

Effekte von LiCl auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER MEDIZIN

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND

VORKLINISCHE MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Verena Knobloch

aus

Erlangen

Im Jahr

2014

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 01.07.2014

Die Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. Andreas Ohlmann

Effekte von LiCl auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER MEDIZIN

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND

VORKLINISCHE MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Verena Knobloch

aus

Erlangen

Im Jahr

2014

Dekan: Prof. Dr. Ernst Tamm

1. Berichterstatter: PD Dr. Andreas Ohlmann

2. Berichterstatter: PD Dr. Tina Dietrich-Ntoukas

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	05
1.1.	<i>Aufbau von Auge und Retina.....</i>	<i>05</i>
1.2.	<i>Ischämische Retinopathien.....</i>	<i>06</i>
	1.2.1. <i>Retinopathia praematurorum.....</i>	<i>06</i>
	1.2.2. <i>Diabetische Retinopathie.....</i>	<i>08</i>
1.3.	<i>Gefäßentwicklung.....</i>	<i>10</i>
1.4.	<i>Wnt/ β-Catenin – Signalweg.....</i>	<i>12</i>
1.5.	<i>Norrin.....</i>	<i>13</i>
1.6.	<i>Lithium.....</i>	<i>15</i>
	1.6.1. <i>Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs.....</i>	<i>15</i>
	1.6.2. <i>Inhibition des IP-PKC-Signalwegs.....</i>	<i>15</i>
	1.6.3. <i>Interaktion des Wnt/β-Catenin- und IP-PKC-Signalwegs.....</i>	<i>16</i>
2.	Ziel der Arbeit	18
3.	Material und Methoden der Zellkultur.....	19
3.1.	<i>Material und Methoden der Zellkultur.....</i>	<i>19</i>
	3.1.1. <i>Allgemeine Laborausstattung.....</i>	<i>19</i>
	3.1.2. <i>Materialien der Zellkultur.....</i>	<i>20</i>
	3.1.3. <i>Reagenzien der Molekularbiologie/Zellkultur.....</i>	<i>21</i>
	3.1.4. <i>Verwendete Zellen und Kulturbedingungen.....</i>	<i>22</i>
	3.1.5. <i>Allgemeine Zellkulturtechniken.....</i>	<i>22</i>
	3.1.6. <i>Zellzahlbestimmung mit Casy TT (Innovatis AG).....</i>	<i>23</i>
	3.1.7. <i>Behandlung von Zellen.....</i>	<i>24</i>
	3.1.8. <i>Zellüberleben/Survival – WST-1-Assay.....</i>	<i>25</i>
	3.1.9. <i>Proliferationsmessung – BrdU-Assay.....</i>	<i>26</i>
	3.1.10. <i>Migrationsverhalten – Scratch Assay.....</i>	<i>27</i>
3.2.	<i>Material und Methoden der Immunhistochemie.....</i>	<i>28</i>
	3.2.1. <i>Materialien der Immunhistochemie.....</i>	<i>28</i>
	3.2.2. <i>Reagenzien und Antikörper.....</i>	<i>29</i>

3.2.3.	<i>Immunhistochemische Färbungen</i>	29
4.	Ergebnisse	31
4.1.	<i>Lithium aktiviert den β-Catenin-Signalweg in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)</i>	31
4.2.	<i>Wirkung von Lithiumchlorid auf humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC)</i>	33
4.2.1.	<i>Lithiumchlorid induziert die Proliferation von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)</i>	33
4.2.2.	<i>Induktion der Proliferation von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) durch SB216763</i>	35
4.2.3.	<i>Lithiumchlorid induziert Zellproliferation mittels Aktivierung des β-Catenin-Signalwegs</i>	36
4.2.4.	<i>Lithiumchlorid erhöht das Überleben humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen (HDMEC)</i>	38
4.2.5.	<i>Lithiumchlorid induziert die Migration humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen (HDMEC)</i>	40
5.	Diskussion	42
5.1.	<i>Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs durch Lithiumchlorid</i>	42
5.2.	<i>Einfluss von Lithiumchlorid auf die Proliferation humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen</i>	43
5.3.	<i>Einfluss von Lithiumchlorid auf die Proliferation humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen</i>	44
5.4.	<i>Einfluss von Lithiumchlorid auf die Migration humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen</i>	45
5.5.	<i>Dosisabhängigkeit der Wirkung von Lithiumchlorid auf humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC)</i>	46
5.6.	<i>Ausblick</i>	48
6.	Zusammenfassung	49

7.	Anhang.....	50
7.1.	<i>Literaturverzeichnis.....</i>	<i>50</i>
7.2.	<i>Abkürzungen.....</i>	<i>57</i>
7.3.	<i>Tabellenverzeichnis.....</i>	<i>58</i>
7.4.	<i>Abbildungsverzeichnis.....</i>	<i>59</i>
7.5.	<i>Danksagung.....</i>	<i>60</i>
7.6.	<i>Erklärung.....</i>	<i>61</i>
7.7.	<i>Curriculum Vitae.....</i>	<i>62</i>

1 Einleitung

1.1 Aufbau von Auge und Retina

Das Auge ist ein nahezu rundes Organ, das größtenteils durch den Glaskörper ausgefüllt wird und nach außen durch eine dreischichtige Wand begrenzt ist. Die äußere Sklera umgibt den Bulbus fast komplett und bietet mechanischen Schutz. In der Choroidea finden sich vor allem arterielle und venöse Blutgefäße, die der Ernährung des Auges dienen. Die innere Begrenzung wird schließlich durch die Retina gebildet, einem komplexen System neuronaler Schichten. Ihr Aufbau besteht aus Pigmentepithel und Photorezeptoren, die von Horizontalzellen, Bipolarzellen und amakrinen Zellen bedeckt werden. Die innerste Schicht wird aus Ganglienzellen gebildet, deren Axone sich zum Nervus opticus vereinigen und schließlich gemeinsam das Auge in Richtung Gehirn verlassen.

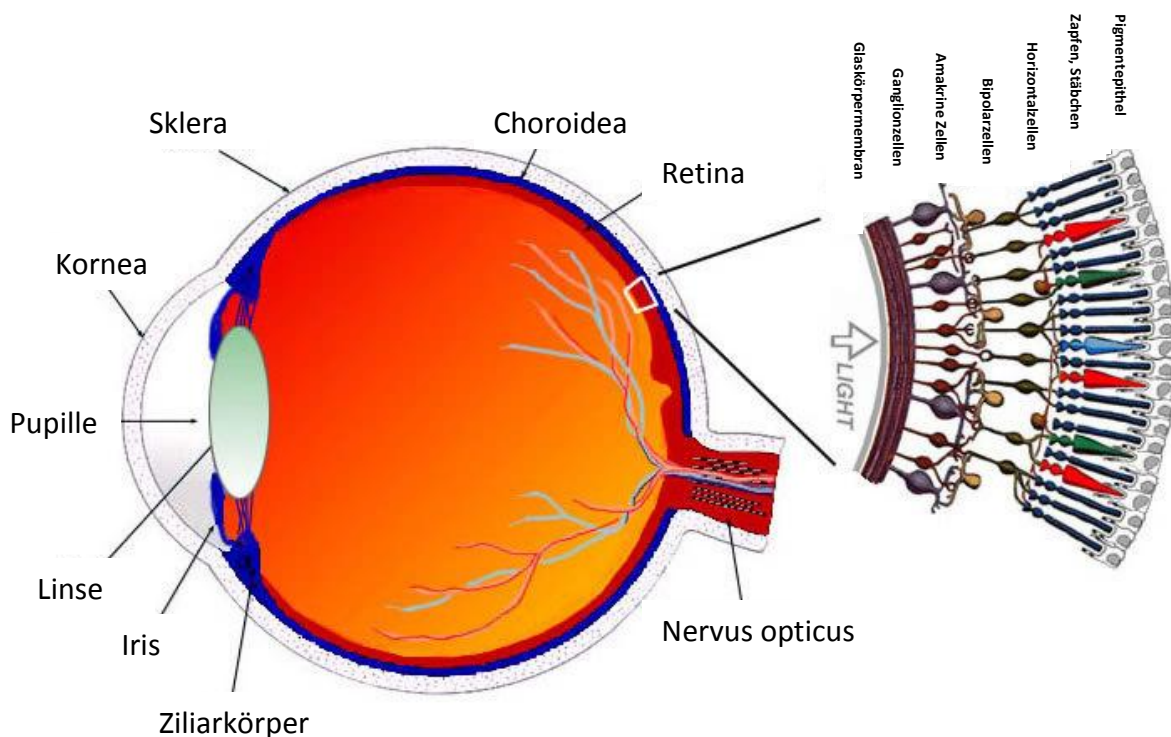


Abb 1 nach (Kolb 2005): schematische Darstellen des okulären und retinalen Aufbaus

Der vordere Augenabschnitt wird vom hinteren durch den lenticulären Apparat abgegrenzt. Er umfasst Binde-, Horn-, Lederhaut, Iris, Ziliarkörper und Linse. Die Hornhaut setzt sich aus der Sklera fort und stellt einerseits einen mechanischen Schutz des Auges dar, zum anderen

trägt sie durch ihre Transparenz und Brechkraft von 43dpt maßgeblich zum scharfen Sehen bei (Grehn 2012). Die Akkommodation geschieht durch die Linse, die zwischen Zonulafasern aufgehängt ist. Durch Kontraktion des Ziliarmuskels wird ihre Krümmung verändert und die Brechkraft an die benötigte Brennweite angepasst. In entspanntem Zustand wird die Linse durch Zug der Zonulafasern abgeflacht und die Brechkraft verringert. Bei Kontraktion des Ringmuskels, entspannen die Zonulafasern und die Linse stellt sich zurück in ihre konvexe Form. Diese ständige Anpassung der Brechkraft ermöglicht die Abbildung eines stets scharfen Bildes auf der Netzhaut.

Die Blutversorgung des Auges wird durch zwei Gefäßsysteme sichergestellt. Die Arteria centralis retinae versorgt über Arteriolen und Kapillaren die inneren zwei Drittel der Retina, während das äußere Drittel aus der Choriokapillaris versorgt wird (Kanski 2008).

1.2 Ischämische Retinopathien

Sowohl die Frühgeborenen-, als auch die diabetische Retinopathie können potentiell in einer ischämischen Retinopathie münden und stellen in ihrer jeweiligen Altersgruppe eine häufige Erblindungsursache dar. Ursprung der Erkrankungen ist eine fehlende Anlage bzw. Degeneration mikrovaskulärer Gefäße, die unbehandelt letztendlich zu einer Hypoxie-induzierten Neovaskularisation führen kann.

1.2.1 Retinopathia praematurorum

Klinik

Im Falle der Retinopathia praematurorum handelt es sich um Frühgeborene oder Neonaten mit niedrigem Geburtsgewicht, die durch postnatale Beatmung mit hohen O_2 -Partialdrücken eine Störung der retinalen Gefäßentwicklung zeigen. Fundoskopisch sieht man deshalb zunächst vor allem ein temporales Fehlen von Gefäßen bzw. Konstriktion der bestehenden Arterien (Grehn 2012)

Im weiteren Verlauf werden fünf Stadien unterschieden. In Stadium eins kommt es zur Ausbildung einer Demarkationslinie zwischen vaskularisierten und avaskulären Netzhautanteilen, die in Stadium zwei zu einer prominenten Leiste mit beginnender Neovaskularisation fortschreitet. Stadium drei wird auch als die vasoproliferative Phase bezeichnet und ist charakterisiert durch pathologische Gefäße, die nun auch in den Glaskörper vorwachsen und nicht selten zu Blutungen führen.

Schreitet die Erkrankung weiter fort, kommt es durch Schrumpfungsprozesse zunehmend zur Traktion und letztendlich zur Ablatio der Netzhaut. Dies kann partiell auftreten (Stadium vier) oder bei Befall der gesamten Retina (Stadium fünf) bis zur Erblindung des Neugeborenen führen (Grehn 2012)

Pathogenese

Frühgeborene bringen durch ihre ausgeprägte Unreife von vornherein eine erhöhte mikrovaskuläre Verletzlichkeit mit, sowie einen Mangel an zytoprotektiven Faktoren in Form von IGF-1 (Reece u. a. 1994; Hellström u. a. 2003), ω -3-Lipid und Antioxidantien (Pawlik, Lauterbach, und Turyk 2011; Jeffrey u. a. 2001; Nielsen, Naash, und Anderson 1988).

Wird aufgrund pulmonaler Insuffizienz eine prolongierte Sauerstoffbeatmung notwendig, führen erhöhte O_2 -Partialdrücke zu oxidativem Stress (Guzy und Schumacker 2006), einem Anstieg von NO, Vasokonstriktion und Reduktion der proangiogenetisch wirksamen Faktoren VEGF und IGF-1 (Ashton, Ward, und Serpell 1954; Kinsey u. a. 1977; Pierce, Foley, und Smith 1996). Hierdurch wird zum einen die retinale Gefäßentwicklung behindert, zum anderen werden bereits bestehende, aber noch unreife Gefäße geschädigt und obliterieren (Li, Fu, und Lo 2012).

Bei Beendigung der Beatmung fällt der Sauerstoffpartialdruck ab und es kommt zur retinalen Hypoxie. Diese stellt einen Trigger für das Gefäßwachstum dar und führt zur reaktiven Induktion von Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 α und HIF-1 α -like-factor (Wang und Semenza 1993; Morita u. a. 2003), sowie einem Anstieg der Wachstumsfaktoren VEGF (Alon u. a. 1995; Pierce, Foley, und Smith 1996), IGF-1 (Hellström u. a. 2003), fibroblast growth factor und Erythropoetin (Sapieha u. a. 2010). Hierdurch werden Endothelzellen zur Proliferation angeregt. Es bilden sich vermehrt pathologische Gefäße aus, die in den Glaskörper

einwachsen, zu Blutungen neigen und die retinale Hypoxie nicht beheben können (Penn, Tolman, und Henry 1994; Smith u. a. 1994; Flynn u. a. 1992; Smith u. a. 1999). Durch die daraus entstehenden Komplikationen, kommt es, wie bereits beschrieben, zu Traktionen an der Retina und unterschiedlich schweren Ausmaßen von Netzhautablösungen.

1.2.2 Diabetische Retinopathie

Klinik

Die diabetische Retinopathie ist eine relativ häufige, im Rahmen eines Diabetes mellitus Typ I oder II auftretende Komplikation. Dabei führen über lange Zeit erhöhte Glucosewerte zu einer mikrovaskulären Schädigung mit zunehmender Störung der Permeabilität und dem Verlust der Funktion als Blut-Retina-Schranke, sowie Komplikationen wie Okklusion retinaler Gefäße. Klinische Symptome in Form erhöhter Blendeempfindlichkeit und Visusminderung durch Ödeme oder Einblutungen, fallen den Patienten häufig erst auf, wenn die Krankheit bereits fortgeschritten ist.

Generell unterscheidet man eine nicht proliferative (NPDR) und eine proliferative Form der Erkrankung (PDR). Erstere zeichnet sich zu Beginn vor allem durch Mikroaneurysmen aus. Im weiteren Verlauf kommen venöse Kaliberschwankungen, intraretinale Blutungen und Lipidablagerungen in Form harter Exsudate hinzu. Fundoskopisch werden zudem vermehrt ischämische Bezirke und Cotton-Wool-Herde sichtbar. In diesem Stadium entwickelt etwa die Hälfte der betroffenen Patienten innerhalb eines Jahres eine proliferative diabetische Retinopathie (Grehn 2012)

Die proliferative Form unterscheidet sich von der nicht proliferativen durch Neovaskularisationen. Diese müssen nicht auf den retinalen Bereich beschränkt sein, sondern können als Rubeosis iridis auch die vorderen Augenanteile betreffen und den Krankheitsverlauf weiter erschweren.

Die neuen, pathologischen Retinagefäße neigen aufgrund ihres mangelhaften Wandaufbaus zu Einblutungen in den Glaskörper. Klinisch kann sich dies durch eine plötzliche Visusminderung manifestieren. In der Folge kommt es, wie bereits bei der

Frühgeborenenretinopathie, zunehmend zur Ausbildung fibrovaskulärer Membranen. Durch Schrumpfungsprozesse entstehen wiederum Traktionen an der Netzhaut, die in eine Ablatio retinae münden können (Grehn 2012).

Pathogenese

Bei der nicht proliferativen Form der diabetischen Retinopathie (NPDR) steht vor allem die Mikroangiopathie im Vordergrund mit Verdickung der Basalmembran (Roy und Lorenzi 1996), Perizytenverlust mit Ausbildung von Mikroaneurysmen (Feman 1994), Störung der Blut-Retina-Schranke mit Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Ödemen (Antonetti u. a. 1999), retinale Mikroinfarkte und Ischämien (Feman 1994).

Die proliferative Form der diabetischen Retinopathie (PDR) stellt einen Versuch dar, die lokale Hypoxie zu kompensieren. Durch Induktion von vascular endothelial growth factor (VEGF) kommt es zu Neovaskularisationen (Khan und Chakrabarti 2007). Die pathologischen Gefäße wachsen verstärkt in den Glaskörper ein, neigen zu Blutungen und führen durch Traktionen nicht selten zu Netzhautablösungen mit progredientem Sehverlust bis hin zur Erblindung (Dorrell und Friedlander 2006).

Weitere molekulare Mechanismen, die eine Rolle bei der mikrovaskulären Schädigung im Rahmen der diabetischen Retinopathie spielen, beinhalten die endotheliale Zellschädigung durch oxidativen und nitrosativen Stress (Khan und Chakrabarti 2007). Bei intrazellulärem Überangebot an Glucose wird diese zunehmend über die Aldose-Reduktase (AR) zu Sorbitol abgebaut, welches bei Akkumulation zytotoxisch wirkt (Kinoshita und Nishimura 1988; Yabe-Nishimura 1998; Srivastava, Ramana, und Bhatnagar 2005). Gleichzeitig wird NADPH verbraucht, das dadurch weniger für das antioxidative System zur Verfügung steht.

Ein weitere Auswirkung von überhöhten Glucoseleveln ist der Anstieg von AGEs (advanced glycation end products), sowie eine durch reaktiven oxidativen Stress (ROS) induzierte Akkumulation von Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) (Pacher und Szabó 2005). PARP, sowie eine Aktivierung des PKC- und Hexosamin-Signalwegs (Kolm-Litty u. a. 1998; Brownlee 2005) tragen gemeinsam weiter zur endothelialen Schädigung bei.

1.3 Gefäßentwicklung

Die Vaskularisierung der Retina beginnt bereits in der frühen Embryonalzeit und durchläuft während der Schwangerschaft einige Veränderungen. Zunächst wird die Blutversorgung durch eine zentrale hyaloidale Arterie sichergestellt. Diese tritt durch den Nervus opticus in das Auge ein. Im weiteren Verlauf speist sie dann hyaloide Gefäße, die wiederum Anschluss an die langen Ziliargefäße finden und schließlich venös drainiert werden (Fruttiger 2007).

Ab etwa der 16. Schwangerschaftswoche beginnt ein Umbau des Gefäßsystems (Ashton, Ward, und Serpell 1954). Durch retinale Hypoxie wird insbesondere VEGF (vascular endothelial growth factor) exprimiert. Es kommt zu einer Kombination aus Angio- und Vaskulogenese (Dorrell und Friedlander 2006, Ashton, Ward, und Serpell 1954).

Hierbei wächst ein primärer Plexus aus arteriellen und venösen Gefäßen zentrifugal vor, der dann weiter in einen oberflächlichen und tiefen Plexus differenziert. Parallel bilden sich die hyaloidalen Gefäße nach und nach zurück (Fruttiger 2007).

Ausbildung des primären Plexus

Aufgrund zahlreicher Experimente, wird angenommen, dass der primäre oberflächliche Gefäßplexus mittels Vaskulogenese entsteht. Er geht aus endothelialen Vorläuferzellen hervor und nutzt Astrozyten als Gerüst, um sich langsam von zentral nach peripher auszubreiten (Dorrell und Friedlander 2006; Fruttiger 2007).

Eine wichtige Rolle spielt dabei insbesondere der bereits erwähnte VEGF, aber auch IGF-1, R-Cadherin, sowie PDGF (Dorrell und Friedlander 2006). Dorrel et al. konnten zeigen, dass intravitrale Injektion von R-Cadherin spezifischen Antikörpern zu einer pathologischen und inkompletten retinalen Vaskularisierung führt (Dorrell, Aguilar, und Friedlander 2002). Auch die Expression einer mutanten PDGF-B-Form in transgenen Mäusen verhinderte eine normale Entwicklung des oberflächlichen Gefäßplexus (Lindblom 2003)

Ausbildung des sekundären Plexus

Im Verlauf kommt es zur Differenzierung des oberflächlichen Gefäßsystems mit Ausbildung des tiefen und intermediären Plexus durch Angiogenese (Gariano, Iruela-Arispe, und Hendrickson 1994; Stone u. a. 1995; Dorrell und Friedlander 2006). Diese sekundären Plexus bestehen aus einem Gefäßnetz entlang des inneren und äußeren Anteils der inneren Körnerschicht und breiten sich ebenfalls von zentral nach peripher aus (Dorrell, Aguilar, und Friedlander 2002; Dorrell u. a. 2004; Dorrell und Friedlander 2006).

Während die genauen molekularen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind, wird der Sekretion von VEGF und R-Cadherin, ebenso wie VLDL eine wichtige Rolle bei der Leitung der Endothelzellen zugesprochen (Dorrell, Aguilar, und Friedlander 2002; Dorrell und Friedlander 2006).

Außerdem konnten einige Mutationen von Genen identifiziert werden, die für die regelrechter Ausbildung des tiefen Plexus von großer Bedeutung zu sein scheinen. Dabei wurde unter anderem gezeigt, dass eine Defizienz im Gen für Angiopoetin 2 oder für Aktivatoren des Wnt-Signalwegs, wie NDP und Frizzled 4, bei Mäusen zu einer fehlenden oder fehlerhaften Entwicklung desselbigen führt (Hackett u. a. 2002; Xu u. a. 2004; Luhmann u. a. 2005; Ohlmann u. a. 2005).

1.4 Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Das zentrale Mediatormolekül des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, β -Catenin, wird konstitutiv exprimiert. Jedoch liegt nur ein geringer Anteil frei im Zytoplasma vor, da der Großteil in einem Komplex aus GSK-3, APC und Axin gebunden und nach Ubiquitinierung in Proteasomen schließlich abgebaut wird (Aberle u. a. 1997).

Wird der Signalweg durch Bindung eines Wnt-Moleküls an einen Fdz-Rezeptor aktiviert, kommt es zur Ausbildung des Frizzled/LRP-Rezeptorkomplexes. Dadurch wird das Dishevelled Protein (Dvl) aktiviert und der GSK-3 β -APC-Axin-Komplex destabilisiert.

β -Catenin wird nun nicht mehr gebunden und der Degradation zugeführt. Daher kommt es zur Akkumulation von freiem β -Catenin im Zytoplasma. Dieses transloziert in den Nukleus, wo es insbesondere die Transkriptionsfaktoren Tcf/Lef-1 aktiviert und spezifische Zielgene induziert (Behrens u. a. 1996; Molenaar u. a. 1996; Clevers 2006; Phiel und Klein 2001).

Neben den Wnt-Proteinen sind weitere Aktivatoren des Frizzled/LRP-Rezeptorkomplexes bekannt. Es handelt sich hierbei vor allem um R-Spondin und Norrin, das im Folgenden noch genauer betrachtet wird (Clevers 2006).

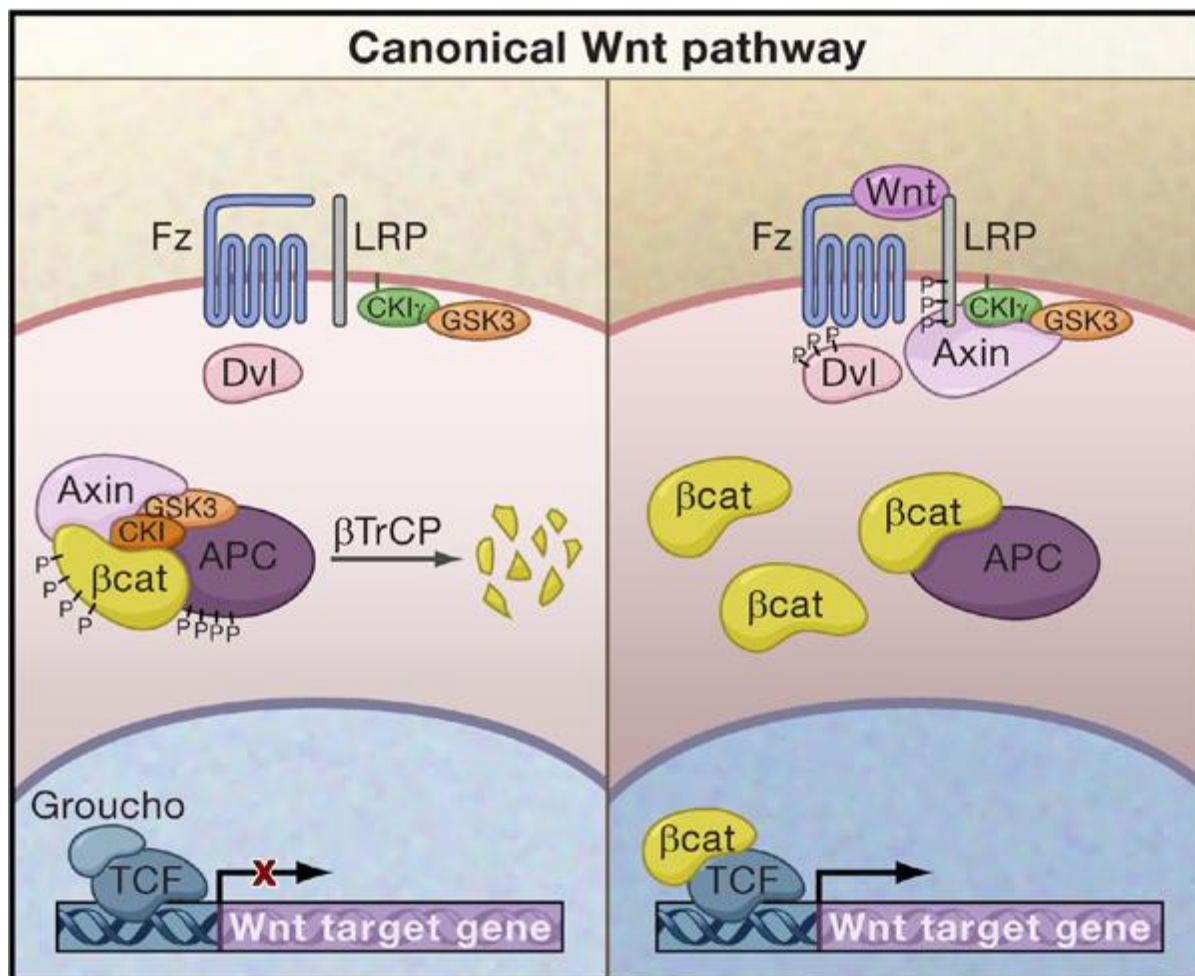


Abb 2: Schematische Darstellung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs; **Links:** inaktiver Zustand des kanonischen Signalwegs: β -Catenin wird vom GSK-3 β -APC-Axin-Komplex gebunden, phosphoryliert, ubiquitiniert und durch Proteasomen abgebaut; **Rechts:** Aktivierung des kanonischen Signalwegs: nach Bindung eines Wnt-Moleküls an den Frizzled/LRP-Rezeptorkomplex wird Dvl aktiviert. Durch Destabilisierung des GSK-3 β -APC-Axin-Komplexes kommt es zur intrazellulären Akkumulation freien β -Catenins und intranukleärer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Induktion verschiedener Zielgene (Behrens u. a. 1996; Molenaar u. a. 1996; nach Clevers 2006)

1.5 Norrin

Norrin ist das Produkt des NDP-Gens. Mit NDP-Mutationen sind mehrere Erkrankungen assoziiert, die mit Fehlbildungen retinaler Gefäße einhergehen. Zu diesen zählen das Norrie-Syndrom, die familiäre exsudative Vitreoretinopathie (FEVR) (Z. Y. Chen u. a. 1993; Dickinson u. a. 2006), der Morbus Coats (Black u. a. 1999) und die Retinopathia praematurorum

(Shastry u. a. 1997; Dickinson u. a. 2006). Gemeinsames Merkmal der Erkrankungen sind Gefäßanomalien, die zu Exsudationen retinaler Gefäße, Neovaskularisationen, Visusverlust und bis hin zur Erblindung führen können. Die Schwere des Verlaufes ist dabei sehr unterschiedlich. Außerdem kommt es, insbesondere im Rahmen des Norrie-Syndroms, zu einem gehäuften Auftreten von Schwer- oder Gehörlosigkeit, sowie mentaler Retardierung variablen Ausmaßes.

Norrin besitzt ebenso wie Wnt-Moleküle die Fähigkeit an den Frizzled/LRP-Rezeptorkomplex binden zu können und somit die Degradierung von β -Catenin zu behindern. Dies führt einerseits zur Induktion spezifischer Wachstumsfaktoren, für die neuroprotektive Effekte bekannt sind (Seitz u. a. 2010), andererseits von Genen, denen wichtige regulatorische Bedeutung bei der Vaskularisierung der Retina und des Innenohrs zukommt (Xu u. a. 2004; Ohlmann u. a. 2005; Ohlmann u. a. 2010).

Im Experiment mit Ndp-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass es zu einer verzögerten Ausbildung des primären retinalen Gefäßplexus kommt. Zudem fehlt der tiefe Plexus vollständig und die hyaloiden Gefäße persistieren (Richter u. a. 1998; Luhmann u. a. 2005; Ye u. a. 2009).

Diese Defekte des Gefäßsystems konnten bei transgenen Mäusen mit einer zusätzlich transgenen ektopen Norrinexpression komplett verhindert und eine normale Gefäßentwicklung ermöglicht werden (Ohlmann u. a. 2005). Die Ergebnisse deuten somit auf eine wichtige Bedeutung von Norrin bei der Ausbildung des retinalen Gefäßsystems hin.

Weiterhin konnte eine vasoprotektive Wirkung von Norrin auch im Mausmodell der Retinopathia praematurorum beobachtet werden. Mäuse mit Überexpression von Norrin zeigten nach Sauerstoffexposition sowohl einen geringeren Gefäßverlust, als auch eine Rekapillarisation der ischämischen Areale durch nicht-pathologische Gefäße (Ohlmann u. a. 2010).

1.6 Lithium

Der genaue molekulare Wirkungsmechanismus von Lithium ist nach wie vor nicht bis ins Detail geklärt. Eine wesentliche Rolle scheint jedoch die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin- und die Inhibition des IP-PKC-Signalwegs zu spielen (Lenox und Wang 2003).

Lithium ist ein insbesondere in der psychiatrischen Therapie häufig eingesetztes Medikament. In zahlreichen experimentellen Studien konnte eine neuroprotektive Wirkung beobachtet werden. So konnten Mastroiacovo et al. unter anderem im Mausmodell eine positive Auswirkung bei fokaler Hirnischämie zeigen (Mastroiacovo u. a. 2009). Auch nach optic nerve crush war ein schützender Effekt auf retinale Ganglionzellen (RCG) nachweisbar (Schuettauf u. a. 2006).

Zudem wurde beobachtet, dass Lithium in vitro eine konzentrationsabhängige Sekretion von VEGF durch zerebrale Endothelzellen und Astrozyten induzieren kann (Guo u. a. 2009).

1.6.1 Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs

Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs geschieht, anders als bei Norrin, nicht rezeptorvermittelt, sondern durch sowohl direkte Inhibition (Phiel und Klein 2001), als auch indirekte Inhibition von GSK-3 β mittels Phosphorylierung eines N-terminalen Serins (Jope 2003). Somit kann β -Catenin intrazellulär akkumulieren und durch Translokation in den Nukleus die Transkription von Genen induzieren (Klein und Melton 1996; Phiel und Klein 2001; Ryves und Harwood 2001; Zhang u. a. 2003; Jope 2003).

1.6.2 Inhibition des IP-PKC-Signalwegs

Der zweite wesentliche Angriffspunkt von Lithium ist die Inhibition der Inositol-Monophosphatase (IMPase), sowie einiger weiterer verwandter Phosphomonoesterasen (Lenox und Wang 2003). Die Inositol-Monophosphatase bewirkt im Inositolkreislauf die Umwandlung von Inositolmonophosphat (IP) zu Inositol.

Bei Langzeitbehandlungen mit Lithium konnte gezeigt werden, dass es durch Störung dieses Kreislaufes zur Akkumulation von Diazylglycerin (DAG) und Aktivierung DAG-abhängiger PKC

kommt. Gleichzeitig kam es in vitro und in vivo zu einem Abfall der PKC-Isoenzyme α und ϵ . Jedoch war der Effekt im Falle von PKC ϵ im Rattenversuch durch Myo-Inositolgabe reversibel (Lenox und Wang 2003).

1.6.3 Interaktion des Wnt/ β -Catenin- und des IP-PKC-Signalwegs

PKC reguliert nicht nur die Expression spezifischer Gene, sondern hat auch Wechselwirkungen mit dem GSK-3 β -Signalweg. So konnte gezeigt werden, dass einige PKC-Unterformen zur Phosphorylierung und folglich Deaktivierung von GSK-3 β führen (Goode u. a. 1992). Umgekehrt konnte eine durch Wnt-Aktivierung induzierte Akkumulation von β -Catenin durch PKC-Inhibitoren teilweise gehemmt werden kann (R. H. Chen, Ding, und McCormick 2000). Jedoch existieren auch atypische PKCs. Diese tragen vornehmlich zur Degradation von β -Catenin bei (Orford u. a. 1997).

Die Komplexität der Interaktionen zwischen Komponenten des GSK-3 β - und PKC-Signalwegs sind im Schaubild genauer dargestellt (Lenox und Wang 2003)

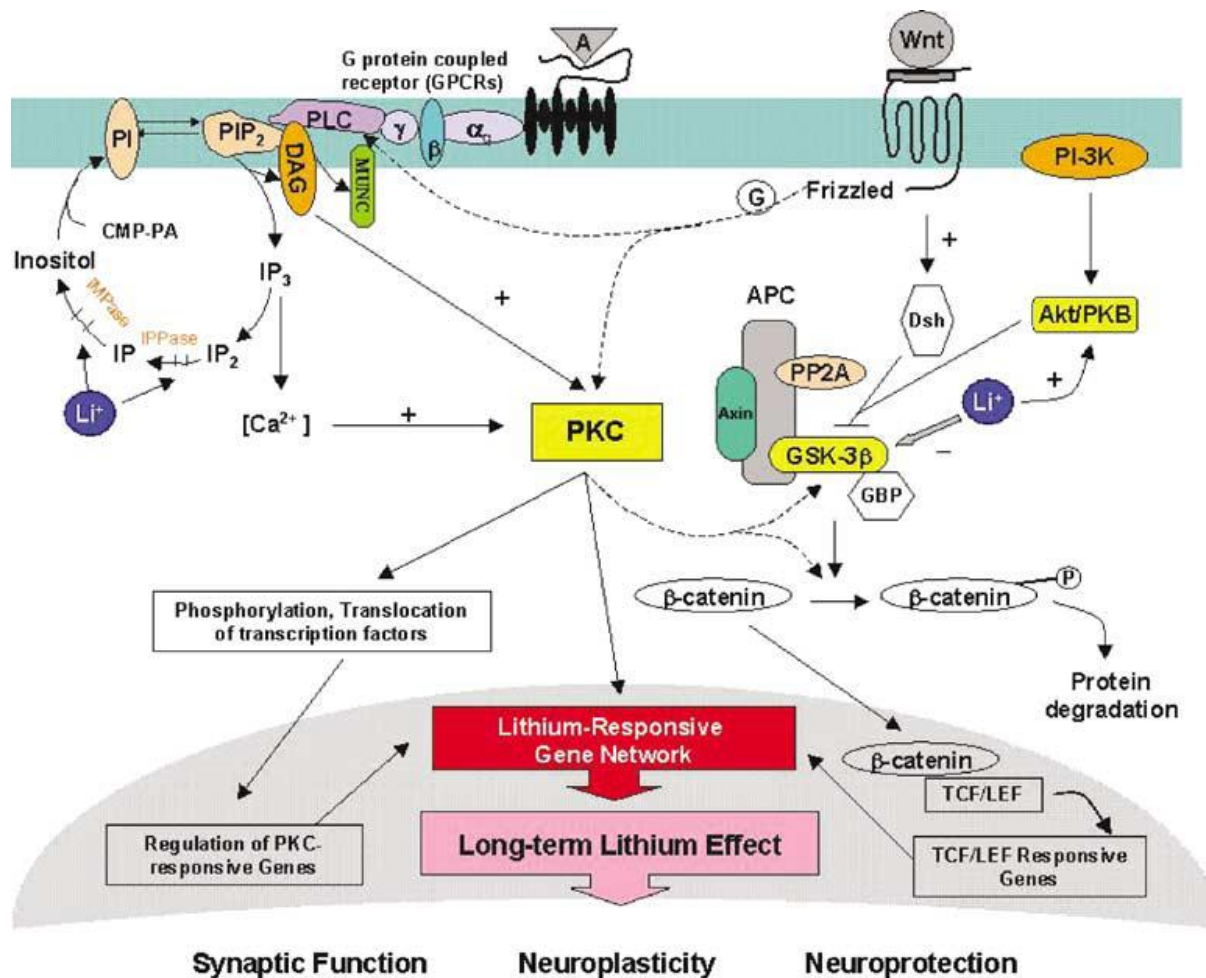


Abb. 3 Interaktion des Wnt/ β -Catenin- und des IP-PKC-Signalwegs: Lithium bewirkt als Aktivator des GSK-3 β -Signalwegs eine Akkumulation von β -Catenin. Zugleich fungiert es als Inhibitor des IP-PKC-Signalwegs. Bei Langzeitbehandlung mit Lithium kommt es zur Akkumulation von DAG und Aktivierung DAG-abhängiger PKC während PKC Isoenzyme α und ϵ sinken. **Abkürzungen:** A – Rezeptoragonist, Akt/PKB – Proteinkinase B/Akt, APC – adenomatöses Polyposis Protein, CMP-PA – Cytidin-Monophosphat-Phosphatidase, DAG – Diazylglycerol, Dsh – Dishevelled, G – G-Protein, GBP – GSK-3-Bindeprotein, GSK 3 – Glykogensynthase-Kinase 3, IP₃ – Inositoltriphosphat, LEF/TCF – lymphoid enhancer element/T-cell factor 1-family transcription factors, LRE – lithium responsive promoter element, MUNC – synaptisches Protein mit DAG Bindedomäne, PI – Phosphatidylinositol, PIP₂ – Phosphatidylinositolbiphosphat, PP2A – Protein Phosphatase 2A, PLC – Phospholipase C, Wnt – Glykolipoprotein und Ligand (Lenox und Wang 2003)

2 Ziel der Arbeit

In vorausgegangenen Arbeiten wurden neuroprotektive und zellproliferative Effekte von Lithium beschrieben, die vermutlich über die Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs vermittelt werden können. Gleichzeitig weiß man, dass die therapeutische Breite von LiCl sehr eng ist (Glumova, Petrov, und Markov 1979; Reisberg B 1979; Pavlovich und Tkacheva 1990; Oakley, Whyte, und Carter 2001).

Norrin seinerseits kann über die Aktivierung des klassischen Wnt-Signalwegs angiogene Eigenschaften auf z.B. Proliferation, Migration und gesteigertes Überleben von Endothelzellen vermitteln.

Aufgrund dessen sind wir von der Hypothese ausgegangen, dass auch Lithiumchlorid ähnliche Eigenschaften auf Endothelzellen in vivo und in vitro haben kann.

Diese Arbeit hatte zum Ziel

1. Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch LiCl in humanen dermalen mikrovaskulären Epithelzellen zu untersuchen
2. Die angiogene Wirkung von LiCl auf humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen in der Zellkultur zu untersuchen

3 Material und Methoden

3.1 Material und Methoden der Zellkultur

3.1.1 Allgemeine Laborausstattung

Materialien/Geräte	Bezugsquelle
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Glaswaren	Schott, Roth, VWR
Handschuhe Nitrile	VWR, Darmstadt
Memmert Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Giessen
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA
Multi-Reaktionsgefäße 1,5; 2,0 ml	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pipetman Pipetten	Gilson, Den Haag, Niederlande
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbergrecht
Pipettierhilfe Macroman™	Gilson, Den Haag, Niederlande
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Kelheim
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnbergrecht
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg

Sunrise-Basic ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH, Grodig, Österreich
System V75 Autoklav	Systemec GmbH, Wettenburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 1: Allgemeine Laborausstattung

3.1.2 Materialien der Zellkultur

Material/Geräte	Firma
CASY	Schärfe-System GmbH, Reutlingen
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kryo Einfriergerät	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kulturflaschen, Objektträger für die Zellkultur, Well-Platten	Nunc, Roskilde, Dänemark
Hera Cell 150 Brutschrank	Heraeus, Hanau
Hera Cell 150 Sterilbank	Heraeus, Hanau
Julabo SW20 Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Petrischalen	Sarstedt, Nürnberg
Rotilabo 0,22 µM Spritzenfilter	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nürnberg
Sunrise-basic ELISA-Reader	Tecan Austria, Grodig,

Österreich

Tabelle 2: Materialien der Zellkultur

3.1.3 Reagenzien der Molekularbiologie/Zellkultur

Reagenzien/Medium	Firma
BrdU-Cell-Proliferation-ELISA (colorimetric)	Roche, Mannheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolute	Roth, Karlsruhe
Microvascular Endothelial Cell Growth Medium (MECM)	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Supplement Mix für Endothelmedium	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin/EDTA (0,05 %)	Invitrogen, Karlsruhe
WST-1 Reagenz (Water Soluble Tetrazolium)	Roche, Mannheim

Tabelle 3: Reagenzien der Molekularbiologie/Zellkultur

3.1.4 Verwendete Zellen und Kulturbedingungen

Sowohl die Kultivierung, als auch die Arbeit mit den Zellen wurde stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Wechseln des Kulturmediums, wie auch die Behandlung von Zellen und die Herstellung steriler Lösungen geschah unter der Sterilwerkbank. Dabei wurden ausschließlich steril verpackte Kunststoffmaterialien verwendet und alle Glaswaren vor Gebrauch autoklaviert. Verwendete Lösungen und Puffer wurden zudem steril filtriert.

Das Zellkulturmedium wurde, je nach Versuch, alle zwei bis drei Tage gewechselt und die Zellen in Brutschränken bei 37°C und 5%-iger CO₂-Konzentration in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre kultiviert.

Zelllinie	Bezugsquelle	Kulturmedium
Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC, primäre Zellen)	Provitro, Berlin	500 ml Microvascular Endothelial Cell Growth Medium 38 ml Supplement-Mix 5 ml Penicillin-Streptomycin 5 % CO ₂

Tabelle 4: Verwendete Zellen und Kulturbedingungen

3.1.5 Allgemeine Zellkulturtechniken

Passagieren/Splitten

Das Zellkulturmedium wurde zunächst abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Absaugen desselbigen wurde ca. 1ml 0,05% Trypsin/EDTA hinzugegeben. Unter Mikroskopkontrolle wurde der Zeitpunkt abgepasst, an dem sich die Zellen abrundeten und sich von der Unterlage lösten. Die Trypsinierung wurde dann mit Hilfe von 5ml supplementiertem Kulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt.

Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1000Upm und Raumtemperatur wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Aufteilung der Zellen auf neue Zellkulturflaschen erfolgte im Verhältnis 1:2 bis 1:4.

Einfrieren/Lagerung von Zellen

Zellen, die aktuell nicht verwendet wurden, wurden eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Vorgehensweise war identisch mit der des Passagierens. Jedoch wurde nach der Zentrifugation der Zellsuspension das Medium abgesaugt und das Zellpellet in 2ml DMSO-haltigem Einfriermedium (10% DMSO, 10% FCS in DMEM 4500) resuspendiert. Nach Überführung in Kryoröhrchen, wurden diese in ein Einfriergefäße gegeben und über Nacht bei -80°C langsam eingefroren (-1°C/Minute). Nach 24 Stunden wurden sie dann in flüssigen Stickstoff verbracht.

Auftauen von Zellen

Zum Auftauen von Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und unter leichtem Schütteln bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Der Röhrcheninhalt wurde dann in ein mit 8ml Medium befülltes Reaktionsgefäß überführt, durchmischt und fünf Minuten lang bei 1000Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst komplett abgesaugt und das Zellpellet in 8ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend auf eine T-75-Zellkulturflasche ausgesät

3.1.6 Zellzahlbestimmung mit Casy TT (Innovatis AG)

Um die gleichmäßige Aussaat konstanter Zellzahlen zu gewährleisten, wurde eine Zellzahlbestimmung mit Hilfe von Casy TT durchgeführt. Das Gerät bestimmt sowohl die Zellzahl, als auch die Größenverteilung der Zellen über die Messung des Widerstandes

mittels elektronischer Pulsflächenanalyse. Der Messbereich wurde dabei so gewählt, dass Verfälschungen durch Fremdpartikel größtenteils ausgeschlossen werden konnten.

Das Vorgehen zur Suspendierung der Zellen entsprach dem des Passagierens. Um weiterhin eine Verunreinigung durch Fremdpartikel zu vermeiden, wurden 10ml PBS filtriert und 25µl der Zellsuspension hinzugegeben. Die Zählung der enthaltenen Zellen erlaubte dann eine Hochrechnung auf das gesamte Volumen der Zellsuspension.

3.1.7 Behandlung von Zellen

Um Versuchsergebnisse eindeutig auf die Effekte der spezifischen Behandlung der Zellen zurückführen zu können, wurden die Zellen, je nach Versuch, zwischen 4-6 Stunden in Serum- und Wachstumsfaktor-freiem Medium kultiviert. Hierdurch wurde der Stoffwechsel der Zellen in einen identischen Grundzustand gebracht.

Reagenzien	Eingesetzte Konzentration	Wirkungsweise	Zusammensetzung
LiCl	0,2-20 mM	Chemischer Aktivator des WNT/ β -Catenin-Signalwegs	In Microvascular Endothelial Cell Growth Medium
Norrin (rh Norrin)	20-40 ng/ml	Atypischer Ligand des WNT/ β -Catenin-Signalwegs	In Microvascular Endothelial Cell Growth Medium
SB216763	5-20 μ M	Chemischer Aktivator des WNT/ β -Catenin-Signalwegs	SB216763 5ng/ml DMSO
Quercetin	10 μ M	Inhibitor des WNT/ β -Catenin-Signalwegs	100 mM Quercetin in DMSO

Tabelle 5: Reagenzien zur Zellbehandlung

3.1.8 Zellüberleben/Survival – WST-1-Assay

Der Effekt von LiCl und SB216763, beides Aktivatoren des Wnt-Signalwegs, auf das Zellüberleben von HDMEC wurde mit Hilfe des *Cell-Proliferation-Reagent WST-1* (Roche, Mannheim) untersucht.

Funktionsweise von WST

Das rötliche Tetrazoliumsalz WST-1 (4-[[3-Iodophenyl]-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat) wird in Mitochondrien der Zellen aufgenommen und vom Succinat-Tetrazolium-Reduktasesystem (Dehydrogenasen) unter Verbrauch von NAD(P)H zu einem dunkelroten Formazan verstoffwechselt.

Abhängig von der Mitochondrienaktivität entsteht folglich ein Farbstoff, dessen Intensität mit Hilfe des ELISA-Readers photometrisch gemessen werden kann und einen Indikator für die Vitalität der Zellen darstellt

Versuchsdurchführung

Zunächst wurden je 8000 Zellen/Well auf 96-Well-Platten ausgesät. Nach Ausbildung eines ebenmäßigen Zellrasens, was in der Regel nach 1-2 Tagen der Fall war, wurden die Zellen über 4 Stunden mit unsubstituiertem Endothelzellmedium bei 37°C inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation über 72h mit 70µL selbigen Mediums, wobei je nach Behandlung LiCl oder rhNorrin zugegeben wurde.

Um das Überleben der Zellen zu messen, wurden anschließend 7µL WST-1-Reagenz/Well hinzugegeben, was einer Verdünnung von 1:10 entspricht. Die Kulturplatten wurden nochmals für 30 Minuten bei 37° inkubiert und dann mit Hilfe des ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Referenzwellenlänge von 690nm photometrisch vermessen.

3.1.9 Proliferationsmessung – BrdU-Assay

Der Effekt von LiCl und SB216763 auf die Proliferation wurde mit Hilfe des *colorimetric BrdU-Cell-Proliferation-ELISA* (Roche, Mannheim Deutschland) untersucht. Als Negativkontrolle diente unsubstituiertes Endothelzellmedium. Als Positivkontrolle wurde reguläres Endothelzellmedium verwendet.

Funktionsweise des BrdU-Assays

Bromodeoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidin-Analogon, das im Rahmen der Synthesephase der Zellen kompetitiv zu Thymidin in den DNA-Strang eingebaut wird. Somit wird lediglich DNA von Zellen markiert, die eine Teilung vollzogen haben. Zur Messung der Menge eingebauten BrdUs muss die dsDNA zunächst durch chemische Denaturierung in ssDNA überführt werden. Dann wird ein mit Peroxidase (POD) konjugierter BrdU-Antikörper zugegeben werden.

Nach Bindung setzt die Peroxidase Tetramethylbenzidin (TMB) in einen chromogenen Komplex um, der spektralphotometrisch messbar ist. Nach Abstoppen der Reaktion wird die Probe mit Hilfe des ELISA-Readers vermessen. Da die entstandene Farbstoffmenge direkt proportional zur Menge des in die DNA eingebauten BrdUs ist, kann die gemessene Extinktion als Maß für die Zellproliferation herangezogen werden.

Versuchsdurchführung

Zunächst wurden je 8000 Zellen/Well auf 96-Well-Platten ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen wurde sie für 4 Stunden mit unsubstituiertem Endothelmedium bei 37°C inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation über 24h mit 100µL unsubstituiertem Medium und BrdU-Labeling Solution im Verhältnis von 1:1000. Je nach Behandlung wurde LiCl, rhNorrin, SB216763 oder Quercetin zugegeben.

Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen mit 200µl Fix Denat für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend bei Raumtemperatur für 120 Minuten mit 100µl

anti-BrdU-POD/well inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 200µl Washing solution/well wurden 100µl Substrate solution (TMB)/well hinzugegeben.

Die Reaktion wurde nach 30 Minuten mit 25µl 1M H₂SO₄/well gestoppt und die Farbintensität photometrisch mit Hilfe des ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Referenzwellenlänge von 690nm gemessen.

3.1.10 Migrationsverhalten – Scratch-Assay

Das Migrationsverhalten von HDMEC wurde mit Hilfe des nach Liang (Liang, Park, und Guan 2007) modifizierten *Scratch-Assays* untersucht.

Funktionsweise des Scratch-Assays

Aus einem konfluenten Zellrasen werden durch einen mechanischen Scratch Zellen herausgelöst. Das wieder Einwandern der Zellen in diesen Bereich kann durch Vermessen der neu überwachsenen Fläche Aufschluss über das Migrationsverhalten der Zellen geben.

Versuchsdurchführung

In Zellkulturschalen von 8,8cm² wurden je 40000 Zellen ausgesät. Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens, wurden die Zellen dreimalig mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 4 Stunden mit unsubstituiertem Endothelmedium bei 37°C inkubiert.

In jeder Zellkulturschale wurden mit Hilfe einer sterilen 200µl Pipettenspitze 5 Scratches gezogen. Das Kulturmedium wurde vorsichtig abgesaugt, um abgelöste Zellen zu entfernen. Dann wurden 2ml unsubstituierten Endothelzellmediums hinzugegeben und je nachdem mit 0,2 oder 1mM LiCl behandelt.

Die Scratches wurden photographisch mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops bei 20-facher Vergrößerung dokumentiert. Eine zweite Aufnahme erfolgte nach 12-stündiger Inkubation

bei 37°C. Die Auswertung der Bilder wurde mit dem Bildanalyseprogramm Axiovision Rel. 4.8 vorgenommen.

Hierbei wurde mit Hilfe des Messwerkzeugs „Kontur“ zunächst die Zell-Scratch-Grenze abgefahren. Das Programm ermittelte hieraus die Größe A_{0h} des Scratches zum Zeitpunkt 0 in μm^2 . Zudem wurde die Länge l des Scratches in μm mit Hilfe des Werkzeuges „Länge“ vermessen.

Zum Endzeitpunkt der Inkubation nach 12 Stunden erfolgte eine erneute Vermessung der Fläche des Scratches (A_{12h}).

Aus den erhaltenen Daten wurde die Migrationsfläche als Differenz von A_{0h} und A_{12h} errechnet und ins Verhältnis zu $2l$ gesetzt.

$$\text{Migration} = \frac{A_{0h} - A_{12h}}{2l}$$

Die Migration unter verschiedener Behandlung der Zellen wurden anschließend stets ins Verhältnis zu einer Negativkontrolle bestehend aus serumfreiem Medium gesetzt.

3.2 Material und Methoden der Immunhistochemie

3.2.1 Materialien der Immunhistochemie

Materialien	Bezugsquelle
Objektträger	Dako, Hamburg
Küvetten	Schott, Mainz

Tabelle 6: Materialien der Immunhistochemie

3.2.2 Reagenzien und Antikörper der Immunhistochemie

Reagenzien und Antikörper	Zusammensetzung
3% BSA	3% BSA 0,1% Triton 0,1 Phosphatpuffer
Fluorescent Mounting Medium	Menzel-Gläser, Braunschweig
Vectashield Mountin Medium mit DAPI	Linaris, Wertheim
Primärer Antikörper	Rabbit anti- β -Catenin (1:500) in 1% BSA
Sekundärer Antikörper	Anti-rabbit-Biotin (1:5000) in 1% BSA
Streptavidin	Streptavidin-Alexa488 (1:1000) in 1% BSA

Tabelle 7: Reagenzien und Antikörper der Immunhistochemie

3.2.3 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemische Färbung ermöglicht durch eine Markierung spezifischer Proteine deren Lokalisierung im Gewebe oder Zellen. Im Falle der HDMECs wurde die Expression und Lokalisation von β -Catenin unter verschiedenen Behandlungen untersucht.

Zur besseren Lokalisierbarkeit des β -Catenins wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI markiert. Dieser interkaliert mit der DNA und wird bei Anregung mit Licht von 381nm fluoreszenzmikroskopisch sichtbar.

Indirekte Immunfluoreszenz

Für die Färbung wurden Zellen auf runden Deckgläschen ausgesät. Als sie nach 2 Tagen Inkubation zu 70% konfluent waren, wurden sie mit einem spezifischen primären Antikörper

gegen β -Catenin inkubiert. Dieser wurde in unverdünnter, 20x, 40x und 100x Verdünnung eingesetzt.

Der biotinylierte sekundäre Antikörper bindet an den Antigen-Antikörper-Komplex und kann seinerseits wiederum mit Fluorochrom konjugierte Streptavidin-Moleküle binden.

Versuchsdurchführung

HDMEC wurden zunächst 5 Minuten mit MetOH fixiert. Anschließend wurden sie dreimalig mit 0,1M Phosphatpuffer gewaschen. Nach der Inkubation mit 100 μ l 3% BSA/Well für eine Stunde, wurde der primäre Antikörper hinzugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Wasche mit 0,1M Phosphatpuffer, wurden die Zellen unter vorsichtigem Schwenken für 1h mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Es folgte ein weiterer dreimaliger Waschschrift mit 0,1M Phosphatpuffer. Schließlich wurden die Zellen unter langsamem Schwenken für eine weitere Stunde mit Streptavidin Alexa 488 inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit DAPI-haltigem Eindeckmedium eingedeckelt.

Die Untersuchung der β -Catenin-Komplexe erfolgte anschließend bei einer Wellenlänge von 488nm. Die fotografische Dokumentation wurde mit Hilfe eines AxioVision Mikroskops von Carl Zeiss und der Computersoftware AxioVision Rel 4.8 durchgeführt.

Statistik

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit dem studentischen t-Test. Statistische Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.05$ (*) als signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Lithiumchlorid aktiviert den β -Catenin-Signalweg in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)

Bereits in früheren Studien, konnte gezeigt werden, dass Lithium zu einer Inhibition von GSK-3 β und der Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs führt (Klein und Melton 1996; Phiel und Klein 2001; Ryves und Harwood 2001; Zhang u. a. 2003; Jope 2003).

Im Rahmen unserer Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob es nach Behandlung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen mit Lithium ebenfalls zum intrazellulären Anstieg freien β -Catenins kommt.

Die Zellen wurden hierfür über 3 Stunden mit Konzentrationen von 0,2mM, 1mM und 10mM LiCl behandelt und mit einer Negativkontrolle verglichen. Um die β -Catenin-Anreicherung visualisieren zu können, wurde eine immunhistochemische Färbung mit spezifischem α - β -Catenin-Antikörper angefertigt. Die zusätzliche Markierung der Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI, ermöglichte die Unterscheidung zwischen intrazellulärer versus intranukleärer Lokalisation.

In der fluoreszenzmikroskopischen Analyse war für die Negativkontrolle eine dezente, homogene intrazelluläre β -Catenin-Verteilung sichtbar. Eine nukleäre Lokalisation fand sich nicht. Die mit Lithiumchlorid behandelten Endothelzellen dagegen, zeigten eine deutliche Akkumulation von β -Catenin sowohl im perinukleären Bereich, als auch im Nukleus. Dieser Effekt war am ausgeprägtesten nach Behandlung der Zellen mit 1mM LiCl.

Somit konnte gezeigt werden, dass Lithiumchlorid den β -Catenin-Signalweg in HDMEC aktiviert und zur intranukleären Anreicherung von β -Catenin führt.

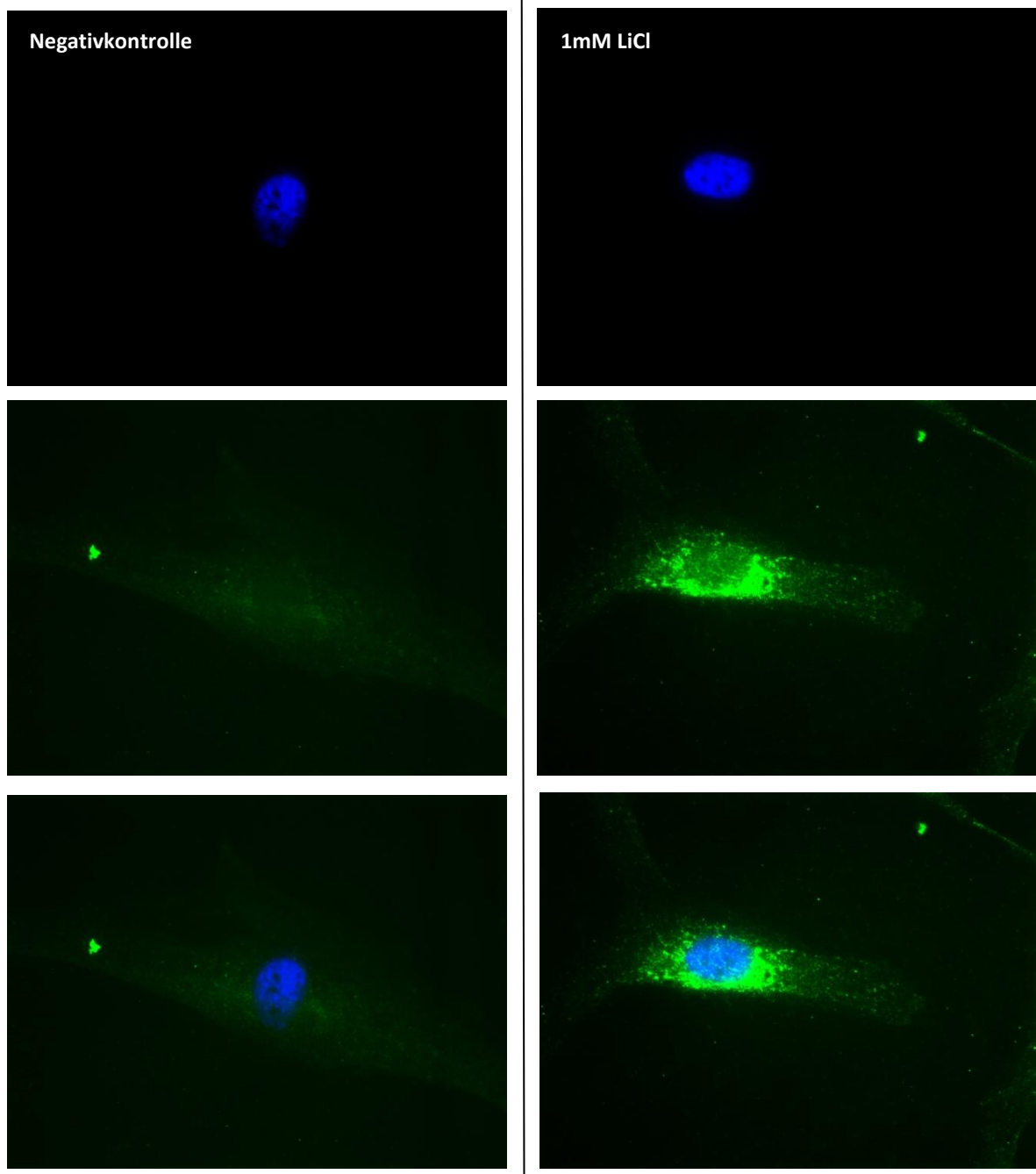


Abb 4: β -Catenin-Färbung von HDMEC nach Behandlung mit LiCl, 20-fache Vergrößerung. HDMEC wurden für 3 Stunden mit 1mM LiCl behandelt, die Negativkontrolle blieb unbehandelt. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung für β -Catenin (grün) durchgeführt. Zur Darstellung des Zellkerns wurde eine DAPI-Färbung verwendet. **Links:** In der Negativkontrolle zeigte sich eine dezente, homogene intrazelluläre β -Catenin-Verteilung. Eine nukleäre Lokalisation fand sich dabei nicht. **Rechts:** mit 1mM LiCl behandelte HDMEC zeigten eine deutlich Akkumulation von β -Catenin. Diese fand sich sowohl im perinukleären Bereich, als auch im Nukleolus.

4.2 Wirkung von Lithiumchlorid auf humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC)

Aus zahlreichen Arbeiten ist bekannt, dass der β -Catenin-Signalweg eine essenzielle Rolle bei der Vaskularisierung des Auges spielt. So führen Defekte im NDP-Gen vermutlich über eine mangelhafte Aktivierung dieser Kaskade zu verschiedenen Erkrankungen, die mit einer gestörten Ausbildung des retinalen Blutgefäßsystems einhergehen (Z. Y. Chen u. a. 1993; Shastry u. a. 1997; Black u. a. 1999; Dickinson u. a. 2006).

Andererseits wurde beobachtet, dass durch die Aktivierung dieses Signalwegs mittels rh Norrin sowohl die Proliferation von mikrovaskulären Endothelzellen induziert, als auch das Überleben verbessert und die Migration gefördert werden kann (Ohlmann u. a. 2010).

Da Lithium ebenfalls den β -Catenin-Signalweg aktiviert, sollte deshalb untersucht werden, ob es die gleiche angiogene Wirkung auf HDMEC vermitteln kann.

4.2.1 Lithiumchlorid induziert die Proliferation von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)

Um die angiogene Wirkung von Lithiumchlorid genauer zu untersuchen, wurde zunächst sein Effekt auf die Zellproliferation betrachtet. Hierzu wurde der colorimetric BrdU-Assay verwendet, bei dem das Tyrosinanalogen Bromdesoxyuridin in sich teilende Zellen eingebaut wird und anschließend in der DNA mittels ELISA-Technik nachgewiesen wird.

In 96-Well-Platten wurden hierfür humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen ausgesät und für 24 Stunden mit 0,2mM, 1mM und 10mM Lithiumchlorid inkubiert. Zur Referenz wurden außerdem Zellen mit 40ng/ml rh Norrin behandelt, sowie eine Positiv- und Negativkontrolle angelegt.

Sowohl Konzentrationen von 0,2mM, als auch 1mM Lithiumchlorid zeigten eine signifikante proliferative Wirkung auf HDMEC. Diese war bei 0,2mM mit einer Steigerung um 36% gegenüber der Negativkontrolle am deutlichsten. Sie blieb damit jedoch unter dem Niveau von rh Norrin. Mit steigenden Lithiumchlorid-Konzentrationen fiel der Effekt zunehmend ab

und war bei 10mM nur noch schwach und nicht mehr signifikant messbar. Es kann daher gefolgert werden, dass die proliferative Wirkung von Lithiumchlorid einer deutlichen Dosisabhängigkeit unterliegt.

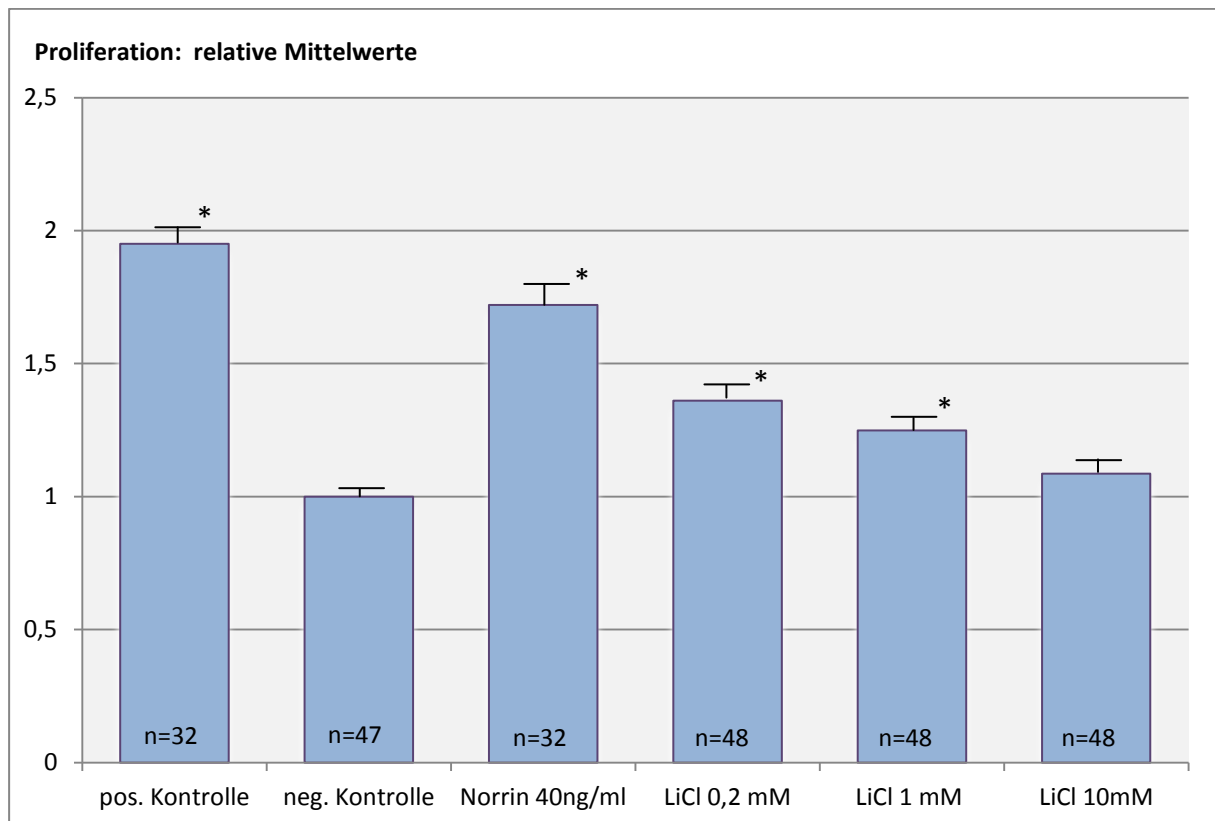


Abb 5: Proliferation humaner dermaler mikrovasculärer Endothelzellen nach 24-stündiger Inkubation mit Lithiumchlorid. Angegeben sind die relativen Werte bezogen auf die Negativkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Für die mit Lithiumchlorid behandelten HDMEC konnte ein konzentrationsabhängiger proliferativer Effekt beobachtet werden. Dieser war für 0,2mM mit 36% am ausgeprägtesten, blieb jedoch unter dem von Norrin. Mit zunehmenden Konzentrationen von LiCl nahm die Wirkung ab.

4.2.2 Induktion der Proliferation von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen durch SB216763

Nachdem gezeigt wurde, dass Lithiumchlorid durch die Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs die Proliferation von HDMEC induzieren kann, sollte dies durch ein weiteres unabhängiges Experiment mit einem weiteren Aktivator dieses Signalwegs genauer untersucht werden.

HDMEC wurden hierzu analog in 96-Well-Platten ausgesät und über 24 Stunden mit 5 μ M, 10 μ M und 20 μ M SB216763 behandelt.

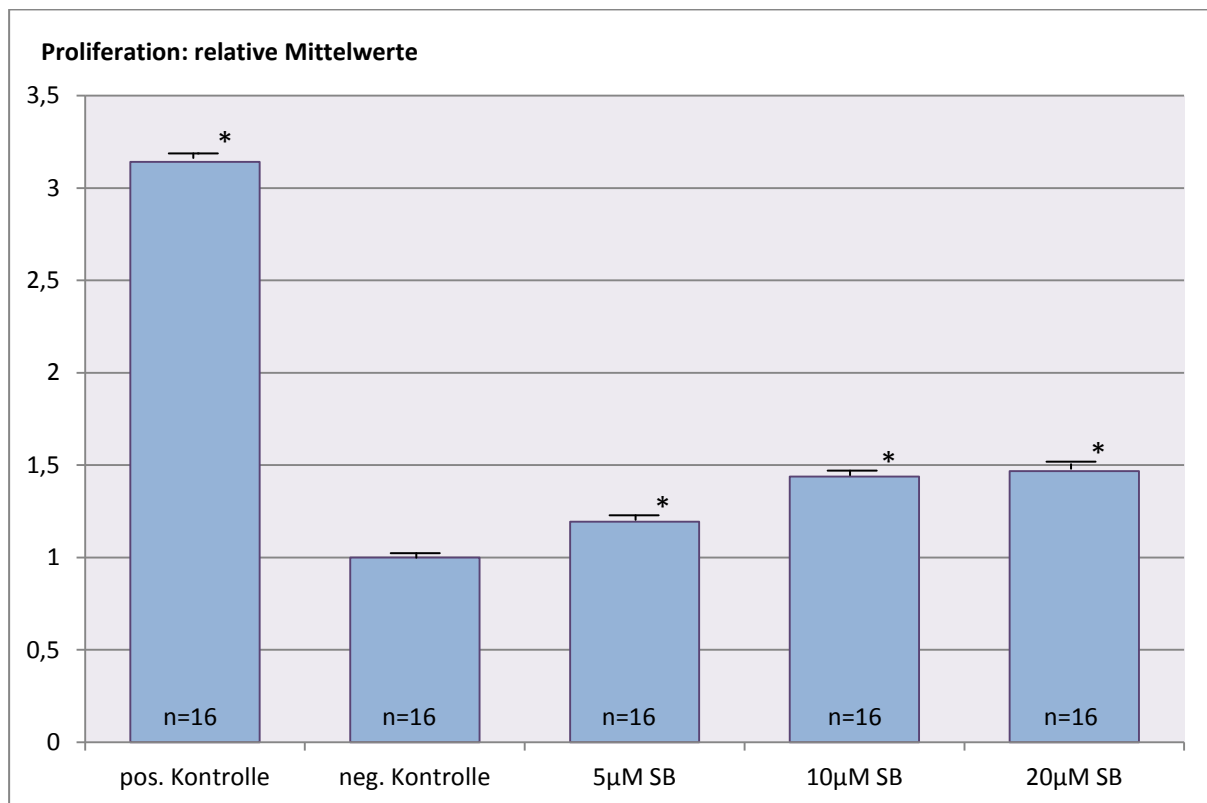


Abb 6: Proliferation humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen nach 24-stündiger Inkubation mit SB 216763. Angegeben sind die relativen Werte bezogen auf die Negativkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM von einem Experimenten. Nach Inkubation von HDMEC mit SB216763, zeigte sich gegenüber der Negativkontrolle eine dosisabhängige Zunahme der Zellproliferation. Die deutlichste Wirkung fand sich hierbei bei einer Behandlung mit 20 μ M. Sie führte zu einer signifikanten Proliferationssteigerung um 46% gegenüber der Negativkontrolle

Nach der Inkubation von HDMEC mit 5 μ M SB216763, zeigte sich gegenüber der Negativkontrolle eine signifikante Zunahme der Zellproliferation um 19%. Diese stieg dosisabhängig weiter an, wenn die Zellen mit 10 bzw. 20 μ M behandelt wurden. Die deutlichste Wirkung fand sich bei einer Behandlung mit 20 μ M, bei der im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante Zunahme der Proliferation um 46% zu beobachten war. Im Vergleich zur Positivkontrolle, war der Effekt durch SB216763 insgesamt deutlich geringer als bei der Behandlung mit LiCl.

4.2.3 Lithiumchlorid induziert Zellproliferation mittels Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs

Nachdem für Lithiumchlorid eine zellproliferative Wirkung nachgewiesen werden konnte, galt es zu zeigen, ob dies auch über den β -Catenin-Signalweg vermittelt wird oder möglicherweise andere Signalwege eine Rolle spielen. Um dies zu überprüfen, wurden die Zellen zusätzlich mit Quercetin, einem Hemmer der Translokation von β -Catenin in den Nukleus (Park u. a. 2005), behandelt.

Dafür wurden in 96-Well-Platten ausgesäte HDMEC zum einen mit 0,2mM und 1mM LiCl behandelt, zum anderen mit 0,2mM LiCl + 10 μ M Quercetin, 1mM LiCl + 10 μ M Quercetin oder 10 μ M Quercetin. Zudem wurde wiederum eine Positiv- und Negativkontrolle angelegt.

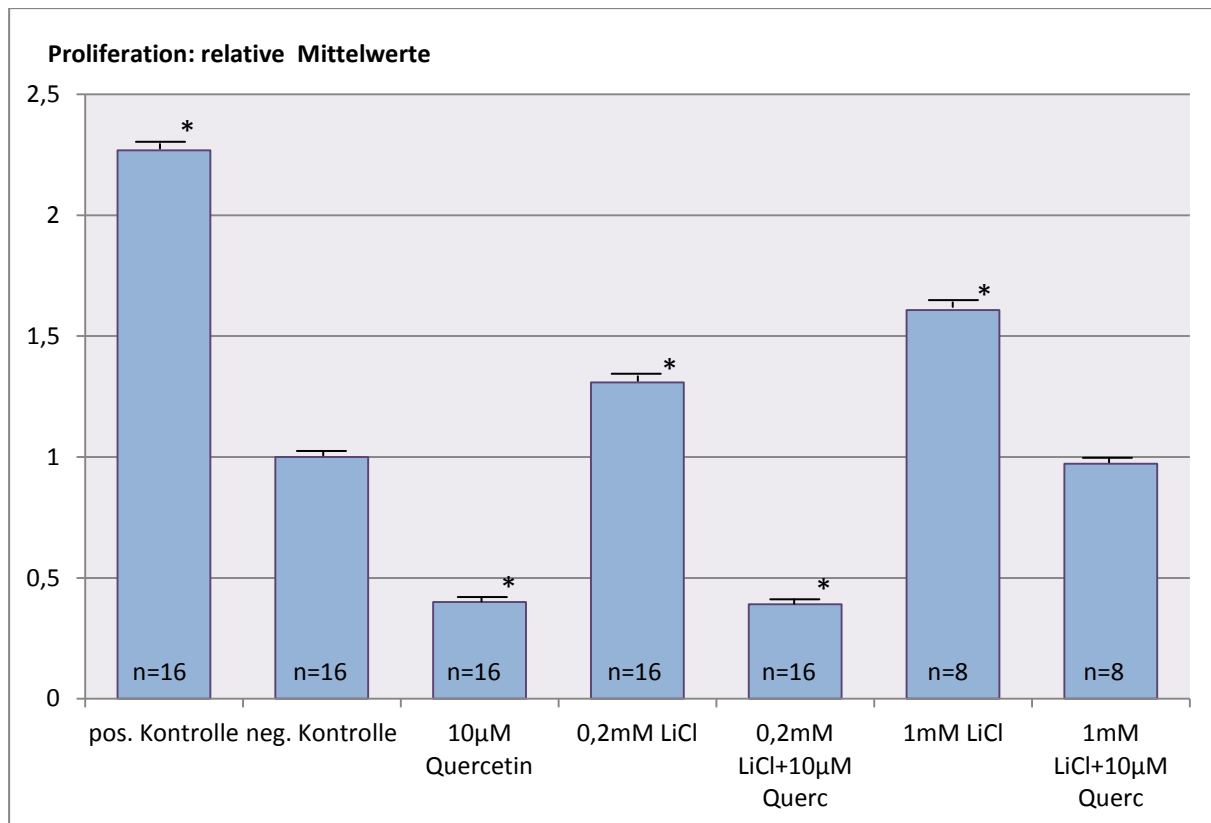


Abb 7: Proliferation humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen LiCl +/- Quercetin. Angegeben sind die relativen Werte bezogen auf die Negativkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM von einem Experiment. Durch Behandlung der Negativkontrolle und 0,2mM LiCl mit 10µM Quercetin zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellproliferation um 60 bzw. 61% gegenüber der Negativkontrolle. Die Zugabe von 10µM Quercetin zu 1mM LiCl reduzierte die Proliferation noch immer so weit, dass kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle messbar war.

Die Behandlung der Zellen mit 0,2mM und 1mM LiCl führte zu einer signifikanten Proliferationssteigerung gegenüber der Negativkontrolle. Diese lag für erstere Konzentration bei 30%, für zweitere bei 60%.

Durch Zugabe von 10µM Quercetin kam es gegenüber der Negativkontrolle zu einem signifikanten Abfall der Proliferation um 60%. Auch die durch 0,2mM LiCl induzierte Steigerung der Proliferation um 30%, konnte durch Quercetin vollständig unterdrückt werden.

Bei zunehmendem proliferativem Effekt durch Behandlung der Zellen mit 1mM LiCl, war die Inhibition durch Quercetin weniger ausgeprägt. Dennoch wurde durch Zugabe von 10µM

Quercetin die Proliferation von HDMEC auf ein Niveau gesenkt, bei dem keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle nachweisbar waren.

4.2.4 Lithiumchlorid erhöht das Überleben von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)

Als weiterer Parameter zur Beurteilung der Wirkung von Lithium auf die Angiogenese sollte dessen Wirkung auf das Überleben von HDMEC untersucht werden. Hierfür wurde das Tetrazoliumsalz WST-1 verwendet. Der Farbstoff wird intrazellulär aufgenommen und abhängig von der Mitochondrienaktivität durch Oxidoreduktasen unter NAD(P)H-Verbrauch zu einem dunkelroten Formazan verstoffwechselt. Dieser ist photometrisch messbar und ermöglicht es somit eine Aussage über die Vitalität von Zellen zu treffen.

Wiederum wurden in einer 96-Well-Platte HDMEC ausgesät, die für 72 Stunden zum einen mit 40ng/ml rh Norrin behandelt wurden, zum anderen mit 0,2, 1 und 10mM LiCl. Analog zu den vorherigen Versuchen wurde eine Positiv- und Negativkontrolle verwendet.

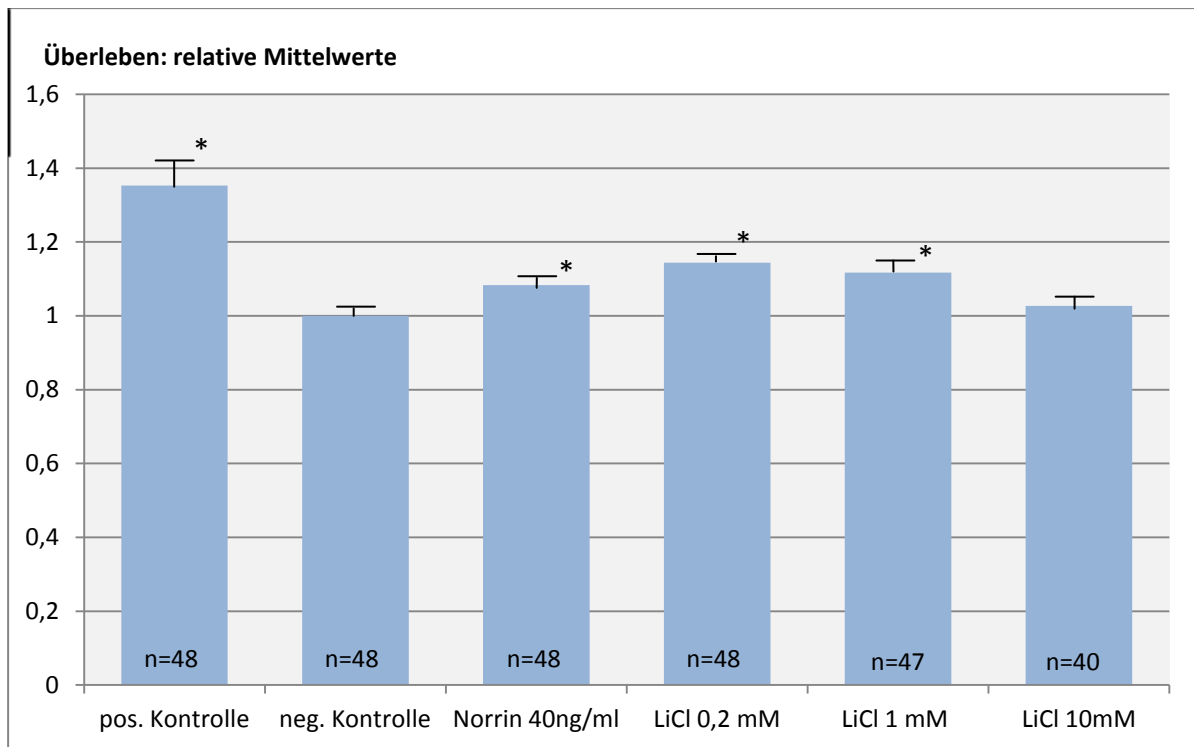


Abb 8: Überleben von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen nach 72-stündiger Behandlung mit Norrin und Konzentrationen von 0,2, 1 und 10mM LiCl. Angegeben sind die relativen Werte bezogen auf die Negativkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Die Positivkontrolle zeigte ein gegenüber der Negativkontrolle um 35% erhöhtes Überleben. Norrin erreichte eine signifikante Erhöhung um 8%, wurde jedoch von 0,2mM LiCl mit 14% und 1mM LiCl mit 11% Überlebenssteigerung noch übertroffen. Für 10mM LiCl konnte gegenüber der Negativkontrolle kein signifikanter positiver Effekt mehr nachgewiesen werden.

Bei der photometrischen Auswertung zeigte sich in der Positivkontrolle ein gegenüber der Negativkontrolle um 35% erhöhter Substratumsatz, mit mehr Zellen und somit besserem Überleben. Norrin führte zu einem geringeren, aber signifikanten Anstieg um 8%.

Bei den mit Lithiumchlorid behandelten Zellen konnte eine konzentrationsabhängige Wirkung beobachtet werden. Der deutlichste Effekt wurde hierbei für Endothelzellen erzielt, die zuvor mit 0,2mM LiCl behandelt worden waren. Sie zeigten gegenüber der Negativkontrolle einen um 14% erhöhten Substratumsatz und lagen damit über dem Effekt von Norrin. Mit zunehmenden Konzentrationen von Lithiumchlorid nahm die positive Wirkung jedoch ab. Während sie für 1mM noch bei 11% lag, konnte für 10mM kein signifikanter Anstieg gegenüber der Negativkontrolle mehr beobachtet werden.

4.2.5 Lithiumchlorid induziert die Migration humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen (HDMEC)

In einem weiteren Experiment sollte geprüft werden, ob Lithiumchlorid die Migration von HDMEC beeinflussen kann.

Dies wurde mit Hilfe von Scratch Assays untersucht. In den konfluenten Zellrasen wurden hierfür mittels einer Pipettenspitze je 5 strichförmige Verletzungen zugefügt. Anschließend wurden die Zellkulturschalen mit un-supplementiertem Endothelzellmedium versetzt und mit 0,2mM bzw. 1mM LiCl behandelt. Um später das Ausmaß der Migration beurteilen zu können, wurden die Läsionen zum Zeitpunkt 0 im Phasenkontrastmikroskop dokumentiert. Nach 12-stündiger Inkubation erfolgte eine zweite Aufnahme. Aus den zwei vermessenen Strecken und Flächen des Scratches konnte die überwachsene Fläche berechnet und verglichen werden.

Bereits in der Mikroskopie war eine ausgeprägtere Wachstumstendenz der behandelten Zellen zu beobachten. Bei der Vermessung der Scratches von mit Lithiumchlorid behandelten HDMEC, fiel gegenüber den un-behandelten Zellen ein konzentrationsabhängiges Verhalten auf. Die mit 0,2mM LiCl behandelten Endothelzellen zeigten nach 12-stündiger Inkubation eine um 12% erhöhte Migration. Noch deutlicher war der Effekt für 1mM LiCl. Hier konnte im Vergleich zur Negativkontrolle ein signifikanter Anstieg um 20% beobachtet werden.

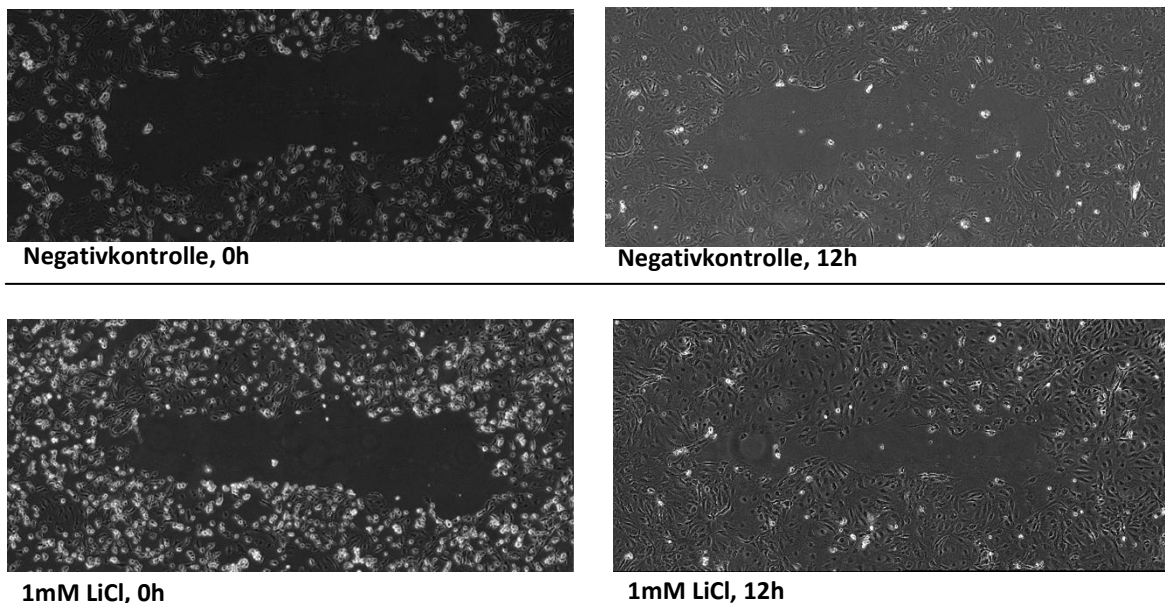


Abb 9: Migration von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen nach 12-stündiger Behandlung mit 1mM LiCl, **Oben:** Negativkontrolle zu Zeitpunkt 0 (links) und 12h (rechts), **Unten:** Nach Behandlung mit 1mM LiCl zum Zeitpunkt 0 (links) und 12h (rechts). Bei den mit LiCl behandelten Zellen war gegenüber der Negativkontrolle eine dosisabhängige Steigerung der Migration zu beobachten.

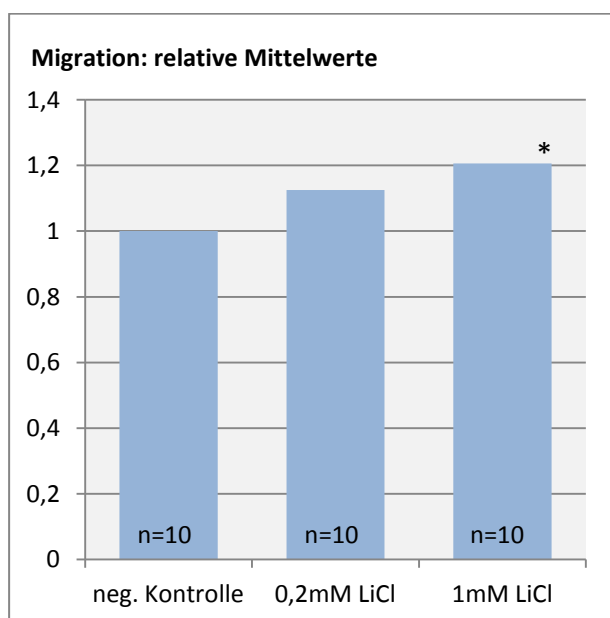


Abb 10: Migration von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen nach 12-stündiger Behandlung mit 0,2mM und 1mM LiCl. Angegeben sind die relativen Werte bezogen auf die Negativkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM von 2 unabhängigen Experimenten. Nach Behandlung von HDMEC mit LiCl zeigte sich eine gegenüber der Negativkontrolle erhöhte Migration. Am deutlichsten war dieser Effekt bei 1mM LiCl mit einem signifikanten Anstieg um 20%.

5 Diskussion

5.1 Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch Lithiumchlorid

Im Rahmen verschiedener Mausexperimente mit defektem Wnt/ β -Catenin-Signalweg, konnte bereits in der Vergangenheit verdeutlicht werden, welche wichtige Bedeutung dieser für die normale retinale Gefäßentwicklung spielt. Mäuse mit Defizienz für Norrin, Frizzled 4 oder Lrp 5 zeigen charakteristischerweise einen ähnlichen Phänotyp, der unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. Dabei kommt es vor allem zu einer verzögerten Ausbildung des primären retinalen Gefäßplexus, sowie einem Fehlen des tiefen Plexus. Gleichzeitig persistieren hyaloide Gefäße (Luhmann u. a. 2005; Ye u. a. 2009; Ohlmann und Tamm 2012).

Im Versuch mit transgenen Mäusen gelang es jedoch bei zusätzlich ektopter Norrinexpression eine normale, gerichtete Gefäßentwicklung zu ermöglichen (Ohlmann u. a. 2005). In weiterführenden Versuchen wurde außerdem sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* gezeigt, dass Norrin Angiogenese induzieren kann, indem es den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktiviert (Ohlmann u. a. 2010).

Auch für Lithium ist bekannt, dass es durch direkte und indirekte Inhibition von GSK-3 β auf den kanonischen Wnt-Signalweg Einfluss nehmen kann (Klein und Melton 1996; Phiel und Klein 2001; Ryves und Harwood 2001; Jope 2003). Bekanntermaßen wirkt es jedoch auch als Inhibitor des IP-PKC-Signalwegs. Durch Hemmung der Inositol-Monophosphatase kommt es zur Akkumulation von Diacylglyceriden, Aktivierung der DAG-abhängigen Proteinkinase C und Abfall der PKC-Isoenzyme α und ϵ (Lenox und Wang 2003).

Die genaue Wirkung der einzelnen Isoenzyme im Rahmen der Vaskularisierung ist noch nicht im Detail geklärt und Ergebnisse divergieren teils stark zwischen verschiedenen Arbeiten. So konnte im Rahmen klinischer Studien eine vasoprotektive Wirkung durch Gabe des PKC- β -Inhibitors Ruboxistaurin bei Patienten mit diabetischer Retinopathie beobachtet werden (Clarke und Dodson 2007). Der gleiche Effekt wurde auch in einem Myokardinfarkt-Modell diabetischer Mäuse gefunden (Ikeda, Matsushita, und Sakakibara 2012). Andererseits zeigten Experimente mit Mäusen mit PKC- β 2-Überexpression nach sauerstoffinduzierter retinaler Ischämie einen deutlichen Anstieg der Angiogenese, während PKC- β 2-Null-Mäuse

eine reduzierte Neovaskularisierung zeigten (Suzuma u. a. 2002). Auch dem Isoenzym PKC- ϵ kommt im Myokardinfarkt-Modell eine protektive Wirkung durch Induktion von VEGF zu (Kawata u. a. 2001).

Aufgrund einer Vielzahl von Interaktionen zwischen den genannten Signalwegen, ist grundsätzlich in Betracht zu ziehen, dass auch bei der Angiogenese Kreuzwirkungen möglich sind. So konnte in früheren Experimenten gezeigt werden, dass einige PKC-Unterformen zur Deaktivierung von GSK-3 β und folglich Akkumulation von β -Catenin führen (Goode u. a. 1992).

Dennoch ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit anzunehmen, dass die angiogenen Effekte von Lithiumchlorid primär über den β -Catenin-Signalweg vermittelt werden. Durch histochemische Färbung wurde gezeigt, dass es nach Behandlung von HDMEC zu einer Anreicherung von β -Catenin im perinukleären Zellplasma und Zellkern kommt. Um die spezifische Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs zu untersuchen, wurde die Zellproliferation nach Behandlung mit LiCl und nach SB216763 gegenübergestellt. Im Inhibitionsversuch mit Quercetin, das die Translokation von β -Catenin in den Nukleus behindert, zeigte sich außerdem eine komplette Reversibilität der durch Lithiumchlorid induzierten proliferativen Effekte.

Zusammenfassend ist es daher sehr wahrscheinlich, dass *in vitro* die Wirkung von Lithiumchlorid auf humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen auf die Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs zurückzuführen ist.

5.2 Einfluss von Lithiumchlorid auf die Proliferation humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen (HDMEC)

Im weiteren Verlauf der Arbeit untersuchten wir die angiogene Wirkung von Lithiumchlorid auf humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen. Hierbei beobachteten wir *in vitro* einen dosisabhängigen signifikanten proliferativen Effekt. Durch Behandlung der Zellen mit SB216763 und Quercetin konnten wir zudem, wie bereits beschrieben, unsere Hypothese

stützen, dass selbige Wirkung auf die Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs zurückzuführen ist.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien, die die Wirkung von Lithium auf andere Zelltypen untersuchten. So konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass Lithium in neuronalen Vorläuferzellen durch Inhibition von GSK-3 β zur vermehrten Proliferation führt (Qu, Sun, und Young 2011; Carter u. a. 2012). Analoge Effekte wurden *in vitro* auch für die Proliferation von stammzellartigen Zellen in Retinoblastomen, für Thyreozyten und Keratinozyten beobachtet (Rao u. a. 2005; Silva u. a. 2010; Hampton u. a. 2012)

In dem von uns durchgeführten Inhibitionsversuch war die beschriebene proliferative Wirkung von Lithiumchlorid durch Quercetin komplett reversibel. Dies stützt unsere Hypothese, dass Lithiumchlorid über den β -Catenin-Signalweg wirkt. Es muss jedoch bedacht werden, dass Quercetin kein spezifischer Inhibitor desselbigen ist, sondern vor allem die Translokation von β -Catenin in den Nukleus hemmt. Desweiteren reduzierte der Inhibitor bei niedrigen Lithiumchlorid-Konzentrationen die Proliferation auf Level, die deutlich unterhalb der Negativkontrolle lagen. Dies legt nahe, dass durch Quercetin zusätzlich auch endogene Signale geblockt werden.

5.3 Einfluss von Lithiumchlorid auf das Überleben humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen (HDMEC)

Im Rahmen weiterführender Experimente, konnten wir einen erhöhten Substratumsatz bei mit Lithiumchlorid behandelten HDMECs nachweisen, was für ein erhöhtes Überleben der Zellen spricht.

In früheren Versuchen an Neuronen war bereits gezeigt worden, dass die Wirkung von Lithium abhängig von der Reife der Zellen ist. Während bei unreifen zerebralen Granulazellen die Apoptose gefördert wurde, bewirkte es bei reifen Neuronen ein erhöhtes Überleben (D'Mello, Anelli, und Calissano 1994). In zahlreichen weiteren Studien konnten in

vitro und in vivo überlebensfördernde Effekte sowohl für Neuronen, als auch für retinale Ganglionzellen beobachtet werden (Willing u. a. 2002; Huang u. a. 2003; Jope 2003). Diese positive Wirkung bestätigte sich auch bei anderen Zelltypen. So erhöhte Lithium das Überleben von Brustkrebszellen (Suganthi u. a. 2012), aber auch von renalen Epithelzellen, indem es die GSK-3 β inhibierte und somit den β -Catenin-Signalweg aktivierte (Sinha u. a. 2005).

Unsere Ergebnisse reihen sich in diese Beobachtungen ein, indem sie nahelegen, dass auch in humanen dermalen mikrovaskulären Zellen Lithium das Überleben erhöht.

5.4 Einfluss von Lithiumchlorid auf die Migration humaner dermalen mikrovaskulärer Endothelzellen (HDMEC)

Um die Wirkung auf die Migration zu untersuchen, führten wir Scratch-Assays durch. Hierbei zeigte sich eine signifikante Zunahme der durch Zellen überwachsenen Fläche nach Behandlung mit Lithiumchlorid.

In verschiedenen Experimenten konnten bisher sowohl hemmende, als auch fördernde Effekte von Lithium auf die Migration von Zellen beobachtet werden, wobei die Dosis eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Tong u. a. 2001; Nowicki u. a. 2008). Während Lithium in vielen Zellen proliferations- und migrationsfördernd wirkt, gibt es Hinweise auf eine inverse Wirkungsweise in malignen Zellen. So konnte in psychiatrischen Studien beobachtet werden, dass mit Lithium behandelte Patienten ein gegenüber der Normalbevölkerung signifikant selteneres Auftreten von Malignomen zeigten (Cohen u. a. 1998). Auch in Experimenten mit Gliomazellen fiel ein Rückgang der Invasion auf (Nowicki u. a. 2008)

Dem gegenüber stehen Studien, die zeigten, dass Lithium in Neuronen die Migration anstoßen (Tong u. a. 2001) und auch in mesenchymalen Stroma- und Stammzellen konnte Lithiumchlorid durch Inhibition der GSK-3 β die Migration fördern (Tsai u. a. 2010; Kim u. a. 2013)

Da es sich bei den von uns verwendeten humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen um benigne Zellen handelt, zeigen sich unsere Ergebnisse kohärent mit der bisher bekannten

Datenlage. Diese stützt unsere Beobachtung, dass Lithiumchlorid die Migration von HDMEC fördert.

5.5 Dosisabhängigkeit der Wirkung von Lithiumchlorid auf humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC)

Im Rahmen unserer Experimente beobachteten wir für die Effekte von Lithiumchlorid eine deutliche Dosisabhängigkeit, was für eine relativ spezifische Wirkungsweise spricht. Da sich die angiogenen Effekte mit ansteigenden Konzentrationen verringerten, sollten hierbei mögliche Gründe bedacht werden.

Denkbare Ursachen sind zum einen zytotoxische Effekte, zum anderen aber auch eventuell additive Signalwege, die bei höheren LiCl-Konzentrationen verstärkt aktiviert werden oder Veränderungen des Membranpotentials.

Durch die bereits langjährige Verwendung von Lithium im Rahmen psychiatrischer Erkrankungen ist bekannt, dass seine medikamentöse Wirksamkeit einer engen therapeutischen Breite unterliegt (Timmer und Sands 1999). Um zytotoxische Effekte durch Überdosierung zu vermeiden, sind daher regelmäßige Kontrollen des Blutspiegels nötig (Reisberg B 1979; Oakley, Whyte, und Carter 2001)

Weiterhin ist zu bedenken, dass Lithiumchlorid nicht nur über die GSK-3 β -Kaskade wirken kann, sondern insbesondere in höheren Dosen auch den IP-PKC-Signalweg inhibiert (Phiel und Klein 2001). Durch Hemmung der Inositol-Monophosphatase kommt es zur Akkumulation von Diacylglyceriden. In der Folge wird die DAG-abhängige Proteinkinase C aktiviert und die PKC-Isoenzyme α und ϵ fallen ab (Lenox und Wang 2003). Insbesondere für das Isoenzym PKC- ϵ wurde im Myokardinfarkt-Modell eine protektive Wirkung durch Induktion von VEGF beschrieben (Kawata u. a. 2001). Steht dieses nun in vermindertem Maße zur Verfügung, wäre ein Rückgang der vasoprotektiven Effekte durch Lithiumchlorid erklärbar.

Eine dritte mögliche Ursache für die Dosisabhängigkeit von Lithiumchlorid könnte in der Verschiebung des Membranpotentials liegen. Hierzu wurden bisher teils divergierende

Arbeiten veröffentlicht, denen zufolge es vor allem zu einer Konzentrationsänderung von Calcium und Natrium kommt. So zeigten frühe Versuche an Neuronen, dass es durch erhöhte Lithiumkonzentrationen zum Anstieg des intrazellulären Calciums und zu einer Verlängerung des Membranpotentials kommt. Dieser Effekt war durch Blockierung der Calcium-Kanäle teilweise reversibel (Mayer, Crunelli, und Kemp 1984).

Bei chronischer Lithiumbehandlung von Neuronen wurde, insbesondere im Hypocampus, eine Abnahme der Na-K-ATPasen-Aktivität beschrieben (Lenox und Hahn 2000).

Dem gegenüber stehen Beobachtungen einiger Forschergruppen, dass sich in Erythrozyten uni- und bipolarer Patienten in der depressiven Phase eine reduzierte Na-K-ATPasen-Aktivität findet. Dies gilt als Grund für die häufig beschriebene Akkumulation von Natrium in diesen Zellen. In Anbetracht dessen, dass das Level freien Natriums mit dem des freien Calciums korreliert, könnte die verringerte Na-K-ATPasen-Aktivität zudem zur intrazellulären Akkumulation von Calcium beitragen. Nach Behandlung mit Lithium kam es bei bipolaren Patienten zum Anstieg der ATPase-Aktivität und Abfall von Calcium (Lenox und Hahn 2000)

Auch wenn die genauen Wirkungen von Lithium auf das Membranpotential verschiedener Zellen noch nicht vollständig geklärt ist, ist eine Beeinflussung offensichtlich vorhanden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass dies auch bei den von uns verwendeten humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen eine Rolle spielen könnte.

5.6 Ausblick

Zusammenfassend legen unsere Ergebnisse der Zellkultur nahe, dass Lithiumchlorid mittels Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs die Proliferation, das Überleben und die Migration von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen induzieren kann.

Dabei ist zu bedenken, dass aus den bisherigen in vitro Ergebnissen keine Schlüsse auf die Wirkung von Lithiumchlorid in vivo möglich sind. In der Netzhaut finden sich verschiedenen Zelltypen, die unterschiedlich auf die Behandlung reagieren könnten.

Frühere Arbeiten zeigten bereits neuroprotektive Wirkung von Lithium auf Neuronen (Mastroiacovo u. a. 2009) und retinale Ganglionzellen (Schuettauf u. a. 2006). Zudem wurden proliferative Effekte durch VEGF-Induktion in zerebralen Endothelzellen und Astrozyten beschrieben (Guo u. a. 2009).

Es wären daher weitergehende in vivo Versuche durch Injektion in den Glaskörper notwendig, um zu sehen welche Wirkungen Lithiumchlorid auf die Entwicklung bzw. die Regeneration von retinalen Gefäßen hat. Zudem wäre zu evaluieren, inwiefern Lithiumchlorid das Membranpotential von retinalen Neuronen und Gliazellen beeinflusst und hierdurch evtl. deren Funktion beeinflussen kann.

6 Zusammenfassung

Mit NDP-Mutationen assoziierte Erkrankungen, wie das Norrie-Syndrom, die familiäre exsudative Vitreopathie, Morbus Coats und die Retinopathia praematurorum, gehen alle mit Pathologien retinaler Gefäße einher (Black u. a. 1999; Dickinson u. a. 2006).

Norrin kann über die Bindung an frizzled-4 den klassischen Wnt-/ β -Catenin-Signalweg aktivieren (Xu et al. 2004). Experimente an Ndp-defizienten Mäusen zeigten, dass es zu einer verzögerten Ausbildung des primären retinalen Gefäßplexus und einem völligen Fehlen von intraretinalen Gefäße kommt (Richter u. a. 1998; Luhmann u. a. 2005; Ye u. a. 2009). Durch ektope transgene Norrinexpression im Auge wurden diese Fehlbildungen jedoch vollständig verhindert und eine normale Gefäßentwicklung ermöglicht (Ohlmann u. a. 2005). An mikrovaskulären Endothelzellen in der Zellkultur kann Norrin über die Aktivierung des Wnt-/ β -Catenin-Signalwegs angiogene Eigenschaften wie Proliferation, Migration und das Überleben von Endothelzellen vermitteln (Ohlmann u. a. 2010).

Da auch für LiCl eine Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs beschrieben ist, war das Ziel meiner Arbeit zu untersuchen, ob es ebenfalls angiogene Eigenschaften in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen induzieren kann. Hierfür wurde die Proliferation, Migration und das Überleben von HDMEC nach einer Behandlung mit LiCl in der Zellkultur untersucht.

Nach der Inkubation von HDMEC mit LiCl konnte eine dosisabhängige Zunahme der Proliferation beobachtet werden. Da durch die gleichzeitige Inkubation mit Quercetin, einem Inhibitor des β -Catenin-Signalwegs, dieser Effekt blockiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass der proliferative Effekt von LiCl über die Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs erfolgt. Unterstützt wird diese Beobachtung durch Experimente mit SB216763, einem spezifischen Aktivator des β -Catenin-Signalwegs, bei denen eine deutliche Zunahme der Proliferation von HDMEC beobachtet werden konnte.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass LiCl die Migration sowie das Überleben von HDMEC signifikant fördern kann, beides ebenfalls Parameter für eine potentielle angiogene Funktion von LiCl *in vitro*.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- Aberle, H, A Bauer, J Stappert, A Kispert, und R Kemler. 1997. „beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway.“ *The EMBO Journal* 16 (13) (Juli 1): 3797–3804. doi:10.1093/emboj/16.13.3797.
- Alon, T, I Hemo, A Itin, J Pe'er, J Stone, und E Keshet. 1995. „Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity.“ *Nature medicine* 1 (10) (Oktober): 1024–1028.
- Antonetti, D A, E Lieth, A J Barber, und T W Gardner. 1999. „Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy.“ *Seminars in ophthalmology* 14 (4) (Dezember): 240–248. doi:10.3109/08820539909069543.
- Ashton, Norman, Basil Ward, und Geoffrey Serpell. 1954. „Effect of Oxygen on Developing Retinal Vessels with Particular Reference to the Problem of Retrolental Fibroplasia.“ *The British Journal of Ophthalmology* 38 (7) (Juli): 397–432.
- Behrens, J, J P von Kries, M Kühl, L Bruhn, D Wedlich, R Grosschedl, und W Birchmeier. 1996. „Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1.“ *Nature* 382 (6592) (August 15): 638–642. doi:10.1038/382638a0.
- Black, G C, R Perveen, R Bonshek, M Cahill, J Clayton-Smith, I C Lloyd, und D McLeod. 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) (Oktober): 2031–2035.
- Brownlee, Michael. 2005. „The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism.“ *Diabetes* 54 (6) (Januar 6): 1615–1625. doi:10.2337/diabetes.54.6.1615.
- Carter, Calvin S., Timothy W. Vogel, Qihong Zhang, Seongjin Seo, Ruth E. Swiderski, Thomas O. Moninger, Martin D. Cassell, u. a. 2012. „Abnormal Development of NG2+PDGFR- α + Neural Progenitor Cells Leads to Neonatal Hydrocephalus in a Ciliopathy Mouse Model.“ *Nature Medicine* 18 (12): 1797–1804. doi:10.1038/nm.2996.
- Chen, R H, W V Ding, und F McCormick. 2000. „Wnt signaling to beta-catenin involves two interactive components. Glycogen synthase kinase-3beta inhibition and activation of protein kinase C.“ *The Journal of biological chemistry* 275 (23) (Juni 9): 17894–17899. doi:10.1074/jbc.M905336199.
- Chen, Z Y, E M Battinelli, A Fielder, S Bunday, K Sims, X O Breakefield, und I W Craig. 1993. „A mutation in the Norrie disease gene (NDP) associated with X-linked familial exudative vitreoretinopathy.“ *Nature genetics* 5 (2) (Oktober): 180–183. doi:10.1038/ng1093-180.
- Clarke, Margaret, und Paul M Dodson. 2007. „PKC inhibition and diabetic microvascular complications.“ *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 21 (4) (Dezember): 573–586. doi:10.1016/j.beem.2007.09.007.
- Clevers, Hans. 2006. „Wnt/beta-catenin signaling in development and disease.“ *Cell* 127 (3) (November 3): 469–480. doi:10.1016/j.cell.2006.10.018.

- Cohen, Y, A Chetrit, Y Cohen, P Sirota, und B Modan. 1998. „Cancer morbidity in psychiatric patients: influence of lithium carbonate treatment“. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 15 (1) (April): 32–36.
- D’Mello, S R, R Anelli, und P Calissano. 1994. „Lithium induces apoptosis in immature cerebellar granule cells but promotes survival of mature neurons“. *Experimental cell research* 211 (2) (April): 332–338. doi:10.1006/excr.1994.1095.
- 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. doi:10.1111/j.1442-9071.2006.01314.x.
- Dorrell, Michael I, Edith Aguilar, und Martin Friedlander. 2002. „Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion“. *Investigative ophthalmology & visual science* 43 (11) (November): 3500–3510.
- Dorrell, Michael I, Atsushi Otani, Edith Aguilar, Stacey K Moreno, und Martin Friedlander. 2004. „Adult bone marrow-derived stem cells use R-cadherin to target sites of neovascularization in the developing retina“. *Blood* 103 (9) (Mai 1): 3420–3427. doi:10.1182/blood-2003-09-3012.
- Dorrell, Michael I., und Martin Friedlander. 2006. „Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina“. *Progress in Retinal and Eye Research* 25 (3) (Mai): 277–295. doi:10.1016/j.preteyeres.2006.01.001.
- Feman, S S. 1994. „The natural history of the first clinically visible features of diabetic retinopathy.“ *Transactions of the American Ophthalmological Society* 92: 745–773.
- Flynn, J T, E Bancalari, E S Snyder, R N Goldberg, W Feuer, J Cassady, J Schiffman, H I Feldman, B Bachynski, und E Buckley. 1992. „A cohort study of transcutaneous oxygen tension and the incidence and severity of retinopathy of prematurity“. *The New England journal of medicine* 326 (16) (April 16): 1050–1054. doi:10.1056/NEJM199204163261603.
- Fruttiger, Marcus. 2007. „Development of the retinal vasculature“. *Angiogenesis* 10 (2): 77–88. doi:10.1007/s10456-007-9065-1.
- Gariano, R F, M L Iruela-Arispe, und A E Hendrickson. 1994. „Vascular development in primate retina: comparison of lamellar plexus formation in monkey and human“. *Investigative ophthalmology & visual science* 35 (9) (August): 3442–3455.
- Glumova, V. A., N. M. Petrov, und V. N. Markov. 1979. „Effect of Lithium Chloride on the Thyroid Gland in Albino Rats“. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 87 (6) (Juni 1): 640–643. doi:10.1007/BF00801410.
- Goode, N, K Hughes, J R Woodgett, und P J Parker. 1992. „Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isoforms“. *The Journal of biological chemistry* 267 (24) (August 25): 16878–16882.
- Grehn, Franz. 2012. *Augenheilkunde*. 31. Aufl. Heidelberg: Springer.
- Guo, Shuzhen, Ken Arai, Monique F Stins, De-Maw Chuang, und Eng H Lo. 2009. „Lithium upregulates vascular endothelial growth factor in brain endothelial cells and astrocytes“. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40 (2) (Februar): 652–655. doi:10.1161/STROKEAHA.108.524504.
- Guzy, Robert D, und Paul T Schumacker. 2006. „Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia“. *Experimental physiology* 91 (5) (September): 807–819. doi:10.1113/expphysiol.2006.033506.

- Hackett, Sean F, Stanley Wiegand, George Yancopoulos, und Peter A Campochiaro. 2002. „Angiopoietin-2 plays an important role in retinal angiogenesis“. *Journal of cellular physiology* 192 (2) (August): 182–187. doi:10.1002/jcp.10128.
- Hampton, Philip J, Ralph Jans, Ross J Flockhart, Graeme Parker, und Nick J Reynolds. 2012. „Lithium regulates keratinocyte proliferation via glycogen synthase kinase 3 and NFAT2 (nuclear factor of activated T cells 2)“. *Journal of cellular physiology* 227 (4) (April): 1529–1537. doi:10.1002/jcp.22872.
- Hellström, Ann, Eva Engström, Anna-Lena Hård, Kerstin Albertsson-Wikland, Björn Carlsson, Aimon Niklasson, Chatarina Löfqvist, u. a. 2003. „Postnatal serum insulin-like growth factor I deficiency is associated with retinopathy of prematurity and other complications of premature birth“. *Pediatrics* 112 (5) (November): 1016–1020.
- Huang, Xizhong, Da-Yu Wu, Guang Chen, Hussein Manji, und Dong Feng Chen. 2003. „Support of retinal ganglion cell survival and axon regeneration by lithium through a Bcl-2-dependent mechanism“. *Investigative ophthalmology & visual science* 44 (1) (Januar): 347–354.
- Ikeda, Akihiko, Shonosuke Matsushita, und Yuzuru Sakakibara. 2012. „Inhibition of protein kinase C β ameliorates impaired angiogenesis in type I diabetic mice complicating myocardial infarction“. *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society* 76 (4): 943–949.
- Jeffrey, B G, H S Weisinger, M Neuringer, und D C Mitchell. 2001. „The role of docosahexaenoic acid in retinal function“. *Lipids* 36 (9) (September): 859–871.
- Jope, Richard S. 2003. „Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes“. *Trends in pharmacological sciences* 24 (9) (September): 441–443. doi:10.1016/S0165-6147(03)00206-2.
- Kanski, Jack J. 2008. *Klinische Ophthalmologie Lehrbuch und Atlas*. 6. Aufl. München: Elsevier.
- Kawata, H, K Yoshida, A Kawamoto, H Kurioka, E Takase, Y Sasaki, K Hatanaka, u. a. 2001. „Ischemic preconditioning upregulates vascular endothelial growth factor mRNA expression and neovascularization via nuclear translocation of protein kinase C epsilon in the rat ischemic myocardium“. *Circulation research* 88 (7) (April 13): 696–704.
- Khan, Zia A., und Subrata Chakrabarti. 2007. „Cellular Signaling and Potential New Treatment Targets in Diabetic Retinopathy“. *Experimental Diabetes Research* 2007. doi:10.1155/2007/31867. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2233770/>.
- Kim, Young Seo, Min Young Noh, Ji Young Kim, Hyun-Jeung Yu, Kyung Suk Kim, Seung Hyun Kim, und Seong-Ho Koh. 2013. „Direct GSK-3 β Inhibition Enhances Mesenchymal Stromal Cell Migration by Increasing Expression of Beta-PIX and CXCR4“. *Molecular neurobiology* (Januar 5). doi:10.1007/s12035-012-8393-3.
- Kinoshita, J H, und C Nishimura. 1988. „The involvement of aldose reductase in diabetic complications“. *Diabetes/metabolism reviews* 4 (4) (Juni): 323–337.
- Kinsey, V E, H J Arnold, R E Kalina, L Stern, M Stahlman, G Odell, J M Driscoll Jr, J H Elliott, J Payne, und A Patz. 1977. „PaO₂ levels and retrolental fibroplasia: a report of the cooperative study“. *Pediatrics* 60 (5) (November): 655–668.
- Klein, P S, und D A Melton. 1996. „A molecular mechanism for the effect of lithium on development“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (16) (August 6): 8455–8459.
- Kolb, Helga. 2005. „Simple Anatomy of the Retina“. Text. Mai 1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11533/>.

- Kolm-Litty, V, U Sauer, A Nerlich, R Lehmann, und E D Schleicher. 1998. „High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells“. *The Journal of clinical investigation* 101 (1) (Januar 1): 160–169. doi:10.1172/JCI119875.
- Lenox, R H, und C G Hahn. 2000. „Overview of the mechanism of action of lithium in the brain: fifty-year update“. *The Journal of clinical psychiatry* 61 Suppl 9: 5–15.
- Lenox, R. H., und Le Wang. 2003. „Molecular Basis of Lithium Action: Integration of Lithium-responsive Signaling and Gene Expression Networks“. *Molecular Psychiatry* 8 (2): 135–144. doi:10.1038/sj.mp.4001306.
- Li, Suk-Yee, Zhong Jie Fu, und Amy C. Y. Lo. 2012. „Hypoxia-Induced Oxidative Stress in Ischemic Retinopathy“. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012. doi:10.1155/2012/426769. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3483772/>.
- Liang, Chun-Chi, Ann Y Park, und Jun-Lin Guan. 2007. „In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro“. *Nature protocols* 2 (2): 329–333. doi:10.1038/nprot.2007.30.
- Lindblom, P. 2003. „Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall“. *Genes & Development* 17 (15) (August 1): 1835–1840. doi:10.1101/gad.266803.
- Luhmann, Ulrich F O, Jihong Lin, Niyazi Acar, Stefanie Lammel, Silke Feil, Christian Grimm, Mathias W Seeliger, Hans-Peter Hammes, und Wolfgang Berger. 2005. „Role of the Norrie disease pseudoglioma gene in sprouting angiogenesis during development of the retinal vasculature“. *Investigative ophthalmology & visual science* 46 (9) (September): 3372–3382. doi:10.1167/iovs.05-0174.
- Mastroiacovo, Federica, Carla L Busceti, Francesca Biagioni, Slavianka G Moyanova, Miriam H Meisler, Giuseppe Battaglia, Andrea Caricasole, Valeria Bruno, und Ferdinando Nicoletti. 2009. „Induction of the Wnt antagonist, Dickkopf-1, contributes to the development of neuronal death in models of brain focal ischemia“. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29 (2) (Februar): 264–276. doi:10.1038/jcbfm.2008.111.
- Mayer, M L, V Crunelli, und J A Kemp. 1984. „Lithium ions increase action potential duration of mammalian neurons“. *Brain research* 293 (1) (Februar 13): 173–177.
- Molenaar, M, M van de Wetering, M Oosterwegel, J Peterson-Maduro, S Godsave, V Korinek, J Roose, O Destrée, und H Clevers. 1996. „XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos“. *Cell* 86 (3) (August 9): 391–399.
- Morita, Masanobu, Osamu Ohneda, Toshiharu Yamashita, Satoru Takahashi, Norio Suzuki, Osamu Nakajima, Shimako Kawauchi, u. a. 2003. „HLF/HIF-2 α is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin“. *The EMBO Journal* 22 (5) (März 3): 1134–1146. doi:10.1093/emboj/cdg117.
- Nielsen, J C, M I Naash, und R E Anderson. 1988. „The regional distribution of vitamins E and C in mature and premature human retinas“. *Investigative ophthalmology & visual science* 29 (1) (Januar): 22–26.
- Nowicki, Michal O., Nina Dmitrieva, Andrew M. Stein, Jennifer L. Cutter, Jakub Godlewski, Yoshinaga Saeki, Masayuki Nita, u. a. 2008. „Lithium inhibits invasion of glioma cells; possible involvement of glycogen synthase kinase-3“. *Neuro-Oncology* 10 (5) (Oktober): 690–699. doi:10.1215/15228517-2008-041.

- Oakley, Patrick W., Ian M. Whyte, und Gregory L. Carter. 2001. „Lithium Toxicity: An Iatrogenic Problem in Susceptible Individuals“. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry* 35 (6): 833–840. doi:10.1046/j.1440-1614.2001.00963.x.
- Ohlmann, Andreas, Michael Scholz, Andreas Goldwisch, Bharesh K Chauhan, Kristiane Hudl, Anne V 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. doi:10.1523/JNEUROSCI.4756-04.2005.
- Ohlmann, Andreas, Roswitha Seitz, Barbara Braunger, David Seitz, Michael R. Bösl, und Ernst R. Tamm. 2010. „Norrin Promotes Vascular Regrowth after Oxygen-Induced Retinal Vessel Loss and Suppresses Retinopathy in Mice“. *The Journal of Neuroscience* 30 (1) (Juni 1): 183–193. doi:10.1523/JNEUROSCI.3210-09.2010.
- Ohlmann, Andreas, und Ernst R. Tamm. 2012. „Norrin: Molecular and functional properties of an angiogenic and neuroprotective growth factor“. *Progress in Retinal and Eye Research* 31 (3) (Mai): 243–257. doi:10.1016/j.preteyeres.2012.02.002.
- Orford, K, C Crockett, J P Jensen, A M Weissman, und S W Byers. 1997. „Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin“. *The Journal of biological chemistry* 272 (40) (Oktober 3): 24735–24738.
- Pacher, Pál, und Csaba Szabó. 2005. „Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in the pathogenesis of diabetic complications: endothelial dysfunction, as a common underlying theme“. *Antioxidants & redox signaling* 7 (11-12) (Dezember): 1568–1580. doi:10.1089/ars.2005.7.1568.
- Pavlovich, N V, und T I Tkacheva. 1990. „[Natural penicillin resistance of *Francisella tularensis*]“. *Antibiotiki i khimioterapii* = *Antibiotics and chemotherapy [sic] / Ministerstvo meditsinskoj i mikrobiologičeskoj promyšlennosti SSSR* 35 (8) (August): 25–28.
- Pawlik, Dorota, Ryszard Lauterbach, und Ewa Turyk. 2011. „Fish-Oil Fat Emulsion Supplementation May Reduce the Risk of Severe Retinopathy in VLBW Infants“. *Pediatrics* 127 (2) (Januar 2): 223–228. doi:10.1542/peds.2010-2427.
- Penn, J S, B L Tolman, und M M Henry. 1994. „Oxygen-induced retinopathy in the rat: relationship of retinal nonperfusion to subsequent neovascularization“. *Investigative ophthalmology & visual science* 35 (9) (August): 3429–3435.
- Phiel, C J, und P S Klein. 2001. „Molecular targets of lithium action“. *Annual review of pharmacology and toxicology* 41: 789–813. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.789.
- Pierce, E A, E D Foley, und L E Smith. 1996. „Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity“. *Archives of ophthalmology* 114 (10) (Oktober): 1219–1228.
- Qu, Zhaoxia, Dongming Sun, und Wise Young. 2011. „Lithium Promotes Neural Precursor Cell Proliferation: Evidence for the Involvement of the Non-canonical GSK-3 β -NF-AT Signaling“. *Cell & Bioscience* 1 (1) (Mai 3): 18. doi:10.1186/2045-3701-1-18.
- Rao, A S, N Kremenevskaja, J Resch, und G Brabant. 2005. „Lithium stimulates proliferation in cultured thyrocytes by activating Wnt/beta-catenin signalling“. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 153 (6) (Dezember): 929–938. doi:10.1530/eje.1.02038.
- Reece, E A, A Wiznitzer, E Le, C J Homko, H Behrman, und E M Spencer. 1994. „The relation between human fetal growth and fetal blood levels of insulin-like growth factors I and II, their binding proteins, and receptors“. *Obstetrics and gynecology* 84 (1) (Juli): 88–95.

- Reisberg B, Gershon S. 1979. „Side effects associated with lithium therapy“. *Archives of General Psychiatry* 36 (8) (Juli 20): 879–887. doi:10.1001/archpsyc.1979.01780080053013.
- 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) (Januar 11): 2450–2457.
- Roy, S, und M Lorenzi. 1996. „Early biosynthetic changes in the diabetic-like retinopathy of galactose-fed rats“. *Diabetologia* 39 (6) (Juni): 735–738.
- Ryves, W J, und A J Harwood. 2001. „Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium“. *Biochemical and biophysical research communications* 280 (3) (Januar 26): 720–725. doi:10.1006/bbrc.2000.4169.
- Sapieha, Przemyslaw, Jean-Sebastien Joyal, José Carlos Rivera, Elsa Kermorvant-Duchemin, Florian Sennlaub, Pierre Hardy, Pierre Lachapelle, und Sylvain Chemtob. 2010. „Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life“. *Journal of Clinical Investigation* 120 (9) (September 1): 3022–3032. doi:10.1172/JCI42142.
- Schuettauf, Frank, Robert Rejdak, Sebastian Thaler, Sylvia Bolz, Cristiana Lehaci, Anna Mankowska, Tomasz Zarnowski, u. a. 2006. „Citicoline and lithium rescue retinal ganglion cells following partial optic nerve crush in the rat“. *Experimental eye research* 83 (5) (November): 1128–1134. doi:10.1016/j.exer.2006.05.021.
- Seitz, Roswitha, Simon Hackl, Thomas Seibuchner, Ernst R. Tamm, und Andreas 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 Müller Cells“. *The Journal of Neuroscience* 30 (17) (April 28): 5998–6010. doi:10.1523/JNEUROSCI.0730-10.2010.
- Shastry, B S, S D Pendergast, M K Hartzler, 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.
- Silva, Amanda K., Hyun Yi, Sarah H. Hayes, Gail M. Seigel, und Abigail S. Hackam. 2010. „Lithium chloride regulates the proliferation of stem-like cells in retinoblastoma cell lines: a potential role for the canonical Wnt signaling pathway“. *Molecular Vision* 16 (Januar 13): 36–45.
- Sinha, Diviya, Zhiyong Wang, Kathleen L. Ruchalski, Jerrold S. Levine, Selvi Krishnan, Wilfred Lieberthal, John H. Schwartz, und Steven C. Borkan. 2005. „Lithium Activates the Wnt and Phosphatidylinositol 3-kinase Akt Signaling Pathways to Promote Cell Survival in the Absence of Soluble Survival Factors“. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 288 (4) (Januar 4): F703–F713. doi:10.1152/ajprenal.00189.2004.
- Smith, L E, W Shen, C Perruzzi, S Soker, F Kinose, X Xu, G Robinson, u. a. 1999. „Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor“. *Nature medicine* 5 (12) (Dezember): 1390–1395. doi:10.1038/70963.
- Smith, L E, E Wesolowski, A McLellan, S K Kostyk, R D’Amato, R Sullivan, und P A D’Amore. 1994. „Oxygen-induced retinopathy in the mouse“. *Investigative ophthalmology & visual science* 35 (1) (Januar): 101–111.
- Srivastava, Satish K., Kota V. Ramana, und Aruni Bhatnagar. 2005. „Role of Aldose Reductase and Oxidative Damage in Diabetes and the Consequent Potential for Therapeutic Options“. *Endocrine Reviews* 26 (3) (Januar 5): 380–392. doi:10.1210/er.2004-0028.

- Stone, J, A Itin, T Alon, J Pe'er, H Gnessin, T Chan-Ling, und E Keshet. 1995. „Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia“. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 15 (7 Pt 1) (Juli): 4738–4747.
- Suganthi, Muralidharan, Gopalakrishnan Sangeetha, Chellakan Selvanesan Benson, Somasundaram Dinesh Babu, Anandhan Sathyavathy, Sivakumar Ramadoss, und Bhaskaran Ravi Sankar. 2012. „In vitro mechanisms involved in the regulation of cell survival by lithium chloride and IGF-1 in human hormone-dependent breast cancer cells (MCF-7)“. *Toxicology letters* 214 (2) (Oktober 17): 182–191. doi:10.1016/j.toxlet.2012.08.022.
- Suzuma, Kiyoshi, Noriko Takahara, Izumi Suzuma, Keiji Isshiki, Kohjiro Ueki, Michael Leitges, Lloyd Paul Aiello, und George L King. 2002. „Characterization of protein kinase C beta isoform's action on retinoblastoma protein phosphorylation, vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation, and retinal neovascularization“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2) (Januar 22): 721–726. doi:10.1073/pnas.022644499.
- Timmer, Richard T., und Jeff M. Sands. 1999. „Lithium Intoxication“. *Journal of the American Society of Nephrology* 10 (3) (Januar 3): 666–674.
- Tong, N, J F Sanchez, S B Maggirwar, S H Ramirez, H Guo, S Dewhurst, und H A Gelbard. 2001. „Activation of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) by platelet activating factor mediates migration and cell death in cerebellar granule neurons“. *The European journal of neuroscience* 13 (10) (Mai): 1913–1922.
- Tsai, Li-Kai, Yan Leng, Zhifei Wang, Peter Leeds, und De-Maw Chuang. 2010. „The Mood Stabilizers Valproic Acid and Lithium Enhance Mesenchymal Stem Cell Migration via Distinct Mechanisms“. *Neuropsychopharmacology* 35 (11): 2225–2237. doi:10.1038/npp.2010.97.
- Wang, G L, und G L Semenza. 1993. „General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (9) (Mai 1): 4304–4308.
- Willing, Alison E, Tanja Zigova, Melissa Milliken, Steve Poulos, Samuel Saporta, Michael McGrogan, Gary Snable, und Paul R Sanberg. 2002. „Lithium exposure enhances survival of NT2N cells (hNT neurons) in the hemiparkinsonian rat“. *The European journal of neuroscience* 16 (12) (Dezember): 2271–2278.
- Xu, Qiang, Yanshu Wang, Alain Dabdoub, Philip M Smallwood, John 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.
- Yabe-Nishimura, Chihiro. 1998. „Aldose Reductase in Glucose Toxicity: A Potential Target for the Prevention of Diabetic Complications“. *Pharmacological Reviews* 50 (1) (Januar 3): 21–34.
- Ye, Xin, Yanshu Wang, Hugh Cahill, Minzhong Yu, Tudor C Badea, Philip M 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. doi:10.1016/j.cell.2009.07.047.
- Zhang, Fang, Christopher J Phiel, Laura Spece, Nadia Gurvich, und Peter S Klein. 2003. „Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3“. *The Journal of biological chemistry* 278 (35) (August 29): 33067–33077. doi:10.1074/jbc.M212635200.

7.2 Abkürzungen

AGE	Advanced glycation end products
Ang2	Angiopoietin 2
DAG	Diacylglycerin
Fzd4	Frizzled 4 Protein
HDMEC	Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
IGF	Insulin-like growth factor
INL	Inner nuclear layer/ Innere Körnerschicht
IP	Inositolmonophosphat
Let	Lymphoid enhancer element
Lrp5	Low density lipoprotein receptor protein 5
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Hydrogenat
NDDP Gen	Norrin Disease Pseudoglioma Gen
NPDR	Nicht proliferative diabetische Retinopathie
PDGFA	Platelet derived growth factor A
PDR	Proliferative diabetische Retinopathie
PKC	Proteinkinase C
ROP	Retinopathy of prematurity/ Retinopathia praematurorum
ROS	Reaktiver oxidativer Stress
Tcf	T-Zellfaktor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLDL	Very low density lipoprotein

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Allgemeine Laborausstattung	S.19
Tabelle 2	Materialien der Zellkultur	S.20
Tabelle 3	Reagenzien der Molekularbiologie/ Zellkulturen	S.21
Tabelle 4	Verwendete Zellen und Kulturbedingungen	S.22
Tabelle 5	Reagenzien zur Zellbehandlung	S.24
Tabelle 6	Materialien der Immunhistochemie	S.28
Tabelle 7	Reagenzien und Antikörper der Immunhistochemie	S.29

7.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung des okulären und retinalen Aufbaus	S.05
Abbildung 2	Schematische Darstellung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs	S.13
Abbildung 3	Interaktion des Wnt/ β -Catenin- und des IP-PKC-Signalwegs	S.17
Abbildung 4	β -Catenin-Färbung von HDMEC nach Behandlung mit LiCl	S.32
Abbildung 5	Proliferation von HDMEC nach 24-stündiger Inkubation mit LiCl	S.34
Abbildung 6	Proliferation von HDMEC nach 24-stündiger Inkubation mit SB216763	S.35
Abbildung 7	Proliferation von HDMEC nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von LiCl +/- Quercetin	S.36
Abbildung 8	Überleben von HDMEC nach 72-stündiger Behandlung mit Norrin und Konzentration von 0,2mM, 1mM und 10mM LiCl	S.39
Abbildung 9	Migration von HDMEC nach 12-stündiger Inkubation mit 1mM LiCl	S.41
Abbildung 10	Migration von HDMEC nach 12-stündiger Inkubation mit 0,2 und 1mM LiCl	S.41

7.5 Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. med. E. Tamm und PD Dr. med. A. Ohlmann für den interessanten Themenvorschlag und die intensive Betreuung über die letzten Jahre danken. Nicht nur hat mir dies die Chance gegeben mit einer Vielzahl von Labormethoden Erfahrung zu sammeln, sondern auch tiefere Einblicke in die wissenschaftliche Denk- und Arbeitsweise zu gewinnen.

Mein besonderer Dank gilt Andreas, der immer für Fragen offen war und sich in zahlreichen Besprechungen Zeit für meine Probleme nahm. Auch möchte ich mich bei Roswitha Seitz und Ludwig Zeilbeck für die Einarbeitung und gute Zusammenarbeit bedanken, sowie bei Margit Schimmel für ihre Hilfe in der Immunhistochemie.

Nicht zuletzt danke ich PD Dr. Rudi Fuchshofer für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Eine besonders großer Dank gilt auch meiner Familie und Freunden, die die Höhen und Tiefen meiner Arbeit mit durchleben durften. Vielen Dank für die Geduld und Ermutigungen!

7.6 Erklärung

Die Dissertation wurde angeregt und ihre Ausarbeitung überwacht von PD Dr. Andreas Ohlmann.

Hiermit erkläre ich, 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.

Regensburg, den 15.12.2014

Verena Knobloch

7.7 Curriculum Vitae

Name	Verena Knobloch
Anschrift	Oberstraße 3 20144 Hamburg
Telefon	0176 - 7000 6707
E-Mail	verena_knobloch@yahoo.com
Geburtsdatum	25.12.1984
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Ledig

Ausbildung & Beruf

1991-1993	Deutsche Schule Barcelona, Spanien
1993-1995	Grundschule Altenfurt, Nürnberg
1995-2001	Neues Gymnasium Nürnberg
2001-2002	Lakeside High School, Atlanta, USA
2002-2004	Neues Gymnasium Nürnberg, Abitur
2004-2006	Studium der Betriebswirtschaftslehre mit Fremdsprachen Englisch, Französisch, Spanisch (Vordiplom), Universität Passau
2006- 2012	Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg, Staatsexamen und Approbation im Herbst 2012
Seit 03/2013	Assistenzärztin in der Kardiologie, Universitäres Herzzentrum Hamburg

Auslandserfahrung

1990-1993	Barcelona, Spanien
2001-2002	Lakeside High School, Atlanta, USA (Austauschjahr)
06-09/2005	Siemens-Paris, Frankreich (Praktikum im strategischen Marketing)
04/2007	Kantonsspital Münsterlingen, Schweiz (Pflegepraktikum)
03/2010	Centro Médico Americano de Progreso, Mexiko (Famulatur Anästhesie)
03-04/2010	ISSSTE Regional de Mérida, Mexiko (Famulatur Innere Medizin)
08-11/2012	Hôpital Neuchâtelois, Schweiz (PJ Chirurgie)
01-03/2012	University of California San Diego, USA (PJ Innere)

Forschung & Lehre

10/2007- 01/2008	Präp-HiWi am Lehrstuhl für Anatomie, Universität Regensburg
02-03/2009	Präp-HiWi am Lehrstuhl für Anatomie, Universität Regensburg
04/2009-2014	Promotion am Lehrstuhl für Anatomie Prof. Dr. med. Tamm, Universität Regensburg, zum Thema „Effekte von LiCl auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg“
Seit 03/2013	Lehre in der Kardiologie, Universitäres Herzzentrum Hamburg

Sonstige Qualifikationen

Stipendien	Auslandsstipendium der Universität Regensburg für ein PJ-Tertial an der University of California San Diego, USA
Sprachen	Deutsch: Muttersprache Englisch: fließend Französisch: sehr gut Spanisch: gut

Außerberufliche Interessen

Freizeit	Joggen, Wellenreiten, Reisen, Klavier
----------	---------------------------------------