifischer Proteine erfolgt. Nach dieser Regenerationsphase wurde den Zellen das Serum und damit die benötigten Wachstumsfaktoren entzogen, wodurch eine Apoptose in RGC-5 Zellen ausgelöst werden konnte.

Nach 24-stündiger Inkubation von differenzierten RGC-5 Zellen in serumfreiem Zellkulturmedium wurde die Anzahl vitaler Zellen mittels WST-1 ermittelt. Die Zellviabilität sank nach dem Entzug von Wachstumsfaktoren um ca. 40 %, verglichen mit RGC-5 Zellen, die in FCS-haltigem Medium inkubiert wurden (Abb. 40A).

Um das neuroprotektive Potential von konditioniertem Müllerzellenmedium zu ermitteln, wurden die RGC-5 Zellen in konditioniertem Zellüberstand von unbehandelten bzw. von rhNorrin-behandelten Müllerzellen kultiviert. Hierzu wurden

zunächst Müllerzellen mit serumfreien Medium mit oder ohne rhNorrin inkubiert. Damit das konditionierte Medium nicht durch Reste an rhNorrin verfälscht wurde, erfolgte nach achtstündiger Inkubation der Müllerzellen ein erneuter Medienwechsel und die Zellen wurden für weitere 16 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Mit dem konditionierten Zellüberstand wurden anschließend RGC-5 kultiviert.

In dem nach 24 Stunden durchgeführten WST-1 Assay zeigte sich, dass die Zellviabilität der RGC-5 Zellen durch Inkubation mit konditioniertem Müllerzellmedium im Vergleich zu den Kontrollzellen um fast 30 % anstieg. Dieser Effekt konnte durch konditioniertes Medium von rhNorrin-behandelten Zellen nochmals um 20 % gesteigert werden (Abb. 40B).

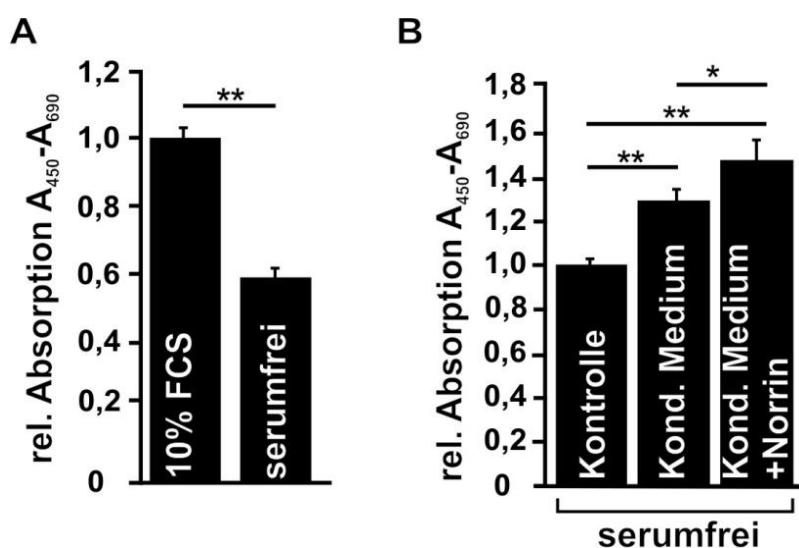


Abb. 40: Konditioniertes Müllerzellmedium hat eine neurotrope Wirkung auf differenzierte RGC-5 Zellen. WST-1 Analysen der Zellviabilität durch 24 stündigen Entzug des Serums (A) und Untersuchungen zur Wirkung von konditioniertem Müllerzellmedium auf die Viabilität von RGC-5 Zellen. Jeweils Zusammenfassung dreier unabhängiger Experimenten. $n = 28$, Mittelwert \pm SEM, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$.

4.5 Interaktionen zwischen Transforming Growth Factor- β und Norrin

Wachstumsfaktoren, die das Überleben von Neuronen regulieren, sind unter anderem Proteine der Transforming Growth Factor (TGF)- β Superfamilie. Im Kontext aus verschiedenen Stimuli/Faktoren können sie Apoptose induzieren oder verhindern. TGF- β -Proteine sind Cytokine, die selbst nicht neurotroph sind, aber die Wirkung anderer Wachstumsfaktoren modifizieren können (Krieglstein *et al.* 2002).

Neben diesen Effekten auf die Viabilität der Neuronen beeinflussen TGF- β Proteine auch die Angiogenese. So zeigen transgene Mäuse mit einer Überexpression von TGF- β 1 in der Linse eine unvollständige Vaskularisierung der Netzhaut, im Gegensatz zu Norrin-Überexpressionsmäusen (Zhao und Overbeek 2001, Ohlmann *et al.* 2005).

Da Norrin eine ähnliche Struktur wie TGF- β 1 besitzen soll (Meitinger *et al.* 1993) und zum Teil ähnliche, zum Teil gegensätzliche Funktionen in der Netzhaut ausübt, stellte sich die Frage, ob beide Proteine miteinander interagieren, bzw. ob sich die Signalwege gegenseitig beeinflussen können.

4.5.1 Norrin reduziert die TGF- β 1 vermittelte Luciferase-Induktion in MLECs

Um eine mögliche Wirkung von Norrin auf den TGF- β -Signalweg zu untersuchen, wurden zunächst Versuche an einer immortalisierten Lungenepithelzelllinie aus dem Nerz (MLEC) durchgeführt. MLECs sind stabil mit dem PAI/L-Vektor transfiziert, bei dem das Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle eines trunkierten Plasminogen Inhibitor-1 (PAI-1) Promoters steht. Dieser trunkierte Promoter spricht auf ein TGF- β 1 Signal an, bleibt aber durch andere Wachstumsfaktoren inaktiv (Abe *et al.* 1994).

Zur Kontrolle dieses Reportersystems wurden zunächst MLEC-Zellen mit verschiedenen TGF- β 1-Konzentrationen inkubiert (0 - 1,5 ng/ml) und nach 20 Stunden Inkubation wurde die Luciferase-Aktivität gemessen. Die maximale Aktivität wurde durch die Inkubation mit 1 ng/ml TGF- β 1 erreicht. Hier stieg die gemessene Anzahl emittierter Lichtquanten im Vergleich zur Kontrolle auf das etwa 10-fache an (Abb. 41), weshalb weitere Experimente mit 1 ng/ml TGF- β 1 durchgeführt wurden.

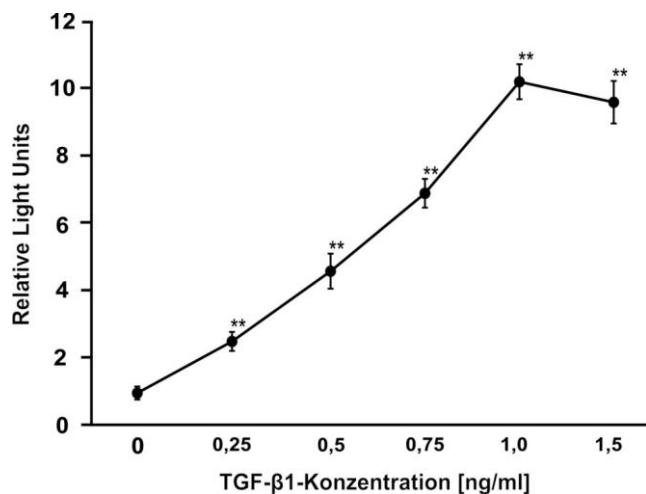


Abb. 41: Luciferase Reporter Assay. MLECs wurden 20 Stunden mit unterschiedlichen TGF- β 1-Konzentrationen inkubiert (0 - 1,5 ng/ml). Gezeigt ist die Zusammenfassung dreier unabhängiger Experimente. $n \geq 18$, Mittelwert \pm SEM.

Um einen möglichen Einfluss von Norrin auf TGF- β 1 zu untersuchen, wurden MLECs mit TGF- β 1 (1 ng/ml), rhNorrin (20 bzw. 40 ng/ml) oder einer Kombination aus beiden Wachstumsfaktoren inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 20 Stunden folgte die Auswertung des Versuchs im Luciferase Reporter Assay. Nach rhNorrin-Inkubation wurde keine erhöhte Luciferase-Aktivität gemessen, demgegenüber erhöhte die Inkubation mit TGF- β 1 deutlich die Expression der Luciferase. Die durch TGF- β 1 induzierte Erhöhung der Aktivität wurde dagegen durch die Kombinationsbehandlung mit 40 ng/ml rhNorrin um etwa 40 % gesenkt. Geringere rhNorrin-Konzentrationen hatten dagegen keinen Effekt auf die Wirkung von TGF- β 1 (Abb. 42).

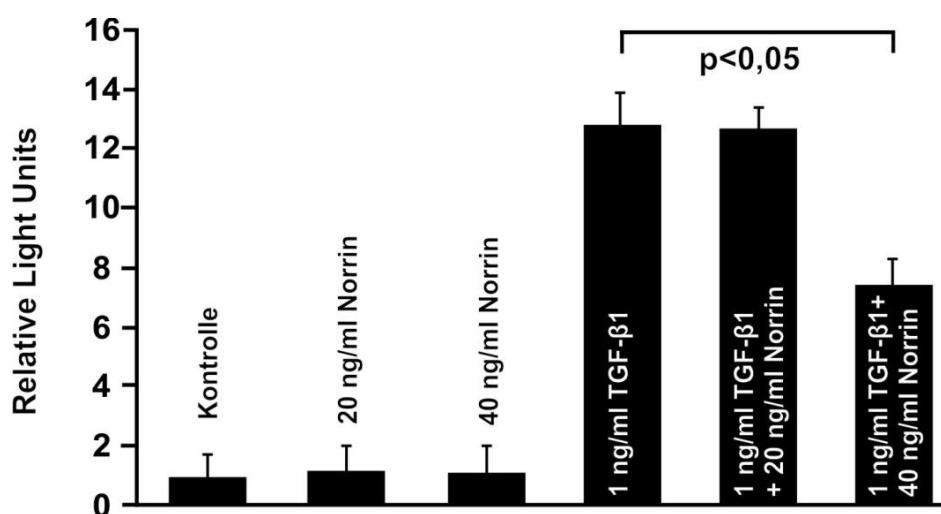


Abb. 42: Norrin reduziert die TGF- β 1-vermittelte Luciferase-Aktivität. MLECs wurden mit TGF- β 1 (1 ng/ml) und/oder rhNorrin (20 oder 40 ng/ml) inkubiert. Nach 20 Stunden wurde die TGF- β 1-induzierte Luciferase Aktivität gemessen. Gezeigt ist die Zusammenfassung dreier unabhängiger Experimente. $n \geq 18$; Mittelwert \pm SEM.

4.5.2 Norrin reduziert die von TGF- β 1 vermittelte PAI-1-Expression in HRMEC

Da der Luciferase Reporter Assay in einem sehr artifiziellen System mit einer immortalisierten Zelllinie und einem trunkierten PAI-1-Promoter durchgeführt wurde, sollte die Wirkung von Norrin auf TGF- β 1 nochmals in einem unabhängigen Modellsystem überprüft werden. Hierfür wurden HRMEC mit TGF- β 1, rhNorrin und einer Kombination aus beiden Wachstumsfaktoren inkubiert. Nach 72 Stunden wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und mittels quantitativer real-time RT-PCR analysiert. Die Inkubation mit rhNorrin hatte keinen Einfluss auf die Expression der PAI-1-mRNA. Dagegen war die Expression durch den Zusatz von TGF- β 1 etwa um das 3,5-fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Diese Induktion von PAI-1 konnte durch Kombinationsbehandlung mit rhNorrin signifikant um etwa 50 % reduziert werden (Abb. 43).

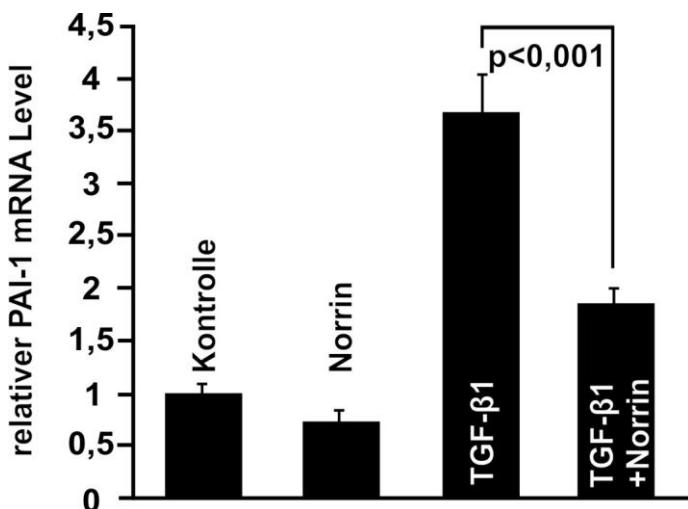


Abb. 43: Norrin reduziert die TGF- β 1-vermittelte Expression von PAI-1 in HRMEC. HRMEC wurden 16 Stunden mit TGF- β 1 (1 ng/ml), rhNorrin (40 ng/ml) oder einer Kombination aus beiden inkubiert. $n = 4$; Mittelwert \pm SEM.

4.5.3 Die Hemmung von TGF- β 1 durch Norrin wird über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg vermittelt

Der TGF- β - und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg modulieren sich gegenseitig während der Embryonalentwicklung, in der Entstehung von Tumoren etc. Da auch Norrin diesen Signalweg aktivieren kann, wurde im Folgenden untersucht, ob die Hemmung von TGF- β 1 durch Norrin über die Aktivierung des β -Catenin-Signalweges vermittelt wird.

Hierfür wurden MLEC-Zellen mit TGF- β 1 (1 ng/ml), rhNorrin (40 ng/ml), DKK-1 (100 ng/ml), TGF- β 1/rhNorrin oder TGF- β 1/rhNorrin/DKK-1 inkubiert. Nach 20 Stunden wurde die Luciferase-Aktivität gemessen. DKK-1 alleine nahm keinen Einfluss auf die Luciferase-Aktivität. Allerdings zeigte sich, dass durch die Hemmung des Fzd/LRP-Rezeptorkomplexes die inhibierende Wirkung von rhNorrin auf die TGF- β 1-vermittelte Luciferase-Aktivität ausblieb (Abb. 44).

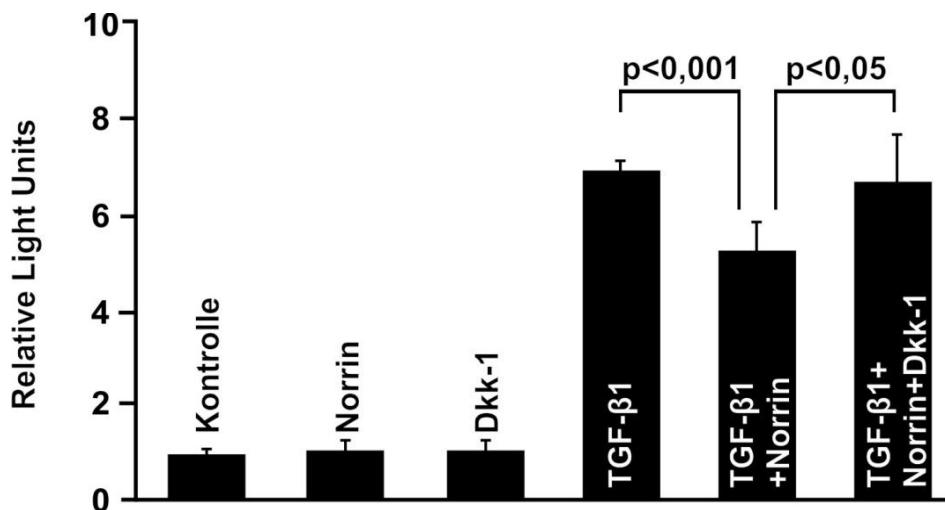


Abb. 44: DKK-1 reduziert die Norrin-vermittelte Hemmung von TGF- β 1. MLECs wurden 20 Stunden mit TGF- β 1 (1 ng/ml), rhNorrin (40 ng/ml), DKK-1 (100 ng/ml), TGF- β 1/rhNorrin oder TGF- β 1/rhNorrin/DKK-1 inkubiert. $n \geq 28$; Mittelwert \pm SEM.

4.5.4 TGF- β 1 reduziert die Norrin-induzierte Proliferation von HRMEC

Nachdem gezeigt wurde, dass Norrin TGF- β 1 hemmen kann, sollte im Folgenden untersucht werden, ob auch TGF- β 1 den Norrin-Signalweg beeinflusst.

In Kap. 4.1.3 wurde gezeigt, dass Norrin den β -Catenin-Spiegel im Zellkern mikrovaskulärer Endothelzellen erhöhen kann. Diese Wirkung von Norrin wurde genutzt, um einen Einfluss von TGF- β 1 auf Norrin-vermittelte Signale zu analysieren. HRMEC wurden hierzu zwei Stunden mit rhNorrin (40ng/ml), TGF- β 1 (1 ng/ml) oder einer Kombination aus beiden inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach der Inkubation wurden die Kernproteine mittels Western Blot Analyse auf β -Catenin hin untersucht. Es zeigte sich, dass der Norrin-induzierte Anstieg von β -Catenin durch die zusätzliche Behandlung der Zellen mit TGF- β 1 reduziert werden

konnte. Die densitometrische Auswertung dreier Western Blot Analysen bestätigte diesen Trend, der jedoch nicht statistisch signifikant war (Abb. 45).

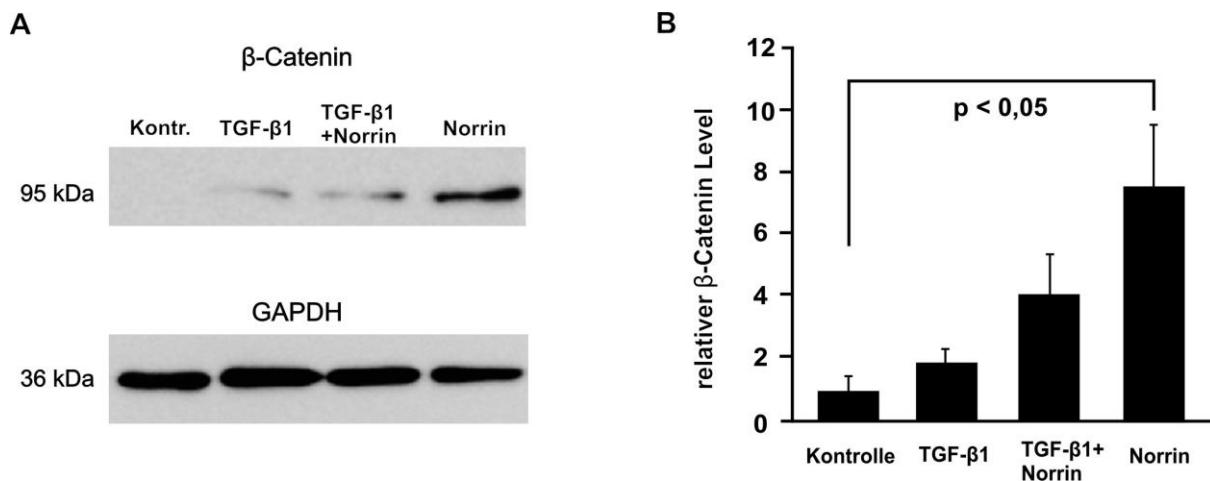


Abb. 45: Die Norrin-vermittelte Aktivierung des klassischen Wnt/β-Catenin-Signalwegs wird durch TGF-β1 gehemmt. A: Repräsentative Western Blot Analyse der nukleären Menge an β-Catenin in HRMEC nach Stimulation mit rhNorrin (40 ng/ml) und /oder TGF-β1 (1 ng/ml) mit dazugehöriger GAPDH-Ladungskontrolle. B: Densitometrische Auswertung dreier unabhängiger Western Blot Experimente gegen β-Catenin. $n = 3$, Mittelwert \pm SEM.

Da dieses Ergebnis zwar einen hemmenden Einfluss von TGF-β1 auf Norrin weiter vermuten lässt, dies aber nicht zweifelsfrei bestätigt werden konnte, wurden weitere unabhängige Experimente durchgeführt.

Hierfür wurden Proliferationsmessungen durchgeführt. HRMEC wurden für 24 Stunden mit Norrin, TGF-β1 oder einer Kombination aus beiden inkubiert. Anschließend wurde ein BrdU-Proliferationsassay durchgeführt. Die Norrin-Behandlung führte erwartungsgemäß zu einer erhöhten Proliferation der HRMEC. TGF-β1 beeinflusste die Proliferation der Zellen dagegen kaum. Die von Norrin vermittelte Steigerung der Proliferation um das 2,6-fache wurde durch die zusätzliche TGF-β1-Behandlung auf das etwa 2,2-fache gesenkt. Dieser Unterschied war signifikant (Abb. 46).

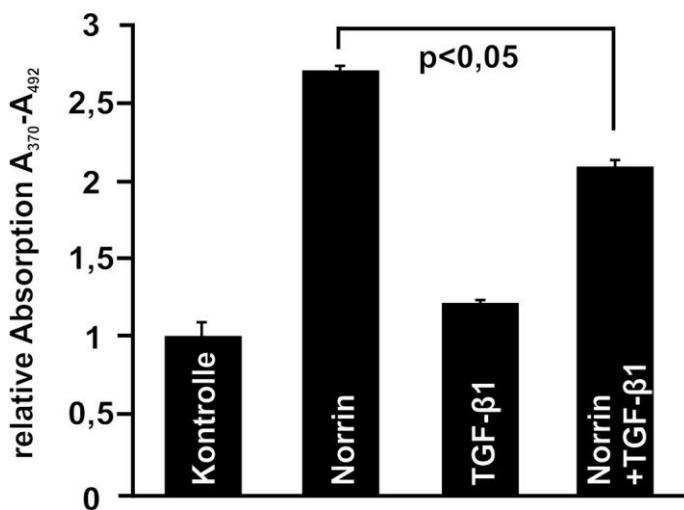


Abb. 46: TGF- β 1 reduziert die Norrin-induzierte Proliferation von HRMEC. HRMEC wurden 24 Stunden mit rhNorrin (40 ng/ml), TGF- β 1 (1ng /ml) oder einer Kombination aus rhNorrin und TGF- β 1 inkubiert. Gezeigt ist die Zusammenfassung dreier unabhängiger Experimente. $n = 12$, Mittelwert \pm SEM.

4.5.5. Kreuzung von β B1-TGF- β 1-Mäusen mit β B1-Norrin-Mäusen

Nachdem *in vitro* Experimente erste Hinweise auf eine Interaktion zwischen TGF- β 1- und dem Norrin-Signalweg lieferten, sollte diese Hypothese zusätzlich *in vivo* an transgenen Tieren überprüft werden. TGF- β 1 reguliert während der Augenentwicklung die Differenzierung der Netzhaut über die Induktion von Apoptosen in retinalen Vorläuferzellen (Beier *et al.* 2006). β B1-TGF- β 1-Mäuse, die ektopes TGF- β 1 in der Linse exprimieren, zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine erhöhte Anzahl an pyknotischen Zellkernen in der Netzhaut, was auf Apoptosen hindeutet. Zudem bilden diese Tiere keinen Glaskörper aus (Flügel-Koch *et al.* 2002).

Bei fünf Tage alten Wildtyp-Mäusen ist der Glaskörper deutlich ausgebildet, in der Retina finden sich vereinzelt Zellen mit pyknotischen Zellkernen (Abb. 47A). Die Retina der Norrin-Überexpressionsmäuse erscheint weitestgehend physiologisch. Das Auge und damit der Glaskörper ist insgesamt etwas kleiner als ein Wildtyp-Auge (Abb. 47B). β B1-TGF- β 1-Mäuse zeigen eine deutlich vermehrte Anzahl an apoptotischen Zellen in der Netzhaut. Es bildet sich kein Glaskörperraum aus, wodurch die Linse direkt der Retina anliegt (Abb. 47C). Durch die Kreuzung von β B1-TGF- β 1-Mäusen mit β B1-Norrin-Mäusen war nicht nur die Anzahl pyknotischer Zellkerne in der Netzhaut, verglichen mit TGF- β 1-Überexpressionstieren, deutlich reduziert, sondern es entwickelte sich zudem wieder ein Glaskörperraum aus,

wenngleich dieser aber wesentlich kleiner war als bei entsprechenden Wildtyp-Tieren (Abb. 47D).

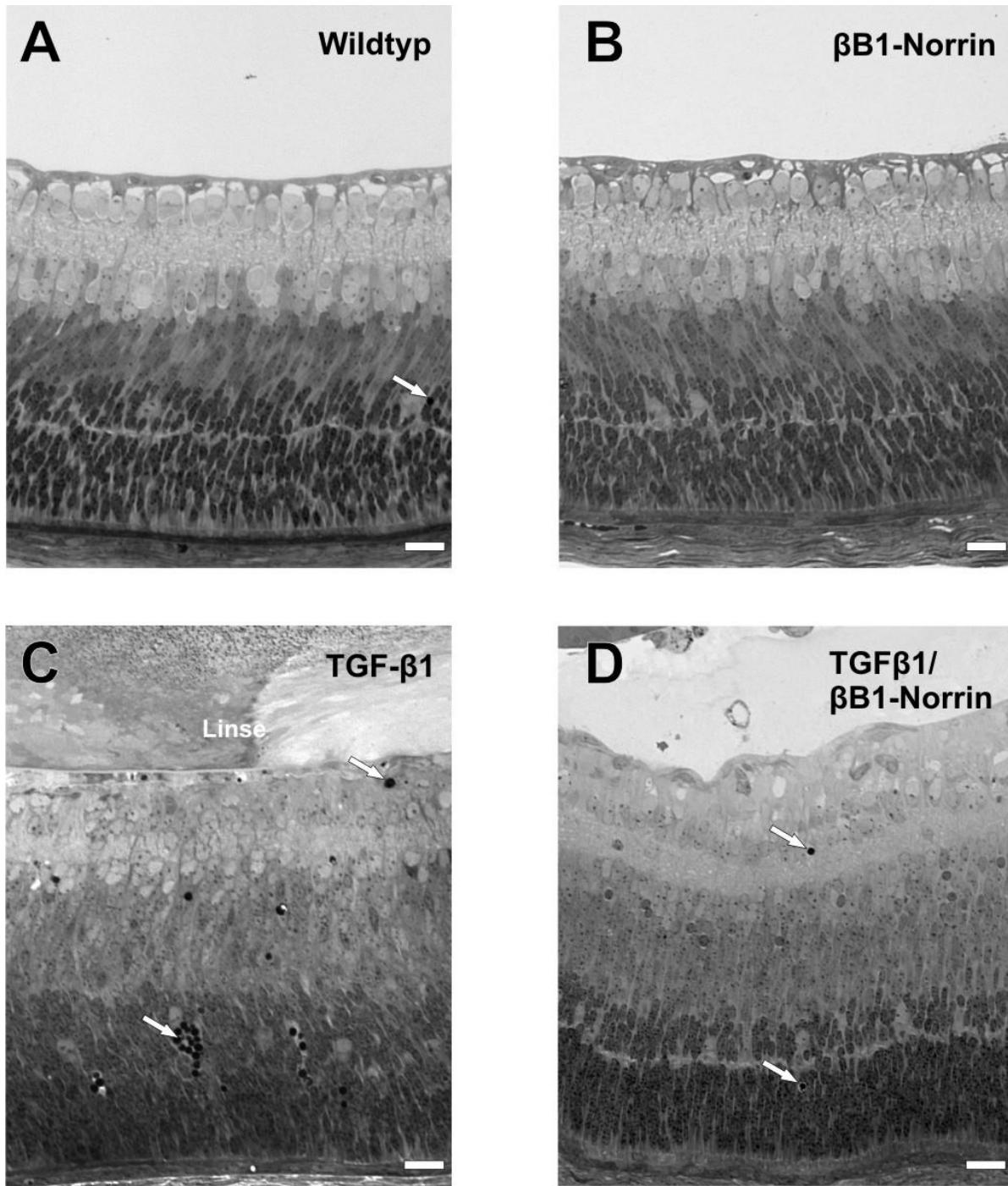


Abb. 47: Kreuzung von β B1-TGF- β 1-Mäuse mit β B1-Norrin Mäusen. Exemplarische sagittale Semidünnsschnitte der Retina von fünf Tage alten Mäusen. Die Retina von β B1-Norrin-Mäusen (B) zeigt im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (A) keine deutlichen Unterschiede. In der Netzhaut von β B1-TGF- β 1-Mäusen (C) findet man vermehrt pyknotische Zellkerne, ein Hinweis auf Apoptosen (Pfeile). Zudem liegt die Linse direkt der Retina auf, da sich kein Glaskörper entwickelt. Durch die Kreuzung beider transgener Tierlinien (D) bildet sich wieder ein Glaskörper und die Anzahl apoptotischer Zellen in der Netzhaut ist verglichen mit TGF- β 1-Überexpressionstieren deutlich reduziert. Messbalken = 20 μ m.

Zusammenfassend liefern die bisherigen Ergebnisse erste Hinweise auf eine potentielle Interaktion von Norrin mit dem TGF- β 1-Signalweg.

5 Diskussion

5.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem humanen Norrin

Die stabile Transfektion eukaryontischer Zellen (Hek293) mit dem pSNOS-Expressionsvektor und die Aufreinigung von rhNorrin aus dem Zellüberstand der transfizierten Zellen ermöglichte die Analyse der Funktion von Norrin.

Da in dieser Arbeit die Funktionalität von Norrin *in vitro* und *in vivo* untersucht werden sollte, war es nötig eine potentielle Verunreinigung des Proteins mit Endotoxinen zu vermeiden. Zum anderen sollten mögliche posttranskriptionale Modifikationen erhalten bleiben, um die Bioaktivität des rekombinanten Proteins zu sichern. Beides kann für das bislang kommerziell erhältliche rekombinante Norrin nicht gewährleistet werden, da dies aus bakteriellen Expressionssystemen gewonnen wird. Aus diesem Grund wurden für diese Arbeit Säugerzellen als Expressionssystem gewählt.

Der erste wichtige Schritt war zunächst der Austausch der endogenen Signalpeptidsequenz gegen den murinen Igk-Leader, dieser sollte die Sekretion von rhNorrin sicherstellen (Coloma *et al.* 1992). Aus unveröffentlichten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war bekannt, dass frühere Aufreinigungsversuche an der zu geringen Sekretion des rekombinanten Proteins in das zu konditionierende Medium der transfizierten Zellen gescheitert waren. Auch in anderen Arbeitsgruppen schienen diese Schwierigkeiten aufzutreten (Shastry und Trese 2003). Perez-Vilar und Hill transfizierten bereits 1997 eukaryontische Zellen (Cos7) mit Expressionsvektoren, die zur Überexpression von Norrin führten. Norrin wurde daraufhin zwar sezerniert, gelangte aber nicht in das Medium, sondern fand sich fast ausschließlich in der extrazellulären Matrix, von der es nur unter denaturierenden Bedingungen wieder gelöst werden konnte (Perez-Vilar und Hill 1997). Durch eine erhöhte Sekretion bestand die Möglichkeit dieses Problem umgehen zu können, indem die Bindungsstellen der extrazellulären Matrix für Norrin durch dessen Überangebot im Medium sozusagen „abgesättigt“ werden.

Nach dem Austausch der endogenen Signalpeptidsequenz konnte die Expression und Sekretion von rhNorrin im Zellüberstand der transfizierten Zellen durch Western Blot Analysen nachgewiesen werden. Die im Immunoblot gelegentlich auftretende zusätzliche Doppelbande könnte auf eine teilweise fehlerhafte Prozessierung oder auf eine post-transkriptionale Modifikation hindeuten. Es ist aus drei Gründen

unwahrscheinlich, dass es sich um eine unspezifische Artefaktbande handelt: (1) Die zusätzliche Bande tauchte bei zwei verschiedenen Antikörpern auf (anti-His und anti-rhNorin). (2) Die zwei Antikörper wurden aus verschiedenen Tieren gewonnen (rabbit und goat), es wurden also verschiedene Sekundärantikörper benutzt. (3) Die zusätzliche Bande konnte nur im Überstand pSNOS-transfizierter Hek-293-EBNA Zellen detektiert werden, nicht aber im Überstand untransfizierter Zellen.

Viele extrazelluläre Signalmoleküle binden an Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie Heparansulfat oder Heparin. Dies ermöglicht z.B die Rezeptorbindung oder hilft bei der Kontrolle des Umsatzes eines Signalmoleküls (Schönherr und Hausser 2000, Harmer 2006, Smallwood *et al.* 2007). Wie oben bereits beschrieben, konnte gezeigt werden, dass Norrin mit hoher Affinität an die extrazelluläre Matrix bindet. Perez-Vilar und Hill konnten 1997 Norrin nur durch eine Behandlung von 6 M Guanidin HCl aus der extrazellulären Matrix lösen. Sie schlossen eine Bindung von Norrin an Heparin oder Heparansulfat aus, da es bei ihren Versuchen nicht möglich war, Norrin durch 1 M NaCl oder durch den Einsatz von Heparinasen zu eluieren. Demgegenüber konnten 2007 Smallwood *et al.* jedoch zeigen, dass Norrin nicht nur an Heparin binden kann, sondern auch durch relativ milde Bedingungen, wie 1 M NaCl, wieder gelöst werden kann (Smallwood *et al.* 2007). Da die Aufreinigung von rhNorrin unter möglichst nativen Bedingungen stattfinden sollte, um die Bioaktivität des Proteins nicht zu gefährden, wurde die Affinität zu Heparin hierfür genutzt. Auch im Rahmen dieser Arbeit gelang die Bindung von rhNorrin an Heparin und die Elution davon durch 1-2 M NaCl. Zudem konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Bioaktivität des Proteins durch die Aufreinigungsprozedur nicht verloren ging.

Andere Arbeitsgruppen konnten in Zellkulturexperimenten und Tiermodellen bereits zeigen, dass Norrin durch die Bindung an den Fzd4-Rezeptor und den LRP5-Korezeptor den klassischen Wnt/β-Catenin-Signalweg aktivieren kann (Xu *et al.* 2004). Da im Rahmen dieser Arbeit ein Teil der Experimente an humanen retinalen Endothelzellen (HRMEC) durchgeführt werden sollte, wurde die Aktivität des aufgereinigten Proteins an dieser Zelllinie getestet. Durch die Behandlung mit rhNorrin konnte β-Catenin in HRMEC deutlich angereichert werden. Immunzytochemische Färbungen mit einem spezifischen Antikörper zeigten eine perinukleäre Akkumulation von β-Catenin. Parallel durchgeführte Western Blot Analysen der nukleären Proteine zeigten, dass β-Catenin aufgrund der Norrin-Stimulation tatsächlich vermehrt in den Zellkern transloziert wird.

Die erfolgreiche Aufreinigung eines bioaktiven rhNorrins ermöglichte es, die bislang hauptsächlich aus dem Studium transgener Tiere gewonnenen Erkenntnisse (Berger *et al.* 1996, Richter *et al.* 1998, Ohlmann *et al.* 2005) umfassend zu ergänzen.

5.2 Die angiogene Wirkung von Norrin auf mikrovaskuläre Endothelzellen *in vitro*

Untersuchungen an Norrin-defizienten ($Ndp^{y^{\prime}}$) Mäusen, einem Tiermodell für das Norrie-Syndrom, lieferten Hinweise auf einen möglichen Pathogenesemechanismus dieser Erkrankung. Da $Ndp^{y^{\prime}}$ -Mäusen die tiefen retinalen Gefäße fehlen, liegt die Vermutung nahe, dass Norrin für die Bildung des tiefen Gefäßplexus essentiell ist (Richter et al. 1998). Die Möglichkeit einer angiogenen Wirkung von Norrin wurde durch die Untersuchungen eines weiteren Tiermodells bekräftigt. β B1-Norrin Mäuse bilden ektopes Norrin unter der Kontrolle des linsenspezifischen β B1-Crystallin-Promoters. Diese Mäuse entwickeln im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant mehr Gefäße in der *Tunica vascularis lentis*, die während der Augenentwicklung der posterioren Oberfläche der Linse anliegt und diese versorgt (Ohlmann et al. 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die direkte Wirkung von Norrin mit *in vitro* Angiogenese Assays auf mikrovaskuläre Endothelzellen der Netzhaut (HRMEC) und der Haut (HDMEC) untersucht. Ein angiogener Effekt von Norrin konnte bestätigt werden, da: (1) Norrin die Proliferation mikrovaskulärer Endothelzellen induziert. (2) Norrin die Migration von HDMEC und HRMEC fördert. (3) Durch die Stimulation mit Norrin die Bildung kapillarähnlicher Strukturen (Tube Formation) durch HRMEC deutlich gesteigert wird.

Die Resultate dieser Arbeit deuten zudem darauf hin, dass die angiogene Wirkung von Norrin hauptsächlich durch die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs vermittelt wird. In verschiedenen Experimenten konnte durch die spezifische Hemmung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mit dem LRP5/6-Inhibitor DKK-1 die Norrin-Wirkung reduziert oder gar vollständig gehemmt werden (Mao et al. 2001, (Zorn 2001).

Die Stabilisierung von β -Catenin durch den Fzd4/Norrin-Komplex ist abhängig vom LRP5-Korezeptor (Xu et al. 2004). Neuere Studien haben gezeigt, dass zudem Tetraspanin (TSPAN)12 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Norrin/ β -Catenin-Signalweges in Endothelzellen spielt, indem es die nötige Formierung eines aktiven Fzd4-Norrin-LRP5-Komplexes ermöglicht. Interessanterweise kann TSPAN12 den Norrin-vermittelten β -Catenin-Signalweg spezifisch verstärken, ohne dabei den Wnt/ β -Catenin Signalweg zu beeinflussen (Ye et al. 2009). Für eine Beteiligung von TSPAN12 am Norrin-Signalweg spricht auch die Tatsache, dass *Norrin*-, *Fzd4*-, *LRP5*- und *TSPAN12*-defiziente Mäuse jeweils einen ähnlichen Gefäßphänotyp

zeigen (Xu *et al.* 2004, Xia *et al.* 2008, Junge *et al.* 2009). Zudem wurde vor kurzem eine weitere Mutation entdeckt, die mit der familiären exsudativen Vitreopathie (FEVR) assoziiert ist. Mutationen im Genlocus von *TSPAN12* führen zu einer autosomal-dominant vererbten Form von FEVR (Poulter *et al.* 2010). Damit steht *TSPAN12* in einer Reihe mit *LRP5*, *NDP* und *FZD4* (Chen *et al.* 1993, Robitaille *et al.* 2002, Jiao *et al.* 2004).

Um das angiogene Potential von Norrin *in vitro* zu untersuchen, wurde sein Einfluss auf die Proliferation, die Migration und die Fähigkeit zur Bildung kapillarähnlicher Strukturen von mikrovaskulären Endothelzellen untersucht.

Durch die Inkubation mit Norrin wurden HDMEC und HRMEC zur Proliferation angeregt. Die Vermutung liegt nahe, dass diese Wirkung über eine Norrin/β-Catenin Signaltransduktion vermittelt wird, da die Steigerung des Zellwachstums durch DKK-1 gehemmt werden konnte. Der Norrin-Effekt auf die Proliferation war zeitlich begrenzt. Bei einer länger als 48 Stunden andauernden Inkubation konnte keine proliferationsfördernde Wirkung mehr nachgewiesen werden. Dies kann mehrere Gründe haben. Zum einen könnte das rekombinante Protein durch Proteasen inaktiviert worden sein. Eine alternative Möglichkeit ist, dass über eine negative Rückkopplung typische regulatorische Prozesse in Gang gesetzt werden. So kommt es nach der Aktivierung von Fzd4 etwa zur Internalisierung des Rezeptors (Chen *et al.* 2003). Zudem kann die Expression des Inhibitors DKK-1 durch die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalweges erhöht werden (González-Sancho *et al.* 2005).

Neben der Wirkung auf die Proliferation von Endothelzellen, wurde das angiogene Potential von Norrin in zwei weiteren Angiogenese Assays untersucht. Norrin konnte die Migration mikrovaskulärer Endothelzellen steigern und die Bildung kapillarähnlicher Strukturen in HRMEC induzieren.

Durch die Koinkubation mit DKK-1 konnte gezeigt werden, dass die Norrin-vermittelte Steigerung der Migration über β-Catenin vermittelt wird. Dass die Norrin-induzierte Bildung kapillarähnlicher Strukturen ebenfalls über den Wnt/β-Catenin-Signalweg vermittelt wird, lassen die Beobachtungen von Ye *et al.* vermuten. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass aus *Fzd4*^{-/-}-Mäusen isolierte retinale Endothelzellen (RECs) keine kapillarähnlichen Strukturen bilden können. Die Bildung kapillarähnlicher Strukturen kann also von Norrin induziert werden und ist zudem

vom Fzd4-Rezeptor abhängig. Es ist also wahrscheinlich, dass dieser Effekt über eine Stabilisierung von β -Catenins vermittelt wird.

Ye *et al.* beobachteten zudem, dass eine Norrin-Überexpression in Mäusen eine massive Expressionsteigerung des Transkriptionsfaktors Sox17 induzierte. Dies führte zu der Überlegung, dass die angiogene Wirkung von Norrin letztlich durch diesen Transkriptionsfaktor vermittelt wird. Tatsächlich konnte die Bildung kapillarähnlicher Strukturen in *Fzd4*^{-/-}-RECs induziert werden, wenn diese mit einem Lentivirus infiziert wurden, der Sox17 exprimierte. Dieser Versuchsausgang legt die Vermutung nahe, dass Norrin und Fzd4 ihre angiogene Wirkung über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Sox17 vermitteln (Ye *et al.* 2009). Je nach Kontext kann Sox17 auf unterschiedliche Weise mit β -Catenin wechselwirken. Zum einen kann es als Antagonist der Wnt/ β -Catenin-vermittelten Genregulation wirken, zum anderen können beide Faktoren zusammen die Transkription gemeinsamer Gene induzieren (Sinner *et al.* 2004, Fu *et al.* 2010). Die Modulation verschiedener Gene durch Norrin-induzierte Transkriptionsfaktoren könnte Aufschluß darüber geben, wodurch sich die Fzd4-vermittelten Signale von Norrin und anderer Liganden unterscheiden.

Der Verlust retinaler Gefäße und die darauf folgende Neovaskularisierung begleitet viele Erkrankungen der Netzhaut, wie etwa die diabetische Retinopathie. Das Problem der Neovaskularisierung ist, dass die neu induzierten Gefäße oftmals unkontrolliert in das Gewebe einwachsen und dabei bestehende Strukturen zerstören. Zudem weisen diese neuen Gefäße meist eine erhöhte Permeabilität auf, was zu Einblutungen in die Netzhaut führen kann. Parallel zu dieser Arbeit zeigten Untersuchungen der Arbeitsgruppe an einem Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR), dass Norrin zum einen den Verlust von Blutgefäßen vermindern kann, zum anderen zu einer gerichteten Neovaskularisierung führt. Bei dem OIR-Modell wurden Mäuse zwischen den postnatalen Tagen 7 und 8 in einer 70 %-igen Sauerstoff-Umgebung gehalten. Zu diesem Zeitpunkt ist die Bildung des Kapillarbetts der Retina noch nicht abgeschlossen. Durch die Hyperoxie kann deshalb zum einen der Verlust von bestehenden Gefäßen beobachtet werden, zum anderen der Entwicklungsstop des Gefäßnetzes (Smith *et al.* 1994).

Zwei transgene Mauslinien, die sich beide durch eine ektopische Norrin-Überexpression entweder im retinalen Pigmentepithel (RPE65-Norrin) oder in der Linse (β B1-Norrin)

auszeichnen, wurden in dem OIR-Modell untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der Gefäßverlust beider transgener Linien weit weniger ausgeprägt war als bei nicht-transgenen Geschwistertieren. Zum anderen verlief die Regeneration der ischämischen Areale kontrolliert, also unter Berücksichtigung der Netzhautstrukturen, ab.

Die Expression von Norrin in Wildtyp-Mäusen wird während einer Hyperoxie vermindert und steigt auch nach der Hyperoxie nicht über das normale Expressionsniveau. Die Expression vieler anderer angiogener Faktoren wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) wird ebenfalls während einer Hyperoxie vermindert, steigt aber danach deutlich an. Dies führt zu einer unkontrollierten Proliferation der Gefäße. Diese präretinale Neovaskularisierung führt letztlich zur Netzhautablösung und damit zu einer Sehminderung bis hin zur Erblindung (Pierce *et al.* 1995,). Im Gegensatz hierzu führen hohe Mengen an Norrin zu einem gerichteten Wachstum der Gefäße und dirigieren diese in die anatomisch korrekte Position, während sie pathologisches Gefäßwachstum verhindern (Ohlmann *et al.* 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Norrin die Expression von Wachstumsfaktoren wie PEDF, FGF-2 und BDNF in Müllerzellen induziert. Dies wurde zwar vor dem Hintergrund einer möglichen neuroprotektiven Funktion von Norrin untersucht, die Induktion von Wachstumsfaktoren in Müllerzellen könnte jedoch nicht nur in Bezug auf eine neuroprotektive Wirkung von Norrin interessant sein. Müllerzellen sind durch die Sekretion angiogener und anti-angiogener Wachstumsfaktoren an der Regulation der retinalen Angiogenese beteiligt (Bringmann *et al.* 2006, Abukawa *et al.* 2009). PEDF zum Beispiel ist ein wichtiger anti-angiogener Faktor, der pathologisches Gefäßwachstum in der Netzhaut unterdrückt (Eichler *et al.* 2004, Barnstable und Tombran-Tink 2004). Andere Faktoren, deren Expression durch Norrin induziert wird, wirken dagegen angiogen, wie etwa FGF-2 oder BDNF (Simó *et al.* 2006, Liu *et al.* 2006). Neben seiner direkten angiogenen Wirkung könnte Norrin das Einwachsen von Gefäßen indirekt über die Regulation anti- und pro-angiogener Faktoren steuern. Wie sich die Expression der genannten Faktoren während bzw. nach einer Hyperoxie in transgenen β B1-Norrin Tieren verhält, könnte zum Verständnis beitragen, worin der Unterschied zwischen VEGF-induzierter und Norrin-induzierter Neovaskularisierung liegt.

Der Hyperoxie-induzierte Verlust an retinalen Gefäßen war, wie bereits oben beschrieben, in Norrin-Überexpressionsmäusen deutlich geringer als in Wildtyp-Mäusen. Diese protektive Wirkung von Norrin wurde auch im Rahmen dieser Arbeit in den *in vitro* Versuchen beobachtet. Die Inkubation von HDMEC und HRMEC mit Norrin unter serumfreien Bedingungen führte bei beiden Zelllinien zu einem deutlichen Anstieg der Überlebensrate der Zellen. Dieser Effekt war nach drei Tagen am ausgeprägtesten und trotz Abnahme bis zu sechs Tage nachweisbar. Durch die *in vitro* und die *in vivo* Daten kann man folgern, dass Norrin eine Schutzfunktion auf Endothelzellen ausübt und möglicherweise zur Aufrechterhaltung des retinalen Kapillarbetts notwendig ist.

Diese Beobachtung ist insbesondere im Hinblick auf okuläre Erkrankungen interessant, die mit erhöhtem Endothelzelluntergang assoziiert sind. Diese protektive Wirkung von Norrin könnte z.B. ein Ansatzpunkt zur Behandlung von Krankheiten wie diabetischer Retinopathie, der häufigsten mikrovaskulären Komplikation des Diabetes mellitus, sein (Mizutani *et al.* 1996, Gardner *et al.* 2002).

Die angiogene Wirkung bzw. die Schutzfunktion von Norrin beschränkte sich nicht nur auf mikrovaskuläre Endothelzellen retinalen Ursprungs. Daher kann eine ubiquitäre Wirksamkeit des Norrin-Signalwegs angenommen werden, auch wenn Norrin nicht im ganzen Körper endogen exprimiert wird (Berger *et al.* 1996). Krankheiten, denen ein Verlust von Blutgefäßen zugrunde liegt, wie etwa zerebrale Ischämien oder ischämische Kardiomyopathien, könnten durch ektopes Norrin therapiert werden.

Da die Proliferation und die Migration durch die zusätzliche Behandlung mit DKK-1 gehemmt werden, liegt die Schlußfolgerung nahe, dass die Norrin-induzierte angiogene Wirkung direkt oder indirekt über den Wnt/β-Catenin-Signalweg vermittelt wird.

5.3 Neuroprotektive Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen

Anhand der erhobenen Daten lässt sich schließen, dass Norrin ausgeprägte neuroprotektive Eigenschaften besitzt, die über den Wnt/β-Catenin-Signalweg vermittelt werden. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei offenbar die Induktion von neurotrophen Faktoren wie FGF-2 und CNTF in Zellen der Müller Glia.

Die im Tier beobachteten Befunde wurden mit Hilfe des NMDA-Schadensmodells erhoben. Durch die intravitreale Injektion des synthetischen Glutamatanalogons NMDA werden NMDA-Glutamat-Rezeptoren in retinalen Ganglienzellen und Amakrinzellen überaktiviert. Der daraus resultierende exzessive Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen aktiviert die Apoptose-Signalkaskade und leitet somit den Zelltod ein (Li *et al.* 1999, Shen *et al.* 2006). Eine Überaktivierung von NMDA-Glutamat-Rezeptoren durch einen pathologisch erhöhten Glutamat-Spiegel wird als Ursache von mehreren neurodegenerativen Erkrankungen des Auges, wie etwa dem Glaukom, diskutiert (Dreyer 1998, Seki und Lipton 2008).

Durch die Injektion von 10 mM NMDA in den Glaskörper von C57/Bl6 Mäusen wurde ein ausgeprägter Schaden retinaler Ganglienzellen induziert, der durch Norrin abgemildert werden konnte. Dies zeigten folgende Befunde: (1) Die Anzahl TUNEL-positiver Zellen 24 Stunden nach Injektion war durch zusätzliche Norrin-Behandlung deutlich geringer. (2) Die Anzahl der Perikarya und die Fläche der inneren plexiformen Schicht war drei Wochen nach Injektion in den zusätzlich mit Norrin injizierten Augen signifikant höher als in den nur mit NMDA behandelten Retinae. (3) Drei Wochen nach zusätzlicher Injektion von Norrin fanden sich etwa 80 % mehr Axone im *Nervus opticus*, verglichen mit alleiniger NMDA-Injektion.

Durch die Injektion von NMDA reduzierte sich die Anzahl der Axone im *N. opticus* von etwa 42,000 auf ca. 10,000, was einer Reduktion auf etwa ein Viertel des Ausgangswertes entspricht. Durch die zusätzliche Injektion von Norrin stieg die Zahl überlebender Axone wieder auf etwa 18,000 an. Vorher konnte bereits gezeigt werden, dass Norrin die NMDA-induzierten Apoptose retinaler Neurone deutlich reduzieren kann. Da der Verlust von Axonen im Sehnerve die direkte Folge eines durch NMDA-hervorgerufenen Untergangs retinaler Ganglienzellen ist, deuten die Befunde insgesamt darauf hin, dass Norrin eine anti-apoptotische Wirkung besitzt.

In Western Blot Analysen konnte ein deutlicher Anstieg von β-Catenin in Retinae, die mit Norrin alleine oder in Kombination mit NMDA behandelt wurden, erkannt werden.

Die anti-apoptotische Wirkung des Wnt/β-Catenin-Signalweges bzw. seiner Komponenten wurde schon mehrfach für neuronale, aber auch für nicht neuronale Zellen beschrieben (Chen *et al.* 2001, Cappuccio *et al.* 2005, Yi *et al.* 2007). Da auch Norrin über diesen Signalweg wirken kann, wurde überprüft, ob eine Hemmung durch DKK-1 die Norrin-vermittelte Protektion beeinflusst. Aus Arbeiten anderer Arbeitsgruppen war bekannt, dass ein DKK-1-antisense Knockdown die ischämische Schädigung von Neuronen *in vivo* deutlich mindern kann. Zudem kann der NMDA-induzierte Schaden einer aus dem Neokortex isolierten Primärkultur, bestehend aus Astrozyten und Neuronen, durch DKK-1 deutlich verstärkt werden. DKK-1 selbst induzierte in diesem *in vitro* Modell den Zelltod (Cappuccio *et al.* 2005). Diese Wirkung von DKK-1 ist vermutlich auf die Inhibition des endogenen Wnt/β-Catenin Signalweges zurückzuführen. Um den Effekt von DKK-1 auf das NMDA-Schadensmodell der Netzhaut zu überprüfen, wurden NMDA und NMDA/DKK-1 intravitreal injiziert. Hier zeigte die Injektion von DKK-1 keine signifikante Reduktion der Axone im *Nervus opticus*. Dieser Befund deutet darauf hin, dass in diesem Modell eines akuten Schadens der endogene Wnt/β-Catenin-Signalweg eine untergeordnete Rolle spielt. Die Norrin-induzierte Protektion der Axone konnte dagegen durch die Injektion von DKK-1 nahezu vollständig gehemmt werden. Der Norrin-vermittelte neuroprotektive Effekt wird also zumindest zum Teil durch die Induktion des Wnt/β-Catenin-Signalweges vermittelt.

Eine weitere Komponente der Norrin-vermittelten Protektion ist die Induktion der Synthese verschiedener neurotropher Faktoren. Durch eine kombinierte Injektion aus NMDA und Norrin wurde die Expression von LEDGF, BDNF, FGF-2 und CNTF in der Netzhaut signifikant gesteigert. Die neurotrophe Funktion dieser Wachstumsfaktoren wurde bereits im Zusammenhang mit verschiedenen Modellen der Netzhautdegeneration beschrieben (Mey und Thanos 1993, Gao und Hollyfield 1996, Machida *et al.* 2001, Cappuccio *et al.* 2005). Interessanterweise konnte eine alleinige Norrin-Injektion, ohne NMDA, nur die Expression des Wachstumsfaktors FGF-2 in der Retina erhöhen. Es ist also offensichtlich neben Norrin noch ein weiter Stimulus nötig, etwa eine akute Schädigung der Netzhaut, um die Expression neurotropher Faktoren in der Retina substanziell zu erhöhen.

Die Induktion von FGF-2 durch eine alleinige Norrin-Injektion könnte durch die leichte Steigerung der Leukemia Inducible Factor (Lif)-mRNA durch Norrin erklärt werden.

Diese Steigerung war im Vergleich zu unbehandelten Augen zwar nicht signifikant, dennoch könnte diese Tendenz die Steigerung der FGF-2 Expression erklären. Die Induktion von FGF-2 durch Lif wurde bereits beschrieben (Joly *et al.* 2008).

Dass die erhöhte mRNA-Expression neurotropher Faktoren auch tatsächlich eine erhöhte Translation zur Folge hat, konnte exemplarisch für die Faktoren FGF-2 und CNTF gezeigt werden. Da bei den durchgeführten Dot Blot Analysen keine Auf trennung der Proteine nach der Größe erfolgt, wurde zunächst die Spezifität der beiden verwendeten Antikörper in Western Blot Analysen retinaler Proteine nachgewiesen. Hierbei fand sich für den FGF-2 Antikörper eine spezifische Bande auf der Höhe eines Dimers. Dies ist keineswegs ungewöhnlich, da sezerniertes FGF-2 zur Rezeptoraktivierung Dimere bildet (Moy *et al.* 1997, Ornitz 2000).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die zusätzliche Injektion von Norrin die Expression von GFAP in der geschädigten Netzhaut deutlich erhöht ist. Die Erhöhung der intraretinalen GFAP-Expression ist ein allgemeiner Marker für eine vorliegende Schädigung der Netzhaut und deutet auf die Aktivierung der Müllerzellen hin (Lewis und Fisher 2003, Eisenfeld *et al.* 1984, Bringmann *et al.* 2006). Müllerzellen sind neben Mikroglia eine der Hauptquellen für die Produktion neurotropher Faktoren während eines Netzhautschadens (Bringmann *et al.* 2006).

Tatsächlich konnte auch in isolierten Müllerzellen durch Stimulation mit Norrin die Expression verschiedener neurotropher Faktoren erhöht werden. Dass die Induktion der Expression neurotropher Faktoren in Müllerzellen überwiegend durch den Wnt/β-Catenin-Signalweg vermittelt wird, konnte anhand von DKK-1 Hemmexperimenten gezeigt werden.

Die in der Retina gewonnenen Daten zeigen aber, dass der Wnt/β-Catenin-Signalweg nicht alleine für die gesteigerte Expression neurotropher Faktoren verantwortlich zu sein scheint, sondern ein zusätzlicher Stimulus benötigt wird. Hier konnte durch eine alleinige Injektion von Norrin zwar die Menge an retinalem β-Catenin erhöht werden, aber alleine die Expression von FGF-2 wurde durch Norrin gesteigert. Die Tatsache, dass bei den *in vitro* Versuchen neben Norrin kein weiteres Signal nötig war um die Expression neurotropher Faktoren zu erhöhen, könnte dadurch erklärt werden, dass die isolierten Müllerzellen bereits aktiviert waren. Ein Hinweis dafür ist die Expression von GFAP der kultivierten Müllerzellen.

An Müllerzellen konnte, parallel zu den in der Netzhaut gewonnenen Ergebnissen, gezeigt werden, dass der gesteigerten Translation von FGF-2 und CNTF auch eine vermehrte Sekretion dieser Faktoren folgt. Dies konnte direkt mittels Dot Blot Analysen nachgewiesen werden. Ein funktioneller Nachweis erfolgte durch die Behandlung von differenzierten RGC-5 Zellen, die mit konditioniertem Zellkulturmedium Norrin-stimulierter Müllerzellen eine signifikant höhere Überlebensrate zeigten. In RGC-5 Zellen kann durch den Entzug von Wachstumsfaktoren Apoptose induziert werden (Tatsumi *et al.* 2008). Die Kultivierung mit dem konditionierten Überstand unbehandelter Müllerzellen erhöhte die Viabilität der RGC-5 bereits deutlich. Dieser Effekt wurde nochmals signifikant gesteigert, wenn das konditionierte Medium von Norrin-behandelten Müllerzellen stammte. Dass auch unbehandelte Müllerzellen neurotrophe Faktoren sezernieren, wurde bereits in den Dot Blot Analysen beobachtet. Dies ist auch nicht weiter verwunderlich, da aktivierte Müllerzellen Wachstumsfaktoren produzieren (Bringmann *et al.* 2006). Da Norrin zusammen mit additiven Stimuli nach retinalem Stress die Expression neuroprotektiver Wachstumsfaktoren modulieren kann, liegt die Vermutung nahe, dass das Norrin-Signal in einen übergeordneten Schutzmechanismus eingebettet ist. Dies deutet auch die erhöhte GFAP-Expression an, als Zeichen für eine Reaktion der Müllerzellen.

Die Aktivierung von Müllerzellen als Antwort auf eine neuronale Schädigung der Netzhaut findet sich in nahezu allen Schadensmodellen (Bringmann *et al.* 2006). Bei der Aktivierung von Müllerzellen kann zum Beispiel das Lif/Edn2-System beteiligt sein. Komponenten dieser Signalkaskade wurden in Bezug auf einen akuten und einen chronischen Schaden der Photorezeptoren untersucht. Aus der Zusammenfassung der bisherigen Befunde ergibt sich folgendes Modell: Eine Subpopulation der Müller-Gliazellen nehmen eine Schädigung der Photorezeptoren wahr. Daraufhin exprimieren und sezernieren diese Zellen Lif. Lif wiederrum aktiviert die Expression von Edn2 in den Photorezeptorzellen. Edn2 signalisiert an die Müllerzellen zurück, stimuliert diese zur Expression von GFAP und zur Produktion von Lif und FGF-2 (Rattner und Nathans 2005, Joly *et al.* 2008). Wie die Müllerzellen den Schaden primär wahrnehmen ist zurzeit noch unklar.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen deuten darauf hin, dass diese bislang nur in Bezug auf einen Photorezeptorschaden untersuchte Signalkaskade auch durch eine exzitotoxischen Schädigung der retinalen Ganglienzellen aktiviert wird. Die alleinige Injektion von NMDA führt bereits zu einer erheblichen Expressionssteigerung von GFAP, Lif und Edn2. Diese kann durch gleichzeitige Injektion von Norrin nochmals deutlich erhöht werden. In der isolierten Müllerzellkultur konnten ebenfalls erhöhte Mengen an Lif-mRNA nach Norrin-Behandlung nachgewiesen werden. Norrin alleine hatte allerdings keinen Einfluss auf die Expression von GFAP und Edn2 in der Retina. Allenfalls die Lif-Expression konnte durch Norrin alleine leicht erhöht werden, jedoch nicht signifikant. Diese Beobachtung könnte zum Beispiel eine Erklärung für die erhöhte FGF-2-Expression nach Norrin-Injektion sein.

Interessanterweise wird nach NMDA-Injektion die Expression von Norrin in der Retina stark erhöht. Dies deutet darauf hin, dass Norrin unter akutem Stress in der Retina gebildet wird. Untersuchungen von Ye *et al.* zeigen, dass Norrin hauptsächlich von Müllerzellen produziert wird (Ye *et al.* 2009). Norrin könnte also als ein autokrines Signalmolekül der Müller-Gliazellen fungieren. Da die zusätzliche Injektion von DKK-1 den NMDA-induzierten Schaden jedoch nicht zusätzlich verstärkte, ist dass endogen gebildete Norrin wohl in seiner Wirkung zu schwach, oder wird in zu geringem Maße gebildet, um eine signifikante neuroprotektive Wirkung zu entfalten. Im Gegensatz zu der hier beobachteten Änderung in der Norrin-Expression nach NMDA-induziertem Stress, wurde die Expression von Norrin durch Hyperoxie-vermittelten Stress im oben beschriebenen IOR-Modell vermindert (Ohlmann *et al.* 2010). Wie genau die Norrin-Regulation in der Retina abläuft und wie es in verschiedene Schutzmechanismen eingebunden ist, muß noch geklärt werden.

5.4 Die Wechselwirkung zwischen dem Norrin- und dem TGF- β 1-Signalweg

Vorläufige Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass sich der TGF- β 1- und der Norrin-Signalweg gegenseitig hemmen können. Dies zeigten folgende Ergebnisse: (1) Die TGF- β 1-induzierte Expression von PAI-1 wird durch Norrin reduziert. (2) TGF- β 1 hemmt die Norrin-vermittelte Proliferation von HRMEC. (3) β B1-TGF- β 1-Mäuse zeigen eine vermehrte Anzahl an pyknotischen Zellkernen in der Netzhaut, zudem bildet sich in diesen Mäusen kein Glaskörperraum aus. Beide Befunde konnten durch die Kreuzung mit β B1-Norrin-Mäusen verbessert werden.

Der TGF- β 1- und der Wnt-Signalweg werden häufig als Gegenspieler, aber auch als Partner bei verschiedenen Entwicklungsprozessen diskutiert. Die Möglichkeiten, wie sich die beiden Signalwege gegenseitig beeinflussen können, sind vielfältig. TGF- β 1 kann synergistisch mit dem Wnt-Signalweg wechselwirken. So kann beispielsweise β -Catenin auch durch Komponenten des TGF- β 1-Signalwegs, wie etwa Smad3, stabilisiert werden oder zusammen mit TGF- β 1-aktivierten Transkriptionsfaktoren verschiedene Gene regulieren (Labbé *et al.* 2000, Satterwhite *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2010). Auf der anderen Seite können sich die beiden Signalwege hemmen, bzw. beide Signalwege regulieren gegenläufige Prozesse während der Entwicklung. So fördert der Wnt/ β -Catenin-Signalweg beispielsweise die Proliferation und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen in der Retina, während TGF- β 1 die Apoptose neuronaler Zellen während der Netzhautentwicklung induziert (Liu *et al.* 2003, Beier *et al.* 2006, Das *et al.* 2008). Auch die retinal Angiogenese wird von beiden Signalwegen gegenläufig reguliert. So wirkt TGF- β 1 anti-angiogen, Wnt-Proteine dagegen können die Angiogenese fördern (Behzadian *et al.* 1998, Masckauchán *et al.* 2005, Bringmann *et al.* 2009). Wie beide Signalwege miteinander interagieren ist allerdings stark von den Rahmenbedingungen des jeweiligen Gewebes abhängig.

Auf eine Interaktion des Frizzled-4-Ligands Norrin mit dem TGF- β 1-Signalweg weisen erste Ergebnisse dieser Arbeit hin. *In vitro* konnte eine grundsätzliche Hemmung von TGF- β 1 durch Norrin gezeigt werden. Dies wurde exemplarisch an einem Zielgen des TGF- β 1-Signalweges, dem *Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI)*-1, untersucht, dessen Expression durch TGF- β 1 erhöht wird (Laiho *et al.* 1987, Westerhausen *et al.* 1991). In HRMEC konnte die TGF- β 1-induzierte Expression von

PAI-1 durch Norrin deutlich reduziert werden. Zusätzlich durchgeführte Versuche an einer Reporterzelllinie, in der die PAI-1-Expression mit einem Luciferase-Gen gekoppelt ist, untermauerten diese Ergebnisse. Zusätzlich konnte hier gezeigt werden, dass die Hemmung von TGF- β 1 durch Norrin über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg vermittelt wird.

Interessanterweise hemmt TGF- β 1 auch umgekehrt die Norrin-vermittelte Proliferation von mikrovaskulären Endothelzellen in Kultur. Dieser Befund deckt sich mit der bereits beobachteten anti-angiogenen Wirkung von TGF- β 1 in der Netzhaut (Spranger *et al.* 1999, Abukawa *et al.* 2009). Hierfür scheint dagegen die Expression von Norrin bzw. die Aktivierung des klassischen β -Catenin-Signalwegs von entscheidender Bedeutung zu sein (Masckauchán *et al.* 2005, Zerlin 2008).

Zusätzlich zu den *in vitro* Experimenten wurde die Interaktion der beiden Signalwege in fünf Tage alten Mäusen analysiert. β B1-TGF- β 1-Mäuse mit einer okulären TGF- β 1-Überexpression zeigten zwei auffällige Befunde. Zum einen findet sich hier eine erhöhte Anzahl an Apoptosen in der Netzhaut. Dies deckt sich mit der Beobachtung anderer Arbeitsgruppen, dass TGF- β 1 während der Entwicklung Apoptosen in den Neuronen der Netzhaut induziert und so maßgeblich an der Differenzierung der Retina beteiligt ist (Beier *et al.* 2006). Zum anderen entwickeln diese transgenen Mäuse keinen Glaskörperraum aus, das Auge ist im Vergleich zum Wildtyp-Auge wesentlich kleiner. Im Hühnerauge gibt es Hinweise, dass TGF- β -Proteine die Entwicklung der Achsenlänge, also letztlich die Größe des Augapfels, beeinflusst. Eine Reduktion von TGF- β führt hier zu einer verlängerten Augenachse (Honda *et al.* 1996). Auch bezüglich der Augenentwicklung der Maus gibt es Hinweise, dass TGF- β 1 an der Regulation der Achsenlänge des Auges beteiligt ist. So entwickeln beispielsweise *Early Growth Response-1 (Egr-1)*-defiziente Mäuse eine längere Augenachse. *Egr-1* ist unter anderem ein Zielgen von TGF- β 1 (Schippert *et al.* 2007).

Durch die Kreuzung von β B1-TGF- β 1-Tieren mit β B1-Norrin-Mäusen wurde nicht nur die Anzahl an apoptotischen Zellen in der Netzhaut reduziert, sondern es bildete sich ebenfalls wieder ein Glaskörperraum aus, der im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen wesentlich kleiner war. Da beide untersuchten Parameter in β B1-TGF- β 1 Mäusen offensichtlich mit der transgenen Überexpression von TGF- β 1 im Auge korrelieren,

deuten die im Tiermodell erhobenen Befunde auf eine Hemmung von TGF- β 1 durch Norrin *in vivo* hin.

Zusammenfassend liefern die Resultate dieser Arbeit Hinweise, dass die Signalwege von Norrin und TGF- β 1 miteinander interagieren können. Der zugrundeliegende Mechanismus dieser Interaktion ist bislang jedoch noch unklar.

6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei Funktionen von Norrin aufgedeckt werden. Zum einen wurde die angiogene Wirkung von Norrin *in vitro* nachgewiesen. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Norrin neuroprotektive Eigenschaften besitzt. Darüberhinaus konnte hierfür ein möglicher Mechanismus, die Induktion neurotropher Wachstumsfaktoren in Müllerzellen der Netzhaut, beschrieben werden.

Norrin besitzt eine direkte angiogene Wirkung auf mikrovaskuläre Endothelzellen der Haut und der Retina. Auffällig ist, dass Norrin verglichen mit anderen angiogenen Faktoren wie etwa VEGF eine gerichtete Revaskularisierung unter Berücksichtigung der anatomischen Strukturen in der Netzhaut induzieren kann. VEGF dagegen löst an der Netzhaut ungerichtete Gefäßproliferationen aus und gefährdet hierdurch die Funktion der Retina (Pierce *et al.* 1995, Ohlmann *et al.* 2010). Eine interessante Frage, die sich stellt ist, worin der Unterschied zwischen der VEGF- und der Norrin-vermittelten Gefäßentwicklung besteht. Die Beobachtung, dass Norrin die Expression von neurotropen Faktoren in der Netzhaut induziert, könnte Aufschluß darüber geben. Einige der Faktoren, die durch Norrin reguliert werden verhalten sich pro- und anti-angiogen. Norrin könnte neben der direkten angiogenen Wirkung auch indirekt die Angiogenese beeinflussen, indem es die Produktion verschiedener Faktoren moduliert. Zur Untersuchung dieser Hypothese könnte im oben beschriebenen Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie die Expression von Faktoren wie PEDF (anti-angiogen) oder FGF-2 (angiogen) zwischen Wildtyp- und Norrin-Überexpressionsmäusen verglichen werden.

Zudem könnte die angiogene Wirkung von konditioniertem Zellüberstand Norrin-behandelter Müllerzellen auf mikrovaskuläre Endothelzellen in *in vitro* Angiogenese-Assays analysiert werden.

Die Resultate dieser Arbeit liefern Hinweise, dass die Expression von endogenem Norrin während eines Netzhautschadens in der Retina erhöht ist. Um die neuroprotektive Funktion von Norrin weiter aufzuklären, könnte die Expression von Norrin in verschiedenen Stressmodellen der Netzhaut untersucht werden, zum Beispiel im bereits erwähnten Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie oder unter akuter Schädigung anderer neuronaler Zellen der Netzhaut, wie etwa der

Photorezeptoren. Zudem sollte überprüft werden, welche Zellen Norrin in einer akuten Stresssituation bilden.

Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Norrin über das Lif/Edn2-System der Netzhaut seine Funktionen vermittelt. Folglich sollte die neuroprotektive Funktion von Norrin in Hinsicht auf das Lif/Edn2-System genauer untersucht werden. Um zu analysieren, welche Rolle Norrin in diesem System tatsächlich einnimmt, wäre der erste Schritt Edn2 in Wildtyp-Mäusen durch einen Inhibitor zu hemmen. Rattner und Nathans haben gezeigt, dass die Wirkung von Edn2 durch blockieren des Endothelin Rezeptors Typ B (EdnrB) dem System entzogen werden kann (Rattner und Nathans 2005). Könnte Norrin nach der indirekten Hemmung von Edn2 seine protektive Wirkung noch entfalten, wäre dies ein Hinweis dafür, dass Norrin entweder Edn2 nachgeschaltet ist oder dass Norrin keinen Einfluss auf das Lif/Edn2-System besitzt. Würde allerdings durch die Hemmung von Edn2 auch die Wirkung von Norrin blockiert, wären dies deutliche Hinweise auf eine Beteiligung des Lif/Edn2-Systems an der Norrin-vermittelten Neuroprotektion. Folglich sollte dann die Wirkung von Norrin in *Lif*-defizienten (*Lif*^{-/-})-Mäusen untersucht werden. Joly *et al.* konnten zeigen, dass *Lif*^{-/-}-Mäuse nicht mehr adäquat auf eine Schädigung der Photorezeptoren reagieren können, da der Lif/Edn2-Signalweg unterbrochen ist und letztlich die Müllerzellen nicht mehr ausreichend aktiviert werden können (Joly *et al.* 2008). Anhand eines NMDA-induzierten Schadens retinaler Ganglienzellen in *Lif*^{-/-}-Mäusen könnte genauer untersucht werden, wo Norrin in diesem Lif/Edn2-vermittelten Schutzmechanismus eingebettet ist. Wird durch eine NMDA/Norrin-Injektion in *Lif*^{-/-}-Mäuse der NMDA-vermittelte Schaden gegenüber dem von Wildtyp-Mäusen verstärkt, könnte dies einen Hinweis liefern, dass Norrin seine protektiven Eigenschaften über das Edn2/Lif-System vermittelt.

In der geschädigten Netzhaut und in kultivierten Müllerzellen wird die Expression von Wachstumsfaktoren durch Norrin, zumindest teilweise, über den β -Catenin-Signalweg induziert, was auf eine indirekte neuroprotektive Funktion von Norrin hindeutet. Allerdings schließen diese Befunde eine direkte protektive Wirkung auf retinale Neurone nicht aus. Ob Norrin auch eine direkte neuroprotektive Wirkung besitzt, könnte durch einen konditionellen Knockout von β -Catenin über ein

Tamoxifen-induzierbares Cre/loxP-System in Müllerzellen oder retinalen Ganglienzellen von Mäusen untersucht werden.

Die Fragen, die durch diese Experimente beantwortet werden könnten, sind: (1) Würde die Hemmung des β -Catenin-Signals in Müllerzellen die protektive Wirkung von Norrin vollständig hemmen und würde (2) das Fehlen von β -Catenin in retinalen Ganglienzellen die protektive Wirkung von Norrin reduzieren?

Die vorläufigen Ergebnisse zur Wechselwirkung von TGF- β 1 und Norrin deuten darauf hin, dass beide Faktoren antagonistisch aufeinander wirken. Ziel kommender Untersuchungen wird sein, mehr über den genauen Mechanismus der Hemmung zu erfahren. Da es den Anschein hat, dass die Hemmung von TGF- β 1 durch Norrin zumindest teilweise über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg vermittelt wird, werden sich zukünftige Studien auf bereits bekannte inhibitorische Mechanismen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs konzentrieren. So kann der WNT/ β -Catenin-Signalweg zum Beispiel den TGF- β 1-Inhibitor Smad7 regulieren. Da die vorhergesagte Norrin-Proteinstruktur ähnlich der von TGF- β 1 ist, könnte auch eine Konkurrenz um die TGF- β -Rezeptoren ein möglicher Mechanismus für die Hemmung sein, was durch Bindungsstudien überprüft werden könnte.

7 Zusammenfassung

Norrin, das Genprodukt des *Norrie Disease Pseudoglioma (NDP)* Gens, ist ein aus 133 Aminosäuren bestehendes sezerniertes Polypeptid. Mutationen des *NDP*-Gens sind assoziiert mit erblichen Augenerkrankungen, die mit kongenitaler Erblindung und/oder einer Fehlentwicklung des Gefäßnetzes der Retina einhergehen. Befunde an gentechnisch veränderten Mäusen zeigen, dass Norrin essentiell ist für die Bildung des tiefen intraretinalen Kapillarplexus, eine Wirkung, die über die Bindung an den Fzd4/LRP5-Rezeptorkomplex und die Aktivierung des kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalwegs erfolgt. *Ndp^{Y-/-}*-Mäuse zeigen zudem einen progressiven Verlust an retinalen Ganglienzellen, ein Befund der eine zusätzliche neuroprotektive Rolle von Norrin nahelegt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es ein eukaryotisches Expressionssystem für rekombinantes humanes Norrin (rhNorrin) zu etablieren, dass die Aufreinigung und experimentelle Anwendung von Norrin zur Klärung seiner Funktion ermöglicht. Mit Hilfe des aufgereinigten rhNorrins sollte analysiert werden, ob eine direkte angiogene Wirkung von Norrin auf mikrovaskuläre Endothelzellen nachweisbar ist. Weiterhin sollte am Tiermodell untersucht werden, ob Norrin neuroprotektive Eigenschaften aufweist, die unabhängig sind von seiner Wirkung auf das Wachstum retinaler Gefäße.

Ein Expressionssystem für Norrin konnte etabliert werden durch den Austausch der endogenen Signalsequenz von Norrin und durch die Nutzung seiner Affinität für Heparin. Rekombinantes Norrin steigerte die Proliferation und Migration von humanen mikrovaskulären Endothelzellen der Retina und der Haut. Zudem konnte Norrin das Überleben von Endothelzellen in Kultur verlängern und die Bildung kapillarähnlicher Strukturen in mikrovaskulären Endothelzellen induzieren. Diese Effekte konnten durch Blockade des Wnt/β-Catenin-Signalwegs weitgehend verhindert werden.

Zur Untersuchung einer neuroprotektiven Wirkung von Norrin *in vivo* wurde das Modell des exzitotoxischen Schadens retinaler Neurone nach intravitrealer Injektion von NMDA etabliert. Die Gabe von Norrin konnte die Anzahl überlebender retinaler Ganglienzellen (RGC) nach NMDA-Schädigung signifikant steigern. Auch dieser

Effekt wurde, zumindest teilweise, über eine Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalweges vermittelt. Die weitere Analyse des Mechanismus der neuroprotektiven Eigenschaften von Norrin ergab, dass Norrin in Müllerzellen *in vivo* und *in vitro* die Expression neurotropher Wachstumsfaktoren wie Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) und Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) induziert und hierdurch vermutlich neuroprotektiv wirkt. Zudem induziert Norrin die Expression von Leukemia Inhibitory Factor (Lif) und Endothelin2 (Edn2), deren protektive Funktion bereits in experimentellen und hereditären Tiermodellen einer Photorezeptordegeneration nachgewiesen wurde.

Ergebnisse dieser Arbeit deuten zudem darauf hin, dass Norrin mit dem TGF-β1-Signalweg interagiert. So konnte gezeigt werden, dass Norrin *in vitro* TGF-β1-vermittelte Signale hemmen kann. Umgekehrt konnte TGF-β1 die Norrin-induzierte Proliferation von HRMEC reduzieren. Zusätzliche *in vivo* Untersuchungen stützen die *in vitro* gewonnenen Resultate. Mäuse, die ektopes TGF-β1 in der Linse exprimieren, bilden keinen Glaskörper aus und zeigen zudem einen Verlust retinaler Ganglienzellen. Durch Kreuzung dieser Tiere mit βB1-Norrin-Mäusen, mit einer okulären Überexpression an Norrin, konnte der Phänotyp dieser Tiere partiell gerettet werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Norrin nicht nur eine direkte angiogene Wirkung auf mikrovaskuläre Endothelzellen entfaltet, sondern auch Teil eines neuroprotektiven Signalsystems für retinale Ganglienzellen in der Netzhaut ist. Norrin und die Komponenten seines Signalwegs könnten Möglichkeiten für einen neuen Therapieansatz eröffnen, der zu einer neuroprotektiven Therapie des Glaukoms genutzt werden könnte.

8 Anhang

8.1 Literaturverzeichnis

- Abe, M u. a. 1994. "An assay for transforming growth factor-beta using cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct." *Analytical Biochemistry* 216:276-284.
- Abukawa, Hayato u. a. 2009. "Modulation of retinal capillary endothelial cells by Müller glial cell-derived factors." *Molecular Vision* 15:451-457.
- Auerbach, R, N Akhtar, R L Lewis, und B L Shinners. 2000. "Angiogenesis assays: problems and pitfalls." *Cancer Metastasis Reviews* 19:167-172.
- Auerbach, Robert, Rachel Lewis, Brenda Shinners, Louis Kubai, und Nasim Akhtar. 2003. "Angiogenesis Assays: A Critical Overview." *Clin Chem* 49:32-40.
- Barnstable, Colin J, und Joyce Tombran-Tink. 2004. "Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential." *Progress in Retinal and Eye Research* 23:561-577.
- Behzadian, M A, X L Wang, M Al-Shabrawey, M Shabrawey, und R B Caldwell. 1998. "Effects of hypoxia on glial cell expression of angiogenesis-regulating factors VEGF and TGF-beta." *Glia* 24:216-225.
- Beier, Marion, Andreas Franke, Adnana Nicoletta Paunel-Görgülü, Nina Scheerer, und Nicole Dünker. 2006a. "Transforming growth factor beta mediates apoptosis in the ganglion cell layer during all programmed cell death periods of the developing murine retina." *Neuroscience Research* 56:193-203.
- Berger, W. 1998. "Molecular dissection of Norrie disease." *Acta Anatomica* 162:95-100.
- Berger, W u. a. 1992. "Isolation of a candidate gene for Norrie disease by positional cloning." *Nature Genetics* 1:199-203.
- Berger, W u. a. 1996b. "An animal model for Norrie disease (ND): gene targeting of the mouse ND gene." *Human Molecular Genetics* 5:51-59.
- Black, G C u. a. 1999. "Coats' disease of the retina (unilateral retinal telangiectasis) caused by somatic mutation in the NDP gene: a role for norrin in retinal angiogenesis." *Human Molecular Genetics* 8:2031-2035.
- Bringmann, Andreas u. a. 2009. "Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects." *Progress in Retinal and Eye Research* 28:423-451.
- Bringmann, Andreas u. a. 2006b. "Müller cells in the healthy and diseased retina." *Progress in Retinal and Eye Research* 25:397-424.

- Cappuccio, Irene u. a. 2005. "Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is required for the development of ischemic neuronal death." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25:2647-2657.
- Charles, Irma u. a. 2005. "Serum deprivation induces apoptotic cell death of transformed rat retinal ganglion cells via mitochondrial signaling pathways." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46:1330-1338.
- Chaum, Edward. 2003. "Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective." *Journal of Cellular Biochemistry* 88:57-75.
- Chen, S u. a. 2001. "Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription." *The Journal of Cell Biology* 152:87-96.
- Chen, Wei u. a. 2003. "Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4." *Science (New York, N.Y.)* 301:1391-1394.
- Chen, Z Y u. a. 1993. "A mutation in the Norrie disease gene (NDP) associated with X-linked familial exudative vitreoretinopathy." *Nature Genetics* 5:180-183.
- Chomczynski, P, und N Sacchi. 1987. "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Analytical Biochemistry* 162:156-159.
- Coloma, M. Josefina, Alice Hastings, Letitia A. Wims, und Sherie L. Morrison. 1992. "Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction." *Journal of Immunological Methods* 152:89-104.
- Connolly, S E, T A Hores, L E Smith, und P A D'Amore. 1988. "Characterization of vascular development in the mouse retina." *Microvascular Research* 36:275-290.
- Das, Ani V u. a. 2008. "The canonical Wnt pathway regulates retinal stem cells/progenitors in concert with Notch signaling." *Developmental Neuroscience* 30:389-409.
- Drenser, Kimberly A, Alice Fecko, Wendy Dailey, und Michael T Trese. 2007. "A characteristic phenotypic retinal appearance in Norrie disease." *Retina (Philadelphia, Pa.)* 27:243-246.
- Dreyer, E B. 1998. "A proposed role for excitotoxicity in glaucoma." *Journal of Glaucoma* 7:62-67.
- Eichler, Wolfram, Yousef Yafai, Thurid Keller, Peter Wiedemann, und Andreas Reichenbach. 2004. "PEDF derived from glial Müller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis." *Experimental Cell Research* 299:68-78.

- Eisenfeld, A J, A H Bunt-Milam, und P V Sarthy. 1984. "Müller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 25:1321-1328.
- Feder, J, J C Marasa, und J V Olander. 1983. "The formation of capillary-like tubes by calf aortic endothelial cells grown in vitro." *Journal of Cellular Physiology* 116:1-6.
- Flügel-Koch, Cassandra, Andreas Ohlmann, Joram Piatigorsky, und Ernst R Tamm. 2002. "Disruption of anterior segment development by TGF-beta1 overexpression in the eyes of transgenic mice." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 225:111-125.
- Folkman, J, und C Haudenschild. 1980. "Angiogenesis in vitro." *Nature* 288:551-556.
- Frassetto, Laura J u. a. 2006. "Kinase-dependent differentiation of a retinal ganglion cell precursor." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47:427-438.
- Fruttiger, Marcus. 2002. "Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43:522-527.
- Fu, De-Yuan u. a. 2010. "Sox17, the canonical Wnt antagonist, is epigenetically inactivated by promoter methylation in human breast cancer." *Breast Cancer Research and Treatment* 119:601-612.
- Gao, H, und J G Hollyfield. 1996. "Basic fibroblast growth factor: increased gene expression in inherited and light-induced photoreceptor degeneration." *Experimental Eye Research* 62:181-189.
- Gardner, Thomas W, David A Antonetti, Alistair J Barber, Kathryn F LaNoue, und Steven W Levison. 2002. "Diabetic retinopathy: more than meets the eye." *Survey of Ophthalmology* 47 Suppl 2:S253-262.
- González-Sancho, José Manuel u. a. 2005. "The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer." *Oncogene* 24:1098-1103.
- Gordon, Michael D, und Roel Nusse. 2006. "Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors." *The Journal of Biological Chemistry* 281:22429-22433.
- Harmer, N J. 2006. "Insights into the role of heparan sulphate in fibroblast growth factor signalling." *Biochemical Society Transactions* 34:442-445.
- Hartzer, Michael K., Mei Cheng, X. Liu, und Barkur S. Shastry. 1999a. "Localization of the Norrie disease gene mRNA by in situ hybridization." *Brain Research Bulletin* 49:355-358.

- Hartzler, Michael K., Mei Cheng, X. Liu, und Barkur S. Shastry. 1999b. "Localization of the Norrie disease gene mRNA by in situ hybridization." *Brain Research Bulletin* 49:355-358.
- Heukeshoven, J, und R Dernick. 1988. "Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels." *Electrophoresis* 9:28-32.
- Hicks, D, und Y Courtois. 1990. "The growth and behaviour of rat retinal Müller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture." *Experimental Eye Research* 51:119-129.
- Honda, S, S Fujii, Y Sekiya, und M Yamamoto. 1996. "Retinal control on the axial length mediated by transforming growth factor-beta in chick eye." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 37:2519-2526.
- Jain, R K, K Schlenger, M Höckel, und F Yuan. 1997. "Quantitative angiogenesis assays: progress and problems." *Nature Medicine* 3:1203-1208.
- Jakobs, Tatjana C, Yixin Ben, und Richard H Masland. 2007. "Expression of mRNA for glutamate receptor subunits distinguishes the major classes of retinal neurons, but is less specific for individual cell types." *Molecular Vision* 13:933-948.
- Jiao, Xiaodong, Valerio Ventruto, Michael T Trese, Barkur S Shastry, und J Fielding Heitmancik. 2004. "Autosomal recessive familial exudative vitreoretinopathy is associated with mutations in LRP5." *American Journal of Human Genetics* 75:878-884.
- Joly, Sandrine, Christina Lange, Markus Thiersch, Marijana Samardzija, und Christian Grimm. 2008. "Leukemia inhibitory factor extends the lifespan of injured photoreceptors in vivo." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28:13765-13774.
- Junge, Harald J. u. a. 2009. "TSPAN12 Regulates Retinal Vascular Development by Promoting Norrin- but Not Wnt-Induced FZD4/[beta]-Catenin Signaling." *Cell* 139:299-311.
- Kriegstein, Kerstin, Jens Strelau, Andreas Schober, Aideen Sullivan, und Klaus Unsicker. 2002. "TGF-beta and the regulation of neuron survival and death." *Journal of Physiology, Paris* 96:25-30.
- Krishnamoorthy, R. R. u. a. 2001. "Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line." *Molecular Brain Research* 86:1-12.
- Kubota, Y, H K Kleinman, G R Martin, und T J Lawley. 1988. "Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures." *The Journal of Cell Biology* 107:1589-1598.
- Labbé, E, A Letamendia, und L Attisano. 2000. "Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling

- by the transforming growth factor-beta and wnt pathways." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:8358-8363.
- Laemmli, U K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227:680-685.
- Laiho, M, O Saksela, und J Keski-Oja. 1987. "Transforming growth factor-beta induction of type-1 plasminogen activator inhibitor. Pericellular deposition and sensitivity to exogenous urokinase." *The Journal of Biological Chemistry* 262:17467-17474.
- Lebrun-Julien, Frédéric, und Adriana Di Polo. 2008. "Molecular and cell-based approaches for neuroprotection in glaucoma." *Optometry and Vision Science: Official Publication of the American Academy of Optometry* 85:417-424.
- Lewis, Geoffrey P, und Steven K Fisher. 2003b. "Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression." *International Review of Cytology* 230:263-290.
- Li, Y, CL Schlamp, und RW Nickells. 1999. "Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40:1004-1008.
- Liang, Chun-Chi, Ann Y Park, und Jun-Lin Guan. 2007. "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro." *Nature Protocols* 2:329-333.
- Liu, Hong, Othman Mohamed, Daniel Dufort, und Valerie A Wallace. 2003. "Characterization of Wnt signaling components and activation of the Wnt canonical pathway in the murine retina." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 227:323-334.
- Liu, Ying, Lijun Sun, Yi Huan, Haitao Zhao, und Jinglan Deng. 2006. "Application of bFGF and BDNF to improve angiogenesis and cardiac function." *The Journal of Surgical Research* 136:85-91.
- Livak, K J, und T D Schmittgen. 2001. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods (San Diego, Calif.)* 25:402-408.
- Luhmann, Ulrich F O u. a. 2005. "Fetal loss in homozygous mutant Norrie disease mice: a new role of Norrin in reproduction." *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 42:253-262.
- Machida, S u. a. 2001. "Lens epithelium-derived growth factor promotes photoreceptor survival in light-damaged and RCS rats." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42:1087-1095.
- Mao, B u. a. 2001b. "LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins." *Nature* 411:321-325.

- Masckauchán, T. Néstor H., Carrie J. Shawber, Yasuhiro Funahashi, Chi-Ming Li, und Jan Kitajewski. 2005. "Wnt/β-Catenin Signaling Induces Proliferation, Survival and Interleukin-8 in Human Endothelial Cells." *Angiogenesis* 8:43-51.
- McGillem, G S, C Guidry, und R F Dacheux. 1998. "Antigenic changes of rabbit retinal Müller cells in culture." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 39:1453-1461.
- Meindl, A u. a. 1992a. "Norrie disease is caused by mutations in an extracellular protein resembling C-terminal globular domain of mucins." *Nature Genetics* 2:139-143.
- Meitinger, T u. a. 1993. "Molecular modelling of the Norrie disease protein predicts a cystine knot growth factor tertiary structure." *Nature Genetics* 5:376-380.
- Mey, J, und S Thanos. 1993. "Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats *in vivo*." *Brain Research* 602:304-317.
- Mizutani, M, T S Kern, und M Lorenzi. 1996. "Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy." *The Journal of Clinical Investigation* 97:2883-2890.
- Moy, F J u. a. 1997. "Properly oriented heparin-decasaccharide-induced dimers are the biologically active form of basic fibroblast growth factor." *Biochemistry* 36:4782-4791.
- Murohara, T u. a. 1999. "Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19:1156-1161.
- Nakamura, Rei EI, Dale D Hunter, Hyun Yi, William J Brunkin, und Abigail S Hackam. o. J. "Identification of two novel activities of the Wnt signaling regulator Dickkopf 3 and characterization of its expression in the mouse retina." *BMC Cell Biology* 8:52-52.
- Nehls, V, und D Drenckhahn. 1995. "A novel, microcarrier-based *in vitro* assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis." *Microvascular Research* 50:311-322.
- Neufeld, G, T Cohen, S Gengrinovitch, und Z Poltorak. 1999. "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13:9-22.
- Ohlmann, Andreas u. a. 2005. "Ectopic Norrin Induces Growth of Ocular Capillaries and Restores Normal Retinal Angiogenesis in Norrie Disease Mutant Mice." *J. Neurosci.* 25:1701-1710.
- Ohlmann, Andreas u. a. 2010. "Norrin promotes vascular regrowth after oxygen-induced retinal vessel loss and suppresses retinopathy in mice." *The Journal*

- of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience 30:183-193.
- Ohlmann, Anne V, Edith Adamek, Andreas Ohlmann, und Elke Lütjen-Drecoll. 2004. "Norrie gene product is necessary for regression of hyaloid vessels." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45:2384-2390.
- Ornitz, D M. 2000. "FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 22:108-112.
- Pelletier, L, J Regnard, D Fellmann, und P Charbord. 2000. "An in vitro model for the study of human bone marrow angiogenesis: role of hematopoietic cytokines." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 80:501-511.
- Perez-Vilar, J, und R L Hill. 1997. "Norrie disease protein (norrin) forms disulfide-linked oligomers associated with the extracellular matrix." *The Journal of Biological Chemistry* 272:33410-33415.
- Pierce, E A, R L Avery, E D Foley, L P Aiello, und L E Smith. 1995. "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:905-909.
- Poulter, James A. u. a. 2010. "Mutations in TSPAN12 Cause Autosomal-Dominant Familial Exudative Vitreoretinopathy." *The American Journal of Human Genetics* 86:248-253.
- Rattner, Amir, und Jeremy Nathans. 2005. "The Genomic Response to Retinal Disease and Injury: Evidence for Endothelin Signaling from Photoreceptors to Glia." *J. Neurosci.* 25:4540-4549.
- Rehm, H L u. a. 1997. "Norrie disease gene mutation in a large Costa Rican kindred with a novel phenotype including venous insufficiency." *Human Mutation* 9:402-408.
- Rehm, Heidi L u. a. 2002. "Vascular defects and sensorineural deafness in a mouse model of Norrie disease." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22:4286-4292.
- Richter, M u. a. 1998. "Retinal vasculature changes in Norrie disease mice." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 39:2450-2457.
- Riveiro-Alvarez, Rosa u. a. 2005. "Genotype-phenotype variations in five Spanish families with Norrie disease or X-linked FEVR." *Molecular Vision* 11:705-712.
- Robitaille, Johane u. a. 2002. "Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy." *Nat Genet* 32:326-330.

- Ruether, K u. a. 1997. "Retinoschisislike alterations in the mouse eye caused by gene targeting of the Norrie disease gene." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 38:710-718.
- Satterwhite, Daniel J, und Kristi L Neufeld. 2004. "TGF-beta targets the Wnt pathway components, APC and beta-catenin, as Mv1Lu cells undergo cell cycle arrest." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 3:1069-1073.
- Schippert, Ruth, Eva Burkhardt, Marita Feldkaemper, und Frank Schaeffel. 2007. "Relative Axial Myopia in Egr-1 (ZENK) Knockout Mice." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48:11-17.
- Schönherr, Elke, und Heinz-JüRgen Hausser. 2000. "Extracellular Matrix and Cytokines: A Functional Unit." *Developmental Immunology* 7:89-101.
- Schroeder, B, L Hesse, W Brück, und A Gal. 1997. "Histopathological and immunohistochemical findings associated with a null mutation in the Norrie disease gene." *Ophthalmic Genetics* 18:71-77.
- Seki, Masaaki, und Stuart A. Lipton. 2008. "Targeting excitotoxic/free radical signaling pathways for therapeutic intervention in glaucoma." S. 495-510 in *Glaucoma: An Open Window to Neurodegeneration and Neuroprotection*, vol. Volume 173. Elsevier <http://www.sciencedirect.com/science/article/B7CV6-4TM9RV7-1B/2/7af83e856e03ff80d3021d9fe2140423> (Zugegriffen Februar 5, 2010).
- Shastry, B S, S D Pendergast, M K Hartzer, X Liu, und M T Trese. 1997. "Identification of missense mutations in the Norrie disease gene associated with advanced retinopathy of prematurity." *Archives of Ophthalmology* 115:651-655.
- Shastry, Barkur S, und Michael T Trese. 2003. "Overproduction and partial purification of the Norrie disease gene product, norrin, from a recombinant baculovirus." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312:229-234.
- Shatkin, A J, E Reich, R M Franklin, und E L Tatum. 1962. "Effect of mitomycin C on mammalian cells in culture." *Biochimica Et Biophysica Acta* 55:277-289.
- Shen, Yin, Xiao-Ling Liu, und Xiong-Li Yang. 2006. "N-methyl-D-aspartate receptors in the retina." *Molecular Neurobiology* 34:163-179.
- Simó, Rafael, Esther Carrasco, Marta García-Ramírez, und Cristina Hernández. 2006. "Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy." *Current Diabetes Reviews* 2:71-98.
- Sinner, Débora, Scott Rankin, Monica Lee, und Aaron M Zorn. 2004. "Sox17 and beta-catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes." *Development (Cambridge, England)* 131:3069-3080.

- Smallwood, Philip M, John Williams, Qiang Xu, Daniel J Leahy, und Jeremy Nathans. 2007. "Mutational analysis of Norrin-Frizzled4 recognition." *The Journal of Biological Chemistry* 282:4057-4068.
- Smith, L E u. a. 1994. "Oxygen-induced retinopathy in the mouse." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 35:101-111.
- Spranger, J, R Meyer-Schwickerath, M Klein, H Schatz, und A Pfeiffer. 1999. "Deficient activation and different expression of transforming growth factor-beta isoforms in active proliferative diabetic retinopathy and neovascular eye disease." *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 107:21-28.
- Stone, J u. a. 1995. "Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 15:4738-4747.
- Tatsumi, Yasuko u. a. 2008. "Nipradilol protects rat retinal ganglion cells from apoptosis induced by serum deprivation in vitro and by diabetes in vivo." *Current Eye Research* 33:683-692.
- Vailhé, B, M Lecomte, N Wiernsperger, und L Tranqui. 1998. "The formation of tubular structures by endothelial cells is under the control of fibrinolysis and mechanical factors." *Angiogenesis* 2:331-344.
- Vailhé, B, D Vittet, und J J Feige. 2001. "In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 81:439-452.
- Warburg, M. 1975. "Blindness in Mentally Retarded Children. A survey of the causes of blindness in 201 notified patients." *Documenta Ophthalmologica. Advances in Ophthalmology* 39:343-349.
- Warburg, M. 1968. "NORRIE'S DISEASE." *Journal of Intellectual Disability Research* 12:247-251.
- Westerhausen, D R, W E Hopkins, und J J Billadello. 1991. "Multiple transforming growth factor-beta-inducible elements regulate expression of the plasminogen activator inhibitor type-1 gene in Hep G2 cells." *The Journal of Biological Chemistry* 266:1092-1100.
- Wu, W, A Glinka, H Delius, und C Niehrs. 2000. "Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/beta-catenin signalling." *Current Biology: CB* 10:1611-1614.
- Xia, Chun-Hong u. a. 2008. "A model for familial exudative vitreoretinopathy caused by LPR5 mutations." *Hum. Mol. Genet.* 17:1605-1612.

- Xu, Qiang u. a. 2004a. "Vascular Development in the Retina and Inner Ear: Control by Norrin and Frizzled-4, a High-Affinity Ligand-Receptor Pair." *Cell* 116:883-895.
- Ye, Xin u. a. 2009a. "Norrin, frizzled-4, and Lrp5 signaling in endothelial cells controls a genetic program for retinal vascularization." *Cell* 139:285-298.
- Yi, Hyun, Rei E I Nakamura, Othman Mohamed, Daniel Dufort, und Abigail S Hackam. 2007. "Characterization of Wnt signaling during photoreceptor degeneration." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48:5733-5741.
- Zerlin, Marielba, Martin A Julius, und Jan Kitajewski. 2008. "Wnt/Frizzled signaling in angiogenesis." *Angiogenesis* 11:63-69.
- Zhang, Ming u. a. 2010. "Smad3 prevents beta-catenin degradation and facilitates beta-catenin nuclear translocation in chondrocytes." *The Journal of Biological Chemistry*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20097766>
- Zhao, S, und P A Overbeek. 2001. "Elevated TGFbeta signaling inhibits ocular vascular development." *Developmental Biology* 237:45-53.
- Zorn, Aaron M. 2001. "Wnt signalling: Antagonistic Dickkopfs." *Current Biology* 11:R592-R595.

8.2 Allgemeines Abkürzungsverzeichnis

µ	mikro (10^{-6})
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ad	zu
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridine
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	Komplementäre DNA (complementary)
DAPI	(4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
H ₂ O dest.	Einfach destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
ds	Doppel-Strang
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintereessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
et al.	et alia (und andere)
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
g	Gramm
h	Stunde
HDMEC	Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
HRMEC	Humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
l	Liter
IC	Immunzytochemie
IPL	innere plexiforme Schicht

m	milli (10^3)
M	Molar
min	Minute
mind.	Mindestens
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
n	nano (10^{-9})
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OIR	Oxygen Induced Retinopathy
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RGC	retinale Ganglienzellen
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
ROP	Retinopathy of Prematurity (Frühgeborenen Retinopathie)
RPE	retinales Pigmentepithel
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TBS	Trisgepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
TEMED	N-N-N'-N'-Tetramethylenmethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
WST-1	Water soluble tetrazolium 1
z.B.	zum Beispiel

8.3 Abkürzungen/Proteinsymbole

BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
FGF-2	Basic Fibroblast Growth Factor
Brn3b	Brain-specific Homeobox/POU Domain Protein 3B
CA	Carboanhydrase
CD31 (Pecam1)	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
DKK-1	Dickkopf 1
Edn2	Endothelin 2
Egr-1	Early Growth Response-1
Fzd4	Frizzled-4
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	Glial-derived Neurotrophic Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acid Proteine
Grm6	Glutamate Receptor, Metabotropic 6
GS	Glutamin synthetase
Iba1	Ionized Calcium-binding Adapter Molecule 1
LEDGF	Lens Epithelial Derived Growth Factor
Lif	Leukemia Inhibitory factor
LRP5	Low Density-like Related Proteine 5
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PEDF	Pigment Epithelial Derived Factor
rhNorrin	rekombinantes humanes Norrin
Smad7	SMAD family member 7
Sox17	SRY (sex determining region Y)-box 17
TGF-β	Transforming Growth Factor
TSPAN12	Tetraspanin12
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt	Wingless Type

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Grundausstattung	11
Tabelle 2: Reagenzien, Materialien und Geräte der Molekularbiologie	13
Tabelle 3: Liste der verwendeten PCR- und qPCR-Oligonukleotidprimer	15
Tabelle 4: Puffer für Gelelektrophorese	18
Tabelle 5: Reagenzien, Materialien und Geräte der Molekularbiologie	26
Tabelle 6: Verwendete Zelllinien.....	27
Tabelle 7: Faktoren zur Zellbehandlung	29
Tabelle 8: Reagenzien, Materialien und Geräte für den Luciferase-Assay	41
Tabelle 9: Puffer Luciferase-Assay.....	42
Tabelle 10: Material und Reagenzien für intravitreale Injektionen	44
Tabelle 11: Reagenzien, Material und Geräte für Proteinbiochemie	49
Tabelle 12: RIPA-Puffer.....	52
Tabelle 13: Puffer für die Isolation von Kernproteinen.....	53
Tabelle 14: Puffer für die SDS-PAGE	55
Tabelle 15: Zusammensetzung der SDS-Gele	56
Tabelle 16: Puffer für die Silberfärbung	57
Tabelle 17: Zusammensetzung 10x Transferpuffer	58
Tabelle 18: Verwendete Antikörper	60
Tabelle 19: Kurzprotokolle Western Blot und Dot Blot.....	62
Tabelle 20: Zusammensetzung von TBS und TBS-T	62
Tabelle 21: Lösungen für die Coomassie-Färbung.....	63
Tabelle 22: Reagenzien und Materialen für die immunzytochemischen Färbungen.	64
Tabelle 23: Kurzprotokolle für die Immunzytochemie	65
Tabelle 24: Reagenzien, Material und Geräte für die Histologie.....	66
Tabelle 25: Puffer für die Histologie.....	67

8.5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Okulärer Gefäßphänotyp der <i>Ndp^{Y/+}</i> -Maus.....	5
Abb. 2: Vereinfachtes Schema des kanonischen β -Catenin/Wnt-Signalwegs.	8
Abb. 3: Der Expressionsvektor pSNOS	71
Abb. 4: Die Expression rhNorrins durch EBNA-pSNOS-Zellen.....	72
Abb. 5: Aufreinigungserfolg von rhNorrin.....	73
Abb. 6: Konzentrationsbestimmung von rhNorrin	74
Abb. 7: Norrin aktiviert den klassischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg in HRMEC.	75
Abb. 8: Immunzytochemische Färbung für anti- β -Catenin.....	76
Abb. 9: Norrin fördert die Proliferation mikrovaskulärer Endothelzellen.....	78
Abb. 10: rhNorrin induziert die Proliferation mikrovaskulärer Endothelzellen	78
Abb. 11: DKK-1 hemmt die von Norrin induzierte Proliferation von HRMEC	79
Abb. 12: Norrin steigert die Viabilität mikrovaskulärer Endothelzellen.....	80
Abb. 13: Norrin erhöht die Zahl vitaler mikrovaskulärer Zellen nach Serumzug ..	81
Abb. 14: Norrin induziert die Migration von HDMEC.....	82
Abb. 15: Norrin induziert die Migration von HRMEC.....	83
Abb. 16: Quantifizierung der Migration von HRMEC ..	85
Abb. 17: Norrin induziert die Bildung kapillarähnlicher Strukturen von HRMEC.	86
Abb. 18: Quantifizierung von kapillarähnlichen endothelialen Strukturen	87
Abb. 19: Die Norrin-induzierten kapillarähnlichen Strukturen weisen ein Lumen auf.	87
Abb. 20: Norrin vermindert die Anzahl NMDA-induzierter Apoptosen ..	90
Abb. 21: Norrin vermindert den NMDA-induzierten Verlust retinaler Ganglienzellen	92
Abb. 22: Norrin schützt gegen den Verlust neuronaler Zellen nach NMDA-Schädigung.....	93
Abb. 23: Der durch NMDA induzierte Verlust an Axonen wird nicht durch die Hemmung des endogenen Wnt/ β -Catenin -Signalwegs beeinflußt..	94
Abb. 24: Norrin vermittelt seinen protektiven Effekt durch Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.	95
Abb. 25: Norrin erhöht den β -Catenin-Spiegel in der Retina	97
Abb. 26: NMDA induziert die Expression von Norrin in der Retina	98
Abb. 27: Norrin kann die Expression von GFAP nach einer akuten Netzhautschädigung zusätzlich erhöhen.	99
Abb. 28: Norrin kann die Expression von Lif und Edn2 in der Retina nach akuter Schädigung zusätzlich erhöhen.	100

Abb. 29: Norrin induziert die Expression neurotropher Faktoren	101
Abb. 30: Norrin erhöht die Proteinmenge an FGF-2.....	103
Abb. 31: Norrin kann die Expression von FGF-2 in der gesunden Retina induzieren..	105
Abb. 32: Isolation von primären Müllerzellen aus der Rattenretina.....	106
Abb. 33: Vergleichende Expressionsanalysen zwischen Rattenretina und der primären Müllerzellkultur.....	107
Abb. 34: Immunzytochemische Färbungen der primären Müllerzellkultur.	108
Abb. 35: Norrin führt zur Stabilisierung von β -Catenin in Müllerzellen.....	109
Abb. 36: Norrin induziert die Expression neurotropher Faktoren in Müllerzelle	110
Abb. 37: Norrin erhöht die Proteinmenge an FGF-2 und CNTF in Müllerzellen.....	111
Abb. 38: Norrin führt zu einer erhöhten Sekretion von FGF-2 und CNTF.....	112
Abb. 39: Differenzierung der RGC-5 durch Staurosporin.	113
Abb. 40: Konditioniertes Müllerzellmedium hat eine neurotrophe Wirkung auf differenzierte RGC-5 Zellen.	114
Abb. 41: Luciferase Reporter Assay	116
Abb. 42: Norrin reduziert die TGF- β 1-vermittelte Luciferase-Aktivität.....	116
Abb. 43: Norrin reduziert die TGF- β 1-vermittelte Expression von PAI-1 in HRMEC.	117
Abb. 44: DKK-1 reduziert die Norrin-vermittelte Hemmung von TGF- β 1	118
Abb. 45: Die Norrin-vermittelte Aktivierung des klassischen Wnt/ β -Catenin- Signalwegs wird durch TGF- β 1 gehemmt.....	119
Abb. 46: TGF- β 1 reduziert die Norrin-induzierte Proliferation von HRMEC	120
Abb. 47: Kreuzung von β B1-TGF- β 1-Mäuse mit β B1-Norrin Mäusen	121

8.6 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich vielmals bei Herrn Prof. Dr. Ernst Tamm für die interessante Fragestellung, die Übernahme des Erstgutachtens und vor allem für seine Unterstützung meiner Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Stephan Schneuwly danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Des Weiteren möchte ich mich bei Pro Retina Deutschland e. V. bedanken, die mich und mein Projekt im Rahmen eines Promotionsstipendiums drei Jahre lang finanziell unterstützten.

Mein herzlichster Dank gilt Dr. Andreas Ohlmann und PD Dr. Rudolf Fuchshofer für meine Betreuung. Rudi möchte ich für die Unterstützung in meinem ersten Jahr in der AG Tamm und darüber hinaus danken. Vor allem für seinen Rat und seine Hilfe während der oft zermürbenden Aufreinigungsphase. Andreas möchte ich für die letzten drei Jahre danken, in denen wir ein gutes Team geworden sind. Ohne ihn, seine Ideen und unsere, manchmal auch hitzigen Diskussionen wären ich und das Projekt nicht so weit gekommen.

David Seitz, Simon Hackl, Thomas Seibuchner und Sebastian Albrecht möchte ich für die tatkräftige Mitarbeit an den Norrin-Projekten danken.

Bei Margit Schimmel, Elke Stauber, Angelika Pach, Sylvia Babl und Katharina Fizia möchte ich mich für die Hilfe im Laboralltag, vor allem für die Unterstützung in der Histologie und bei histologischen Färbungen bedanken und zudem für die netten Plaudereien zwischendurch und die Organisation vieler schöner Institutsfeiern. Besonderer Dank gebührt Margit für die Versorgung des Instituts mit ausreichenden Mengen an Kaffee!

Meinen Laborkollegen möchte ich allgemein für die freundschaftliche Atmosphäre im und auch außerhalb des Instituts danken, besonders den Alt-Doktoranden Walter Paper und Benjamin Junglas für die schöne gemeinsame Zeit am Institut und in den

Bergen. Sabrina Ullmann, Leonie Herrnberger, Ludwig Zeilbeck und Patrick Zadravec möchte ich danken für ihre hilfsbereite Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit, bei Injektionen und der AxioVision Software und vieles mehr.

Außerhalb des Instituts möchte ich meinen Freunden und vor allem meiner Familie Danke sagen für die seelische Unterstützung während des Studiums und während der Promotion.

Danke an meine vier Kleinen: Vicky, Anna, Feli und den kleinen Peter, die auf ihre ganz besondere Art für Zerstreuung sorgen.

Danke auch an Gerhard, der in den vergangenen vier Jahren (fast) immer ein offenes Ohr für meine Probleme und Geschichten hatte und mir eine große Stütze ist. Ohne ihn wäre ich vor allem während des Endspurts wahrscheinlich verhungert oder schlichtweg durchgedreht.

Für ihre Liebe und Unterstützung danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglichen und mich jederzeit unterstützt haben.

8.7 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Regensburg, den 10. März 2010

Roswitha Seitz