

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR HUMANANATOMIE UND EMBRYOLOGIE  
PROF. DR. MED. ERNST R. TAMM  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

## DIE NEUROPROTEKTIVE WIRKUNG VON NORRIN AUF RETINALE GANGLIENZELLEN

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg



vorgelegt von

**Simon Hackl**

2011



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR HUMANANATOMIE UND EMBRYOLOGIE  
PROF. DR. MED. ERNST R. TAMM  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

## DIE NEUROPROTEKTIVE WIRKUNG VON NORRIN AUF RETINALE GANGLIENZELLEN

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg



vorgelegt von

**Simon Hackl**

2011

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ernst R. Tamm

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Olaf Strauß

Tag der mündlichen Prüfung: 15. März 2012

**Meiner Familie**



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Norrie-Syndrom - eine angeborene okulo-akustisch-zerebrale degenerative Erkrankung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>NDP - Das Norrie-Disease-Pseudoglioma-Gen .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3</b>	<b>Norrin - Das Produkt des Norrie-Disease-Pseudoglioma-Gens .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4</b>	<b>Beobachtungen an Norrin-defizienten und transgenen Mausmodellen .</b>	<b>5</b>
<b>1.5</b>	<b>Der Norrin/ <math>\beta</math>-Catenin-Signalweg.....</b>	<b>7</b>
<b>1.6</b>	<b>Modell und Signalweg der exzitotoxischen Schädigung durch NMDA ...</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1</b>	<b>Chemikalien, Reagenzien und allgemeine Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2</b>	<b>Expressionsanalyse von mRNA .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Reagenzien für die Molekularbiologie.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Oligonukleotide.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Prinzip der Expressionsanalyse mittels quantitativer real-time RT-PCR .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.4</b>	<b>RNA-Isolation .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Quantifizierung der RNA.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.6</b>	<b>RNA-Agarose-Gelelektrophorese .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.7</b>	<b>cDNA-Herstellung.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.8</b>	<b>Durchführung der quantitativen real-time RT-PCR .....</b>	<b>24</b>

<b>3.3 Zellkulturtechniken .....</b>	27
<b>3.3.1 Zelllinie .....</b>	28
<b>3.3.2 Allgemeine Arbeitstechniken in der Zellkultur .....</b>	28
<b>3.3.3 Kultivierung der RGC-5 .....</b>	29
<b>3.3.4 Splitten der Zellen.....</b>	29
<b>3.3.5 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer.....</b>	30
<b>3.3.6 Zellzahlbestimmung mittels CASY® Cell Counter Model TT .....</b>	30
<b>3.3.7 Aussähen der Zellen auf 96-Well-Platten .....</b>	31
<b>3.3.8 Differenzierung der RGC-5.....</b>	32
3.3.8.1 Differenzierung mittels Succinyl-Concanavalin A.....	32
3.3.8.2 Differenzierung mittels Staurosporin .....	32
<b>3.4 Funktionelle Untersuchungen an den RGC-5.....</b>	34
<b>3.4.1 Bestimmung der Zellviabilität mittels des MTT-Tests .....</b>	34
3.4.1.1 Prinzip des MTT-Zellviabilitätstests .....	34
3.4.1.2 Versuchsdurchführung .....	34
<b>3.4.2 Bestimmung der Zellviabilität mittels WST-1-Reagenz .....</b>	35
3.4.2.1 Prinzip des WST-1-Zellviabilitätstests.....	36
3.4.2.2 Versuchsdurchführung .....	36
<b>3.5 <i>In vivo</i> Experimente.....</b>	37
<b>3.5.1 Haltung der Versuchstiere .....</b>	37
<b>3.5.2 Anästhesie der Versuchstiere.....</b>	37
<b>3.5.3 Intravitreale Injektionen.....</b>	37
<b>3.5.4 Präparation der Mausaugen und der Sehnerven .....</b>	38
<b>3.5.5 Präparation der Retina .....</b>	39
<b>3.6 Histologische Arbeitstechniken .....</b>	40
<b>3.6.1 Paraffin-Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten.....</b>	41
3.6.1.1 Herstellung der Reagenzien.....	41
3.6.1.2 Durchführung der Paraffin-Einbettung.....	41
<b>3.6.2 Epon-Einbettung und Herstellung von Semi-Dünn schnitten .....</b>	42
3.6.2.1 Herstellung der Reagenzien.....	43

3.6.2.2 Durchführung der Epon-Einbettung der Augen und Herstellung von Semi-Dünnschnitten .....	44
3.6.2.3 Durchführung der Epon-Einbettung der Nn. optici und Herstellung von Semi-Dünnschnitten .....	45
<b>3.6.3 Lichtmikroskopische Färbungen.....</b>	<b>47</b>
3.6.3.1 Richardson-Färbung für Epon-Schnitte .....	47
3.6.3.2 Fuchsin-Methylenblau-Färbung für Epon-Schnitte .....	48
3.6.3.3 Paraphenylendiamin-Färbung für Epon-Schnitte .....	49
<b>3.6.4. <i>DeadEnd<sup>TM</sup></i> Fluorometric TUNEL System .....</b>	<b>49</b>
3.6.4.1 Prinzip des <i>DeadEnd<sup>TM</sup></i> Fluorometric TUNEL System.....	49
3.6.4.2 Herstellung der benötigten Lösungen .....	50
3.6.4.3 Versuchsdurchführung .....	52
<b>3.7 Mikroskopie.....</b>	<b>55</b>
<b>3.7.1 Lichtmikroskopie.....</b>	<b>55</b>
<b>3.7.2 Fluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>55</b>
<b>3.8 Datenverarbeitung und Statistik .....</b>	<b>56</b>
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1 <i>In vivo</i> Experimente.....</b>	<b>57</b>
4.1.1 NMDA verursacht eine konzentrationsabhängige Schädigung der retinalen Ganglienzellen.....	57
<b>4.1.2 Norrin reduziert den NMDA-induzierten exzitotoxischen Verlust von retinalen Ganglienzellen.....</b>	<b>59</b>
4.1.2.1 Der durch Norrin verminderte NMDA-vermittelte exzitotoxische Verlust von retinalen Ganglienzellen spiegelt sich in einer erhöhten Anzahl an Axonen im Sehnerv wieder.....	59
4.1.2.2 Norrin vermindert den Verlust der Perikarya in der Ganglienzellschicht nach NMDA-Schaden.....	63
4.1.2.3 Norrin vermindert den Verlust der Fläche der inneren plexiformen Schicht nach NMDA-Schaden.....	65
<b>4.1.3 Norrin vermindert die durch NMDA induzierte Apoptose der retinalen Ganglienzellen.....</b>	<b>67</b>

<b>4.1.4 Dkk-1 inhibiert den protektiven Effekt von Norrin auf mit NMDA geschädigten retinalen Ganglienzellen.....</b>	70
<b>4.1.5 Norrin führt zur Expression von neuroprotektiven Faktoren in mit NMDA geschädigten Retinae.....</b>	72
<b>4.2 <i>In vitro</i> Experimente.....</b>	75
<b>4.2.1 Untersuchung von undifferenzierten RGC-5.....</b>	75
4.2.1.1 Behandlung von undifferenzierten RGC-5 mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	75
4.2.1.2 Behandlung von undifferenzierten RGC-5 mit Glutamat .....	77
<b>4.2.2 Untersuchung von mit sConA differenzierten RGC-5 .....</b>	79
4.2.2.1 Behandlung von in sConA inkubierten RGC-5 mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	80
4.2.2.2 Behandlung von mit sConA differenzierten RGC-5 mit Glutamat.....	82
4.2.2.3 Norrin hat keinen Einfluss auf den H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierten Zelltod von in sConA inkubierten RGC-5.....	85
<b>4.2.3 Differenzierung von RGC-5 mittels Staurosporin .....</b>	87
4.2.3.1 Behandlung von in Staurosporin inkubierten RGC-5 mit Glutamat .....	90
4.2.3.2 Behandlung von in Staurosporin inkubierten RGC-5 mit unterschiedlichen FBS-Konzentrationen .....	91
4.2.3.3 Norrin schützt mittels Staurosporin differenzierte RGC-5 .....	93
<b>5 Diskussion.....</b>	95
<b>5.1 Protektive Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen <i>in vitro</i>.....</b>	95
<b>5.2 Protektive Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen <i>in vivo</i>.....</b>	100
<b>5.3 Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen.....</b>	102
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	105
<b>7 Anhang .....</b>	107
<b>7.1 Literaturverzeichnis.....</b>	107

## **Inhaltsverzeichnis**

---

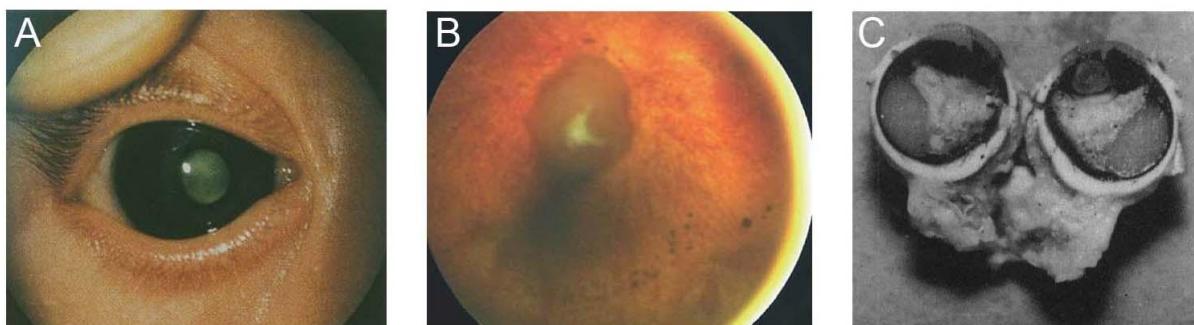
<b>7.2 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>121</b>
<b>7.3 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>125</b>
<b>7.4 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>128</b>
<b>7.5 Danksagung.....</b>	<b>130</b>
<b>7.6 Erklärungen.....</b>	<b>132</b>
<b>7.7 Curriculum Vitae.....</b>	<b>133</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Das Norrie-Syndrom - eine angeborene okulo-akustisch-zerebrale degenerative Erkrankung

1927 wurde vom dänischen Arzt Gordon Norrie bei der wissenschaftlichen Aufarbeitung aller 578 Fälle kindlicher Blindheit, welche er als Ophthalmologe am „*Royal Danish Institutes for the Blind*“ behandelte, erstmals ein Syndromkomplex beschrieben, bei dem es sich um eine Form der erblichen Blindheit handelte, welche mit einer beidseitigen Atrophie (*Phthisis bulbi*) der Augen einherging und von nur männlichen Mitglieder einer Familie betroffen waren [Norrie, 1927]. Etwa 40 Jahre später, 1966, fand dieser Syndromkomplex aufgrund eingehender Untersuchungen betroffener Familien durch Mette Warburg Einzug in die wissenschaftliche Literatur unter dem Begriff Norrie- bzw. Norrie-Warburg-Syndrom (*Norrie disease, ND*). Bei groß angelegten Untersuchungen der betroffenen Familien stellte sie dabei fest, dass es sich um eine X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung handeln müsse [Warburg, 1966].

Kennzeichnend für das sehr seltene Norrie-Syndrom, welches sich meist bei Geburt oder kurz danach manifestiert, seien dabei dysplastische und proliferative Fehlentwicklungen der Retina und des Glaskörpers [Warburg, 1968]. So führen die dysplastischen Vorgänge in den Augen der betroffenen Neugeborenen zur teilweisen oder auch vollständigen Ablösung der Netzhaut vom retinalen Pigmentepithel [Warburg, 1966]. Durch zusätzlich parallel dazu ablaufende proliferative Veränderungen im Bereich der abgelösten Netzhaut formiert sich eine undifferenzierte, fibrovaskuläre Masse, welche durch stetiges Wachstum die Verdrängung des Glaskörpers verursacht. Diese retrozentralen Membranen wurden bei der Untersuchung von enukleierten Augen anfänglich verfälschend als retinaler Pseudotumor benannt. Heute wird dies meist als Pseudogliom bezeichnet, stellt eine Hyperplasie des retinalen Pigmentepithels dar und ist als Leukokorie sichtbar. Bei der Funduskopie zeigt sich dies darüber hinaus als eine trübe, weißlich-gelbe Masse, die an der Retina fixiert ist [Harendra de Silva, 1988; Chynn, 1996; Drenser, 2007] (Abb. 1).



**Abb. 1 Photographie (A), Funduskopie (B) und Schnittpräparat (C) von Augen von mit dem Norrie-Syndrom betroffenen Patienten.** A-C: Bei den vom Norrie-Syndrom betroffenen Patienten kann bereits kurz nach der Geburt aufgrund der dysplastischen und proliferativen Umbauvorgänge im Bereich der Netzhaut ein trüber, weißlich-gelber Pupillenreflex (Leukokorie) festgestellt werden (A), welcher durch die Funduskopie als weißliches Gewebe im Bereich der Retina genauer dargestellt werden kann (B). Bei den postmortal angefertigten Schnittpräparaten ist ebenfalls das als Pseudogliom bezeichnete dysplastisch veränderte Gewebe erkennbar [Abbildungen modifiziert aus (A) Chynn, 1996; (B) Drenser, 2007 und (C) Harendra de Silva, 1988].

Diese Fehlentwicklungen führen immer zur Erblindung des betroffenen Patienten. Lediglich einige Fälle sind beschrieben, bei denen die Netzhautablösung verzögert auftrat und so den Patienten die Lichtwahrnehmung für einige Jahre ermöglichte [Bergen, 1994]. Die fortschreitende Netzhautablösung verursacht im weiteren Verlauf die Atrophie des Auges [Warburg, 1975; Berger, 1998]. Zusätzlich dazu führt das Norrie-Syndrom bei vielen Patienten zur Entstehung eines Glaukoms, Katarakts sowie zu Einblutungen in Glaskörper und Retina [Berger, 1998]. Auch zeigt die Aufarbeitung histologischer Schnitte durch die betroffenen Augen Veränderungen im Glaskörper, bei denen es sich um nicht vollständig zurückgebildete hyaloidale Gefäße handelte [Warburg, 1975], und in den nukleären Schichten der Retina [Apple, 1974]. Hierbei fielen, neben der Desorganisation dieser Schichten, eine deutliche geringere Anzahl an retinalen Ganglienzellen, sowie das Vorkommen einiger dieser Zellen in der inneren plexiformen Schicht auf [Schröder, 1997]. Untersuchungen der retinalen Blutgefäße zeigten ebenfalls Auffälligkeiten, welche hauptsächlich durch das Fehlen des tiefen Kapillarnetzes gekennzeichnet waren [Drenser, 2007; Wu, 2007].

Neben diesen beim Norrie-Syndrom primär auftretenden Veränderungen des Auges führte die über einen längeren Zeitraum angelegte Beobachtung der betroffenen Patienten durch Mette Warburg [Warburg, 1966] zur Identifizierung weiterer mit dem Norrie-Syndrom verknüpfte extraokuläre Symptome. So leidet etwa ein Drittel der vom Norrie-Syndrom betroffenen Patienten an einer progressiven sensorisch-neuralen Taubheit, welche sich jedoch erst meist im frühen Erwachsenenalter manifestiert [Halpin, 2005] und an einer zunehmenden mentalen Retardierung variabler Ausprägung. So wird von Mette Warburg der Fall des vom Norrie-Syndrom betroffenen John Helmuth beschrieben, welcher noch im Alter von 6 Jahren an Enuresis nocturna litt. Im weiteren Verlauf nahmen seine geistigen Fähigkeiten immer weiter ab. So führte er im 13. Lebensjahr die letzte sprachliche Kommunikation, wurde ab dem 15. Lebensjahr vermehrt unruhig und kurz vor seinem Tod im Alter von 23 Jahren musste er wegen zunehmender Automutilation am Bett fixiert werden [Warburg, 1966]. Neben diesen beiden am häufigsten vorkommenden extraokulären Manifestationen des Norrie-Syndroms werden weitere komplexe Symptome, wie beispielsweise Hypogonadismus, Epilepsie, Immundefizite oder Wachstumsstörungen, beschrieben [De la Chapelle, 1985; Gal, 1986; Donnai, 1988]. Das Auftreten dieser Symptome ist jedoch höchst variabel und ist selbst in einer Familie unterschiedlich ausgeprägt [Berger, 1998].

## 1.2 NDP - Das Norrie-Disease-Pseudoglioma-Gen

Mit Einzug moderner molekularbiologischer Methoden in die medizinische Forschung konnte 1992 das ursächliche Gen für das Norrie-Syndrom identifiziert werden. Nach Analyse des Genoms mehrerer vom Norrie-Syndrom betroffener Patienten konnten zahlreiche Mutationen im *NDP*- (*Norrie Disease Pseudoglioma*) Gen identifiziert werden [Berger, 1992; Meindl, 1992; Chen, 1993]. Die kodierende Sequenz des *NDP*-Gen, lokalisiert auf dem proximalen kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp11.4-p11.2), umfasst 28 kb und besteht aus 3 Exons, wobei Exon 1 lediglich den 5'-UTR (*Five Prime Untranslated Region*) enthält [Rehm, 1997; Drenser, 2007; Wu, 2007]. Das Spektrum der für das Norrie-Syndrom verantwortlichen Mutationen umfasst dabei unter anderem zahlreiche Punktmutationen, vorzeitige Termination der Translation sowie Leserahmenverschiebungen [Berger, 1998; Nikopoulos, 2010]. Bei weiteren Untersuchungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen Geno- und

Phänotyp stellte sich heraus, dass Veränderungen im *NDP*-Gen neben dem Norrie-Syndrom auch bei anderen Augenerkrankungen eine Rolle spielen können. Hierzu zählen sowohl die sporadische als auch die familiäre exsudative Vitreopathie (FEVR), der Morbus Coats sowie die Frühgeborenenretinopathie (ROP) [Shastry, 1997; Berger, 1998; Black, 1999]. All diese Erkrankungen haben jedoch gemeinsam, dass sie durch eine Störung in der Entwicklung der retinalen Blutgefäße verursacht werden. Bis heute ist aber eine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation für die Veränderungen im *NDP*-Gen nicht möglich. Selbst die gleiche Mutation des *NDP*-Gens in einer vom Norrie-Syndrom betroffenen Familie kann zur unterschiedlichen Ausprägung führen und legt daher eine weitere Beteiligung genetischer und umweltbedingter Einflüsse auf die Entstehung des Norrie-Syndroms nahe [Berger, 1998].

### **1.3 Norrin - Das Produkt des Norrie-Disease-Pseudoglioma-Gens**

Produkt des *NDP*-Gens stellt Norrin dar, dessen Funktion bis heute weitestgehend unbekannt ist. Biochemische Analysen des Proteins aus Mensch und Maus ergaben, dass das humane Norrin aus 133 Aminosäuren und homologes murines Norrin aus 131 Aminosäuren aufgebaut ist, wobei eine Übereinstimmung der beiden Proteinsequenzen von etwa 94 % besteht [Berger, 1998] und beide Sequenzen über zwei charakteristische Domänen, nämlich einer 24 Aminosäure umfassende N-terminalen Signalfrequenz und einer C-terminalen cysteinreichen Domäne, verfügen [Meindl, 1992]. Aufgrund des Vorhandenseins eines Signalpeptids und in den von Perez-Vilar [Perez-Vilar, 1997] und Smallwood [Smallwood, 2007] durchgeföhrten Arbeiten zeigte sich, dass Norrin in den extrazellulären Raum sezerniert werden kann und an die extrazelluläre Matrix bindet [Xu, 2004]. Weitere Arbeiten bestätigten dann, dass es sich bei Norrin um ein parakrines Signalmoleköl handelt [Ye, 2010]. Durch *in situ* Hybridisierung muriner Norrin mRNA gelang der Nachweis, dass Norrin mRNA hauptsächlich in der inneren und äußeren Körnerschicht und in der Ganglienzellschicht der Retina, in den Purkinjezellen des Kleinhirns, in den sensorischen Zellen des olfaktorischen Epithels, in den Gonaden sowie im Innenohr exprimiert wird [Berger, 1996; Hartzer, 1999; Rehm, 2002; Luhmann, 2005]. In neueren Arbeiten mit Knock-in-Reportermäusen konnte jedoch, im Gegensatz zu den mittels *in situ* Hybridisierung gewonnenen Daten, die Expression des *NDP*-Gens in den Müllerzellen der Retina und nicht in den Neuronen dargestellt werden [Ye, 2011].

Weitere Hinweise bezüglich möglicher Funktion und Aufbau von Norrin erbrachten Sequenzanalysen und *in silico* 3D-Strukturanalysen des Proteins. Dabei wurde eine Ähnlichkeit der Tertiärstrukturen von Norrin mit TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor*) und anderen Wachstumsfaktoren mit einem Cystinknoten-Motiv nahegelegt [Meitinger, 1993; Haider, 2001], weswegen Norrin den Wachstumsfaktoren mit Cysteinknoten zugeordnet werden kann. Bestätigt wird dies durch die Tatsache, dass eine große Anzahl der pathogenen Mutationen im *NDP*-Gen den Bereich des potentiellen Cystinknotens betreffen und durch dessen Zerstörung zum Funktionsverlust von Norrin führen [Meindl, 1992; Drenser, 2007] (Abb. 2).

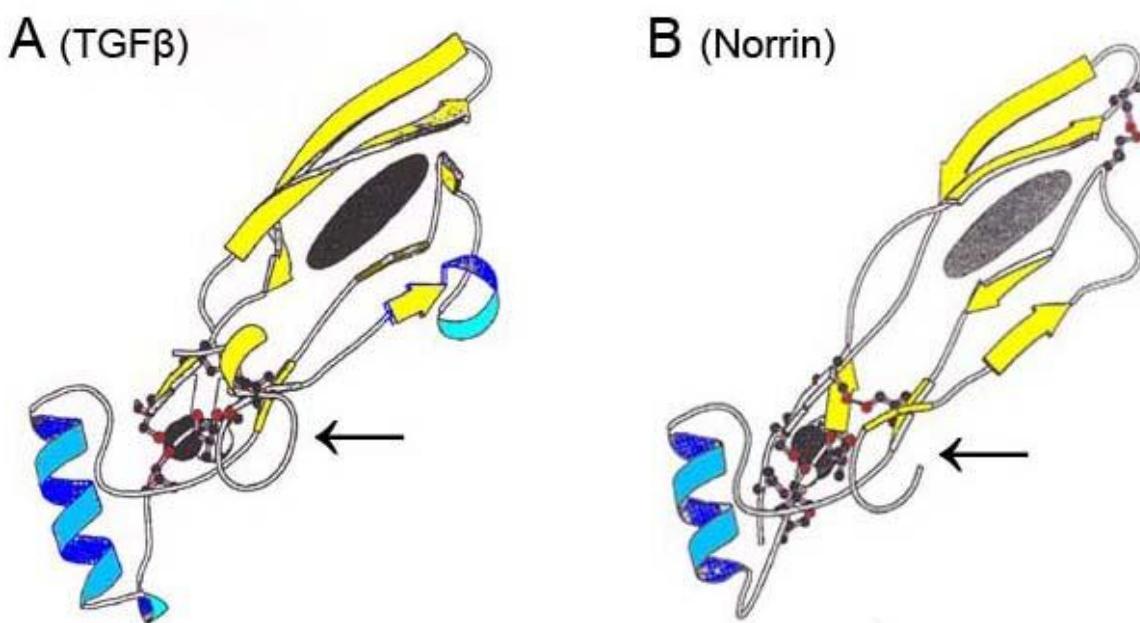


Abb. 2 **Ribbon-Diagramme der 3D-Strukturanalyse von TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor*) (A) und des NDP-Genproduktes (Norrin) (B).** A; B: Die vergleichenden Strukturanalysen zeigen, dass beide Proteine, wie bei vielen Wachstumsfaktoren üblich, einen Cystinknoten (Pfeil) besitzen, und verdeutlichen darüber hinaus die Ähnlichkeit zwischen der Tertiärstruktur von Norrin (B) und TGF $\beta$  (A). [Abbildungen modifiziert aus Meitinger, 1993].

#### 1.4 Beobachtungen an Norrin-defizienten und transgenen Mausmodellen

Zur weiteren Untersuchung der Funktion von Norrin konnte von Berger eine Norrin-defizierte Maus (*Ndp*<sup>y-</sup>), in welcher das *Ndph*-Gen (*Norrie Disease Pseudoglioma Homolog*), dem murinen Ortholog zum humanen *NDP*-Gen, durch gezielte homologe Rekombination ausgeschaltet wurde, etabliert werden [Berger, 1998].

Untersuchungen, die von Richter et al. an diesem Mausmodell durchgeführt wurden, zeigten, dass Norrin eine wesentliche Rolle bei der Angiogenese retinaler Gefäße spielt [Richter, 1998]. Bei der histologischen Aufarbeitung konnte gezeigt werden, dass die *Ndp<sup>y/-</sup>*-Mäuse unter anderem kein tiefes Kapillarbett in der Retina ausbildeten [Richter, 1998]. Auch zeigten Experimente an *Ndp<sup>y/-</sup>*-Mäusen mittels Elektroretinogramm (ERG), dass der Verlust des *Ndph*-Gens wie beim Menschen die fortschreitende Erblindung der Mäuse verursacht [Ruether, 1997]. Neben diesen am retinalen Gefäßsystem auftretenden Veränderungen, verursachte das Fehlen von Norrin einen fortschreitenden Verlust an retinalen Ganglienzellen. Die von Richter durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass 9 Tage nach der Geburt noch keine Unterschiede in der Anzahl der retinalen Ganglienzellen bei *Ndp<sup>y/-</sup>*-Mäusen zu Wildtyp-Mäusen bestanden. Erst ab dem 14. Tag nach der Geburt fand sich in *Ndp<sup>y/-</sup>*-Mäuse eine deutlich reduzierte Anzahl an retinalen Ganglienzellen.

Ein weiteres Tiermodell zur Untersuchung der Funktion von Norrin stellt die βB1-Crystallin-Norrin-Maus dar, in welcher es zur Überexpression von ektopem Norrin unter der Kontrolle des starken linsenspezifischen βB1-Crystallin-Promotors kommt [Ohlmann, 2005]. Neben einem starken Gefäßwachstum in der Tunica vasculosa lentis in diesem Mausmodell zeigte eine Kreuzung dieser Mäuse mit *Ndp<sup>y/-</sup>*-Mäusen eine völlig der Norm entsprechende retinale Vaskularisierung sowie eine, mittels ERG nachgewiesene, fast wieder hergestellte Funktion der Netzhaut [Ohlmann, 2005]. Auch durch diese Versuche bestätigte sich die Vermutung, dass Norrin einen wesentlichen Einfluss auf die retinale Angiogenese ausübt. Neben den Veränderungen am retinalen Gefäßsystem in diesem Tiermodell zeigten sich wie bereits bei den *Ndp<sup>y/-</sup>*-Mäusen Veränderungen in der Anzahl der retinalen Ganglienzellen. So resultierte aus der Kreuzung von *Ndp<sup>y/-</sup>*-Mäusen mit βB1-Crystallin-Norrin-Maus nicht nur eine deutlich höhere Anzahl an retinalen Ganglienzellen verglichen mit den *Ndp<sup>y/-</sup>*-Mäusen, sondern auch verglichen mit den Wildtyp-Mäusen. Durch den Nachweis von proliferierenden Zellen mittels Bromodesoxyuridin (BrdU) konnte diese erhöhte Anzahl an retinalen Ganglienzellen auf eine verstärkte Mitose zurückgeführt werden [Ohlmann, 2005].

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Norrin, neben den in vielen Arbeiten beschriebenen Einfluss auf die retinale Angiogenese [Übersicht bei Masckauchán, 2006],

auch einen neuroprotektiven Effekt auf die retinalen Ganglienzellen ausüben könnte, dessen weitere experimentelle Abklärung Ziel dieser Arbeit darstellte.

## 1.5 Der Norrin/ $\beta$ -Catenin-Signalweg

Die Analysen der DNA-Sequenzen von Patienten, welche vom Norrie-Syndrom, von der familiären exudativen Vitreoretinopathie (FEVR) oder auch von der Frühgeborenenretinopathie (ROP) betroffen waren, zeigten dass Mutationen im *NDP*-Gen unter anderem ursächlich für die Entstehung dieser Krankheiten sein können [Dickinson, 2006]. Bei näherer Betrachtung der familiären exudativen Vitreoretinopathie (FEVR) stellte sich diese jedoch als sehr heterogenes Krankheitsbild dar, welches neben einem X-chromosomal rezessiven, verursacht durch einen Defekt im *NDP*-Gen, auch einen autosomal rezessiven sowie einen autosomal dominanten Erbgang aufweist [Chen, 1993; Robitaille, 2002]. So konnten in weiteren Arbeiten Defekte in den Genen *FZD4* (*Frizzled-4*), *LRP5* (*Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5*) und *TSPAN12* (*Tetraspanin-12*) für die autosomale Vererbung der familiären exudativen Vitreoretinopathie (FEVR) verantwortlich gemacht werden [Jiao, 2004; Robitaille, 2010]. Davon ausgehend konnten Untersuchungen an *FZD4*-defizienten, *LRP5*-defiziente und *Norrin*-defizienten Tiermodellen fast identische Veränderungen des vaskulären Phänotyp, wie das Fehlen des tiefen Kapillarnetzes, in den Retinae dieser Modelle zeigen [Xu, 2004; Xia, 2008]. All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass aufgrund des ähnlichen Phänotyps bei Defekten der Gene *NDP*, *FZD4* sowie *LRP5*, deren Produkte Teil eines gemeinsamen Signalweges sein könnten. Bestätigt wurde diese Hypothese durch Xu et al. [Xu, 2004], die in der Lage waren zu zeigen, dass *Norrin* und *Frizzled-4* zum einen ein Ligand-Rezeptor-Paar darstellen und zum anderen, dass diese Bindung die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs zur Folge hat [Xu, 2004]. Darauf aufbauend zeigte sich, dass *Norrin* auch nur an *Frizzled-4* binden kann und nicht in der Lage ist, mit einem anderen der 10 *Frizzled*-Rezeptoren zu interagieren [Smallwood, 2007].

Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs, auch als Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg bezeichnet, erfolgt zumeist durch die Bindung sezernierter Glykoproteine (Wnt) an den aus cysteinreichen Domänen bestehenden extrazellulären Anteil der 7-Transmembran-Rezeptoren der *Frizzled*-Familie [Zerlin, 2008]. Als notwendiger Co-Rezeptor fungiert hierbei

LRP5/6 [Cadigan, 2006; Rey, 2010]. Im Ruhezustand befindet sich im Zytoplasma ein Degradationskomplex, unter anderem bestehend aus dem Tumorsuppressor APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), Axin und GSK-3 $\beta$  (*Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$* ), der freies zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin bindet, am Ser9 phosphoryliert und ubiquiniert und so zum Abbau vom konstitutiv in der Zelle gebildeten  $\beta$ -Catenin im Proteasom führt [Aberle, 1997; Cappuccio, 2005]. Erfolgt nun die Aktivierung des Frizzled-Rezeptors, wird das zytoplasmatische Protein Dvl (*Dishevelled*) phosphoryliert. Dieses ist dadurch in der Lage, den  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex zu destabilisieren [Kimelman, 2006], was einen Anstieg des zytoplasmatischen  $\beta$ -Catenin zur Folge hat, welches nun vermehrt in den Zellkern transloziert. Im Nucleus bindet  $\beta$ -Catenin an Transkriptionsfaktoren der Familie TCF (*T-Cell Factor*)/ Lef (*Lymphoid Enhancer Factor*) und reguliert somit die Expression zahlreicher Zielgene [Akiyama, 2000; Cadigan, 2006; Gordon, 2006; Masckauchán, 2006] (Abb. 3).

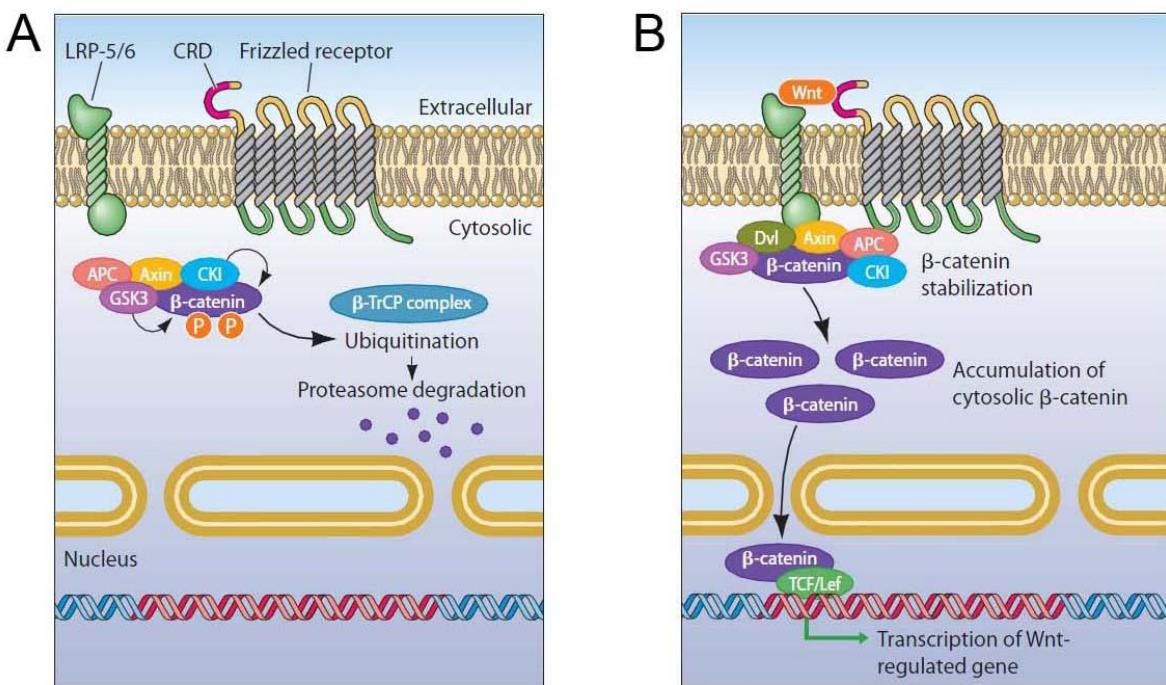


Abb. 3 **Schematische Darstellung des kanonischen Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs.** A; B: Vor Aktivierung des Frizzled-Rezeptors wird  $\beta$ -Catenin kontinuierlich im Proteasom abgebaut (A). Erfolgt die Bindung an den Frizzled-Rezeptor und seinen Co-Rezeptor LRP5/6 führt dies zur Phosphorylierung von Dvl und dadurch zur Destabilisierung des  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplexes. Die Konzentration an freiem  $\beta$ -Catenin steigt daraufhin im Zytoplasma an, wodurch mittels Translokation  $\beta$ -Catenin in den Zellkern gelangt und dort die Expression zahlreicher Zielgene regulieren kann (B) [Abbildungen modifiziert aus Masckauchán, 2006].

Darüber hinaus konnten Junge und Mitarbeiter zeigen [Junge, 2009], dass das 4-Transmembran-Protein TSPAN12 (*Tetraspanin-12*) einen weiteren noch nicht näher charakterisierten Bestandteil des Norrin-Rezeptorkomplexes darstellt, wobei TSPAN12 dabei zu einer spezifischen Verstärkung des Norrin/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs über die Rekrutierung von Norrin und Frizzled-4 führt, ohne dass dadurch eine Beeinflussung des Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs erfolgt [Junge, 2009; Ye, 2010].

Die von  $\beta$ -Catenin regulierten Zielgene nehmen unter anderem bei vielen Entwicklungsvorgängen und physiologischen Prozessen, wie beispielsweise der Entwicklung des zentralen Nevensystems, eine zentrale Rolle ein [Akiyama, 2000], was eine strenge Regulation des Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg notwendig macht. Eine bedeutende Funktion fällt hierbei dem sezernierten Glykoprotein Dkk-1 (*Dickkopf-1*) zu, das neben den sFRP (*secreted Frizzled-related protein*), ein wichtiger extrazellulärer Antagonist des Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs ist [Bafico, 2001; Zorn, 2001]. Dkk-1 ist in der Lage, sowohl an den Co-Rezeptor LRP5/6 als auch an weitere Rezeptoren, den Transmembranproteinen Krm1 (*Kremen1*) und Krm2 (*Kremen2*), zu binden und so die Internalisierung des Co-Rezeptors LRP5/6 zu induzieren, wodurch die Bildung des, den kanonischen Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg aktivierenden, Frizzled-Wnt-LRP5/6-Rezeptorkomplexes verhindert wird [Mao, 2001; Semenov, 2001; Zorn, 2001; Kawano, 2003] (Abb. 4).

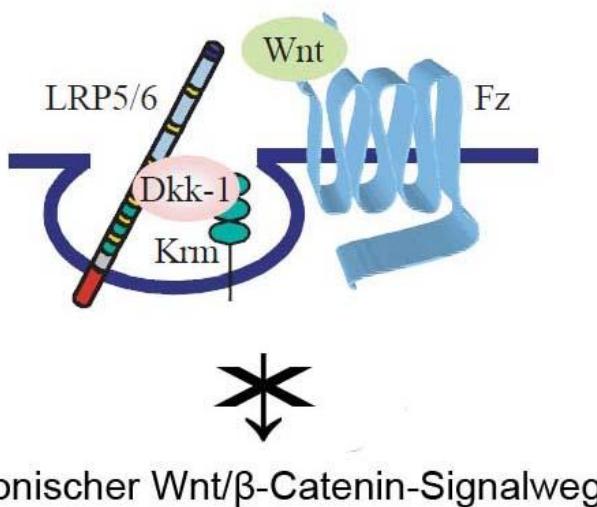


Abb. 4 Schematische Darstellung der Hemmung des kanonischen Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs durch Dkk-1 (**Dickkopf-1**). Dkk-1 ist in der Lage, durch Bindung an den Co-Rezeptor LRP5/6 und an die Transmembranproteine Krm, eine Endozytose dieser Proteine zu induzieren und somit eine mögliche Aktivierung des Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs durch stimulierende Liganden am Frizzled-Rezeptorkomplex, zu verhindern [Abbildung modifiziert aus Kawano, 2003].

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der näheren Untersuchung anderer Mitglieder der Dickkopf-Familie, wie beispielsweise bei Dkk-3, dass diese agonistisch auf den Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg einwirken [Nakamura, 2007].

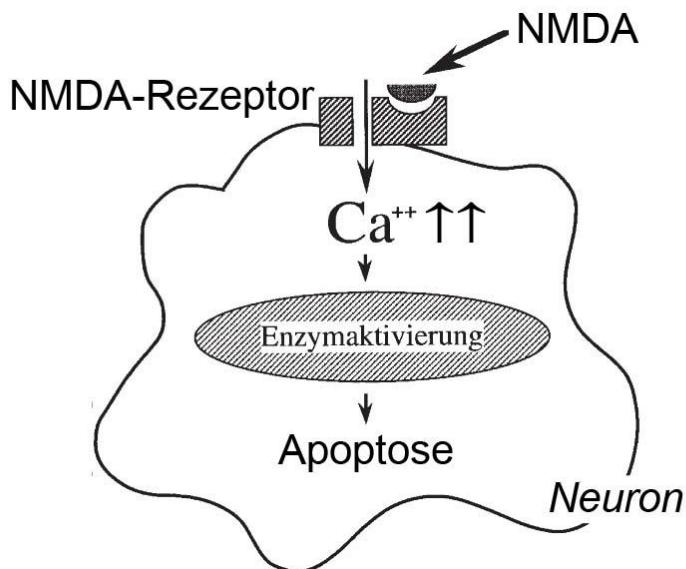
## 1.6 Modell und Signalweg der exzitotoxischen Schädigung durch NMDA

Ziel dieser Arbeit war die nähere Abklärung eines möglichen neuroprotektiven Effekts von Norrin auf die retinalen Ganglienzellen. Hierfür wurde ein NMDA-Schadensmodell verwendet, welches auf der exzitotoxischen Schädigung retinaler Ganglienzellen beruht [Shimazawa, 2005].

Bei einem breiten Spektrum an neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise amyotrophe Lateralsklerose (ALS), HIV-Enzephalopathie oder Chorea Huntington, aber auch bei pathologischen Vorgängen im Auge, wie der Verlust von Neuronen beim Glaukom, spielt die Exzitotoxizität, neuronaler Zelltod verursacht durch einen Überschuss an exzitatorischen Neurotransmittern, wie beispielsweise Glutamat, eine bedeutende Rolle [Lam, 1999]. Eine

Schlüsselposition nimmt dabei der NMDA- (*N-Methyl-D-Aspartat*) Rezeptor, ein ionotroper Glutamat-Rezeptor, ein. Dabei handelt es sich um einen aus 5 Untereinheiten, NR1 und NR2A bis NR2D, aufgebauten Ionenkanal, welcher nach Aktivierung mittels Glutamat oder dem synthetischen Agonist NMDA, den Einstrom von Kationen, meist  $\text{Ca}^{2+}$ , in die Zelle ermöglicht [Shen, 2006; Lau, 2010]. Voraussetzung für die Öffnung des Kanals ist die Depolarisation der Zelle. Im Ruhezustand wird der Kanaleingang normalerweise durch extra- und intrazelluläre  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen versperrt. Erst durch die Depolarisation erfolgt die Freigabe des Kanals [Johnson, 1990]. Darüber hinaus ist Glycin ein obligater Coagonist für die Aktivierung des NMDA-Rezeptors [Johnson, 1987].

Da es sich bei NMDA (*N-Methyl-D-Aspartat*) um keinen physiologisch im Organismus vorkommenden Stoff handelt, führt die Bindung dieser Liganden an den NMDA-Rezeptorkomplex aufgrund fehlender antagonistischer Mechanismen zu einer unphysiologisch langen Öffnung des Ionenkanals und somit zu einem exzessiven Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle [Shen, 2006]. Die hohen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen wiederum führen zur Stimulation der neuronalen NO-Synthase (nNOS), welche die vermehrte Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) katalysiert [Manabe, 2005], das in hohen Konzentrationen unter anderem zum einen aufgrund oxidativer Eigenschaften durch direkte DNA-Schädigung und zum anderen durch Interaktion mit GAPDH durch direkte Neurotoxizität, zum Zelltod führen kann [Lau, 2010]. Zusätzlich dazu ist NO über eine Reihe weiterer Mechanismen in der Lage, eine Apoptose zu induzieren. So führt NO beispielsweise durch Abbau des mitochondrialen Membranpotentials zur Freisetzung von Cytochrom C, welches die Aktivierung einer Caspase-abhängigen apoptotischen Signalkaskade zur Folge hat [Chung, 2001]. Auch kann es durch die erhöhten NO-Konzentrationen zur Akkumulation des Proteins p53 kommen, welches über den Apoptose-Regulator BAX ebenfalls zur Induktion einer Apoptose-Signalkaskade führt [Chung, 2001]. Daneben existieren auch verschiedene NO unabhängige Signalwege, wie beispielsweise die Aktivierung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger DNAase, die eine Apoptose in den betroffenen Zellen einleiten [Lynch, 2002]. Die genauen Mechanismen, die die Induktion einer Apoptose verursachen, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt [Shen, 2006] (Abb. 5).



**Abb. 5 Vereinfachte schematische Darstellung einer durch exzitotoxische Schädigung induzierten Apoptose.** Die Stimulierung des NMDA-Rezeptors führt zu einem vermehrten Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen, welche über eine Reihe von noch nicht vollständig geklärten Mechanismen die Induktion einer Apoptose der Zelle zur Folge haben [Abbildung modifiziert aus Haefliger, 2001].

Um die durch NMDA-Rezeptoren verursachte Apoptose in retinalen Ganglienzellen hervorzurufen, wurde in dieser Arbeit unter anderem, wie von Shimazawa beschrieben [Shimazawa, 2005], NMDA (*N*-Methyl-D-Aspartat) intravitreal in die Mausaugen injiziert. Ferner konnte Li zeigen, dass der Verlust an retinalen Ganglienzellen durch NMDA-Injektionen auf apoptotische Prozesse zurückzuführen ist [Li, 1999]. Da NMDA-Rezeptoren im Auge hauptsächlich in den retinalen Ganglienzellen vorkommen [Jakobs, 2007], konnte darüber hinaus ein relativ spezifischer Schaden gesetzt werden, während andere Strukturen des Auges unversehrt blieben. Aufgrund dieser Tatsachen handelt es sich bei der exzitotoxischen Schädigung durch NMDA im Mausauge um ein gutes Modell, einen möglichen neuroprotektiven Effekt von Norrin an retinalen Ganglienzellen zu untersuchen.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Bei den von Richter et al. [Richter, 1998] und Ohlmann et al. [Ohlmann, 2005] durchgeführten Experimenten an Ndp<sup>y/-</sup>- bzw.  $\beta$ B1-Crystallin-Norrin-Mäusen zeigte sich, dass die unterschiedliche Expression von Norrin die Anzahl der retinalen Ganglienzellen beeinflussen kann. So führt einerseits das Fehlen von Norrin zu einem deutlichen Verlust an retinalen Ganglienzellen, andererseits hatte die Überexpression von Norrin eine höhere Anzahl an retinalen Ganglienzellen im Mausauge zur Folge. Dies lässt vermuten, dass Norrin einen neuroprotektiven Effekt besitzen könnte, welcher jedoch bisher noch nicht bestätigt werden konnte.

Ziel dieser Arbeit war es daher, einen möglichen neuroprotektiven Effekt von Norrin auf durch Exzitotoxizität geschädigte retinale Ganglienzellen, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachzuweisen.

Im Einzelnen wurden folgende Ziele verfolgt:

1. Die Etablierung eines Schadensmodells zur Induktion einer Apoptose in retinalen Ganglienzellen.
2. Die Untersuchung des neuroprotektiven Potentials von Norrin *in vivo*.
3. Die Untersuchung des neuroprotektiven Potentials von Norrin *in vitro*.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Chemikalien, Reagenzien und allgemeine Verbrauchsmaterialien

Tab. 1 Verwendete Geräte

Produkt	Firma
Arpege 140 Stickstofftank	Air Liquide GmbH, Düsseldorf
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Casy Cell Counter Model TT	Innovatis AG, Bielefeld
Hera Cell 150 Brutschrank	Heraeus, Hanau
Hera Safe Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
Inolab pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
Innova CO-170 Brutschrank	New Brunswick Scientific, New Jersey (USA)
Julabo SW20 Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Leica Ultracut E	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Kern PJL 2100-2M Analysewaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Memmert Wasserbad	Memmert-GmbH, Schwabach
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Giessen
Mikroskop Axio Imager. Z1, Axiovert M400, Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Göttingen
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica (USA)
NEUBAUER-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH, Lauden
Pipetman Pipetten	Gilson, Middleton (USA)
Pipetting Aid	Gilson, Middleton (USA)
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Kelheim
PowerShot G5 Digital Camera	Canon, Krefeld
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Sunrise-Basic ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH, Grodig (Österreich)
Systec V75 Autoklav	Systec GmbH, Wettenburg
Transferpette-8	Brand, Wertheim

Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York (USA)
Wärmelampe	Electric Petra, Beergau
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf, Hamburg

Tab. 2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma
„Falcon“ Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Glaswaren	Schott, Roth, VWR
Millex-GV 0,22 µm Spritzenfilter	Millipore Corporation, Billerica (USA)
Multi-Reaktionsgefäße 0.5 ml, 1.5 ml und 2.0 ml	Roth, Karlsruhe
Omnifix sterile Einmalspritzen	Braun, Wertheim
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago (USA)
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht
Rotilabo 0,22 µm Spritzenfilter	Roth, Karlsruhe
SATIN PLUS Powder Free Latex Gloves	Kimberly-Clark, Neenah (USA)

Tab. 3 Verwendete kommerzielle Kits

Produkt	Firma
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	Promega Corporation, Madison (USA)
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad, München

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma (Deisenhofen) oder Merk (Darmstadt) in der Reinheitsstufe *pro analysis* bezogen. Zellkulturmaterialein wurden von der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe) und PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) bezogen.

## 3.2 Expressionsanalyse von mRNA

### 3.2.1 Reagenzien für die Molekularbiologie

Tab. 4 Verwendete Chemikalien und Reagenzien (Expressionsanalyse)

Produkt	Firma
10 x PCR-Puffer	Bioline, Luckenwalde
Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf
Borat (Natrumtetraborat)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Bioline, Luckenwalde
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ficoll	Serva, Heidelberg
Fluorescein	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
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

Tab. 5 Allgemeine Geräte (Expressionsanalyse)

Produkt	Firma
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nürnbrecht
Elektrophoresekammer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
IQ5 Multicolor Real-time PCR Detection System + iCycler	BioRad, München
Mastercycler gradient, personal	Eppendorf, Hamburg
Mikrohomogenisator	Roth, Karlsruhe
Power Supply	Consort, Turnhout (Belgien)
Zellschaber	Sarstedt, Nürnbrecht

### 3.2.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotidprimer wurden bei der Firma Invitrogen (Karlsruhe) erworben. Die in der quantitativen real-time RT-PCR eingesetzten Primer wurden mit Hilfe des Roche Applied Science *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* ermittelt.

Tab. 6 Verwendete Oligonukleotidprimer

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz von 5' nach 3'
BDFN	Mus musculus	fw	AGTCTCCAGGACAGCAAAGC
		rev	TGCAACCGAAGTATGAAATAACC
CNTF	Mus musculus	fw	TTGATTCCACAGGCACAAAA
		rev	CCCTGCCTGACTCAGAGGT
FGF2	Mus musculus	fw	CGGCTCTACTGCAAGAACG
		rev	TTTCTTGTCACCTCTGGCTGTA
GAPDH	Mus musculus	fw	TGTCCGTCGTGGATCTGAC
		rev	CCTGCTTCACCACCTTCTTG
LEDGF	Mus musculus	fw	GGCCAGCAGTAAGACAAAGC
		rev	TGAAGTCTGCCGACCTAGTTAT

VEGF120	Mus musculus	fw	GGAGAGATGAGCTTCTACAGCA
		rev	CTGAACAAGGCTCACAGTCATTT
VEGF164	Mus musculus	fw	GGAGAGATGAGCTTCTACAGCA
		rev	CCTGGCTTGTACATTTCT

### 3.2.3 Prinzip der Expressionsanalyse mittels quantitativer real-time RT-PCR

Die Expressionsanalyse wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR, einer Fluoreszenz-basierten PCR-Methode durchgeführt, mit deren Hilfe die Expression eines Gens quantifiziert werden kann [Higuchi, 1993]. Dabei wird *complementary DNA* (cDNA), synthetisiert durch das Enzym reverse Transkriptase aus mRNA, als Ausgangsmaterial verwendet.

Ein Realtime-Gerät besteht aus einem Laser, der einen in den Proben enthaltenen, interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green I) anregt, und einem Detektor, welcher die Intensität der von der Probe emittierten Fluoreszenz kontinuierlich misst. Darüber hinaus wird durch Anlagerung von Oligonukleotiden, Verlängerung durch die DNA-Polymerase und zyklische Denaturierung ein Amplikon wie bei der konservativen PCR exponentiell vermehrt. Durch die Interkalation des im Reaktionsansatz enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR-Green I) ist das Reaktionsprodukt bereits während des Versuchsablaufs sichtbar.

Da SYBR-Green I einerseits ausschließlich an doppelsträngige DNA bindet, sowie in ungebundener Form nur eine äußerst geringe Fluoreszenz aufweist, ist die gemessene Intensität der emittierten Fluoreszenz direkt proportional zur vorhandenen DNA-Menge. Überschreitet nun die Fluoreszenz im Reaktionsansatz mit zunehmender Zykluszahl den Hintergrundwert, kann die exponentielle Vermehrung des PCR-Produktes verfolgt werden. Dabei wird der Zyklus bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal den Hintergrundwert überschreitet als „cycle-threshold“  $C_T$ -Wert definiert. Dieser  $C_T$ -Wert ist von der eingesetzten cDNA-Konzentration des untersuchten Gens abhängig, weshalb aus dem gemessenen  $C_T$ -Wert eine quantitative Aussage über die anfänglich vorhandene mRNA-Menge gemacht werden kann. Da der Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green I) jedoch sequenzunabhängig in die dsDNA interkaliert, erzeugen auch nichtspezifische Amplifikationen und Primer-Dimere Signale, welche durch eine nachfolgende Schmelzkurvenanalyse berücksichtigt werden müssen.

Zur relativen Quantifizierung wird die Expression der mRNA des untersuchten Gens ins Verhältnis zu der eines Referenzgens gesetzt bzw. die Differenz ihrer C<sub>T</sub>-Werte gebildet. Als Referenzgene werden meist „Housekeeping“-Gene verwendet, deren Expressionsniveau im Zellstoffwechsel einer möglichst geringen Regulation unterliegt und somit annähernd konstant ist. Solch eine Eigenschaft weist beispielsweise die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in der Retina auf.

### 3.2.4 RNA-Isolation

Für Expressionsanalysen mittels RT-PCR wurde die RNA aus Retinae, welche 7 Stunden nach den intravitrealen Injektionen aus den Mausaugen präpariert wurden, nach der Methode von Chomczynski und Sacchi [Chomczynski, 1987] isoliert.

Zum Aufschluss der Zellen und dem Lösen der Zellkomponenten wurde zu den Retinae 300 µl TRIzol®-Reagenz, einer einphasigen Lösung aus Phenol und Guanidinethiocyanat, gegeben. Nach Überführung des Gewebes in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß und Zerkleinerung der Retinae mittels eines Mikrohomogenisators wurden je 80 µl Chloroform pro ml TRIzol®-Reagenz zugegeben, um das Homogenat in 3 Phasen aufzutrennen. Nach kräftigem Schütteln und Inkubation des Gemisches für 20 Minuten auf Eis erfolgte die Zentrifugation bei 13200 Upm bei 4°C für 20 Minuten. Die dabei entstandene wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach kräftigem Schütteln wurde das Gemisch über Nacht bei -20°C inkubiert, wodurch die RNA aus der wässrigen Phase ausgefällt wurde. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 13200 Upm bei 4°C für 20 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene RNA-Pellet mit 500 µl 70%-igem Ethanol unter kräftigem Schütteln „gewaschen“. Nach erneuter Zentrifugation bei 13200 Upm bei 4°C für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und das vom Alkohol befreite RNA-Pellet in 10 bis 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert (vgl. Tab. 7).

Tab. 7 Zusammenfassung der RNA-Isolation mittels TRIzol®-Reagenz

Schritt	Dauer
1 Zugabe von 300 µl TRIzol®-Reagenz zur Retina	
2 Zerkleinerung des Gewebes mittels Mikrohomogenisator	
3 Zugabe von 80 µl Chloroform pro ml TRIzol®-Reagenz	
4 Inkubation auf Eis	20 Minuten
5 Zentrifugation bei 13200 Upm bei 4°C	20 Minuten
6 Überführung der wässrigen Phase in eine neues Reaktionsgefäß	
7 Zugabe von Isopropanol im Verhältnis 1:1 zur wässrigen Phase	
8 Inkubation bei -20°C	über Nacht
9 Zentrifugation bei 13200 Upm bei 4°C	20 Minuten
10 Überstand verwerfen	
11 Pellet in 500 µl 70%-igem Ethanol resuspendieren	
12 Zentrifugation bei 13200 Upm bei 4°C	5 Minuten
13 Überstand verwerfen	
14 Pellet in 10 - 20 µl RNase-freiem Wasser lösen	mindestens 12 h

### 3.2.5 Quantifizierung der RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit Hilfe eines Photometers gemessen, wobei die stark temperaturempfindliche RNA während des gesamten Messvorgangs stets auf Eis gelagert wurde.

Dazu wurden 2 µl der wie oben beschriebenen extrahierten RNA mit 98 µl RNase-freiem Wasser verdünnt (Verhältnis 1:50) und die Extinktion bei 260 nm in einer geeigneten Küvette bestimmt. Die RNA-Konzentration wurde mittels der folgenden Formel bestimmt, wobei der Methodenfaktor RNA mit 40 µg/ml und der Verdünnungsfaktor mit 50 angegeben wurde:

$$[RNA] = E_{260} \times \text{Methodenfaktor RNA} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Um die Reinheit der RNA beurteilen zu können, wurde die Extinktion bei 260 und 280 nm gegen RNase-freies Wasser gemessen. Bei Werten des Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  zwischen 1,8 und 2,0 wurde die RNA als rein betrachtet.

### 3.2.6 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

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

Vor Durchführung der RNA-Agarose-Gelelektrophorese wurden alle dafür benötigten Lösungen hergestellt.

Tab. 8 Ansatz von 10x TBE (TRIS-Borat-EDTA-Puffer)

Reagenz	Dosierung
Tris	108 g
Borat	55 g
EDTA (0,5 M) (pH 8)	40 ml
a.d.	1,0 l

Tab. 9 Ansatz von 4x Auftragspuffer

Reagenz	Dosierung
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylencyanol FF	0,25% (w/v)
Ficoll	15% (w/v)

Nachdem für das Gel 1 g Agarose durch Aufkochen in einer Mikrowelle in 100 ml 1x TBE-Puffer vollständig gelöst war, wurde der Gelansatz auf etwa 60°C abgekühlt und vor Gießen des Gels 5 µl einer 0,01%-igen Ethidiumbromid-Lösung zum Ansatz gegeben. Gleich nach Auspolymerisierung des Gels wurde die Elektrophoresekammer mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt, so dass das Gel gerade bedeckt war.

Die zu untersuchenden RNA-Proben, bestehend aus 1 µl isolierter Gesamt-RNA und 5 µl RNase-freiem Wasser, wurden mit 2 µl 4x Auftragspuffer gemischt und in die Taschen des Gels gegeben. Die Elektrophorese wurde je nach Fragmentgröße 30 bis 60 Minuten mit einer Spannung von 130 V durchgeführt.

Durch das Bromphenolblau im Auftragspuffer konnte die Wanderstrecke der Proben abgeschätzt werden. Nach Auftrennung der RNA wurde das Gel aus der Apparatur entnommen und unter UV-Beleuchtung in einem Transilluminator mit einem Kamerasystem dokumentiert.

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“, hinweisend auf fragmentierte RNA, auf dem Gel sichtbar wurden.

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

### **3.2.7 cDNA-Herstellung**

RNA kann mit Hilfe der reversen Transkription in komplementäre einzelstrangige DNA (cDNA) umgewandelt werden, was den Vorteil hat, dass die vormals auf der RNA codierte Information stabiler konserviert ist und der Analyse mittels PCR-Technik zugänglich ist.

Als Startpunkt für die Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wurden oligo-dT-Ketten als Primer verwendet, die an den Poly-A-Schwänzen am 3'-Ende der RNA binden. Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des „*iScript cDNA Synthesis Kit*“ durchgeführt, wobei eine reverse Transkriptase ohne RNase-Aktivität verwendet wurde.

Zur Abschätzung von DNA-Verunreinigungen der RNA wurden pro RNA-Probe zwei Ansätze, einmal mit reverser Transkriptase („+RT“) sowie einmal ohne reverser Transkriptase („-RT“), wie folgt angesetzt.

**Tab. 10 Reaktionsansatz für die cDNA-Herstellung**

Reagenz	„+RT“-Ansatz	„-RT“-Ansatz
0,5 µg RNA in H <sub>2</sub> O	7,5 µl	10 µl
5x iScript™ Reaction Mix	2 µl	-
iScript™ Reverse Transcriptase	0,5 µl	-

Die reverse Transkription wurde im Anschluss daran in einem Thermocycler nach folgendem Schema durchgeführt, wobei die cDNA-Synthese mittels der reversen Transkriptase im 2. Schritt erfolgte und die selbige im 3. Schritt bei einer Temperatur von 85°C über 5 Minuten inaktiviert wurde (vgl. Tab. 11).

**Tab. 11 PCR-Programm für die cDNA-Synthese**

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

Anschließend wurde die so entstandene cDNA bei -20°C für die real-time RT-PCR-Analyse aufbewahrt.

### 3.2.8 Durchführung der quantitativen real-time RT-PCR

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 GAPDH als Referenzgen zur Normalisierung der cDNA-Menge gewählt.

Für jedes Kandidatengen wurden pro Lauf und zu untersuchender cDNA-Probe („+RT“) zwei Replikate der Reaktion durchgeführt. Hinzu kam eine entsprechende Reaktion des zugehörigen „-RT“-Ansatzes zum Ausschluss einer möglichen DNA-Kontamination. Des Weiteren wurde für jedes Primerpaar eine Leerkontrolle mit Wasser pipettiert.

Zunächst wurde jede cDNA-Probe („+RT“) und zugehöriger „-RT“-Ansatz mit einer Master-Mix-Lösung wie folgt versetzt:

Tab. 12 Ansatz der Master-Mix-cDNA (für je einen Reaktionsansatz)

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

Die so entstandenen „+RT“- und „-RT“-Ansätze wurden nach einem bestimmten Schema zu je 15 µl in die 96-Loch-Mikrotiterplatte vorgelegt.

Daraufhin wurden je 5 µl des Primer-Mix, der die spezifischen Primer des zu untersuchenden Gens enthielt, zugegeben:

Tab. 13 Ansatz des Primer-Mix

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

Mit Hilfe einer Klebefolie wurde die Mikrotiterplatte nach oben hin abgedichtet und in das Gerät eingesetzt. Das PCR-Programm wurde nach Eingabe des Platten-Pipettierschemas und der PCR-Parameter gestartet (vgl. Tab. 14).

Tab. 14 Programm für die real-time PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
1 (1x)	95°C	15 Minuten
2 (40x)	95°C	10 Sekunden
	60°C	40 Sekunden
3 (1x)	95°C	1 Minuten
4 (1x)	55°C	1 Minuten
5 (81x)	55°C + 0,5°C je Zyklus	6 Sekunden (Schmelzkurve)
6	4°C	∞

Die Amplifikations- bzw. Schmelzdaten wurden mit der *iCycler iQ Optical System Software Vers. 3.0a* erhoben und mit dem Tabellenkalkulationsprogramm *Microsoft® Excel*

(Microsoft® Corporation, Redmond, USA) ausgewertet. Die relative Expression der Transkripte wurde nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet [Livak, 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 Zellkulturtechniken

Zur Untersuchung des neuroprotektiven Potentials von Norrin auf geschädigte retinale Ganglienzellen *in vitro* wurden RGC-5 verwendet [Krishnamoorthy, 2001]. Um hierfür ein verwendbares Schadensmodell zu etablieren, sind die RGC-5 sowohl mit SConA (Succinyl-Concanavalin A) als auch mit Staurosporin behandelt und zur Induktion von Apoptosen mit unterschiedlichen Konzentrationen von in Medium gelöstem Glutamat, Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Serum inkubiert worden.

Tab. 15 Verwendete Chemikalien und Reagenzien (Zellbiologische Techniken)

Produkt	Firma
DMEM 4500 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolute	Roth, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum	Invitrogen, Karlsruhe
Natrium-L-Glutamat	AppliChem, Darmstadt
PBS, 1x, pH 7,4, -CaCl <sub>2</sub> -MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblaulösung (0,08%)	Sigma, Taufkirchen
0,05% Trypsin EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
WST-1 Reagenz (Water Soluble Tetrazolium)	Roche, Mannheim

Tab. 16 Verwendete Geräte und Materialien (Zellbiologische Techniken)

Produkt	Firma
Deckglas optisch plan für Haemazytometer	Mäntzel-Gläser, Braunschweig
Hera Cell 150 Brutschrank	Heraeus, Hanau
Hera Cell 150 Sterilbank	Heraeus, Hanau
Julabo SW20 Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde (Dänemark)
Kryo Einfriergerät	Nunc, Roskilde (Dänemark)
Kulturflaschen	Nunc, Roskilde (Dänemark)
Neubauer Zählkammer improved	Mäntzel-Gläser, Braunschweig

Petrischalen	Sarstedt, Nürnberg
Rotilabo 0,22 µM Spritzenfilter	Roth, Karlsruhe
Sunrise-basic ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH, Grodig (Österreich)
Multidishes Nunclon™ Δ 6-well	Nunc, Roskilde (Dänemark)
Tissue Culture Plate 96-well (Flat Bottom)	Sarstedt, Newton (USA)

### **3.3.1 Zelllinie**

Die in dieser Arbeit verwendeten RGC-5 (immortalisierte, retinale Ganglienzellen aus der Ratte) wurden von Neeraj Agarwal (University of North Texas, Fort Worth, USA) zur Verfügung gestellt.

### **3.3.2 Allgemeine Arbeitstechniken in der Zellkultur**

Sämtliche Arbeiten die im Zusammenhang mit den Zellkulturen standen, die Kultivierung von Zellen, die Herstellung von sterilen Lösungen und Medien, der Mediumwechsel und die Behandlung der Zellkulturen, wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Flow Werkbank mit vertikaler Luftführung (Herasafe, Heraeus, Hanau) durchgeführt.

Glaskörper wurden vor Gebrauch autoklaviert, Kunststoffmaterialien waren steril verpackt und wurden nach einmaligem Gebrauch entsorgt. Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden durch Filtrieren sterilisiert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Innova CO-170, New Brunswick Scientific, USA) bei 37°C und in 5% CO<sub>2</sub> mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre.

### 3.3.3 Kultivierung der RGC-5

Die Zellen wurden in folgendem Medium kultiviert:

Tab. 17 Zusammensetzung des Ganglienzellmediums für die Kultivierung („Komplettmedium“)

Komplettmedium:	DMEM 10% FBS (ohne Antibiotikum)
	500 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium
	50 ml 100% fötales Kälberserum (fetal calf serum; FCS)

Tab. 18 Zusammensetzung des Ganglienzellmediums für Experimente („Basalmedium“)

Basalmedium:	DMEM SF (ohne Antibiotikum)
	500 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium

### 3.3.4 Splitten der Zellen

Nach Erreichen der Konfluenz (Monolayer) wurde das Komplettmedium aus der Zellkulturflasche mit den adhärenten RGC-5 abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit jeweils 10 ml PBS (*Phosphate buffered saline*: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, pH 8,0) gespült, um Reste des serumhaltigen Mediums zu entfernen.

Daraufhin wurden die RGC-5 mit auf 37°C angewärmten 0,05% Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe) benetzt. Durch diese Behandlung lösten sich die Zellen unter Mikroskopkontrolle von der Plastikoberfläche der Zellkulturflasche ab. Die Trypsinisierung wurde sofort nach Abrunden der Zellen und deren Ablösung von der Oberfläche durch die Zugabe von 5 ml serumhaltigem Komplettmedium abgestoppt.

Diese Zellsuspension wurde anschließend in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und über 5 Minuten bei Raumtemperatur (20°C) mit 1000 Upm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und verworfen. Das verbliebene Zellpellet ist durch Zugabe frischen Komplettmediums und mehrmaligem Trituieren resuspendiert worden.

Für das Ausdünnen („Splitten“) der Zellen wurden 10 ml des Komplettmediums in eine frische Zellkulturflasche vorgelegt und ein entsprechendes Aliquot der Zelllösung

hinzugegeben, um die gewünschte Dichte zu erhalten. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig über den Boden der Zellkulturflasche verteilt und anschließend im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre inkubiert.

### **3.3.5 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer**

Um eine genaue Kontrolle des Zellwachstums zu gewährleisten und um für Experimente exakte Zellzahlen vorzugeben, wurden die Zellen vor der Aussaat gezählt. Die Zellzählung erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld, Lauden).

Von der zu untersuchenden Zellsuspension wurden 25 µl abgenommen und mit gleichem Volumen einer 0,08%-igen Trypanblaulösung gemischt. Bereits abgestorbene Zellen wurden durch Trypanblau angefärbt und gingen nicht mit in die Zählung ein (Trypanblauausschluss). In einem ersten Schritt wurde das Deckglas der Neubauer-Zählkammer mit PBS an den Rändern benetzt und auf der Neubauer-Zählkammer befestigt.

Anschließend wurde die Zellsuspension, dessen Zellzahl zu bestimmen war, durch Auf- und Abpipettieren in einen homogenen Zustand überführt und 100 µl dieser Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer gegeben.

Unter dem Mikroskop erfolgte daraufhin das Auszählen von 4 Gruppenquadranten der Neubauer-Zählkammer. Das Volumen eines Gruppenquadrates ist 0,1 µl. Aufgrund der Verdünnung der Zellen durch die Trypanblaulösung im Verhältnis von 1:2 konnte die Zellzahl nach folgender Formel berechnet werden:

$$(Anzahl\ der\ gezählten\ Zellen\ n : 4) \times 10^4 = \text{Zellzahl\ pro\ ml\ Medium}$$

Aus diesem Wert wurde errechnet, welche Menge dieser Zellsuspension eingesetzt werden musste, um eine bestimmte Anzahl von Zellen auszusäen.

### **3.3.6 Zellzahlbestimmung mittels CASY® Cell Counter Model TT**

Mittels des CASY® Cell Counter konnte durch eine weitere Methode die Zellzahl bestimmt werden. Um eine genaue Kontrolle des Zellwachstums zu gewährleisten und um für

Experimente exakte Zellzahlen vorgeben zu können, wurden die Zellen vor der Aussaat gezählt.

Hierzu wurde das Gerät vor Benutzung dreimalig mit *CASY<sup>®</sup>clean*-Lösung gespült. Anschließend wurden 50 µl der Zellsuspension zusammen mit 10 ml *CASY<sup>®</sup>ton*-Puffer in ein Reaktionsgefäß (*CASY<sup>®</sup>cup*) pipettiert. Die Analyse der Anzahl der lebenden Zellen erfolgt im *CASY<sup>®</sup> Cell Counter* nach dem Widerstandsmessprinzip, kombiniert mit einer Pulsflächenanalyse. Zur Messung zog das Gerät die Zellsuspensionslösung aus dem Reaktionsgefäß (*CASY<sup>®</sup>cup*) durch eine Kapillare zwischen 2 Elektroden. Je nach Partikelgröße veränderte sich so das elektromagnetische Feld, da die Teilchen einen vom *CASY<sup>®</sup>ton*-Puffer differierenden Widerstand aufwiesen. Da tote Zellen einen von lebenden Zellen unterschiedlichen Widerstand besitzen, gab der *CASY<sup>®</sup> Cell Counter* daraufhin die Anzahl der lebenden Zellen pro ml Zellsuspension an. Nach Beendigung der Zellzahlbestimmung wurde das Gerät nochmals dreimalig mit *CASY<sup>®</sup>clean*-Lösung gespült.

### **3.3.7 Aussähen der Zellen auf 96-Well-Platten**

Alle Experimente mit den RGC-5 wurden in 96-Well-Platten durchgeführt.

Um die Adhäsion der Zellen am flachen Plastikboden der einzelnen Kavitäten zu verbessern, wurde der Boden mit Poly-L-Lysin benetzt und für 24 Stunden bei 4°C inkubiert, bevor die Zellsuspensionen in die einzelnen Wells gegeben wurden.

Nach Bestimmung der Zellkonzentration in der zu verwendenden Zellsuspension wurde diese mit serumhaltigem Komplettmedium so verdünnt, dass sich nach der Aussaat von jeweils 100 µl pro Kavität dieser Zellsuspension je 50000 RGC-5 in jedem Well befanden.

Die Platten wurden daraufhin für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre inkubiert, um die Adhärenz der Zellen zum Plastikboden und den Eintritt der RGC-5 in einen normalen Stoffwechsel zu ermöglichen. Weiterhin bildete sich in dieser Zeit eine Konfluenz (Monolayer) der Zellen aus.

### 3.3.8 Differenzierung der RGC-5

#### 3.3.8.1 Differenzierung mittels Succinyl-Concanavalin A

Bei einigen Experimenten erfolgte zuvor die Behandlung der RGC-5 mittels Succinyl-Concanavalin A (sConA) (Sigma, Taufkirchen), welches eine Differenzierung der RGC-5 induzieren sollte [modifiziert nach Krishnamoorthy, 2001].

Hierzu wurden, nach Absaugen des serumhaltigen Komplettmediums, die Zellen mit jeweils 100 µl PBS (*Phosphate buffered saline*: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, pH 8,0) pro Well gespült, um mögliche Reste des serumhaltigen Mediums zu entfernen. Im Anschluss daran wurden 100 µl des serumfreien Basalmediums pro Well hinzugegeben und die Zellen wurden für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre inkubiert.

Nach 24 Stunden wurde das serumfreie Basalmedium aus den Zellkulturflaschen mit den adhärenten Ganglienzellen abgesaugt und durch Zugabe von je 100 µl Succinyl-Concanavalin A (sConA)-haltigem DMEM 10% FBS ersetzt. Je nach Versuch wurden sConA-Konzentrationen von 50 µg/ml, 100 µg/ml bzw. 150 µg/ml verwendet. Zur Ausdifferenzierung der RGC-5 wurden die Zellen nun für 7 Tage mit der jeweiligen sConA-Konzentration in DMEM 10% FBS kultiviert, wobei alle 2 Tage das sConA-haltige Medium gewechselt wurde.

Nach Abschluss dieser Behandlung wurde die sConA-Komplettmedium-Lösung abgesaugt, die Zellen mit auf 37°C angewärmten 100 µl DMEM pro Well gespült und die RGC-5 für weitere 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre mit je 100 µl serumfreiem Basalmedium pro Well inkubiert.

Nach Abschluss dieser Behandlung konnten die jeweiligen Experimente durchgeführt werden.

#### 3.3.8.2 Differenzierung mittels Staurosporin

Neben der Ausdifferenzierung der RCG-5 zu postmitotischen retinalen Ganglienzellen mittels sConA, wurde die Differenzierung der RGC-5 auch mittels des unspezifischen Proteinkinaseinhibitors Staurosporin durchgeführt [modifiziert nach Frassetto, 2006].

Hierzu wurde das serumhaltige Komplettmedium abgesaugt und die Zellen jeweils mit auf 37°C angewärmten 100 µl DMEM pro Well gespült, um Reste des serumhaltigen Mediums zu entfernen. Anschließend wurden 100 µl 1 µM Staurosporin in DMEM pro Well hinzugegeben

und die Zellen über eine Zeitspanne von 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre inkubiert. Die Staurosporin-DMEM-Lösung wurde daraufhin abgesaugt, die RGC5-Zellen wieder mit jeweils 100 µl DMEM pro Well gespült und für weitere 24 Stunden mit DMEM 10% FBS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre inkubiert.

### 3.4 Funktionelle Untersuchungen an den RGC-5

Sämtliche funktionelle *in vitro* Experimente wurden mit RGC-5 durchgeführt. Das Ziel der Versuche war, festzustellen inwiefern die Ausdifferenzierung der RGC-5 mittels sConA bzw. Staurosporin möglich ist und welchen Einfluss verschiedene Substanzen auf die Viabilität der Zellen haben bzw. wie und ob die Viabilität durch die Zugabe von Norrin verändert werden kann.

#### 3.4.1 Bestimmung der Zellviabilität mittels des MTT-Tests

Mit Hilfe des MTT (*(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-bromid)*-Assays wurde der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Viabilität der undifferenzierten wie auch der differenzierten RGC-5 untersucht [modifiziert nach Berridge, 1993].

##### 3.4.1.1 Prinzip des MTT-Zellviabilitätstests

Bei dem MTT-Test handelt es sich um eine quantitative colormetrische Methode um die Viabilität von Zellen durch ihre mitochondriale Stoffwechselaktivität darzustellen.

Das wasserlösliche gelbe Tetrazoliumsalz MTT (*(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-bromid)*) wird zu etwa 10% durch das an der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Enzym Succinat-Dehydrogenase und zu etwa 90% durch NADH und NADPH reduziert. Dabei entstehen wasserunlösliche blaue Formazan-Kristalle. Nach Lösung der entstandenen Formazan-Kristalle kann deren Farbintensität, die direkt proportional zu der Menge des entstandenen Formazan ist, durch Absorptionsmessung quantifiziert werden. Die Aktivität von NADH, NADPH und der Succinat-Dehydorgenase ist abhängig vom Stoffwechselzustand der Zellen und somit ein Indikator für deren Vitalität und letztlich ein Indikator für die Anzahl der vitalen Zellen.

##### 3.4.1.2 Versuchsdurchführung

Zur Durchführung des MTT-Assays wurden die in der Tabelle beschriebenen Lösungen hergestellt (vgl. Tab. 19). Die MTT-Stock-Lösung wurde zusätzlich steril filtriert um eine bakterielle Kontamination der Zellen auszuschließen.

Tab. 19 Lösungen für den MTT-Assay

Lösung	Zusammensetzung
MTT-Stock-Lösung	5 mg/ml MTT in 1x PBS (5 ml Aliquot)
Solubilization-Lösung	19,88 ml DMSO 0,12 ml Essigsäure (100%) 2 g SDS

Für den MTT-Test wurden nach Abschluss der jeweiligen Versuche mit Ende der entsprechenden Inkubationszeiten die 96-Well-Platten kurz aus dem Brutschrank ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre) entnommen, 10 µl (1/10 Kulturvolumen) der sterilen MTT-Stock-Lösung je Well hinzugefügt, anschließend vorsichtig durchmischt und für die Zeitdauer von 60 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5% CO<sub>2</sub> in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre bis zur Bildung der blauen Formazan-Aggregate inkubiert. Die Überstände in den jeweiligen Kavitäten wurden im Anschluss daran vorsichtig abgesaugt und 100 µl der Solubilization-Lösung je Well zur Auflösung der Formazan-Aggregate zugegeben. Die Platten wurden daraufhin für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für weitere 5 Minuten auf den Schüttler gestellt.

Die Absorptionsmessung wurde bei 570 nm gegen eine Referenz-Wellenlänge von 630 nm am ELISA-Reader durchgeführt. Als Hintergrundwert wurde die Absorptionsmessung mittels des MTT-Assays an Wells durchgeführt, die lediglich serumfreies Basalmedium enthielten. Die Auswertung erfolgte mittels des Programms Magellan™ (TECAN Group Ltd., Männedorf, Schweiz).

### 3.4.2 Bestimmung der Zellviabilität mittels WST-1-Reagenz

Das „Cell Proliferation Reagent WST-1“ (Roche, Mannheim) stellt eine weitere Methode dar, mit der der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Viabilität von RGC-5 untersucht wurde.

### 3.4.2.1 Prinzip des WST-1-Zellviabilitätstests

Der WST-1-Test ist eine nicht-radioaktive Methode um die Viabilität von Zellen zu quantifizieren. Das wasserlösliche 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 die Vitalität der Zellen.

Gegenüber anderen klassischen Tetrazoliumsalzen, wie beispielsweise MTT, bietet die Analyse mittels WST-1 den Vorteil, dass sein Reaktionsprodukt wasserlöslich und nicht toxisch ist, wodurch die untersuchten Zellen weiterhin verwendungsfähig bleiben.

### 3.4.2.2 Versuchsdurchführung

Für den WST-1-Test wurden, wie oben beschrieben, die ausgesäten Zellen in den 96-Well-Platten verwendet. Nach Durchführung der jeweiligen Versuche wurden mit Ende der entsprechenden Inkubationszeiten die 96-Well-Platten kurz aus dem Brutschrank entnommen. Das Medium wurde aus den einzelnen Wells abgesaugt und mit jeweils auf Raumtemperatur (20°C) angewärmten 50 µl WST-1/ serumfreies Basalmedium (1:10 Verdünnung) pro Kavität ersetzt. Anschließend wurden die Platten wieder im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre für 10 bis 60 Minuten inkubiert.

Die Absorptionsmessung wurde bei 450 nm gegen eine Referenz-Wellenlänge von 690 nm am ELISA-Reader durchgeführt. Als Hintergrundwert für die Erfassung des Spontanumsatzes erfolgte zusätzlich die Absorptionsmessung an Wells die lediglich 50 µl WST-1/ serumfreies Basalmedium (1:10 Verdünnung) pro Kavität enthielten. Dieser Wert wurde bei der Auswertung von den anderen, Zellen enthaltenden Werten abgezogen. Die Auswertung erfolgte mittels des Programms Magellan™ (TECAN Group Ltd., Männedorf, Schweiz).

### **3.5 *In vivo* Experimente**

#### **3.5.1 Haltung der Versuchstiere**

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  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , relative Luftfeuchtigkeit  $55\% \pm 5\%$ , Hell-Dunkelintervall 12 Stunden, Futter und Wasser ad libitum). Die Tiere wurden im Tierstall der Universität Regensburg gehalten.

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Experimente wurden an Bl6/c57 Mäusen aus eigener Zucht durchgeführt.

#### **3.5.2. Anästhesie der Versuchstiere**

Für die Injektion verschiedener Substanzen, wie beispielsweise eine Kombination aus NMDA (Sigma, Taufkirchen) und PBS (Invitrogen, Karlsruhe) oder NMDA und Norrin mit und ohne Dkk-1 (R&D, Wiesbaden), in die Glaskörper der Mausaugen wurden die Tiere kurz mit Diethylether betäubt und anschließend mit 6 bis 8 mg/kg Körpergewicht 2% Xylazin i.m. (Serumwerk Bernburg, Bernburg) und 90 bis 120 mg/kg Körpergewicht 10% Ketamin i.m. (WDT, Garbsen) in tiefe Narkose versetzt.

Nach etwa 10 Minuten trat bei den Mäusen gute Analgesie, Muskelrelaxation und leichte Atemdepression für durchschnittlich 30 Minuten ein. Nach weiteren 120 Minuten waren die Mäuse wieder vollständig erwacht.

Aufgrund der Tatsache, dass Mäuse unter Narkose sehr schnell auskühlen, wurden die Tiere während dieser Zeit mit einer Wärmelampe versorgt.

#### **3.5.3 Intravitreale Injektionen**

Zur besseren Übersicht während der Injektion wurden die Pupillen für 2 Minuten mit 2% Phenylephrin benetzt, was zur Mydriasis der Mausaugen führte. Die Augen wurden anschließend vor der Injektion für 3 Minuten mit jodhaltiger Braunol-Lösung (Braun, Melsungen) in sterilem PBS desinfiziert.

Die Injektion der Substanzen erfolgte mit Hilfe einer 33-Gauge-Nadel (World Precision Instruments, Sarasota, USA), die durch einen dünnen Schlauch mit einer 25 µl Hamiltonpipette (Roth, Karlsruhe) verbunden war.

Hierfür wurde die Nadel am Augenäquator durch die Sklera in Richtung Nervus opticus in den Glaskörper des Mausauges vorgesoben. Daraufhin erfolgte die Injektion von 3 µl der jeweiligen Substanzen.

Nach Abschluss der Injektion wurde die Nadel für etwa 30 Sekunden in dieser Position belassen, um den durch die Injektion verursachten erhöhten intraokularen Druck auszugleichen und so den retrograden Reflux der injizierten Substanzen über den Stichkanal weitgehend zu verhindern.

Nach Entfernung der Nadel aus dem Mausauge wurde dieses mit anti-entzündlicher Isopto-Max-Salbe (Wirkstoff: 1 mg/ml Dexamethason, Neomycinsulfat, Polymyxin-B-Sulfat) (Alcon Pharma GmbH, Freiburg) versorgt und die Tiere nach Erwachen und Regeneration zurück in die Käfige gesetzt.

### **3.5.4 Präparation der Mausaugen und der Sehnerven**

Zum Abschluss der Experimente wurden die Tiere nach Inhalationsnarkose mit Isofluran (Baxter, Unterschleißheim) durch eine zervikale Dislokation getötet.

Anschließend wurden die Augen mitsamt des N. opticus enukleiert und das um das Auge liegende Bindegewebe mittels einer Federschere durchtrennt. Das Auge wurde im Bereich des Durchtritts des N. opticus durch die Sklera mit einer Pinzette gefasst und mit leichtem Zug aus der knöchernen Augenhöhle geborgen. Dabei wurde darauf geachtet, Auge und N. opticus nicht zu beschädigen. Der Sehnerv wurde daraufhin sowohl 1 cm proximal des Auges als auch kurz vor dem Durchtritt durch die Sklera durchtrennt. Die Augen und die 1 cm langen Abschnitte der Nn. optici wurden dann für die Herstellung verschiedener histologischer Schnitte weiterpräpariert und je nach weiterer Verwendung mittels unterschiedlicher Substanzen fixiert.

### **3.5.5 Präparation der Retina**

Nach Enukleation der für die RNA-Isolation aus der Retina bestimmten Mausaugen wurden diese folgendermaßen präpariert. Mit einer Fadenschere erfolgte die zirkuläre Inzesion zur Trennung des vorderen Augenabschnittes hinter dem Ziliarkörper. Nach vorsichtiger Entfernung der Linse aus dem eröffneten Auge wurde der hintere Augenbecher radiär eingeschnitten und ausgebreitet. Mittels Pinzette wurde nun die Retina vorsichtig vom retinalen Pigmentepithel abgelöst und umgehend bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

### 3.6 Histologische Arbeitstechniken

Tab. 20 Reagenzien für die Histologie

Reagenz	Bezugsquelle
Aceton	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-Phenyldiamin	Sigma, Taufkirchen

Tab. 21 Geräte für die Histologie

Geräte	Bezugsquelle
Einbettautomat EM TP	Leica, Wetzlar
Einbettautomat HMP110	Microm, Waldorf
Supercut 2050	Reichert-Jung, Kirchseeon
Ultracut E-Ultramikrotom	Reichert-Jung, Kirchseeon

### 3.6.1 Paraffin-Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten

Die Herstellung von Paraffinschnitten erfolgte für den Nachweis apoptotischer Zellen mittels des *DeadEnd<sup>TM</sup>* Fluorometric TUNEL Systems.

#### 3.6.1.1 Herstellung der Reagenzien

Tab. 22 Ansatz von 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4)

Puffer	Firma	Dosierung
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt	35,6 g in 2000 ml a.d.
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt	13,8 g in 1000 ml a.d.

Tab. 23 Ansatz von 4% Paraformaldehyd

Reagenz	Firma	Dosierung
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt	4,0 g
0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4)		100,0 ml

Bis zur vollständigen Lösung des Paraformaldehyds wurde das Gemisch unter ständigem Rühren auf 75°C im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde der pH-Wert kontrolliert und bei einem pH < 7,0 mit NaOH korrigiert.

#### 3.6.1.2 Durchführung der Paraffin-Einbettung

Für die Einbettung in Paraffin wurden die enukleierten Augen in 4% PFA bei 4°C für mindestens 4 Stunden immersionsfixiert und danach dreimal für 20 bis 30 Minuten mit 0,1 M Phosphatpuffer gespült. Die anschließende Einbettung erfolgte im Einbettautomat HMP110 (Microm, Waldorf) mittels Isopropanol der Konzentrationen 50%, 70%, 80%, 96% und 100%, Xylol 100% sowie abschließend in Paraffin (vgl. Tab. 24).

Tab. 24 Paraffin-Einbettungsprotokoll der Augen

Schritt	Reagenz	Dauer
1	4% PFA	4 – 6 h
2	0,1 M Phosphatpuffer	3 x 20 - 30 Minuten
3	Isopropanol 50%	1 h
4	Isopropanol 70%	1 h
5	Isopropanol 70%	über Nacht
6	Isopropanol 80%	1 h
7	Isopropanol 96%	1 h
8	Isopropanol 96%	2 h
9	Isopropanol 100%	4 x 1 h
10	Xylol 100%	2 x 1,5 h
11	Paraffin	2 h
12	Paraffin	8 h

Daraufhin wurden die eingebetteten Augen auf Holzblöckchen fixiert. Mit Hilfe des Supercut-Mikrotoms 2050 (Reichert-Jung, Kirchseeon) wurden von den Augen Schnitte von etwa 5 µm Dicke hergestellt. Für die weitere Auswertung wurden nur Schnitte verwendet, bei denen der Sehnerv mit angeschnitten war und welche weder Falten noch eine Ablösung der Netzhaut aufwiesen.

### 3.6.2 Epon-Einbettung und Herstellung von Semi-Dünnschnitten

Für die histologische Auswertung der Nn. optici und der Retinae erfolgte die Anfertigung von in Epon-eingebettete Semi-Dünnschnitten.

### 3.6.2.1 Herstellung der Reagenzien

Tab. 25 Ansatz von Cacodylatpuffer (pH 7,2)

Reagenz	Firma	Dosierung
Cacodylsäure	Merck, Darmstadt	20,14 g
H <sub>2</sub> O dest.		in 0,5 l

Tab. 26 Ansatz von EM-Fixans

Reagenz	Firma	Dosierung
Paraformaldehyd 25%	Merck, Darmstadt	10,0 ml
0,2 M Caco-Puffer (pH 7,6)		50,0 ml
a.d.		30,0 ml

Kurz vor Verwendung der EM-Fixans wurde bei einem pH-Wert von 7,4 noch Glutaraldehyd 25% in einer Verdünnung 1:10 zum Ansatz des EM-Fixans zugegeben.

Tab. 27 Ansatz der Stammlösung A

Reagenz	Firma	Dosierung
Glycidether 100	Merck, Darmstadt	62 ml
DDSA	Merck, Darmstadt	100 ml

Tab. 28 Ansatz der Stammlösung B

Reagenz	Firma	Dosierung
Glycidether 100	Merck, Darmstadt	100 ml
MNA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	89 ml

Nach 30-minütiger Durchmischung der Stammlösung A und B mit dem Magnetrührer unter Verschluss durch Parafilm und Vermeidung von Luftblasen erfolgte die Zugabe von 1,5 g DMP-30 Beschleuniger (Serva, Heidelberg). Vor Verwendung des Epons wurde der Ansatz nochmals für 1 Stunde gut durchmischt und mit der Vakuumpumpe entlüftet.

### **3.6.2.2 Durchführung der Epon-Einbettung der Augen und Herstellung von Semidünn schnitten**

Für die Einbettung in Epon wurden die enukleierten Augen in EM-Fixanz (2,5% Paraformaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer) für mindestens 12 Stunden bei 4°C immersionsfixiert, mit Cacodylatpuffer (10,7 g Cacodylsäure in 0,5 l H<sub>2</sub>O; pH 7,2) viermal für jeweils 15 Minuten gespült und dann für weitere 4 Stunden bei 4°C in 0,1 M CaCo-Puffer inkubiert. Die Augen wurden anschließend in 1% Osmiumtetroxid nachfixiert, das Osmium wurde daraufhin durch mehrmaliges Spülen mit Aqua bidest. wieder ausgewaschen und die Augen in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) und mit Propylenoxid zweimal für jeweils 10 Minuten entwässert.

Die Einbettung in Epon (Serva, Heidelberg) erfolgte mit Hilfe eines Einbettautomaten (EM TP Leica, Wetzlar). Es wurden dazu Stammlösung A und Stammlösung B im Verhältnis 1:1 mit 2% Beschleuniger DMP-30 verwendet:

1. Propylenoxid/ Epon 2:1 für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20°C);
2. Propylenoxid/ Epon 1:1 für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20°C);
3. Propylenoxid/ Epon 1:2 für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20°C);
4. 100% Epon für 1 Stunde bei Raumtemperatur (20°C);
5. 100% Epon für mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur (20°C);

Daraufhin erfolgte die Aushärtung im Brutschrank für 2 Stunden bei 30°C und für weitere 48 Stunden bei 60°C.

Von den Augen wurden zunächst Semidünn schnitte (1 µm) angefertigt und lichtmikroskopisch betrachtet. Dabei wurde darauf geachtet, dass für die weitere Auswertung nur Schnitte verwendet wurden, bei denen der Sehnerv mit angeschnitten war und welche weder Falten noch eine Ablösung der Netzhaut aufwiesen.

Tab. 29 Epon-Einbettungsprotokoll der Augen

Schritt	Reagenz	Dauer	Temperatur
1	EM-Fixans	mindestens 12 h	4°C
2	0,1 M CaCo-Puffer (pH 7,4)	4 x 15 Minuten	Raumtemperatur
3	0,1 M CaCo-Puffer (pH 7,4)	4 h	4°C
4	1% Osmiumtetroxid	2 h	4°C
5	Aqua bidest.	Mehrmals	Raumtemperatur
6	Ethanol 50%	2 x 10 Minuten	4°C
7	Ethanol 70%	2 x 10 Minuten	4°C
8	Ethanol 80%	2 x 10 Minuten	4°C
9	Ethanol 90%	2 x 10 Minuten	Raumtemperatur
10	Ethanol 100%	2 x 10 Minuten	Raumtemperatur
11	Propylenoxid	2 x 10 Minuten	Raumtemperatur
12	Propylenoxid/ Epon (2:1)	30 Minuten	Raumtemperatur
13	Propylenoxid/ Epon (1:1)	30 Minuten	Raumtemperatur
14	Propylenoxid/ Epon (1:2)	30 Minuten	Raumtemperatur
15	100% Epon	1 h	Raumtemperatur
16	100% Epon	mindestens 12 h	Raumtemperatur

### 3.6.2.3 Durchführung der Epon-Einbettung der Nn. optici und Herstellung von Semi-Dünn schnitten

Für die Einbettung in Epon wurden die 1 cm langen Nn. optici in EM-Fixanz (2,5% Paraformaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer) für mindestens 12 Stunden bei 4°C immersionsfixiert, mit Cacodylatpuffer (10,7 g Cacodylsäure in 0,5 l H<sub>2</sub>O; pH 7,2) dreimal für jeweils 10 Minuten gespült und anschließend für mindestens 12 Stunden bei 4°C in

Cacodylatpuffer (10,7 g Cacodylsäure in 0,5 l H<sub>2</sub>O; pH 7,2) inkubiert. Die Nn. optici wurden für 2 Stunden in 1% Osmiumtetroxid nachfixiert. Anschließend wurde das Osmium durch mehrmaliges Nachspülen mit Aqua bidest. wieder ausgewaschen. Die Sehnerven wurden dann in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 50%, 70%, 80%, 90% und 100%) zweimal für jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur (20°C) dehydriert. Die Einbettung in Epon (Serva, Heidelberg) erfolgte manuell:

1. Ethanol 100% / Epon 2:1 für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20°C);
2. Ethanol 100% / Epon 1:2 für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20°C);
3. 100% Epon für 1 Stunde bei Raumtemperatur (20°C);
4. 100% Epon für mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur (20°C);

Anschließend erfolgte die Aushärtung im Brutschrank für 2 Stunden bei 30°C und für weitere 48 Stunden bei 60°C.

Tab. 30 **Epon-Einbettungsprotokoll der Nn. optici**

Schritt	Reagenz	Dauer	Temperatur
1	EM-Fixans	mindestens 12 h	4°C
2	0,1 M CaCo-Puffer (pH 7,4)	3 x 10 Minuten	Raumtemperatur
3	0,1 M CaCo-Puffer (pH 7,4)	mindestens 12 h	4°C
4	1% Osmiumtetroxid	2 h	4°C
5	Aqua bidest.	Mehrmals	Raumtemperatur
6	Ethanol 50%	2 x 10 Minuten	Raumtemperatur
7	Ethanol 70%	2 x 10 Minuten	Raumtemperatur
8	Ethanol 80%	2 x 10 Minuten	Raumtemperatur
9	Ethanol 90%	2 x 10 Minuten	Raumtemperatur
10	Ethanol 100%	2 x 10 Minuten	Raumtemperatur
11	Ethanol 100% / Epon (2:1)	30 Minuten	Raumtemperatur
12	Ethanol 100% / Epon (1:2)	30 Minuten	Raumtemperatur

13	100% Epon	1 h	Raumtemperatur
14	100% Epon	mindestens 12 h	Raumtemperatur

Nach der Aushärtung wurden die hergestellten Eponblöcke mit den Nn. optici bis zu 1 mm von den augennahen Enden der Sehnerven getrimmt und anschließend Semidünnschnitte (Schnittdicke 1 µm) mittels des Ultramikrotoms (Leica Ultracut E, Leica Mikrosysteme, Wetzlar) senkrecht zur Längsachse des Sehnervenverlaufs angefertigt.

### 3.6.3 Lichtmikroskopische Färbungen

#### 3.6.3.1 Richardson-Färbung für Epon-Schnitte

Die saggitalen Semidünnschnitte der Augen wurden unter anderem nach Richardson gefärbt.

Tab. 31 Ansatz von 1% Azur II

Reagenz	Dosierung
Azur II	5,0 g
a.d.	500,0 ml

Tab. 32 Ansatz von 1% Methylenblau

Reagenz	Dosierung
Methylenblau	5,0 g
1% Natriumtetraboratlösung	500,0 ml

Hierzu wurde jeweils die gleiche Menge der Lösungen nach Filtration mit der doppelten Menge a.d. in einer dunklen Glasflasche vermischt.

Nach Anfertigung der Semidünnschnitte und Trocknung der selbigen bei 90°C auf den Objektträgern wurde die Färbelösung nach Richardson für 15 bis 30 Sekunden bei 60°C auf

die Schnitte getropft und anschließend mit a.d. gut abgespült [modifiziert nach Romeis, 1989].

Nach erneuter Trocknung wurden die Schnitte mit *Vitro-Clud®* (Langenbrinck, Emmendingen) eingedeckt. Die Objektträger wurden anschließend für 12 Stunden bei Raumtemperatur belassen, um eine ausreichend feste Adhäsion der Deckgläser zu erreichen.

### **3.6.3.2 Fuchsin-Methylenblau-Färbung für Epon-Schnitte**

Eine weitere Methode zur Anfärbung der saggitalen Semidünnschnitte der Augen stellte die Fuchsin-Methylenblau-Färbung dar.

Tab. 33 Ansatz von 0,0125% Fuchsin

Reagenz	Dosierung
Ethanol	75,0 ml
a.d.	125,0 ml
Fuchsin	25,0 mg

Tab. 34 Ansatz von 0,15% Methylenblau

Reagenz	Dosierung
1% Methylenblau	15,0 ml
1% Natriumtetraboratlösung	85,0 ml

Nach Anfertigung der Semidünnschnitte und Trocknung dieser bei 90°C auf den Objektträgern, wurde das gefilterte 0,15% Methylenblau auf die Schnitte getropft. Nach 2-minütiger Einwirkzeit bei 60°C wurden die Schnitte mehrmals mit a.d. gespült, bevor einige Tropfen 0,0125% Fuchsin auf die Schnitte gegeben und diese damit für 25 Sekunden bei 60°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte wieder mehrmals mit a.d. gespült.

Nach Trocknung wurden die Schnitte mit *Vitro-Clud®* (Langenbrinck, Emmendingen) eingedeckt. Die Objektträger wurden anschließend für 12 Stunden bei Raumtemperatur belassen, um eine ausreichend feste Adhäsion der Deckgläser zu erreichen.

### 3.6.3.3 Paraphenyldiamin-Färbung für Epon-Schnitte

Zur Darstellung der Myelinscheide der Axon der Ganglienzellen im N. opticus wurden diese mittels Paraphenyldiamin eingefärbt.

Tab. 35 Ansatz von 1% Paraphenyldiamin

Reagenz	Dosierung
1,4-p-Phenyldiamin ( $C_6H_8N_2$ ; M = 108,14)	1,0 mg
100% Ethanol (vergällt)	100,0 ml

Die 1%-ige Paraphenyldiamin-Lösung wurde für 3 Tage bei Tageslicht und Raumtemperatur inkubiert, bis sich das 1,4-p-Phenyldiamin vollständig gelöst hatte und die Lösung eine dunkelbraune Farbe annahm [modifiziert nach Schultze, 1972; Tanck, 2004].

Nach Anfertigung der Semidünnschnitte und Trocknung dieser bei 90°C auf den Objektträgern wurden die Schnitte für 3 Minuten bei Raumtemperatur in der 1%-ige Paraphenyldiaminlösung inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mehrmals kräftig mit 100%-igem Ethanol (vergällt) gespült, bis keine Rückstände des 1%-igen Paraphenyldiamin mehr auf den Objektträgern sichtbar waren.

Nach Trocknung wurden die Schnitte mit *Vitro-Clud®* (Langenbrinck, Emmendingen) eingedeckt und für 12 Stunden bei Raumtemperatur belassen, um eine ausreichend feste Adhäsion der Deckgläser zu erreichen.

### 3.6.4. *DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System*

Zum Nachweis apoptotischer Neurone in der Retina wurde das *DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System* (Promega, Mannheim) verwendet.

#### 3.6.4.1 Prinzip des *DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System*

Bei dem *DeadEnd™ Fluorometric TUNEL* (*TdT-mediated dUTP Nick-End-Labeling*) System handelt es sich um ein Assay zum histologischen Nachweis apoptotischer Zellen. Durch Apoptose wird die DNA mittels aktiverter endogener Endonukleasen [Schwartzman, 1993]

in Multimere mit 180 bis 200 bp Länge gespalten. Das beim *DeadEnd<sup>TM</sup>* Fluorometric TUNEL System zugegebene rekombinante Enzym Terminale-Deoxynukleotidyl-Transferase (*rTdT*) bindet an die 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente und katalysiert die Bindung des ebenfalls zugegebenen Fluorescein-12-dUTP an das 3'OH-Ende der DNA-Fragmente [Gavrieli, 1992]. Die daraus entstehenden Fluorescein-12-dUTP-markierten DNA-Fragmente können daraufhin mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden (Abb. 6).

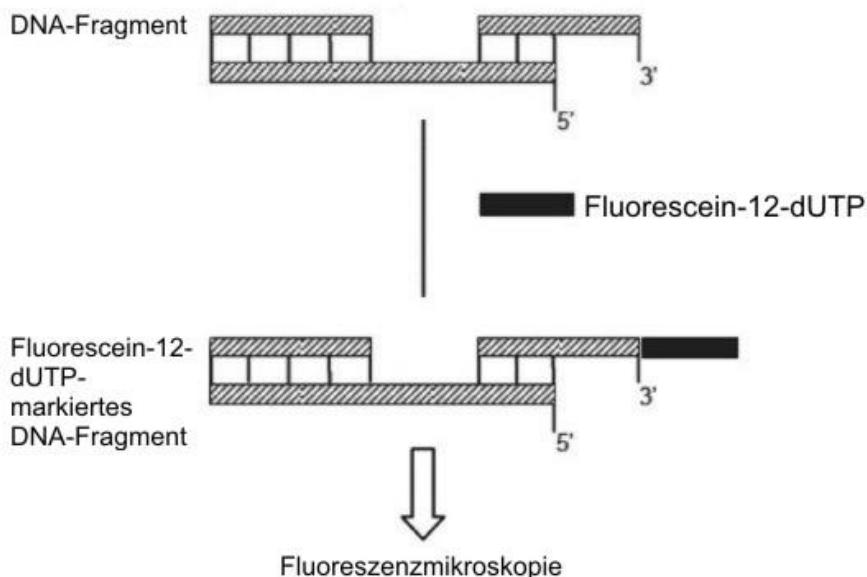


Abb. 6 Prinzip des *DeadEnd<sup>TM</sup>* Fluorometric TUNEL Systems [modifiziert nach Huerta, 2007]

Je intensiver die Färbung der jeweiligen Zellen bei der Fluoreszenzmikroskopie ist, desto mehr DNA-Fragmente sind in der Zelle vorhanden. Im Vergleich zu den Zellen in einem stabilen Zellzyklus mit nur einem freien 3'-OH-DNA-Ende leuchten die apoptotischen Zellen mit ihren vielen DNA-Multimeren kräftig.

### 3.6.4.2 Herstellung der benötigten Lösungen

Vor Durchführung des Apoptose-Assays wurden alle benötigten Lösungen hergestellt.

Tab. 36 Ansatz von 1x PBS (pH 7,4)

Reagenz	Dosierung
NaCl	137 mM (8,006 g)
KCl	2,68 mM (0,200 g)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47 mM (0,200 g)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,10 mM (1,442 g)
a.d.	1,0 l

Tab. 37 Ansatz von 0,85% NaCl

Reagenz	Dosierung
NaCl	1,7 g
a.d.	200 ml

Tab. 38 Ansatz des Proteinase K-Puffers

Reagenz	Dosierung
Tris-HCl (pH 8,0)	100 mM (12,11 g/l)
EDTA	50 mM (18,61 g/l)

Tab. 39 Ansatz der Proteinase K-Lösung

Reagenz	Firma	Dosierung
Proteinase K	Promega, Madison (USA)	2 µl
Proteinase K-Puffer		998 µl

### 3.6.4.3 Versuchsdurchführung

Nach Trocknung und Adhäsion der 5 µm-dicken Paraffinschnitte auf den Objektträgern wurden diese wie folgt behandelt [modifiziert nach *DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System Technical Bulletin, 2007*] (vgl. Tab. 40).

Tab. 40 Vorbehandlung des Paraffin-eingebetteten Gewebes

Schritt	Reagenz	Dauer	Temperatur
1	Xylol	2x 10 Minuten	Raumtemperatur
2	Ethanol 100%	2 x 10 Minuten	Raumtemperatur
3	Ethanol 96%	2 x 5 Minuten	Raumtemperatur
4	Ethanol 80%	2 x 5 Minuten	Raumtemperatur
5	Ethanol 70%	5 Minuten	Raumtemperatur
6	Ethanol 50%	5 Minuten	Raumtemperatur
7	0,85% NaCl	5 Minuten	Raumtemperatur
8	1x PBS	5 Minuten	Raumtemperatur
9	4% Paraformaldehyd	15 Minuten	Raumtemperatur
10	1x PBS	3 x 5 Minuten	Raumtemperatur
11	Entfernung der Flüssigkeit vom Gewebe durch Abtupfen		
12	20 µg/ml Proteinase K-Lösung	10 Minuten	Raumtemperatur
13	1x PBS	2 x 5 Minuten	Raumtemperatur
14	4% Paraformaldehyd	5 Minuten	Raumtemperatur
15	1x PBS	3 x 5 Minuten	Raumtemperatur

Nach Entparaffinisierung und anschließender Entwässerung wurde die Flüssigkeit vom Gewebe durch Abtupfen entfernt und die jeweiligen Schnitte wurden auf dem Objektträger mittels Fettstift eingerahmt, um ein Verlaufen der bei den weiteren Behandlungen

benutzten Flüssigkeiten zu verhindern. Die darauf folgende Zugabe der Proteinase K-Lösung ermöglichte das Eindringen der weiteren Reagenzien in den Zellkern.

Im Anschluss an die Nachfixierung mit 4% Paraformaldehyd und während der Inkubation der Schnitte mit etwa 100 µl Equilibration-Puffer pro Schnitt für 10 Minuten wurden unter Lichtschutz der RTdT-Inkubationspuffer und die Negativ-Kontrolle hergestellt und auf Eis gekühlt.

**Tab. 41 Ansatz des rTdT-Inkubationspuffers**

Reagenz	Firma	Dosierung
Equilibration-Puffer	Promega, Madison (USA)	45 µl
Nukleotid-Mix	Promega, Madison (USA)	5 µl
rTdT-Enzym	Promega, Madison (USA)	1 µl

**Tab. 42 Ansatz der Negativ-Kontrolle**

Reagenz	Firma	Dosierung
Equilibration-Puffer	Promega, Madison (USA)	45 µl
Nukleotid-Mix	Promega, Madison (USA)	5 µl
a.d.		1 µl

Nach Entfernung des Equilibration-Puffers wurden die Schnitte mit 50 µl rTdT-Inkubationspuffer bzw. mit der Negativ-Kontrolle für 60 Minuten bei 37°C unter Lichtschutz benetzt (vgl. Tab. 43).

Tab. 43 ***DeadEnd<sup>TM</sup>*** Fluorometric TUNEL System

Schritt	Reagenz	Dauer	Temperatur
1	100 µl Equilibration-Puffer	10 Minuten	Raumtemperatur
2	Entfernung der Flüssigkeit vom Gewebe durch Abtupfen		
3	50 µl rTdT-Inkubationspuffer bzw. Negativ-Kontrolle	60 Minuten	37°C (H <sub>2</sub> O gesättigt)

Im Anschluss daran wurden die Schnitte für 15 Minuten mit 2x SSC und dreimal für je 5 Minuten mit 1x PBS unter Lichtschutz gewaschen (vgl. Tab. 44).

Tab. 44 Nachbehandlung des ***DeadEnd<sup>TM</sup>*** Fluorometric TUNEL Systems

Schritt	Reagenz	Dauer	Temperatur
1	2x SSC (Abstoppen der Reaktion)	15 Minuten	Raumtemperatur
2	1x PBS	3 x 5 Minuten	Raumtemperatur

Anschließend wurde die Flüssigkeit von den Objektträgern durch Abtupfen entfernt und die Schnitte mit dem Fluoreszenz-Eindeckmedium DAPI (1:10) (Promega, Madison, USA) eingedeckt.

### **3.7 Mikroskopie**

#### **3.7.1 Lichtmikroskopie**

Zur Bestimmung der Auswirkungen der intravitrealen Injektion von NMDA und/ oder Norrin auf die Ganglienzellen in der Retina sowie auf die Gesamtzahl der Axone des N. opticus wurden 21 Tage nach Injektion sagittale 1 µm dicke Semidünnschnitte der Augen sowie Querschnitte der Nn. optici untersucht.

Die Semidünnschnitte der Augen wurden nach Richardson gefärbt, die Semidünnschnitte der Sehnerven mit Paraphenyldiamin. Mit Hilfe des „*Axio Imager Z1*“-Mikroskops (Carl Zeiss, Göttingen) und der *Axiovision 3.0* Software wurden zunächst Panoramaaufnahmen der Semidünnschnitte erstellt.

Die Auszählung der Axone der Nn. optici erfolgte mit der Zählfunktion „Count-and-Tag“ des Programms *IT ImageTool* (University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA). Zum Ausschluss einer Interpretation durch den Experimentator wurden alle Axone gezählt, auch diejenigen deren Myelinscheide eine intensivere Färbung aufwies.

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.

#### **3.7.2 Fluoreszenzmikroskopie**

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* (University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA) bestimmt.

### **3.8 Datenverarbeitung und Statistik**

Alle dargestellten Experimente sind mindestens zweimal in unabhängigen Mehrfachbestimmungen durchgeführt worden. Dafür verwendete Zellen wiesen unterschiedliche Passagestufen auf.

Alle numerischen Daten wurden zur weiteren Verarbeitung in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Excel (Microsoft® Corporation, Redmond, USA) übertragen.

Die statistische Auswertung, die Ermittlung der beschreibenden Parameter Mittelwert, Varianz und Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) sowie die graphische Darstellung der Daten in Diagrammen erfolgte ebenfalls mittels Microsoft® Excel. Für die endgültige Erscheinungsform wurden die Diagramme mit den Programmen CorelDRAW® 11 (Corel® Corporation, Ottawa, Canada) und Adobe® Photoshop® CS3 Extended Version 10.0 (Adobe Systems Inc., USA) modifiziert.

Die Bewertung der ermittelten Werte erfolgte mit dem zweiseitigen studentischen T-Test. Statistisch signifikante Unterschiede wurden angenommen für  $p < 0,05$  und als hochsignifikant für  $p < 0,001$ . In Diagrammen wurde dies mit „\*“ für  $p < 0,05$  bzw. mit „\*\*“ für  $p < 0,001$  verdeutlicht.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 *In vivo* Experimente

#### 4.1.1 NMDA verursacht eine konzentrationsabhängige Schädigung der retinalen Ganglienzellen

Als Voraussetzung für die Untersuchung der neuroprotektiven Eigenschaften von Norrin auf retinale Ganglienzellen wurde das Modell der exzitotoxischen Schädigung durch NMDA verwendet um Apoptosen der retinalen Ganglienzellen zu induzieren. Hierzu wurde zur Konzentrationsermittlung NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) in den Glaskörper von Mäusen injiziert.

Da NMDA-Rezeptoren im Auge fast ausschließlich in den retinalen Ganglienzellen exprimiert werden, bleiben die anderen Strukturen des Auges durch die NMDA-Injektionen relativ unbeeinträchtigt. Lediglich auf einer Subpopulation amakriner Zellen sind ebenfalls NMDA-Rezeptoren lokalisiert [Jakobs, 2007].

Um zu ermitteln, welche NMDA-Konzentration im Auge einen deutlichen Schaden bei möglichst geringer Konzentration verursacht, wurden verschiedene NMDA-Konzentrationen in Vorversuchen im Vergleich zu PBS getestet.

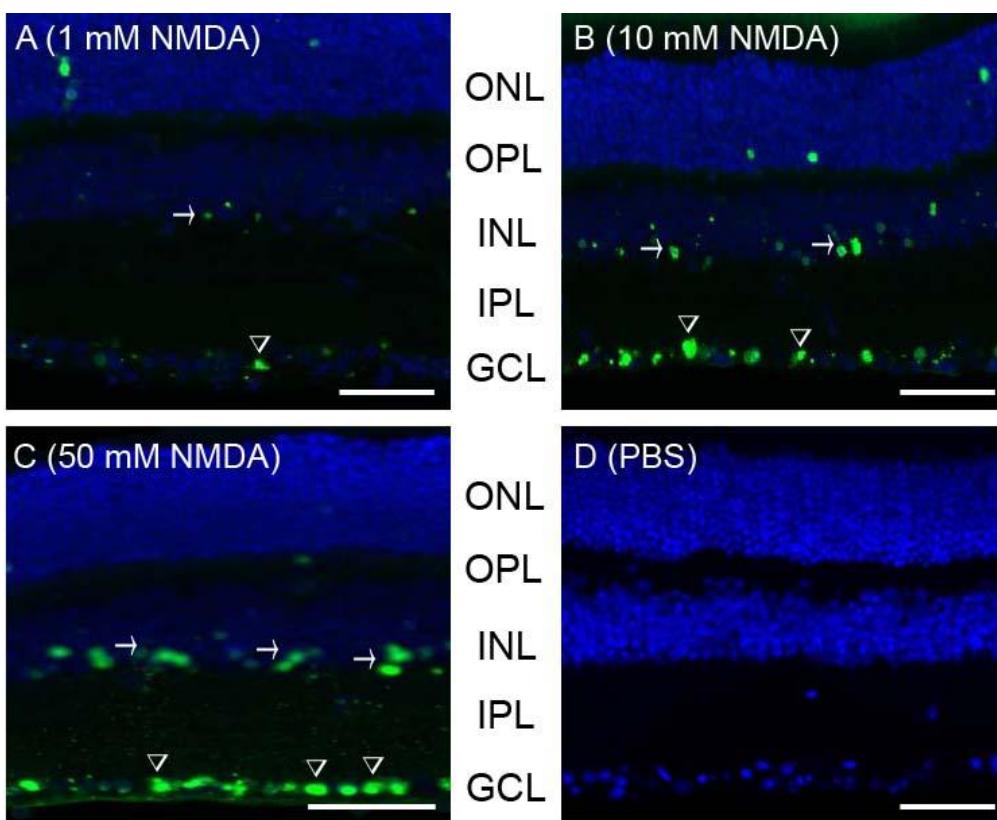
Den Bl6/c57 Mäusen wurden jeweils 3 µl der folgenden Substanzen intravitreal injiziert:

Tab. 45 Injektionsschemata für die konzentrationsabhängige Schädigung retinaler Ganglienzellen

Substanz	
rechtes Auge:	NMDA (1, 10, 50, 100 mM)
linkes Auge:	PBS

Die Auswertung erfolgte 24 Stunden nach Injektion semiquantitativ durch die Markierung apoptotischer Ganglienzellen mittels TUNEL-Analyse.

Die niedrigste NMDA-Konzentration, welche noch einen signifikanten Schaden induzierte, betrug 10 mM NMDA. Bei der Injektion von 1 mM NMDA zeigte sich nur eine sehr geringe Anzahl an TUNEL-positiven Zellen in der retinalen Ganglienzellschicht. Bei den Konzentrationen 50 bzw. 100 mM waren hingegen nahezu alle Zellen der Ganglienzellschicht TUNEL-positiv (Abb. 7).



**Abb. 7 NMDA verursacht eine konzentrationsabhängige Schädigung der retinalen Ganglienzellen.**  
**A-D:** TUNEL-Färbung sagittaler Schnitte der Retina 24 Stunden nach intravitrealer Injektion. Nach der Injektion von 3 µl 1 mM NMDA-Lösung waren fast keine TUNEL-positiven Zellen vorhanden (A). Nach der Injektion von 3 µl 10 mM NMDA-Lösung waren etwa 50% der Zellen im Bereich der Ganglienzellschicht (Pfeilspitze) sowie vereinzelte Zellen der inneren Körnerschicht (Pfeil) TUNEL-positiv (B). Nach der Injektion von 50 mM NMDA-Lösung zeigten fast alle Zellen in der Ganglienzellschicht eine Fluoreszenz der Zellkerne (C). Im Vergleich dazu fand sich nach der Injektion von 3 µl PBS als Kontrolle keine Färbung in der Ganglien- bzw. inneren Körnerschicht (D). ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht. grün: TUNEL-positive Zellen, blau: DAPI-Färbung, Messbalken: 25 µm.

Da das Ziel der Arbeit der Nachweis eines protektiven Effekts durch Norrin war, sollte ein deutlicher aber kein vollständiger Verlust der retinalen Ganglienzellen induziert werden. Deswegen wurde für alle weiteren *in vivo* Experimente jeweils 3 µl einer 10 mM NMDA-Lösung zur Injektion in die Glaskörper verwendet.

#### **4.1.2 Norrin reduziert den NMDA-induzierten exzitotoxischen Verlust von retinalen Ganglienzellen**

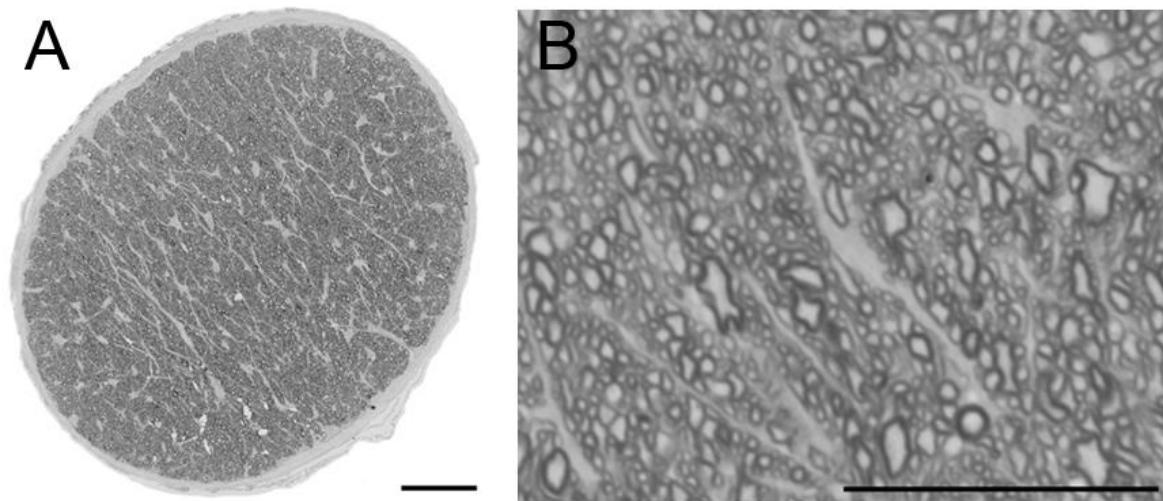
Um zu untersuchen, ob Norrin einen Effekt auf die durch NMDA geschädigten Ganglienzellen hat, wurde Mäusen in das eine Auge je 3 µl 10 mM NMDA in Kombination mit 5 ng/µl Norrin und in das Partnerauge lediglich 3 µl 10 mM NMDA intravitreal injiziert. 21 Tage nach dieser Behandlung wurden die Augen zusammen mit den Nn. optici entnommen und zur weiteren Auswertung präpariert. Ein Teil dieser Experimente erfolgte dabei in Kooperation mit Frau Dr. Roswitha Seitz.

##### **4.1.2.1 Der durch Norrin verminderte NMDA-vermittelte Verlust von retinalen Ganglienzellen spiegelt sich in einer erhöhten Anzahl an Axonen im Sehnerv wieder**

Der Sehnerv ist neben Stützgewebe und Kapillaren hauptsächlich aus parallel angeordneten, von den retinalen Ganglienzellen ausgehenden, myelinisierten Axonen aufgebaut. Aufgrund der Tatsache, dass jede retinale Ganglienzelle nur jeweils ein Axon besitzt, verhält sich die Anzahl der Axone im Sehnerv identisch zu der Anzahl der retinalen Ganglienzellen in der Netzhaut. Daraus ergibt sich, dass die beispielsweise durch NMDA-vermittelte Abnahme der retinalen Ganglienzellen aufgrund apopototischer Prozesse innerhalb eines Zeitraumes von 21 Tagen zur identischen Verringerung der Anzahl der Axone des N. opticus führt.

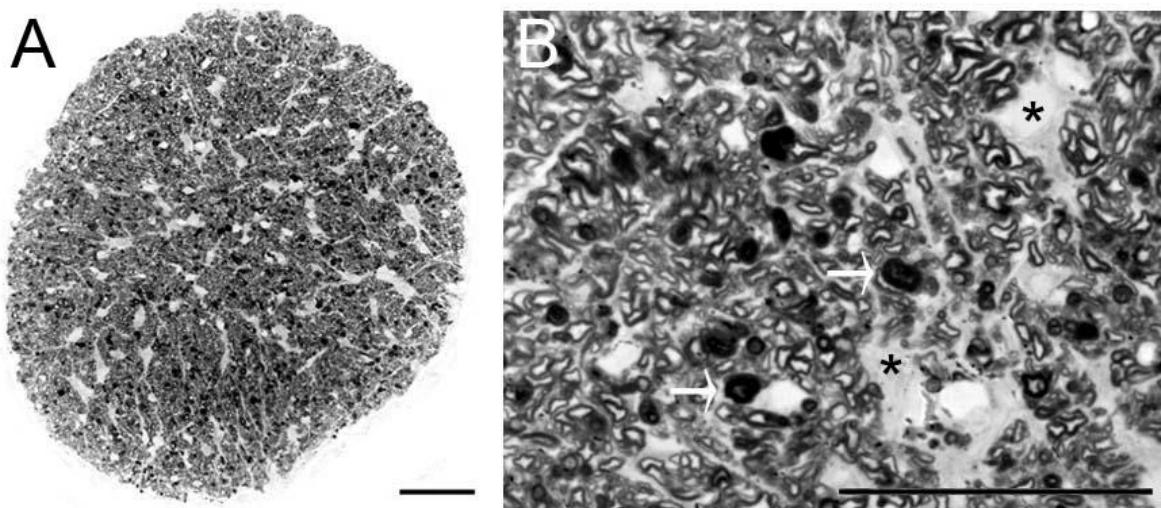
Zur Quantifizierung des Umfangs der protektiven Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen wurden in den folgenden Versuchen die Gesamtzahl der Axone im N. opticus nach NMDA-Injektion mit und ohne Norrin bestimmt. Dazu wurden senkrecht zur Längsachse angefertigte Semidünnschnitte der Nn. optici mittels Paraphenyldiamin angefärbt und lichtmikroskopisch betrachtet. Als Kontrolle wurde darüber hinaus zusätzlichen Mäusen lediglich PBS intravitreal injiziert, um die Anzahl der Axone ohne NMDA-Behandlung abschätzen zu können.

Nach Behandlung mit PBS zeigte sich das Bild eines gesunden N. opticus, dessen Axone regelmäßig und eng beieinander lagen. Das gliale Stützgewebe nahm einen sehr geringen Anteil am gesamten Sehnerv an. Die Myelinscheiden der Axone stellten sich gleichmäßig gefärbt und intakt dar (Abb. 8).



**Abb. 8 Exemplarischer sagittaler Semidünnsschnitt eines N. opticus von einem mit PBS behandelten Auge. A; B:** 21 Tage nach intravitrealer Injektion von 3 µl PBS stellte sich die lichtmikroskopische Morphologie des N. opticus unauffällig dar. Die axonalen Myelinscheiden erschienen gleichmäßig gefärbt und intakt. Die Anzahl der Axone des Sehnervs betrug in etwa 42000. Messbalken: A: 50 µm; B: 25 µm.

Im Gegensatz dazu zeigten die Sehnerven von mit NMDA behandelten Augen zahlreiche und großflächige gliale Narbenfelder (Sterne in Abb. 9), welche auf abgelaufene Umbauprozesse der Sehnerven, hervorgerufen durch die Degeneration der retinalen Ganglienzellen und letztlich derer Axone, hindeuten. Neben einem massiven Verlust an Axonen, verglichen mit den PBS-behandelten Augen, fand sich desweiteren eine Vielzahl von intensiv mit Paraphenyldiamin angefärbten, im Durchmesser stark vergrößerten, Axonen (Abb. 9).



**Abb. 9 Exemplarischer sagittaler Semidünnsschnitt eines N. opticus von einem mit NMDA behandelten Auge. A; B:** 21 Tage nach intravitrealer Injektion von 3 µl 10 mM NMDA zeigte sich die lichtmikroskopische Morphologie des N. opticus durch großflächige gliale Narbenfelder (Sterne) und intensive Anfärbung der axonalen Myelinscheiden (Pfeil) stark verändert. Des Weiteren fiel der massive Verlust an Axonen im N. opticus auf. Messbalken: A: 50 µm; B: 25 µm [Abbildungen modifiziert aus Seitz, 2010].

Im Vergleich dazu fand sich bei den Sehnerven, deren Augen eine Kombination aus 10 mM NMDA und 5 ng/µl Norrin injiziert wurde, schon bei der näheren lichtmikroskopischen Betrachtung ein wesentlich kleinerer Anteil an glialen Narbenfeldern und ein geringerer Verlust an Axonen. Wie auch bei den nur mit NMDA behandelten Augen zeigte sich bei manchen Axonen eine intensivere Anfärbung der Myelinscheiden. Die betroffenen Axone der NMDA/ Norrin behandelten Augen waren im Vergleich dazu jedoch zahlenmäßig weit unterlegen (Abb. 10).

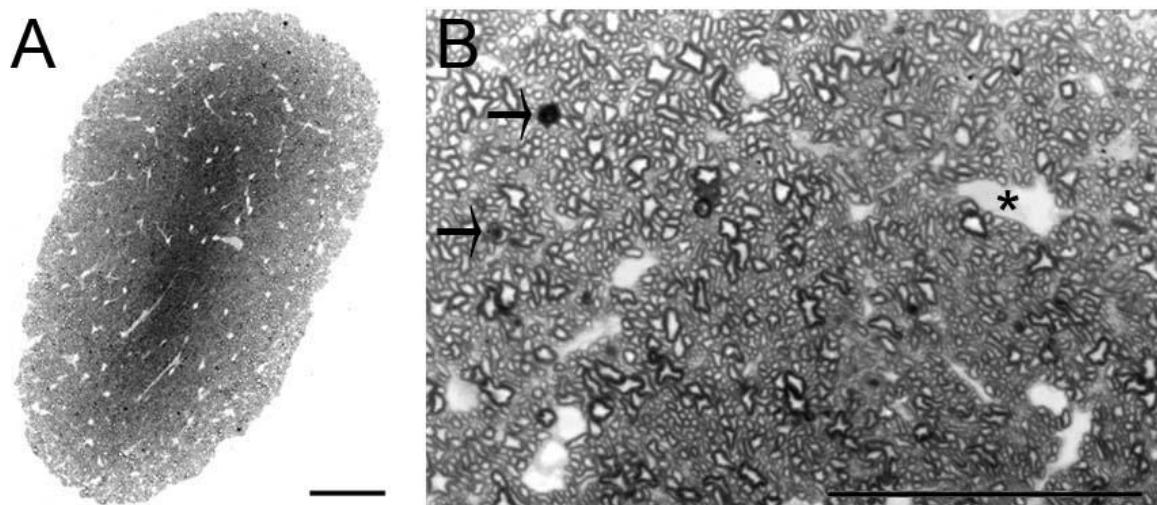
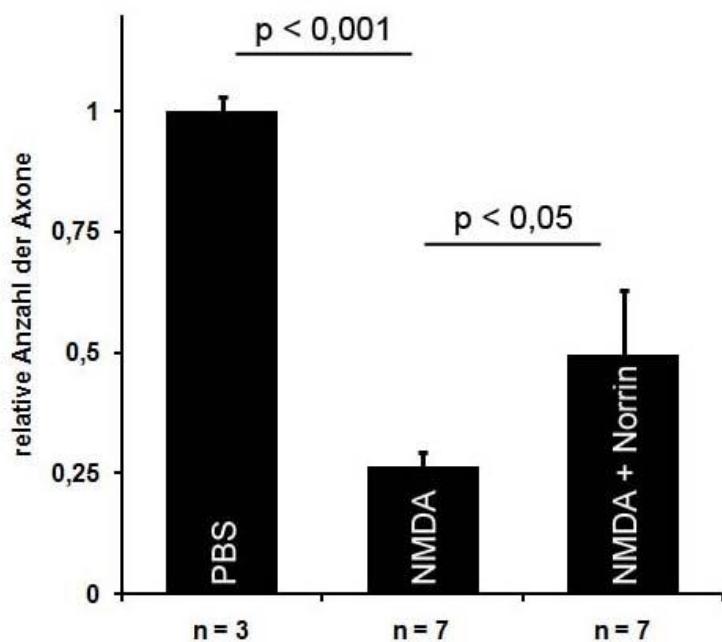


Abb. 10 Exemplarischer sagittaler Semidünnschnitt eines N. opticus von einem mit NMDA und Norrin behandelten Auge. A; B: 21 Tage nach intravitrealer Injektion von 3 µl 10 mM NMDA kombiniert mit 5 ng/µl Norrin fielen lichtmikroskopisch vereinzelte gliale Narbenfelder (Stern) im N. opticus und einige Axone mit einer intensiv angefärbten Myelinscheide (Pfeil) auf. Messbalken: A: 50 µm; B: 25 µm [Abbildungen modifiziert aus Seitz, 2010].

Zur Quantifizierung des unterschiedlichen Schadensausmaßes wurde die gesamte Anzahl der Axone in allen drei Versuchsgruppen bestimmt. Dazu wurde aufgrund der Tatsache, dass die retinalen Ganglienzellen nicht gleichmäßig in der Retina verteilt sind, alle Axone in den einzelnen Nn. optici gezählt und die absolute Anzahl miteinander verglichen. Dabei enthielten Sehnerven von nur mit PBS injizierten Augen eine Gesamtzahl von etwa 42000 Axonen. Bei den Nn. optici, welche 21 Tage nach intravitrealer NMDA-Injektion ausgewertet wurden, sank die Zahl der Axone pro Sehnerv auf etwa 11000, was einer Reduktion des Ausgangswertes bei mit PBS behandelten Augen auf etwa 25% entsprach. Bei gleichzeitiger Injektion von NMDA und Norrin fanden sich noch etwa 20000 Axone in jedem Sehnerv. Dies bedeutete, verglichen mit alleiniger intravitrealer NMDA-Injektion, eine um etwa 85% höhere Überlebensrate der Axone in den zusätzlich mit Norrin behandelten Augen. Dieser durch Norrin hervorgerufene Effekt sowie der durch NMDA verursachte Effekt waren signifikant (Abb. 11).



**Abb. 11 Quantifizierung der Axone der Sehnerven von mit PBS, NMDA bzw. NMDA und Norrin behandelten Augen.** Die Quantifizierung der gesamten Anzahl der Axone zeigte, dass in den Sehnerven der mit NMDA behandelten Augen im Vergleich zu der PBS Versuchsgruppe die Anzahl der Axone auf etwa 25% reduziert waren. Der Vergleich zwischen NMDA und der Kombination aus NMDA und Norrin ergab eine um etwa 85% erhöhte Überlebensrate der Axone in den zusätzlich mit Norrin behandelten Augen. Mittelwert  $\pm$  SEM [Abbildung modifiziert aus Seitz, 2010].

#### 4.1.2.2 Norrin verhindert den Verlust der Perikarya in der Ganglienzellschicht nach NMDA-Schaden

Zur weiteren Absicherung der in den Nn. optici erhaltenen Befunde und um zu überprüfen, ob der Verlust der Axone durch einen Verlust von retinalen Ganglienzellen bedingt ist, wurde 21 Tage nach der intravitrealen Injektion von jeweils 3  $\mu$ l 10 mM NMDA bzw. von der Kombination aus 10 mM NMDA und 5 ng/ $\mu$ l Norrin sagittale Semidünnschnitte der behandelten Augen auf Höhe der Papille angefertigt, mit Fuchsin-Methylenblau angefärbt und die Anzahl der Perikarya der Ganglienzellen über der gesamten Länge der Retina ermittelt.

Schon bei der lichtmikroskopischen Betrachtung konnte die reduzierte Anzahl der Perikarya der Ganglienzellen der NMDA-injizierten Augen, verglichen zu den mit der Kombination aus NMDA und Norrin behandelten Partneraugen, festgestellt werden (Abb. 12).

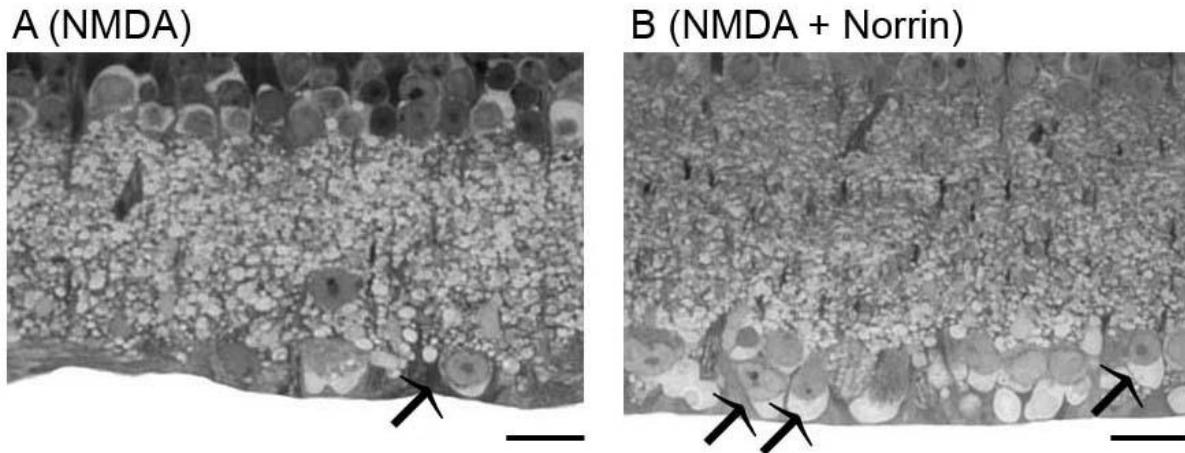


Abb. 12 **Exemplarische sagittale Semidünnschnitte durch die Ganglienzellschicht und die innere plexiforme Schicht der Retina von einem mit 10 mM NMDA (A) bzw. 10 mM NMDA und 5 ng/ $\mu$ l Norrin (B) behandelten Auge.** A; B: 21 Tage nach intravitrealer Injektion von 3  $\mu$ l 10 mM NMDA (A) zeigte sich lichtmikroskopisch eine deutlich geringere Anzahl an Perikarya in der Ganglienzellschicht (Pfeile) der Retina als bei den mit zusätzlichem Norrin injizierten Partneraugen (B). Messbalken: A, B: 10  $\mu$ m [Abbildungen modifiziert aus Seitz, 2010].

Zur Quantifizierung dieser höheren Überlebensrate der mit der Kombination aus NMDA und Norrin behandelten Augen, verglichen mit der alleinigen NMDA-Injektion, wurde die gesamte Anzahl der Perikarya in der Ganglienzellschicht in Bezug zur Gesamtlänge der Retina dargestellt. So wiesen Augen, welche zusätzlich mit Norrin behandelt wurden, etwa 55% mehr retinale Ganglienzellen auf als Augen, denen lediglich NMDA injiziert wurde. Dieser durch Norrin hervorgerufene Effekt war ebenfalls signifikant (Abb. 13).

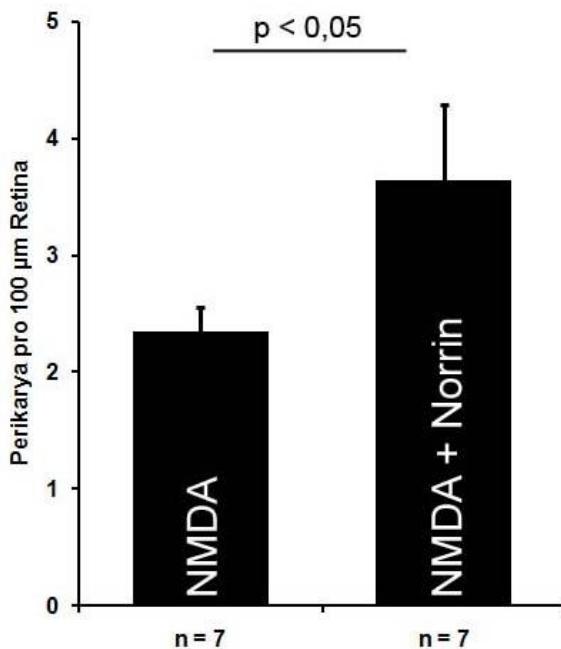


Abb. 13 Quantifizierung der Perikarya der Ganglienzellschicht von mit NMDA bzw. NMDA und Norrin behandelten Augen pro 100 µm Retina. Die Anzahl der Perikarya der Ganglienzellen wurde über die gesamte Zirkumferenz der Retina ermittelt und als Anzahl der Perikarya pro 100 µm Retina wiedergegeben. Bei Augen, die nur mit NMDA behandelt wurden, fanden sich 21 Tage nach der Injektion 2,35 Perikarya pro 100 µm Retina. Erfolgte die kombinierte Injektion von NMDA und Norrin, konnten 3,64 Perikarya pro 100 µm Retina nachgewiesen werden. Daraus ergab sich eine erhöhte Überlebensrate der Ganglienzellen in den zusätzlich mit Norrin behandelten Augen von etwa 55% verglichen zur alleinigen NMDA-Injektion. Mittelwert ± SEM [Abbildung modifziert aus Seitz, 2010].

#### 4.1.2.3 Norrin vermindert den Verlust der Fläche der inneren plexiformen Schicht nach NMDA-Schaden

Die innere plexiforme Schicht besteht aus den Synapsen der bipolaren Zellen und der retinalen Ganglienzellen sowie aus den Kontakten der Horizontalzellen und amakrinen Zellen. Eine mögliche Degeneration der retinalen Ganglienzellen führt auch zu einer Abnahme der Anzahl dieser Synapsen, was sich in der Verringerung der Fläche der inneren plexiformen Schicht widerspiegelt.

Aufgrund dessen wurde neben der Anzahl der Perikarya in der Ganglienzellschicht auch die Fläche der inneren plexiformen Schicht ermittelt. Dazu wurde 21 Tage nach der intravitrealen Injektion von je 3 µl 10 mM NMDA sowie 10 mM NMDA mit 5 ng/µl Norrin in

das Partnerauge sagittale Semidünnschnitte der Augen auf Höhe der Papille angefertigt und mit Fuchsin-Methylenblau angefärbt.

Dabei zeigte sich schon bei der lichtmikroskopischen Betrachtung die wesentlich dünneren inneren plexiformen Schicht der mit NMDA behandelten Augen, im Vergleich zu der Dicke der inneren plexiformen Schicht der mit NMDA und Norrin behandelten Partneraugen (Abb. 14).

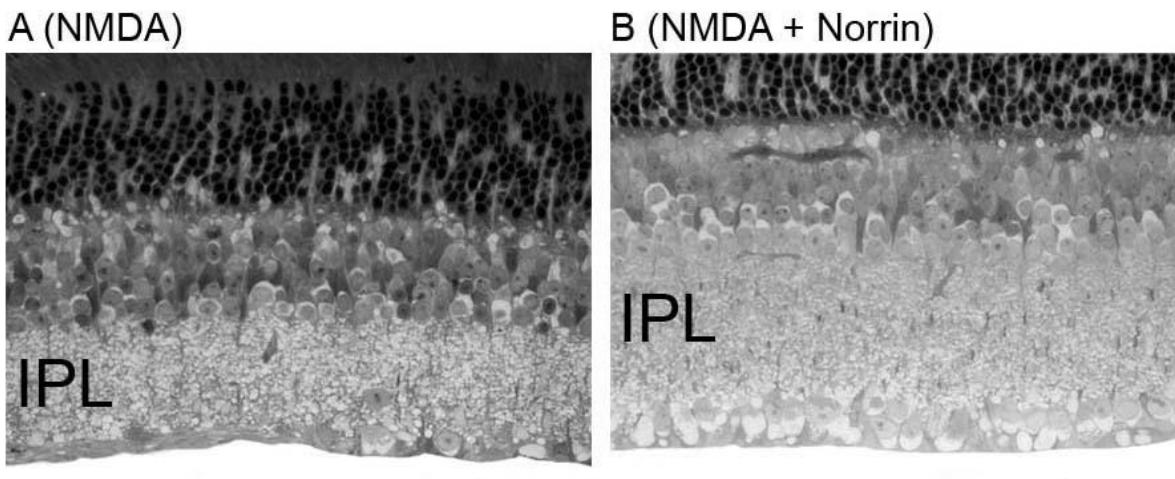
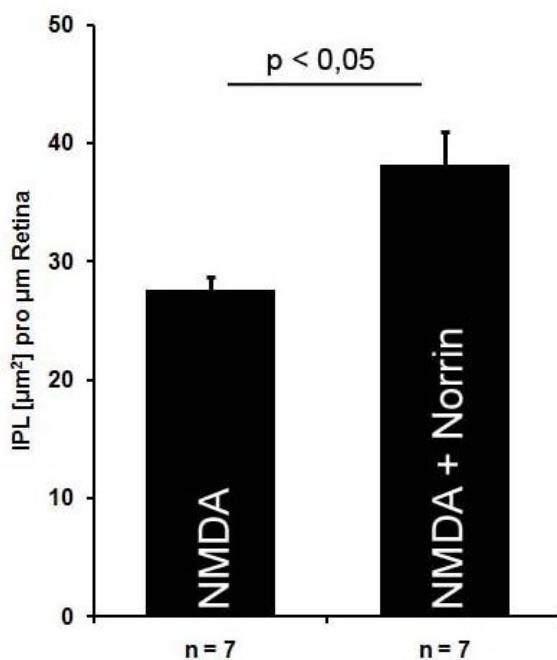


Abb. 14 **Exemplarische sagittale Semidünnschnitte durch die Retina von einem mit 10 mM NMDA (A) bzw. 10 mM NMDA und 5 ng/ $\mu$ l Norrin (B) behandelten Auge. A; B:** 21 Tage nach intravitrealer Injektion von 3  $\mu$ l 10 mM NMDA (A) zeigte sich lichtmikroskopisch eine deutlich dünnerne innere plexiforme Schicht (IPL) als bei dem mit zusätzlichem Norrin injizierten Partnerauge (B). Messbalken: A, B: 25  $\mu$ m [Abbildungen modifiziert aus Seitz, 2010].

Zur Quantifizierung dieses Unterschiedes wurde die Fläche der inneren plexiformen Schicht bestimmt. Dabei zeigte sich nach Ausmessung dieser Fläche, dass die mit der Kombination aus NMDA und Norrin behandelten Augen eine um etwa 38% größere Fläche der inneren plexiformen Schicht aufweisen, als Augen, denen lediglich NMDA injiziert wurde (Abb. 15).

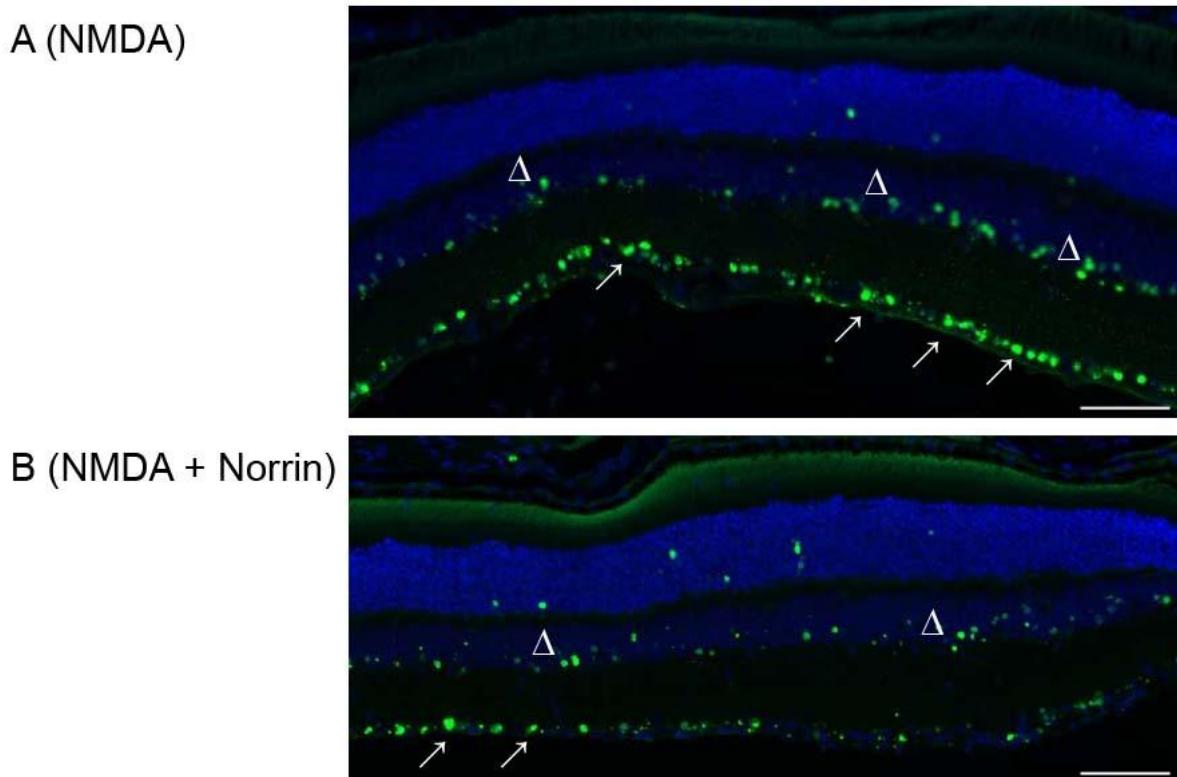


**Abb. 15 Quantifizierung der Fläche der inneren plexiformen Schicht (IPL) von mit NMDA bzw. NMDA und Norrin behandelten Augen pro  $\mu\text{m}$  Retina.** Die Fläche der inneren plexiformen Schicht (IPL) wurde über die gesamte Zirkumferenz der Retina ermittelt und als Fläche der inneren plexiformen Schicht (IPL) pro  $\mu\text{m}$  Retina wiedergegeben. Bei Augen, die nur mit NMDA behandelt wurden, fand sich 21 Tage nach der Injektion eine Fläche der inneren plexiformen Schicht (IPL) von  $27,6 \mu\text{m}^2$  pro  $\mu\text{m}$  Retina. Nach kombinierter Injektion von NMDA und Norrin konnte hingegen eine Fläche von  $38,2 \mu\text{m}^2$  pro  $\mu\text{m}$  Retina ermittelt werden. Daraus ergab sich in den mit zusätzlichem Norrin behandelten Augen eine um etwa 38% größere Fläche der inneren plexiformen Schicht (IPL) verglichen zur alleinigen NMDA-Injektion. Mittelwert  $\pm$  SEM [Abbildung modifiziert aus Seitz, 2010].

#### 4.1.3 Norrin vermindert die durch NMDA induzierte Apoptose der retinalen Ganglienzellen

In den oben beschriebenen Versuchen zeigte sich, dass in den Augen, welchen die Kombination aus 10 mM NMDA und 5 ng/ $\mu\text{l}$  Norrin injiziert wurde, verglichen zu denen mit alleiniger NMDA Behandlung, die retinalen Ganglienzellen wesentlich zahlreicher vorkommen. Zum Nachweis, ob diese größere Anzahl an retinalen Ganglienzellen auf der Hemmung der NMDA-induzierten Apoptose durch Norrin beruht, wurde 10 mM NMDA kombiniert mit 5 ng/ $\mu\text{l}$  Norrin intravitreal injiziert. Im Partnerauge erfolgte lediglich die Injektion von 10 mM NMDA. 24 Stunden nach Injektion wurden die enukleierten Augen fixiert, in Paraffin eingebettet und Sagittalschnitte auf Höhe der Papille angefertigt. Der Nachweis der Apoptose erfolgte mit dem *DeadEnd<sup>TM</sup> TUNEL-Assay*.

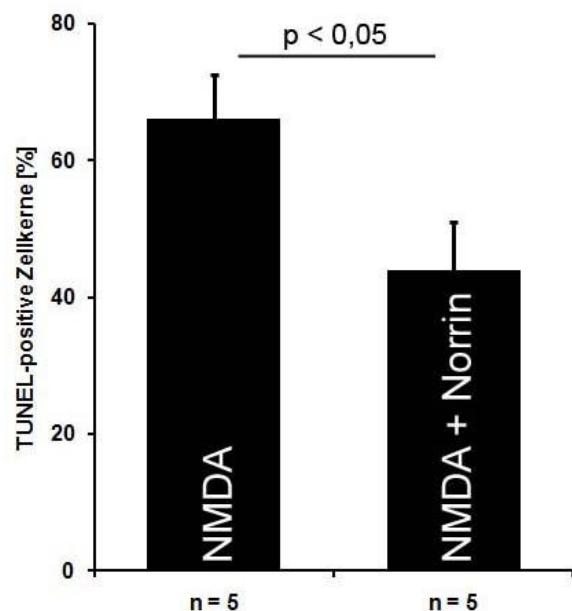
Dabei zeigte sich nach alleiniger NMDA-Injektion eine große Anzahl an mittels des *DeadEnd<sup>TM</sup>* TUNEL-Assays grün markierter, apoptotischer Zellkerne im Bereich der Ganglienzellschicht sowie der inneren Körnerschicht der Retina. Bei der kombiniert durchgeführten intravitrealen Injektion von NMDA und Norrin fand sich im Vergleich dazu ein deutliche geringere Anzahl an apoptotischen Zellkernen in diesen Schichten (Abb. 16).



**Abb. 16 TUNEL-Analyse von sagittalen Semidünnsschnitten durch die Retina von einem mit 10 mM NMDA (A) bzw. 10 mM NMDA und 5 ng/ $\mu$ l Norrin (B) behandelten Auge (TUNEL-Färbung).** A; B: 24 Stunden nach intravitrealer Injektion von 3  $\mu$ l 10 mM NMDA (A) zeigte sich in den mittels TUNEL-Assays gefärbten Schnitten eine deutlich größere Anzahl an apoptotischen, TUNEL-positiven Zellkernen in der Ganglienzellschicht (Pfeile) und der inneren Körnerschicht (Pfeilspitzen). Im Vergleich dazu stellte sich die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen in diesen Schichten bei zusätzlicher Behandlung mit 5 ng/ $\mu$ l Norrin bereits mikroskopisch deutlich reduziert dar (B). grün: TUNEL-positive Zellen, blau: DAPI-Färbung, Messbalken: A, B: 50  $\mu$ m [Abbildungen modifiziert aus Seitz, 2010].

Zur Quantifizierung dieses bereits mikroskopisch sichtbaren Unterschiedes wurde die Anzahl der gesamten Zellkerne in der retinalen Ganglienzellschicht sowie die Anzahl der TUNEL-positiven Zellkerne in dieser Schicht bestimmt und daraus das Verhältnis der apoptotischen

Zellkerne zu der Gesamtzahl der Zellkerne gebildet. Dabei zeigte sich, dass bei alleiniger Injektion von NMDA etwa 66% der Zellkerne TUNEL-positiv waren. Bei der kombinierten Injektion aus NMDA und Norrin hingegen wurde in 44% der Zellkerne eine Apoptose induziert, was eine Reduktion der Apoptosen verglichen zu den mit lediglich NMDA behandelten Augen um etwa 33% entsprach (Abb. 17).



**Abb. 17 Quantifizierung des Verhältnisses von apoptotischen Zellkernen zur Gesamtzahl der Zellkerne in der retinalen Ganglionzellschicht.** Die gesamte Anzahl der Zellkerne der Ganglionzellschicht wurde mittels DAPI-Färbung markiert und über die komplette Zirkumferenz der Retina ermittelt. Ebenso wurden die apoptotischen TUNEL-positiven Zellkerne in der retinalen Ganglionzellschicht ermittelt und daraus dann das Verhältnis von apoptotischen Zellkernen zur gesamten Anzahl der Zellkerne bestimmt. Bei Augen, die nur mit NMDA behandelt wurden, fand sich 24 Stunden nach der Injektion ein Verhältnis von 66% apoptotischen Zellkernen, bezogen auf die Gesamtzahl der Zellkerne in der retinalen Ganglionzellschicht. Erfolgte die kombinierte Injektion von NMDA und Norrin, reduzierte sich dieses Verhältnis auf etwa 44%. Daraus ergab sich eine Reduktion der Apoptosen in der Ganglionzellschicht in den mit zusätzlich Norrin behandelten Augen von etwa 33% verglichen zur alleinigen NMDA-Injektion. Mittelwert  $\pm$  SEM [Abbildung modifiziert aus Seitz, 2010].

#### **4.1.4 Dkk-1 inhibiert den protektiven Effekt von Norrin auf mit NMDA geschädigten retinalen Ganglienzellen**

Zur Analyse, ob Norrin seine protektiven Eigenschaften auf durch NMDA geschädigte retinale Ganglienzellen über die Aktivierung des kanonischen Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs vermittelt, welcher auch im Rahmen der Angiogenese der Retina eine wichtige Rolle spielt [Xu, 2004], wurden weitere Experimente durchgeführt.

Durch diesen Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg wird mittels der Phosphorylierung am Ser9 der Glykogensynthese-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) die Aktivität des  $\beta$ -Catenins reguliert. Durch Glycoproteine der Familie Wnt, die an den Frizzled-Rezeptor und an die Corezeptoren LRP5 und LRP6 binden, kommt es zu einer Inaktivierung der Glykogensynthese-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). In der Folge führt dies zu einer verringerten Rate der Phosphorylierung des  $\beta$ -Catenins und somit zu einer Hemmung der Förderung der neuronalen Degeneration [Gordon, 2006]. Durch den Ligand Dkk-1 kann diese Signalkaskade gehemmt werden. Dabei wirkt Dkk-1 durch die Bindung an die Wnt-Corezeptoren LRP5 und LRP6 als Antagonist [Zorn, 2001].

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde 5  $\mu$ g/ $\mu$ l Dkk-1 zusätzlich zu 10 mM NMDA bzw. zur Kombination aus 10 mM NMDA und 5 ng/ $\mu$ l Norrin ins Partnerauge intravitreal injiziert und 21 Tage nach dieser Behandlung Semidünnsschnitte senkrecht zur Längsachse der Nn. optici angefertigt. Nach Anfärbung der axonalen Myelinscheiden mittels Paraphenyldiamin erfolgte deren lichtmikroskopische Betrachtung. Ein Teil dieser Versuche erfolgte dabei in Kooperation mit Frau Dr. Roswitha Seitz.

Wie schon im vorausgehenden Experiment beobachtet wurde, zeigten die mit der Kombination aus NMDA und Norrin behandelten Augen ein geringes Ausmaß an Degeneration des N. opticus (Abb. 18 A-B). Die gleichzeitige Injektion von NMDA, Norrin und Dkk-1 führte, verglichen dazu, zu einem wesentlich deutlicheren Schaden in den Sehnerven, welcher dem, hervorgerufen durch eine alleinige intravitreale NMDA-Injektion, ähnlich war. Bereits bei der lichtmikroskopischen Betrachtung zeigten sich in diesen Nn. optici zahlreiche, großfläche gliale Narbenfelder sowie ein massiver Verlust an Axonen. Auch fand sich, wie bei alleiniger NMDA-Injektion, eine Vielzahl von intensiv mit Paraphenyldiamin angefärbten, im Durchmesser stark vergrößerten Axonen (Abb. 18 C-D).

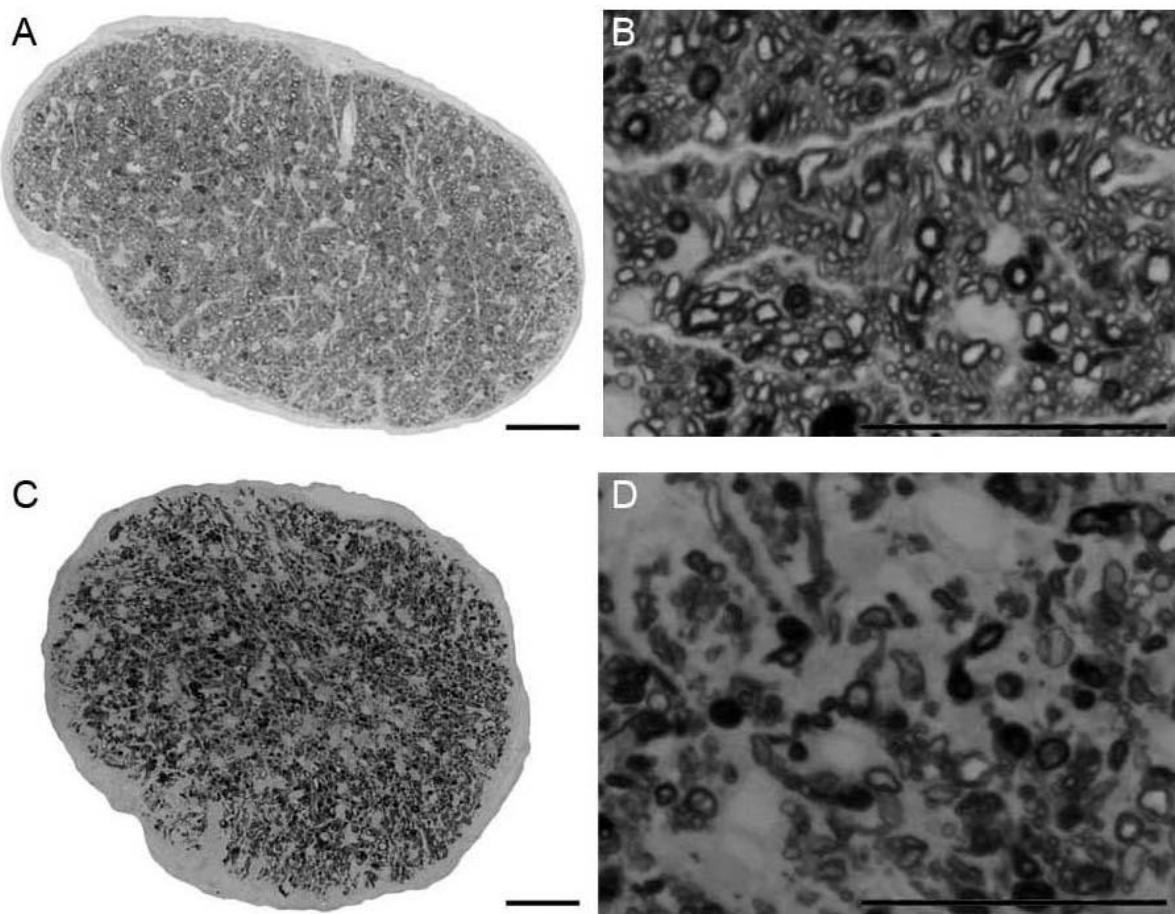


Abb. 18 **Exemplarischer sagittaler Semidünnsschnitt eines N. opticus von einem mit NMDA und Norrin (A; B) und von einem mit NMDA, Norrin und Dkk-1 (C; D) behandelten Auge.** A-D: 21 Tage nach intravitrealer Injektion von 3  $\mu$ l 10 mM NMDA und 5 ng/ $\mu$ l Norrin (A-B) zeigte sich die lichtmikroskopische Morphologie des N. opticus durch vereinzelte gliale Narbenfelder und einige intensiv angefärbte Myelinscheiden moderat verändert. Bei zusätzlicher Injektion von 5  $\mu$ g/ $\mu$ l Dkk-1 (C-D) fielen großflächige gliale Narbenfelder und zahlreiche intensive Anfärbungen der axonalen Myelinscheiden auf. Die Morphologie der Sehnerven dieser mit zusätzlich Dkk-1 behandelten Augen ähnelte dem Aufbau der Nn. optici, welche eine alleinige Injektion von 10 mM NMDA erhalten haben. Des Weiteren fiel in den mit Dkk-1 behandelten Augen der massive Verlust an Axonen im N. opticus auf. Messbalken: A, C: 50  $\mu$ m; B, D: 25  $\mu$ m [Abbildungen modifiziert aus Seitz, 2010].

Zur Quantifizierung des Schadensausmaßes wurde die gesamte Anzahl der Axone in den beiden Versuchsgruppen ermittelt und die absolute Anzahl der Axone in den einzelnen Sehnerven miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass Sehnerven, deren Augen eine Kombination aus NMDA und Norrin injiziert wurde, eine um etwa 69% größere Gesamtzahl

an Axone enthielten als Nn. optici, die mit einer Kombination aus NMDA, Norrin und Dkk-1 behandelt wurden. Der durch Dkk-1 hervorgerufene Effekt war signifikant (Abb. 19). Dies lässt darauf schließen, dass durch die Hemmung des LRP5- und LRP6-Rezeptors durch Dkk-1 der protektive Effekt von Norrin teilweise aufgehoben werden kann und Norrin seine protektiven Eigenschaften durch Aktivierung des kanonischen Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs vermitteln könnte.

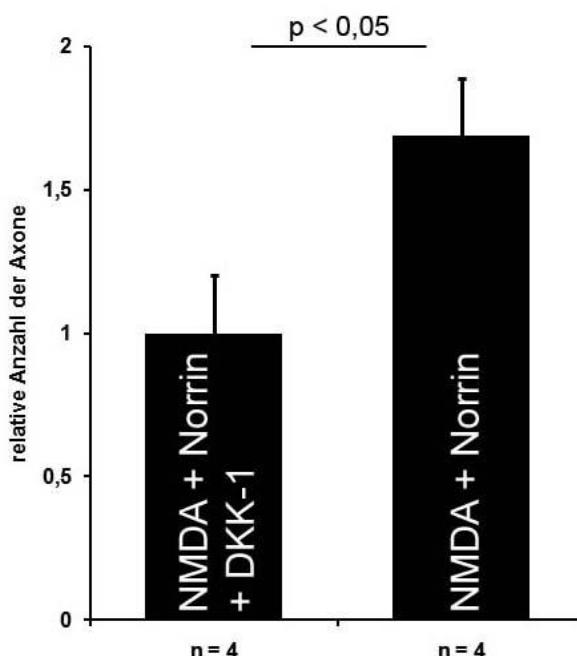


Abb. 19 Quantifizierung der Axone der Sehnerven mit NMDA und Norrin bzw. mit NMDA, Norrin und DKK-1 behandelten Augen. Dabei zeigte sich, dass die Sehnerven, deren Augen mit einer Kombination aus 10 mM NMDA und 5 ng/ $\mu$ l Norrin behandelt wurden, im Vergleich zu denen, welchen eine Kombination aus 10 mM NMDA, 5 ng/ $\mu$ l Norrin und 5  $\mu$ g/ $\mu$ l DKK-1 intravitreal injiziert wurde, eine um etwa 69% größere Anzahl an Axonen enthielten. Mittelwert  $\pm$  SEM [Abbildung modifiziert aus Seitz, 2010].

#### 4.1.5 Norrin führt zur Expression von neuroprotektiven Faktoren in mit NMDA geschädigten Retinae

In den oben beschriebenen Experimenten zeigte sich, dass die zusätzliche intravitreale Injektion von 5 ng/ $\mu$ l Norrin in mit 10 mM NMDA geschädigten Retinae die Anzahl der apoptotischen Ganglienzellen deutlich verringert. Zur weiteren Abklärung des zugrunde

liegenden Mechanismus wurde die Wirkung von Norrin auf die Expression der neuroprotektiven Faktoren in mit NMDA geschädigten Retinae untersucht.

Dabei versteht man unter neuroprotektiven Faktoren Moleküle, welche in der Lage sind, intrazelluläre apoptotische Prozesse zu unterdrücken und so protektiven Einfluss auf retinale Ganglienzellen zu nehmen. Dies geschieht hauptsächlich über die Aktivierung intrazellulärer Überlebenssignalwege und die Hemmung apoptotischer Signalkaskaden [Raff, 1993]. Bei einigen neuroprotektiven Faktoren, wie beispielsweise den Liganden für membrangebundene Tyrosinkinaserezeptoren FGF-2 oder BDNF, ist diese protektive Wirkung auf die Neuronen der Retina bekannt [Chaum, 2003; Lebrun-Julien, 2008].

Um zu untersuchen, ob Norrin einen Einfluss auf die Regulation neuroprotektiver Faktoren in durch NMDA geschädigte Retinae ausübt, wurden 3 µl 10 mM NMDA bzw. 3 µl 10 mM NMDA mit 5 ng/µl Norrin in das Partnerauge intravitreal injiziert. Nach 7 Stunden erfolgte die Isolation der retinalen RNA. Mittels quantitativer real-time RT-PCR wurde daraufhin die Expression von den Splicevarianten 120 und 164 des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF 120, VEGF 164), des *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), des *Lens Derived Growth Factor* (LEDGF), des *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2) und des *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF) untersucht. Ein Teil dieser Experimente erfolgte dabei in Kooperation mit Frau Dr. Roswitha Seitz.

Dabei zeigte sich, mit Ausnahme von VEGF 120 und VEGF 164, eine erhöhte Expression der mRNA der untersuchten neurotrophen Faktoren LEDGF, BDNF, FGF-2 und CNTF nach kombinierter Injektion von NMDA und Norrin im Vergleich zu der alleinigen NMDA-Injektion (Abb. 20).

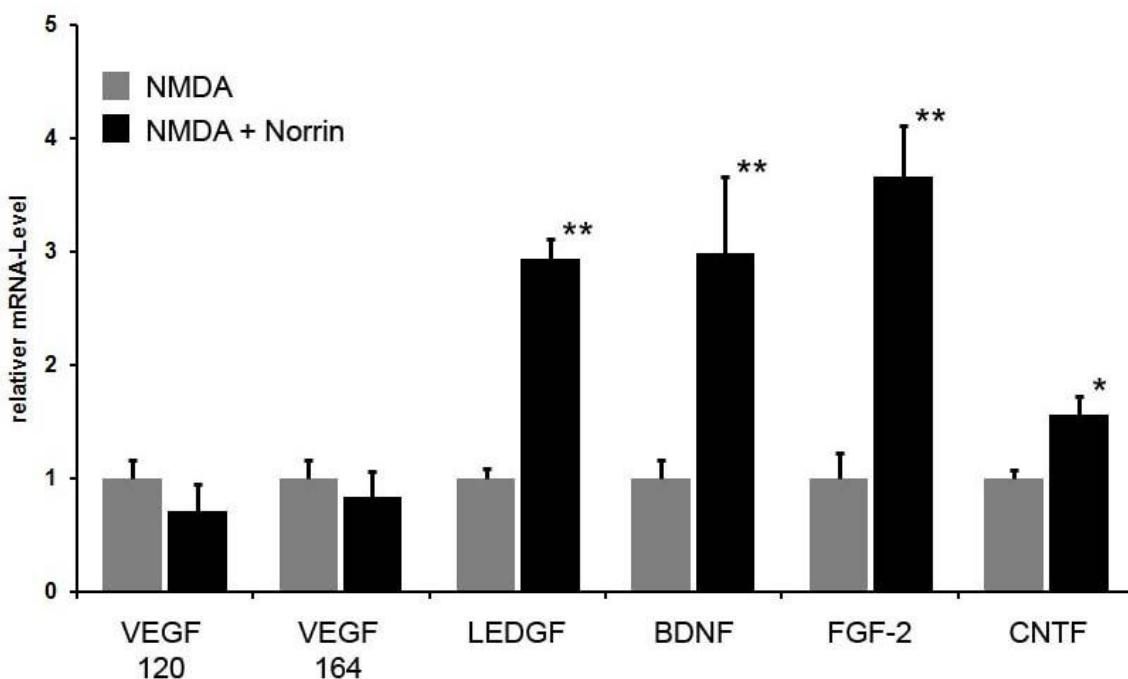


Abb. 20 **Norrin führt zur Expression von neuroprotektiven Faktoren in der durch NMDA geschädigten Retina.** Die Bestimmung des unterschiedlichen Ausmaßes der Expression der neuroprotektiver Faktoren wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR, 7 Stunden nach intravitrealer Injektion von 10 mM NMDA bzw. 10 mM NMDA und 5 ng/ $\mu$ l Norrin in das Partnerauge, untersucht. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Bei LEDGF, BDNF, FGF-2 und CNTF zeigte sich nach der Behandlung mit der Kombination aus NMDA und Norrin eine deutlich erhöhte Expression verglichen zu der bei alleiniger NMDA-Injektion. Bei der Expression der neuroprotektiven Faktoren VEGF 120 und VEGF 164 konnte jedoch kein Unterschied zwischen NMDA und der Kombination aus NMDA und Norrin festgestellt werden. n  $\geq$  4, Mittelwert  $\pm$  SEM, \*: p < 0,05, \*\*: p < 0,001 [Abbildung modifiziert aus Seitz, 2010].

## 4.2 *In vitro* Experimente

In den oben durchgeführten Experimenten am Tiermodell zeigte sich, dass Norrin einen protektiven Effekt auf die durch NMDA geschädigten retinalen Ganglienzellen besitzt. Aufgrund der Hemmung des durch Norrin vermittelten Effekts durch die Zugabe von Dkk-1 ließ sich vermuten, dass die erhöhte Überlebensrate der retinalen Ganglienzellen über den Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg vermittelt wird.

Um zu untersuchen, ob Norrin *in vitro* ebenfalls einen neuroprotektiven Effekt auf isolierte retinale Ganglienzellen nach einem zuvor induzierten Schaden hat, wurden immortalisierte retinale Ganglienzellen aus der Ratte (RGC-5) verwendet [Krishnamoorthy, 2001]. Die Zellen wurden von Neeraj Agarwal (University of North Texas, Forth Worth, TX, USA) zur Verfügung gestellt.

### 4.2.1 Untersuchung von undifferenzierten RGC-5

Ausgangspunkt der protektiven Wirkung von Norrin auf die retinalen Ganglienzellen im Tiermodell war eine zuvor induzierte Apoptose durch die exzitotoxische Schädigung mittels NMDA. Um bei den *in vitro* Versuchen eine Schädigung der RGC-5 zu verursachen, wurden sowohl  $H_2O_2$  als auch Glutamat in verschiedenen Konzentrationen verwendet.

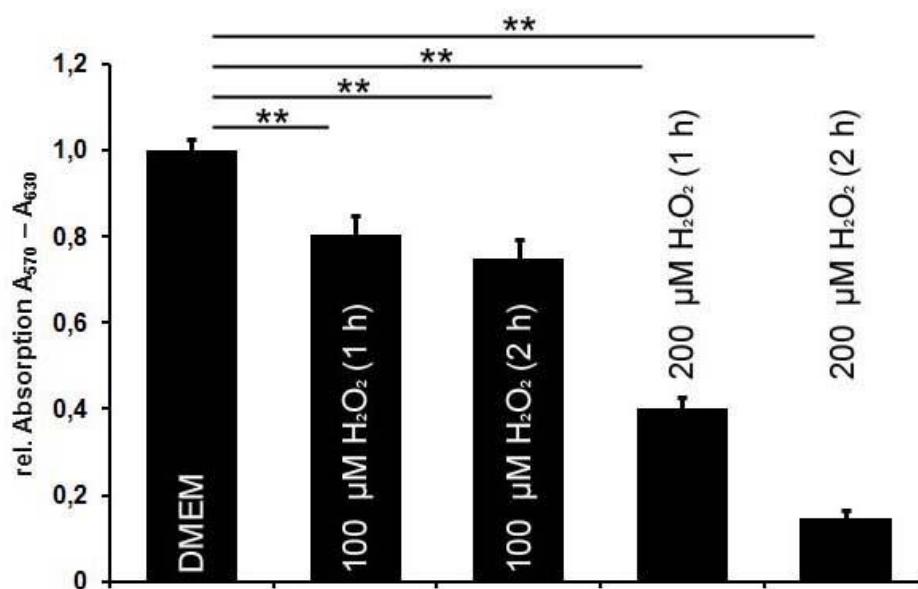
#### 4.2.1.1 Behandlung von undifferenzierten RGC-5 mit $H_2O_2$

Reaktive Sauerstoffverbindungen (*Reactive Oxygen Species*, ROS), wie beispielsweise Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) oder Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), lösen in den jeweils betroffenen Zellen oxidativen Stress aus. Überschreitet die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die zelluläre Antioxidantienkapazität, welche hauptsächlich aus den Enzymen Superoxid-Dismutase und Katalase besteht [Fridovich, 1995], kann dies unter anderem zur Zerstörung von Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen sowie zur Induktion der Apoptose führen. Für die Induktion der Apoptose spielen dabei vor allem der Verlust des Transmembranpotentials an der Mitochondrienmembran sowie die Freisetzung von Cytochrom C in das Zytoplasma und die Abnahme des antiapoptotisch wirkenden Liganden bcl-2 eine Rolle [Davies, 1999]. So konnte in weiteren Arbeiten gezeigt werden, dass auch in RGC-5 mittels Wasserstoffperoxid

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) eine durch oxidativen Stress verursachte Apoptose induziert werden kann [Koriyama, 2009].

Um zu untersuchen, welche Konzentration und Expositionszeit von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nötig ist, um eine deutliche Schädigung der undifferenzierten RGC-5 hervorzurufen, wurden diese nach einer Wachstumsphase von 24 Stunden in DMEM 10% FBS und weiteren 24 Stunden in serumfreiem Medium, um verfälschende wachstumsfördernde Effekte des Serums zu vermeiden, mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für jeweils 1 oder 2 Stunden inkubiert. Nach weiteren 24 Stunden in serumfreiem DMEM wurde die Anzahl der überlebenden RGC-5 mit Hilfe des MTT-Zellviabilitätstests ermittelt. Zum Vergleich wurden Zellen verwendet, welche 24 Stunden in serumfreiem DMEM kultiviert wurden.

Dabei zeigte sich, dass sich die Anzahl der RGC-5 bei einstündiger Inkubation mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> um etwa 20% verringert, verglichen zur Kultivierung in serumfreiem DMEM. Wurden die Zellen für eine weitere Stunde mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt, führte dies zu einer Abnahme der Anzahl der RGC-5 um etwa 25% bezogen auf die Kultivierung in serumfreiem DMEM. Die Inkubation der Zellen mit 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduzierte die Anzahl der RGC-5 nach der ersten Stunde auf etwa 40% und nach einer weiteren Stunde auf etwa 15% verglichen zu unbehandelten Kontrollzellen. Diese Abnahme der Zellviabilität der undifferenzierten RGC-5 durch Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) war signifikant und zeigte, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> einen Zelltod in den RGC-5 induzieren kann (Abb. 21).



**Abb. 21 Quantifizierung der Abnahme von undifferenzierten RGC-5 nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen und Einwirkzeiten von  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** Die MTT Analyse zeigte, dass mit zunehmender Dauer und Konzentration an  $\text{H}_2\text{O}_2$  die Anzahl der RGC-5 deutlich abnimmt. Nach ein- bzw. zweistündiger Inkubation der undifferenzierten RGC-5 mit 100  $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  waren noch 80% bzw. 75% der Zellen vorhanden. Die Inkubation mit 200  $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  über 1 bzw. 2 Stunden führte sogar zu einer Reduktion der Anzahl an undifferenzierten RGC-5 um 60% bzw. 85% bezogen auf die für 24 Stunden in serumfreiem DMEM kultivierten undifferenzierten RGC-5. Gezeigt ist die Zusammenfassung dreier voneinander unabhängigen Experimenten,  $n \geq 28$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, \*\*:  $p < 0,001$ .

#### 4.2.1.2 Behandlung von undifferenzierten RGC-5 mit Glutamat

Ähnlich wie *in vivo* durch NMDA, kann Glutamat *in vitro* durch die Bindung an NMDA-Rezeptoren exzitotischen Schaden induzieren.

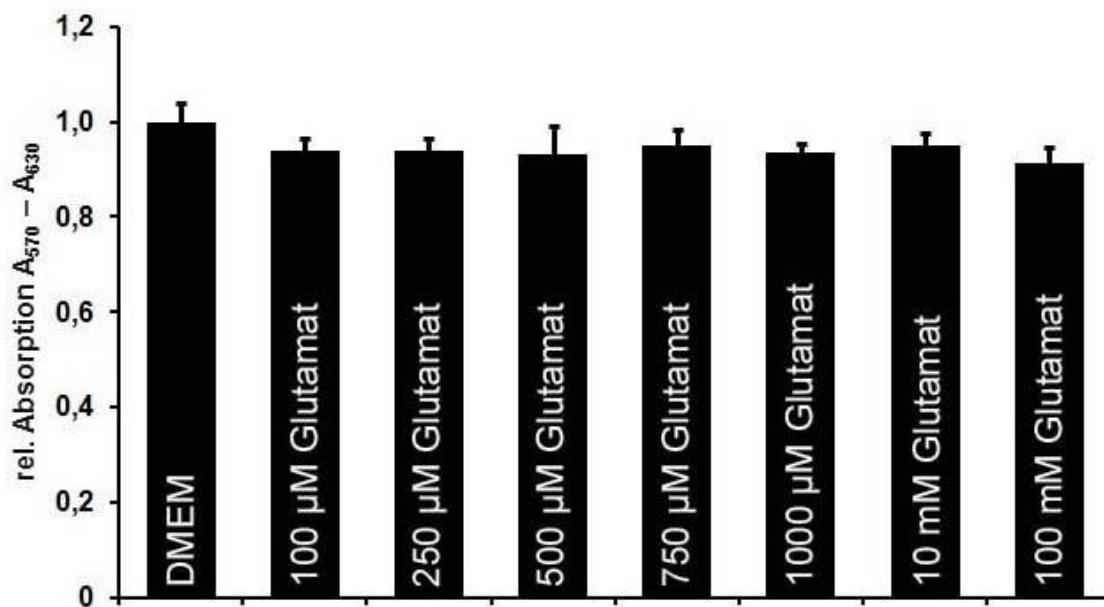
Glutamat spielt *in vivo* vor allem als synaptischer Transmitter der retinalen Ganglienzellen eine bedeutende Rolle. So ist Glutamat unter anderem in der Lage, auf der postsynaptischen Seite ionotrope N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren) zu aktivieren. Dieser NMDA-Rezeptor-Komplex besteht aus einem spannungsabhängigen Kanal, welcher nach Aktivierung mittels Glutamat den Einstrom von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle sowie den Ausstrom von  $\text{K}^+$  aus der Zelle ermöglicht [Coyle, 1993]. Hohe Konzentrationen an Glutamat führen zu einer unnatürlich langen Öffnung dieses Kanals und letztlich zu einem massiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx,

welcher die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), katalysiert durch die NO-Synthase (nNOS), hervorruft. Hierdurch und durch weitere von NO unabhängige Signalwege erfolgt die Aktivierung einer Apoptose-Signalkaskade. Der genaue Mechanismus, der die Induktion einer Apoptose verursacht, ist jedoch noch unbekannt [Haefliger, 2001; Maher, 2005; Shen, 2006].

Um zu untersuchen, welche Glutamat-Konzentration zu einer deutlichen Schädigung der undifferenzierten RGC-5 führt, wurden die RGC-5 nach einer Wachstumsphase von 24 Stunden in DMEM mit 10% FBS und weiteren 24 Stunden in serumfreiem DMEM mit unterschiedlichen Glutamat-Konzentrationen (100 µM, 250 µM, 500 µM, 750 µM, 1 mM, 10 mM bzw. 100 mM) für eine Dauer von 24 Stunden inkubiert.

Zur Quantifizierung der Anzahl der nach dieser Behandlung überlebenden RGC-5 wurde der MTT-Zellviabilitätstest verwendet. Die Anzahl an undifferenzierten RGC-5 Zellen nach 24-stündiger Kultivierung in serumfreiem DMEM wurde zum Vergleich als Ausgangswert verwendet.

Nach Auswertung des MTT-Zellviabilitätstest zeigte sich jedoch, dass verglichen zu den Zellen, welche 24 Stunden in serumfreiem DMEM kultiviert wurden, keine der verwendeten Glutamat-Konzentrationen zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl an undifferenzierten RGC-5 und zur Induktion eines Zelltodes führte (Abb. 22).



**Abb. 22 Unterschiedliche Glutamat-Konzentrationen haben keine Auswirkung auf die Zellviabilität von undifferenzierten RGC-5.** Die Analyse der Zellviabilität mittels des MTT-Tests zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der RGC-5 nach Zugabe unterschiedlicher Glutamat-Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 750  $\mu\text{M}$ , 1 mM, 10 mM bzw. 100 mM) für 24 Stunden im Vergleich zu im gleichen Zeitraum in serumfreiem DMEM kultivierten undifferenzierten RGC-5. Gezeigt ist die Zusammenfassung dreier voneinander unabhängigen Experimenten,  $n \geq 28$ , Mittelwert  $\pm$  SEM.

#### 4.2.2 Untersuchung von mit sConA differenzierten RGC-5

Die oben beschriebenen Versuche, durchgeführt mit undifferenzierten retinalen Ganglienzellen, zeigten, dass durch die Zugabe von Glutamat bei diesen Zellen keine Apoptose induziert werden konnte. Deshalb wurde, um ein funktionierendes *in vitro* Modell der retinalen Ganglienzellen zu verwenden, in den folgenden Experimenten versucht, die Differenzierung der immortalisierten retinalen Ganglienzellen mittels Succinyl-Concanavalin A (sConA) nach der modifizierten Methode von Krishnamoorthy zu induzieren [Krishnamoorthy, 2001].

Hierzu wurden die undifferenzierten retinalen Ganglienzellen nach 24-stündiger Kultivierung in serumfreiem DMEM, mit unterschiedlichen sConA-Konzentrationen in DMEM 10% FBS über eine Dauer von 7 Tagen behandelt, um für die weiteren Versuche differenzierte retinale

Ganglienzellen verwenden zu können. Nach dieser Inkubation zeigten diese mit sConA behandelten retinalen Ganglienzellen jedoch keine deutlichen morphologischen Unterschiede im Vergleich zu den undifferenzierten RGC-5. Die Zellsoma der behandelten RGC-5 stellten sich flach und langezogen dar. Auch zeigte sich keine Zunahme in der Anzahl dendriten- und axonähnlicher Strukturen. Die Länge der vorhandenen Fortsätze war dann auch meist kürzer als die ihrer Zellsoma. Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der mit sConA behandelten RGC-5 fiel des weiteren keine wesentliche Reduktion der Wachstumsrate, wie bei ausdifferenzierten postmitotischen neuronalen Zellen, auf (Abb. 23).

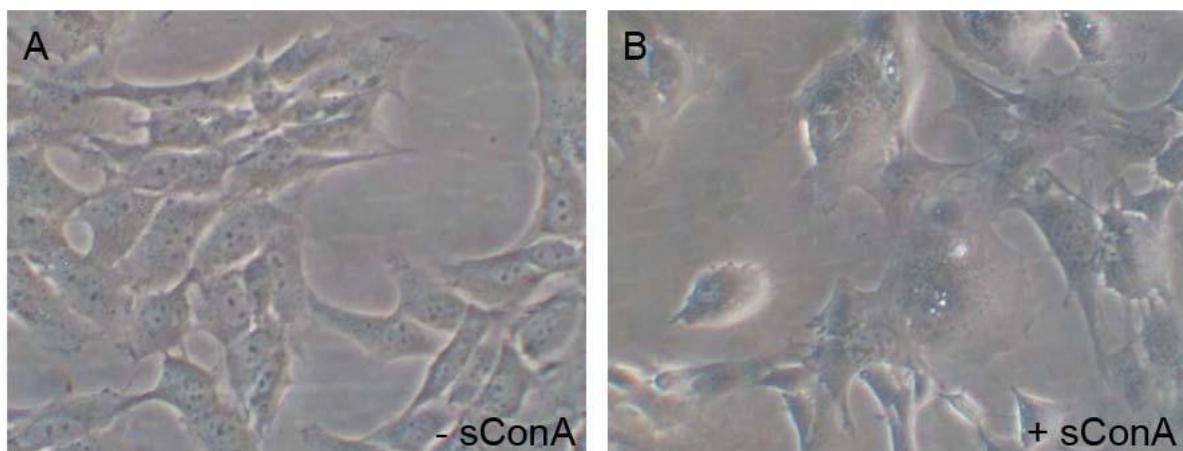


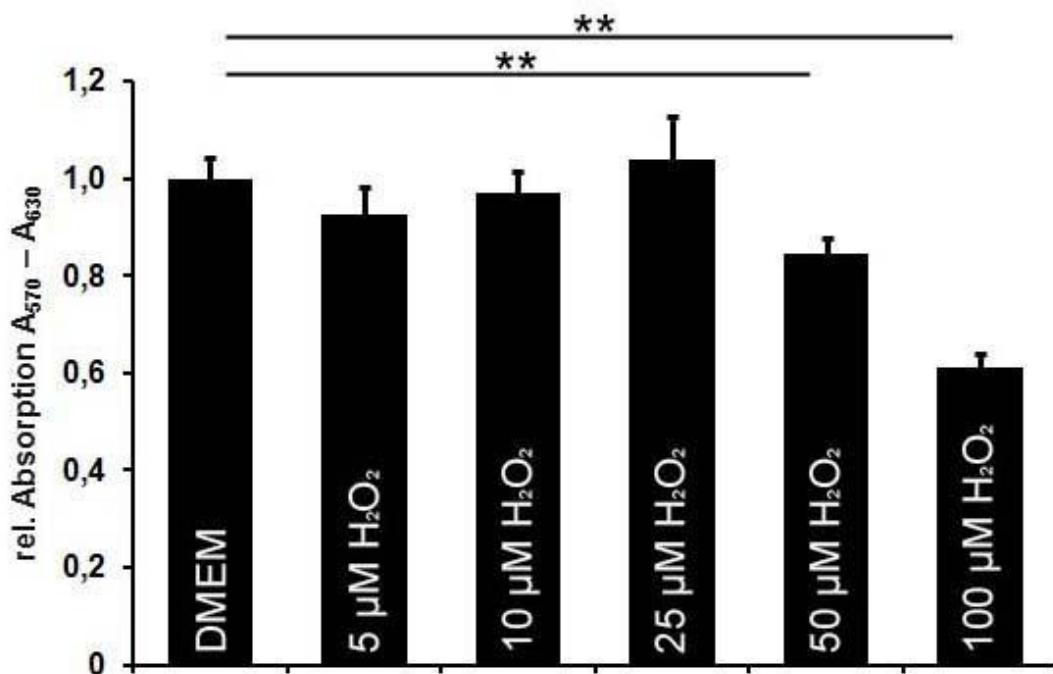
Abb. 23 **Behandlung von undifferenzierten RGC-5 mit 50 µg/ml Succinyl-Concanavalin A (sConA). A; B:** Nach 7-tägiger Inkubation mit 50 µg/ml sConA der undifferenzierten, immortalisierten RGC-5 (B), verglichen mit unbehandelten retinalen Ganglienzellen (A), stellten sich bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der Zellen keine wesentlichen morphologischen Unterschiede dar. Auch nach Behandlung mit sConA (B) waren die Zellsoma flach und langezogen. Eine deutliche Zunahme dendriten- und axonähnlicher Strukturen konnte nicht beobachtet werden. Ursprüngliche Vergrößerung 10x.

#### 4.2.2.1 Behandlung von in sConA inkubierten RGC-5 mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Zur Untersuchung, ob verschiedene Konzentrationen von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in der Lage sind, eine deutliche Apoptose in den mit 50 µg/ml sConA behandelten RGC-5 zu induzieren, wurden diese nach 24 Stunden in serumfreiem DMEM, mit unterschiedlichen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen (5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM und 100 µM) für 1 Stunde

behandelt und bis zur Bestimmung der Anzahl der überlebenden RGC-5 mit Hilfe des MTT-Zellviabilitätstests für weitere 24 Stunden in serumfreiem DMEM inkubiert. Zum Vergleich wurden mit 50 µg/ml sConA behandelte Zellen verwendet, welche 24 Stunden in serumfreiem DMEM kultiviert wurden.

Nach Auswertung dieses Versuchs zeigte sich, dass die einstündige Behandlung der retinalen Ganglienzellen mit den Wasserstoffperoxid-Konzentrationen 5 µM, 10 µM sowie 25 µM zu keiner signifikant relevanten Abnahme der Anzahl der RGC-5 führten. Die Behandlung der retinalen Ganglienzellen mit 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatte eine Verringerung der Anzahl der RGC-5 um etwa 15%, verglichen mit den in serumfreiem DMEM kultivierten Zellen zur Folge. Die einstündige Zugabe von 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduzierte die Anzahl der RGC-5 auf etwa 60% der Zellen, die nach Kultivierung in serumfreiem DMEM vorhanden waren. Die Abnahme der vitalen Zellen durch Induktion einer Apoptose der mit sConA behandelter RGC-5 durch 50 µM bzw. 100 µM Wasserstoffperoxid war signifikant (Abb. 24).



**Abb. 24 Quantifizierung der Abnahme von RGC-5 nach vorausgegangener Inkubation mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Succinyl-Concanavalin A (sConA) durch unterschiedliche Wasserstoffperoxid-Konzentrationen.** Mit Hilfe der MTT Analyse zeigte sich, dass ab einer Wasserstoffperoxid-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M}$  die Anzahl der RGC-5 deutlich abnimmt. So reduzierte die einstündige Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  die Anzahl der retinalen Ganglienzellen auf etwa 85% der Zellen, welche nur in serumfreiem DMEM kultiviert wurden. Eine Abnahme der Anzahl der RGC-5 um etwa 40% konnte mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  erzielt werden. Die geringeren Wasserstoffperoxid-Konzentrationen (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$ ) waren hingegen nicht in der Lage, die Anzahl der RGC-5 zu verringern. Gezeigt ist die Zusammenfassung dreier voneinander unabhängigen Experimenten,  $n \geq 28$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, \*\*:  $p < 0,001$ .

#### 4.2.2.2 Behandlung von mit sConA differenzierten RGC-5 mit Glutamat

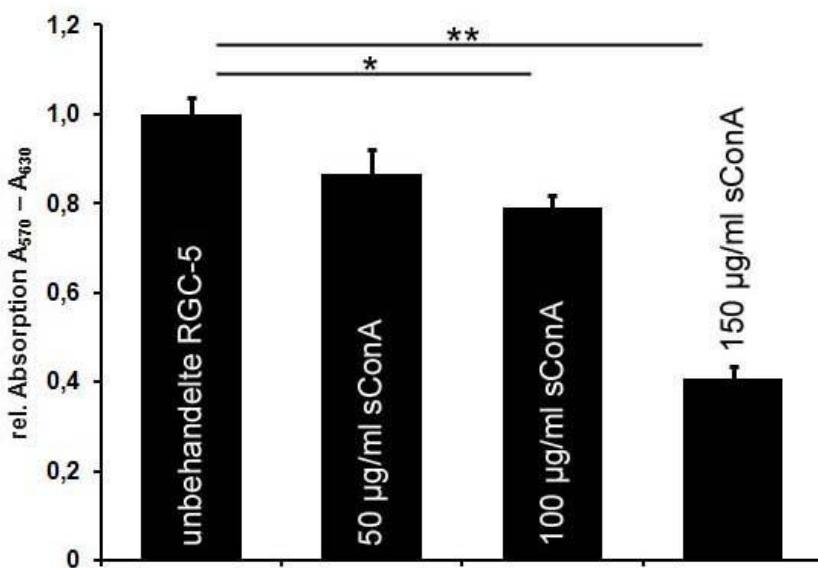
Wie bereits bei undifferenzierten RGC-5 wurde in den folgenden Experimenten bei den mit Succinyl-Concanavalin A (sConA) behandelten retinalen Ganglienzellen versucht, mit Glutamat einen exzitotoxischen Schaden zu induzieren und so die Induktion einer Apoptose in den RGC-5 zu erreichen.

Dabei erfolgte die von Krishnamoorthy beschriebene Differenzierung der RGC-5 wie oben erwähnt [Krishnamoorthy, 2001], jedoch mit dem Unterschied, dass neben 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sConA

auch die sConA-Konzentrationen 100 µg/ml und 150 µg/ml verwendet wurden, um eine deutlichere Differenzierung der RGC-5 zu stimulieren.

Nach Abschluss der 7-tägigen Behandlung mit den unterschiedlichen sConA-Konzentrationen und weiterer Kultivierung der RGC-5 in serumfreiem DMEM für 24 Stunden, wurde in einem Vorversuch zur Quantifizierung der Anzahl der nach dieser Behandlung noch vorhandenen retinalen Ganglienzellen der MTT-Zellviabilitätstest durchgeführt. Dabei sollte sich zeigen, ob es die sConA-Konzentrationen ermöglichen, die undifferenzierten retinalen Ganglienzellen in ausdifferenzierte postmitotische RGC-5 zu überführen, was sich auf Grund des Rückganges in der Wachstumsrate in einer Reduktion der Anzahl der behandelten retinalen Ganglienzellen wiederspiegeln müsste. Zum Vergleich wurde als Ausgangswert die Anzahl an undifferenzierten RGC-5 Zellen nach 24-stündiger Kultivierung in serumfreiem DMEM verwendet.

Dabei zeigte sich, dass nach Behandlung mit 50 µg/ml sConA kein signifikant relevanter Rückgang der Anzahl der RGC-5 beobachtet werden konnte. Wurden die undifferenzierten retinalen Ganglienzellen jedoch mit 100 µg/ml bzw. 150 µg/ml sConA inkubiert, ergab sich im MTT-Zellviabilitätstest eine Reduktion der Anzahl der RGC-5 um etwa 20% bzw. 60% im Vergleich zu der Anzahl der undifferenzierten RGC-5 nach 24-stündiger Kultivierung in serumfreiem DMEM. Diese Abnahme der RGC-5 war signifikant (Abb. 25).

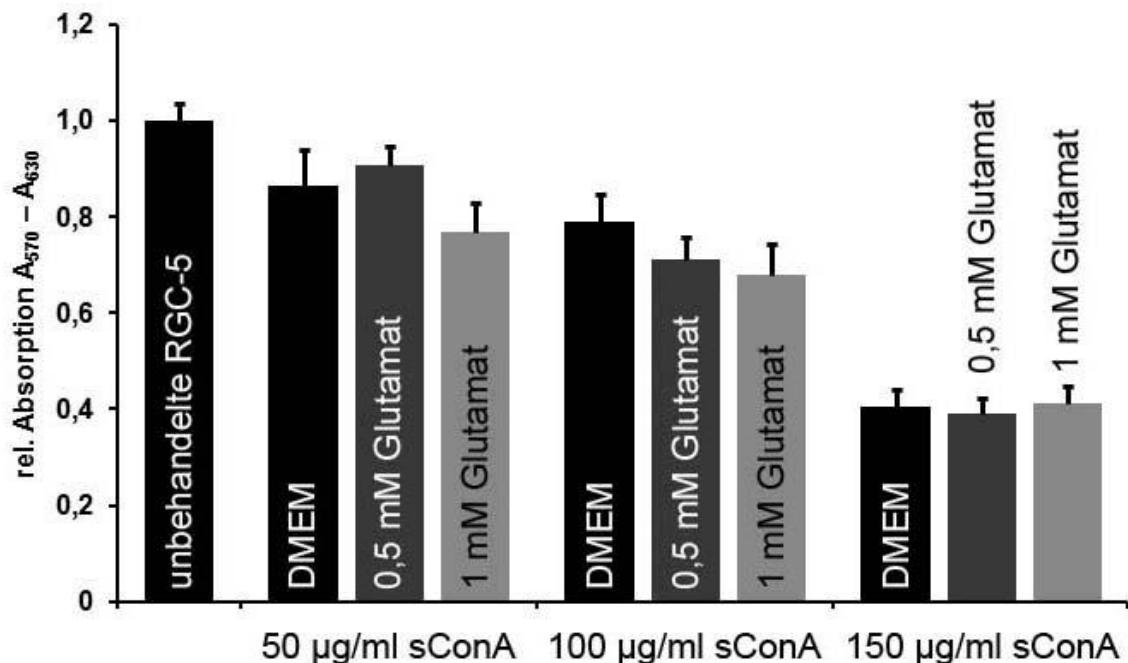


**Abb. 25 Quantifizierung der Anzahl der RGC-5 nach 7-tägiger Behandlung mit 50 µg/ml, 100 µg/ml bzw. 150 µg/ml Succinyl-Concanavalin A (sConA).** Nach Analyse der Anzahl der RGC-5 mittels des MTT-Zellviabilitätstests zeigte sich, dass ab einer sConA-Konzentration von 100 µg/ml die Anzahl der überlebenden RGC-5 nach 24 Stunden in serumfreiem DMEM deutlich abnimmt. So führt die Inkubation der undifferenzierten RGC-5 mit 100 µg/ml sConA zu einer Abnahme um etwa 20%, die Inkubation mit 150 µg/ml sogar zu einer Reduktion der Anzahl an retinalen Ganglienzellen um ungefähr 60%, verglichen zu undifferenzierten RGC-5 nach 24-stündiger Kultivierung in serumfreiem DMEM. Gezeigt ist die Zusammenfassung dreier voneinander unabhängigen Experimenten,  $n \geq 28$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,001$ .

Da sich die vorhergehenden Experimente mit Glutamat als problematisch erwiesen haben, wurden für die nachfolgenden Untersuchungen nach der 7-tägigen Behandlung der RGC-5 mit 50 µg/ml, 100 µg/ml bzw. 150 µg/ml Succinyl-Concanavalin A (sConA) und anschließender Kultivierung der Zellen in serumfreiem DMEM für 24 Stunden, den retinalen Ganglienzellen für weitere 24 Stunden unterschiedliche Glutamat-Konzentrationen (500 µM, 1000 µM) hinzugefügt. Zum Vergleich wurden mit den unterschiedlichen sConA-Konzentrationen behandelte Zellen nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem DMEM verwendet.

Die Anzahl der überlebenden RGC-5 wurde nach Abschluss dieses Versuchs mit Hilfe des MTT-Zellviabilitätstests bestimmt. Dabei zeigte sich, dass verglichen mit den Zellen welche

24 Stunden in serumfreiem DMEM kultiviert wurden, weder die 24-stündige Inkubation mit 0,5 mM Glutamat noch mit 1 mM Glutamat in der Lage war, eine deutliche Apoptose in den mit unterschiedlichen sConA-Konzentrationen behandelten RGC-5 zu induzieren und dadurch zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl der RGC-5 zu führen (Abb. 26).



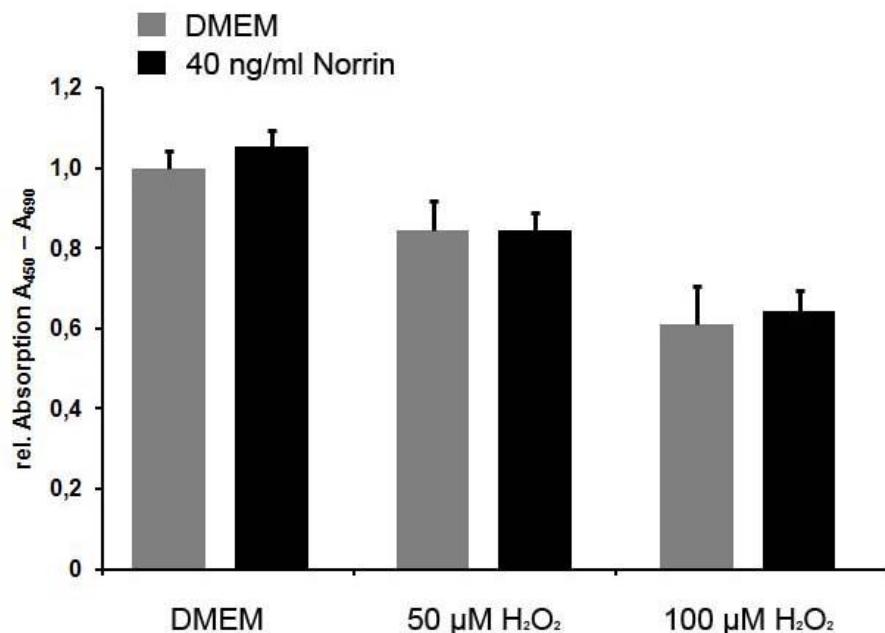
**Abb. 26 Wirkung von Glutamat auf mit unterschiedlichen sConA-Konzentrationen differenzierte RGC-5.** Die Analyse der Zellviabilität mittels des MTT-Tests zeigte, dass sowohl bei mit 50 µg/ml, 100 µg/ml sowie 150 µg/ml Succinyl-Concanavalin A (sConA) differenzierte RGC-5 keine signifikanten Unterschiede in deren Anzahl nach Zugabe unterschiedlicher Glutamat-Konzentrationen (0,5 mM bzw. 1 mM) für 24 Stunden, im Vergleich zu im gleichen Zeitraum in serumfreiem DMEM kultivierten RGC-5, erkennbar waren. Gezeigt ist die Zusammenfassung dreier voneinander unabhängigen Experimenten,  $n \geq 28$ , Mittelwert  $\pm$  SEM.

#### 4.2.2.3 Norrin hat keinen Einfluss auf den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Zelltod von in sConA inkubierten RGC-5

Die zuvor durchgeföhrten Versuche zeigten, dass die 1-stündige Behandlung sowohl mit 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als auch mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer deutlichen Abnahme der mit 50 µg/ml sConA differenzierten RGC-5 führt.

Um zu untersuchen, ob Norrin auch einen direkten neuroprotektiven Effekt *in vitro* auf isolierte RGC-5 besitzt, wurden die Zellen mit 50 µg/ml sConA wie oben beschrieben differenziert und nach 24 Stunden in serumfreiem DMEM für anschließend 1 Stunde mit 50 µM oder 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. mit einer Kombination aus 50 µM oder 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 40 ng/ml Norrin behandelt. Bis zur Bestimmung der Anzahl der überlebenden RGC-5 mittels des WST-1 Zellviabilitätstests wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit serumfreiem DMEM bzw. mit 40 ng/ml Norrin in serumfreiem DMEM inkubiert. Als Kontrolle wurden mit 50 µg/ml sConA behandelte Zellen verwendet, welche für 24 Stunden in serumfreiem DMEM kultiviert wurden. Um einen möglichen Einfluss von Norrin auf nicht mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelte RGC-5 auszuschließen, wurden auch Zellen für 24 Stunden mit 40 ng/ml Norrin in serumfreiem DMEM behandelt.

Die anschließende Analyse der Zellviabilität mittels WST-1-Assay zeigte, dass 40 ng/ml Norrin auf die mit 50 µg/ml sConA behandelten und in serumfreiem Medium inkubierten RGC-5 keinen Unterschied in der Anzahl der vitalen Zellen zur Folge hat. Dies lässt darauf schließen, dass Norrin unter physiologischen Bedingungen keinen neuroprotektiven Effekt auf differenzierte RGC-5 besitzt. Ebenso übte die zusätzliche Inkubation mit Norrin weder bei den mit 50 µM noch bei den mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geschädigten RGC-5 eine signifikante Zunahme der Anzahl der vitalen Zellen, verglichen zu den ohne Norrin behandelten RGC-5, aus (Abb. 27).



**Abb. 27 40 ng/ml Norrin zeigen keinen Einfluss auf mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelte in 50 µl/ml sConA inkubierte RGC-5.** Vor Versuchsdurchführung wurden die verwendeten RGC-5 in 50 µl/ml Succinyl-Concanavalin A (sConA) kultiviert. Die Analyse der Zellviabilität mit WST-1 Analyse zeigte, dass die Zugabe von 40 ng/ml Norrin zu keiner signifikanten Zunahme von vitalen RGC-5 nach 1-stündiger Behandlung mit 50 µM bzw. 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt. Ebenso konnte durch die Zugabe von 40 ng/ml Norrin zu den in lediglich serumfreiem DMEM kultivierten RGC-5 keine erhöhte Anzahl an vitalen Zellen beobachtet werden. Gezeigt ist die Zusammenfassung dreier voneinander unabhängigen Experimenten, n ≥ 28, Mittelwert ± SEM.

#### 4.2.3 Differenzierung von RGC-5 mittels Staurosporin

Bei den oben durchgeführten Versuchen konnte beobachtet werden, dass sowohl bei undifferenzierten retinalen Ganglienzellen als auch bei mit Succinyl-Concanavalin A (sConA) behandelten RGC-5 durch die Zugabe von Glutamat keine deutliche Apoptose hervorgerufen wird. Auch zeigte die Morphologie der sConA-differenzierten RGC-5 keinen offensichtlichen neuronalen postmitotischen Phänotyp, weshalb der Versuch unternommen wurde, die RGC-5 mittels Staurosporin zu differenzieren.

Deshalb wurde in den folgenden Versuchen die Differenzierung der RGC-5 nach der von Frassetto beschriebenen Methode mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin durchgeführt und analysiert [Frassetto, 2006].

Hierzu wurden die undifferenzierten retinalen Ganglienzellen für 1 Stunde mit 1 µM Staurosporin in serumfreiem DMEM kultiviert. Schon während dieser Phase zeigten sich bei den RGC-5 deutliche morphologische Veränderungen, verglichen mit den unbehandelten retinalen Ganglienzellen. Die Zellsoma wurden zunehmend runder und erhabener. Auch führte die Inkubation mit Staurosporin zu einer deutlichen Zunahme der Größe der Zellsoma. Daneben bildeten sich zahlreiche dendriten- und axonähnliche Strukturen aus, deren Länge einem Vielfachen des Durchmessers ihres Zellsomas entsprach. Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der mit Staurosporin behandelten RGC-5 fiel des weiteren eine wesentliche Reduktion der Wachstumsrate auf, verglichen mit unbehandelten retinalen Ganglienzellen (Abb. 28).

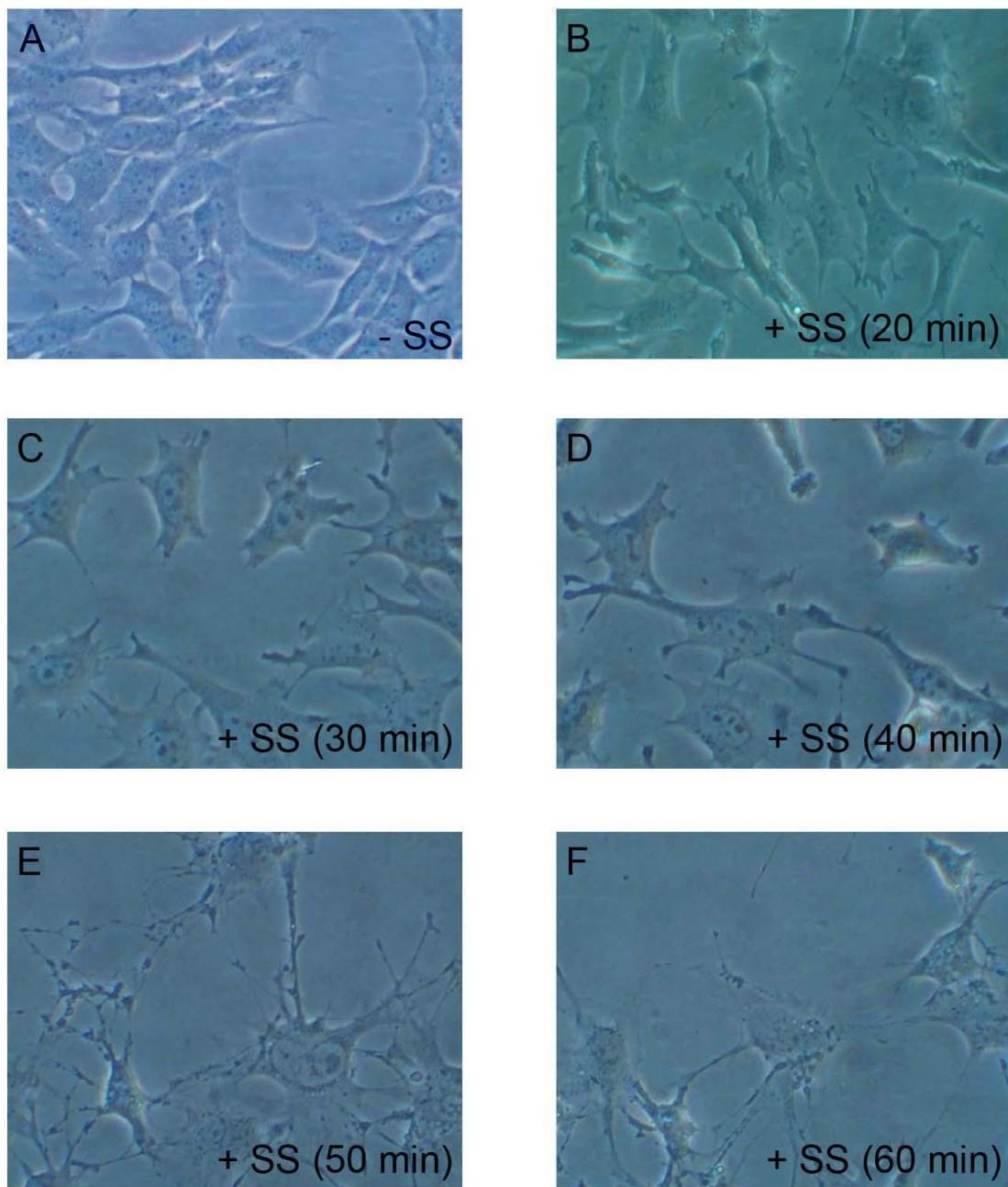


Abb. 28 **Behandlung von undifferenzierten RGC-5 mit 1 µM Staurosporin (SS).** A-F. Nach Inkubation der undifferenzierten, immortalisierten RGC-5 mit 1 µM Staurosporin (SS) (B-F) zeigten sich bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der Zellen mit der Zeit zunehmende deutliche morphologische Veränderungen, verglichen mit unbehandelten retinalen Ganglienzellen (A). Nach 20-minütiger Inkubation mit Staurosporin (B) konnten bereits erste morphologische Unterschiede beobachtet werden, die mit weiterer Inkubation in Staurosporin (C-F) noch deutlicher wurden. Die Zellsoma fielen durch eine Größenzunahme auf und wurden runder und erhabener. Auch nahm die Anzahl und Länge dendriten- und axonähnlicher Strukturen beeindruckend zu. Die Aufnahmen erfolgten 20 (B), 30 (C), 40 (D), 50 (E) bzw. 60 (F) Minuten nach Zugabe von 1 µM Staurosporin (SS). Ursprüngliche Vergrößerung 10x.

Nach der einstündigen Behandlung mit 1 µM Staurosporin wurden die Zellen für weitere 24 Stunden in DMEM 10% FBS kultiviert, um die Expression RGC-spezifischer Proteine zu ermöglichen.

#### **4.2.3.1 Behandlung von in Staurosporin inkubierten RGC-5 mit Glutamat**

Nachdem sich bereits kurz nach Inkubation der RGC-5 mit 1 µM Staurosporin (SS) eine wesentliche Veränderung ihrer Morphologie beobachten ließ, wurde, wie schon bei den undifferenzierten und mittels sConA (Succinyl-Concanavalin A) differenzierten Zellen, untersucht, ob mit dem exzitotoxisch wirkenden Glutamat eine Apoptose in den RGC-5 induziert werden kann.

Hierfür wurden die Zellen nach Abschluss der Differenzierung mittels Staurosporin (SS) für weitere 24 Stunden mit unterschiedlichen Glutamat-Konzentrationen (500 µM bzw. 1 mM) behandelt. Mit Hilfe des WST-1-Zellviabilitätsstests wurde danach die Anzahl der vitalen Zellen bestimmt und mit der Anzahl der RGC-5, welche lediglich für 24 Stunden in serumfreiem DMEM kultiviert wurden, verglichen.

Die Analyse der Zellviabilität ergab jedoch, dass, verglichen mit den Zellen, welche für 24 Stunden in serumfreiem DMEM kultiviert wurden, weder 500 µM Glutamat noch 1 mM Glutamat zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl der mittels Staurosporin (SS) differenzierten RGC-5 führten (Abb. 29).

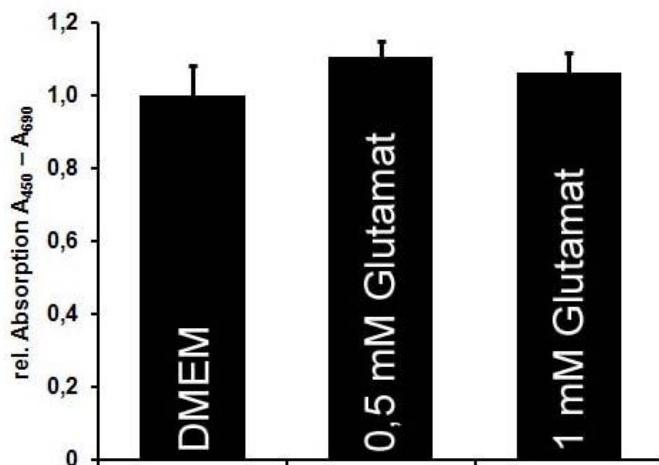


Abb. 29 **Wirkung unterschiedlicher Glutamat-Konzentrationen auf mit Staurosporin differenzierten RGC-5.** Die Analyse der Zellviabilität mittels WST-1 zeigte, dass weder die 24-stündige Zugabe von 500 µM Glutamat noch die von 1 mM Glutamat einen signifikanten Untergang von mit Staurosporin (SS) differenzierten RGC-5, verglichen mit den im gleichen Zeitraum in serumfreiem DMEM kultiviert Zellen, hervorrief. Gezeigt ist die Zusammenfassung dreier voneinander unabhängigen Experimenten, n ≥ 28, Mittelwert ± SEM.

#### 4.2.3.2 Behandlung von in Staurosporin inkubierten RGC-5 mit unterschiedlichen FBS-Konzentrationen

Bei den oben durchgeführten Versuchen bezüglich der Wirkung der unterschiedlichen Glutamat-Konzentrationen auf die mit Staurosporin (SS) differenzierten RGC-5 konnte nach der 24-stündigen Kultivierung der Zellen in serumfreiem DMEM bereits bei der lichtmikroskopischen Betrachtung eine deutliche Abnahme der Anzahl der Zellen festgestellt werden. Im folgenden Experiment wurde daher untersucht, ob durch Verringerung der Serumkonzentrationen (FBS) und somit einem Entzug benötigter Wachstumsfaktoren eine Apoptose in den retinalen Ganglienzellen induziert werden kann.

Nach Abschluss der Differenzierung der RGC-5 mit Staurosporin (SS) und weiteren 24 Stunden in DMEM 10% wurden die retinalen Ganglienzellen hierzu mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen (1%, 3%, 5% und 10% FBS) sowie in serumfreiem DMEM für 24 Stunden kultiviert und anschließend die Anzahl der überlebenden RGC-5 mittels des WST-1-Zellviabilitätstests analysiert.

Dabei zeigte sich, dass die Serumkonzentration einen deutlichen Einfluss auf die Zellviabilität der RGC-5 hat. Eine Reduktion der Serumkonzentration auf 5% FBS führte zu einer Abnahme der überlebenden Zellen auf etwa 70% verglichen mit den in 10% FBS kultivierten RGC-5. Bei den Serumkonzentrationen 3% FBS bzw. 1% FBS nahm die Anzahl der im WST-1-Zellviabilitätstest nachgewiesen Zellen um durchschnittlich 30% bzw. 37% ab. Bei vollständigem Entzug der Wachstumsfaktoren reduzierte sich die Anzahl der überlebenden RGC-5 um etwa 50% im Vergleich zu den im 10% FBS-haltigem Medium kultivierten retinalen Ganglienzellen. Diese Abnahme der Zellviabilität durch Induktion einer Apoptose durch Entzug bzw. Reduktion der Wachstumsfaktoren (5%, 3%, 1% FBS) der mit Staurosporin behandelten RGC-5 war signifikant (Abb. 30).

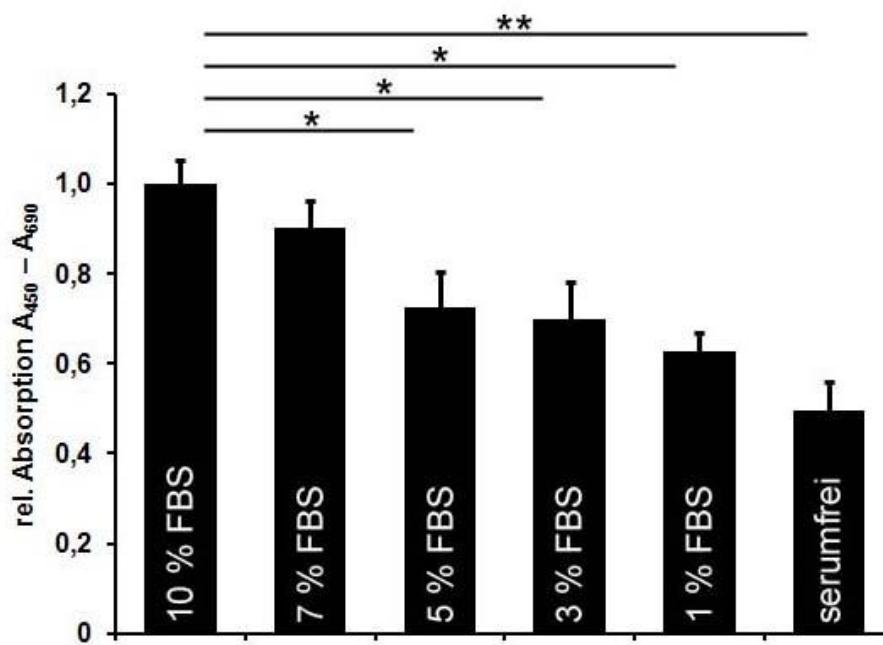


Abb. 30 Die Reduktion der Serumkonzentration führt bei mit 1  $\mu\text{M}$  Staurosporin (SS) differenzierten retinalen Ganglienzellen zur Abnahme der Anzahl der RGC-5. Nach 24-stündiger Kultivierung in DMEM mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen (10%, 7%, 5%, 3%, 1% FBS) zeigte die Analyse der Zellviabilität mit WST-1, dass durch Reduktion der Wachstumsfaktoren eine Apoptose in den mit 1  $\mu\text{M}$  Staurosporin differenzierten RGC-5 induziert werden kann. So nahm die Anzahl der RGC-5 in 5% bzw. 3% FBS-haltigem Medium um etwa 30% ab, verglichen mit den in 10% FBS-haltigem Medium kultivierten Zellen. Eine Serumkonzentration von 1% FBS reduzierte die Anzahl der überlebenden RGC-5 auf etwa 63%. Durch den vollständigen Entzug der Wachstumsfaktoren reduzierte sich die Anzahl der überlebenden Zellen um etwa 50%. Die 24-stündige Inkubation mit 7% FBS-haltigem Medium führte hingegen zu keiner signifikanten Abnahme der Anzahl an retinalen Ganglienzellen. Gezeigt ist die Zusammenfassung dreier voneinander unabhängigen Experimenten,  $n \geq 28$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,001$ .

#### 4.2.3.3 Norrin schützt mittels Staurosporin differenzierte RGC-5

Bei dem oben durchgeföhrten Experiment zeigte sich, dass durch die 24-stündige Inkubation der mittels Staurosporin differenzierten RGC-5 in serumfreiem Medium die Anzahl an Zellen deutlich reduziert werden konnte.

Zur Untersuchung, ob Norrin nun einen direkten protektiven Effekt auf die differenzierten retinalen Ganglienzellen besitzt, wurden die mittels 1  $\mu\text{M}$  Staurosporin differenzierten Zellen

nach 24-stündiger Inkubation in DMEM 10% FBS für weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium mit verschiedenen Norrin-Konzentrationen (20 ng/ml, 40 ng/ml und 60 ng/ml) inkubiert. Als Kontrolle wurden differenzierte RGC-5 verwendet, welche lediglich mit serumfreiem DMEM mit und ohne 10% FBS behandelt wurden.

Im anschließend durchgeführten WST-1-Zellviabilitätstest zeigte sich, dass die Zugabe von Norrin einen Anstieg der Anzahl der retinalen Ganglienzellen um etwa 20% bewirkt, verglichen zu den in serumfreiem DMEM kultivierten Zellen. Allerdings fand sich keine Konzentrationsabhängigkeit zwischen den überlebenden Zellen und den eingesetzten Norrin-Konzentrationen. Diese durch Norrin verursachte Zunahme der Zellviabilität war signifikant (Abb. 31).

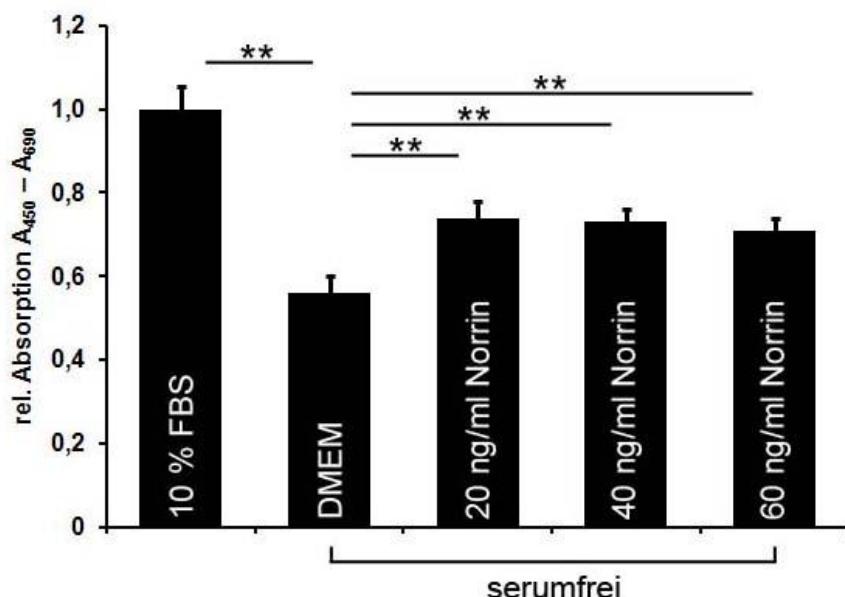


Abb. 31 **Norrin schützt mittels Staurosporin differenzierte RGC-5.** Nach der Differenzierung der RGC-5 mittels 1  $\mu$ M Staurosporin wurden die Zellen für 24 Stunden in serumfreiem DMEM mit unterschiedlichen Norrin-Konzentrationen (20 ng/ml, 40 ng/ml und 60 ng/ml) inkubiert. Dabei zeigte der im Anschluss durchgeführte WST-1-Zellviabilitätstest, dass durch die Zugabe von Norrin die Anzahl der überlebenden RGC-5 etwa um 20%, verglichen zu den lediglich in serumfreiem Medium kultivierten retinalen Ganglienzellen, ansteigt. Dieser durch Norrin hervorgerufene neuroprotektive Effekt war jedoch von der Höhe der Norrin-Konzentrationen unabhängig. So verursachten sowohl 20 ng/ml, 40 ng/ml als auch 60 ng/ml Norrin einen ähnlichen Anstieg der Anzahl der RGC-5 um etwa 20%. Gezeigt ist die Zusammenfassung dreier voneinander unabhängigen Experimenten,  $n \geq 28$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, \*\*:  $p < 0,001$  [Abbildung modifiziert aus Seitz, 2010].

## 5 Diskussion

### 5.1 Neuroprotektive Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen *in vitro*

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente konnte gezeigt werden, dass Norrin einen direkten neuroprotektiven Effekt auf durch Staurosporin (SS) differenzierte und durch den Entzug von Serum und letztlich von Wachstumsfaktoren geschädigte RGC-5 ausübt.

Hierzu wurden immortalisierte retinale Ganglienzellen aus der Ratte (RGC-5), zur Verfügung gestellt von Neeraj Agarwal, verwendet, welche bereits in einer Vielzahl anderer Arbeiten als *in vitro* Modell für retinale Ganglienzellen verwendet wurden [Krishnamoorthy, 2001; Agarwal, 2007; Liu, 2007; Wood, 2008]. Voraussetzung für die Untersuchung der neuroprotektiven Eigenschaften von Norrin an RGC-5 war die Etablierung eines Schadensmodells, welches einen Untergang von RGC-5 induzieren kann. Eingesetzt wurden hierbei zum einen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid) [Nakajima, 2008], welches durch oxidativen Stress, sowie Glutamat [Pang, 1999], welches durch Exzitotoxizität eine Apoptose von kultivierten retinalen Ganglienzellen zur Folge hat. Dabei ergab sich jedoch, dass nur hohe Konzentrationen an Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zu einem deutlichen konzentrationsabhängigen Rückgang der RGC-5 führten. Durch Glutamat ließ sich dagegen selbst durch sehr hohe Konzentrationen (100 mM) kein Verlust an RGC-5 beobachten. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Krishnamoorthy berichtet, der jedoch ab einer Konzentration von 2 mM Glutamat erste Anzeichen einer Exzitotoxizität beobachtete [Krishnamoorthy, 2001]. Grund für das fehlende Ansprechen der RGC-5 auf Glutamat könnte eine fortschreitende Dedifferenzierung der Zelllinie sein, wodurch ein teilweiser oder kompletter Verlust der Expression der Glutamat-Rezeptoren eingetreten sein könnte. Bestätigung findet diese Hypothese in einer von Van Bergen durchgeführten Arbeit, in der gezeigt wurde, dass mit zunehmendem Alter der RGC-5-Zelllinie deren Sensitivität auf Glutamat abnimmt [Van Bergen, 2009]. Während durch die 24-stündige Zugabe von 5 mM Glutamat 2003 die Anzahl der RGC-5 noch um etwa 65 % abnahm [Aoun, 2003], waren es 2005 nur noch ungefähr 25 % [Fan, 2005] und 2009 lediglich noch 5 % [Van Bergen, 2009]. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten RGC-5 wiesen keinerlei Sensitivität auf Glutamat mehr auf und die durch Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid) erreichte Abnahme der

Anzahl der überlebenden RGC-5 muss aufgrund der dazu benötigten sehr hohen Konzentrationen an Wasserstoffperoxid auf eine allgemeine Schädigung der Zellen im Sinne einer Nekrose zurückgeführt werden.

Da sich undifferenzierte RGC-5 für die geplante Untersuchungen als ungeeignet erwiesen, wurden die RGC-5 differenziert, wie dies in einer Reihe von Arbeiten mit verschiedenen Methoden beschrieben wird. Krishnamoorthy verwendete hierzu 50 µg/ml sConA (Succinyl-Concanavalin A) [Krishnamoorthy, 2001], wodurch eine Veränderung der Zellmorphologie beobachtet wurde. Auch zeigte sich nach Zugabe von 0,5 mM Glutamat zu den so differenzierten RGC-5 nach 24 Stunden eine Reduktion der Anzahl dieser Zellen um etwa 50% [Krishnamoorthy, 2001]. Im Gegensatz dazu konnte bei den im Rahmen dieser Arbeit mit sConA behandelten RGC-5 keine deutliche Veränderung der Zellmorphologie festgestellt werden. Verglichen zu den unbehandelten RGC-5 wurde jedoch durch die Zugabe von geringeren Konzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine deutliche konzentrationsabhängige Reduktion der Anzahl der retinalen Ganglienzellen erreicht. Da es sich bei RGC-5, im Unterschied zu den postmitotischen retinalen Ganglienzellen, um mitotisch aktive Zellen handelt [Frassetto, 2006] ist ein wesentlicher Hinweis auf die abgelaufene Differenzierung der RGC-5 die Abnahme der Wachstumsrate, welche nach Behandlung der Zellen mit 100 bzw. 150 µg/ml sConA (Succinyl-Concanavalin A) beobachtet werden konnte. Die anschließend durchgeführte Zugabe von Glutamat zeigte jedoch, wie bereits bei unbehandelten RGC-5, im Gegensatz zu den von Krishnamoorthy erhobenen Ergebnissen [Krishnamoorthy, 2001], keine Reduktion der Anzahl der differenzierten RGC-5. Die Induktion einer Apoptose durch das exzitotoxisch wirkende Glutamat konnte auch in den mittels sConA differenzierten RGC-5 nicht erreicht werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis führte auch eine Arbeit von Van Bergen [Van Bergen, 2009], in der die Zugabe von 1 mM Glutamat zu den durch sConA differenzierten Zellen lediglich eine Reduktion der Anzahl der retinalen Ganglienzellen um etwa 2 % zur Folge hatte [Van Bergen, 2009]. Da sich aber durch die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu den mit sConA behandelten RGC-5 ein nachweisbarer Zelluntergang induzieren ließ, wurde in weiteren Experimenten mittels Zugabe von 40 ng/ml Norrin die möglichen neuroprotektiven Eigenschaften von Norrin untersucht. Dabei zeigte sich, dass es weder bei durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geschädigten RGC-5 als auch bei Zellen, denen für 24 Stunden die Wachstumsfaktoren entzogen wurden, Norrin die Anzahl der überlebenden retinalen Ganglienzellen beeinflusst.

Ursächlich hierfür könnte, auch unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die RGC-5 keine Sensitivität auf Glutamat aufweisen, eine, seit der initialen Transformation von primären retinalen Ganglienzellen in RGC-5, fortschreitende Veränderung des Expressionsmusters sein. Dieser Vermutung stehen jedoch Ergebnisse aus einer Arbeit von Lin gegenüber, in welcher Norrin eine deutliche Protektion auf die retinalen Ganglienzellen ausübt [Lin, 2009]. Ausgangspunkt bei den von Lin durchgeführten Untersuchungen an RGC-5 war aber nicht die vorherige Differenzierung der RGC-5 mit sConA (Succinyl-Concanavalin A), sondern mit dem proapoptotisch wirkenden Kinaseinhibitor Staurosporin.

Daher wurde in den weiteren Experimenten versucht, wie auch in Arbeiten von Frassetto beschrieben [Frassetto, 2006], die Differenzierung der RGC-5 durch die Zugabe von Staurosporin zu induzieren. Eine Arbeit von Lieven deutet darauf hin, dass Staurosporin durch die Erhöhung der Expression von MAP2c (*Microtubule-associated protein 2c*) die Differenzierung der RGC-5 einleitet [Lieven, 2007]. Die Expression von MAP2c spielt hauptsächlich bei der Ausbildung und Stabilisierung des Zytoskeletts während der Differenzierung von neuronalen Zellen eine Rolle [Caceres, 1986] und kann darüber hinaus in sich entwickelnden primären retinalen Ganglienzellen beobachtet werden. Der genaue Mechanismus ist bislang jedoch unbekannt [Thompson, 2010]. Bei der Behandlung der RGC-5 mit Staurosporin zeigte sich eine rasche, mit der Zeit zunehmende Veränderung der Zellmorphologie mit Abflachung der Zellsoma sowie die Ausbildung zahlreicher dendriten- und axonähnlicher Strukturen, was in dieser Weise auch in der Arbeit von Frassetto beschrieben wurde [Frassetto, 2006]. Die Zugabe des exzitotoxisch wirkenden Glutamats führte jedoch auch bei den mit Staurosporin behandelten RGC-5 zu keiner Abnahme der Anzahl der Zellen. Diese fehlende Sensitivität der durch Staurosporin differenzierten RGC-5 auf Glutamat wurde in einer Arbeit von Nieto bestätigt [Nieto, 2010]. Zusammenfassend zeigte sich, dass die Differenzierung der RGC-5 weder mit Staurosporin noch mit sConA die vollständige Expression des Glutamat-Rezeptor-Komplexes ermöglichte. Jedoch konnte bei den mit Staurosporin differenzierten RGC-5 durch die Kultivierung in serumfreiem Medium ein deutlicher Rückgang der Anzahl der RGC-5 beobachtet werden. Die Arbeit von Tatsumi zeigt, dass durch diesen Enzug von Wachstumsfaktoren eine Apoptose in den RGC-5 induziert wird [Tatsumi, 2008]. Dies bestätigte sich auch in weiteren Experimenten in denen nachgewiesen werden konnte, dass mit abnehmender Serumkonzentration in den mit

Staurosporin differenzierten RGC-5-Kulturen auch die Anzahl der retinalen Ganglienzellen deutlich abnimmt. Der komplette Entzug an Wachstumsfaktoren führte nach 24 Stunden zu einer Reduktion der Anzahl der RGC-5 um ungefähr 50 %. Die so behandelten und durch Staurosporin differenzierten RGC-5 stellten nun ein verwendbares *in vitro* Schadensmodell für isolierte retinale Ganglienzellen dar, an Hand dessen nun ein möglicher direkter neuroprotektiver Effekt von Norrin untersucht werden konnte.

Durch die Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an Norrin (20 ng/ml, 40 ng/ml und 60 ng/ml) wurde nach 24 Stunden eine Zunahme der überlebenden RGC-5 um etwa 20 % beobachtet. Dieser Effekt tritt unabhängig von der Höhe der Konzentration an Norrin ein. Zu ähnlichen Ergebnissen führten auch Versuche in der von Lin durchgeführten Arbeit [Lin, 2009]. Im Anschluss durchgeführte Versuche [Seitz, 2010] ergaben, dass die von Norrin nachgewiesene neuroprotektiven Eigenschaften auf RGC-5 *in vitro* nicht durch die zusätzliche Behandlung mit Dkk-1 (*Dickkopf-1*) aufgehoben werden konnte [Seitz, 2010]. Ebenso beobachtete Lin in *in vitro* Versuchen mit durch Staurosporin differenzierten RGC-5, dass nach der induzierten Apoptose Dkk-1 den durch Norrin hervorgerufenen neuroprotektiven Effekt nur teilweise aufhebt [Lin, 2009]. Möglicherweise deutet dies und die von der Höhe der Konzentration an Norrin unabhängige Abnahme des Untergangs von RGC-5 darauf hin, dass der Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg, anders als bei den *in vivo* Versuchen beobachtet, beim direkten neuroprotektiven Effekt von Norrin auf geschädigte RGC-5 keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt und die neuroprotektiven Eigenschaften stattdessen über einen bisher noch unklaren direkten Mechanismus vermittelt werden. Ursächlich für die teils unterschiedlichen Ergebnisse, bezüglich der Hemmung des neuroprotektiven Effekts von Norrin durch Dkk-1 *in vitro*, könnte die mit der Zeit zunehmende Dedifferenzierung der RGC-5-Linie sein. Darüber hinaus konnte auch festgestellt werden, dass das neuroprotektive Potential von Norrin *in vitro* wesentlich geringer ist als *in vivo*. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass die Dedifferenzierung der RGC-5 zur Induktion verschiedener, das Überleben der RGC-5 steigernden Signalwege geführt hat und ein direkt durch Norrin hervorgerufener neuroprotektiver Effekt daher in den einzelnen Zellen geringer ausfällt.

Zur weiteren Klärung der Rolle des Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs beim direkten neuroprotektiven Effekt von Norrin auf geschädigte retinale Ganglienzellen könnte ein  $\beta$ -Catenin<sup>fe/fe</sup> defizientes Tiermodell hilfreich sein, wodurch der Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg in Müllerzellen oder retinalen Ganglienzellen ausgeschaltet werden könnte. Sollte sich bei Versuchen mit diesem Tiermodell herausstellen, dass die kombinierte intravitreale Injektion von NMDA (*N*-Methyl-D-Aspartat) und Norrin keinen wesentlichen Einfluss auf das Überleben der retinalen Ganglienzellen hat, würde dies die Hypothese bestätigen, dass der in den RGC-5 beobachtet Effekt nur von untergeordneter Bedeutung ist.

## 5.2 Neuroprotektive Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen *in vivo*

*In vivo* konnte ebenfalls eine sehr deutliche und wesentlich stärkere als in den *in vitro* Versuchen ausgeprägte protektive Wirkung von Norrin nachgewiesen werden, indem gezeigt wurde, dass intravitreal injiziertes Norrin protektiv auf durch NMDA geschädigte retinale Ganglienzellen wirkt.

Ausgangspunkt der Untersuchungen, ob Norrin neuroprotektive Eigenschaften besitzt, war, wie bereits bei den *in vitro* Versuchen, die Etablierung eines exzitotoxischen Schadensmodell, welches mittels intravitrealer NMDA-Injektionen einen Untergang von retinalen Ganglienzellen in den Augen der Bl6/c57-Mäusen induzieren sollte [Li, 1999; Shen, 2006]. Da NMDA-Rezeptoren im Auge lediglich von retinalen Ganglienzellen sowie einer Subpopulation amakriner Zellen exprimiert werden [Jakobs, 2007], gelang es, durch die intravitreale Injektion einen relativ spezifischen Schaden im Bereich der retinalen Ganglienzellschicht zu induzieren. Lebrun-Julien konnte in einer Arbeit zeigen, dass durch die intravitreale Injektion von 20 mM NMDA nach 24 Stunden nur noch etwa 10 % der anfänglich vorhandenen Zellen in der retinalen Ganglienzellschicht vorhanden waren [Lebrun-Julien, 2009]. Darüber hinaus wiesen von Li beschriebene Daten darauf hin, dass die durch NMDA hervorgerufene exzitotoxische Schädigung der retinalen Ganglienzellen in Mausaugen konzentrationsabhängig ist [Li, 1999]. Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte die intravitreale Injektion verschiedener NMDA-Konzentrationen, wobei hier besonders die Konzentration von 10 mM NMDA hervortrat, welche nach 21 Tagen eine deutliche, jedoch nicht komplett Induktion einer Apoptose der Zellen in der retinalen Ganglienzellschicht zur Folge hatte und einen Verlust von etwa 75% der retinalen Ganglienzellen verursachte, verglichen mit Werten, welche nach intravitrealer Injektion von PBS erhoben wurden. Im Vergleich mit anderen Arbeiten, in welchen die absolute Anzahl retinaler Ganglienzellen in unbehandelten Mausaugen bestimmt wurde [Bonfanti, 1996; Strom, 1998], zeigte sich aber, dass die hier ermittelte Anzahl an retinalen Ganglienzellen in lediglich mit PBS behandelten Augen mit ungefähr 42000 Zellen niedriger liegt. So gab Strom die Anzahl retinaler Ganglienzellen in erwachsenen Bl6/c57-Mäusen mit etwa 55500 an [Strom, 1998]. Ursächlich für die in dieser Arbeit ermittelte höhere Anzahl der retinalen Ganglienzellen könnte deren genauere Bestimmung durch die elektronenmikroskopische Darstellung der Sehnerven sein. Zusammenfassend konnte durch die NMDA-Injektionen ein Schadensmodell

etabliert werden, mit dem die neuroprotektiven Eigenschaften von Norrin im weiteren *in vivo* untersucht wurden.

Die Hypothese, Norrin besitze einen neuroprotektiven Effekt, konnte durch mehrere Versuche im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Da die Anzahl der myelinisierten Axone im N. opticus die Anzahl ihrer Perikarya in der Retina wiederspiegelt [Williams, 1996], wurde die Anzahl der Axone in mit NMDA geschädigten Augen nach zusätzlicher Injektion von Norrin bestimmt. Dabei zeigte sich, dass Norrin zu einer Verringerung des durch NMDA verursachten Verlusts von retinalen Ganglienzellen um etwa 85 % führt. Die neuroprotektiven Eigenschaften von Norrin wurden auch durch die Tatsache unterstrichen, dass Norrin im NMDA-Schadensmodell zum Verbleib von etwa 55 % mehr Perikarya in der Ganglienzellschicht führt. Ein weiteres Indiz für einen neuroprotektiven Effekt von Norrin zeigt die nähere Betrachtung der inneren plexiformen Schicht, bestehend aus den Synapsen der bipolaren Zellen mit den retinalen Ganglienzellen. So zeigte sich in Arbeiten von Lam, dass durch intravitreale Injektion von NMDA die Fläche der inneren plexiformen Schicht der Retina deutlich abnimmt [Lam, 1999]. Durch die zusätzliche Injektion von Norrin im NMDA-Schadensmodell ließ sich nach 21 Tagen im Vergleich zu den nur mit NMDA injizierten Augen eine um ungefähr 38 % größere innere plexiforme Schicht nachweisen, was auf eine Verminderung des Verlusts synaptischer Kontakte der retinalen Ganglienzellen hinweist. Alle diese Experimente machten deutlich, dass Norrin den mittels Exzitotoxizität hervorgerufenen Verlust an retinalen Ganglienzellen deutlich reduzieren konnte. Zur weiteren Abklärung des geringeren Verlusts an retinalen Ganglienzellen im NMDA-Schadensmodell bei mit Norrin behandelten Mausaugen führte die Markierung apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Färbung 24 Stunden nach Injektion. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Norrin die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen und somit die durch NMDA induzierten Apoptosen in der retinalen Ganglienzellschicht um etwa 33 % reduziert. Die Ergebnisse zeigen, dass Norrin in der Lage ist apoptotische Vorgänge zu hemmen und lassen vermuten, dass diese anti-apoptotische Wirkung von Norrin unter anderem ursächlich für dessen neuroprotektiven Effekt gegenüber NMDA-geschädigter retinaler Ganglienzellen ist.

### 5.3 Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen

Um weitere Einblicke in den Mechanismus zu erlangen, welcher den neuroprotektiven Eigenschaften von Norrin zugrundeliegt, erfolgte zusätzlich zur *in vivo* Behandlung mit NMDA und Norrin die intravitreale Injektion von Dkk-1. In verschiedenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Norrin als aktivierender Ligand des Frizzled-4-Rezeptorkomplexes fungiert und somit zur Stimulation des kanonischen Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs führen kann [Xu, 2004; Smallwood, 2006]. Darüber hinaus gelang es in verschiedenen Arbeiten den Nachweis zu führen, dass durch Aktivierung des Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs die Hemmung einer Apoptose erfolgen kann [Chen, 2001; Yi, 2007]. Ein gut untersuchter Antagonist dieses Signalwegs stellt das Glykoprotein Dkk-1 (*Dickkopf-1*) dar [Cappuccio, 2005]. Zur Feststellung, ob der durch Norrin verursachte neuroprotektive Effekt auf die retinalen Ganglienzellen über den Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg vermittelt wird, wurde den durch NMDA geschädigten Augen neben Norrin auch das antagonistisch wirkende Dkk-1 injiziert. Dabei zeigte sich, dass aufgrund der zusätzlichen Behandlung mit Dkk-1 die neuroprotektive Wirkung von Norrin zum größten Teil aufgehoben werden kann. Dies bestätigte die Hypothese, dass ein großer Teil der neuroprotektiven Eigenschaften von Norrin durch die anti-apoptotische Wirkung des Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs induziert wird. Obwohl sich *in vitro* der neuroprotektive Effekt von Norrin nicht durch Dkk-1 hemmen ließ, kann *in vivo* dennoch davon ausgegangen werden, dass Norrin seine neuroprotektiven Eigenschaften überwiegend über die Aktivierung des kanonischen Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs vermittelt.

Nach kombinierter intravitrealer Injektion von NMDA und Norrin konnte eine deutliche Induktion von neuroprotektiven Wachstumsfaktoren beobachtet werden. So zeigte sich in weiteren *in vivo* Versuchen, dass Norrin in der Lage ist, den Anstieg neuroprotektiver Faktoren in der mittels NMDA geschädigten Retina zu verstärken. In verschiedenen Arbeiten konnte bisher nachgewiesen werden, dass verschiedene neuroprotektive Faktoren, wie beispielsweise BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) oder FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor-2*) eine schützende Wirkung auf durch NMDA geschädigte retinale Ganglienzellen ausüben [Schuettauf, 2004]. Ähnliche Effekte konnten für LEDGF (*Lens Derived Growth Factor*) [Inomata, 2003] und CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*) [Unoki, 1994] beobachtet

werden. Desweiteren konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass durch verschiedene Schädigungen der Retina die Expression dieser neuroprotektiven Faktoren stark gesteigert wird [Wen, 1995; Gao, 1996; Martins, 2005]. Die zusätzliche erhöhte Expression der neuroprotektiven Faktoren BDNF, CNTF, FGF-2 und LEDGF durch Norrin im NMDA-Schadensmodell 7 Stunden nach intravitrealer Injektion legt die Vermutung nahe, dass die anti-apoptotische Wirkung von Norrin über die Induktion der Synthese dieser Faktoren vermittelt wird.

In der Netzhaut kann die Expression von Wachstumsfaktoren über die Aktivierung von Müllerzellen erfolgen. Müllerzellen, Bestandteil des glialen Stützgewebes, nehmen deswegen in fast allen bisher beschriebenen Modellen neuronaler Schädigung der Netzhaut aufgrund ihrer Expression von neuroprotektiven Faktoren aber auch durch die Resorption exzitotoxisch wirkender Substanzen, wie beispielsweise Glutamat, eine zentrale Rolle ein [Bringmann, 2006]. Im Anschluss an diese Arbeit durchgeführten Versuche deuten darauf hin [Seitz, 2010], dass Müllerzellen einen wesentlichen Beitrag bei der Protektion der retinalen Ganglienzellen durch Norrin leisten. So konnte zum einen nachgewiesen werden, dass nach intravitrealer Injektion von NMDA die Expression von GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), einem Marker für die Gliose-Reaktion von Müllerzellen nach vorausgegangener Schädigung der Retina [Eisenfeld, 1984], stark anstieg und zum anderen, dass *in vitro* die alleinige Zugabe von Norrin zu isolierten Müllerzellen eine vermehrte Expression neuroprotektiver Faktoren zur Folge hatte [Seitz, 2010].

Verschiedene Arbeiten führten zu dem Ergebnis, dass diese Aktivierung der Müllerzellen Folge eines sehr komplexen intraretinalen Signalwegs ist, welcher im Rahmen der Schädigung von Photorezeptorenzellen näher untersucht wurde [Rattner, 2005; Joly, 2008; Bürgi, 2009]. So können Müllerzellen über einen bisher noch nicht geklärten Mechanismus eine mögliche Schädigung der Photorezeptorenzellen wahrnehmen und reagieren darauf mit einer erhöhten Expression von Lif (*Leukemia Inhibitory Factor*), welches wiederum eine vermehrte Synthese von Edn2 (*Endothelin-2*) in den Photorezeptorenzellen verursacht [Joly, 2008]. Edn2 wirkt dabei als unspezifisches Stresssignal und führt durch Bindung an EdnRB (*Endothelin Rezeptor B*) der Müllerzellen zu deren gesteigerten Aktivierung [Rattner, 2005] und dadurch zur vermehrten Expression von neuroprotektiv wirksamen FGF-2 [Russo, 2004;

Joly, 2008]. Ferner zeigte sich, dass es in Lif<sup>-/-</sup> defizienten Mäusen sowie durch die Unterbrechung dieses Signalweges mittels Edn2-Rezeptor-Antikörper zur vermehrten Induktion von Apoptosen in Photorezeptorzellen kam [Joly, 2008]. Da in weiteren Versuchen nachgewiesen werden konnte, dass eine durch NMDA verursachte exzitotoxische Schädigung der Retina ebenfalls zu einer erhöhten Expression von GFAP, Lif und Edn2 führte und die zusätzliche intravitreale Injektion von Norrin diese Expression weiter erhöhte, deutet vieles darauf hin [Seitz, 2010], dass der beschriebene Lif/ Edn2-Signalweg ebenfalls durch die spezifische Schädigung der retinalen Ganglienzellen durch NMDA aktiviert wird.

Unterstützt wird diese Hypothese, da Norrin auch in Müllerzellkulturen die Aktivierung des Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs induzieren kann [Seitz, 2010]. Demgegenüber ist der dem direkten neuroprotektiven Effekt von Norrin auf immortalisierte retinale Ganglienzellen zugrundeliegende Mechanismus zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch unklar [Seitz, 2010] und scheint *in vivo* eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Norrin einen wesentlichen protektiven Einfluss auf das Überleben geschädigter retinaler Ganglienzellen ausübt. Die genaue Aufklärung der diesem Effekt zugrunde liegenden Mechanismen muss allerdings noch in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Insgesamt erscheinen Norrin und die damit verknüpften Signalwege ein vielversprechender therapeutischer Angriffspunkt für Krankheiten, wie beispielsweise das Glaukom, welche unter anderem durch die Schädigung und Abnahme der retinalen Ganglienzellen zum fortschreitenden Verlust des Augenlichts führen können, zu sein.

## 6 Zusammenfassung

Beim Norrie-Syndrom handelt es sich um eine angeborene okulo-akustisch-zerebrale degenerative Erkrankung, welche durch verschiedene Mutationen im *NDP*- (*Norrie Disease Pseudoglioma*) Gen zur Erblindung und häufig auch zu einer progressiven sensorisch-neuralen Taubheit und einer zunehmenden mentalen Retardierung führt. Neben dem Norrie-Syndrom sind auch weitere Augenerkrankungen, wie beispielsweise die familiäre exsudative Vitreopathie (FEVR) oder die Frühgeborenenretinopathie (ROP) mit Mutationen im *NDP*-Gen assoziiert. Gemeinsames Merkmal all dieser Erkrankungen ist die gestörte Entwicklung der retinalen Blutgefäße. Beim Produkt des *NPD*-Gens handelt es sich um ein aus 133 Aminosäuren bestehendes sezerniertes Polypeptid, dessen Funktion bis heute nicht abschließend geklärt ist. Beobachtungen an gentechnisch veränderten Mäusen zeigten, dass Norrin nicht nur bei der Angiogenese der retinalen Gefäße eine wesentliche Rolle spielt sondern auch einen protektiven Effekt auf retinale Ganglienzellen ausübt.

Aufgrund dieser Beobachtung war das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit die potentielle protektive Rolle von Norrin auf retinale Ganglienzellen zu untersuchen. Hierfür sollte sowohl ein *in vivo* als auch ein *in vitro* Schadensmodell etablieren werden. Anhand dieser Modelle sollte daraufhin das neuroprotektive Potential von Norrin näher untersucht und die dahinter stehenden Mechanismen analysiert werden.

*In vitro* konnte nach der Differenzierung von RGC-5 mittels Staurosporin (SS) und dem anschließenden Entzug von Serum und letztlich von Wachstumsfaktoren ein Schadensmodell etabliert werden, an dem ebenfalls die neuroprotektiven Eigenschaften von Norrin analysiert wurden. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von Norrin zu einer konzentrationsunabhängigen Zunahme der Anzahl der RGC-5 führte. Im Anschluss an diese Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass dieser neuroprotektive Effekt von Norrin auf die immortalisierten retinalen Ganglienzellen nicht durch Dkk-1 gehemmt werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass der kanonische Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg hierbei nur eine untergeordnete Rolle spielt und der direkte neuroprotektive Effekt von Norrin über einen zum jetzigen Zeitpunkt noch unklaren Mechanismus vermittelt wird.

*In vivo* stellte die intravitreale Injektion von 10 mM NMDA (*N-Methyl-D-Aspartat*) ein verwendbares Schadensmodell dar, welches zur exzitotoxischen Schädigung der retinalen Ganglienzellen führte und anhand dessen die neuroprotektive Wirkung von Norrin *in vivo* untersucht werden konnte. Die zusätzliche Injektion von Norrin führte dabei zu einem signifikanten Anstieg der überlebenden retinalen Ganglienzellen, welcher durch die Behandlung mit Dkk-1 (*Dickkopf-1*) fast vollständig aufgehoben werden konnte. Diese Experimente legen den Schluss nahe, dass Norrin seine neuroprotektiven Eigenschaften überwiegend durch die Aktivierung des kanonischen Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs vermittelt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass Norrin eine gesteigerte Synthese von neuroprotektiven Faktoren, wie beispielsweise BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*) oder FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor-2*) induziert. Dies führte zu der Hypothese, welche im Anschluss an diese Arbeit bestätigt werden konnte, dass Müllerzellen eine zentrale Rolle bei der Protektion der retinalen Ganglienzellen spielen.

Insgesamt konnte in der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass Norrin einen bedeutenden neuroprotektiven Effekt auf das Überleben geschädigter retinaler Ganglienzellen besitzt. Die weitere Aufklärung der diesem Effekt zugrundeliegenden Mechanismen sollte daher Ziel weiterer Arbeiten sein, da dadurch völlig neue Therapiestrategien für Krankheiten, die durch den Untergang von retinalen Ganglienzellen gekennzeichnet sind, wie beispielsweise das Glaukom, erschlossen werden könnten.

## 7 Anhang

### 7.1 Literaturverzeichnis

- Aberle, Hermann, Andreas Bauer, Jorg Stappert, Andreas Kispert, und Rolf Kemler. 1997. "β-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway". *EMBO J* 16 (13) (Juli 1): 3797-3804.
- Agar, Ashish, S Li, Neeraj Agarwal, Minas T Coroneo, und MA Hill. 2006. "Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure". *Brain Research* 1086 (1) (Mai 1): 191-200.
- Agarwal, Neeraj, R Agarwal, DM Kumar, Amber Ondricek, Abbot F Clark, Robert J Wordinger, und I-H Pang. 2007. "Comparison of expression profile of neurotrophins and their receptors in primary and transformed rat retinal ganglion cells". *Molecular Vision* 13: 1311-1318.
- Akiyama, T. 2000. Wnt/beta-catenin signaling". *Cytokine & Growth Factor Reviews* 11 (4) (Dezember): 273-282.
- Aoun, Paul, James W Simpkins, und Neeraj Agarwal. 2003. "Role of PPAR-gamma ligands in neuroprotection against glutamate-induced cytotoxicity in retinal ganglion cells". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44 (7) (Juli): 2999-3004.
- Apple, D. J., G. A. Fishman, M. F. Goldberg. 1974. "Ocular histopathology of Norrie's disease". *Am J Ophthalmol* 78: 196-203.
- Bürgi, Sandra, Marijana Samardzija, und Christian Grimm. 2009. "Endogenous leukemia inhibitory factor protects photoreceptor cells against light-induced degeneration". *Molecular Vision* 15: 1631-1637.
- Bafico, Anna, G Liu, Abraham Yaniv, Arnona Gazit, und Stuart A. Aaronson. 2001. "Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow". *Nat Cell Biol* 3 (7) (Juli): 683-686.
- Bergen, A. A., W. Berger, Z. Y. Chen, P. J. Diergaard, E. M. Bleeker-Wagemakers, E. M. Battinelli, M. Warburg, H. H. Ropers, I. W. Craig. 1994. "Norrie Disease. In Molecular Genetics of Inherited Eye Disorders". AF Wright and Jay Barrie. Harwood Academic Publishers: 321-338.
- Berger, W., A. Meindl, T. J. van de Pol, F. P. Cremers, H. H. Ropers, C. Doerner, A. Monaco, A. A. Bergen, R. Lebo, M. Warburg, L. Zergollen, B. Lorenz, A. Gal, E. M. Bleeker-Wagenmakers, T. Meitinger. 1992. "Isolation of a candidate gene for Norrie disease by positional cloning". *Nat Genet.* 1 (3): 199-203.

- Berger, W., D. van de Pol, D. Bachner, F. Oerlemans, H. Winkens, H. Hameister, B. Wieringa, W. Hendriks, und H.-H. Ropers. 1996. "An Animal Model for Norrie Disease (ND): Gene Targeting of the Mouse Nd Gene". *Human Molecular Genetics* 5 (1): 51-59.
- Berger, W. 1998. "Molecular dissection of the Norrie disease." *Acta Anat. (Basel)* 162 (2-3): 95-100.
- Berridge, M V, und A S Tan. 1993. "Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303 (2) (Juni): 474-482.
- Black, G. 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 (11): 2031-2035.
- Bonfanti, L, E Strettoi, S Chierzi, M C Cenni, und XH Liu, Martinou J-C. 1996. "Protection of retinal ganglion cells from natural and axotomy-induced cell death in neonatal transgenic mice overexpressing bcl-2". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (13) (Juli 1): 4186-4194.
- Bringmann, Andreas, Lanors Landiev, Thomas Pannicke, Antje Wurm, Margrit Hollborn, Peter Wiedemann, Neville N Osborne, und Andreas Reichenbach. 2009. "Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects". *Progress in Retinal and Eye Research* 28 (6) (November): 423-451.
- Bringmann, Andreas, Thomas Pannicke, Jens Grosche, Mike Francke, Peter Wiedemann, Serguei N Skatchkov, Neville N Osborne, und Andreas Reichenbach. 2006. "Müller cells in the healthy and diseased retina". *Progress in Retinal and Eye Research* 25 (4) (Juli): 397-424.
- Cáceres, A, G A Bunker, und L Binder. 1986. "Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 6 (3) (März): 714-722.
- Cadigan, K. M. 2006. "Wnt signaling: complexity at the surface". *Journal of Cell Science* 119 (3): 395-402.
- Cappuccio, Irene, Agata Calderone, Carla L Busceti, Francesca Biagioni, Fabrizio Pontarelli, Valeria Bruno, Marianna Storto, 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 (10) (März 9): 2647-2657.

- Cayouette, M, D Behn, M Sendtner, P Lachapelle, und C Gravel. 1998. "Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (22) (November 15): 9282-9293.
- Chaum, Edward. 2003. "Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective". *Journal of Cellular Biochemistry* 88 (1): 57-75.
- Chen, L, K Wang, Y. Shao, J. Huang, X Li, J. Shan, D Wu, und JJ Zheng. 2008. "Structural Insight into the Mechanisms of Wnt Signaling Antagonism by Dkk". *Journal of Biological Chemistry* 283 (34): 23364-23370.
- Chen, S, D C Guttridge, Z You, Z Zhang, A Fribley, M W Mayo, J Kitajewski, und CY Wang. 2001. "Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription". *The Journal of Cell Biology* 152 (1): 87-96.
- Chen, Z-Y., E.M. Battinelli, A. Fielder, S. Bundey, K Sims, X.O. Breakefield, und IW Craig. 1993. "A mutation in the Norrie disease gene (NDP) associated with X-linked familial exudative vitreoretinopathy". *Nat Genet* 5 (2) (Oktober): 180-183.
- Chomczynski, P, und N Sacchi. 1987. "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Analytical Biochemistry* 162 (1) (April): 156-159.
- Chung, Hun-Taeg, Hyun-Ock Pae, Byung-Min Choi, Timothy R. Billiar, und Young-Myeong Kim. 2001. "Nitric Oxide as a Bioregulator of Apoptosis". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282 (5) (April 20): 1075-1079.
- Chynn, Emil W., David S. Walton, Lauri B. Hahn, und Thaddeus P. Dryja. 1996. "Norrie Disease: Diagnosis of a Simplex Case by DNA Analysis". *Archives of Ophthalmology* 114 (9) (September 1): 1136-1138.
- Coyle, J T, und P Puttfarcken. 1993. "Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders". *Science (New York, N.Y.)* 262 (5134) (Oktober 29): 689-695.
- Davies, K J. 1999. "The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress". *IUBMB Life* 48 (1) (Juli): 41-47.
- De la Chapelle A., E. M. Sankila, M. Lindlof, P. Aula, R. Norio. 1985. "Norrie disease caused by a gene deletion allowing carrier detection and prenatal diagnosis." *Clin Genet.* 28 (4): 317-320.
- Dickinson, Joanne L, Michèle M Sale, Abraham Passmore, Liesel M FitzGerald, Catherine M Wheatley, Kathryn P Burdon, Jamie E Craig, u. a. 2006. "Mutations in the NDP gene: contribution to Norrie disease, familial exudative vitreoretinopathy and retinopathy of prematurity". *Clinical & Experimental Ophthalmology* 34 (7) (Oktober): 682-688.

- Donnai, D, R C Mountford, und A P Read. 1988. "Norrie disease resulting from a gene deletion: clinical features and DNA studies". *Journal of Medical Genetics* 25 (2) (Februar): 73-78.
- Drenser, KA, Alice Fecko, Wendy Dailey, und Michael T Trese. 2007. "A characteristic phenotypic retinal appearance in Norrie disease". *Retina (Philadelphia, Pa.)* 27 (2) (Februar): 243-246.
- 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 (11) (November): 1321-1328.
- Fan, Wei, Neeraj Agarwal, MD Kumar, und Nigel G F Cooper. 2005. "Retinal ganglion cell death and neuroprotection: Involvement of the CaMKIIalpha gene". *Brain Research. Molecular Brain Research* 139 (2) (Oktober 3): 306-316.
- Frassetto, Laura J, Christopher R Schlieve, Christopher J Lieven, Amy A Utter, Mathew V Jones, Neeraj Agarwal, und LA Levin. 2006. "Kinase-dependent differentiation of a retinal ganglion cell precursor". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47 (1): 427-438.
- Fridovich, I. 1995. "Superoxide radical and superoxide dismutases". *Annual Review of Biochemistry* 64: 97-112.
- Gal, A., B. Wieringa, D. F. Smeets, L. Bleeker-Wagenmakers, H. H. Ropers. 1986. "Submicroscopic interstitial deletion of the X chromosome explains a complex genetic syndrome dominated by Norrie disease". *Cytogenet Cell Genet.* 42 (4): 219-224.
- 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 (2) (Februar): 181-189.
- Gavrieli, Y, Y Sherman, und S A Ben-Sasson. 1992. "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation". *The Journal of Cell Biology* 119 (3) (November): 493-501.
- Gordon, Michael D, und Roel Nusse. 2006. "Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors". *The Journal of Biological Chemistry* 281 (32) (August 11): 22429-22433.
- Haefliger, I O, N Pellanda, J C Fleischhauer, M Gekkiewa, und J Flammer. 2001. "Neuroprotection in glaucoma. What is the current status?". *Der Ophthalmologe: Zeitschrift Der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 98 (6) (Juni): 564-567.

- Haider, M Z, L V Devarajan, M Al-Essa, B S Srivastva, H Kumar, R Azad, und N Rashwan. 2001. "Retinopathy of prematurity: mutations in the Norrie disease gene and the risk of progression to advanced stages". *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society* 43 (2) (April): 120-123.
- Halpin, Chris, Grace Owen, Gustavo A Gutiérrez-Espeleta, Katherine Sims, Heidi L Rehm. 2005. "Audiolgic features of Norrie disease". *The Annals of Otology, Rhinology and Laryngology* 114 (7) (Juli): 533-538.
- Harendra de Silva, D G, und D B de Silva. 1988. "Norrie's disease in an Asian family". *The British Journal of Ophthalmology* 72 (1): 62-64.
- Hartzler, M K, M Cheng, X Liu, und B S Shastry. 1999. "Localization of the Norrie disease gene mRNA by in situ hybridization". *Brain Research Bulletin* 49 (5) (Juli 15): 355-358.
- Higuchi, R, C Fockler, G Dollinger, und R Watson. 1993. "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions". *Bio/Technology (Nature Publishing Company)* 11 (9) (September): 1026-1030.
- Huerta, Sergio, Emily J Goulet, Sara Huerta-Yepez, und Edward H Livingston. 2007. "Screening and detection of apoptosis". *The Journal of Surgical Research* 139 (1) (Mai 1): 143-156.
- Ikeda, S, S Kishida, H Yamamoto, H Murai, S Koyama, und A Kikuchi. 1998. "Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin". *The EMBO Journal* 17 (5) (März 2): 1371-1384.
- Inokuchi, Yuta, Masamitsu Shimazawa, Yoshimi Nakajima, Shinsuke Suemori, Satoshi Mishima, und Hideaki Hara. 2006. "Brazilian green propolis protects against retinal damage in vitro and in vivo". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* 3 (1) (März): 71-77.
- Inomata, Yasuya, Akira Hirata, Takahisa Koga, A Kimura, Dhirendra P Singh, Toshimichi Shinohara, und Hidenobu Tanihara. 2003. "Lens epithelium-derived growth factor: neuroprotection on rat retinal damage induced by N-methyl-D-aspartate". *Brain Research* 991 (1-2) (November 21): 163-170.
- 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 Hejtmancik. 2004. "Autosomal recessive familial exudative vitreoretinopathy is associated with mutations in LRP5". *American Journal of Human Genetics* 75 (5) (November): 878-884.

- Johnson, J W, und P Ascher. 1987. "Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons". *Nature* 325 (6104) (Februar 5): 529-531.
- Johnson, J W, und P Ascher. 1990. "Voltage-dependent block by intracellular Mg<sup>2+</sup> of N-methyl-D-aspartate-activated channels". *Biophysical Journal* 57 (5) (Mai): 1085-1090.
- 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 (51) (Dezember 17): 13765-13774.
- Joly, Sandrine, Vincent Pernet, Sylvain Chemtob, Adriana Di Polo, und Pierre Lachapelle. 2007. "Neuroprotection in the juvenile rat model of light-induced retinopathy: evidence suggesting a role for FGF-2 and CNTF". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48 (5) (Mai): 2311-2320.
- Junge, Harald J, S Yang, Jeremy B Burton, Kim Paes, Xiao Shu, Dorothy M French, Mike Costa, Dennis S Rice, und W Ye. 2009. "TSPAN12 regulates retinal vascular development by promoting Norrin- but not Wnt-induced FZD4/beta-catenin signaling". *Cell* 139 (2) (Oktober 16): 299-311.
- Kawano, Yoshiaki, und Robert Kypta. 2003. "Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway". *Journal of Cell Science* 116 (Pt 13) (Juli 1): 2627-2634.
- Kimelman, D, und W Xu. 2006. "beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective". *Oncogene* 25 (57) (Dezember 4): 7482-7491.
- Koriyama, Yoshiki, Mamoru Ohno, T Kimura, und Satoru Kato. 2009. "Neuroprotective effects of 5-S-GAD against oxidative stress-induced apoptosis in RGC-5 cells". *Brain Research* 1296 (November 3): 187-195.
- Krishnamoorthy, R R, P Agarwal, G Prasanna, K Vopat, W Lambert, H J Sheedlo, IH Pang, u. a. 2001. "Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line". *Brain Research. Molecular Brain Research* 86 (1-2): 1-12.
- Lam, TT, A S Abler, J M Kwong, und M O Tso. 1999. "N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced apoptosis in rat retina". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40 (10) (September): 2391-2397.
- Lau, Anthony, und Michael Tymianski. 2010. "Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration". *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 460 (2) (Juli): 525-542.
- 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 (6) (Juni): 417-424.

- Lebrun-Julien, Frédéric, Laure Duplan, Vincent Pernet, Ingrid Osswald, Przemyslaw Sapieha, Philippe Bourgeois, Kathleen Dickson, Derek Bowie, Philip A Barker, und Adriana Di Polo. 2009. "Excitotoxic death of retinal neurons in vivo occurs via a non-cell-autonomous mechanism". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (17) (April 29): 5536-5545.
- Li, Y, C L Schlamp, R W Nickells. 1999. "Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40 (5) (April): 1004-1008.
- Li, Yonghe, Wenyan Lu, Taj D King, C-C Liu, Gautam N Bijur, und Guojun Bu. 2010. "Dkk1 stabilizes Wnt co-receptor LRP6: implication for Wnt ligand-induced LRP6 down-regulation". *PLoS One* 5 (6): e11014.
- Lieven, Christopher J, Lucia E Millet, Mark J Hoegger, und LA Levin. 2007. "Induction of axon and dendrite formation during early RGC-5 cell differentiation". *Experimental Eye Research* 85 (5) (November): 678-683.
- Lin, Song, Mei Cheng, Wendelin Dailey, K Drenser, und S Chintala. 2009. "Norrin attenuates protease-mediated death of transformed retinal ganglion cells". *Molecular Vision* 15: 26-37.
- Liu, Q, Won-Kyu Ju, Jonathan G Crowston, Fang Xie, George Perry, Mark A Smith, James D Lindsey, und Robert N Weinreb. 2007. "Oxidative stress is an early event in hydrostatic pressure induced retinal ganglion cell damage". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48 (10) (Oktober): 4580-4589.
- 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 (4) (Dezember): 402-408.
- Luhmann, Ulrich F O. 2004. "Aufklärung molekularer Pathogenesemechanismen des Norrie-Syndroms". *Dissertation im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin*.
- Luhmann, Ulrich F O, Dominique Meunier, Wei Shi, Angela Lüttges, Christiane Pfarrer, Reinald Fundele, und Wolfgang Berger. 2005. "Fetal loss in homozygous mutant Norrie disease mice: a new role of Norrin in reproduction". *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 42 (4) (August): 253-262.
- Lynch, David R und Rodney P Guttmann. 2002. "Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes". *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 300 (3) (März): 717-723.
- Machida, S, P Chaudhry, T Shinohara, D P Singh, V N Reddy, L T Chylack, P A Sieving, und R A Bush. 2001. "Lens epithelium-derived growth factor promotes photoreceptor survival in light-damaged and RCS rats". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42 (5) (April): 1087-1095.

- Maher, Pamela, und Anne Hanneken. 2005. "The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46 (2) (Februar): 749-757.
- Manabe, Shin-Ichi, Zezong Gu, Stuart A Lipton. 2005. "Activation of matrix metalloproteinase-9 via neuronal nitric oxide synthase contributes to NMDA-induced retinal ganglion cell death". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46 (12) (Dezember): 4747-4753.
- Mao, B, W Wu, Y Li, D Hoppe, P Stannek, A Glinka, und C Niehrs. 2001. "LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins". *Nature* 411 (6835) (Mai 17): 321-325.
- Martins, Rodrigo A P, Mariana S Silveira, Marco R Curado, Angela I Police, und Rafael Linden. 2005. "NMDA receptor activation modulates programmed cell death during early post-natal retinal development: a BDNF-dependent mechanism". *Journal of Neurochemistry* 95 (1) (Oktober): 244-253.
- Masckauchán, T Néstor H, und Jan Kitajewski. 2006. "Wnt/Frizzled signaling in the vasculature: new angiogenic factors in sight". *Physiology (Bethesda, Md.)* 21 (Juni): 181-188.
- Meindl, A, W Berger, T Meitinger, D van de Pol, H Achatz, C Dörner, M Haasemann, H Hellebrand, A Gal, und F Cremers. 1992. "Norrie disease is caused by mutations in an extracellular protein resembling C-terminal globular domain of mucins". *Nature Genetics* 2 (2) (Oktober): 139-143.
- Meitinger, T, A Meindl, P Bork, B Rost, C Sander, M Haasemann, und J Murken. 1993. "Molecular modelling of the Norrie disease protein predicts a cystine knot growth factor tertiary structure". *Nature Genetics* 5 (4) (Dezember): 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 (2) (Februar 5): 304-317.
- Moy, F J, M Safran, A P Seddon, D Kitchen, P Böhlen, D Aviezer, A Yayon, und R Powers. 1997. "Properly oriented heparin-decasaccharide-induced dimers are the biologically active form of basic fibroblast growth factor". *Biochemistry* 36 (16) (April 22): 4782-4791.
- Nakajima, Yoshimi, Yuta Inokuchi, Masahiro Nishi, Masamitsu Shimazawa, Kazumasa Otsubo, und Hideaki Hara. 2008. "Coenzyme Q10 protects retinal cells against oxidative stress *in vitro* and *in vivo*". *Brain Research* 1226 (August 21): 226-233.
- Nakamura, REI, Dale D Hunter, Hyun Yi, William J Brunk, und Abigail S Hackam. 2007. "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.

- Niehrs, C. 2006. "Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators". *Oncogene* 25 (57) (Dezember 4): 7469-7481.
- Nieto, Paula S, Victoria A Acosta-Rodríguez, Diego J Valdez, und Mario E Guido. 2010. "Differential responses of the mammalian retinal ganglion cell line RGC-5 to physiological stimuli and trophic factors". *Neurochemistry International* 57 (3) (Oktober): 216-226.
- Nikopoulos, Konstantinos, Hanka Venselaar, Rob W J Collin, Rosa Riveiro-Alvarez, F Nienke Boonstra, Johanna M M Hooymans, Arijit Mukhopadhyay, u. a. 2010. "Overview of the mutation spectrum in familial exudative vitreoretinopathy and Norrie disease with identification of 21 novel variants in FZD4, LRP5, and NDP". *Human Mutation* 31 (6) (Juni): 656-666.
- Norrie, G. 1927. "Causes of blindness in children". *Acta Ophthalmol. (Copenhagen)* 5: 357-386.
- Ohlmann, Andreas, Michael Scholz, Andreas Goldwich, Bharesh K Chauhan, Kristiane Hudl, AV Ohlmann, Eberhart Zrenner, u. a. 2005. "Ectopic norrin induces growth of ocular capillaries and restores normal retinal angiogenesis in Norrie disease mutant mice". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (7) (Februar 16): 1701-1710.
- 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 (2) (Februar): 108-112.
- Pang, IH, E M Wexler, S Nawy, L DeSantis, und M A Kapin. 1999. "Protection by eliprodil against excitotoxicity in cultured rat retinal ganglion cells". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40 (6) (Mai): 1170-1176.
- Perez-Vilar, J, und RL Hill. 1997. "Norrie disease protein (norrin) forms disulfide-linked oligomers associated with the extracellular matrix". *The Journal of Biological Chemistry* 272 (52) (Dezember 26): 33410-33415.
- Poulter, James A, Manir Ali, David F Gilmour, A Rice, Hiroyuki Kondo, Kenshi Hayashi, David A Mackey, u. a. 2010. "Mutations in TSPAN12 cause autosomal-dominant familial exudative vitreoretinopathy". *American Journal of Human Genetics* 86 (2) (Februar 12): 248-253.
- Promega Corporation. 2007. "DeadEnd<sup>TM</sup> Fluorometric TUNEL System". *Technical Bulletin* (April 07).
- Raff, M C, B A Barres, J F Burne, H S Coles, Y Ishizaki, und M D Jacobson. 1993. "Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system". *Science (New York, N.Y.)* 262 (5134) (Oktober 29): 695-700.

- Rattner, Amir, und Jeremy Nathans. 2005. "The genomic response to retinal disease and injury: evidence for endothelin signaling from photoreceptors to glia". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (18) (Mai 4): 4540-4549.
- Rehm, H L, G A Gutiérrez-Espeleta, R Garcia, G Jiménez, U Khetarpal, J M Priest, KB Sims, B J Keats, und C C Morton. 1997. "Norrie disease gene mutation in a large Costa Rican kindred with a novel phenotype including venous insufficiency". *Human Mutation* 9 (5): 402-408.
- Rehm, Heidi L, D-S Zhang, M Christian Brown, Barbara Burgess, Chris Halpin, Wolfgang Berger, Cynthia C Morton, David P Corey, und Zheng-Yi Chen. 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 (11) (Juni 1): 4286-4292.
- Rey, Jean-Philippe und Debra L Ellies. 2010. "Wnt modulators in the biotech pipeline". *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 239 (1): 102-114.
- Richter, M, J Gottanka, C A May, U Welge-Lüssen, W Berger, und E Lütjen-Drecoll. 1998. "Retinal vasculature changes in Norrie disease mice". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 39 (12) (November): 2450-2457.
- Riveiro-Alvarez, Rosa, Maria José Trujillo-Tiebas, Ascension Gimenez-Pardo, Maria Garcia-Hoyos, Diego Cantalapiedra, Isabel Lorda-Sánchez, Marta Rodriguez de Alba, Carmen Ramos, und Carmen Ayuso. 2005. "Genotype-phenotype variations in five Spanish families with Norrie disease or X-linked FEVR". *Molecular Vision* 11: 705-712.
- Robitaille, JM, B Zheng, Karin Wallace, M Jill Beis, Cuneyt Tatlidil, J Yang, Tom G Sheidow, u. a. 2010. "The role of Frizzled-4 mutations in familial exudative vitreoretinopathy and Coats disease". *The British Journal of Ophthalmology* (November 21). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21097938>.
- Robitaille, J, Marcia L E MacDonald, Ajamete Kaykas, Laird C Sheldahl, Jutta Zeisler, Marie-Pierre Dubé, L-H Zhang, u. a. 2002. "Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy". *Nature Genetics* 32 (2) (Oktober): 326-330.
- Rock, Nathan, und SK Chintala. 2008. "Mechanisms regulating plasminogen activators in transformed retinal ganglion cells". *Experimental Eye Research* 86 (3) (März): 492-499.
- Romeis, B. 1989. "Mikroskopische Technik". 17. Auflage. *Urban und Schwarzenberg Verlag München*.

- Rosi, Maria Cristina, Ilaria Luccarini, Cristina Grossi, Anna Fiorentini, Maria Grazia Spillantini, Antonella Prisco, Carla Scali, u. a. 2010. "Increased Dickkopf-1 expression in transgenic mouse models of neurodegenerative disease". *Journal of Neurochemistry* 112 (6) (März): 1539-1551.
- Rubin, L L. 1997. "Neuronal cell death: when, why and how". *British Medical Bulletin* 53 (3): 617-631.
- Ruether, K, D van de Pol, G Jaissle, W Berger, R P Tornow, und E Zrenner. 1997. "Retinoschisislike alterations in the mouse eye caused by gene targeting of the Norrie disease gene". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 38 (3) (März): 710-718.
- Russo, Vincenzo C, E Andaloro, S A Fornaro, S Najdovska, D F Newgreen, L A Bach, und G A Werther. 2004. "Fibroblast growth factor-2 over-rides insulin-like growth factor-I induced proliferation and cell survival in human neuroblastoma cells". *Journal of Cellular Physiology* 199 (3) (Juni): 371-380.
- Schmittgen, Thomas D, und Kenneth J Livak. 2008. "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method". *Nature Protocols* 3 (6): 1101-1108.
- Schröder B., L. Hesse, W. Bruck, A. Gal. 1997. "Histopathological and immunohistological findings associated with a null mutation in the Norrie disease gene". *Ophthalmic Genet.* 18 (2): 71-77.
- Schuettauf, Frank, Christian Vorwerk, Rita Naskar, Anton Orlin, Kristine Quinto, David Zurakowski, Nadine S Dejneka, Ronald L Klein, Edward M Meyer, und Jean Bennett. 2004. "Adeno-associated viruses containing bFGF or BDNF are neuroprotective against excitotoxicity". *Current Eye Research* 29 (6) (Dezember): 379-386.
- Schultze, W H. 1972. "Über das Paraphenylendiamin in der histologischen Färbetechnik und über eine neue Schnellfärbmethode der Nervenmarkscheide am Gefrierschnitt". *Zentralbl. Pathol.*: 36: 639-640.
- Schwartzman, R A, und J A Cidlowski. 1993. "Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death". *Endocrine Reviews* 14 (2) (April): 133-151.
- Seitz, R., S. Hackl, T. Seibuchner, E. R. Tamm, und A. Ohlmann. 2010. "Norrin Mediates Neuroprotective Effects on Retinal Ganglion Cells via Activation of the Wnt/β-Catenin Signaling Pathway and the Induction of Neuroprotective Growth Factors in Muller Cells". *Journal of Neuroscience* 30 (17): 5998-6010.
- Seménov, M V, K Tamai, B K Brott, M Kühl, S Sokol, und X He. 2001. "Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6". *Current Biology: CB* 11 (12) (Juni 26): 951-961.
- 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 (5) (Mai): 651-655.

- Shen, Yin, X-L Liu, und X-L Yang. 2006. "N-methyl-D-aspartate receptors in the retina". *Molecular Neurobiology* 34 (3) (Dezember): 163-179.
- Shimazawa, Masamitsu, Tetsumori Yamashima, Neeraj Agarwal und Hideaki Hara. 2005. "Neuroprotective effects of minocycline against in vitro and in vivo retinal ganglion cell damage". *Brain Research* 1053 (1-2) (August 16): 185-194.
- Smallwood, PM, J Williams, Q Xu, Daniel J Leahy, und Jeremy Nathans. 2007. "Mutational analysis of Norrin-Frizzled4 recognition". *The Journal of Biological Chemistry* 282 (6) (Februar 9): 4057-4068.
- Strom, R C, und RW Williams. 1998. "Cell production and cell death in the generation of variation in neuron number". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (23) (Dezember 1): 9948-9953.
- Tanck, J J. 2004. "Studie zur morphometrischen Auswertung peripherer Nerven". *Dissertation am Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München*.
- Tatsumi, Yasuko, Akiyasu Kanamori, Azusa Nagai-Kusuhara, Yoriko Nakanishi, Neeraj Agarwal, Akira Negi, und M Nakamura. 2008. "Nipradilol protects rat retinal ganglion cells from apoptosis induced by serum deprivation in vitro and by diabetes in vivo". *Current Eye Research* 33 (8) (August): 683-692.
- Thompson, Alex F, und LA Levin. 2010. "Neuronal differentiation by analogs of staurosporine". *Neurochemistry International* 56 (4) (März): 554-560.
- Toledo, Enrique M, Marcela Colombres, und Nibaldo C Inestrosa. 2008. "Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation". *Progress in Neurobiology* 86 (3) (November): 281-296.
- Unoki, K, und M M LaVail. 1994. "Protection of the rat retina from ischemic injury by brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, and basic fibroblast growth factor". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 35 (3) (März): 907-915.
- Van Bergen, Nicole J, John P M Wood, Glyn Chidlow, Ian A Trounce, Robert J Casson, Won-Kyu Ju, Robert N Weinreb, und Jonathan G Crowston. 2009. "Recharacterization of the RGC-5 retinal ganglion cell line". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50 (9) (September): 4267-4272.
- Vitt, U A, S Y Hsu, und A J Hsueh. 2001. "Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules". *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 15 (5) (Mai): 681-694.
- Warburg, M. 1966. "Norrie's disease. A congenital progressive oculo-acoustico-cerebral degeneration." *Acta Ophthalmol. (Copenhagen) Suppl.* 89: 1-145.

- Warburg, M. 1968. "Norrie's disease." *J Ment Defic Res.* 7 (12): 247-251.
- Warburg, M. 1975. "Norrie's disease-differential diagnosis and treatment". *Acta Ophthalmol. (Copenhagen)* 53: 217-236.
- Wen, R, Y Song, T Cheng, M T Matthes, D Yasumura, M M LaVail, und R H Steinberg. 1995. "Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 15 (11) (November): 7377-7385.
- Williams, RW, R C Strom, D S Rice, und D Goldowitz. 1996. "Genetic and environmental control of variation in retinal ganglion cell number in mice". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (22) (November 15): 7193-7205.
- Wood, John P M, Gerassimos Lascaratos, Anthony J Bron, und Neville N Osborne. 2007. "The influence of visible light exposure on cultured RGC-5 cells". *Molecular Vision* 14: 334-344.
- Wu, W-C, K Drenser, M Trese, Antonio Capone, und Wendy Dailey. 2007. "Retinal phenotype-genotype correlation of pediatric patients expressing mutations in the Norrie disease gene". *Archives of Ophthalmology* 125 (2) (Februar): 225-230.
- Xia, Chun-Hong, H Liu, Debra Cheung, M Wang, C Cheng, Xin Du, Bo Chang, Bruce Beutler, und Xiaohua Gong. 2008. "A model for familial exudative vitreoretinopathy caused by LPR5 mutations". *Human Molecular Genetics* 17 (11) (Juni 1): 1605-1612.
- Xu, Q, Y Wang, Alain Dabdoub, PM Smallwood, J Williams, Chad Woods, Matthew W Kelley, u. a. 2004. "Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair". *Cell* 116 (6) (März 19): 883-895.
- Ye, X, P Smallwood, und Jeremy Nathans. 2011. "Expression of the Norrie disease gene (Ndp) in developing and adult mouse eye, ear, and brain". *Gene Expression Patterns: GEP* 11 (1-2) (Februar): 151-155.
- Ye, X, Y Wang, Hugh Cahill, Minzhong Yu, Tudor C Badea, PM Smallwood, Neal S Peachey, und Jeremy Nathans. 2009. "Norrin, frizzled-4, and Lrp5 signaling in endothelial cells controls a genetic program for retinal vascularization". *Cell* 139 (2) (Oktober 16): 285-298.
- Ye, X, Y Wang, und Jeremy Nathans. 2010. "The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease". *Trends in Molecular Medicine* 16 (9) (September): 417-425.
- Yi, Hyun, REI Nakamura, O Mohamed, Daniel Dufort, und Abigail S Hackam. 2007. "Characterization of Wnt signaling during photoreceptor degeneration". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48 (12) (Dezember): 5733-5741.

- You, L, B He, Kazutsugu Uematsu, Z Xu, Julien Mazieres, Amie Lee, Frank McCormick, und David M Jablons. 2004. "Inhibition of Wnt-1 signaling induces apoptosis in beta-catenin-deficient mesothelioma cells". *Cancer Research* 64 (10) (Mai 15): 3474-3478.
- Zerlin, Marielba, Martin A Julius, und Jan Kitajewski. 2008. "Wnt/Frizzled signaling in angiogenesis". *Angiogenesis* 11 (1): 63-69.
- Zorn, A M. 2001. "Wnt signalling: antagonistic Dickkopfs". *Current Biology: CB* 11 (15) (August 7): R592-595.

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

Tab. 46 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
∞	Unendlich
%	Prozent
μ	mikro ( $10^{-6}$ )
°C	Grad Celsius
x	-fach/mal
Abb.	Abbildung
ad	Zu
a.d.	destilliertes Wasser
BDFN	Brain Derived Neurotrophic Factor
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
d	Tage
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff)
DDSA	2-Dodecenylsuccinic-acid-anhydrid
Dkk-1	Dickkopf-1
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Extinktion

EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
et al.	und andere („et alia“)
FBS	Fötales Kälberserum
FGF2	Basic Fibroblast Growth Factor
fw	Forward
g	Gramm
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCL	Ganglienzellschicht
h	Stunde
H <sub>2</sub> O dest.	einfach destilliertes Wasser
INL	innere Körnerschicht
IPL	innere plexiforme Schicht
<i>in vitro</i>	außerhalb des lebenden Organismus
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
J	Joule
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LEDGF	Lens Epithelial Derived Growth Factor
m	Meter oder milli ( $10^{-3}$ )
M	Molar (Mol pro Liter)
min	Minute
mind.	Mindestens
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl oder nano ( $10^{-9}$ )
N.	Nervus
Nn.	Nervi

NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
ONL	äußere Körnerschicht
OPL	äußere plexiforme Schicht
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PFA	Paraformaldehyd
pH	Konzentration der H <sup>+</sup> -Ionen einer Lösung
rev	reverse
RGC	retinale Ganglienzellen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
rTdT	rekombinante Terminale-Deoxynukleotidyl-Transferase
s	Sekunde
sConA	Succinyl-Concanavalin A
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
SS	Staurosporin
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
Taq Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick-End-Labeling
U	Enzymeinheit („Unit“)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

vgl.	vergleiche
vs.	versus
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
wnt	Wingless Type
WST-1	Water soluble tetrazolium 1
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Geräte .....	14
Tab. 2: Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	15
Tab. 3: Verwendete kommerzielle Kits .....	15
Tab. 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien (Expressionsanalyse) .....	16
Tab. 5: Allgemeine Geräte (Expressionsanalyse) .....	17
Tab. 6: Verwendete Oligonukleotidprimer .....	17
Tab. 7: Zusammenfassung der RNA-Isolation mittels TRIzol®-Reagenz .....	20
Tab. 8: Ansatz von 10x TBE (TRIS-Borat-EDTA-Puffer) .....	21
Tab. 9: Ansatz von 4x Auftragspuffer .....	21
Tab. 10: Reaktionsansatz für die cDNA-Herstellung .....	23
Tab. 11: PCR-Programm für die cDNA-Synthese .....	23
Tab. 12: Ansatz der Master-Mix-cDNA (für je einen Reaktionsansatz) .....	24
Tab. 13: Ansatz des Primer-Mix .....	25
Tab. 14: Programm für die real-time RT-PCR .....	25
Tab. 15: Verwendete Chemikalien und Reagenzien (Zellbiologische Techniken) .....	27
Tab. 16: Verwendete Geräte und Materialien (Zellbiologische Techniken) .....	27
Tab. 17: Zusammensetzung des Ganglienzellmediums für die Kultivierung .....	29
Tab. 18: Zusammensetzung des Ganglienzellmediums für Experimente .....	29
Tab. 19: Lösungen für den MTT-Assay .....	35
Tab. 20: Reagenzien für die Histologie .....	40
Tab. 21: Geräte für die Histologie .....	40
Tab. 22: Ansatz von 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) .....	41

Tab. 23: Ansatz von 4% Paraformaldehyd .....	41
Tab. 24: Paraffin-Einbettungsprotokoll der Augen .....	42
Tab. 25: Ansatz von Cacodylatpuffer (pH 7,2).....	43
Tab. 26: Ansatz von EM-Fixans.....	43
Tab. 27: Ansatz der Stammlösung A.....	43
Tab. 28: Ansatz der Stammlösung B.....	43
Tab. 29: Epon-Einbettungsprotokoll der Augen.....	45
Tab. 30: Epon-Einbettungsprotokoll der Nn. optici .....	46
Tab. 31: Ansatz von 1% Azur II .....	47
Tab. 32: Ansatz von 1% Methylenblau .....	47
Tab. 33: Ansatz von 0,0125% Fuchsin .....	48
Tab. 34: Ansatz von 0,15% Methylenblau .....	48
Tab. 35: Ansatz von 1% Paraphenyldiamin .....	49
Tab. 36: Ansatz von 1x PBS (pH 7,4).....	51
Tab. 37: Ansatz von 0,85% NaCl .....	51
Tab. 38: Ansatz des Proteinase K-Puffers.....	51
Tab. 39: Ansatz der Proteinase K-Lösung .....	51
Tab. 40: Vorbehandlung des Paraffin-eingebetteten Gewebes .....	52
Tab. 41: Ansatz des rTdT-Inkubationspuffers .....	53
Tab. 42: Ansatz der Negativ-Kontrolle .....	53
Tab. 43: <i>DeadEnd<sup>TM</sup></i> Fluorometric TUNEL System.....	54
Tab. 44: Nachbehandlung des <i>DeadEnd<sup>TM</sup></i> Fluorometric TUNEL Systems .....	54
Tab. 45: Injektionsschemata für die konzentrationsabhängige Schädigung retinaler Ganglienzellen .....	57

Tab. 46: Abkürzungsverzeichnis .....	121
--------------------------------------	-----

## 7.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Photographie, Funduskopie und Schnittpräparat von Augen von mit dem Norrie-Syndrom betroffenen Patienten.....	2
Abb. 2: Ribbon-Diagramme der 3D-Strukturanalyse von TGF $\beta$ und Norrin .....	5
Abb. 3: Schematische Darstellung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs .....	8
Abb. 4: Schematische Darstellung der Hemmung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs durch Dkk-1 .....	10
Abb. 5: Schematische Darstellung einer durch Exzitotoxizität induzierten Apoptose .....	12
Abb. 6: Prinzip des <i>DeadEnd<sup>TM</sup></i> Fluorometric TUNEL Systems .....	50
Abb. 7: NMDA verursacht eine konzentrationsabhängige Schädigung der retinalen Ganglienzellen.....	58
Abb. 8: Sagittaler Semidünnschnitt eines N. opticus von einem mit PBS behandelten Auge .	60
Abb. 9: Sagittaler Semidünnschnitt eines N. opticus von einem mit NMDA behandelten Auge .....	61
Abb. 10: Sagittaler Semidünnschnitt eines N. opticus von einem mit NMDA und Norrin behandelten Auge.....	62
Abb. 11: Quantifizierung der Axone der Sehnerven von mit PBS, NMDA bzw. NMDA und Norrin behandelten Augen.....	63
Abb. 12: Sagittale Semidünnschnitte durch die Ganglienzellschicht und die innere plexiforme Schicht der Retina von einem mit NMDA bzw. NMDA und Norrin behandelten Auge .....	64
Abb. 13: Quantifizierung der Perikarya der Ganglienzellschicht von mit NMDA bzw. NMDA und Norrin behandelten Augen.....	65
Abb. 14: Sagittale Semidünnschnitte durch die Retina von einem mit NMDA bzw. NMDA und Norrin behandelten Auge .....	66
Abb. 15: Quantifizierung der Fläche der inneren plexiformen Schicht von mit NMDA bzw. NMDA und Norrin behandelten Augen .....	67

Abb. 16: TUNEL-Analyse von sagittalen Semidünnschnitten durch die Retina von einem mit NMDA bzw. NMDA und Norrin behandelten Auge .....	68
Abb. 17: Quantifizierung des Verhältnisses von apoptotischen Zellkernen zur Gesamtzahl der Zellkerne in der retinalen Ganglienzellschicht. ....	69
Abb. 18: Sagittaler Semidünnschnitt eines N. opticus von einem mit NMDA und Norrin und von einem mit NMDA, Norrin und Dkk-1 behandelten Auge.....	71
Abb. 19: Quantifizierung der Axone der Sehnerven mit NMDA und Norrin bzw. mit NMDA, Norrin und DKK-1 behandelten Augen .....	72
Abb. 20: Norrin führt zur Expression von neuroprotektiven Faktoren in der durch NMDA geschädigten Retina.....	74
Abb. 21: Quantifizierung der Abnahme von undifferenzierten RGC-5 nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen und Einwirkzeiten von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	77
Abb. 22: Unterschiedliche Glutamat-Konzentrationen haben keine Auswirkung auf die Zellviabilität von undifferenzierten RGC-5 .....	79
Abb. 23: Behandlung von undifferenzierten RGC-5 mit sConA .....	80
Abb. 24: Quantifizierung der Abnahme von RGC-5 nach vorausgeganger Inkubation mit sConA durch unterschiedliche Wasserstoffperoxid-Konzentrationen.....	82
Abb. 25: Quantifizierung der Anzahl der RGC-5 nach Differenzierung mit 50, 100 bzw. 150 µg/ml sConA.....	84
Abb. 26: Wirkung von Glutamat auf mit sConA differenzierte RGC-5.....	85
Abb. 27: Norrin zeigt keinen Einfluss auf mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> behandelte in sConA inkubierte RGC-5 ...	87
Abb. 28: Behandlung von undifferenzierten RGC-5 mit Staurosporin.....	89
Abb. 29: Wirkung von Glutamat auf mit Staurosporin differenzierten RGC-5 .....	91
Abb. 30: Die Reduktion der Serumkonzentration führt bei mit Staurosporin differenzierten retinalen Ganglienzellen zur Abnahme der Anzahl der RGC-5.....	93
Abb. 31: Norrin schützt mittels Staurosporin differenzierte RGC-5 .....	94

## 7.5 Danksagung

Zu aller erst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ernst R. Tamm für die interessante Fragestellung dieser Arbeit, die Übernahme des Erstgutachtens und vor allem für seine Unterstützung bei meiner Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein herzlichster Dank gilt weiterhin Herrn Dr. med. Andreas Ohlmann für die hervorragende Betreuung. Ganz speziell möchte ich mich hier bei Andreas für die stets ausgezeichnete, prompte, geduldige und oftmals auch zeitintensive Unterstützung in sämtlichen Anliegen bedanken. Durch die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, sein stets offenes Ohr sowie seiner ständigen Diskussionsbereitschaft gelang es ihm, seine Leidenschaft und sein Interesse für die Forschung an mich weiterzugeben. Ohne ihn und seiner Ideen würde es die Arbeit in dieser Form nicht geben und hätte bei weitem nicht so viel Freude gemacht.

Roswitha Seitz, Thomas Seibuchner sowie David Seitz möchte ich für die tatkräftige Unterstützung an meinem Projekt danken.

Ferner bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Humananatomie und Embryologie für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme persönliche Miteinander. Mein Dank gilt hierbei vor allem Angelika Pach, Margit Schimmel, Elke Stauber und Katharina Fizia für die Hilfe im Laboralltag sowie der netten Unterhaltungen zwischendurch. Darüber hinaus möchte ich mich besonders bei Margit Schimmel und Elke Stauber für die Unterstützung bei den histologischen Arbeiten und die motivierenden Gespräche während der oft sehr langwierigen Bestimmungen der Anzahl der Axone in den Nn. optici bedanken. Mein besonderer Dank gilt daneben auch Angelika Pach für ihre geduldige und tatkräftige Unterstützung bei der Kultivierung und den Arbeiten mit den RGC-5 sowie für die Vermittlung ihres umfangreichen Wissens beim Umgang mit den Zellkulturen.

Für die freundschaftliche Atmosphäre im Institut, die schönen gemeinsamen Stunden auf den Institutsfeiern und der Vorführung der neusten Wissenschaftsvideos möchte ich meinen Laborkollegen ganz herzlich danken.

Außerhalb des Lehrstuhls möchte ich meinen Freunden und meiner Familie für ihre aufrichtige Unterstützung und den vielen unvergesslichen Momenten während meines Studiums danken.

Insbesondere möchte ich meinen Eltern danken, die mir mein Studium ermöglichten und mich in jeder Lebenslage unterstützen.

## 7.6 Erklärungen

Zum Antrag auf Zulassung zur Promotion als Doktor der Medizin vorgelegt von Simon Hackl unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Ernst R. Tamm am Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie der Universität Regensburg nach § 6 Absatz 5 der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät und der Naturwissenschaftlichen Fakultät III (Medizinische Fächer) der Universität Regensburg vom 12. Juni 2008:

*„Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.*

*Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.*

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

Simon Hackl

Regensburg, im November 2011

## 7.7 Curriculum Vitae

### PERSÖNLICHE DATEN

*Name:* Simon Hackl  
*Geburtstag:* 19. Oktober 1983  
*Geburtsort:* Passau  
*Staatsangehörigkeit:* deutsch

### BERUFLICHER WERDEGANG

*seit 2011* Assistenzarzt der Unfallchirurgie und Orthopädie an der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Murnau

### AUSBILDUNG

*1990-1994* Grundschule Passau/ Grubweg  
*1994-2003* Adalbert-Stifter-Gymnasium in Passau  
*2004-2006* Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg  
*2006-2011* Klinisches Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg

### ZIVILDIENST

*2003-2004* Pflegediensthelfer am Klinikum Passau (Onkologie)

### FAMULATUREN

*Februar 2007* Klinik für Unfall-, Hand-, Wiederherstellungs- u. Wirbelsäulenchirurgie (Klinikum Passau)  
*September 2007* Praxis für Innere Medizin mit hausärztlicher Betreuung (Passau)  
*Februar 2008* Unfall- u. Wiederherstellungs chirurgie (Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Murnau)  
*August 2008* Sportmedizin (Sierra Vista Regional Medical Center San Luis Obsipo, CA, USA)  
*März 2009* Plastische Chirurgie (Al Babtain Plastic Surgery Centre, Kuwait City, Kuwait)

### PRAKTISCHES JAHR

*Aug. 09 - Sept. 09* Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Kinderchirurgie (Klinikum Passau)  
*Okt. 09 - Nov. 09* Klinik für Allgemeinchirurgie (Dunedin School of Medicine in Invercargill, Neuseeland)  
*Dez. 09 - April 10* Klinik für Innere Medizin (Spital Uster, Schweiz)  
*April 10 - Aug. 10* Orthopädische Klinik für die Universität Regensburg (Bad Abbach)