

# **Einfluss des kanonischen Wnt-Signalwegs auf die retinale Vaskularisierung**



## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin der  
Universität Regensburg

vorgelegt von

**Birgit Barbara Müller**

aus Regensburg

im Jahr 2015

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

27. 04. 2015

Die Arbeit wurde angeleitet von:

PD Dr. Andreas Ohlmann

Unterschrift:

**Meiner Familie**

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Die Retina .....	1
1.1.1	Struktureller Aufbau der Retina .....	1
1.1.2	Bedeutung der Müllerzellen in der Retina .....	2
1.1.3	Entwicklung der retinalen Gefäßplexus.....	4
1.2	Das proangiogene Protein Norrin .....	8
1.2.1	Das <i>NDP</i> -Gen und die Expression von Norrin .....	8
1.2.2	Mutationen im <i>NDP</i> -Gen - das Norrie-Syndrom.....	10
1.2.3	Aktivierung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs .....	10
1.2.4	Angiogene Eigenschaften von Norrin.....	12
1.3	Erkrankungen des retinalen Gefäßsystems .....	14
1.3.1	<i>Retinopathia praematurorum</i> (ROP) .....	15
1.3.2	Das Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR) .....	16
2	Zielsetzung.....	18
3	Material und Methoden .....	19
3.1	Materiallisten .....	19
3.1.1	Reagenzienliste .....	19
3.1.2	Materialien und Geräte .....	21
3.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	22
3.1.4	Enzyme und Reagenzien-Kits.....	23
3.1.5	Oligonukleotidprimer und DNA-Leiter .....	23
3.1.6	Antikörper und Molekulargewichtsstandard .....	24
3.1.7	Rezepte für Lösungen und Puffer .....	25
3.2	Tiermodelle .....	28
3.2.1	Versuchstiere und Tierhaltung .....	28
3.2.2	Tamoxifenbehandlung .....	29
3.2.3	Das Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie .....	31

3.2.3.1	Experimentelle Durchführung.....	31
3.2.3.2	Quantifizierung der retinalen Gefäßveränderungen .....	32
3.2.4	Perfusion.....	33
3.2.5	Retinapräparation .....	34
3.2.6	Herstellung von retinalen Häutchenpräparaten.....	35
3.3	Molekularbiologische Techniken .....	35
3.3.1	Genotypisierung der Mäuse.....	35
3.3.1.1	DNA-Extraktion aus Mausschwanzbiopsien .....	35
3.3.1.2	Genotypisierungs-PCR.....	36
3.3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	37
3.3.2	Expressionsanalysen .....	37
3.3.2.1	RNA-Extraktion.....	37
3.3.2.2	RNA-Konzentrationsbestimmung .....	38
3.3.2.3	cDNA-Herstellung.....	39
3.3.2.4	Quantitative real-time RT-PCR.....	40
3.3.3	Proteinbiochemische Techniken .....	41
3.3.3.1	Proteinextraktion .....	41
3.3.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem BCA-Assay .....	42
3.3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	43
3.3.3.4	Western Blot Transfer .....	44
3.3.3.5	Nachweis spezifischer Proteine im Western Blot .....	45
3.3.3.6	Coomassie-Färbung.....	46
3.4	Histologische Techniken .....	47
3.4.1	Einbettverfahren und Herstellung von Gewebeschnitten .....	47
3.4.1.1	Kryo.....	47
3.4.1.2	Paraffin .....	47
3.4.1.3	Epon.....	48
3.4.2	Färbungen.....	49

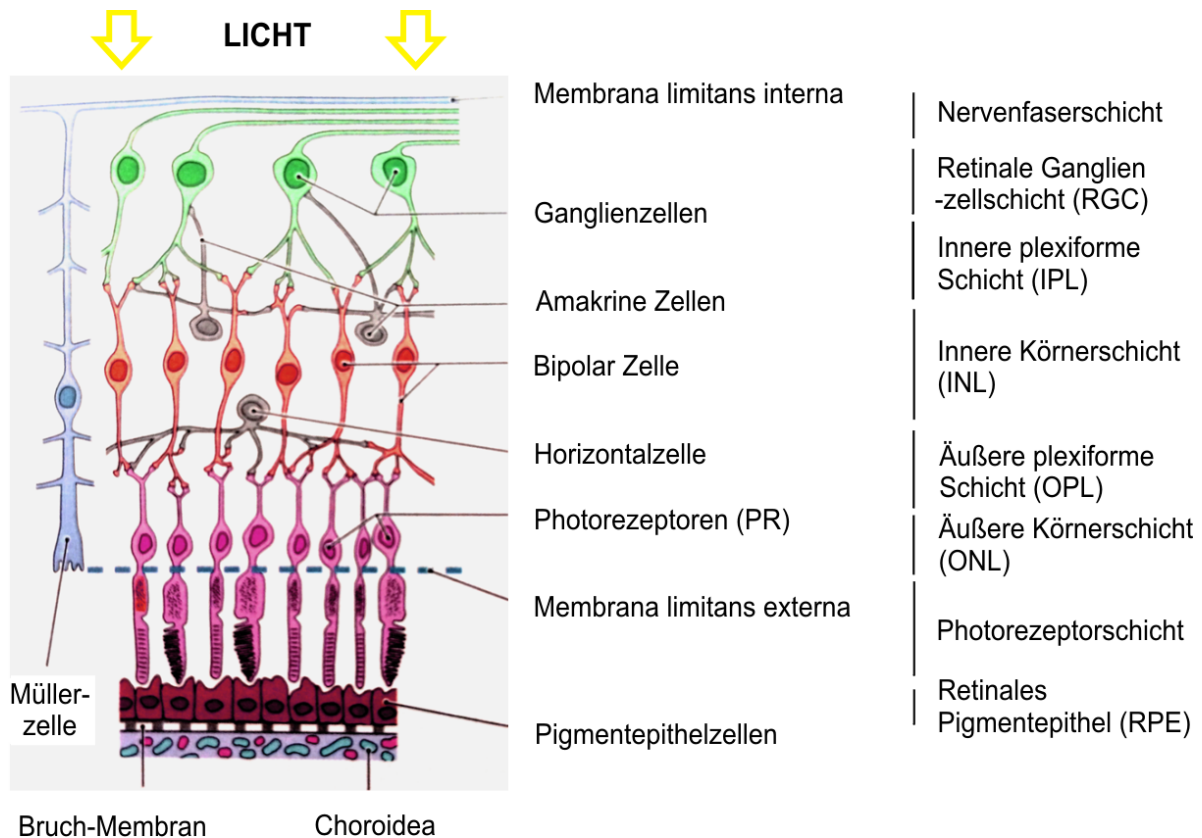
3.4.2.1	Immunhistochemische Färbungen .....	49
3.4.2.2	X-Gal histochemische Färbung .....	51
3.4.2.3	Färbung nach Richardson .....	52
3.4.3	Mikroskopie .....	52
3.4.4	Dickenmessung von Retina, INL und ONL .....	52
3.5	Auswertung und Statistik .....	53
4	Ergebnisse .....	54
4.1	Deletion von <i>Ctnnb1</i> in Müllerzellen während der Entwicklung der retinalen Gefäße .....	54
4.1.1	Verifizierung der konditionellen $\beta$ -Catenin-Defizienz in Müllerzellen .....	55
4.1.2	Untersuchung des Einflusses des Tamoxifen-induzierbaren Cre-Systems auf die Retina .....	58
4.1.3	Untersuchung des Gefäßphänotyps nach Induktion der $\beta$ -Catenin-Defizienz in Müllerzellen von P1-P5 .....	62
4.1.4	Untersuchung des Gefäßphänotyps nach Induktion der $\beta$ -Catenin-Defizienz in Müllerzellen von P5-P8 .....	69
4.2	Deletion von <i>Ctnnb1</i> in Müllerzellen im adulten Tier .....	73
4.2.1	Verifizierung der konditionellen $\beta$ -Catenin-Defizienz in Müllerzellen .....	73
4.2.2	Untersuchung des Einflusses des Tamoxifen-induzierbaren Cre-Systems auf die Retina .....	76
4.2.3	Auswirkungen der $\beta$ -Catenin Defizienz in Müllerzellen auf das ausgebildete retinale Gefäßsystem im adulten Tier .....	80
4.3	Einfluss der $\beta$ -Catenin-Defizienz in Müllerzellen auf die Revaskularisierung nach Induktion einer Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR) .....	83
4.4	Einfluss der Norrin-Überexpression auf die Vaskularisierung nach OIR .....	92
4.4.1	Norrin vermittelt seine angiogenen Effekte nach OIR nicht über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen .....	93
4.4.2	Norrin vermittelt seine angiogenen Effekte zumindest teilweise über Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen .....	99
5	Diskussion .....	107

5.1	Charakterisierung der Slc1a3Cre <sup>ERT2</sup> /Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup> Mauslinie.....	107
5.2	Einfluss des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen auf die retinale Gefäßentwicklung und -stabilität .....	109
5.3	Einfluss des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen auf die Revaskularisierung der Retina nach OIR .....	112
5.4	Wirkung von Norrin auf die Revaskularisierung nach OIR bei $\beta$ -Catenin-Defizienz in Müller- und mikrovaskulären Endothelzellen .....	117
6	Zusammenfassung.....	122
7	Anhang.....	124
7.1	Literaturverzeichnis .....	124
7.2	Abkürzungsverzeichnis .....	131
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	135
7.4	Tabellenverzeichnis.....	138
7.5	Erklärung.....	139

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Retina

### 1.1.1 Struktureller Aufbau der Retina



**Abb. 1: Schematische Darstellung der retinalen Schichten und Zelltypen im menschlichen Auge**  
 Modifiziert nach Karl Wesker und Markus Voll (Abbildung M-5.12 Duale Reihe Anatomie, Ausgabe 1, (Konstantin 2007))

Die Netzhaut ist sowohl im Mensch als auch in der Maus streng in einzelne Schichten unterteilt. Hierbei sorgen die darin liegenden, spezialisierten Zellen für eine optimale Weiterleitung und Verarbeitung der Lichtimpulse. Bei einem Querschnitt durch die Retina, wie in Abb. 1 schematisch dargestellt, lassen sich insgesamt zehn Schichten unterscheiden. Die äußere Abgrenzung ist hierbei das retinale Pigmentepithel (RPE). Neben seiner Funktion Streulicht zu minimieren und damit die Sehqualität zu erhöhen, sind die Zellen des RPE maßgeblich für die Versorgung der Photorezeptoren mit Nährstoffen aus der darunterliegenden *Choroidea* zuständig. Des Weiteren wird der Abbau der Membrandisks der Außensegmente sowie das Recycling des Sehstoffs 11-cis-Retinal durch das RPE übernommen (Strauss 2009). In der Photorezeptorschicht befinden sich die Außen- und Innensegmente der

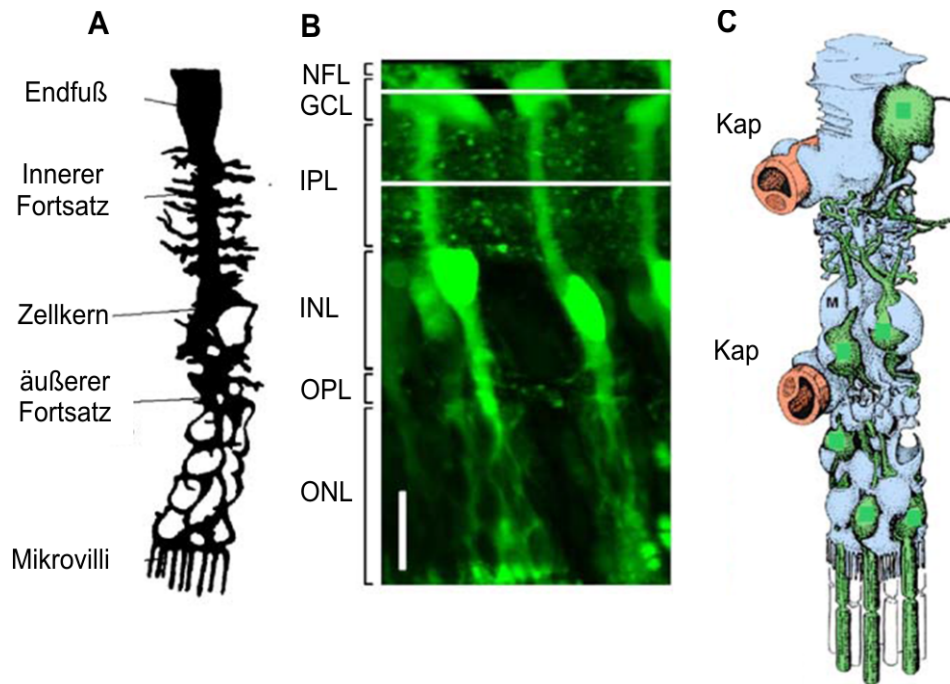


Stäbchen und Zapfen, in denen die Phototransduktion stattfindet. Ihre Zellkerne befinden sich in der weiter innen liegenden äußeren Körnerschicht (ONL). Getrennt werden diese beiden Schichten durch die *Membrana limitans externa*, die von den Fortsätzen der Müllerzellen gebildet wird. Zur Weiterleitung der Impulse aus den Photorezeptoren bilden deren Axone, in der äußeren plexiformen Schicht (OPL), synaptische Verbindungen mit den Bipolarzellen aus. Deren *Somata* sind wiederum in der nach innen anschließenden inneren Körnerschicht (INL) lokalisiert. In der INL befinden sich zudem auch die Zellkerne der glialen Müllerzellen sowie der Horizontal- und der Amakrinzellen. Die innere plexiforme Schicht (IPL) entsteht durch die Synapsen zwischen den Axonen der bipolaren und amakrinen Zellen sowie den retinalen Ganglienzellen. Letztere bilden mit ihren *Somata*, zusammen mit den Astrozyten, die retinale Ganglienzellschicht (RGC) sowie schließlich die Nervenfaserschicht aus. Als innerste Schicht grenzt die, durch die Endfüße der Müllerzellfortsätze gebildete, *Membrana limitans interna* die Retina vom Glaskörper ab.

### 1.1.2 Bedeutung der Müllerzellen in der Retina

Innerhalb der Retina von Säugetieren kommen zwei Typen von Gliazellen vor. Auf der einen Seite stehen die Mikroglia, die das Immunsystem im retinalen Gewebe repräsentieren und somit für die immunologische Abwehr sowie die Aktivierung von Entzündungs- und Reparaturprozessen zuständig sind. Auf der anderen Seite befinden sich die Makroglia, bei denen es sich prinzipiell um Müllerzellen handelt. Nur in vaskularisierten Retinae sind hier zusätzlich auch Astrozyten als Bestandteil der Makroglia nachzuweisen (Bringmann, Pannicke et al. 2006). Bei den Müllerzellen handelt es sich um radiäre Gliazellen, deren Zellkerne in der INL lokalisiert sind und deren Zellfortsätze annähernd die komplette Dicke der Retina durchziehen (vgl. Abb. 2). Ihre Endfüße bilden in der retinalen Nervenfaserschicht die *Membrana limitans interna* aus, während die Fortsätze am äußeren Rand der ONL in der *Membrana limitans externa* enden (Newman and Reichenbach 1996; Bringmann, Pannicke et al. 2006). Dabei ummanteln die Müllerzellen die Zellkerne und Fortsätze aller retinalen Neurone. Im Bereich der plexiformen Schichten finden sich zudem zahlreiche seitliche Abzweigungen zur Interaktion mit den Synapsen. Wie in Abb. 2 C dargestellt

kommt es so zur Ausbildung einer Art funktionellen Einheit zwischen Müllerzellen und Neuronen. Auf dieser Grundlage ist es den Müllerzellen möglich ihre vielfältigen Aufgaben optimal auszuführen (Reichenbach, Stolzenburg et al. 1993; Uckermann, Vargova et al. 2004; Jadhav, Roesch et al. 2009).



**Abb. 2: Morphologie der Müllerzelle**

A: Morphologische Darstellung einer Müllerzelle. B: Darstellung einer Müllerzelle *in vivo* mittels Mitotracker Orange (grün). Maßstabsbalken: 20µm. C: Schematische Darstellung der physiologischen Einheit aus Müllerzelle (blau) und den Neuronen (grün) und Kapillaren (Kap; rot). Modifiziert nach A: (Bringmann, Pannicke et al. 2006) B: (Uckermann, Vargova et al. 2004) C: (Reichenbach, Stolzenburg et al. 1993).

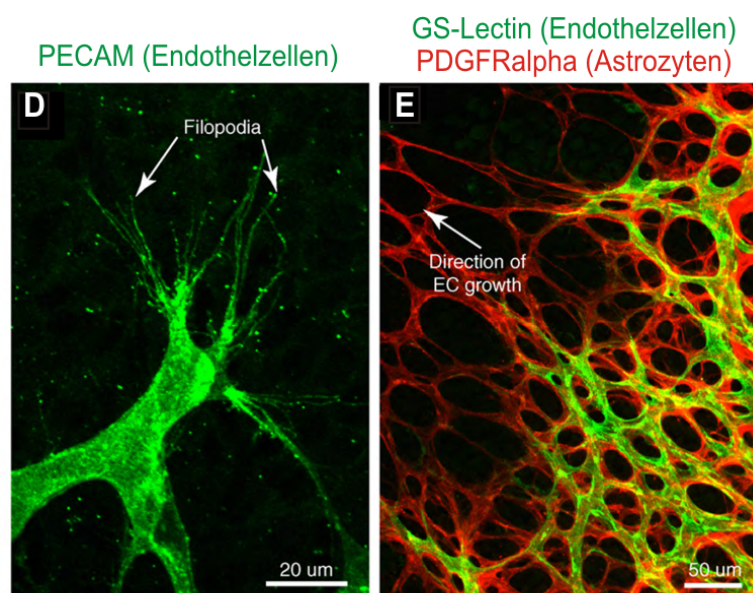
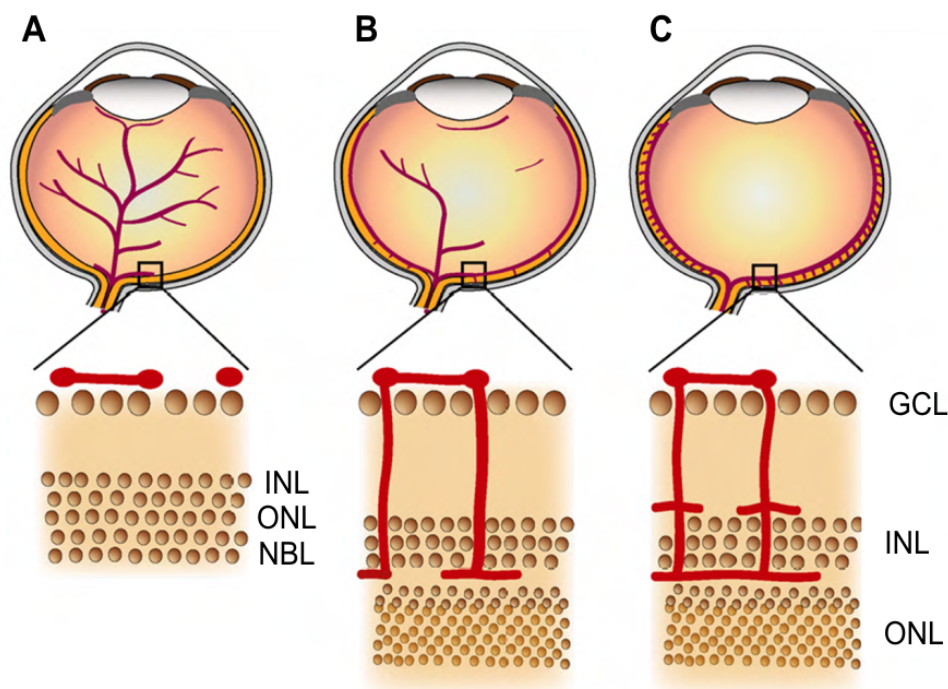
Müllerzellen sind u.a. für die Aufrechterhaltung der Kalium- und Wasserhomöostase innerhalb der Retina verantwortlich. Vor allem die  $K^+$ -Homöostase ist hierbei besonders wichtig um die Neurone vor Hyperexzitation zu schützen (Newman and Reichenbach 1996). Hierfür exprimieren Müllerzellen eine große Anzahl an  $K^+$ -Kanälen und Aquaporinen (Nagelhus, Horio et al. 1999). Weiterhin trägt zum Schutz der Neurone vor Hyperexzitation aber auch die Expression von speziellen Transportern wie u.a. GAT-3 ( $\gamma$ -Aminobuttersäure- (GABA) Transporter) und GLAST (Glutamat/Aspartat Transporter) zur Wiederaufnahme der präsynaptisch freigesetzten Neurotransmitter GABA und Glutamat bei (Otori, Shimada et al. 1994; Johnson, Chen et al. 1996). Über GABA-Transaminase und Glutaminsynthetase werden die aufgenommenen Neurotransmitter recycelt und als Glutamine wieder den

Neuronen zugeführt (Umapathy, Li et al. 2005). Zusätzlich spielen Müllerzellen aber auch schon während der Entwicklung eine bedeutende Rolle. Bereits die unreifen Müllerzellen dienen als eine Art Grundgerüst für die entstehenden Neurone und somit für die strukturelle Organisation der Retina (Willbold, Berger et al. 1997). Entsprechend scheinen sie auch im späteren Verlauf für die Ausbildung der intraretinalen Gefäßplexus als Leitschiene für die einwachsenden Kapillaren zu dienen (Stone, Itin et al. 1995). Sicher ist, dass Müllerzellen mit den retinalen Kapillaren, ebenso wie mit den Neuronen, in engem Kontakt stehen und für die Ausbildung der Blut-Retina-Schranke (BRB) und der Regulation deren Dichte verantwortlich sind (D'Amore 1994). Beide Prozesse werden durch die Ausschüttung von proangiogenen Faktoren, z.B. VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und antiangiogenen Faktoren, z.B. PEDF (*pigment epithelium derived growth factor*) reguliert (Stone, Itin et al. 1995; Dawson, Volpert et al. 1999). Auf Grund ihres besonderen Metabolismus haben Müllerzellen einen geringen Sauerstoffverbrauch und sind demnach weniger anfällig für Hypoxie (Winkler, Arnold et al. 2000). Müllerzellen reagieren auf Hypoxie, indem sie durch Hif1 $\alpha$  aktiviert werden und daraufhin neurotrophe und angiogene Faktoren ausschütten (Kubota and Suda 2009). Demnach spielen sie auch unter pathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle. Bei der diabetischen Retinopathien konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es durch Induktion der VEGF Expression und gleichzeitiger Reduktion von PEDF zur Ausbildung von Neovaskularisationen und dem Verlust der BRB kommt (Amin, Frank et al. 1997; Boehm, Lang et al. 2003).

### 1.1.3 Entwicklung der retinalen Gefäßplexus

Die Versorgung der Retina erfolgt über ein Zusammenspiel unterschiedlicher Gefäßsysteme. Das äußere Drittel der Retina wird über die *Choroidea* versorgt, deren Kapillaren unterhalb des RPE lokalisiert sind (Chan-Ling 2010). In diesem Bereich findet sich ein fenestriertes Endothel, das im Detail, die Zellen des RPEs sowie die darüber liegenden Photorezeptoren versorgt. Die Versorgung der inneren Bereiche der Netzhaut, wird während der frühen Entwicklung durch ein einfaches arterielles Gefäßsystem, den Hyaloidalgefäßen, gewährleistet (Saint-Geniez and D'Amore 2004). Erst etwas später entwickeln sich drei, miteinander in Verbindung

stehende Gefäßplexus, die letztendlich die inneren zwei Drittel der Netzhaut versorgen (vgl. Abb. 3 A-C) (Dorrell and Friedlander 2006).



TRENDS in Molecular Medicine

### Abb. 3: Entwicklung des retinalen Gefäßsystems

A-C: Darstellung der Vaskularisierung im zeitlichen Verlauf. Beginnend von der *Papilla nervi optici* kommt es zur Ausbildung des oberflächlichen Plexus (A). Erst nach dessen Entwicklung und Differenzierung sprossen Gefäße aus und migrieren in die Retina, wo es dann zur Formation des tiefen und mittleren Plexus kommt (B, C). Gleichzeitig mit dieser Vaskularisierung kommt es zur Regression der hyaloidalen Gefäße. D: Immunhistochemische Darstellung einer *Tip Cell* mit Filopodien. E: Bei der Entwicklung des oberflächlichen Plexus wachsen die Endothelzellen (grün) entlang eines durch Astrozyten (rot) ausgebildeten Netzwerks. NBL: Neuroblastenschicht. Modifiziert nach (Ye, Wang et al. 2010)

Während der Entstehungsphase dieses retinalen Gefäßsystems kommt es zeitgleich zu einer durch Makrophagen vermittelten Regression der hyaloidalen Gefäße (Diez-Roux and Lang 1997; Fruttiger 2007). Im Mensch findet dieser Prozess *in utero* statt und beginnt während des 4. Schwangerschaftsmonats. Erst zum Zeitpunkt der Geburt, in etwa nach der 40. Gestationswoche, ist die retinale Gefäßentwicklung abgeschlossen (Provis 2001). Im Gegensatz dazu wird die Gefäßentwicklung in der Maus erst mit der Geburt induziert und dauert etwa drei Wochen (Stahl, Connor et al. 2010). Die Lokalisation der einzelnen Plexus unterscheidet sich in beiden Spezies hierbei nicht, wobei sich der oberflächliche Plexus in der retinalen Ganglienzellschicht entwickelt, während sich der intermediäre und tiefe Plexus am inneren und äußeren Rand der INL ausbilden (vgl. Abb. 3 B). Die Entstehung dieser Gefäßplexus folgt dabei, im Unterschied zu anderen Organen, einem sehr strikten zeitlichen und räumlichen Prinzip. Zunächst entsteht, sowohl beim Mensch als auch in der Maus, der oberflächliche Plexus (Fruttiger 2007). Grundlegend hierfür ist ein Netzwerk aus Astrozyten, das sich kurz vor Beginn der Vaskularisierung bildet und als Gerüst für die einwandernden Endothelzellen dient (Dorrell, Aguilar et al. 2002). Die Kapillaren bilden sich zunächst im Bereich des Sehnervenkopfes (ONH) (vgl. Abb. 3 A). Beim Mensch spielt hierbei vermutlich der Prozess der Vaskulogenese eine Rolle, bei dem es zur Neubildung von Gefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen kommt (Chan-Ling, McLeod et al. 2004). Derartige Angioblasten konnten in der Maus bisher nicht nachgewiesen werden, so dass hier der Ursprung der ersten Gefäße eher auf dem Prozess der Angiogenese (Aussprossung neuer Gefäße von bereits existierenden Gefäßen) beruht (Fruttiger 2002). Relativ sicher ist, dass die Proliferation der Endothelzellen durch verschiedene Wachstumsfaktoren, unter anderen VEGF und IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), vermittelt wird (Smith, Shen et al. 1999; Salhia, Angelov et al. 2000). Diese Faktoren werden von Astrozyten, nach deren Hypoxie induzierter Aktivierung durch den Transkriptionsfaktor Hif1 $\alpha$ , im retinalen Gewebe ausgeschüttet (Ozaki, Hayashi et al. 1997; Kubota and Suda 2009). Um dem astrozytären Netzwerk zu folgen, befinden sich an der Spitze der entstehenden Kapillaren spezialisierte Endothelzellen, sogenannte *Tip Cells* (vgl. Abb. 3D, E). In ihren Filopodien konnte das Vorhandensein von VEGFR2 sowie von Adhensionsmolekülen wie R-Cadherin und Integrinen nachgewiesen werden. Vermutlich werden Filopodien nahe den zugrundeliegenden Astrozyten durch die VEGF-Interaktion stabilisiert (Dorrell,

Aguilar et al. 2002; Gerhardt, Golding et al. 2003). Darauf folgend kommt es zur Ausbildung weiterer Adhärenzverbindungen und zur Umdifferenzierung der Endothelzellen in sogenannte *Stalk Cells*, die durch die Bildung eines Lumens zu neuen Gefäßen in diesem Bereich führen (Siemerink, Augustin et al. 2010). Entsprechend diesem Mechanismus breitet sich der oberflächliche Plexus vom ONH radiär in die Peripherie aus. Währenddessen kommt es in den bereits vaskularisierten Bereichen zur Ausdifferenzierung des unreifen Gefäßplexus. Über die Expression von PDGFB (*platelet derived growth factor b*) rekrutieren die Endothelzellen Perizyten, die die Kapillaren ummanteln und so stabilisieren (Lindahl, Johansson et al. 1997; Hellstrom, Kalen et al. 1999). Zusätzlich kommt es durch cytotoxische T-Lymphozyten, die in der Maus ab P5 über den Sehnerv einwandern, über FasL zur Induktion von Apoptose in den Endothelzellen und somit zum Abbau von überschüssigen, nicht stabilisierten Kapillaren (Ishida, Yamashiro et al. 2003). Ausgehend von dem so entstandenen oberflächlichen Plexus beginnt in der Maus ab P8 die Entwicklung der intraretinalen Gefäßplexus wobei zunächst der intermediäre und dann der tiefe Plexus entsteht (vgl. Abb. 3 C). Interessanterweise findet man beim Mensch eine umgekehrte Reihenfolge, in der der intermediäre vor dem tiefen Plexus gebildet wird (Gariano 2003). In beiden Fällen erfolgt die Ausbildung der intraretinalen Kapillaren aber durch Angiogenese. Im Detail kommt es hierbei zur Aussprossung von Gefäßen des oberflächlichen Plexus, die abzweigen und in die tieferen Schichten der Netzhaut einwandern (Hughes, Yang et al. 2000; Saint-Geniez and D'Amore 2004). Initiiert wird dieser Prozess vermutlich durch eine steigende Hypoxie in den äußeren Schichten, bedingt durch die Verdickung der reifenden Netzhaut (Dreher, Robinson et al. 1992) sowie einem Anstieg der neuronalen Aktivität, die einen erhöhten Sauerstoffbedarf zur Folge hat (Dorrell and Friedlander 2006). Auf Grund der Absenz von Astrozyten in den tieferen Schichten der Netzhaut müssen die Endothelzellen anderweitig in die Tiefe dirigiert werden. Höchstwahrscheinlich spielen dabei die glialen Müllerzellen eine entsprechende Rolle, da diese während dieses Prozesses vermehrt VEGF ausschütten (Stone, Itin et al. 1995). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass es in dieser Phase am inneren und äußeren Rand der INL zur Expression von R-Cadherin kommt, wodurch den Endothelzellen vermutlich vermittelt wird, wie weit sie in die tieferen Schichten einwachsen müssen (Honjo, Tanihara et al. 2000). Dies wird auch durch Untersuchungen von R-Cadherin Knockout Mäusen bestätigt, in denen die Gefäße

ungehindert in die Photorezeptorschicht und bis in den subretinalen Raum einwachsen (Dorrell, Aguilar et al. 2002). Nach vollständiger Entwicklung der retinalen Gefäße wird die Angiogenese wieder gestoppt. Hierfür scheinen zum einen der, durch die Normoxie, sinkende VEGF-Spiegel sowie die Expression von antiangiogenen Faktoren wie PEDF verantwortlich zu sein. Generell konnte in Bezug auf die Vaskularisierung der tiefen retinalen Schichten noch nicht ausreichend geklärt werden, welche Zelltypen und Faktoren dies speziell regulieren. Einige Studien an Knockout Mäusen weisen aber auf die Beteiligung bestimmter Proteine hin. So zeigte sich, dass die Defizienz von *NDP* (*Norrie disease pseudoglioma*; Norrin) oder des dazugehörigen Rezeptors *Fzd4* zu einem kompletten Fehlen von intraretinalen Gefäßen führt (Xu, Wang et al. 2004; Luhmann, Lin et al. 2005). Interessanterweise bildet sich der oberflächliche Plexus in beiden Fällen relativ normal aus. Die Ausbildung dieses Phänotyps konnte in *Ndp<sup>y/-</sup>* Mäusen durch die ektope Überexpression von Norrin in der Linse wieder komplett aufgehoben werden (Ohlmann, Scholz et al. 2005). In weiteren Untersuchungen entsprechender Knockout Mäuse konnten auch für die Proteine *Lrp5* (*low density lipoprotein receptor-related protein 5*) und *Tspan12* (Tetraspanin 12) ähnliche Phänotypen beschrieben werden (Kato, Patel et al. 2002; Junge, Yang et al. 2009). Interessanterweise handelt es sich dabei um Co-Rezeptoren für Norrin (He, Semenov et al. 2004; Junge, Yang et al. 2009). Da alle diese Proteine an der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs beteiligt sind, scheint dieser eine entscheidende Rolle bei der Vaskularisierung der Netzhaut zu spielen.

## 1.2 Das proangiogene Protein Norrin

### 1.2.1 Das *NDP*-Gen und die Expression von Norrin

Das im Menschen auf dem X-Chromosom (Xp11.4) lokalisierte *NDP*-Gen (*Norrie disease pseudoglioma*) kodiert eine 2,1 kb große mRNA in der drei Exons enthalten sind. Durch Translation entsteht daraus das 133 bp lange Protein Norrin. In der Maus ist das *NDP*-Gen ebenfalls X-chromosomal lokalisiert. Für das murine Genprodukt, das eine Länge von 131 bp aufweist, konnte eine 95%-ige Homologie zum humanen Protein nachgewiesen werden (Battinelli, Boyd et al. 1996). *In silico* Analysen weisen daraufhin, dass Norrin, ähnlich wie einige andere Wachstumsfaktoren wie z.B. der

TGF $\beta$ -Superfamilie, ein Cystein-Knoten-Motiv enthält (Meitinger, Meindl et al. 1993). Dieses wird im Exon 3 kodiert. Zudem handelt es sich bei Norrin um ein sezerniertes Protein, wobei die Sekretion durch ein N-terminales Signalpeptid vermittelt wird (Meindl, Berger et al. 1992; Battinelli, Boyd et al. 1996). Extrazellulär kommt es zur Ausbildung von Oligomeren, von 25-200 kDa, wofür das Cystein an Position 95 von zentraler Bedeutung ist. Wie frühere Studien durch Aminosäureaustauschexperimente an dieser Position zeigen konnten, bilden sich hierüber Disulfidbrücken aus. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Oligomerisierung auch eine grundlegende Rolle für die Bioaktivität von Norrin spielt, da monomeres Norrin zwar in der Lage ist an Fzd4 zu binden, aber nicht den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg zu aktivieren (Perez-Vilar and Hill 1997; Shastry and Trese 2003; Smallwood, Williams et al. 2007; Junge, Yang et al. 2009). Generell vermittelt Norrin seine Wirkung sowohl über autokrine als auch parakrine Weise.

Zur Identifikation der Expressionsorte von Norrin wurden mehrere Studien durchgeführt, die allerdings zu kontroversen Ergebnissen führten. So wurde in Studien unter Verwendung von *in situ* Hybridisierung die Expression von Norrin in retinalen Ganglienzellen sowie Zellen der INL und ONL in humanen und murinen Retinae beobachtet. Außerhalb des Auges konnte Norrin mRNA in fast allen Teilen des Gehirns detektiert werden (Berger, van de Pol et al. 1996; Hartzler, Cheng et al. 1999). Darüber hinaus zeigte sich in Mäusen auch ein Vorkommen von Norrin mRNA in verschiedenen Reproduktionsorganen und in der Niere (Hsieh, Boerboom et al. 2005; Luhmann, Meunier et al. 2005). In einer Studie von Ye et al. mit *Ndp<sup>AP</sup>*-Mäusen, in denen das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) unter der Kontrolle des endogenen *Ndp*-Promotors exprimiert wird, zeigten sich allerdings andere Befunde. So konnte eine erste Expression von Norrin im Auge um den Embryonaltag (E) 15,5 im Bereich des Sehnervenkopfs detektiert werden wobei sich das AP-Signal nach der Geburt homogen in der gesamten Retina verteilte. Als Quelle der Norrin-Expression konnten dabei ausschließlich Müllerzellen identifiziert werden (Ye, Wang et al. 2009). In ähnlicher Weise zeigte sich, dass Norrin im Gehirn ebenfalls von glialen Zellen exprimiert wird. So war in *Ndp<sup>AP</sup>*-Mäusen ein AP-Signal in Astrozyten sowie in den speziell im Cerebellum vorkommenden Bergmann Glia zu detektieren. Zudem fand sich eine Expression von *NDP* im Bereich des Corti Organs und in der *Stria vascularis* (Ye, Smallwood et al. 2011).



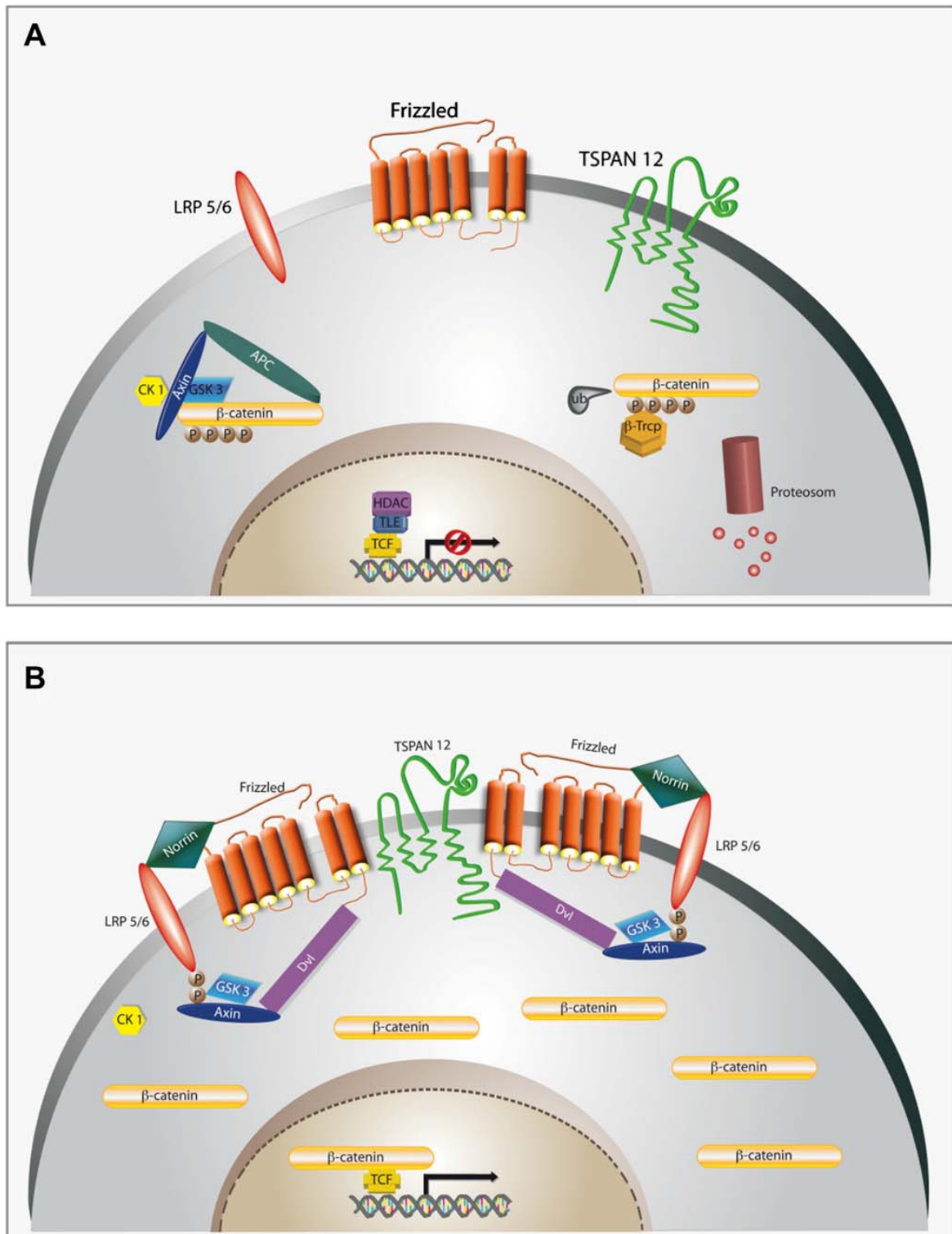
### 1.2.2 Mutationen im *NDP*-Gen - das Norrie-Syndrom

Bisher konnten bereits mehr als 100 verschiedene Mutationen im *NDP*-Gen identifiziert werden (die meisten davon im Exon 3), die im Zusammenhang mit retinalen Erkrankungen stehen. Primär ist hier das Norrie-Syndrom zu nennen (Meindl, Berger et al. 1992; Nikopoulos, Venselaar et al. 2010), bei dem es sich um eine rezessiv X-chromosomale Erbkrankheit handelt, die entsprechend in erster Linie Männer betrifft. Neben dem Leitsymptom Erblindung führt es in etwa 1/4 der Betroffenen auch zu mentaler Retardierung und Taubheit. Erstmals wurde dieses Syndrom von Dr. Gordon Norrie im Jahre 1927 beschrieben und später auch nach ihm benannt (Norrie 1927). Erst in weiteren Studien in den 1960er Jahren wurde die Erkrankung durch Mette Warburg genauer charakterisiert. Ursache für die Erblindung sind hierbei diverse strukturelle Veränderungen im Auge. Hierzu zählen z.B. Trübung der Cornea, Irisatrophie, Neovaskularisationen und Synechien der Iris im vorderen Augenabschnitt sowie vermindertes Wachstum und Missbildungen der retinalen Gefäße, Ablösung der Retina und fibrotische Veränderungen im hinteren Augenabschnitt (Andersen and Warburg 1961; Warburg 1961; Warburg 1963; Warburg 1966; Donnai, Mountford et al. 1988). Wie bereits erwähnt zeigen *Ndp*<sup>Y/-</sup> Mäuse ebenfalls deutliche vaskuläre Veränderungen innerhalb der Retina (Richter, Gottanka et al. 1998). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass es hierdurch ebenfalls zur Erblindung kommt und dass die Tiere unter Taubheit leiden (Rehm, Gutierrez-Espeleta et al. 1997; Richter, Gottanka et al. 1998). Da ähnliche Phänotypen ebenfalls in Mäusen mit einem Knockout von anderen am kanonischen Wnt-Signalweg beteiligten Proteinen, wie Fzd4 und LRP5, nachgewiesen werden konnten (Kato, Patel et al. 2002; Junge, Yang et al. 2009), scheint dieser Signalweg einen entscheidenden Stellenwert in der Regulation der retinalen Vaskularisierung einzunehmen.

### 1.2.3 Aktivierung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs

Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs erfolgt durch Ligandenbindung an den Fzd4 Rezeptor sowie den Co-Rezeptor LRP5/6 (He, Semenov et al. 2004). Obwohl für Norrin keine Homologie zu den Mitgliedern der Wnt (*Wingless-type MMTV integrationsite family*) -Familie aufweist, ergaben entsprechende Studien eine

hohe selektive Affinität gegenüber der *Cysteine-rich domain* (CRD) des Fzd4 Rezeptors (Smallwood, Williams et al. 2007).



**Abb. 4: Der Norrin/β-Catenin-Signalweg.**

Vereinfachte Darstellung des Norrin/β-Catenin-Signalwegs. A: Inaktiver Zustand des Signalwegs wenn keine Ligandbindung besteht. B: Aktivierter Signalweg nach Bindung des Liganden Norrin an den Rezeptor Fzd4 und den Co-Rezeptor Lrp5/6. Nach Ohlmann und Tamm (Ohlmann & Tamm 2012).

Durch die hierbei durchgeführten *TOPflash* Analysen konnte zudem auch eine entsprechende Aktivierung des Fzd4/ $\beta$ -Catenin Signalwegs nach Bindung von Norrin nachgewiesen werden (Xu, Wang et al. 2004). Demnach lässt sich vermuten, dass Norrin seine Effekte über diesen Signalweg vermittelt. In einer weiteren Studie konnte zusätzlich Tspan12 als Co-Rezeptor für Norrin identifiziert werden (Junge, Yang et al. 2009). Wie bereits erwähnt, zeigt sich bei einem Knockout von *Tspan12* ein ähnlicher retinaler Gefäßphänotyp wie bei *Ndp<sup>y/-</sup>*, *Fzd4<sup>-/-</sup>* und *LRP5<sup>-/-</sup>* Mäusen. Durch *TOPflash* Analysen zeigte sich *in vitro* eine 3-fache Erhöhung des Wnt-Signals nach Norrin Bindung im Vergleich zu Zellen ohne Tspan12. Grund hierfür ist vermutlich ein verstärktes *Rezeptor-Clustering* (Junge, Yang et al. 2009). Generell findet eine konstitutive Expression von  $\beta$ -Catenin statt. Bei Abwesenheit eines Liganden wird  $\beta$ -Catenin allerdings dann von seinem Degradationskomplex, bestehend aus Axin, APC (*Adenomatous polyposis coli*), CK1 (*Casein kinase 1, alpha 1*) und GSK-3 $\beta$  (*Glycogensynthase kinase-3 $\beta$* ) gebunden und durch die beiden Letzteren phosphoryliert. Anschließend wird  $\beta$ -Catenin durch die E3-Ubiquitin-Ligase  $\beta$ -Trcp (*beta-transducin repeat containing*) ubiquitiniert und letztlich im Proteasom abgebaut. Die Bindung eines Liganden an den Fzd4 Rezeptor induziert hingegen die Inaktivierung des Degradationskomplexes, so dass  $\beta$ -Catenin nicht länger degradiert wird, sondern statt dessen, im Cytoplasma akkumuliert und schließlich in den Zellkern transloziert (MacDonald, Tamai et al. 2009). Durch Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren Lef (*lymphoid enhancer-binding factor*)/TCF (*T-cell factor*) induziert  $\beta$ -Catenin die Transkription entsprechender Zielgene, die vor allem an der Regulation von Entwicklungsprozessen wie Proliferation und Differenzierung beteiligt sind (Logan and Nusse 2004).

### 1.2.4 Angiogene Eigenschaften von Norrin

Die funktionellen Eigenschaften von Norrin konnten primär in Studien von Norrin-defizienten (*Ndp<sup>y/-</sup>*)-Mäusen identifiziert werden. Hierbei wurde beschrieben, dass Norrin über die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs neuroprotektive und angiogene Effekte vermittelt (Ohlmann and Tamm 2012). Ersteres basiert auf der Beobachtung, dass es in der Retina von *Ndp<sup>y/-</sup>* Mäusen zu einem erhöhten Verlust von retinalen Ganglienzellen kommt (Richter, Gottanka et al. 1998), der in der Folge

auch zum Sehverlust führt (Ruether, van de Pol et al. 1997). In einer weiterführenden Studie, konnte gezeigt werden, dass die ektope Überexpression von Norrin in der Linse von *NDP<sup>Y/-</sup>* Mäusen, die Ausprägung dieses Phänotyps verhindert, wobei die Anzahl der RGCs sogar höher war, als in wildtypischen Tieren (Ohlmann, Scholz et al. 2005). Zusätzlich vermindert Norrin das Absterben von RGCs nach exzitotoxischem N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA) Schaden, indem es die Expression neuroprotektiver Faktoren wie u.a. Lif (*leukemia inhibitory factor*), Endothelin2 und FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) induziert (Seitz, Hackl et al. 2010). Neben diesen Befunden zeigte die phänotypische Analyse der *Ndp<sup>Y/-</sup>* Mäuse aber auch schwerwiegende Veränderungen in der retinalen Gefäßentwicklung (Ohlmann and Tamm 2012). Die Bildung des oberflächlichen Plexus erfolgt hierbei verzögert und auch die Aufzweigung des Gefäßnetzes ist reduziert (Luhmann, Lin et al. 2005; Ye, Wang et al. 2009). Zusätzlich konnte eine geringere Anlagerung von Perizyten an die entstehenden Kapillaren (Ye, Wang et al. 2009) und eine erhöhte Expression des Fenestrationsmarkers PLVAP (*plasmalemma vesicle associated protein*) (Schafer, Luhmann et al. 2009) beobachtet werden. Die Endothelzellen innerhalb der Retina sind allerdings unter normalen Umständen über *Tight Junctions* verbunden und bilden so die innere BRB. Eine Expression von PLVAP weist demnach auf einen Verlust dieser Barriere hin. Norrin scheint demnach über die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der BRB eine Rolle zu spielen (Paes, Wang et al. 2011). Neben dem retardierten oberflächlichen Plexus zeigte sich bei der phänotypischen Analyse von *Ndp<sup>Y/-</sup>* Mäusen, dass die intraretinalen Kapillaren vollständig fehlen. Gleichzeitig konnte eine Persistenz der hyaloidalen Gefäße beobachtet werden (Richter, Gottanka et al. 1998; Ohlmann, Adamek et al. 2004). Vermutlich stehen diese beiden Befunde in direktem Zusammenhang, da die fehlende Versorgung der tiefen retinalen Schichten zur Hypoxie im Gewebe und damit zur Aktivierung von Hif1 $\alpha$  führt. Die dadurch bedingte erhöhte Expression von VEGF verhindert den Abbau der Hyaloidalgefäße (Fong 2009). Wie frühere Studien zeigen konnten, ist es möglich, die Ausbildung dieses Phänotyps mittels einer linsenspezifischen ektope Überexpression von Norrin in *Ndp<sup>Y/-</sup>* Mäusen vollständig zu vermeiden und die physiologische Vaskularisierung der Retina wieder herzustellen (Ohlmann, Scholz et al. 2005). Das Norrin seine proangiogenen Effekte dabei über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg vermittelt, wird dadurch gestützt, dass *Tspan12<sup>-/-</sup>*, *Fzd4<sup>-/-</sup>* und *LRP5<sup>-/-</sup>* Mäuse einen

den *Ndp<sup>fl/-</sup>* Mäusen entsprechenden, vaskulären Phänotyp aufweisen (Xu, Wang et al. 2004; Junge, Yang et al. 2009; Ye, Wang et al. 2009). In *in vitro* Experimenten konnte dies zusätzlich bestätigt werden, da Norrin und die erhöhte Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen zu einer gesteigerten Proliferation, Migration sowie Bildung von Kapillar-ähnlichen Strukturen (*Tube formation*) führen (Ohlmann, Seitz et al. 2010). Neben der Rolle in der Gefäßentwicklung ist Norrin aber auch im Bezug auf die Protektion der Gefäße und den vaskulären Reparaturmechanismen von Bedeutung (Ohlmann and Tamm 2012). So zeigte sich, dass die ektope Überexpression von Norrin, sowohl in der Linse als auch im RPE, die Vasoobliteration der Gefäße durch erhöhte Sauerstoffexposition, im Vergleich zu wildtypischen Tieren, vermindert (Ohlmann, Seitz et al. 2010). Ebenso zeigte sich in den Überexpressionstieren eine größere Fläche von intraretinalen Kapillaren (Ohlmann, Seitz et al. 2010). Durch entsprechende Expressionsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass es während der Hyperoxie in Wildtypen zu einer Suppression der Norrin Expression kommt (Ohlmann, Seitz et al. 2010). Nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie konnte zudem beobachtet werden, dass Norrin die physiologische Revaskularisierung in vasoobliterierte Areale verbessert und gleichzeitig die Ausbildung von pathologischen Neovaskularisationen stark verringert (Ohlmann, Seitz et al. 2010).

### 1.3 Erkrankungen des retinalen Gefäßsystems

Die Entwicklung des retinalen Gefäßsystems ist ein Prozess der, wie bereits erwähnt, einem strikten zeitlichen und räumlichen Ablauf folgt (vgl. 1.1.3). Reguliert wird dies vor allem durch eine unterschiedliche Sauerstoffversorgung in den jeweiligen Arealen. So ist die Hypoxie in den peripheren sowie den tiefen Bereichen der Netzhaut die treibende Kraft für die Aussprossung der Endothelzellen und somit für den Aufbau des Kapillarnetzes (Scott and Fruttiger 2009). Demgegenüber steht die Hyperoxie in den vaskularisierten Arealen, die wiederum für die Induktion von Differenzierungsprozessen bedeutend ist (Ishida, Yamashiro et al. 2003). Auf molekularer Ebene spielen dabei u.a. angiogene Faktoren wie VEGF und IGF-1 als Mediatoren dieser Vorgänge eine zentrale Rolle (Smith, Shen et al. 1999; Hellstrom, Perruzzi et al. 2001). Interessanterweise sind genau dieselben Regulatoren aber

auch an der Entstehung von Erkrankungen des retinalen Gefäßsystems entscheidend beteiligt. So führt Hypoxie im adulten Organismus nach Abschluss der retinalen Gefäßentwicklung nicht mehr zur Ausbildung von physiologischen Kapillaren, sondern zur Formation von pathologischen Neovaskularisationen (Scott and Fruttiger 2009). Diese Gefäßneubildungen sind ein zentrales Problem von Erkrankungen wie der diabetischen Retinopathie, Familiärer exudativer Vitreoretinopathie (FEVR) oder der Frühgeborenenretinopathie (*Retinopathia praematurorum*; ROP) und zählen damit zu den Hauptursachen für Erblindung in den westlichen Ländern innerhalb verschiedener Altersgruppen (Fruttiger 2007). Um neue therapeutische Ansätze entwickeln zu können ist es entscheidend die Mechanismen und Faktoren zu identifizieren, die an der Regulation von physiologischer und pathologischer Angiogenese in der Netzhaut beteiligt sind. Interessanterweise konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass das Morbiditätsrisiko für diese Erkrankungen bzw. der Schweregrad der Ausprägung durch Mutationen im *NDP*-Gen negativ gefördert werden (Nikopoulos, Venselaar et al. 2010).

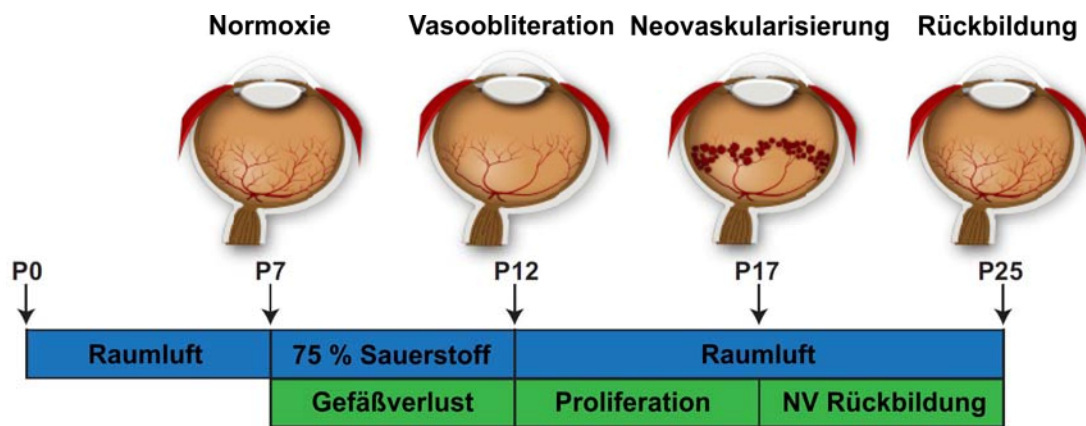
### **1.3.1 *Retinopathia praematurorum* (ROP)**

Bei der ROP handelt es sich um eine Erkrankung, die durch eine erhöhte Sauerstoffexposition bedingt ist. Hierbei wirkt der Sauerstoff auf die noch unreifen Gefäße der menschlichen Netzhaut, so dass diese teilweise degenerieren und eine weitere retinale Gefäßentwicklung unterbleibt. Die Hyperoxie entsteht dabei bereits allein durch eine verfrühte Exposition gegenüber normale Raumluft, wie dies bei vorterminlicher Geburt vorkommt (Singer and Muhlfeld 2007). Eine zusätzliche Versorgung des Frühgeborenen mit Sauerstoff erhöht das Risiko für ROP. Zu den Symptomen gehört, neben einer unvollständigen Vaskularisierung der peripheren Netzhautareale, auch eine Undichtigkeit der Gefäße die zu Einblutungen in die Netzhaut bzw. den subretinalen Raum führen kann. Letzteres kann eine Ablösung der Netzhaut zur Folge haben. Zusätzlich kommt es innerhalb dieser ersten Phase auch zur Vasoobliteration von bereits bestehenden Kapillaren. In der zweiten Phase kommt es, bedingt durch die Minderversorgung der Netzhautareale, zur Proliferation und zur charakteristischen Ausbildung von Neovaskularisationen am Übergang von

vaskularisierter zu avaskulärer Netzhaut. Durch den Zug der in den Glaskörper einwachsenden Gefäße auf die Retina, kann es auch hierdurch zu einer Netzhautablösung kommen. Die Entwicklung der retinalen Gefäße findet beim Menschen zwischen der 16. Schwangerschaftswoche und dem Ende der Schwangerschaft um etwa Woche 40. statt (Smith 2003). Kinder die bereits vor der 37. Woche zur Welt kommen gelten bereits als frühgeboren (Heckmann 2008). In Deutschland betrifft dies pro Jahr etwa 9,2% aller Neugeborenen. Bedingt durch das steigende Alter der Gebärenden sowie anderer Faktoren nimmt diese Zahl stetig zu. Etwa 9000 Kinder (1,3% der Neugeborenen) kommen sogar noch vor der 32. Gestationswoche auf die Welt, wodurch das Risiko für ROP per se erhöht ist (Krohne, Aisenbrey et al. 2012). Neben dem frühen Geburtsalter (Fortes Filho, Eckert et al. 2010) spielen aber auch das Geburtsgewicht (Seiberth and Linderkamp 2000), die postnatale Entwicklung (Wallace, Kylstra et al. 2000) sowie die Expression von angiogenen Faktoren wie VEGF und IGF-1 (Smith, Shen et al. 1999) eine wichtige Rolle für die Ausprägung einer ROP. Es konnte gezeigt werden, dass die Hyperoxie eine geringere Expression beider Faktoren bedingt wodurch das Gefäßwachstum gestoppt wird (Hellstrom, Engstrom et al. 2003; Lofqvist, Andersson et al. 2006). Die in der zweiten Phase auftretende Hypoxie führt dann, über eine Induktion von VEGF, zu Neovaskularisation (Aiello, Pierce et al. 1995; Pierce, Avery et al. 1995). Demnach scheint die Inhibition von VEGF mittels intravitrealer Injektion entsprechender Substanzen einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz darzustellen. Auf Grund der zentralen und systemischen angiogenen Effekte von VEGF sind die Nebenwirkungen dieser Therapie allerdings nicht zu vernachlässigen (Saint-Geniez, Maharaj et al. 2008). Weitere Untersuchungen die zu einem besseren Verständnis der retinalen Angiogenese beitragen sind demnach notwendig.

### **1.3.2 Das Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR)**

Das Mausmodell der OIR ist eines der am besten etablierten Modelle zur Untersuchung von retinaler Vaskularisierung unter pathologischen Bedingungen (Smith, Wesolowski et al. 1994; Stahl, Connor et al. 2010).



**Abb. 5: Schematische Darstellung des Mausmodells der OIR**

Zeitlicher Ablauf und Veränderungen in der retinalen Gefäßentwicklung bei, während und nach OIR. Modifiziert nach (Connor, Krahl et al. 2009)

Wie bereits unter 1.3.1 erwähnt sind bei der ROP, wie auch im hier beschriebenen OIR-Modell, zwei Phasen zu unterscheiden. Da die Vaskularisierung in Mäusen, im Gegensatz zum Mensch, erst nach der Geburt stattfindet, muss die Hyperoxie durch Exposition einer erhöhten Sauerstoffkonzentration erzeugt werden. Dafür werden 7 Tage alte Mäuse für 5 Tage einer Sauerstoffatmosphäre von 75% ausgesetzt. Durch die Hyperoxie im retinalen Gewebe wird das weitere Gefäßwachstum gestoppt wobei es zusätzlich zur Vasoobliteration in der zentralen Netzhaut kommt. An Tag 12 erfolgt die Rückführung der Mäuse an die Raumluft. Die daraus resultierende relative Hypoxie induziert die Proliferation der Endothelien. Im Laufe der folgenden Tage kommt es dann, im Gegensatz zur Situation im Menschen, zur physiologischen Revaskularisierung der vasoobliterierten Zone aber auch zur Ausbildung von neovaskulären Tufts, die ihre maximale Ausprägung an P17 erreichen. Anders als im menschlichen Auge bilden sich diese Tufts in Mäusen ebenfalls bis zu P25 wieder zurück (Heckmann 2008).



## 2 Zielsetzung

Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Vaskularisierung der Retina während der Entwicklung sowie für die Revaskularisierung nach Sauerstoff-induzierter Vasoobliteration (Ohlmann, Seitz et al. 2010). Über die Aktivierung dieses Signalwegs vermittelt auch das Protein Norrin seine proangiogenen Effekte. Darauf basierend sollte im Zuge dieser Dissertation geklärt werden, welchen Einfluss der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Müllerzellen auf die Entwicklung und Integrität der retinalen Gefäße hat. Zusätzlich sollte in weiteren Experimenten geklärt werden, ob Norrin seine angiogenen Effekte über die Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen und/oder mikrovaskulären Endothelzellen oder möglicherweise sogar über die Aktivierung alternativer Signalwege vermittelt.

Hierfür wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Untersuchung des Einflusses des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen auf die Entwicklung des retinalen Gefäßsystems mittels Phänotypanalyse von Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach Induktion des konditionellen Knockouts mit Tamoxifen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.
- Phänotypanalyse von adulten Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen zur Untersuchung des Einflusses des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen auf die Integrität von adulten retinalen Gefäßen.
- Analyse der Beteiligung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen an vaskulären Reparaturmechanismen nach Induktion einer Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR) in Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen.
- Untersuchung des Norrin-vermittelten angiogenen Effekte auf mikrovaskuläre Endothel- und Müllerzellen nach Induktion einer OIR in Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> und Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen.

## 3 Material und Methoden

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Lösungszusammensetzungen sowie Protokolle basieren auf etablierten Verfahrensweisen des Lehrstuhls für Humananatomie und Embryologie an der Universität Regensburg.

### 3.1 Materiallisten

#### 3.1.1 Reagenzienliste

Bezeichnung	Bezugsquelle
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
1,4-p-Phenylendiamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
10x PCR-Puffer	Qiagen, Hilden bzw. Bionline, Luckenwalde
2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl) Phenol (DPM-30)	Roth, Karlsruhe
2-Dodecenylsuccinic-acid-anhydride (DDSA)	Roth, Karlsruhe
Aceton	Merck, Darmstadt
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidisulfat (APS), 10% (w/v)	Roth, Karlsruhe
Azur II	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BC Assay Reagenz A+B	Interchim, Wörgl, AUT
Borat (Natriumtetraborat)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Collagenase A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie <sup>®</sup> Brillant Blue R-250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Corn Oil	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DABCO	Roth, Karlsruhe
Deoxycholsäure	Roth, Karlsruhe
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth, Karlsruhe
Dig Easy Hyb	Roche, Mannheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Qiagen, Hilden bzw. Bionline, Luckenwalde
EDTA	Roth, Karlsruhe

## Material und Methoden

EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Epon	Serva, Heidelberg
Ethanol absolut	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ficoll	Serva, Heidelberg
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Dextran	TdB Consultancy, Uppsala, SE
Fluorescein	Qiagen, Hilden
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutaraldehyd, 25 % in Wasser	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycidether 100	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidin HCl	Roth, Karlsruhe
Heparin-Natrium 25000 I.E. / 5 ml	Ratiopharm, Ulm
Immobilon™ Western HRP Substrat	Millipore Corporation, Billerica, USA
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Ketamin	WDT, Garbsen
Magermilchpulver (MM)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (25 mM und 50mM)	Qiagen, Hilden
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylnadicanhydrid (MNA)	Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin, (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat, Anhydrid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat, Pentahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Osmiumtetroxid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS	Life Technologies, Paisley, UK
peqGOLD TriFast™	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Propylenoxid	Serva, Heidelberg
Protease-Inhibitor-Mix M	Serva, Heidelberg

Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Roti <sup>®</sup> -Free Stripping-Puffer	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 (30 % Acrylamidstammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37% (HCL)	Merck, Darmstadt
Sauerstoff 2.5	Linde, München
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Stickstoff 2.8	Linde, München
SYBR-Green I	Qiagen, Hilden
Tamoxifen	Biomol, Hamburg
Tergitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tissue-Tek <sup>®</sup>	Sakura, Zoeterwoude, NED
Tris Ultrapure, MB Grade	Usb Corporation, Cleveland, USA
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (0,05 %)	Life Technologies, Paisley, UK
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasser Rotisolv (RNase-frei)	Roth, Karlsruhe
Xylazin	Serumwerk Bernburg, Bernburg
Xylencyanol FF	Roth, Karlsruhe

**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Reagenzien**

### 3.1.2 Materialien und Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
25 µl Hamiltonspritze	Roth, Karlsruhe
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Axio Imager.Z1 mit ApoTome Zusatzmodul	Carl Zeiss, Göttingen
Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Göttingen
Druckminderer für Sauerstoff bzw. Stickstoff	KAYSER GmbH, Plaidt/Koblenz
Einbettautomat EM TP	Leica, Wetzlar
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Glaswaren	Schott, Roth, VWR
Heat Sealer 4S <sup>™</sup>	4titude, Berlin
IKA combimag RET Heizplatte	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Inolab pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
IQ5 Multicolor Real-time PCR Detection	BioRad, München

System + iCycler	
Julabo SW20 Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Kern PJL 2100-2M Analysewaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Kryo-Einfriergerät	Nunc, Roskilde, DEN
LAS 3000 Intelligent Dark Box	Fujifilm, Düsseldorf
Mastercycler Gradient, personal	Eppendorf, Hamburg
Memmert Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach
Messumformer für Luftsauerstoff OXY 3690	GREISINGER electronic GmbH, Regenstauf
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Giessen
Microm HM 500 OM Kryostat	Microm International, Walldorf
Mikrohomogenisator	Roth, Karlsruhe
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA
Model 45-101-i ClassII Electrophoresis System	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
NanoDROP 2000c	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetman Pipetten	Gilson, Den Haag, NED
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Kelheim
Power Supply	Consort, Turnhout, BEL
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Sauerstoffelektrode GGO 369 MU	GREISINGER electronic GmbH, Regenstauf
Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Stemi 2000-CS	Carl Zeiss, Göttingen
Sunrise-Basic ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH, Grödig, AUT
Systec V75 Autoklav	Systec GmbH, Wettenburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf, Hamburg

**Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte und Materialien**

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
„Falcon“ Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
3MM Blotting ("Whatman")-Papiere	Neolab, Heidelberg
BD microlance Kanülen	BD Bioscience, Heidelberg
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht

Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Dispomed Einmalspritze	Dispomed Witt oHG, Geinhausen
EasyFlasks Nunclon™ Δ T25, T75	Nunc, Roskilde, DEN
Ecoflo Perfusionsbesteck	Dispomed Witt oHG, Geinhausen
Handschuhe Nitril	VWR, Darmstadt
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Liquid Blocker PAP-Pen	SCI Science Services, München
Microseal® B' Film	BioRad, München
Multi-Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Roth, Karlsruhe
Ohrmarken	Hauptner & Heberholz, Solingen
Omnifix sterile Einmalspritzen	B. Braun, Wertheim
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR Plates, 96 Well iCycler IQ	BioRad, München
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Powderfree Sempercare Handschuhe	Sempermed, Wien, AUT
PVDF-Western Blot Membran	Roche, Mannheim
Rotilabo 0,22 µm Spritzenfilter	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Sterican Einmal-Injektions-Kanüle	B. Braun, Wertheim
SuperFrost®Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig

**Tabelle 3: Auflistung der Verbrauchsmaterialien**

### 3.1.4 Enzyme und Reagenzien-Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
HotStarTaq Kit	5Prime, Hilden
qScript cDNA Synthesis Kit	Quanta, Gaithersburg, USA
Mango Taq DNA Polymerase	Bioline, Luckenwalde

**Tabelle 4: Auflistung der Enzyme und Reagenzien-Kits**

### 3.1.5 Oligonukleotidprimer und DNA-Leiter

Alle hier aufgeführten Oligonukleotidprimer wurden von Life Technologies, Paisley, UK synthetisiert. Die Primersequenzen für quantitative real-time RT-PCR Analysen wurden unter Verwendung des Universal ProbeLibrary Assay Design Centers (Roche

Applied Science, Penzberg) designt und über das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des Technial Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Maryland, USA) überprüft.

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
<b>Genotypisierung</b>			
<b>β-B1</b>	<i>Mus musculus</i>	forward	gtgcgggacagaaacctg
		reverse	ggaagtgccagctcatcagt
<b>β-Catenin loxP</b>	<i>Mus musculus</i>	forward	aaggtagagtgatgaaagttgtt
		reverse	caccatgtcctctgtctattc
<b>Cdh5-Cre</b>	<i>Mus musculus</i>	forward	gcctgcattaccggctgatgcaacga
		reverse	gtggcagatggcgcggaacaccatt
<b>LacZ</b>	<i>Mus musculus</i>	forward	atcctctgatggtcaggtc
		reverse	cgtggcctgattcattcc
<b>Slc1a3-Cre</b>	<i>Mus musculus</i>	forward	acaatctggcctgtaccaaacg
		reverse	ccagtgaacagcattgctgtc
<b>real-time RT-PCR</b>			
<b>Angpt-2</b>	<i>Mus musculus</i>	forward	cacactgaccttccccaact
		reverse	cccacgtccatgtcacagta
<b>GAPDH</b>	<i>Mus musculus</i>	forward	tgtccgctcgtggatctgac
		reverse	cctgcttcaccaccttctg
<b>Igf-1</b>	<i>Mus musculus</i>	forward	caaagcagcccgtctta
		reverse	tcgatagggacggggact
<b>VEGF</b>	<i>Mus musculus</i>	forward	caggctgctgtaacgatgaa
		reverse	cgcctagtttgagtggtttcg

Tabelle 5: Oligonukleotidprimer

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wurde als Größenstandard eine 100bp DNA-Leiter (GeneRuler, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet.

### 3.1.6 Antikörper und Molekulargewichtsstandard

Primäre Antikörper	Klonalität	Verwendung	Hersteller
rabbit-anti- <b>α-Tubulin</b>	polyklonal	WB	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
rabbit-anti- <b>β-Catenin</b>	polyklonal	WB, IC	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
rabbit-anti- <b>Iba-1</b>	polyklonal	IC	Wako, Neuss
rabbit-anti- <b>GFAP</b>	monoklonal	IC	Dako, Hamburg

rabbit-anti- <b>Glutaminsynthetase</b>	polyklonal	IC	Santa Cruz, Heidelberg
rat-anti- <b>PLVAP</b>	monoklonal	IC	Santa Cruz, Heidelberg
<b>Sekundäre Antikörper</b>	<b>Konjugation</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
donkey-anti-goat	HRP	WB	Santa Cruz, Heidelberg
goat-anti-rabbit	HRP	WB	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
goat-anti-rabbit	Cy™3	IC	Dianova, Hamburg
donkey-anti-rat	Cy™3	IC	Dianova, Hamburg
goat-anti-rabbit	Biotin	IC	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Streptavidin	Alexa Fluor® 488	IC	Life Technologies, Paisley, UK

**Tabelle 6: Liste der eingesetzten Antikörper für Western Blot Analysen und Immunhistochemie**  
 Bei den Western Blot Analysen wurde die Höhe der detektierten Banden mit Hilfe der PageRuler Prestained Protein-Leiter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt.

### 3.1.7 Rezepte für Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
0,1 M Phosphatpuffer (PhP)	P1: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O: 35,6 g auf 2 l P2: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1H <sub>2</sub> O: 13,8 g auf 1 l P1:P2 = 5:1 pH 7,4
1,0 M Tris/HCl (pH 6,8)	121,14 g Tris ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.; pH 6,8
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	181,71 g Tris ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.; pH 8,8
10 % SDS-Lösung	10g SDS ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O dest.
10x Elektrodenpuffer	250 mM Tris/HCl 400 mM Glycin 1 % (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O dest. lösen
10x PBS	80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid 14,4 g Natriumhydrogenphosphat 2,4 g Kaliumhydrogenphosphat ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest., pH 7,4; autoklavieren
10x TBE	108 g Tris



	55 g Borat 40 ml 0,5 M EDTA ad 1l mit H <sub>2</sub> O dest.; pH 8
10x TBS	30 g Tris 80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid mit HCl auf pH 7,4 (20 °C) einstellen ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.; autoklavieren
1x TBST	100 ml 10x TBS 0,05 % (v/v) Tween 20 ad 1l mit H <sub>2</sub> O dest.
10x Transferpuffer	5,8 g Tris 2,9 g Glycin 200 ml Methanol 3,7 ml 10 % (w/v) SDS ad 1 l H <sub>2</sub> O dest.
4 % Paraformaldehyd (PFA)	4 g PFA 100 ml PhP unter Rühren und Erwärmen lösen pH 7,4
4x Auftragspuffer für Agarosegel	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF 15 % (w/v) Ficoll
5x Laemmli-Probenpuffer	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8) 30 % Glycerin 8 % (w/v) SDS 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 0,3 M DTT 10 % β-Mercaptoethanol
Cacodylatpuffer	10,7 g Cacodylsäure in 0,5 l H <sub>2</sub> O pH 7,2
Coomassie-Färbelösung	40 ml Methanol 2 ml Essigsäure 0,2 g Coomassie® Brillant Blue R-250 ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O dest. auffüllen
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1 % Diethylpyrocarbonat ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest. üN 37 °C; autoklavieren
EM-Fixans	2,5 % Paraformaldehyd 2,5 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer
Gebrauchslösung (Richardson)	1 Teil Stammlösung I + 1 Teil Stammlösung II + 2 Teile H <sub>2</sub> O dest.
Mausschwanz-Lysepuffer	50 mM Kaliumchlorid

	10 mM Tris-HCl, pH 8,3 2 mM Magnesiumchlorid 0,1 mg/ml Gelatine 0,45 % Nonidet P-40 0,45 % Tween 20 Proteinase K (500 µg/ml)
Methyl-Carnoy	30 % Methanol 15 % Chloroform 5 % Eisessig
Methylenblau-Lösung	10 mM Tris-HCl, pH 8,3 2 mM Magnesiumchlorid 0,1 mg/ml Gelatine
Mowiol Einbettmedium	2,4 g Mowiol 4-88 6,0 g Glycerin 6,0 ml H <sub>2</sub> O dest. 12,0 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5) 25,0 ml DABCO pro 1,0 ml Lösung
Mowiol Einbettmedium mit DAPI	2,4 g Mowiol 4-88 6,0 g Glycerin 6,0 ml H <sub>2</sub> O dest. 12,0 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5) 25,0 ml DABCO pro 1,0 ml Lösung DAPI (1:10)
LacZ-Waschpuffer	1,0 ml 1 mM MgCl <sub>2</sub> 5,0 ml 1 % NaDC 5,0 ml 2 % Tergitol 489 ml 1x PBS (pH 7,3)
LacZ-Fixans	0,4 ml 25 % Glutaraldehyd 1,0 ml 0,25 M EGTA (pH 7,3) 100 µl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 48,4 ml 1 x PBS (pH 7,3)
LacZ-Färbelösung	3,0 ml X-Gal (25 mg/ml in DMSO) 0,159 g K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> · 3H <sub>2</sub> O 0,123 g K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 72,0 ml LacZ-Waschpuffer
Paraphenylendiamin	500 mg Paraphenylendiamin 50 ml Ethanol
Stammlösung A (Epon)	62 ml Glycidether 100 100 ml DDSA
Stammlösung B (Epon)	100 ml Glycidether 100 89 ml MNA
Stammlösung I (Richardson)	5 g Azur II 500 ml H <sub>2</sub> O dest.
Stammlösung II (Richardson)	5 g Methylenblau 500 ml 1 % Borax (Natriumtetraborat)

Tabelle 7: Rezepte der eingesetzten Lösungen und Puffer

## 3.2 Tiermodelle

### 3.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Um die Bedeutung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs in Müllerzellen auf das retinale Gefäßsystem zu untersuchen wurden im Zuge in dieser Arbeit Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> im C57BL/6 Hintergrund verwendet. In diesen Tieren kommt es unter der Kontrolle des Müllerzellspezifischen Promotors Slc1a3 zur Expression der Cre-Rekombinase deren Aktivität, auf Grund einer fusionierten Ligandbindedomäne eines Östrogen-Rezeptors (ER), durch den Östrogen-Rezeptorantagonisten Tamoxifen (TX) induziert wird. Dabei kommt es zur Translokation der Cre-Rekombinase aus dem Zytoplasma in den Zellkern und dort zur Deletion des von *loxP*-Sequenzen flankierten  $\beta$ -Catenin-Gens (*Ctnnb1*). Die Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup> Linie wurde von Jackson Lab (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen. Mäuse der Linie Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> wurden uns freundlicherweise von em. Prof. Dr. Rolf Kemler (Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt. Zur Zucht der Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> wurden jeweils ein Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> mit einem Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> verpaart um neben den Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> auch Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>-negative Geschwister Tiere zu erhalten die als Kontrollen verwendet wurden. Die Genotypisierung der Nachkommen erfolgte, hier wie auch bei den folgenden Mauslinien, nach den, unter Punkt 3.3.1 angegebenen, Protokollen. Die Tiere wurden dafür entweder mit Ohrmarken versehen (> P21) oder mit einer Tätowierung markiert (< P21).

Zur Überprüfung des Müllerzell-spezifischen Tamoxifen-induzierbaren Cre<sup>ERT2</sup>/*loxP*-Systems wurden Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup> Mäuse mit Mäusen des Reportermausstammes ROSA26LacZ (C57BL/6 Hintergrund) verpaart. Hierbei kommt es zur Expression von  $\beta$ -Galactosidase unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven ROSA Promotors. Dies geschieht allerdings nur unter der Voraussetzung, dass eine zwischen Promotor und LacZ-Gen lokalisierte und durch zwei *loxP*-Sequenzen flankierte, Neomycin Kassetten mit Poly-A-Schwanz durch die aktivierte Cre-Rekombinase deletiert wird. Durch Zugabe des entsprechenden Substrates X-Gal, das von der  $\beta$ -Galactosidase in einer enzymatischen Reaktion umgesetzt wird, kann die Expression der Cre-Rekombinase durch eine dabei entstehende Blaufärbung lokalisiert werden (vgl. 3.4.2.2).

Für weiterführende Experimente dieser Arbeit wurden die dreifach transgenen Linien  $\beta$ B1-Norrin/Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> und  $\beta$ B1-Norrin/Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> generiert. Diese Tiere weisen, neben der Deletion des Wnt-Signalproteins  $\beta$ -Catenin

in Müllerzellen (Slc1a3) bzw. in Endothelzellen (Cdh5), unter der Kontrolle des chicken- $\beta$ B1-Crystallin-Promotors eine ektopische Überexpression von Norrin in der Linse auf. Anhand dieser Linien sollte geklärt werden, ob es durch die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Norrin zur Induktion von kompensatorischen Mechanismen kommt, die den in Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> und Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> aufgetretenen retinalen vaskulären Veränderungen entgegenwirken können. Transgene  $\beta$ B1-Norrin Mäuse im FVB/N Hintergrund (Ohlmann *et al.* 2005) waren hierfür bereits am Lehrstuhl vorhanden. Tiere der Linie Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup> (C57BL/6 Hintergrund) wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Ralf Adams (MPI Münster) zur Verfügung gestellt.

Die Haltung und Behandlung aller Versuchstiere erfolgte gemäß den Bestimmungen des „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“. Zudem lagen für alle in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche genehmigte Tierversuchsanträge der Regierung der Oberpfalz, Bayern, vor. Die Mäuse wurden im Tierstall der naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg unter Standardbedingungen (Temperatur  $23 \pm 2$  °C, relative Luftfeuchtigkeit  $55 \pm 5$  %, Futter und Wasser *ad libitum*) mit 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

### 3.2.2 Tamoxifenbehandlung

Um anhand unseres Mausmodells die Auswirkungen einer  $\beta$ -Catenin-Defizienz in Müllerzellen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten zu untersuchen, wurde eine Sonderform der Cre-Rekombinase verwendet. Neben der Kontrolle des Expressionsortes durch den Müllerzell-spezifischen Promotor Slc1a3 war hierbei auch die zeitliche Kontrolle der Aktivität der Cre-Rekombinase möglich. Durch Fusion an eine mutierte Form der Ligand-Bindedomäne (LBD) des Östrogen-Rezeptors (ER) wird die Cre-Rekombinase im Zytoplasma zurückgehalten. Erst nach Bindung des Östrogen-Rezeptorantagonisten Tamoxifen (TX) an die LBD kann die Cre-Rekombinase in den Zellkern translozieren und dort das durch *loxP*-Sequenzen flankierte Zielgen, in diesem Fall  $\beta$ -Catenin, deletieren.

Um den konditionellen Knockout während der Entwicklung zu induzieren, wurden Mäuse im Alter von postnatalem Tag (P)1-P17, je nach Versuch, für 4-5 Tage 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (TX-AT) (5mg/ml Tamoxifen (Biomol, Hamburg) gelöst in *Corn Oil* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)) behandelt. Da Tamoxifen als

Östrogen-Rezeptorantagonist bekannterweise auch zu Infertilität führen kann, war es notwendig das Muttertier entsprechend zu schützen. Auf Grund des mütterlichen Verhaltens von Mäusen die Jungtiere regelmäßig zu putzen, wurden diese nach Behandlung noch ca. 20 Minuten in einem separaten Käfig gehalten um die Aufnahme von Tamoxifen durch das Muttertier bestmöglich zu minimieren. Erst nachdem das Öl vollständig eingezogen war wurde der Nachwuchs wieder zu dem Muttertier zurückgesetzt.

Zur Untersuchung der Auswirkung der Müllerzell-spezifischen  $\beta$ -Catenin-Defizienz auf die Stabilität der retinalen Gefäßplexus wurde die Deletion in adulten Tieren induziert. Diese erhielten hierfür im Alter von 6 Wochen (We) über 5 Tage 2x täglich eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von je 50 $\mu$ l Tamoxifen (20mg/ml in *Corn Oil*).

Eine Zusammenfassung der durchgeführten Experimente und dem dabei verwendeten Behandlungsschema ist der Tabelle 8 zu entnehmen.

Mauslinie	Alter	Behandlung	Experiment
Untersuchungen zur Etablierung des konditionell Knockouts			
Slc1a3-Cre <sup>ERT2</sup> /ROSALacZ	P14	TX-AT (P7-P10)	X-Gal Färbung
	8 We	TX i.p. (6 We)	X-Gal Färbung
Slc1a3-Cre <sup>ERT2</sup> /Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup>	P17	TX-AT (P12-P15)	WB, Histologie
	8 We	TX i.p. (6 We)	WB, Histologie
Untersuchungen unter physiologischen Bedingungen			
Slc1a3-Cre <sup>ERT2</sup> / Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup>	P7	TX-AT (P1-P5) / (P5-P8)	FITC-Dextran-Perfusion
	P10	TX-AT (P1-P5) / (P5-P8)	FITC-Dextran-Perfusion
	P14	TX-AT (P1-P5) / (P5-P8)	FITC-Dextran-Perfusion
	P21	TX-AT (P1-P5) / (P5-P8)	FITC-Dextran-Perfusion
	8 We	TX i.p. (6 We)	FITC-Dextran-Perfusion
Untersuchungen unter pathologischen Bedingungen			
Slc1a3-Cre <sup>ERT2</sup> /Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup>	P12	OIR	FITC-Dextran-Perfusion
	P15	OIR +	FITC-Dextran-Perfusion

		TX-AT (P12-P15)	
	P17	OIR + TX-AT (P12-P15)	FITC-Dextran-Perfusion qRT-PCR
$\beta$ B1-Norrin/Slc1a3-Cre <sup>ERT2</sup> / Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup>	P17	OIR + TX-AT (P12-P15)	FITC-Dextran-Perfusion
$\beta$ B1-Norrin/Cdh5-Cre <sup>ERT2</sup> / Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup>	P17	OIR + TX-AT (P12-P15)	FITC-Dextran

**Tabelle 8: Übersicht der durchgeführten Experimente**

Aufgeführt sind die einzelnen Mauslinien und die für die entsprechenden Experimente durchgeführten Behandlungen. AT: Augentropfen, OIR: Sauerstoff-induzierte Retinopathie, P: postnataler Tag, TX: Tamoxifen, We: Woche

### 3.2.3 Das Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie

Bei der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR) handelt es sich um eines der am häufigsten verwendeten Schadensmodelle zur Untersuchung von Vaskularisierungsprozessen innerhalb der Retina unter pathologischen Bedingungen. Dem System liegt dabei die Tatsache zugrunde, dass es bei einigen Erkrankungen wie der diabetischen Retinopathie sowie der *Retinopathia praematurorum* (ROP) aufgrund von Gefäßschädigungen zu ischämischen Arealen mit Hypoxie kommt (Scott, Fruttiger). Dies wiederum führt zu einer Induktion von physiologischen Revaskularisierungsprozessen, zum anderen aber auch zu pathologischen Neovaskularisierungen. Anhand dieser Prozesse sollte hier untersucht werden welchen Einfluss der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Müllerzellen auf die retinalen Gefäße nach einem Sauerstoff-induzierten Schaden hat. Zusätzlich sollte ebenfalls geklärt werden, ob die durch Deletion von *Ctnnb1* in Müller- sowie in Endothelzellen entstandenen Effekte durch eine ektopische Überexpression von Norrin kompensiert werden können.

#### 3.2.3.1 Experimentelle Durchführung

Für die experimentelle Durchführung der OIR wurden Tiere der zu untersuchenden Linien (Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>,  $\beta$ B1-Norrin/Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> und  $\beta$ B1-

Norrin/Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>) von P7 bis P12 zusammen mit dem Muttertier in einer Hyperoxie-Kammer bei 75 % Sauerstoffatmosphäre gehalten (Connor, Krah et al. 2009). Mittels einer Mischkammer wurde das entsprechende Gasgemisch aus 100 % Sauerstoff sowie 100 % Stickstoff hergestellt. Der Sauerstoffgehalt wurde dabei von einer Sauerstoffelektrode GGO 369 MU (GREISINGER electronic GmbH, Regenstauf) gemessen und durch den Messumformer OXY 3690 (GREISINGER electronic GmbH, Regenstauf) reguliert. Über einen Schlauch wurde das Gasgemisch dann in die Kammer geleitet. Um sicher zu stellen, dass die Kammer dicht war und damit der Sauerstoffgehalt innerhalb der Kammer konstant, mündete ein Auslassschlauch in ein mit Wasser gefülltes Becherglas. Das Entweichen der Luft, das bei dichter Kammer ausschließlich über diesen Weg stattfinden kann, konnte so visualisiert werden.

An P12 wurden die Tiere wieder aus der Kammer entnommen und weiterhin bei normaler Raumluft gehalten. Die Rückkehr zu dem Luftsauerstoffgehalt von 21 % stellte damit eine relative Hypoxie dar. Im Anschluss an die OIR wurden die Tiere entweder direkt präpariert (P12) oder zunächst mit Tamoxifen behandelt und dann an P15 bzw. P17 präpariert (vgl. Tabelle 8).

### 3.2.3.2 Quantifizierung der retinalen Gefäßveränderungen

Um die Rolle des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müller- und mikrovaskulären Endothelzellen unter pathologischen Bedingungen zu klären wurde der Einfluss auf Gefäßveränderungen nach OIR untersucht. An retinalen Häutchenpräparaten von mit FITC-Dextran perfundierten Mäusen an P12, P15 und P17 wurde der Grad der Rekapillarisation durch Vermessung der vasoobliterierten Zone bestimmt. Ebenso wurden die Ausbildung intraretinaler Gefäße sowie die Entstehung von neovaskulären Tufts quantifiziert. Hierfür wurden die Häutchenpräparate mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axio Imager.Z1 (Carl Zeiss, Göttingen) in 50-facher Vergrößerung aufgenommen. Unter Verwendung der Bildanalyse-Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Göttingen) konnte an diesen Bildern direkt die Größe des avaskulären Areals bestimmt werden. Für die Auswertung der Fläche der intraretinalen Gefäße sowie der präretinalen Tufts wurde eine 200-fache Vergrößerung sowie das ApoTome Zusatzmodul (Carl Zeiss, Göttingen) benötigt. Die Fläche der vasoobliterierten Zone sowie der intraretinalen Gefäße wurde in Bezug

zur Gesamtfläche der Retina bestimmt während die Fläche der neovaskulären Tufts auf 1000  $\mu\text{m}^2$  Retina bezogen wurde. Zusätzlich wurde das Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop CS3 Extended (Adobe, San Jose, USA) verwendet um die quantifizierten Bereiche zur repräsentativen Darstellung farblich zu markieren.

### 3.2.4 Perfusion

Die Methode der Herzperfusion wurde verwendet um retinale Gefäße für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung darzustellen bzw. um das retinale Gewebe für histologische Zwecke zu fixieren.

Perfusionslösung	Konzentration	Zweck der Perfusion
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Dextran	50 mg/ml in PBS	Darstellung retinaler Gefäße
heparinisiertes NaCl	1 ml Heparin-Natrium auf 1l 0,89% NaCl-Lösung	Entfernung von Blut aus dem Kreislauf
Paraformaldehyd	4% PFA in 0,1M PhP	Gewebefixierung für Kryo- und Paraffineinbettung
EM-Fixans	2,5 % Paraformaldehyd 2,5 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer	Gewebefixierung für Eponeinbettung

**Tabelle 9: Liste der für die Perfusion verwendeten Lösungen**

Die Mäuse wurden hierfür mittels einer intraperitonealen Injektion von Ketamin (120 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (8 mg/kg Körpergewicht) in tiefe Narkose versetzt. Nachdem das zu perfundierende Tier auf der Arbeitsfläche fixiert wurde, wurde die *Cavitas abdominalis* eröffnet. Um das Herz freizulegen wurde der *Thorax* geöffnet indem das *Diaphragma* vom Rippenbogen gelöst, die Rippen lateral beidseitig aufgeschnitten und mit Hilfe einer Moskitoklemme nach oben fixiert wurden. Nach Entfernung des *Pericards* wurde nun die Perfusionskanüle (Ecoflo, Dispomed Witt oHG, Geinhausen) über den *Apex cordis* im linken Ventrikel platziert und ein Entlastungsschnitt im rechten *Atrium* gesetzt. Über das Perfusionsbesteck wurde daraufhin die entsprechende Perfusionslösung (Tabelle 9) mit Hilfe des schlagenden Herzens im Blutgefäßsystem verteilt. Eine Hellfärbung der Leber deutete auf die Entfernung des Blutes und damit einer vollständigen Verteilung der Perfusionslösung im Kreislauf hin. Mäuse die für immunhistologische Zwecke mit 4% PFA perfundiert



wurden, erhielten im Vorfeld eine Perfusion mit hepariniertem NaCl, da die Entfernung der Erythrozyten, aufgrund deren hoher Autofluoreszenz, hier besonders wichtig war. Nach der Perfusion wurden allen Mäusen die Augen entnommen. Bei Tieren <P15 mussten hierfür zunächst die Augenlider eröffnet werden. Anschließend wurde je ein Schnitt in den *Angulus oculi lateralis* und *medialis* gesetzt. Das Durchtrennen der *Conjunctiva* sowie die Augenmuskeln ermöglichte unter Zuhilfenahme einer gebogenen Pinzette die organschonende Entnahme des Auges aus der *Orbita*.

### 3.2.5 Retinapräparation

Zur Expressionsanalyse der angiogenen Faktoren IGF-1 (*insulin like growth factor 1*), Angpt-2 (Angiopietin 2) und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) wurde RNA aus der Retina extrahiert. Hierzu wurden Mäuse an P17 nach OIR und anschließender Tamoxifen-Behandlung dekapitiert und die Augen entnommen (vgl. 3.2.4). Zum Nachweis des konditionellen Knockouts von  $\beta$ -Catenin wurden Mäuse an P17, sowie adulte Tiere im Alter von 8 Wochen verwendet. Aus den präparierten Retinae wurde das Gesamtprotein isoliert.

Zur Isolation der Retina aus dem enukleierten Auge wurde zunächst der vordere Teil des Auges mit Cornea und Ziliarkörper entfernt. Hierzu wurde das Auge mit einer Kanüle an der *Ora serrata* eingestochen und so eine Öffnung geschaffen über die im Anschluss mittels einer Federschere (Fine Science Tools, Heidelberg) zirkulär entlang der *Ora serrata* entlang geschnitten wurde. Nach Entfernen der Linse wurde der Augenbecher am *N. opticus* mit einer dünnen Pinzette fixiert. Da die Retina den darunterliegenden Strukturen lediglich aufliegt und nicht fest mit diesen verbunden ist, ist es möglich die Retina mit der flachen Seite der Schere vorsichtig aus dem Augenbecher heraus zu schieben. Die so freipräparierten Retinae wurden in je 500  $\mu$ l peqGold TriFast<sup>TM</sup> Trizol-Reagenz (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

### 3.2.6 Herstellung von retinalen Häutchenpräparaten

Um die Vaskularisierung der Retina sowie die Rekapillarisation vasoobliterierter Netzhautareale nach OIR zu untersuchen, wurden retinale Häutchenpräparate hergestellt.

In Anlehnung an die von Connor *et al.* publizierte Methode (Connor *et al.* 2009) wurden Mäusen nach FITC-Dextran-Perfusion die Augen entnommen und mit 4% PFA für 1,5h immersionsfixiert. Nach dreimaligem Spülen der Augen für je 10min mit 0,1M Phosphatpuffer (PhP) wurden die Augen in eine mit ebenfalls 0,1M PhP gefüllte Petrischale überführt. Unter dem Stereomikroskop wurde zunächst mit einer Kanüle ein Loch in die Cornea gestochen. Die so entstandene Öffnung wurde anschließend mit zwei Pinzetten (Fine Science Tools, Heidelberg) durch vorsichtiges Reißen kontinuierlich vergrößert. Auf diese Weise wurde der äußere Augenbecher von der Retina abgeschält, wobei auch der *N. opticus* mit entfernt wurde. Anschließend wurde die Linse entnommen und gegebenenfalls an der Retina verbliebene Reste des Ziliarkörpers vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Die frei präparierte Retina wurde nun auf einen Objektträger gelegt und mit einem Tropfen 0,1M PhP benetzt. Um die Retina nun plan ausbreiten zu können wurde diese an 4 Seiten eingeschnitten wodurch die typische Form eines vierblättrigen Kleeblatts zustande kam. Nachdem der überschüssige Puffer mit einer Pipette abgesaugt worden war, wurde das Retinahäutchen mit Mowiol eingedeckelt. Die Häutchenpräparate wurden bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

## 3.3 Molekularbiologische Techniken

### 3.3.1 Genotypisierung der Mäuse

#### 3.3.1.1 DNA-Extraktion aus Mausschwanzbiopsien

Für die Genotypisierung (vgl. 3.3.1) der im Zuge dieser Arbeit verwendeten transgenen Mauslinien wurden Mausschwanzbiopsien genommen und daraus die DNA extrahiert. Die Lyse der Gewebestücke erfolgte durch Zugabe von 200 µl Mausschwanz-Lysepuffer mit Proteinase K in einem 1,5 ml Reaktionsgefäße (vgl. 3.1.7) über Nacht bei 900 UpM und 55°C im Thermomixer comfort (Eppendorf,

Hamburg). Zur anschließenden Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben 10 min bei 95°C inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden bei 13200 UpM für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand mit der darin enthaltenen DNA diente als DNA-Matrize (Template) für die Genotypisierungs-PCR (vgl. 3.3.1.2).

### 3.3.1.2 Genotypisierungs-PCR

Die Genotypisierungen der Mäuse erfolgte mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktionen) unter Verwendung der in Tabelle 5 aufgeführten spezifischen Primersequenzen. Die entsprechenden Reaktionsansätze sind in Tabelle 10 aufgelistet. Die Amplifikation des transgenen DNA-Abschnitts erfolgte mit Hilfe des Thermocyclers Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) nach dem jeweiligen Programm (Tabelle 11). Die Proben wurden im Anschluss zur Auftrennung auf Agarosegel aufgetragen (vgl. 3.3.1.3).

PCR-Ansatz	$\beta$ -Catenin loxP	$\beta$ B1	LacZ	Slc1a3-Cre	Cdh5-Cre
DNA	2 $\mu$ l	1,2 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	1,0 $\mu$ l	2,0 $\mu$ l
10x PCR-Puffer	2,5 $\mu$ l	1,5 $\mu$ l	x	1,25 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l
5x Reaktionspuffer (Bioline)	x	x	2,5 $\mu$ l	x	x
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2,25 $\mu$ l	x	x	1,25 $\mu$ l	1,2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	x	0,3 $\mu$ l	1,5 $\mu$ l	x	x
dNTPs (10mM)	1,0 $\mu$ l	0,3 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
Taq DNA Polymerase	0,25 $\mu$ l	0,3 $\mu$ l	x	0,15 $\mu$ l	0,3 $\mu$ l
Mango Taq (Bioline)	x	x	0,5 $\mu$ l	x	x
Primer fw (1:10)	2,0 $\mu$ l	0,3 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
Primer rev (1:10)	2,0 $\mu$ l	0,3 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	13,0 $\mu$ l	10,5 $\mu$ l	18,5 $\mu$ l	6,35 $\mu$ l	17,5 $\mu$ l

**Tabelle 10: Reaktionsansatz (1x) für Genotypisierungs-PCRs**

Schritt	Temperatur	Dauer	Produkt
1 Initiation	94 °C	2 min	
2 Denaturierung	94 °C	30 s	
3 Annealing			
$\beta$ B1	65 °C	30 s	300 bp
$\beta$ -Catenin loxP	60 °C	30 s	221 bp (WT) 324 bp (TG)
Cdh5-Cre	70 °C	45 s	750 bp

<b>LacZ</b>	60 °C	30 s	<b>300 bp</b>
<b>Slc1a3-Cre</b>	60 °C	30 s	<b>600 bp</b>
4 Elongation	72 °C	45 s	
Schritt 2-4: 35x			
5 End-Elongation	72 °C	5 min	
6 Halten	12 °C	∞	

Tabelle 11: Thermocyclerprogramme für Genotypisierungs-PCRs

### 3.3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Linearisierte DNA-Fragmente können hinsichtlich ihrer Größe in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Im Gel enthaltenes Ethidiumbromid (roter Phenanthridin-Farbstoff) interkaliert dabei mit doppelsträngiger DNA, wodurch diese anschließend unter UV-Licht-Bestrahlung sichtbar gemacht werden kann.

Für die Auftrennung der PCR-Produkte wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet. Hierfür wurden 1 mg Agarose in 100 ml 1x TBE-Puffer eingewogen und unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach kurzem Abkühlen auf etwa 50°C wurde die Lösung mit 3 µl Ethidiumbromid versetzt und zur Aushärtung in einen Gelschlitten gegossen. Anschließend wurden jeweils ca. 15 µl PCR-Produkt und 2 µl der 100 bp DNA Leiter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer konstanten Spannung von ca. 120 V für ca. 30– 45min in einer Elektrophoresekammer Model 45-101-i ClassII Electrophoresis System (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) mit 1x TBE. Die DNA wurde mit Hilfe eines UV-Durchlichtschirms (Herolab Laborgeräte GmbH, Wiesloch) bei einer Wellenlänge von 302 nm detektiert.

## 3.3.2 Expressionsanalysen

### 3.3.2.1 RNA-Extraktion

Um die Expression der angiogenen Faktoren IGF-1, Angpt-2 und VEGF in Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen an P17 nach OIR zu analysieren, wurde RNA aus den Retinae extrahiert. Hierfür wurde die Methode von Chomczynski und Sacchi verwendet (Chomczynski and Sacchi 1987). Für den Aufschluss der Zellen und zum Lösen der Zellkomponenten wurde dabei das peqGold TriFast<sup>TM</sup> Trizol-Reagenz

(PepqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet. Diese einphasige Lösung, basierend auf Phenol und Guanidinisoithiocyanat, ermöglicht durch Zugabe von Chloroform eine Auftrennung in drei Phasen. Aus diesen Phasen können im Anschluss RNA (wässrige Phase), DNA (Interphase) und Proteine (Phenol-Chloroform-Phase) isoliert werden können.

Zunächst wurde den Proben 100 µl Chloroform pro 500 µl peqGold TriFast™ Trizol-Reagenz zugefügt. Nach kräftigem Schütteln wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C für 5 min. Die wässrige obere Phase konnte dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol (Verhältnis 1:1) versetzt werden. Hierbei wurde besonders darauf geachtet weder die Interphase noch die Phenol-Chloroformphase zu berühren um eine Verunreinigung der RNA zu verhindern. Um die RNA zu fällen, wurde der Ansatz über Nacht bei -20°C gelagert. Nachdem die präzipitierte RNA durch Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 12000 x g pelletiert worden war, wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ abgenommen und das RNA-Pellet getrocknet. Danach wurde die RNA in 15 µl RNase-freiem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.3.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Um das für die cDNA Herstellung benötigte RNA Volumen zu ermitteln, wurde die RNA Konzentration der Proben mit Hilfe des NanoDrop-2000c Spektralphotometer (PepqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Hierbei wird die optische Dichte der Probe bei  $\lambda=260$  nm ( $OD_{260}$ ), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren (DNA, RNA), und bei  $\lambda=280$  nm ( $OD_{280}$ ), dem Absorptionsmaximum von Proteinen gegenüber dem Lösungsmittel ( $H_2O$ ) bestimmt. Da eine  $OD_{260}$  von 1 einer RNA Konzentration von 40 µg/ml entspricht, kann die in der Probe enthaltene Menge an RNA mittels der Formel

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

berechnet werden.

Der Wert des Quotienten aus OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> ermöglicht es zudem Verunreinigung der RNA-Probe durch DNA oder Proteinen festzustellen. Optimal erweise sollte sich hierbei für eine reine RNA ein Wert von 1.6-2.0 des A<sub>260/280</sub>-Quotienten ergeben.

### 3.3.2.3 cDNA-Herstellung

Um die auf der RNA gespeicherten Informationen für die Durchführung der quantitativen real-time RT (Reverse-Transkription)-PCR Analysen (vgl. 3.3.2.4) zu konservieren, wurde diese mittels reverser Transkription in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben, welche dann als DNA-Matrize diente. Hierfür wurde das qScript™ cDNA Synthesis Kit (Quanta Biosciences Inc., Gaithersburg, USA) verwendet. Der Reaktionsansatz ist der Tabelle 12 zu entnehmen. Der 5x qScript™ Reaktionsmix enthält hierbei neben Puffer, Magnesium und dNTPs, oligo-dT-Primer, um so hauptsächlich mRNA mit polyA-Schwanz zu transkribieren. Um mögliche Verunreinigungen der RNA mit genomischer DNA erkennen zu können, wurden pro RNA-Probe zwei Ansätze,- einmal mit Reverser Transkriptase (+RT) und einmal ohne Reverse Transkriptase (-RT),- angesetzt.

Die reverse Transkription erfolgte in einem Thermocycler Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) unter Verwendung des in Tabelle 13 beschriebenen Programms. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Komponenten	Volumen +RT-Ansatz	Volumen -RT-Ansatz
0,5 µg RNA und H <sub>2</sub> O (RNase-frei)	7,5 µl	7,5 µl
5x qScript™ Reaction Mix	2,0 µl	2,5 µl
qScript™ Reverse Transkriptase	0,5 µl	x

**Tabelle 12: 10 µl Reaktionsansätze (1x) für cDNA-Synthese**

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

**Tabelle 13: Thermocyclerprogramm für cDNA-Synthese**

### 3.3.2.4 Quantitative real-time RT-PCR

Die relative Genexpression der angiogenen Faktoren IGF-1, Angpt-2 und VEGF wurde in den Retinae der *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen an P17 nach Hyperoxie und Tamoxifen-induziertem Müllerzell-spezifischem Knockout von *Ctnnb1* auf mRNA-Ebene mit Hilfe der quantitativen real-time RT (Reverse-Transkription)-PCR bestimmt. Um die relative Expression der zu untersuchenden Gene (Zielgen) quantifizieren zu können, wurde die Zielgen-Expression im Verhältnis zur Expression des Referenzgens GAPDH untersucht.

Die durch reverse Transkription aus der RNA der Proben synthetisierte cDNA diente als Matrize für die Polymerasekettenreaktion. Jede cDNA-Probe („+RT“) wurde in dreifachen Ansätzen untersucht. Zusätzlich wurde ein „-RT“-Ansatz und ein Ansatz mit RNase-freiem Wasser analysiert, um Kontaminationen auszuschließen. Zuerst wurde jede Probe („+RT“, „-RT“ und RNase-freies Wasser) mit einem Master-Mix auf ein Volumen von 15 µl gebracht und in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert (Tabelle 14). Danach wurden je 5 µl Primer-Mix (0,17 µl forward 0,17 µl reverse Primer (0,1 M) und 4,66 µl RNase-freies Wasser) mit spezifischen Primern für das zu untersuchende Gen (Tabelle 5) auf den „+RT“/„-RT“/H<sub>2</sub>O-Master-Mix gegeben.

Im Anschluss wurde die Platte unter Verwendung eines Heatsealers (4titude, Berlin) mit einer Folie verschlossen und abzentrifugiert. Die Amplifikation sowie die Schmelzkurve und die Detektion der Fluoreszenz erfolgten nach dem in Tabelle 15 aufgeführten Programm im IQ5 Multicolor Real-time PCR Detection System + iCycler (BioRad, München).

Zur Aufzeichnung der Zunahme der amplifizierten PCR-Produkte wurde den Reaktionsansätzen der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I zugesetzt. Hierbei wird die bei der Interkalation des Farbstoffs in doppelsträngige DNA auftretende Fluoreszenz in jedem Zyklus („real-time“, in Echtzeit) erfasst (Wong & Medrano 2005) und dient der Quantifizierung, da die Fluoreszenzintensität proportional zur Konzentration der doppelsträngigen DNA zunimmt (Wittwer *et al.* 1997; Wong & Medrano 2005).

Zur Analyse der Genexpression wurde das Programm iQ Optical System Software Version 3.0a (BioRad, München) benutzt, wobei der sogenannte C<sub>t</sub> („Cycle threshold“)-Wert verwendet wurde. Dieser gibt den Zyklus an, bei dem die detektierte Fluoreszenz die Hintergrund-Fluoreszenz erstmals signifikant übersteigt (Wong &

Medrano 2005). Dementsprechend weist ein niedriger  $C_T$ -Wert auf eine größere Menge der Ziel-cDNA-Matrize hin (Wong & Medrano 2005).

Die Schmelzkurve kann nach dem Lauf zur Überprüfung der Spezifität des Produkts herangezogen werden (Wong & Medrano 2005).

Mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft<sup>®</sup> Excel 2007 (Microsoft<sup>®</sup> Corporation, Redmond, USA) wurden die Daten ausgewertet und die relative Expression nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode bestimmt (Schmittgen & Livak 2008).

Komponenten	Volumen
H <sub>2</sub> O (RNase-frei)	12,005 µl
10x Puffer (Qiagen)	1,5 µl
Magnesiumchlorid (25 mM; Qiagen)	0,6 µl
SYBR-Green I	0,39 µl
cDNA-Syntheseprodukt (+RT bzw. -RT)	0,15 µl
dNTPs (25 mM, Qiagen)	0,12 µl
Primer forward (1 µM)	0,08 µl
Primer reverse (1 µM)	0,08 µl
HotStarTaq DNA Polymerase (5 U/µl; Qiagen)	0,06 µl
Fluorescein (1:100)	0,015 µl

**Tabelle 14: 15 µl Reaktionsansatz (1x) für die quantitative real-time RT-PCR**

Schritt	Temperatur	Dauer
1	94 °C	2 min
2 (40x)	94 °C 60 °C 70 °C	20 s 10 s 20 s
3	95 °C	1 min
5 (81x)	55 °C + 0,5 °C pro Zyklus (für Schmelzkurve)	6 s
6	4 °C	∞

**Tabelle 15: Cyclerprogramm für die quantitative real-time RT-PCR**

### 3.3.3 Proteinbiochemische Techniken

#### 3.3.3.1 Proteinextraktion

Die Extraktion des retinalen Gesamtproteins für die späteren Western Blot Analysen erfolgte im Anschluss an die RNA-Isolation (siehe Punkt 3.3.2.1) mit peqGold



TriFast™ Trizol-Reagenz, aus der verbleibenden Inter- und Phenol-Chloroform-Phase (Chomczynski 1993).

Dabei wurde das Protein im ersten Schritt durch Zugabe von 750 µl Isopropanol gefällt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das präzipitierte Protein durch Zentrifugation bei 4 °C und 12000 x g 10 min lang pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet dreimal gewaschen, um Rückstände des peqGold TriFast™ Trizol-Reagenz aus dem Protein zu entfernen. Dazu wurden die Proben mit jeweils 1 ml Waschpuffer (0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95 % ETOH) versetzt, für 20 min inkubiert (Raumtemperatur) und für 5 min bei 4 °C und 7600 x g zentrifugiert. Danach wurde 1 ml 100 % Ethanol zum Pellet zugegeben, kräftig gemischt und nochmals für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an einen weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4 °C und 7600 x g wurde der Überstand quantitativ abgenommen und das Pellet getrocknet. Die Proteine wurden entsprechend der Pelletgröße in 150 – 200 µl 1 % SDS + Protease-Inhibitor (1:100 Verdünnung) + Phosphatase-Inhibitor (1:100) aufgenommen und im Heizblock bei 750 Upm und 50 °C über Nacht gelöst. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen, wurden die Proben im Anschluss daran noch einmal für 10 min bei 4 °C und 10000 x g zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei –20 °C gelagert.

Die auf diese Methode gewonnen Proteine wurden in den Western Blot Analysen eingesetzt.

### 3.3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem BCA-Assay

Die Konzentration des isolierten retinalen Gesamtproteins wurde mit Hilfe des BCA-Assay bestimmt.

Dieser Test basiert auf der Bildung von  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexen mit den vorhandenen Proteinen. Unter alkalischen Bedingungen kommt es dabei zur Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$ , wobei die Menge des reduzierten Kupfers proportional zur Menge des vorhandenen Proteins ist. Zusammen mit der Bicinchoninsäure bildet  $\text{Cu}^{1+}$  einen violetten Farbkomplex. Die Messung der optischen Dichte bei 562 nm erlaubt damit eine Quantifizierung der Proteinmenge (Smith, Krohn et al. 1985). Als Eichkurve wurde eine Standardverdünnungsreihe (1000 µg/ml bis 100 µg/ml) mit

Rinderserumalbumin-Stammlösung (2 mg/ml) verwendet, welche mit 1 % SDS hergestellt wurde, das bereits zum Lösen der Proteine verwendet wurde.

Jeweils 10 µl der Proteinproben (unverdünnt, 1:5 verdünnt und 1:10 verdünnt) und der Standardkonzentrationen wurden auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 200 µl BCA-Lösung (Reagenz A: Reagenz B = 50:1, Interchim, Wörgl, AUT) versetzt. Jeder Ansatz wurde dabei doppelt pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Proteinkonzentration in einem ELISA-Reader (Sunrise-Basic, Tecan, AUS) bestimmt. Dabei wurde die Extinktion bei 560 nm photometrisch gemessen und mit der Eichgeraden verglichen, um so die Proteinkonzentration abschätzen zu können. Die endgültige Konzentration ergab sich aus der Berechnung des Mittelwertes der Einzelmessungen.

### 3.3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

	<b>Sammelgel (1 ml Ansatz)</b>	<b>Trenngel 10 % (5 ml Ansatz)</b>
dH <sub>2</sub> O	0,68 ml	1,9 ml
Rotiphorese® Gel 30	0,17 ml	1,7 ml
Tris/HCl, 1M, pH 6,8	0,13 ml	-
Tris/HCl, 1,5M, pH8,8	-	1,3 ml
10% SDS	0,01 ml	0,05 ml
10% APS	0,01 ml	0,05 ml
TEMED	0,001 ml	0,002 ml

**Tabelle 16: Rezepte für die verwendeten SDS-Gele**

Die Auftrennung der isolierten Proteine für die anschließenden Western Blot Analysen erfolgte mittels SDS (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach der von Laemmli beschriebenen Methode. Die Proteine werden hierbei in einem elektrischen Feld entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli 1970).

Zur Herstellung der Gele wurde eine Apparatur der Firma PeqLab Biotechnology GmbH (Erlangen) nach Anleitung aufgebaut. Das SDS-Gel, bestehend aus Trenn- und Sammelgel (vgl. Tabelle), wurde dabei zwischen zwei Glasplatten gegossen. Zunächst wurde das Trenngel, in welchem die Auftrennung der Proteine erfolgt, hergestellt und mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Lauffront zu kreieren.

Nach dessen vollständiger Polymerisation wurde die überstehende Flüssigkeit wieder entfernt und das Sammelgel darauf gegossen. Um die Proteinproben im späteren Verlauf auftragen zu können, wurde ein Plastikkamm in das noch flüssige Sammelgel eingesetzt. Dieser konnte nach Polymerisation entnommen werden, wobei Taschen im Gel zurückblieben. In dem so entstandenen Zwei-Phasen-Gel werden im Sammelgel, auf Grund der zum Trenngel unterschiedlichen Porengröße, des pH-Werts und der elektrophoretischen Beweglichkeit seiner Ionen, die Proteine aufkonzentriert. Im Trenngel findet hingegen eine Auftrennung nach Molekulargewicht (MG) statt. Durch das in den Gelen enthaltene SDS, das durch Bindung der Proteine zu einer stark negativen Nettoladung führt, wird sichergestellt, dass die Ladung der Proteine hierauf keinen Einfluss nimmt.

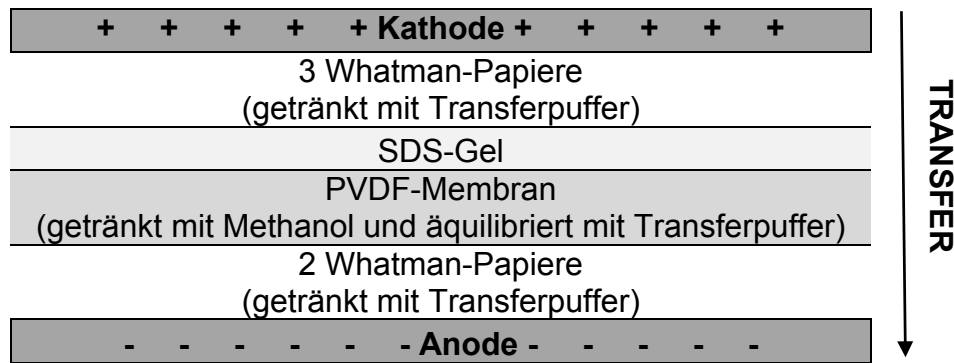
Als Vorbereitung wurden die Proteinproben zusammen mit dem reduzierenden 5x-Laemmlipuffer für 5 min gekocht, was zu deren Denaturierung führt wodurch die Proteine denaturieren. Durch das im Puffer enthaltene Bromphenolblau wurden die Proben damit zusätzlich eingefärbt.

Nachdem das fertige Gel nach Anleitung in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Puffertank mit 1 x Laufpuffer aufgefüllt worden war, wurden die Proben, die eine einheitliche Proteinmenge (15 µg – 25 µg Protein) besaßen, zusammen mit 5 µl Proteinmolekulargewichtsmarker (Fermentas, St. Leon-Rot) in die Geltaschen geladen.

Die Auftrennung erfolgte für 70 min bei 20 mA (pro Gel). Im Anschluss daran wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel für die Western Blot Analyse genutzt.

### **3.3.3.4 Western Blot Transfer**

Die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden aus dem Trenngel mittels „Elektroblotting“ auf eine Polyvinylfluorid (PVDF)-Membran übertragen, um sie für das weitere Vorgehen zu fixieren. Durchgeführt wurde dies mittels des „Semidry Blotting“ Verfahrens (Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen). Der Blot wurde entsprechend dem folgenden Schema zusammengebaut:



**Tabelle 17: Schema für den Aufbau des Semidry-Blots**

Für den Transfer wurde die PVDF Membran zunächst mit Methanol hydrophilisiert und anschließend 5 min mit Transferpuffer äquilibriert. Die zusätzlich benötigten Blotting-Papiere wurden ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtet. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich zwischen Membran und Gel keine Luftblasen befanden, um eine vollständige Übertragung der Proteine zu gewährleisten. Der Transfer der Proteine erfolgte für 90 min bei 25 V. Anschließend wurde das zu analysierende Protein mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen (vgl. 3.3.3.5).

### 3.3.3.5 Nachweis spezifischer Proteine im Western Blot

Zum Nachweis des konditionellen Knockouts von  $\beta$ -Catenin in Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach entsprechender Tamoxifen-Behandlung auf Proteinebene wurde die Methode des Western Blottings verwendet. Hierfür wurden Primärantikörper gegen das gesuchte Zielprotein sowie für das als Ladekontrolle verwendete Protein  $\alpha$ -Tubulin eingesetzt. Diese Antikörper reagieren spezifisch mit dem entsprechenden Antigen. Der daraus gebildete Antikörper-Antigen-Komplex kann dann von einem, dem Primärantikörper entsprechenden, Sekundärantikörper gebunden werden. Durch die an letzteren gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) kommt es bei Zugabe eines HRP-Substrats zur Katalysation einer Reaktion bei der Chemilumineszenz emittiert wird. Der Nachweis des gesuchten Proteins verläuft über die Detektion dieser Chemilumineszenz-Emission.

<b>Blockierung</b>	<b>Primärantikörper</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>MG</b>
5 % MM in TBST, 1 h, RT	rabbit-anti- $\beta$ -Catenin 1:1000 in 5 % BSA (TBST), $\ddot{u}$ N, 4 °C	HRP-konjugierter goat-anti-rabbit 1:2000 in 5 % MM (TBST), 1 h, RT	95 kDa
5 % BSA in TBST, 30 min, RT	rabbit-anti- $\alpha$ -Tubulin 1:10000 in 5 % BSA (TBST), $\ddot{u}$ N, 4 °C	HRP-konjugierter goat-anti-rabbit 1:2000 in 5 % MM (TBST), 1 h, RT	55 kDa

**Tabelle 18: Protokolle für die Blockierung und Antikörperinkubation zum Nachweis spezifischer Proteine**

Konkret wurden die Membranen nach dem Semidry-Blot zunächst 1 h bei Raumtemperatur mit 5 % BSA oder 5 % MM in 1 x TBST inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper bei 4 °C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x TBST für je 5 min wurde der HRP konjugierte Sekundärantikörper zugegeben und der Blot für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde noch dreimal für 5 min mit TBST gewaschen. Bei allen Schritten wurden die Membranen in den Lösungen geschwenkt, um eine optimale Verteilung zu gewährleisten.

Zur Detektion der Proteinbanden wurden die Membranen nach dem letzten Waschschrift mit 1 ml Immobilon™Western HRP Substrat (Millipore Corporation, Billerica, USA) bedeckt, in Folie eingeschlagen um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Chemilumineszenz-Signal wurde im Anschluss mit dem LAS 3000 (Fujifilm, Düsseldorf) digital aufgenommen und entsprechend in Graustufen umgesetzt. Die densitometrische Auswertung der Chemilumineszenz-Signale wurde mit der Software Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06 (Raytest, Straubenhardt) bewerkstelligt.

Zur Landungskontrolle wurde bei den Western Blot Analysen  $\alpha$ -Tubulin verwendet, wobei die Expression dieses Gens konstant und nicht reguliert ist.

### **3.3.3.6 Coomassie-Färbung**

Mittels Coomassie®Brillant Blue R-250, einem Triphenylmethanfarbstoff (Sambrook, Fristch et al. 1989), wurden die aufgetrennten Proteine der Proben auf der PVDF-

Membran sichtbar gemacht. Dies diente dem Zweck einer zusätzlichen Ladungskontrolle zum Abgleich der im Western Blot detektierten Proteinbanden.

Für die Coomassie-Färbung wurden die PVDF-Membranen in die Coomassie-Färbelösung gegeben und bei Raumtemperatur für ca. 15 min inkubiert. Darauffolgend wurde die Färbelösung abgegossen und die Membran unter ständigem Schütteln mit VE-Wasser gewaschen bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Die Membranen wurden anschließend getrocknet und mit Hilfe der LAS 3000 Intelligent Dark Box (Fujifilm, Düsseldorf) fotografiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der Software Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06 (Raytest, Straubenhardt).

### **3.4 Histologische Techniken**

#### **3.4.1 Einbettverfahren und Herstellung von Gewebeschnitten**

##### **3.4.1.1 Kryo**

Für den immunhistochemischen Nachweis von  $\beta$ -Catenin wurden sagittale Kryoschnitte der Mäuseaugen angefertigt. Dafür wurden die enukleierten Augen für 4 h in 4 % PFA bei Raumtemperatur (RT) immersionsfixiert, wobei nach 1 h die Cornea eingeschnitten wurde, um das Eindringen des Fixans zu ermöglichen. Anschließend wurden die Augen dreimal für 10 min mit 0,1 M Phosphatpuffer (PhP) gewaschen. Zur Entwässerung und Stabilisierung des Gewebes wurden die Augen für jeweils 4 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in 10 %, 20 % und 30 % Sucrose-Lösung (w/v) in 0,1 M PhP inkubiert. Danach wurden die Augen in Tissue-Tek<sup>®</sup> eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus den so entstandenen Kryoblöcken wurden, nach deren Fixierung auf Metallblöcken, im Microm HM 500 OM Kryostat (Microm International, Walldorf) Sagittalschnitte der Augen angefertigt und auf SuperFrost<sup>®</sup>Plus Objektträger übertragen. Die Kryoblöcke wurden für die potentielle Anfertigung weiterer Schnitte bei -20 °C aufbewahrt.

##### **3.4.1.2 Paraffin**

Die Einbettung in Paraffin wurde für Augen von Tieren der Slc1a3CreERT/ROSA26 - Linie nach X-gal Färbung verwendet sowie zur immunhistochemischen Färbung von

GFAP, Iba-1 und Glutaminsynthetase der Retinae von Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen. Hierfür wurden die enukleierten Augen in entweder 4 % PFA (für Färbung von Iba-1, GFAP, Glutaminsynthetase) oder Methyl-Carnoy (Für Färbung auf PLVAP) für mindestens 4 h immersionsfixiert. Mit PFA fixierte Augen wurden danach 3 x 10 min mit 0,1 M PhP gespült. Augen die mit Methyl-Carnoy fixiert wurden, wurden anschließend für je 10 min in 50% und dann in 25% Methanol inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit dH<sub>2</sub>O wurden die Augen mit 0,1 M PhP gespült. Bei beiden Fixierungen wurde nach 1 h ein Schnitt in der Cornea gesetzt, um die Fixierung zu verbessern. Die Einbettung erfolgte im Einbettautomaten EM TP (Leica, Wetzlar). Dabei wurden die Augen zunächst über eine Alkoholreihe mit Isopropanol (50, 70, 80, 96 und 100 % jeweils 1-2 h) gewebeschonend entwässert, anschließend in Xylol (2 x 1 h 100 %) inkubiert und schließlich in Paraffin (6 h Paraffin) eingebettet. Die eingebetteten Augen wurden anschließend auf Blöcken fixiert und mit Hilfe des Supercut-Mikrotoms Sagittalschnitte von 6 µm angefertigt.

### 3.4.1.3 Epon

Zur Untersuchung der retinalen Morphologie und der Vermessung der Schichtdicken wurden Semidünnschnitte der Augen angefertigt. Hierfür wurden adulte 8 Wochen alte Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> sowie Tiere an P17 nach entsprechender Behandlung (vgl. Tabelle 8) zunächst mit 0,89 % NaCl + Heparin und anschließend mit EM-Fixans perfundiert (vgl. 3.2.4). Die danach entnommenen Mäuseaugen wurden für 24 h vollständig mit EM-Fixans bedeckt. Dabei wurde nach einer Stunde die Cornea der Augen eingeschnitten um ein besseres Eindringen des Fixans und damit eine bessere Fixierung des Gewebes zu erreichen. Im Weiteren wurden die Augen mit Cacodylatpuffer (4 x 30 min) gewaschen und anschließend zur Nachfixierung in 1 % Osmiumtetroxid überführt. Über eine aufsteigende Ethanolreihe (70, 80, 90, 100 %) wurde das Gewebe schonend entwässert. Für die Eponeinbettung wurde der Einbettautomat EM TP (Leica, Wetzlar) verwendet. Die Augen wurden hierbei nacheinander in 100 % Propylenoxid, Propylenoxid/Epon (2:1), Propylenoxid/Epon (1:1), Propylenoxid/Epon (1:2) und schließlich in 100 % Epon (Eponmischung aus Stammlösung A und Stammlösung B im Verhältnis 1:1 mit 2 % DPM-30) überführt. Nach 48 h bei 60 °C im Brutschrank war das Epon vollständig auspolymerisiert, so

dass anschließend mittels des Ultracut E-Ultramikrotom (Reichert-Jung, Kirchseeon) 1 µm dicke sagittale Semidünnschnitte hergestellt werden konnten.

### 3.4.2 Färbungen

#### 3.4.2.1 Immunhistochemische Färbungen

Um die konditionelle Deletion von  $\beta$ -Catenin in Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach Tamoxifen-Behandlung zu verifizieren und um mögliche Auswirkungen dieser Behandlung und der grundlegenden gentechnischen Veränderungen im Tiermodell auf die Retina zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Dafür wurden sowohl Gefrierschnitte (für  $\beta$ -Catenin), als auch Paraffinschnitte (für Iba-1, GFAP, Glutaminsynthetase, PLVAP) der murinen Augen verwendet.

Zur Vorbereitung wurden die Gefrierschnitte erst kurz bei RT angetaut und dann mit einem Föhn angewärmt, um die Gewebeschnitte auf den Objektträgern zu fixieren und ein Abschwimmen im Puffer zu verhindern. Die Paraffinschnitte der Augen mussten im Vorfeld der Färbung zunächst entparaffiniert werden. Hierfür wurde eine Isopropanol-Reihe (2 x 10 min 100 %, 2 x 5 min 96 %, 2 x 5 min 80 %, 1 x 5 min 70 %) bis hin zur 5-minütigen Dehydrierung in dH<sub>2</sub>O durchlaufen. Anschließend wurde mit Schnitten beider Varianten auf die gleiche Weise fortgefahren. Die Schnitte wurden 3 x 5 min bei RT mit 0,1 M PhP in einer Küvette gewaschen. Für die Durchführung der folgenden Schritte wurden die Objektträger der Küvette entnommen, überschüssiger Puffer mit einem Tuch entfernt und die Schnitte mit einem Liquid Blocker PAP-Pen (SCI Science Services, München) umfahren, wodurch das Areal um die Schnitte durch einen hydrophoben Film begrenzt wurde. Danach wurden die Schnitte blockiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Für die Färbungen auf Iba-1, GFAP und Glutaminsynthetase erfolgte desweiteren eine Vorbehandlung des Gewebes zu dessen Permeabilisierung (durch Triton X-100) und zur Demaskierung von Epitopen (durch NH<sub>4</sub>Cl). Die für die jeweiligen Proteine verwendeten Färbeprotokolle sind der Tabelle 19 und der Tabelle 20 zu entnehmen. Die verwendeten Antikörperverdünnungen wurden jeweils in einer 1:10 in 0,1 M PhP verdünnten Blockierlösung angesetzt. Zur Durchführung von Negativkontrollen wurde pro Färbung jeweils ein Schnitt mit 1:10 verdünnter Blockierlösung - statt Primärantikörper- und anschließend mit Sekundärantikörper inkubiert. Damit sollte



ausgeschlossen werden, dass es zu falsch-positiven Signalen aufgrund unspezifischer Bindungen des sekundären Antikörpers kommt.

<b>Blockierung</b>	<b>Primärantikörper</b>	<b>Sekundärantikörper</b>
3 % BSA und 0,1 % Triton-X-100 in 0,1 M PhP, 45 min, RT	rabbit-anti- <b>β-Catenin</b> 1:100 üN, 4 °C	<b>Biotin</b> -konjugierter goat- anti-rabbit 1:500, 1 h, RT <b>Alexa Fluor® 488</b> - konjugiertes <b>Streptavidin</b> 1:1000 1 h, RT

**Tabelle 19: Protokoll für die immunhistochemische Färbung von β-Catenin an Gefrierschnitten**

<b>Vorbehandlung (*)</b>		
NH <sub>4</sub> Cl (0,05M) ½ - 1h	Reduktion freier Aldehyd-Gruppen	
0,1M PhP 3 x 5-10 min	Waschen	
0,5% Triton-X-100 5-10min	Permeabilisierung	
0,1M PhP 3 x 5-10 min	Waschen	
<b>Blockierung</b>	<b>Primärantikörper</b>	<b>Sekundärantikörper</b>
3 % BSA, 0,1 % Triton-X-100 in 0,1 M PhP, 45 min, RT	rabbit-anti- <b>Iba-1</b> (*) 1:500 üN, 4 °C	<b>Cy™3</b> -konjugierter goat- anti-rabbit 1:2000 1 h, RT
3 % BSA, 0,1 % Triton-X-100 in 0,1 M PhP, 45 min, RT	rabbit-anti- <b>GFAP</b> (*)1:1000 üN, 4 °C	<b>Cy™3</b> -konjugierter goat- anti-rabbit 1:2000 1 h, RT
3 % BSA, 0,1 % Triton-X-100 in 0,1 M PhP, 45 min, RT	goat-anti- <b>Glutaminsynthetase</b> (*) 1:50 üN, 4 °C	<b>Biotin</b> -konjugierter goat- anti-rabbit 1:500, 1 h, RT <b>Alexa Fluor® 488</b> - konjugiertes <b>Streptavidin</b> 1:1000 ,1 h, RT
3 % BSA, 0,1 % Triton-X-100 in 0,1 M PhP, 45 min, RT	rat-anti- <b>PLVAP</b> 1:50 üN, 4 °C	<b>Cy™3</b> -konjugierter donkey-anti-rat 1:2000 1 h, RT

**Tabelle 20: Protokoll für immunhistochemische Färbungen von Iba-1, GFAP,GS und PLVAP an Paraffinschnitten**

Für Färbungen in denen Antikörper verwendet werden, die mit (\*) gekennzeichnet sind, ist die Vorbehandlung der Gewebeschnitte nach in der Tabelle angegebenen Protokoll notwendig.

Die Objektträger wurden jeweils nach Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper mit 0,1 M PhP (3 x 5 min) gewaschen. Vor dem Eindeckeln der Schnitte mit dem DAPI-haltigen Mounting Medium Mowiol erfolgte noch ein weiterer Waschschrift mit dH<sub>2</sub>O. Bei DAPI handelt es sich um einen DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, der mit Licht einer Wellenlänge von 381 nm angeregt wird. Er diente somit zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Zellkerne. Bis zur näheren Untersuchung der gefärbten Schnitte wurden diese bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt um die Fluoreszenz zu bewahren.

### 3.4.2.2 X-Gal histochemische Färbung

Zur Verifizierung der Tamoxifen-induzierbaren Aktivität und der zellspezifischen Expression der Cre-Rekombinase wurden Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/ROSA26LacZ Mäuse verwendet. Hierfür wurden Tiere von P7-P10 sowie adulte Tiere im Alter von 6 Wochen gemäß dem unter Punkt 3.2.2 beschriebenen Protokoll mit Tamoxifen behandelt. An P17 bzw. mit 8 Wochen wurden die Augen entnommen und insgesamt 1 in LacZ-Fixans (vgl. Tabelle 7) inkubiert. Dabei wurde nach 30 min die Cornea mittels einer Federschere entfernt und anschließend vorsichtig die Linse entnommen, um die Retina für Fixans und Färbelösung zugänglich zu machen. Der übrige Augenbecher wurde nach den restlichen 30 min im Fixans mit LacZ-Waschpuffer gewaschen (3 x 5 min), anschließend in die LacZ-Färbelösung (vgl. Tabelle 7) überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das enthaltene Substrat X-Gal wird dabei durch die exprimierte  $\beta$ -Galactosidase enzymatisch zu 5-Brom-4-chlor-indoxyl gespalten, das durch den vorhandenen Luftsauerstoff dann zu dem tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird.

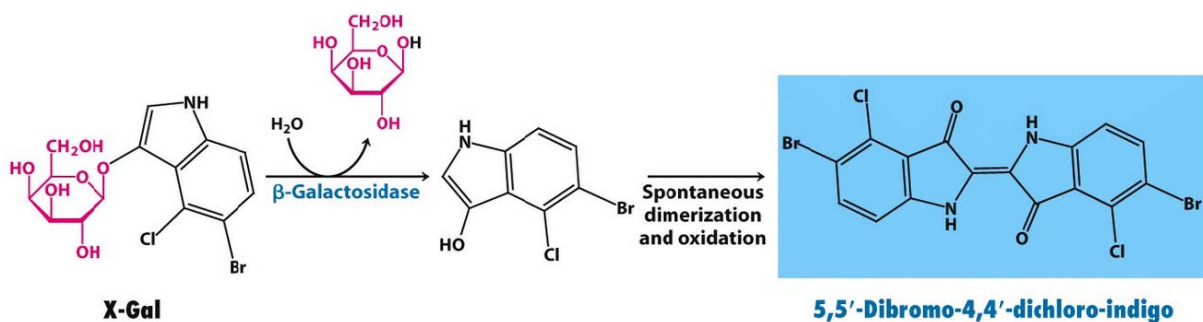


Abb. 6: Enzymatische Reaktion der  $\beta$ -Galactosidase (Berg Jeremy M. 2003)

Entsprechend dem Modell ist demnach eine Blaufärbung dort zu lokalisieren wo nach Expression der Cre-Rekombinase und deren Aktivierung durch Tamoxifen  $\beta$ -Galactosidase Expression stattfindet. Nach Entfernen der Färbelösung werden die Augenbecher noch 3 x 10 min mit LacZ-Waschpuffer und 1 x 20 min mit 0,1 M PhP gewaschen, bevor sie für das weitere Vorgehen in Paraffin eingebettet werden (vgl. 3.4.1.2 ).

### 3.4.2.3 Färbung nach Richardson

Um die angefertigten sagittalen Semidünnschnitte der Augen von Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen der lichtmikroskopischen Analyse der allgemeinen Morphologie und der Dickenmessung der gesamten Retina sowie der inneren und äußeren Körnerschicht zugänglich zu machen, wurden diese nach der Methode von Richardson *et al.* eingefärbt (Richardson *et al.* 1960). Hierbei werden basophile und osmiophile Strukturen blau dargestellt. Die Semidünnschnitte werden für 30 s bei 60 °C mit der Gebrauchslösung (vgl. Tabelle 7) bedeckt und anschließend gründlich mit dH<sub>2</sub>O gewaschen.

### 3.4.3 Mikroskopie

Für die licht- und fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Semidünnschnitte, der retinalen Häutchenpräparate, sowie der immunhistochemischen und immunzytochemischen Färbungen wurde der Axio Imager.Z1 (Carl Zeiss, Göttingen) verwendet. Die immunhistochemischen Färbungen, sowie die intraretinalen Gefäße wurden mit Hilfe des ApoTome Zusatzmoduls (Carl Zeiss, Göttingen) aufgenommen. Alle mikroskopischen Bilder wurden unter Verwendung der Bildanalyse-Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Göttingen) verarbeitet.

### 3.4.4 Dickenmessung von Retina, INL und ONL

Um potentielle Auswirkungen des konditionellen Knockouts von  $\beta$ -Catenin auf die allgemeine Morphologie der Retina zu untersuchen, wurden sagittale Semidünnschnitte der Retina von Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen an P17 und im

Alter von 8 Wochen quantitativ analysiert. Um etwaige toxische Effekte von Tamoxifen zu detektieren, wurden die Tiere im Vorfeld mit Tamoxifen (Biomol, Hamburg) bzw. nur mit der Trägersubstanz *Corn Oil* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) behandelt (vgl. 3.2.2).

Für die Auswertung wurden die Semidünnschnitte nach Richardson-Färbung unter dem Lichtmikroskop in einer 630-fachen Vergrößerung aufgenommen. Mit Hilfe der Bildanalyse-Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Göttingen) erfolgte anschließend die Vermessung der Gesamtdicke der Retina, der Dicke der inneren Körnerschicht (INL), sowie auch der äußeren Körnerschicht (ONL). Hierfür wurden zunächst die Messpunkte festgelegt, indem die Retina, -ausgehend von der *Ora serrata* (OS)-, nasal, sowie temporal bis zum Sehnervenkopf (ONH) in je zehn gleiche Abschnitte aufgeteilt wurde.

### 3.5 Auswertung und Statistik

Die bei den Versuchen erhaltenen Daten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft<sup>®</sup> Excel 2007 (Microsoft<sup>®</sup> Corporation, Redmond, USA) ausgewertet. Zur Überprüfung auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Stichproben wurde der zweiseitige t-Test verwendet. Bei Analysen mit mehr als zwei Vergleichsgruppen wurde zunächst mittels ANOVA die Verteilung der Varianzen ermittelt. Zur Überprüfung auf statistisch signifikante Unterschiede wurde bei einer homogenen Verteilung der Varianzen der Games-Howell-Test bzw. bei einer inhomogenen Verteilung der Varianzen der *Fishers Least Significant Difference* (LSD)-Test verwendet. Unterschiede wurden bei  $p$  („Probability“)  $< 0.05$  (\*) als signifikant und bei  $p < 0,01$  (\*\*) als hoch signifikant bewertet. Die Säulen-, Punkt- und Liniendiagramme wurden zunächst mit Microsoft<sup>®</sup> Excel 2007 (Microsoft<sup>®</sup> Corporation, Redmond, USA) erstellt und anschließend in CorelDRAW<sup>®</sup> X4 (Corel<sup>®</sup> Corporation, Ottawa, CAN) in Vektorgrafiken umgearbeitet. In den Diagrammen wurden Mittelwerte stets zusammen mit ihrem Standardfehler (SEM) dargestellt.

## 4 Ergebnisse

In früheren Studien unserer und auch anderer Arbeitsgruppen konnte bereits gezeigt werden, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg bei der Vaskularisierung der Retina eine wichtige Rolle spielt. So zeigte sich in Retinae von *Ndp*<sup>y/-</sup> Mäusen eine Beeinträchtigung der Gefäßentwicklung im Bereich des oberflächlichen Plexus, die Persistenz der hyaloidalen Gefäße und ein kompletter Verlust der intraretinalen Kapillaren (Richter, Gottanka et al. 1998; Ohlmann, Adamek et al. 2004). Durch Überexpression von Norrin in der Linse konnte die Entwicklung dieses Phänotyp in doppelt transgenen  $\beta$ B1-Norrin/*Ndp*<sup>y/-</sup> Mäusen vollständig verhindert werden (Ohlmann, Scholz et al. 2005). Zusätzlich führte eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs auch nach einem Sauerstoff-induzierten Schaden zu einer verbesserten Revaskularisierung und verminderte die Bildung von pathologischen Neovaskularisationen (Ohlmann, Seitz et al. 2010). Allerdings ist noch unklar, ob Norrin seine proangiogenen Effekte über eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen und / oder Müllerzellen vermittelt. Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, welche Rolle dem kanonischen Wnt-Signalweg in Müllerzellen bei der Vaskularisierung der Retina unter physiologischen Bedingungen und nach Induktion einer Sauerstoff-induzierten Retinopathie, dem Mausmodell der Frühgeborenenretinopathie, zugeschrieben werden kann.

### 4.1 Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen während der Entwicklung der retinalen Gefäße

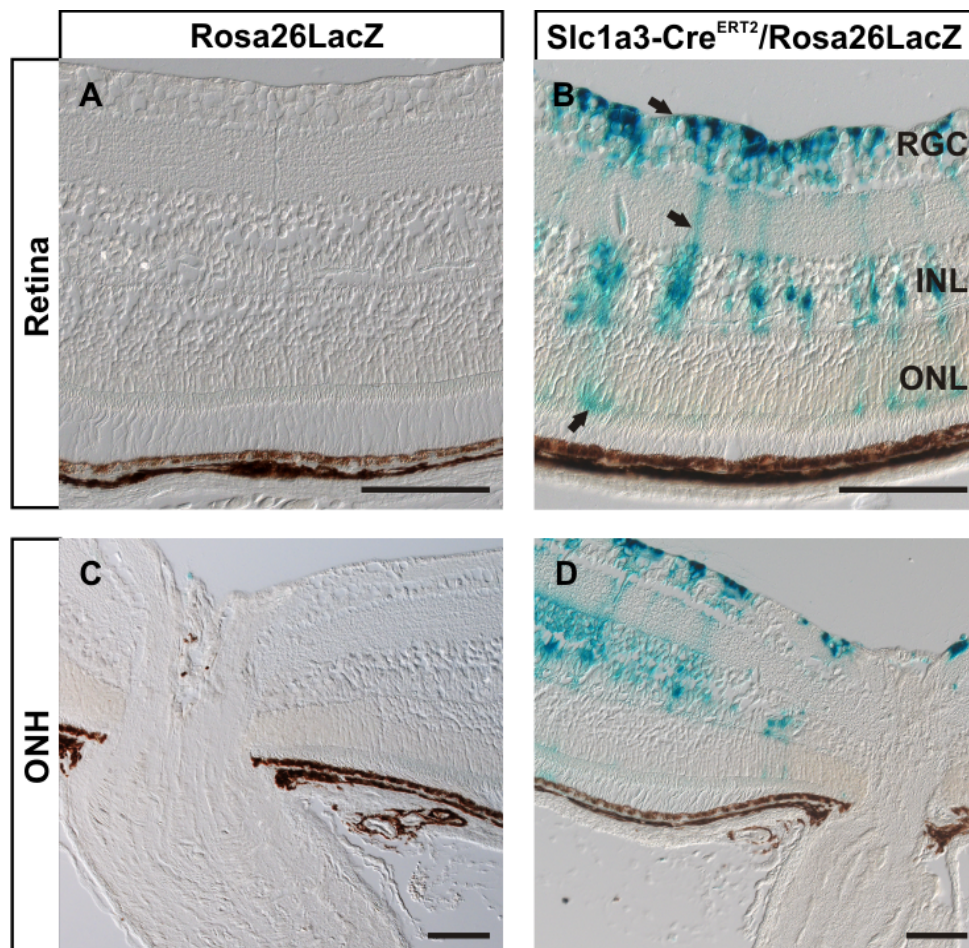
Da Müllerzellen als radiäre Gliazellen die Retina durchziehen und damit eine Leitstruktur für das Einwachsen der Gefäße darstellen, wurde untersucht welche Auswirkungen die Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen auf die Ausbildung der retinalen Gefäßplexus während unterschiedlicher Entwicklungsstadien hat.

#### 4.1.1 Verifizierung der konditionellen $\beta$ -Catenin-Defizienz in Müllerzellen

Zur Untersuchung des Einflusses des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen auf die Vaskularisierung in der Retina, wurden  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäuse mit einer konditionellen  $\beta$ -Catenin-Defizienz in Müllerzellen verwendet. Die Aktivität der Cre-Rekombinase in dieser Linie kann durch Behandlung der Tiere mit Tamoxifen (TX) induziert werden, wodurch eine zeitliche Kontrolle der Deletion von *Ctnnb1* ermöglicht wird. Dementsprechend wurde zunächst ein Behandlungsschema für Jungtiere entwickelt, wobei TX in einer Konzentration von 5mg/ml über 4 bzw. 5 Tage 3x täglich in Form von Augentropfen verabreicht wurde (vgl.3.2.2). Um eine erfolgreiche Rekombination in Müllerzellen zu verifizieren wurde die Reportermauslinie  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/ROSA26LacZ$  verwendet. Die TX-induzierbare Cre-Rekombinase-Aktivität und zelluläre Spezifität kann so mittels einer histologischen Färbung dargestellt werden. Weiterhin wurden  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäuse verwendet um die Effektivität des konditionellen Knockouts von  $\beta$ -Catenin in Müllerzellen auf Proteinebene zu analysieren.

Zunächst wurden an P14 die Augen von  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/ROSA26LacZ$  Mäusen, nach entsprechender Behandlung mit TX von P7-P10, entnommen und eine histologische X-Gal Färbung durchgeführt (vgl. 3.4.2.2). An sagittalen Paraffinschnitten konnte in Retinae der  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/ROSA26LacZ$  Tiere eine spezifische Blaufärbung von Zellkernen in der inneren Körnerschicht (INL), in der die Zellkerne der Müllerzellen lokalisiert sind, detektiert werden. Zudem waren deren Zellfortsätze angefärbt, die die verschiedenen Schichten der Retina durchspannen und in der *Membrana limitans externa* und *interna* enden. Im Gegensatz dazu war in den  $Slc1a3-Cre^{ERT2}$ -negativen ROSA26LacZ Kontrolltieren keinerlei Färbung zu erkennen (vgl. Abb. 7 A,B). Anhand der Detailaufnahmen der Retina im Bereich des Sehnervenkopfes sollte die Zellspezifität des *Slc1a3*-Promotors überprüft werden. Obwohl bekannt ist, dass dieser Glutamat/Aspartat Transporter in der Retina spezifisch von Müllerzellen exprimiert wird (Mori, Tanaka et al. 2006) sollte sichergestellt werden, dass es zu keiner Expression in den ebenfalls glialen Astrozyten kommt. Wie in Abb. 7 C und D zu sehen ist, konnte in den  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/ROSA26LacZ$  wie in den Kontrolltieren keine Färbung im Bereich des *N. opticus* detektiert werden. Dies lässt den Schluss

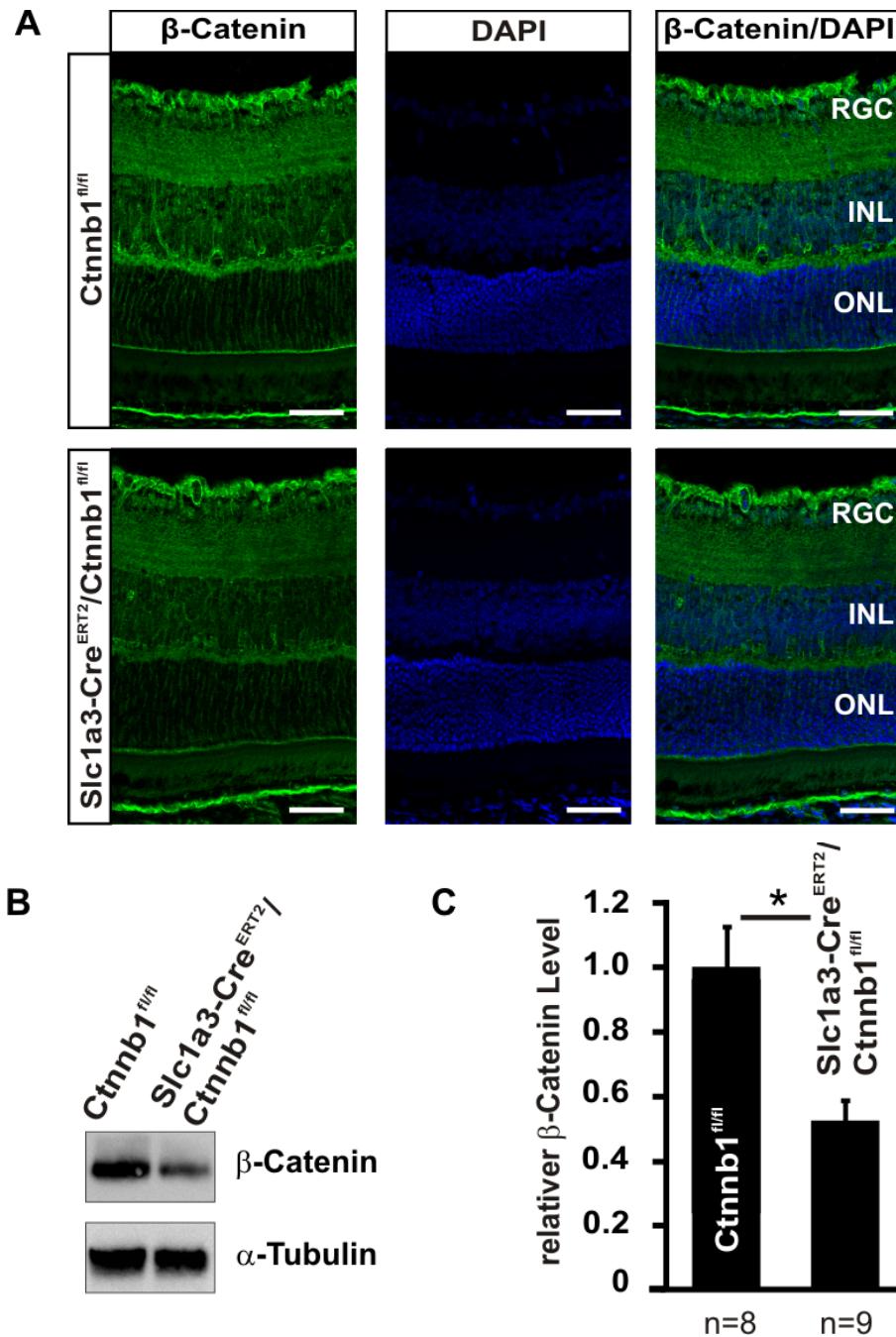
zu, dass es in der Netzhaut ausschließlich in Müllerzellen zu einer spezifischen Aktivierung der Cre-Rekombinase und damit zur Rekombination kommt.



**Abb. 7: Verifizierung der spezifischen Expression der TX-abhängigen Cre-Rekombinase in  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/ROSA26LacZ$ -Tieren an P14**

A-D: X-Gal-Färbung von sagittal geschnittenen Augen von  $Slc1a3-Cre^{ERT2}$ -positiven  $ROSA26LacZ$ -Mäusen (B, D) und  $Slc1a3-Cre^{ERT2}$ -negativen Kontrolltieren (A, C) an P14 nach TX-Behandlung von P7-P10. In Retinae von  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/ROSA26LacZ$  Tieren ist eine spezifische Blaufärbung in den Zellkernen im Bereich der äußeren INL, sowie in deren Fortsätzen die in der *Membrana limitans externa* und *interna* (Pfeile) enden, zu beobachten. Im Bereich des Sehnervenkopfes ist in beiden Fällen keine Färbung erkennbar (C, D). ONH: Sehnervenkopf; RGC: retinale Ganglienzellschicht; INL: innere Körnerschicht; ONL: äußere Körnerschicht. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

Um die Reduktion der  $\beta$ -Catenin-Expression auch auf Proteinebene in der Netzhaut zu bestätigen wurden  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  und  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Tiere zur Induktion des konditionellen Knockouts von P12 bis P15 mit TX behandelt. Für die entsprechenden Untersuchungen wurden an P17 die Augen entnommen und der immunhistochemischen bzw. Western Blot Analyse zugeführt (vgl. Abb. 8).



### Abb. 8: Verifizierung des konditionellen $\beta$ -Catenin Knockouts auf Proteinebene

A: Immunhistochemische Färbung von  $\beta$ -Catenin (grün) an sagittal geschnittenen Augen von  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen und  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrolltieren an P17 nach Behandlung mit TX-Augentropfen von P12-P15. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI (blau). In Retinae von  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  ist im Gegensatz zu den Kontrollen kaum ein Signal von akkumuliertem  $\beta$ -Catenin in der INL zu erkennen. RGC: retinale Ganglienzellschicht; INL: innere Körnerschicht; ONL: äußere Körnerschicht. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

B, C: Repräsentative Western Blot Analyse (B) und densitometrische Auswertung (C) der  $\beta$ -Catenin-Spiegel in retinalem Gesamtprotein von  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen und Kontrollgeschwistertieren an P17 nach TX-Behandlung (P12-P15). Als Ladekontrolle wurde der Blot mit  $\alpha$ -Tubulin hybridisiert (Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 Wurfen; \*  $p < 0,05$ ).

In den  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrolltieren war eine deutliche kernlokalisierte Färbung in der INL zu sehen die auf einen aktivierten Wnt-Signalweg hindeutet, da es in diesem Fall zu



einer Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern kommt. Im Gegensatz dazu zeigte sich in Retinae von  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen in diesem Bereich nur noch in vereinzelt Zellen ein detektierbares Signal. Dabei erschien auch die Intensität der Färbung im Bereich der *Membrana limitans externa* bei  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen deutlich schwächer als in den  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrolltieren. Demgegenüber war die Expression von  $\beta$ -Catenin in anderen retinalen Zellen nicht verändert, wie die vergleichbare Intensität des Fluoreszenzsignals in der RGC-Schicht bei einem Vergleich von  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  und Kontrolltieren zeigt.

Neben der immunhistochemischen Analyse wurden die  $\beta$ -Catenin-Spiegel in retinalem Gesamtprotein aus  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen und  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrolltieren bestimmt (vgl. Abb. 8 B, C). Hierfür wurden die Versuchstiere, wie bereits beschrieben, mit TX behandelt. In  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrolltieren fand sich in der Netzhaut ein spezifisches Signal für  $\beta$ -Catenin in der Western Blot Analyse, das in  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen deutlich schwächer war (B). Die densitometrische Auswertung (C) ergab eine signifikante Reduktion der retinalen  $\beta$ -Catenin-Spiegel in  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen um  $47,2 \pm 6,7 \%$  im Vergleich zu den  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrollen.

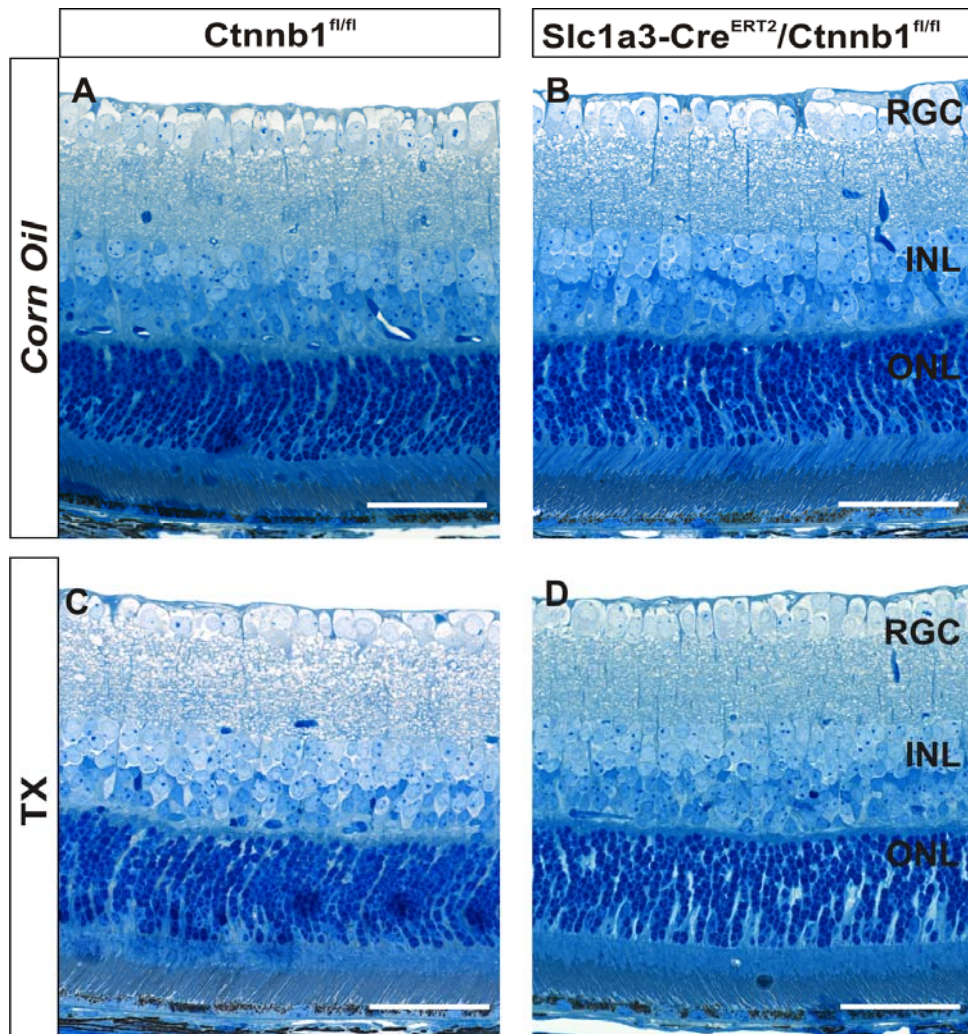
#### **4.1.2 Untersuchung des Einflusses des Tamoxifen-induzierbaren Cre-Systems auf die Retina**

Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits erwähnt, basiert das im Zuge dieser Arbeit verwendete Tiermodell auf einer Müllerzell-spezifischen Expression einer Cre-Rekombinase die durch Verabreichung von TX aktiviert wird. Die daraus resultierende permanente Präsenz eines körperfremden Proteins sowie die durch Tamoxifen vermittelten toxischen Effekte könnten demnach zu Veränderungen innerhalb der Retina führen. Um dies näher zu untersuchen und mögliche Veränderungen im Vorfeld der Versuche zu detektieren, wurden morphologische und immunhistochemische Analysen durchgeführt.

Hierfür wurden  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  sowie  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäuse von P12-P15 mit TX bzw. der Trägersubstanz *Corn Oil* behandelt (vgl. 3.2.2).

Zur Untersuchung der allgemeinen Morphologie der Retina und deren einzelner Schichten wurden zunächst sagittale Semidünnschnitte der Augen beider

Vergleichsgruppen nach entsprechender Behandlung angefertigt (vgl. 3.4.1.3). Im Vergleich zeigte sich, dass weder die Expression der Cre-Rekombinase oder deren Aktivierung, noch die alleinige Behandlung der Tiere mit TX zu offensichtlichen morphologischen Veränderungen führt (vgl. Abb. 9).



**Abb. 9: Morphologische Analyse von  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  sowie  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen mittels Lichtmikroskopie**

A-D: Lichtmikroskopische Aufnahmen von sagittalen Semidünnschnitten nach Richardson-Blaufärbung der Retinae von  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  (B,D) und  $Ctnnb1^{fl/fl}$  (A,C) Mäusen an P17 nach Behandlung mit TX (C,D) bzw. der Trägersubstanz *Corn Oil* (A,B) von P12-P15. Im Vergleich zeigt sich eine unauffällige, physiologische Morphologie der Retina unabhängig von Behandlung und Genotyp der Tiere. RGC: retinale Ganglienzellschicht; INL: innere Körnerschicht; ONL: äußere Körnerschicht. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

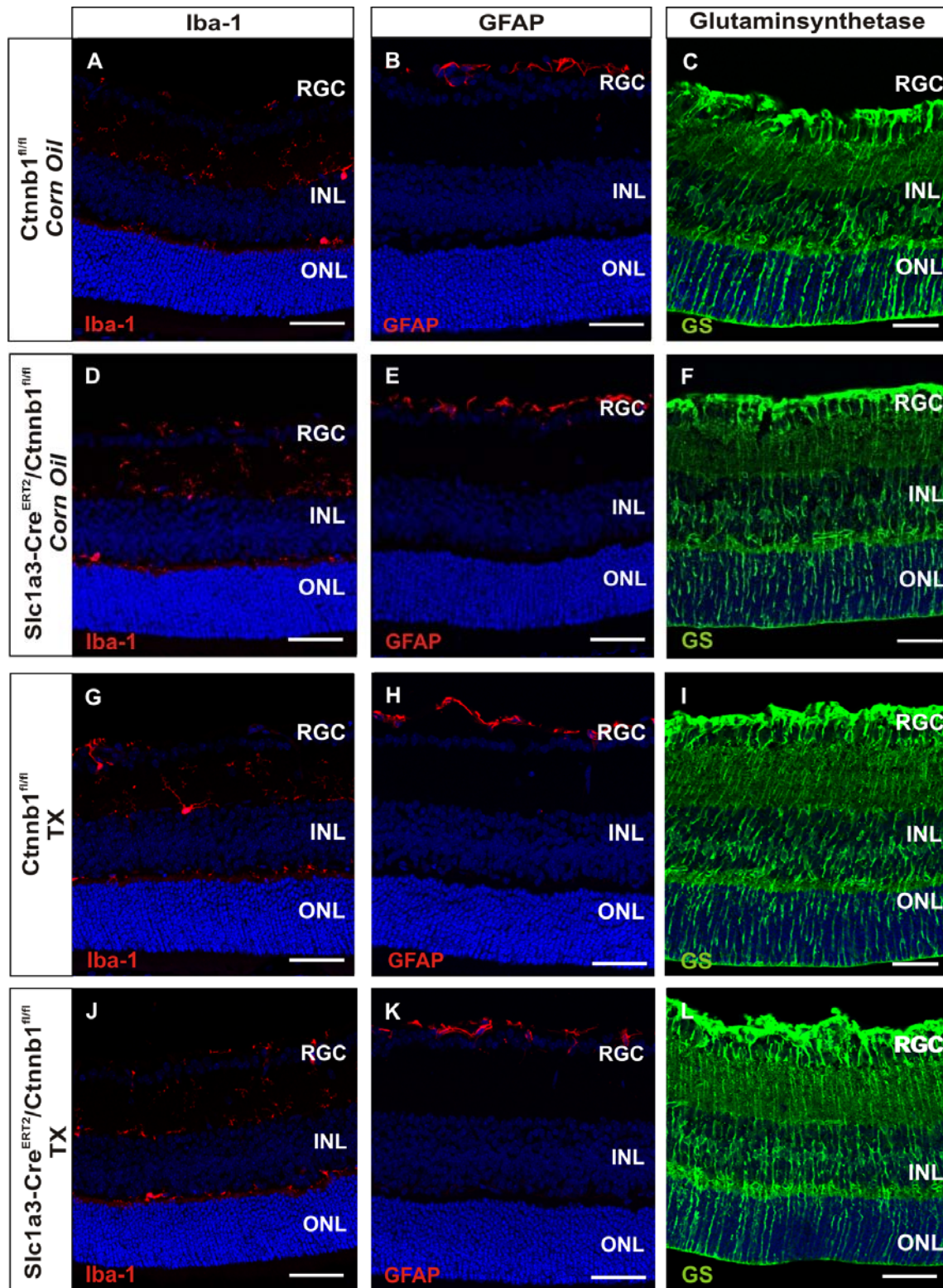
Um mögliche reaktive Veränderungen von Müllerzellen aber auch Mikroglia zu detektieren, wurden zusätzlich immunhistochemische Färbungen für die Proteine Iba-1 (*ionized calcium binding adaptor molecule 1*), GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) und GS (Glutaminsynthetase) durchgeführt (vgl. Abb. 10).

Hierfür wurden Mäuse beider Vergleichsgruppen von P12-P15 mit TX bzw. der Trägersubstanz *Corn Oil* behandelt. An P17 wurden die Augen entnommen und sagittale Paraffinschnitte (vgl. 3.4.1.2) für die immunhistochemischen Färbungen angefertigt. Unabhängig vom Genotyp der Tiere und der durchgeführten Behandlung zeigte sich bei den durch Iba-1 markierten Mikroglia eine regelmäßige Verteilung in der RGC-Schicht sowie in der inneren und äußeren plexiformen Schicht. Die hierbei auffällige ramifizierte Form der Mikroglia weist zudem auf deren inaktiven Ruhezustand hin. Da die Mikroglia in der Netzhaut einen wichtigen Teil der immunologischen Abwehr darstellen, weisen die Befunde daraufhin, dass es zu keiner immunologischen Reaktion auf die exprimierte Cre-Rekombinase sowie auf das, zu deren Aktivierung verwendete, TX kommt.

Um mögliche Schädigungen der Müllerzellen durch die spezifische Expression der Cre-Rekombinase und die Applikation von TX per se auszuschließen, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Hierbei wurde GFAP, als Marker für die Reaktivität der Müllerzellen, sowie für Glutaminsynthetase, als spezifischer Zellmarker, verwendet (vgl. 3.4.2.1). An den Schnitten aller Genotypen zeigte sich lediglich eine intensive Färbung für GFAP innerhalb der RGC-Schicht. Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen und Behandlungen wurden nicht beobachtet. Ebenso war keine radiäre Streifung in den inneren Schichten der Netzhaut zu detektieren, welche als deutliches Zeichen einer Gliosereaktion gilt (vgl. Abb. 10).

Anhand von immunhistochemischen Färbungen für Glutaminsynthetase sollte untersucht werden, ob die Behandlung der Tiere mit TX und der daraus resultierenden Deletion von *Ctnnb1*, einen Verlust von Müllerzellen induziert. Im Rahmen dieser Färbung zeigte sich in allen Genotypen eine deutlich radiäre Färbung in der Netzhaut, die von der *Membrana limitans interna* bis zur *Membrana limitans externa* reichte (Abb. 10). Im Bereich der Ganglienzellschicht war ein starkes Signal zu erkennen, welches auf das Anfärben der Müllerzell-Endfüße sowie der Astroglia zurückzuführen ist. Im Vergleich der gefärbten Retinae von *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* und *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen zeigte sich hierbei keinerlei Unterschied. Ebenso konnte auch kein Einfluss festgestellt werden, der auf die Behandlung mit TX zurückzuführen ist. Ein morphologisch auffälliger Verlust von Müllerzellen wurde nicht beobachtet.

Zusammenfassend konnte somit für alle Genotypen und für alle Behandlungen eine offensichtliche immunologische sowie gliale Reaktion von Müllerzellen in der Netzhaut ausgeschlossen werden.



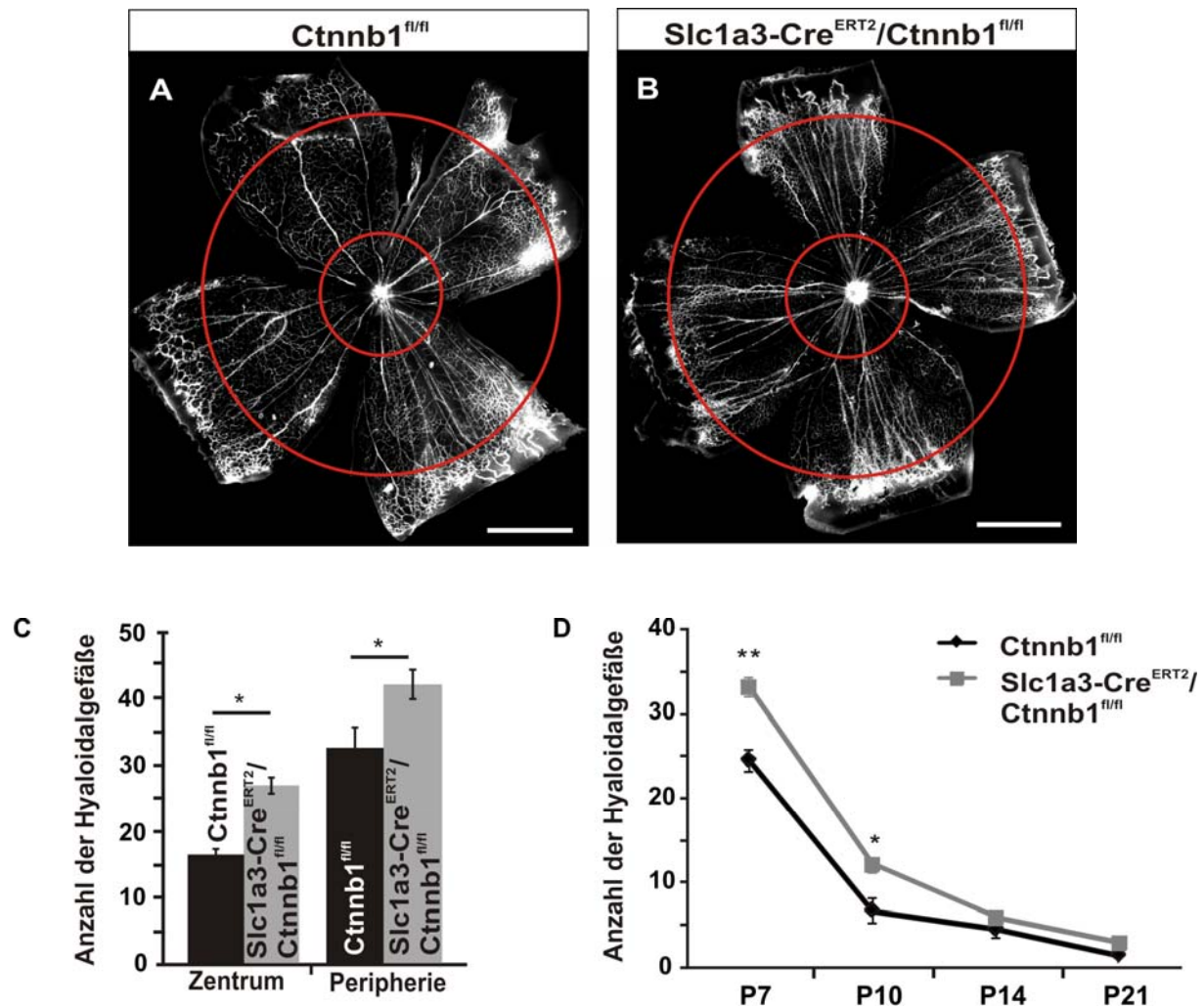
**Abb. 10: Deletion von  $\beta$ -Catenin in Müllerzellen sowie TX-Behandlung während der Entwicklung haben keine immunologische Reaktion und Gliosereaktion zur Folge**

A-L: Immunhistochemische Färbung von Iba-1 (A, D, G, J; rot), GFAP (B, E, H, K; rot) und Glutaminsynthetase (C, F, I, L; grün) an sagittalen Paraffinschnitten von  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  und  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen an P17 nach Behandlung mit TX (G-L) bzw. der Trägersubstanz *Corn Oil* (A-F) von P12-P15. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI (blau). Unabhängig von Genotyp und Behandlung zeigten sich bei keiner der durchgeführten Färbungen erkennbare Unterschiede. RGC: retinale Ganglienzellschicht; INL: innere Körnerschicht; ONL: äußere Körnerschicht. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

### 4.1.3 Untersuchung des Gefäßphänotyps nach Induktion der $\beta$ -Catenin-Defizienz in Müllerzellen von P1-P5

*Ndp*<sup>Y/-</sup> und *Fzd4*<sup>-/-</sup> Tiere weisen bereits in der frühen Entwicklung einen retinalen Gefäßphänotyp auf, wobei die Entwicklung des oberflächlichen Plexus retardiert ist und die hyaloidalen Gefäße persistieren (Richter, Gottanka et al. 1998; Ohlmann, Adamek et al. 2004). Auf Grund dessen wurden in dieser Arbeit zunächst die Auswirkungen der  $\beta$ -Catenin Defizienz in Müllerzellen während der frühen Entwicklung der retinalen Gefäße untersucht. Da die Vaskularisierung der Retina in Mäusen mit der Geburt beginnt wurden *Slc1a3-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Mäuse sowie die Cre-negativen *Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Geschwistertiere ab dem postnatalen Tag (P)1 bis P5 mit TX behandelt (vgl. 3.2.2). Für die anschließende Analyse der retinalen Gefäße wurden Mäuse an den entsprechenden Tagen mit FITC-Dextran perfundiert und retinale Häutchenpräparate zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung angefertigt. Im Rahmen der mikroskopischen Auswertung konnten in *Slc1a3-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Mäusen an P7 im Vergleich zu den *Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Kontrollgeschwistertieren vermehrt hyaloidale Gefäße detektiert werden. Um dies zu Quantifizieren wurde die Anzahl der Hyaloidalgefäße in einer zentralen sowie in einer peripheren Zone in allen vier Quadranten des Häutchenpräparats bestimmt (vgl. Abb. 11 A, B rote Kreise). Hierbei ergab sich für die *Slc1a3-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Mäuse mit  $26,50 \pm 1,15$  im zentralen und von  $41,83 \pm 2,17$  im peripheren Bereich ein vermehrtes Auftreten von hyaloidalen Gefäßen im Vergleich zu den Kontrolltieren (zentral  $16,57 \pm 0,84$  und peripher  $32,43 \pm 3,12$  hyaloidale Gefäße) (vgl. Abb. 11 C). Dieser Unterschied erreichte in beiden Fällen Signifikanz.

Um zu klären ob dieser Unterschied auch im altersprogressiven Verlauf persistiert, wurden Tiere nach gleicher Behandlung auch an P10, P14 und P21 analysiert. Wie Abb. 11D zeigt, ließ sich im weiteren Verlauf der Entwicklung in Tieren beider Genotypen ein Rückgang in der Anzahl der Hyaloidalgefäße feststellen. Der an P7 detektierte Unterschied zwischen *Slc1a3-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Mäusen und ihren *Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Kontrollgeschwistertieren verringerte sich dabei kontinuierlich mit zunehmendem Alter der Tiere und ging schließlich komplett verloren. Die Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen scheint demnach nicht zu einer Persistenz sondern lediglich zu einer verzögerten Regression der hyaloidalen Gefäße zu führen.



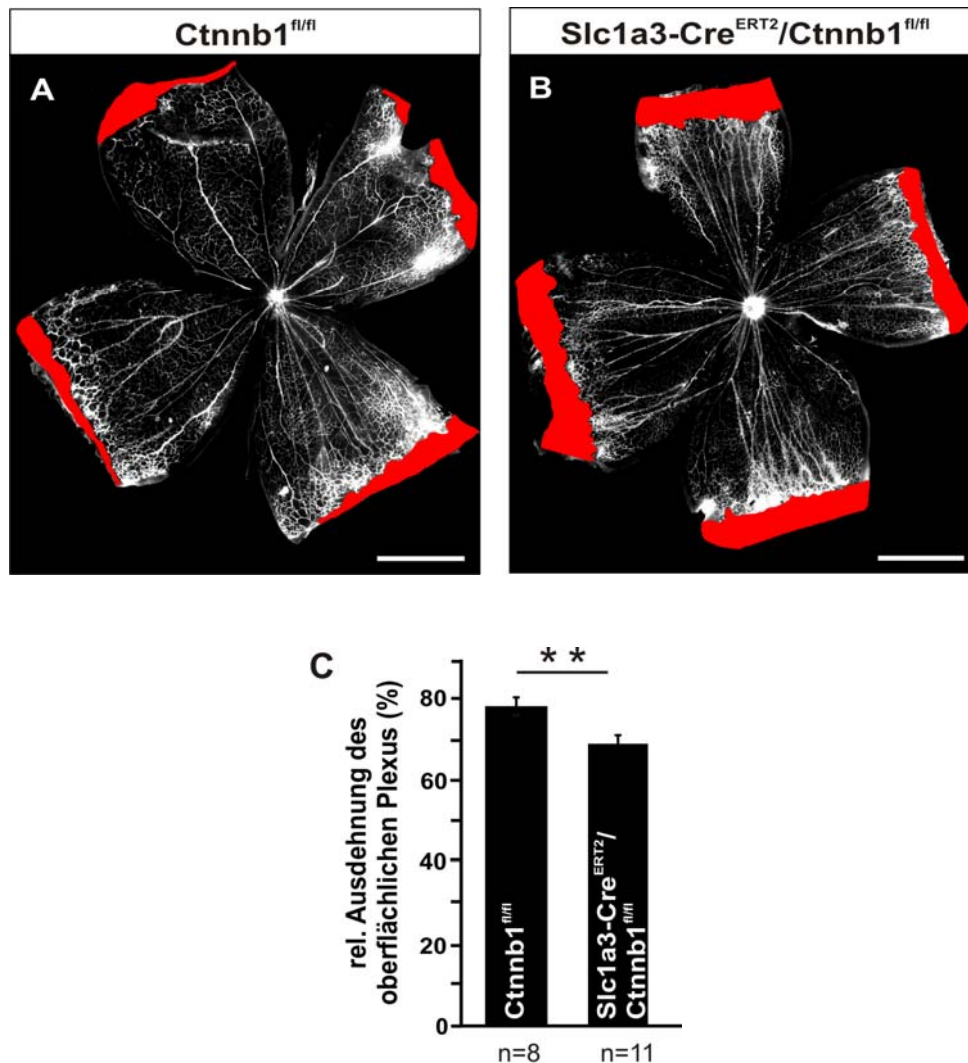
**Abb. 11: Deletion von  $\beta$ -Catenin in Müllerzellen verzögert die Regression der Hyaloidalgefäße**

A-B: Retinale Häutchenpräparate von mit FITC-Dextran perfundierten Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> (B) und Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> (A) Mäusen an P7 nach TX-Behandlung von P1-P5. Die roten Kreise stellen die zentrale und periphere Zone dar in der die Quantifizierung der Anzahl der Hyaloidalgefäße erfolgte. Maßstabsbalken: 500  $\mu$ m.

C: Die Quantifizierung, zeigt eine höhere Anzahl der Hyaloidalgefäße in den Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen im Vergleich zu den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrollen. D: Im altersprogressiven Verlauf zeigt die Quantifizierung, bei der die Mittelwerte aus der Anzahl der zentralen und peripheren Hyaloidalgefäße verwendet wurden, dass der Unterschied in der Anzahl der Hyaloidalgefäße zwischen den beiden Genotypen bis zu P21 komplett ausgeglichen wird. (Mittelwert  $\pm$  SEM, n>6 von je 3 Würfen; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01).

Basierend auf diesen Befunden wurde eine nähere Betrachtung der retinalen Gefäßentwicklung durchgeführt um eine mögliche Erklärung für die anfänglich verzögerte Regression der hyaloidalen Gefäße in Tieren mit einer Müllerzell-spezifischen Deletion von Ctnnb1 zu erhalten. Hierbei zeigte sich bei der mikroskopischen Analyse, dass die Kapillaren des oberflächlichen Plexus in Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen an P7 weniger weit an die Ora serrata heranreichten als dies in den Kontrollgeschwistertieren der Fall war (vgl. Abb. 12A, B). Die Quantifizierung ergab eine um  $8,87 \pm 1,89$  % hochsignifikant geringere Ausdehnung

des oberflächlichen Plexus in Relation zur Gesamtfläche der Retina in *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Tieren im Vergleich zu Kontrollgeschwistertieren (vgl. Abb. 12C).



**Abb. 12: Deletion von  $\beta$ -Catenin in Müllerzellen verzögert die Entwicklung des oberflächlichen Plexus**

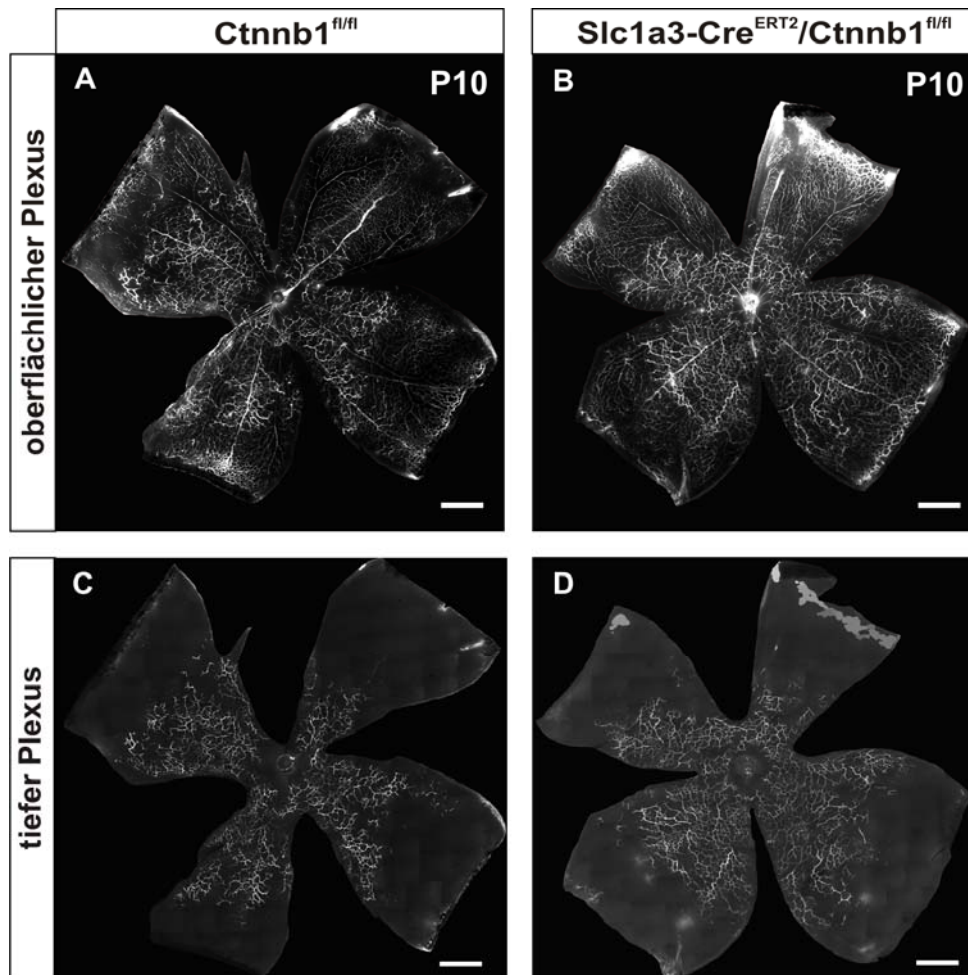
A-B: Retinale Häutchenpräparate von mit FITC-Dextran perfundierten *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* (B) und *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* (A) Mäusen an P7 nach Behandlung mit TX von P1-P5. In rot sind die noch nicht vaskularisierten Areale markiert. Zu sehen ist dabei, dass dieses Areal in *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* größer ist als in den *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Geschwistertieren. Maßstabsbalken: 500  $\mu$ m.

C: Für die Quantifizierung wurde die Fläche des oberflächlichen Plexus in Relation zur Gesamtfläche der Retina gesetzt und als relative Fläche des oberflächlichen Gefäßplexus angegeben. (Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 Würfen; \*\*  $p < 0,01$ ).

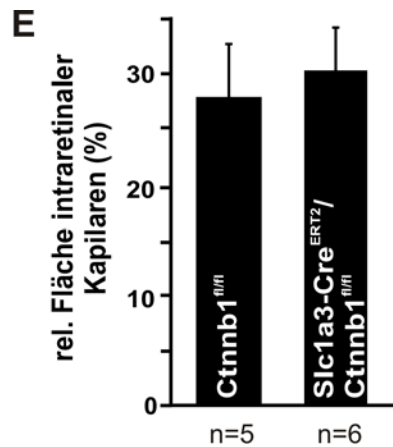
Als radiäre Gliazellen durchziehen Müllerzellen die einzelnen Schichten der Netzhaut und dienen dabei als Gerüst um aussprossende Gefäße des oberflächlichen Plexus in die Tiefe zu leiten. Wie in früheren Studien gezeigt werden konnte, weisen Mäuse mit einem Knockout für Proteine des kanonischen Wnt-Signalwegs wie *Norrin* und *Fzd4* keine intraretinalen Gefäße auf (Xu, Wang et al. 2004; Luhmann, Lin et al.

2005). Daher besteht die Hypothese, dass das Einwachsen der Gefäße in die Retina und damit auf die Ausbildung des tiefen und intermediären Plexus über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Müllerzellen vermittelt wird. Um dem nachzugehen wurden  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Tiere nach entsprechender Behandlung mit TX von P1 bis P5 an unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung der intraretinalen Gefäße (P10, P14 und P21) mit FITC-Dextran perfundiert und retinale Häutchenpräparate angefertigt.

Im Zuge dieser Untersuchungen wurde die Ausbildung der intraretinalen Gefäße zunächst an P10, also direkt während der Entwicklung des tiefen Gefäßplexus, analysiert (vgl. Abb. 13).







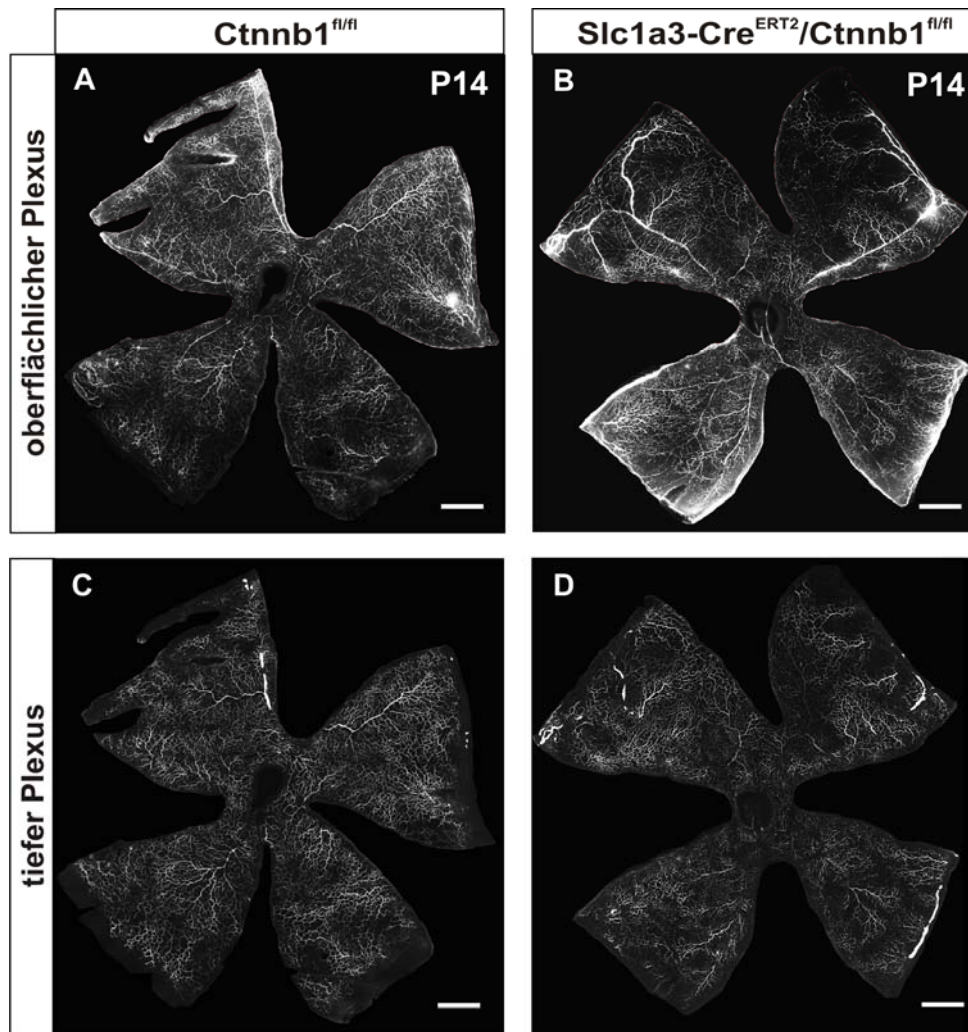
**Abb. 13: Deletion von  $\beta$ -Catenin in Müllerzellen von P1-P5 hat keinen Einfluss auf die Ausbildung intraretinaler Kapillaren an P10**

A-D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von retinalen Häutchenpräparaten von Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> und Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach TX-Behandlung von P1-P5. Zur Visualisierung der Gefäße wurden die Tiere an P10 mit FITC-Dextran perfundiert und Übersichtsaufnahmen vom oberflächlichen (A, B) und tiefen Plexus (C, D) angefertigt. Maßstabsbalken: 500 $\mu$ m.

E: Die quantitative Auswertung der Fläche der intraretinalen Kapillaren im prozentualen Vergleich zur Gesamtfläche der Retina zeigt, dass es zu keinerlei Unterschieden während der Entwicklung des tiefen Plexus in Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen im Vergleich zu den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrollgeschwistertieren kommt (Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 Würfen).

In der Netzhaut beider Genotypen zeigte sich zu diesem Zeitpunkt, gemäß der physiologischen Entwicklung, ein vollständig ausgebildeter oberflächlicher Plexus (A, B). Mittels des ApoTome Zusatzmoduls war es möglich den tiefen Plexus gesondert aufzunehmen (C, D). Hierbei konnten in den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren (C) bereits intraretinale Kapillaren beobachtet werden. In Tieren mit einer Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen (D) zeigte sich eine dazu ähnlich große Fläche. Offensichtliche morphologische Auffälligkeiten bezüglich der kapillären Struktur fanden sich bei keinem der beiden Genotypen. Die Quantifizierung (vgl. Abb. 13 E) bestätigte, dass in Tieren beider Vergleichsgruppen etwa 30 % der gesamten Netzhaut durch intraretinale Gefäße versorgt wurde.

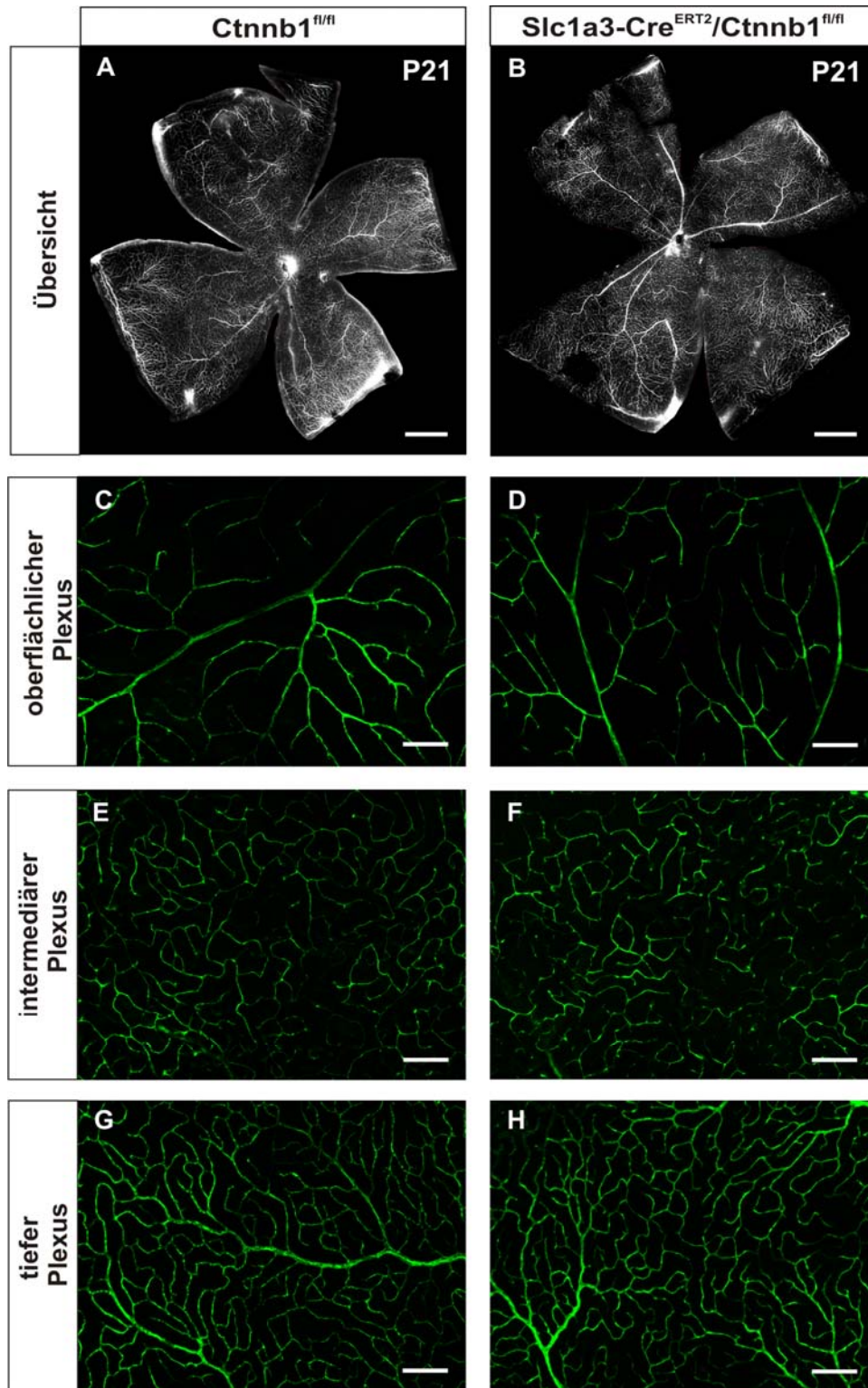
Da die Entwicklung des tiefen Plexus an P14 abgeschlossen sein sollte, wurden die Versuchstiere auch zu diesem Zeitpunkt analysiert (vgl. Abb. 14). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Retinae von Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> (B, D) und Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrollmäusen (A, C) zeigten neben dem physiologisch ausgebildeten oberflächlichen Plexus auch eine vollständige Vaskularisierung im Bereich des tiefen Plexus. Dabei konnten keine offensichtlichen pathologischen Auffälligkeiten in den Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen in Bezug auf die Morphologie der intraretinalen Kapillaren festgestellt werden.



**Abb. 14: Deletion von  $\beta$ -Catenin in Müllerzellen von P1-P5 hat keinen Einfluss auf die Ausbildung intraretinaler Kapillaren an P14**

A-D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von retinalen Häutchenpräparaten von *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* und *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen nach TX-Behandlung (P1-P5). Die Übersichtsaufnahmen (A, B) sowie die Darstellungen des tiefen Plexus (C, D) zeigen, dass in Retinae von Mäusen beider Genotypen der oberflächliche sowie tiefe Plexus jeweils vollständig und ohne morphologische Auffälligkeiten ausgebildet war. Maßstabsbalken: 500 $\mu$ m.

Die weiterführenden Analysen wurden an P21 durchgeführt, dem Zeitpunkt, an dem die Ausbildung aller drei retinalen Gefäßplexus unter physiologischen Bedingungen abgeschlossen sein sollte (vgl. Abb. 15). Wie bereits zu den vorangegangenen Zeitpunkten, war auch an P21 der oberflächliche Plexus unabhängig vom Genotyp der Tiere vollständig entwickelt. Die Analyse der intraretinalen Gefäße zeigte, dass *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* ebenso wie ihre Cre-negativen Geschwistertiere einen vollständigen tiefen wie auch intermediären Plexus aufweisen. Die Detailaufnahmen der einzelnen Gefäßplexus deuten ebenfalls daraufhin, dass es zu keinen morphologischen Veränderungen in der Struktur der Kapillaren kommt.



**Abb. 15: Untersuchung der retinalen Gefäßplexus von *Slc1a3-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> und *Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Mäusen an P21 nach TX-Behandlung von P1-P5**

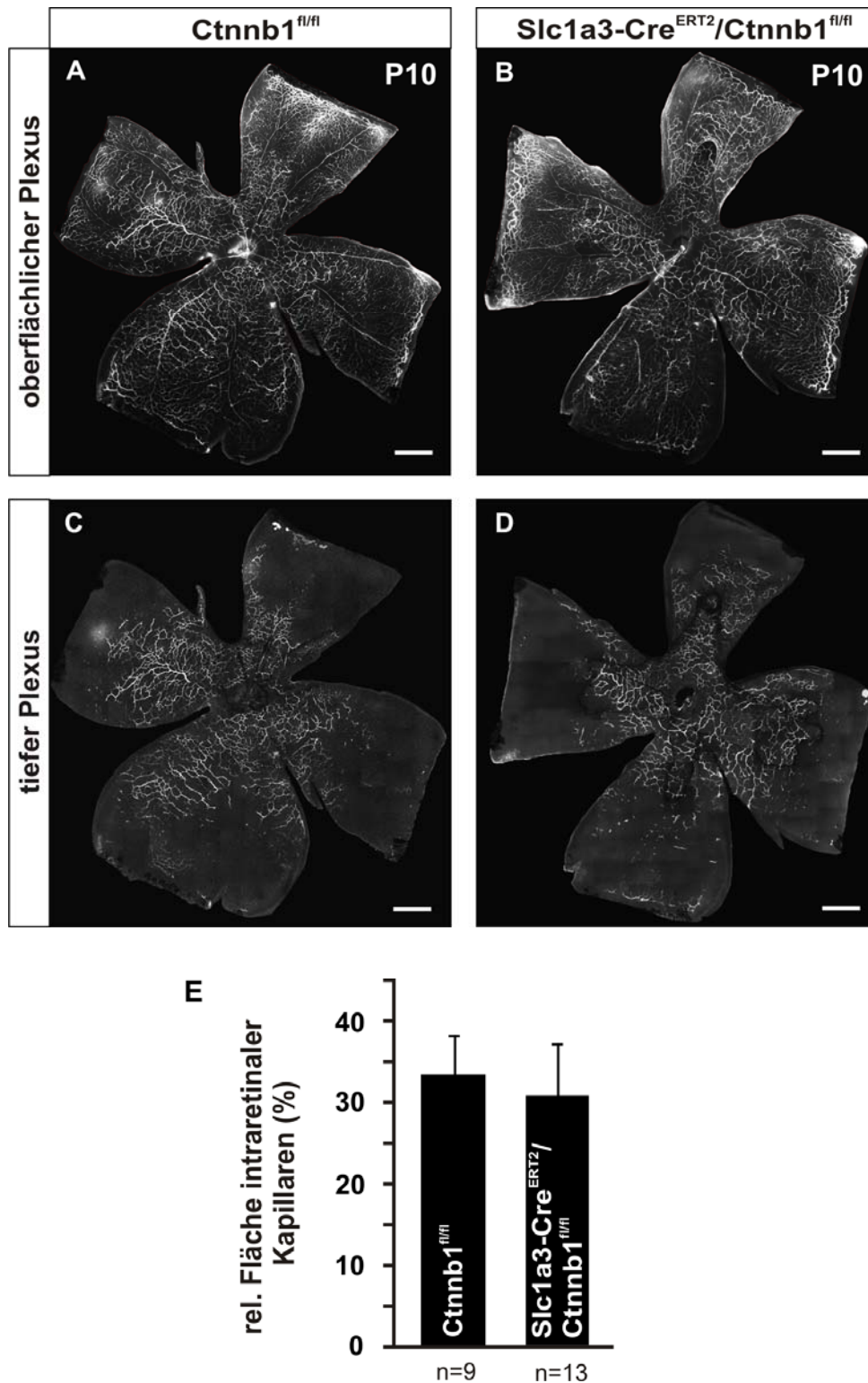
A-B: Übersichtsaufnahmen von retinalen Häutchenpräparaten mit durch FITC-Dextran-Perfusion visualisierten Gefäßen von *Slc1a3-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> (B) und *Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> (A) Mäusen an P21 nach TX-Behandlung von P1-P5. Hierbei konnte eine komplett vaskularisierte Retina in Mäusen beider Genotypen festgestellt werden. Maßstabsbalken: 500µm.

C-H: Detailaufnahmen des oberflächlichen (C-D), des intermediären (E-F) und des tiefen (G-H) Plexus zeigen keine morphologischen Unterschiede oder Auffälligkeiten in der Ausbildung der retinalen Kapillaren unabhängig vom Genotyp der Tiere. Maßstabsbalken 50µm.

Zusammenfassend ergibt sich aus den durchgeführten Untersuchungen, dass die Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen während der ersten Lebenswoche die physiologische Ausbildung der drei retinalen Gefäßplexus unter physiologischen Bedingungen nicht beeinflusst.

#### **4.1.4 Untersuchung des Gefäßphänotyps nach Induktion der $\beta$ -Catenin-Defizienz in Müllerzellen von P5-P8**

Obwohl bekannt ist, dass bereits unreife Müllerzellen als Leitstruktur während der retinalen Entwicklung dienen (Willbold, Berger et al. 1997), findet ihre Differenzierung erst in den ersten Tagen nach der Geburt statt (Young 1984; Reichenbach and Reichelt 1986). Um beide Differenzierungsstadien und deren Einfluss auf die intraretinale Gefäßentwicklung zu berücksichtigen, wurde die Applikation der TX-Augentropfen zusätzlich in einem späteren Zeitraum durchgeführt um möglichst viele reife Müllerzellen zu erreichen. Im Unterschied zum ersten Versuchsansatz wurden *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* und *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Geschwistertiere dabei von P5 bis P8, anstatt von P1 bis P5, mit TX behandelt. Auch wenn TX erst über die Dauer der Behandlung akkumuliert und sein Wirkspiegel mehrere Tage anhält um die Rekombination zu induzieren, wurde die Behandlung damit exakt auf den Zeitraum der Müllerzellendifferenzierung, die von P5 bis P8 stattfindet, verschoben. Um auch Verzögerungen in der Entwicklung des tiefen Plexus zu detektieren, wurden die Tiere an P10, also während der Entwicklung des tiefen Gefäßplexus, untersucht (vgl. Abb. 16). Im Vergleich der Übersichtsaufnahmen der retinalen Häutchenpräparate von *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* (B) und *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen (A) zeigte sich zunächst kein erkennbarer Unterschied. Der oberflächliche Gefäßplexus war in beiden Fällen regelrecht entwickelt. Mittels des ApoTome Zusatzmodul konnte zusätzlich nur der tiefe Plexus fluoreszenzmikroskopisch aufgenommen werden (C-D). Die mikroskopische Untersuchung sowie die quantitative Auswertung der Fläche der intraretinalen Gefäße im prozentualen Vergleich zur Gesamtfläche der Retina ergaben dabei keinen Unterschied im Vergleich von *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* und *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Geschwistertieren. In beiden Fällen war ca. 30 % der Retina bereits durch Gefäße des tiefen Plexus vaskularisiert (vgl. Abb. 16E).

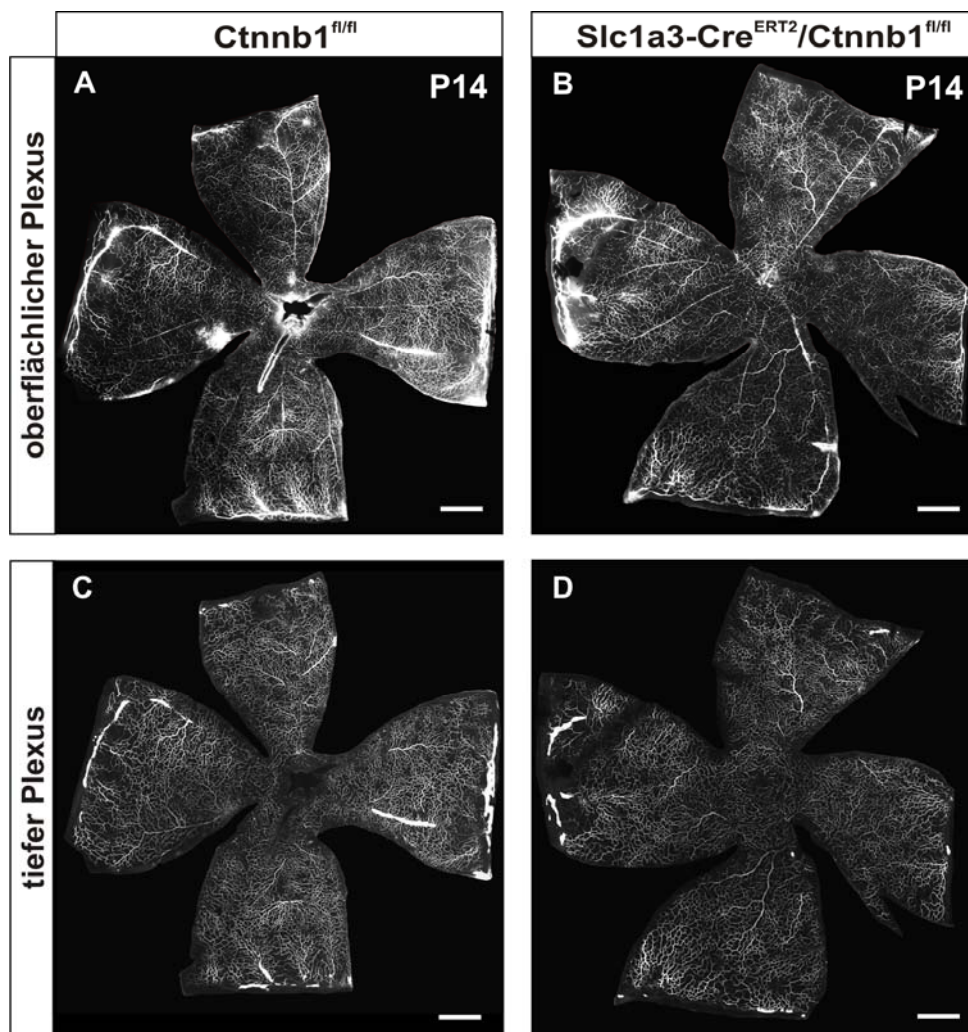


**Abb. 16: Deletion von  $\beta$ -Catenin in Müllerzellen von P5-P8 hat keinen Einfluss auf die Ausbildung intraretinaler Kapillaren an P10**

A-D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von retinalen Häutchenpräparaten von Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> und Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach TX-Behandlung (P5-P8). Zur Visualisierung der Gefäße wurden die Tiere an P10 mit FITC-Dextran perfundiert und Übersichtsaufnahmen (A, B) sowie Aufnahmen des tiefen Plexus angefertigt (C, D). Im Vergleich fanden sich keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Maßstabsbalken: 500 $\mu$ m.

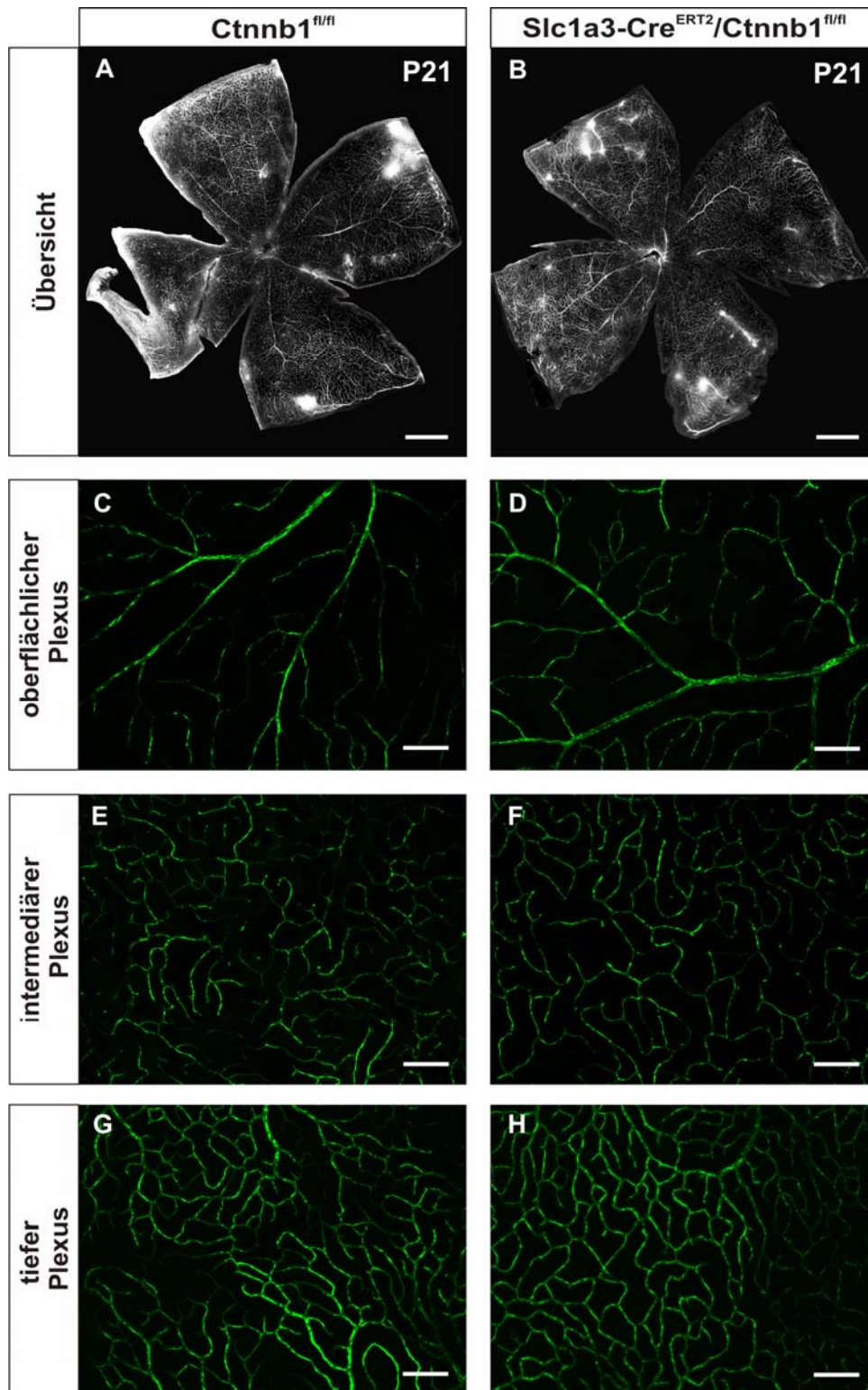
E: Die quantitative Auswertung der Fläche der intraretinalen Kapillaren im prozentualen Vergleich zur Gesamtfläche der Retina bestätigte die morphologische Beobachtung. (Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 Würfeln).

An P14 erfolgte ebenfalls eine entsprechende Analyse der Versuchstiere, da zu diesem Zeitpunkt die Entwicklung des tiefen Plexus abgeschlossen sein sollte (vgl. Abb. 17). Neben dem physiologisch ausgebildeten oberflächlichen Plexus zeigte sich in der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung von Retinae von *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* (B, D) und *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Kontrollmäusen (A, C) ein vollständig entwickelter tiefer Plexus. Offensichtliche pathologische Auffälligkeiten in Bezug auf die Morphologie der intraretinalen Kapillaren konnten dabei nicht festgestellt werden.



**Abb. 17: Deletion von  $\beta$ -Catenin in Müllerzellen von P5-P8 hat keinen Einfluss auf die Ausbildung intraretinaler Kapillaren an P14**

A-D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von retinalen Häutchenpräparaten von *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* und *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen nach TX-Behandlung (P5-P8). Zur Visualisierung der Gefäße wurden die Tiere an P14 mit FITC-Dextran perfundiert und retinale Häutchenpräparate angefertigt. Die Übersichtsaufnahmen beider Genotypen (A, B) zeigen einen physiologisch ausgebildeten oberflächlichen Plexus. Ebenso fand sich beim tiefen Plexus (C, D) kein offensichtlicher Unterschied zwischen *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* und *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen. Maßstabsbalken: 500 $\mu$ m.



**Abb. 18: Untersuchung der retinalen Gefäßplexus von *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* und *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen an P21 nach TX-Behandlung von P5-P8**

A-B: Übersichtsaufnahmen von retinalen Häutchenpräparaten mit durch FITC-Dextran-Perfusion visualisierten Gefäßen von *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* (B) und *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* (A) Mäusen an P21 nach TX-Behandlung von P5-P8. Beide Genotypen zeigen eine komplett vaskularisierte Retina. Maßstabsbalken 500 $\mu$ m.

C-H: Die Detailaufnahmen des oberflächlichen (C-D), des intermediären (E-F) und des tiefen (G-H) Plexus zeigen keine offensichtlichen morphologischen Auffälligkeiten in der Ausbildung der retinalen Kapillaren unabhängig vom Genotyp der Tiere. Maßstabsbalken: 50 $\mu$ m.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der retinalen Häutchenpräparate von Tieren nach FITC-Perfusion an P21 ergab, dass es in  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  wie in den  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrollgeschwistertieren zu einer physiologischen Ausbildung aller retinalen Gefäßplexus kommt (vgl. Abb. 18). In den Detailaufnahmen sind ebenfalls keine strukturellen Auffälligkeiten der Kapillaren zu erkennen.

Entsprechend der Ergebnisse die im vorangegangenen Abschnitt dargestellt wurden, deutet dies darauf hin, dass eine Müllerzell-spezifische Deletion von *Ctnnb1*, unabhängig von deren Differenzierungsstadium, keine Auswirkung auf die Ausbildung der intraretinalen Gefäße hat. Der klassische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Müllerzellen scheint demnach nicht an dem durch Norrin vermittelten Einwachsen der Gefäße beteiligt zu sein.

## 4.2 Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen im adulten Tier

Nachdem für die Deletion des  $\beta$ -Catenin-Gens in Müllerzellen während der Entwicklung kein Einfluss auf die Ausbildung der retinalen Gefäße nachgewiesen werden konnte, sollte in einem nächsten Schritt geklärt werden, ob ein Verlust dieses Signalproteins Auswirkungen auf den Erhalt des Gefäßsystems hat. Dafür wurden adulte  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  und die entsprechenden  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrolltiere im Alter von 6 Wochen mit TX behandelt. Nach weiteren zwei Wochen wurden die Tiere zur weiteren Analyse entsprechend präpariert.

### 4.2.1 Verifizierung der konditionellen $\beta$ -Catenin-Defizienz in Müllerzellen

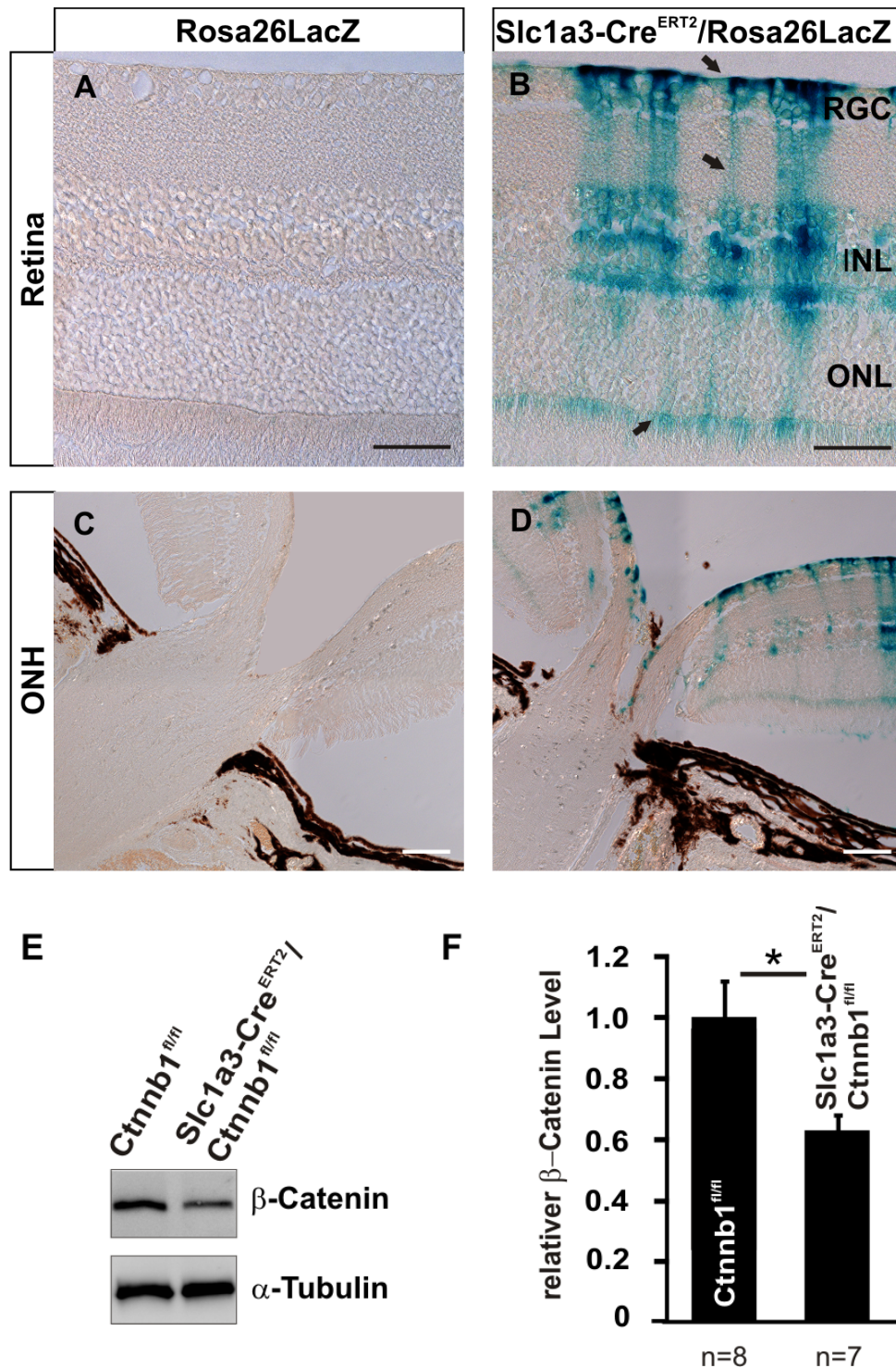
Zur Klärung der Frage, ob es in adulten  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  durch den Verlust des kanonischen Wnt-Signals in Müllerzellen zu Veränderungen der bestehenden retinalen Gefäßplexus kommt, wurden Mäuse im Alter von 6 Wochen mit TX behandelt. Nach weiteren zwei Wochen wurden die Tiere zur weiteren Analyse präpariert.

Im Vorfeld der Versuche sollte aber zunächst das von uns verwendete Tiermodell mit einer TX-induzierbaren Cre-Rekombinase auch im adulten Tier verifiziert werden.



Wie bereits unter Punkt 4.1.1 beschrieben, wurden dafür Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/ROSA26LacZ Mäuse verwendet um die Induktion der Cre-Rekombinase-Aktivität sowie deren zellspezifische Expression zu untersuchen. Zur Induktion des konditionellen Knockouts in adulten Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen erhielten die Tiere, nach einem bereits etablierten Protokoll, an fünf aufeinander folgenden Tagen zweimal täglich eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von 50µl TX (20mg/ml gelöst in *Corn Oil*) (Leone, Genoud et al. 2003; Mori, Tanaka et al. 2006). Zwei Wochen im Anschluss an die Behandlung wurden den Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/ROSA26LacZ Mäusen sowie den Cre-negativen ROSA26LacZ Kontrolltieren die Augen entnommen, mittels X-Gal histochemisch gefärbt und anschließend in Paraffin eingebettet. Die lichtmikroskopische Auswertung der sagittalen Gewebeschnitte (vgl. Abb. 19) zeigte eine deutliche Blaufärbung in Retinae der Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/ROSA26LacZ Tiere (B, D) im Vergleich zu den ROSA26LacZ Kontrollen (A, C) bei denen keinerlei Färbung sichtbar war. In der für Müllerzellen charakteristischen Weise konnte die Blaufärbung in Zellkernen der INL und in deren Fortsätzen, die radiär durch die einzelnen Schichten der Retina ziehen und in der *Membrana limitans externa* und *interna* enden, lokalisiert werden. Wie bereits bei den Jungtieren gezeigt, war auch bei den adulten Tieren keine Färbung im Bereich des *N. opticus* zu erkennen, so dass eine Aktivität des Slc1a3-Promotors in anderen Gliazellen, wie den Astrozyten, als unwahrscheinlich erachtet werden kann.

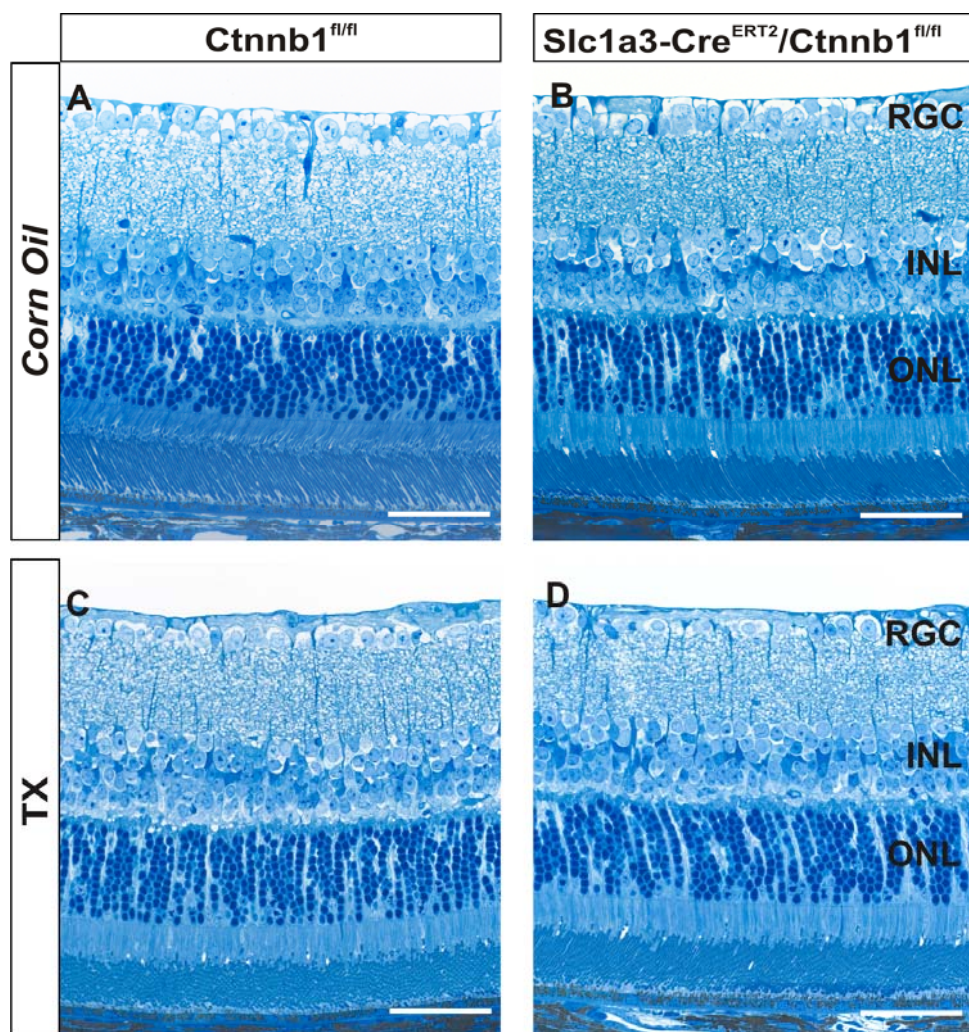
Um die Reduktion der  $\beta$ -Catenin-Level durch die Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurde das Gesamtprotein aus Retinae von adulten Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> und Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach TX-Behandlung isoliert und mittels Western Blot analysiert (vgl. 3.3.3.5). In Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen war ein spezifisches Signal für  $\beta$ -Catenin zu detektieren, welches in Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen deutlich schwächer war (Abb. 19E). Die densitometrische Auswertung (F) ergab in adulten Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen mit  $0,62 \pm 0,06$  eine um etwa 40 % signifikante Reduktion der  $\beta$ -Catenin-Level im Vergleich zu den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrollen. Damit konnte in den adulten Tieren eine vergleichbare Reduktion von  $\beta$ -Catenin auf Proteinebene detektiert werden, wie bereits in den Jungtieren (vgl. 4.1.1).



**Abb. 19: Verifizierung der TX-induzierbaren Cre-Rekombinase in adulten *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>*-Tieren**  
 A-D: X-Gal-Färbung von sagittalen Paraffinschnitten der Augen von 8 Wochen alten *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>*-positiven *Rosa26LacZ*-Mäusen (B,D) im Vergleich zu den *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>*-negativen Kontrolltieren (A,C) nach intraperitonealer TX-Behandlung (im Alter von 6 Wochen). Zu sehen ist eine spezifische Blaufärbung in den Zellkernen der Müllerzellen im Bereich der INL, sowie in deren Fortsätzen die in der *Membrana limitans externa* und *interna* (Pfeile) enden. Im Bereich des Sehnervenkopfes (C,D) ist keine Färbung erkennbar. ONH: Sehnervenkopf; RGC: retinale Ganglienzellschicht; INL: innere Körnerschicht; ONL: äußere Körnerschicht. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.  
 E, F: Western Blot Analyse (E) und densitometrische Auswertung (F) der Menge an  $\beta$ -Catenin in retinalem Gesamtprotein von Mäusen der *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>*-Linie im Alter von 8 Wochen nach TX-Behandlung (im Alter von 6 Wochen) im Vergleich zur Ladekontrolle  $\alpha$ -Tubulin (Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 Würfen; \* p < 0,05).

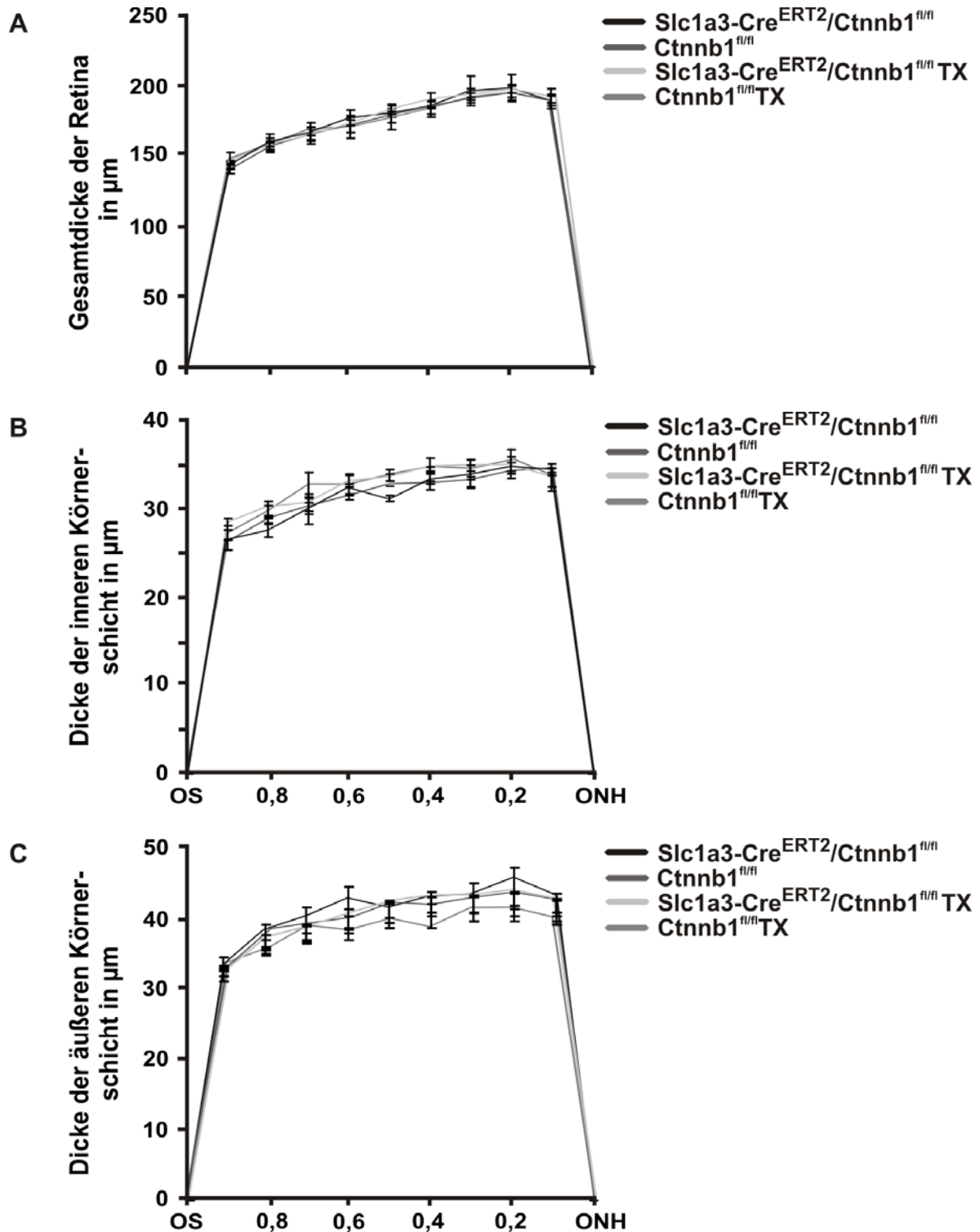
#### 4.2.2 Untersuchung des Einflusses des Tamoxifen-induzierbaren Cre-Systems auf die Retina

Das von uns verwendete Tiermodell könnte, basierend auf der Präsenz des körperfremden Proteins Cre-Rekombinase und toxischer Nebenwirkungen durch die Behandlung mit TX, pathologische Veränderungen in der Netzhaut aufweisen. Um dies zu untersuchen wurden, wie bereits schon in den Jungtieren (vgl. 4.1.2), histologische und immunhistochemische Analysen durchgeführt.



**Abb. 20: Morphologische Analyse adulter Retinae von  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  und  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen mittels Lichtmikroskopie nach Behandlung mit TX (i.p.) im Alter von 6 Wochen**

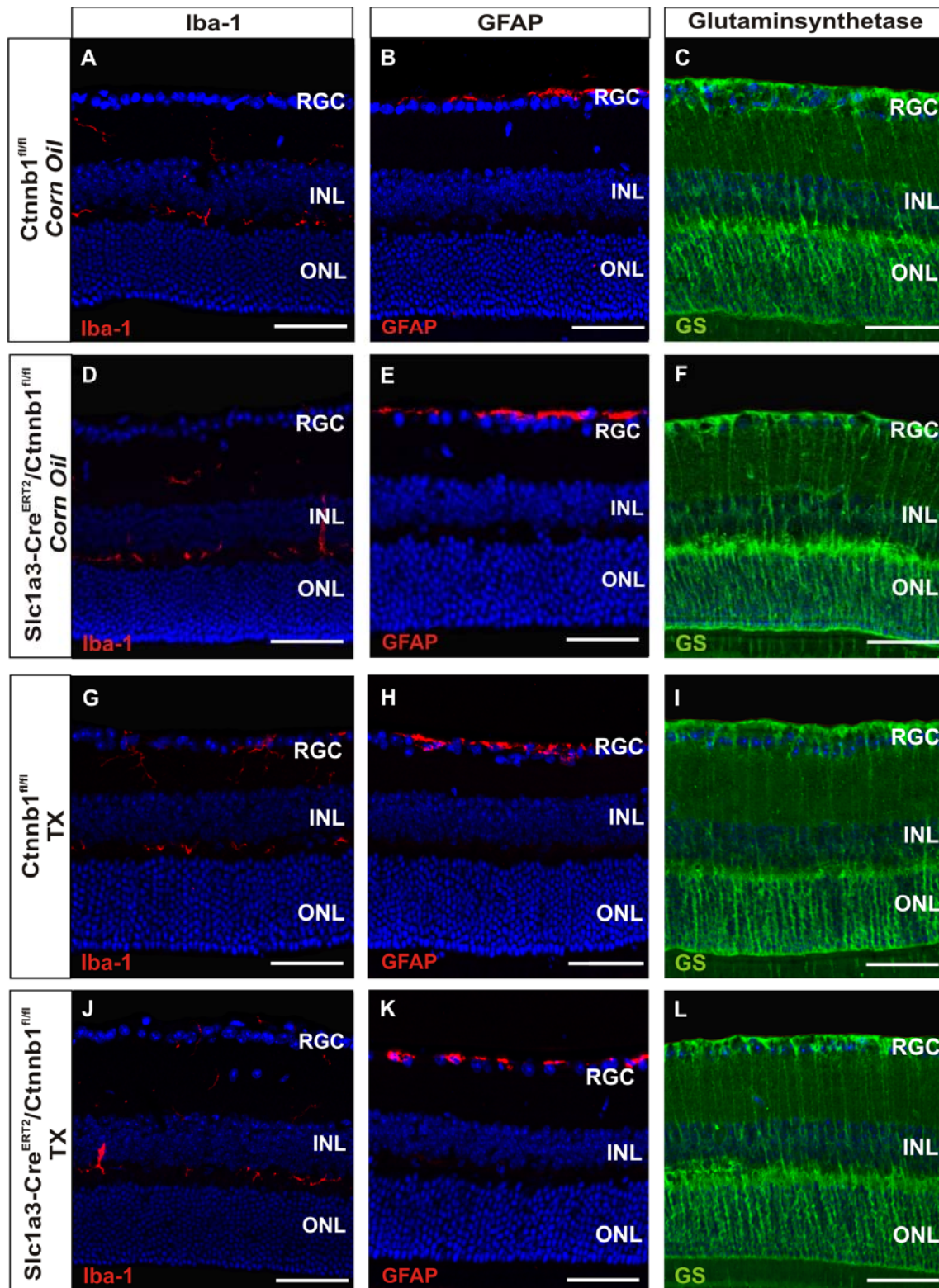
A-D: Lichtmikroskopische Aufnahmen von sagittalen Semidünnschnitten nach Richardson-Blaufärbung der Retinae von  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  (B,D) und  $Ctnnb1^{fl/fl}$  (A,C) Mäusen im Alter von 8 Wochen nach Behandlung mit TX (C,D) bzw. der Trägersubstanz *Corn Oil* (A,B). Im Vergleich zeigt sich eine unauffällige Morphologie der Retina unabhängig von Behandlung und Genotyp der Tiere. RGC: retinale Ganglienzellschicht; INL: innere Körnerschicht; ONL: äußere Körnerschicht. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.



**Abb. 21: Cre-Expression, TX-Behandlung und Deletion von  $\beta$ -Catenin führen zu keinen Veränderungen in der Gesamtdicke der Retina, sowie der INL und ONL**

A-C: Quantitative Auswertung der gesamten Netzhautdicke (A), der Dicke der inneren Körnerschicht (INL; B) und der äußeren Körnerschicht (ONL; C) an sagittalen Semidünnschnitten von Mäusen im Alter von 8 Wochen nach entsprechender Behandlung mit TX bzw. *Corn Oil*. Hierfür wurden beide Zirkumferenzen der Retina, jeweils ausgehend vom Sehnervenkopf (ONH) bis zur *Ora serrata* (OS) in zehn gleiche Abschnitte eingeteilt um die Messpunkte zu definieren. Dargestellt ist der Mittelwert von der Dicke des entsprechenden Abschnittes beider Zirkumferenzen einer Retina (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n > 4$ )

Hierfür erhielten  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  und  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäuse im Alter von 6 Wochen gemäß Protokoll zweimal täglich eine Injektion (i.p.) von TX oder der Trägersubstanz *Corn Oil*. Zwei Wochen nach Ende der Behandlung wurden den Tieren die Augen entnommen und histologisch aufgearbeitet. Um zunächst die Morphologie der Retina zu bewerten wurden sagittale Semidünnschnitte der Augen angefertigt (vgl. 3.4.1.3) und für die lichtmikroskopische Auswertung mit Richardson-Blau gefärbt (vgl. 3.4.2.3). Unabhängig von Genotyp und Behandlung zeigte sich in der Retina von allen Tieren eine unauffällige Morphologie und eine vergleichbare Dicke der einzelnen Netzhautschichten (vgl. Abb. 20). Um diesen morphologischen Eindruck zu quantifizieren, wurden die Dicke der gesamten Retina sowie der INL und ONL vermessen. Die sagittalen Semidünnschnitte der Retina wurden hierzu ausgehend von der *Ora serrata* (OS) bis hin zum Sehnervenkopf (ONH) in zehn gleiche Abschnitte geteilt um die Messpunkte festzulegen. Die Mittelwerte der Messungen der einzelnen Retinae sind in Abb. 21 dargestellt. Im Vergleich aller Versuchsgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Dicke aller vermessenen Schichten (gesamte Retina, INL, ONL), so dass davon ausgegangen werden kann, dass weder die Behandlung mit TX noch die Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen zu einer offensichtlichen morphologischen Pathologie der Netzhaut führt. Um mögliche beginnende pathologische Veränderungen in der Netzhaut der Tiere zu detektieren wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Analysiert wurden hierbei die Proteine Iba-1, GFAP und Glutaminsynthetase (vgl. Abb. 22). Augen von  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  und  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen wurden dafür nach entsprechender Behandlung mit TX, im Alter von 8 Wochen entnommen und in Paraffin eingebettet. An sagittalen Retinaschnitten wurde zunächst eine Färbung auf den Mikroglia marker Iba-1 durchgeführt um immunologische Reaktionen zu detektieren. Im Vergleich zwischen den  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen und den  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrollen wurde dabei kein Unterschied beobachtet. Weder die Präsenz der Cre-Rekombinase alleine oder deren Aktivität induzierten eine Reaktion des Immunsystems. Ebenso wenig geschah dies durch alleinige Behandlung mit TX. In allen Genotypen war eine gleichmäßige Verteilung der Mikroglia in der inneren und äußeren plexiformen Schicht sowie der RGC-Schicht zu detektieren.



**Abb. 22: Deletion von  $\beta$ -Catenin in Müllerzellen sowie TX-Behandlung im adulten Tier haben keine immunologische Reaktion und Gliosereaktion zur Folge**

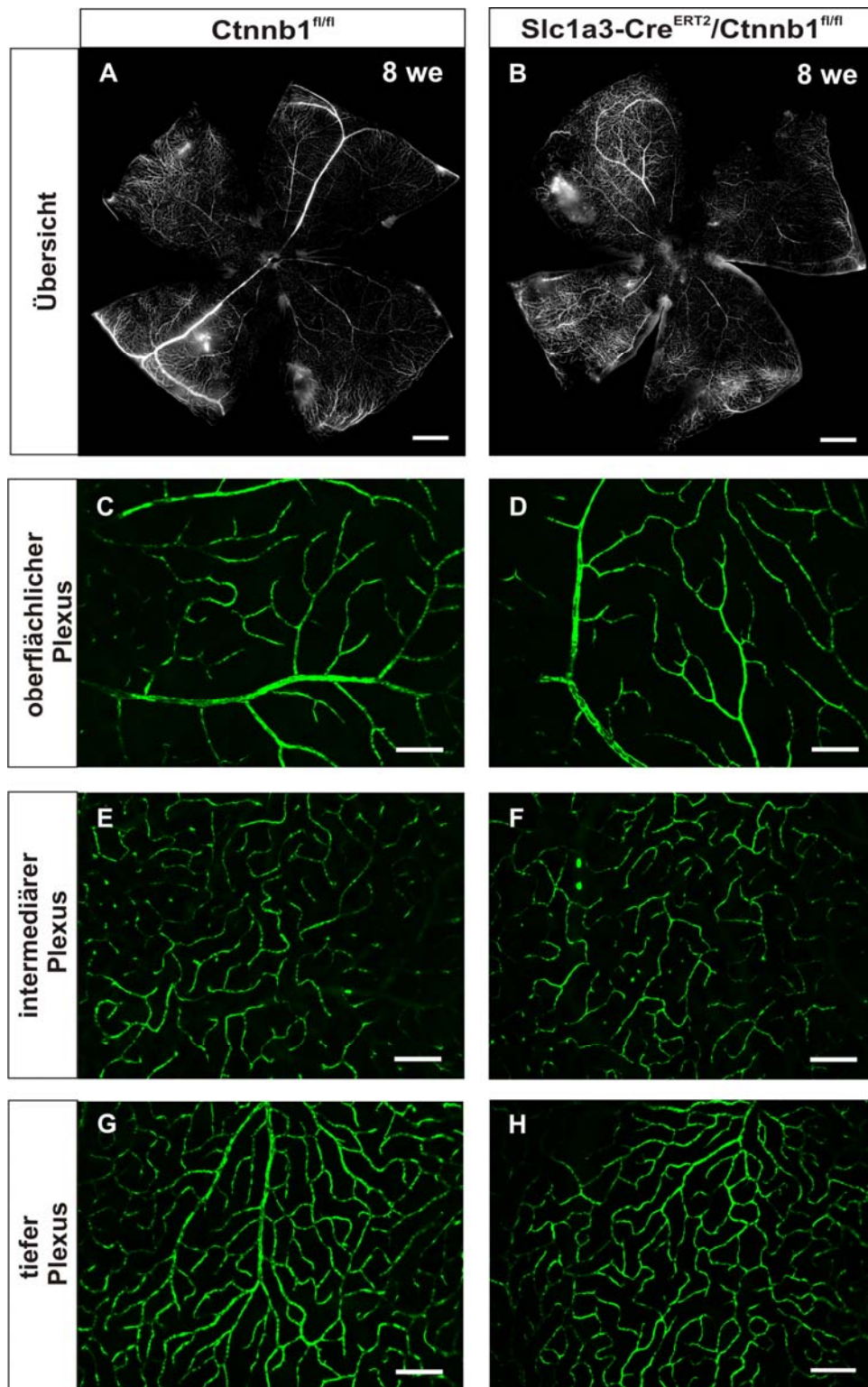
A-L: Immunhistochemische Färbung von Iba-1 (A, D, G, J; rot), GFAP (B, E, H, K; rot) und Glutaminsynthetase (C, F, I, L; grün) an sagittalen Paraffinschnitten von Augen von *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* und *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen im Alter von 8 Wochen nach Behandlung mit TX (G-L) bzw. der Trägersubstanz *Corn Oil* (A-F) im Alter von 6 Wochen. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI (blau). Unabhängig von Genotyp und Behandlung zeigten sich bei keiner der durchgeführten Färbungen erkennbare Unterschiede. RGC: retinale Ganglienzellschicht; INL: innere Körnerschicht; ONL: äußere Körnerschicht. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

Zusätzlich wurde mittels GFAP-Färbung überprüft, ob es durch die Expression der Cre-Rekombinase oder durch den Verlust von  $\beta$ -Catenin zu gliotischen Veränderungen der Müllerzellen kommt. In allen Retinae, unabhängig von Genotyp und Behandlung der Tiere, fand sich eine intensive Färbung ausschließlich in der RGC-Schicht. Innerhalb der übrigen retinalen Schichten war hingegen keinerlei Signal zu erkennen, so dass eine gliotische Reaktion von Müllerzellen durch die Deletion von *Ctnnb1* oder durch die Behandlung mit TX als unwahrscheinlich erachtet werden kann. Um die strukturelle Erscheinung sowie die Anzahl der Müllerzellen zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen mit dem Müllerzellmarker Glutaminsynthetase (GS) durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine charakteristische radiäre Färbung der Retinae, die sich zwischen der *Membrana limitans externa* und *interna* erstreckte. Im Vergleich der beiden Genotypen und deren Behandlung mit bzw. ohne TX konnten weder bezüglich der Lokalisation noch der Intensität der GS-Expression Unterschiede beobachtet werden. In Folge dessen konnte ausgeschlossen werden, dass es durch die Präsenz der inaktiven Cre-Rekombinase, dem Verlust des kanonischen Wnt-Signals in Müllerzellen oder durch TX bedingte toxische Effekte zu einem Verlust von Müllerzellen in der Retina von adulten Tieren kommt.

Zusammenfassend kann, basierend auf diesen Ergebnissen, davon ausgegangen werden, dass der Verlust des  $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen und die Behandlung mit TX im Untersuchungszeitraum von bis zu 8 Wochen keinen negativen Einfluss auf die adulte Netzhaut ausüben.

### **4.2.3 Auswirkungen der $\beta$ -Catenin Defizienz in Müllerzellen auf das ausgebildete retinale Gefäßsystem im adulten Tier**

Nachdem es während der Entwicklung in *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen morphologisch zu keinen offensichtlichen pathologischen Gefäßveränderungen kam, sollte untersucht werden, ob eine  $\beta$ -Catenin Defizienz in Müllerzellen adulter Tiere Auswirkungen auf die Stabilität der Gefäße hat. Nach Induktion des konditionellen Knockouts durch TX (vgl. 3.2.2) wurden Tiere im Alter von 8 Wochen mit FITC-Dextran perfundiert und retinale Häutchenpräparate angefertigt.



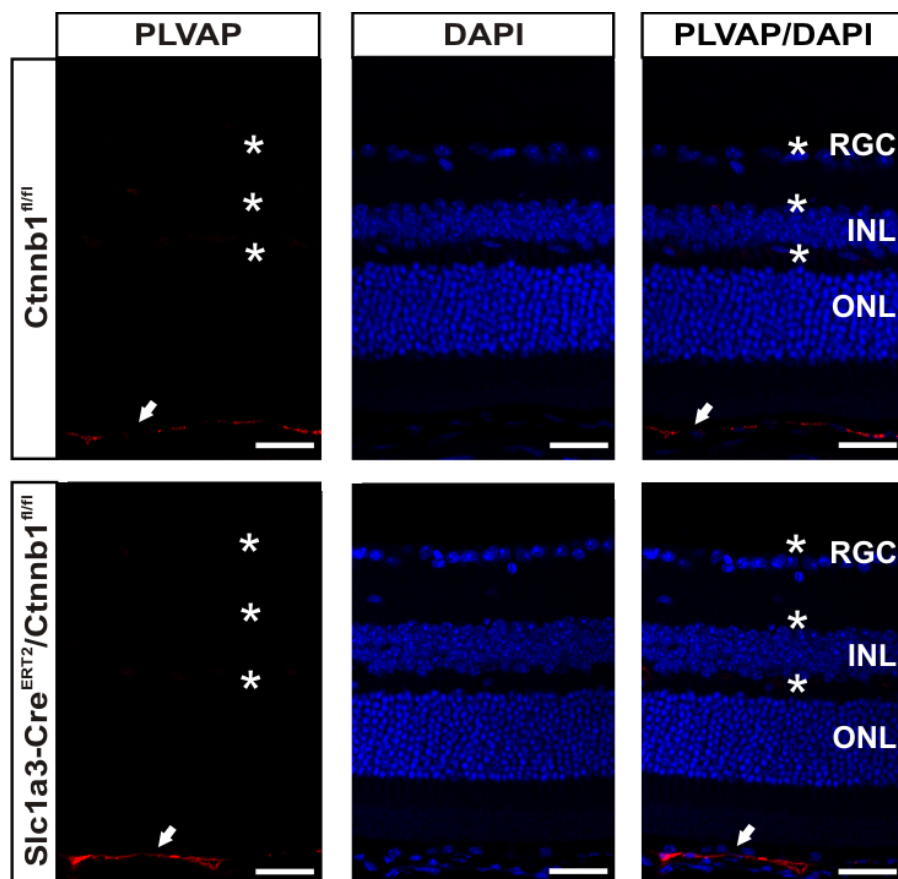
**Abb. 23: Untersuchung der retinalen Gefäßplexus in adulten *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* und *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Tieren**

A-B: Übersichtsaufnahmen von retinalen Häutchenpräparaten mit durch FITC-Dextran-Perfusion visualisierten Gefäßen von *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* (B) und *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* (A) Mäusen im Alter von 8 Wochen nach TX-Behandlung im Alter von 6 Wochen. Maßstabsbalken 500µm.

C-H: Detailaufnahmen des oberflächlichen (C-D), des intermediären (E-F) und des tiefen (G-H) Plexus zeigen keine morphologischen Auffälligkeiten in der Ausbildung der retinalen Kapillaren unabhängig vom Genotyp der Tiere. Maßstabsbalken: 50µm.



Bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung zeigte sich in *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen genauso wie in den *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Kontrollen eine vollständig vaskularisierte Netzhaut (vgl. Abb. 23 A, B). In Detailaufnahmen der einzelnen Gefäßplexus, die mit Hilfe des ApoTome Zusatzmoduls angefertigt wurden, konnten ebenfalls keine Auffälligkeiten in der Struktur der Kapillaren festgestellt werden. Wie in Abb. 23 zu sehen, waren in Retinae der Tiere mit einer Deletion von *Ctnnb1* wie auch in den *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>*-negativen Kontrolltieren, neben dem oberflächlichen (C, D) auch der intermediäre (E, F) und der tiefe Plexus (G, H) physiologisch ausgebildet und zeigten keine auffälligen pathologischen Veränderungen.



**Abb. 24: Deletion von  $\beta$ -Catenin sowie die TX-Behandlung haben keinen Verlust der inneren BRB in adulten Tieren zur Folge**

Immunhistochemische Färbung von PLVAP (rot) an sagittalen Paraffinschnitten von Augen von *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* und *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen im Alter von 8 Wochen nach Behandlung mit TX im Alter von 6 Wochen. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI (blau). Unabhängig vom Genotyp zeigte sich im Bereich der retinalen Gefäßplexus (\*) keine Färbung. Ein deutliches Signal war nur in den fenestrierten Kapillaren der *Choriocapillaris* zu erkennen (Pfeil). RGC: retinale Ganglienzellschicht; INL: innere Körnerschicht; ONL: äußere Körnerschicht. Maßstabsbalken: 25  $\mu$ m.

Da bekannt ist, dass die Gliazellen innerhalb der Retina auch für die Etablierung und Aufrechterhaltung der inneren BRB verantwortlich sind (Igarashi, Chiba et al. 2000;

Eichler, Yafai et al. 2004), sollte überprüft werden ob der kanonische Wnt-Signalweg in diesen Prozess involviert ist. Um die Dichtigkeit der BRB zu untersuchen wurde an sagittalen Retinaschnitten eine Färbung auf PLVAP durchgeführt, ein Marker für fenestriertes Endothel. Im Vergleich zwischen den *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen und den *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Kontrollen wurde kein Unterschied beobachtet. In beiden Tieren war nur eine intensive Färbung der *Choriocapillaris* zu detektieren, deren Endothel zur Versorgung des RPE und der Außensegmente der Photorezeptoren fenestriert ist (vgl. Abb. 24).

Zusammenfassend kann, zumindest für den relativ kurzen Beobachtungszeitraum, davon ausgegangen werden, dass der kanonische Wnt-Signalweg in Müllerzellen demnach keinen Einfluss auf die Stabilität des bereits ausgebildeten retinalen Gefäßsystems zu haben scheint.

### **4.3 Einfluss der $\beta$ -Catenin-Defizienz in Müllerzellen auf die Revaskularisierung nach Induktion einer Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR)**

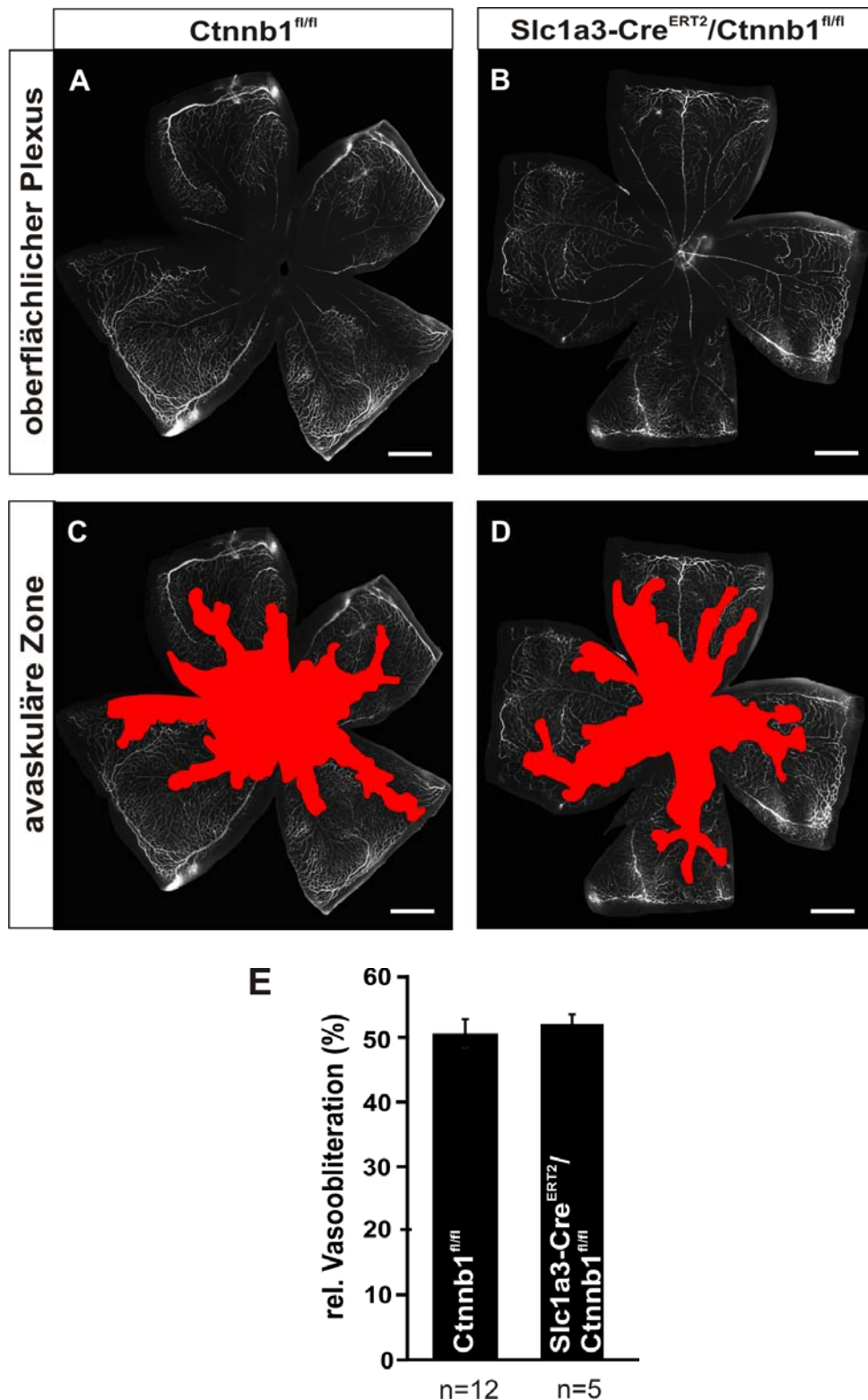
Wie in den vorangegangenen Abschnitten dargestellt, hatte die Deletion von *Ctnnb1* und damit die Inhibierung des kanonischen Wnt-Signalwegs speziell in Müllerzellen, nur geringe Auswirkungen auf die physiologische Entwicklung der retinalen Gefäße. Ebenso konnte in adulten Tieren keine Beteiligung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs an der Aufrechterhaltung des Gefäßsystems festgestellt werden.

Dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg neben der physiologischen Gefäßentwicklung in der Netzhaut aber auch unter pathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle spielt, konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden. So wurde beobachtet, dass es in  $\beta$ B1-Norrin Mäusen, die eine ektope linsenspezifische Überexpression von Norrin aufweisen, nach OIR zu einer geringeren Vasoobliteration im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen kommt. Zusätzlich führt die Überexpression von Norrin zu einer verbesserten Revaskularisierung der avaskulären Netzhautareale nach OIR und vermindert hierdurch auch die Bildung von Neovaskularisationen (Ohlmann, Seitz et al. 2010).

Auf Grund dieser Befunde sollte im Weiteren die Frage geklärt werden, welche Rolle der kanonische Wnt-Signalweg, speziell in Müllerzellen, bei der Vermittlung dieser proangiogenen Effekte spielt. Im Detail sollten hierbei die Auswirkungen der  $\beta$ -

Catenin-Deletion auf die Revaskularisierung von vasoobliterierten Netzhautarealen nach hyperoxischem Schaden unter Verwendung des Mausmodells der OIR untersucht werden. Tiere der  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mauslinie wurden gemäß Protokoll (vgl. 3.2.3.1) ab P7 für 5 Tage unter 75 %-iger Sauerstoffatmosphäre gehalten, wodurch das Gefäßwachstum gestoppt wird und bereits angelegte Gefäße des oberflächlichen Plexus in der zentralen Retina zugrunde gehen. An P12 kehren die Tiere wieder zurück an die Raumluft. Auf Grund des dort vorherrschenden Sauerstoffgehalts von 21% entsteht damit in der Netzhaut eine relative Hypoxie. In Folge dessen wird die Aktivierung von vaskulären Reparaturmechanismen induziert, wobei neue Kapillaren von, in der peripheren Netzhaut verbliebenen, Gefäßen in das avaskuläre Areale aussprossen. Neben dem anatomisch korrekten Wachstum können die Gefäße während diesem Prozess aber auch das Netzhautniveau verlassen, in den Glaskörper einwachsen und dort sogenannte präretinale Neovaskularisationen ausbilden. (Scott and Fruttiger 2009).

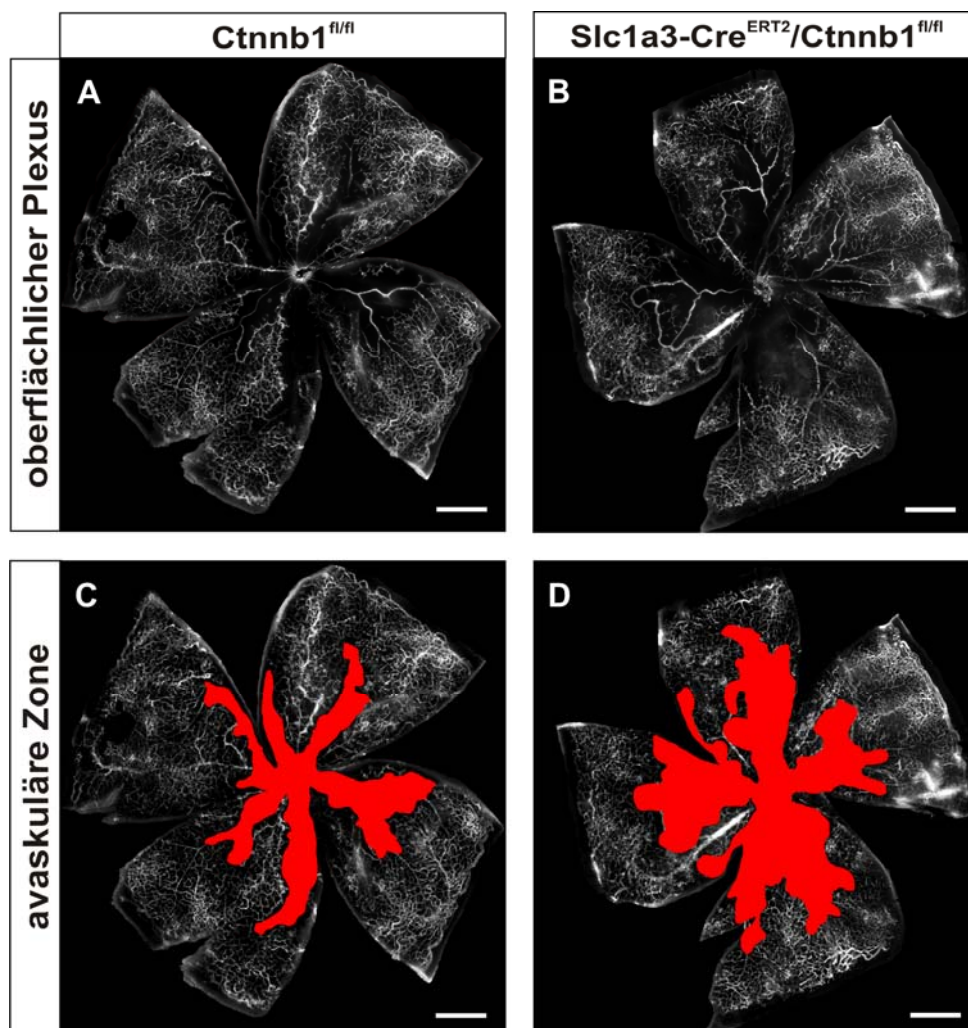
Um zunächst die Induktion einer avaskulären Zone durch OIR zu kontrollieren, erfolgte die Analyse des retinalen Gefäßsystems direkt im Anschluss an die Hyperoxie an P12. Die späteren Untersuchungen der Revaskularisierungsprozesse nach Induktion des konditionellen Knockouts wurden an P17 durchgeführt. Zur Darstellung der retinalen Gefäße wurden die Mäuse mit FITC-Dextran perfundiert. Nach Beendigung der Sauerstoffbehandlung zeigte sich an P12 eine deutliche vasoobliterierte Zone in der zentralen Netzhaut (vgl. Abb. 25). Die histologische Beurteilung erbrachte hierbei keinen Hinweis auf offensichtliche Größenunterschiede zwischen den beiden Genotypen. Die Quantifizierung bestätigte, dass zwischen  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  und  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen die Fläche der vasoobliterierten Zone, mit jeweils ca. 50 % der Gesamtfläche der Retina, annähernd gleich groß war (vgl. Abb. 25 E). Eine erfolgreiche Induktion der OIR konnte damit bestätigt werden. Gleichzeitig konnte ausgeschlossen werden, dass der unterschiedliche Genotyp der Geschwistertiere (mit und ohne Expression der Cre-Rekombinase) einen Einfluss auf die Größe des avaskulären Areals hat.

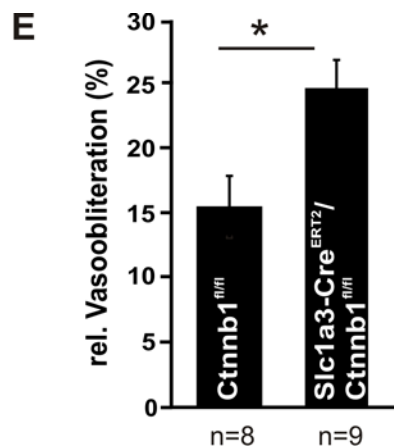


**Abb. 25: Rel. Vasoobliteration in Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> und Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>Tieren nach OIR an P12**  
 A-D: Retinale Häutchenpräparate von Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> und Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen an P12 nach OIR. Zur Darstellung der Gefäße wurden die Tiere mit FITC-Dextran perfundiert. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zeigte sich eine ausgeprägte vasoobliterierte Zone in der zentralen Retina, wobei zwischen den Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> (B) und Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> (A) Mäusen kein Unterschied in deren Größe erkennbar war. Zur deutlicheren Darstellung wurde das vasoobliterierte Areal farblich (rot) markiert (C, D). Maßstabsbalken: 500µm.  
 E: Zur Quantifizierung der Vasoobliteration wurde deren Fläche ermittelt und in Relation zur Gesamtfläche der Retina dargestellt. (Mittelwert ± SEM von 3 Würfen).

Um zu klären welchen Einfluss nun die Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen auf die retinale Vaskularisierung unter pathologischen Bedingungen hat, wurden retinale Häutchenpräparate der Tiere an P17 nach OIR und TX-Behandlung von P12 bis P15 analysiert. Für die Quantifizierung der vaskulären Schädigung wurde die Fläche des vasoobliterierten Areal (vgl. Abb. 26) und die Fläche der intraretinalen Kapillaren gemessen (vgl. Abb. 27) und in Bezug auf die Gesamtfläche der Retina ermittelt. Die Fläche der neovaskulären Tufts wurde in Bezug auf  $1000 \mu\text{m}^2$  Retina bestimmt (vgl. Abb. 28).

An P17 zeigte sich in Retinae beider Vergleichsgruppen eine zentrale vasoobliterierte Zone. Bereits bei der mikroskopischen Untersuchung fiel auf, dass das vasoobliterierte Areal in *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen größer war als in den *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Geschwistertieren. Zur deutlicheren Darstellung wurde dieses Areal farblich markiert (vgl. Abb. 26 C, D).





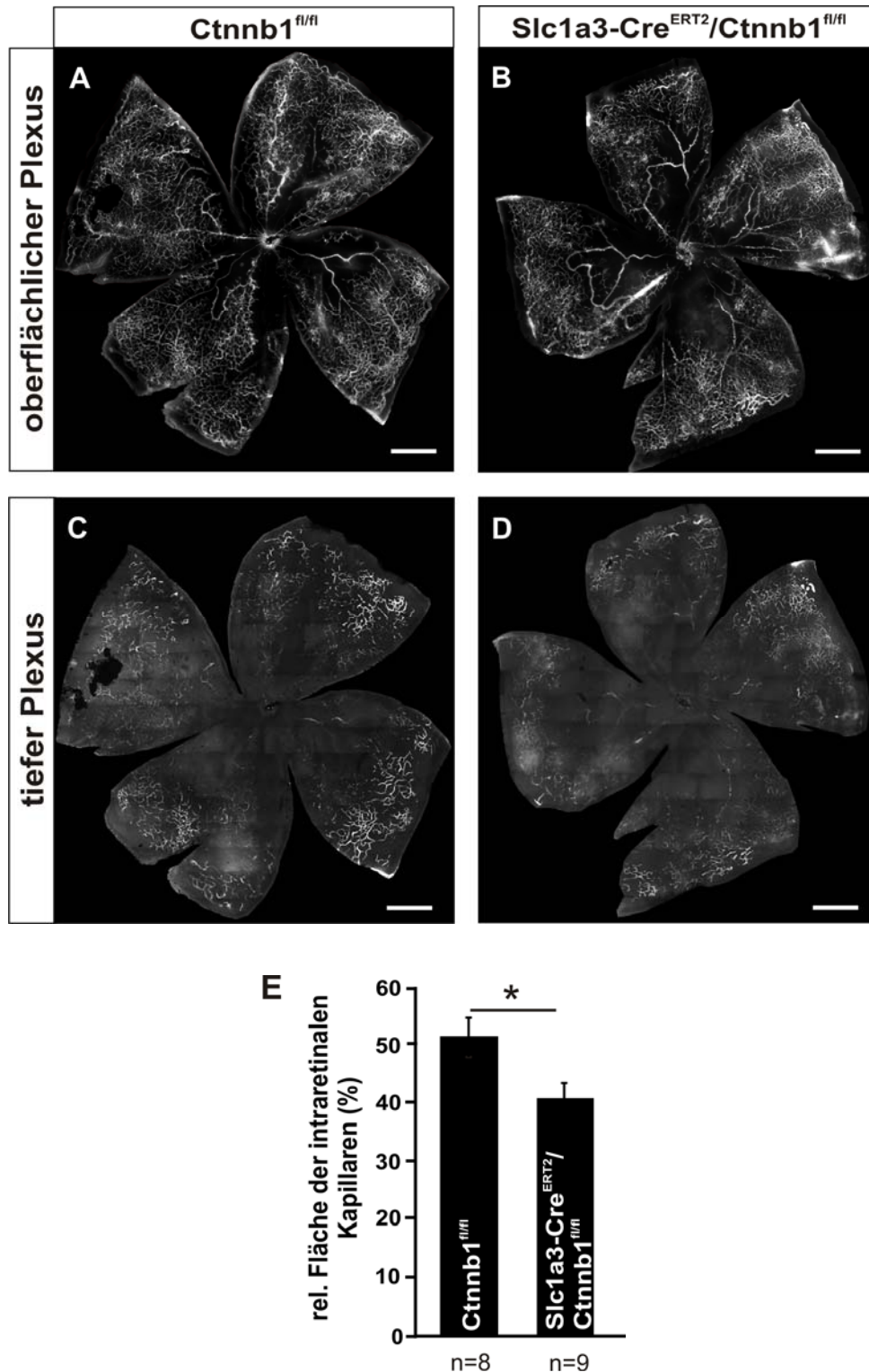
**Abb. 26: Verzögerte Revaskularisierung in *Slc1a3-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Tieren nach Induktion einer OIR**

A-D: Retinale Häutchenpräparate von *Slc1a3-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> und *Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Mäusen an P17 nach OIR und Behandlung mit TX (P12-P15). Zur Darstellung der Gefäße wurden die Tiere mit FITC-Dextran perfundiert. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zeigte sich eine stärker ausgeprägte vasoobliterierte Zone (rote Darstellung in C, D) in der zentralen Retina von *Slc1a3-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> (B, D) im Vergleich zu den *Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Kontrollen (A, C). Maßstabsbalken: 500µm.

E: Zur Quantifizierung wurde die Fläche der vasoobliterierten Zone von beiden Genotypen ermittelt und auf die Gesamtfläche der Retina bezogen. (Mittelwert ± SEM von 3 Würfeln; \*p<0,05).

Die Quantifizierung der vasoobliterierten Fläche von *Slc1a3-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Tieren betrug annähernd 25% der gesamten retinalen Fläche und war damit im Vergleich zu den Kontrolltieren, mit  $9,28 \pm 2,50$  %, signifikant größer (vgl. Abb. 26 E). Diese Befunde weisen demnach auf eine deutliche Beteiligung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs in Müllerzellen bei der Revaskularisierung der Netzhaut nach Sauerstoff-induziertem Schaden hin.

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob die Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen nach Induktion einer OIR ebenfalls einen Einfluss auf die Entwicklung von intraretinalen Gefäßen hat. Bei der phänotypischen Analyse fand sich in der Netzhaut von *Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Kontrollmäusen in den peripheren Bereichen bereits eine Vielzahl an intraretinalen Kapillaren (Abb. 27C). Im Vergleich dazu war diese Fläche in *Slc1a3-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Tieren deutlich kleiner (Abb. 27 D). Die quantitative Auswertung bestätigte, dass Mäuse mit einer Defizienz für *Ctnnb1* in Müllerzellen mit  $42,03 \pm 2,29$  % eine um ca. 10% signifikant kleinere Fläche an intraretinalen Gefäßen aufweisen als die Kontrolltiere ( $51,79 \pm 1,48$  %) (vgl. Abb. 27E).



**Abb. 27: Hemmung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signals in Müllerzellen führt zu einem verminderten Einwachsen von Gefäßen in die Netzhaut nach Induktion einer OIR**

A-D: Retinale Häutchenpräparate von  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  und  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen an P17 nach Induktion einer OIR und TX-Behandlung. Zur Darstellung der Gefäße wurden die Tiere mit FITC-Dextran perfundiert. Mittels des ApoTome Zusatzmodul wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Analyse der Fläche der intraretinalen Gefäße angefertigt (C, D). Hierbei zeigte sich eine kleinere Fläche an intraretinalen Kapillaren in der Retina von  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen (D) im Vergleich zu den  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrollen (C). Maßstabsbalken: 500 $\mu$ m.

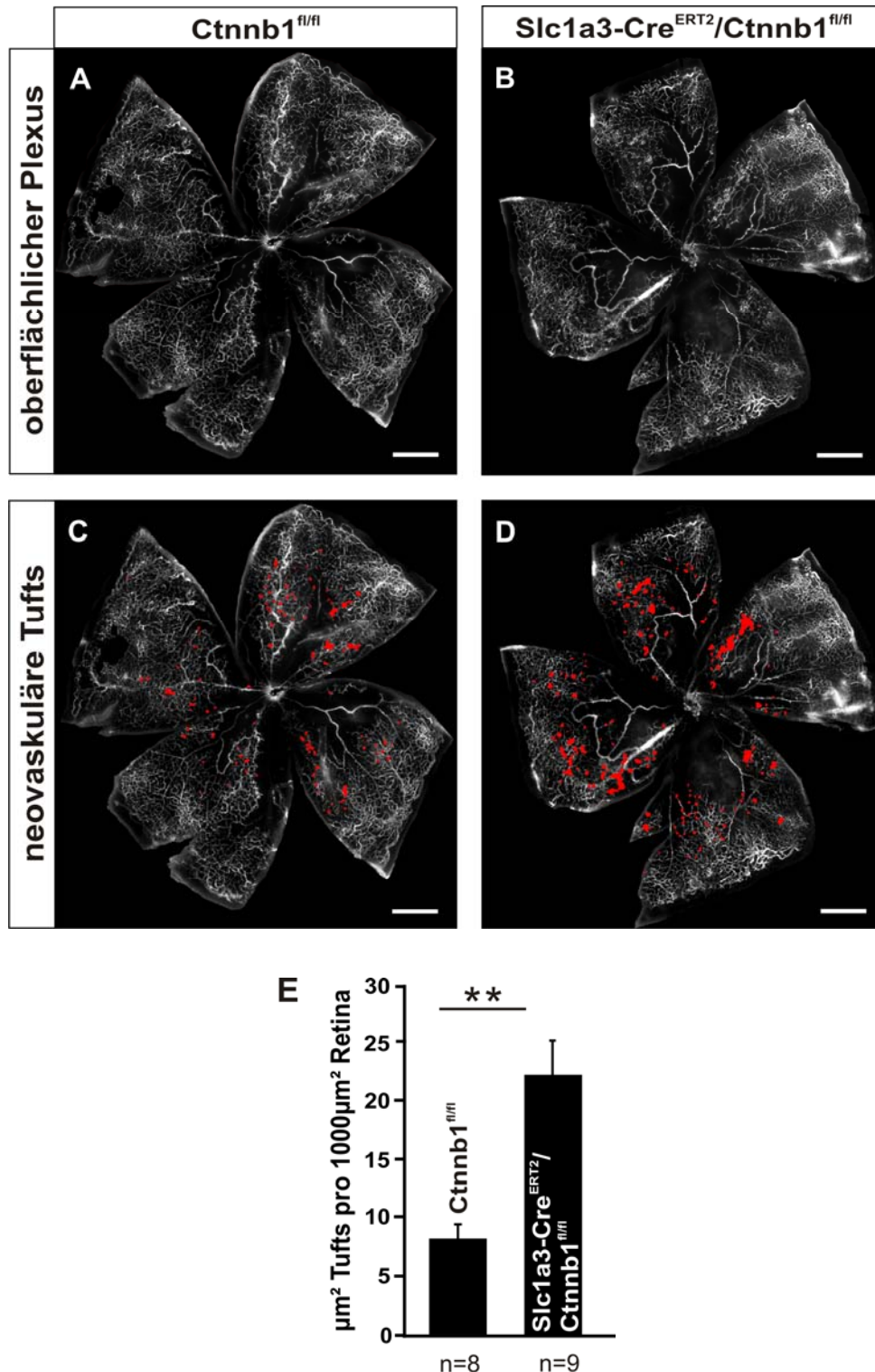
E: Zur Quantifizierung wurde die Fläche mit intraretinalen Gefäßen in Relation zur Gesamtfläche der Retina gesetzt und als relative Fläche angegeben (Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 Würfen; \*p < 0,05).

Wie bereits erwähnt, kommt es neben der physiologischen Revaskularisierung der Retina nach OIR auch zur Ausbildung von pathologischen Neovaskularisationen. Hierbei verlassen aussprossende Gefäße die Ebene des superfizialen Plexus in Richtung des Glaskörpers. In Folge dessen können sich daraus weitere Komplikationen wie Ödeme oder Netzhautablösungen ergeben, die letztendlich in einem Verlust der Sehfähigkeit resultieren (Wirostko, Wong et al. 2008; Scott and Fruttiger 2009). Anhand der farblichen Markierung der neovaskulären Tufts in Abb. 28 ist deutlich deren vermehrtes Auftreten in der Netzhaut von *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Tieren (D) gegenüber den *Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Kontrollen (C) zu erkennen. Die Gesamtgröße des durch Neovaskularisation betroffenen Areal wurde vermessen und in Relation zu  $1000\mu\text{m}^2$  Retina bestimmt. In Retinae von *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Tieren war hierbei die Fläche der neovaskulären Tufts mit  $22,3 \pm 2,8 \mu\text{m}^2$  pro  $1000\mu\text{m}^2$  Retina um das ca. 2,7-fache hoch signifikant größer als die der Kontrollgeschwistertiere ( $8,3 \pm 1,2 \mu\text{m}^2$  Tufts pro  $1000\mu\text{m}^2$  Retina). Dies deutet darauf hin, dass die Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen nach OIR die Ausbildung von pathologischen Neovaskularisationen in der Netzhaut fördert.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass der Verlust des kanonischen Wnt-Signalwegs in Müllerzellen, basierend auf der Deletion von *Ctnnb1*, eine Inhibierung der vaskulären Reparaturmechanismen zur Folge hat. Damit einhergehend kommt es zu einer gesteigerten Ausbildung von präretinalen Neovaskularisationen. Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Müllerzellen scheint demnach eine wichtige Rolle bei der Revaskularisierung von vasoobliterierten Arealen sowie der Entstehung von präretinalen Tufts nach hyperoxischem Schaden zu spielen.

Da diese Prozesse durch angiogene Faktoren reguliert werden, sollte im Weiteren untersucht werden, welche dieser Faktoren die verminderte Revaskularisierung sowie die verstärkte Neovaskularisation nach OIR in Mäusen mit einer Müllerzell-spezifischen Deletion von *Ctnnb1* möglicherweise vermitteln. Mittels quantitativer real-time RT-PCR Analyse wurde im speziellen die Expression von IGF-1, Angpt-2 und VEGF untersucht. Wie frühere Studien zeigen konnten, handelt es sich bei den beiden erstgenannten um nachgeschaltete Signalmoleküle deren Expression durch Norrin vermittelt werden kann (Ohlmann, Seitz et al. 2010).



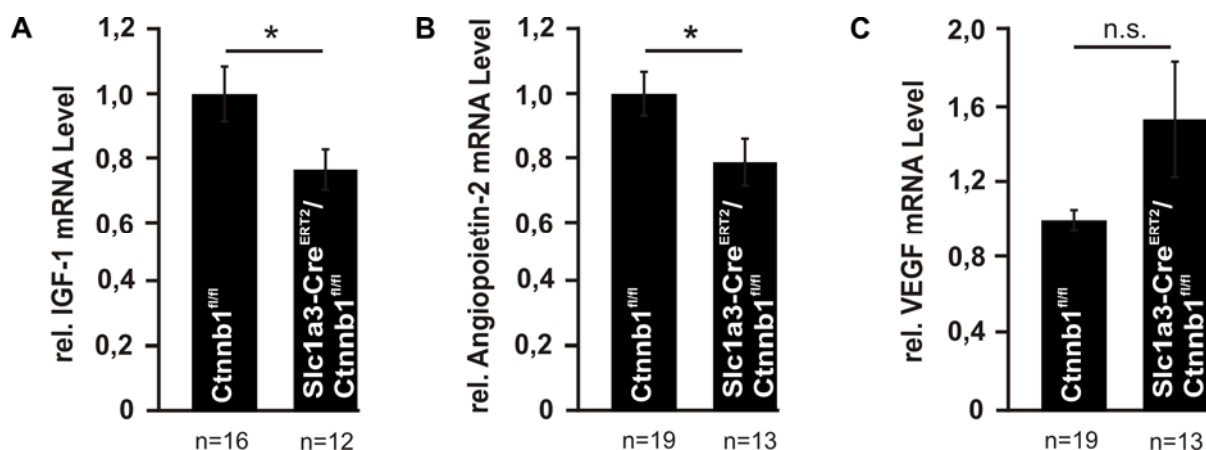


**Abb. 28: Deletion des Wnt/β-Catenin-Signalwegs in Müllerzellen induziert die Bildung von neovaskulären Tufts nach OIR**

A-D: Retinale Häutchenpräparate von Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> und Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen an P17 nach OIR und TX-Behandlung. Zur Darstellung der Gefäße wurden die Tiere mit FITC-Dextran perfundiert, mittels Fluoreszenzmikroskop analysiert und zur besseren Darstellung farblich (rot) markiert (C, D). Hierbei zeigte sich ein deutlich vermehrtes Auftreten von neovaskulären Tufts in der Retina von Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> (D) Mäusen im Vergleich zu den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrollen (C). Maßstabsbalken: 500μm.

E: Zur Quantifizierung wurde die Fläche der Neovaskularisationen pro 1000μm<sup>2</sup> Retina ermittelt. (Mittelwert ± SEM von 3 Würfen; \*\*p<0,01).

Für die Expressionsanalysen wurden  $Slc1a3\text{-Cre}^{\text{ERT2}}/\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$  und  $\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$  Mäusen an P17, nach OIR und TX-Behandlung, die Augen entnommen und die Retinae isoliert. Gemäß Protokoll wurde daraus die RNA aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben. Die Expression der Zielgene wurde in Relation zur Expression des *Housekeepers* GAPDH analysiert. Wie in Abb. 29 A zu sehen, zeigte sich eine signifikant verminderte Expression von IGF-1 in den Retinae von  $Slc1a3\text{-Cre}^{\text{ERT2}}/\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$  Mäusen um das  $0,24 \pm 0,06$ -fache im Vergleich zu den  $\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$  Kontrollen. In vergleichbarer Weise konnte auch bei der Expressionsanalyse von Angpt-2 eine signifikante Reduktion um das  $0,21 \pm 0,07$ -fache in Retinae von Tieren mit einer Deletion von *Ctnnb1* im Vergleich zu den Kontrolltieren detektiert werden (vgl. Abb. 29 B). Im Gegensatz dazu konnte in Retina von Mäusen mit einem Müllerzell-spezifischen Verlust von  $\beta$ -Catenin in Bezug auf die VEGF-Expression kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich eine deutliche Tendenz die für eine Induktion spricht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die VEGF mRNA Level in  $Slc1a3\text{-Cre}^{\text{ERT2}}/\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$  um das  $1,55 \pm 0,30$ -fache ( $p=0,097$ ) erhöht (vgl. Abb. 29 C). Möglicherweise beruht dieser Effekt auf einem Kompensationsmechanismus, der durch die verringerte Expression spezifischer angiogener Faktoren wie IGF-1 und Angpt-2 bedingt ist. Andererseits könnte dafür auch die erhöhte Hypoxie im retinalen Gewebe, basierend auf der verzögerten Revaskularisierung, verantwortlich sein.



**Abb. 29:  $\beta$ -Catenin Defizienz in Müllerzellen führt zu Veränderungen in der Expression von angiogenen Faktoren in der Netzhaut**

A-C: Quantitative Expressionsanalyse von angiogenen Faktoren (IGF-1, Angpt-2, VEGF) in Retinae von  $Slc1a3\text{-Cre}^{\text{ERT2}}/\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$  und  $\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$  Mäusen an P17, nach Induktion einer OIR und Behandlung mit TX. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet (Mittelwert  $\pm$  SEM von 5 Würfen, \* $p < 0,05$ ).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass die Revaskularisierung nach OIR, zumindest teilweise, über IGF-1 und Angpt-2 vermittelt wird. Eine reduzierte Expression dieser Faktoren könnte Grund für die verminderte Revaskularisierung vasoobliterierter Areale in *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen sein. Die hieraus resultierende retinale Hypoxie könnte die Expression von VEGF steigern und letztlich zu einem Anstieg in der Ausbildung von neovaskulären Tufts beitragen.

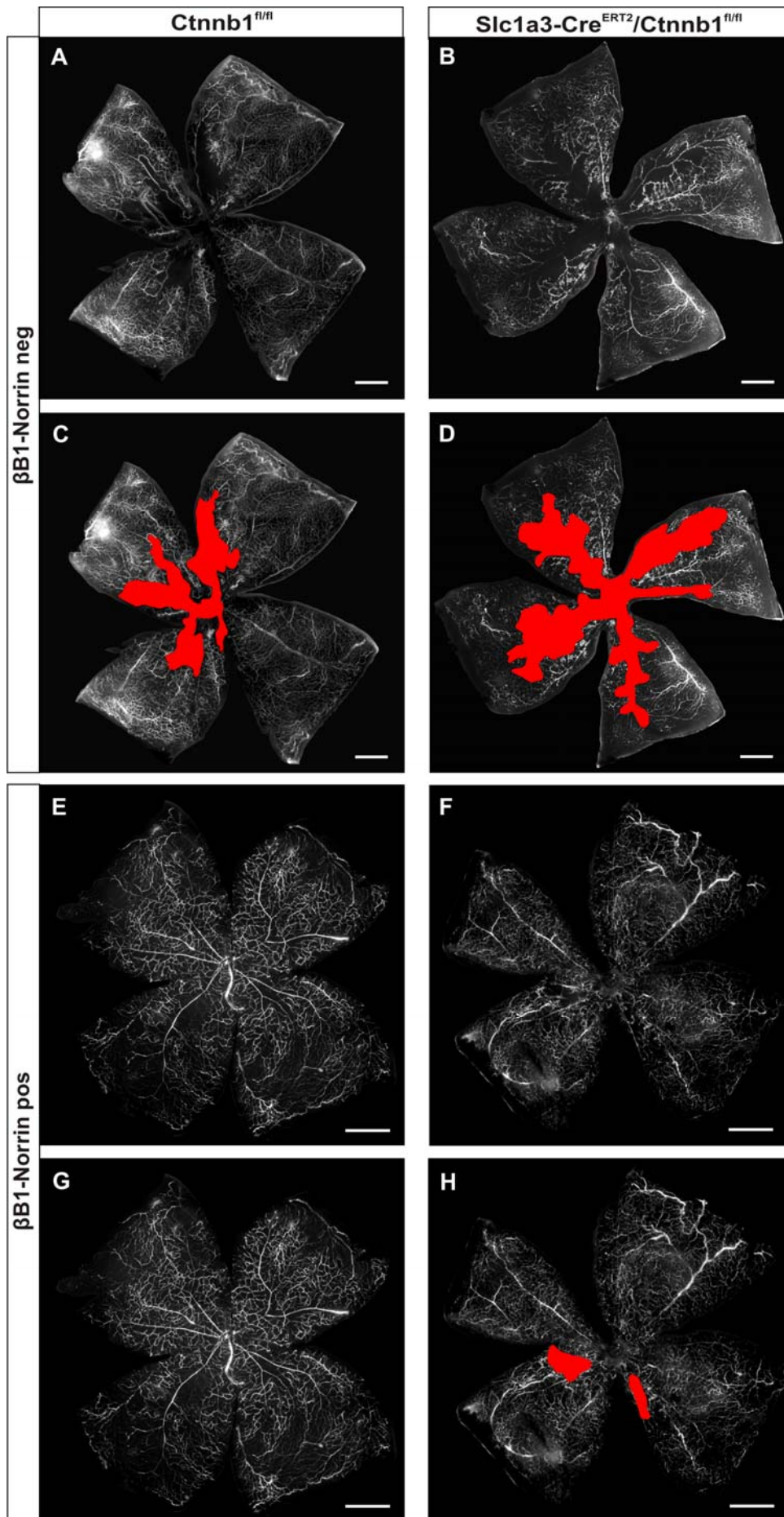
### **4.4 Einfluss der Norrin-Überexpression auf die Vaskularisierung nach OIR**

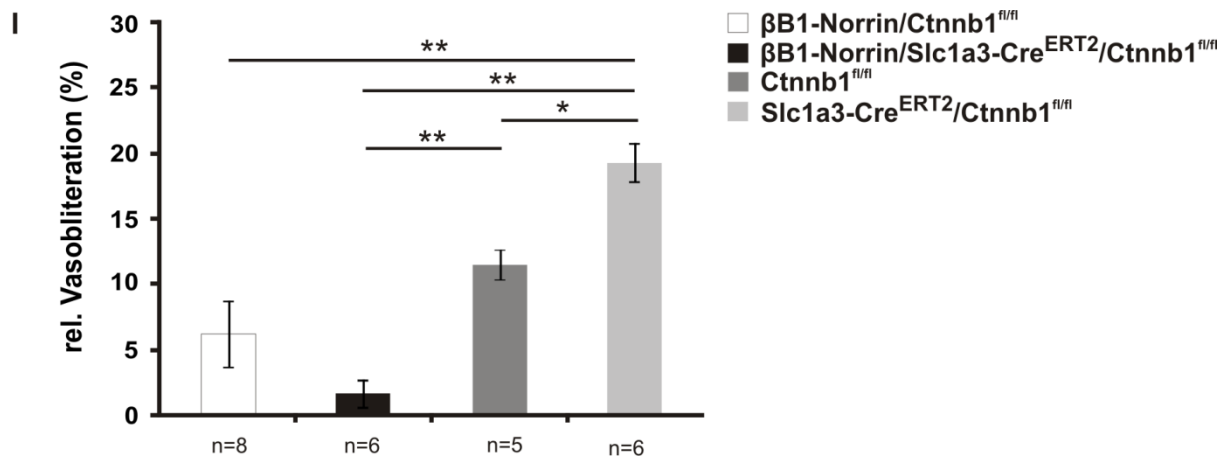
In den vorangegangenen Abschnitten wurde dargestellt, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Müllerzellen, neben dem nur geringen Einfluss auf die physiologische retinale Gefäßentwicklung, eine Rolle bei der Revaskularisierung der Netzhaut nach hyperoxischem Schaden spielt. Bei Untersuchungen an unserem Lehrstuhl, die von Daniel Wöhl durchgeführt wurden, konnte festgestellt werden, dass eine Deletion von *Ctnnb1* in mikrovaskulären Endothelzellen nach OIR ebenso zu einer verzögerten Revaskularisierung der vasoobliterierten Areale und einer verminderten Ausbildung von intraretinalen Gefäßen führt. Im Gegensatz zu der verstärkten Neovaskularisation, die in *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen beobachtet werden konnte, zeigte sich bei *Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen ein Rückgang in der Ausbildung von neovaskulären Tufts (Daniel Wöhl, unveröffentlichte Daten). Basierend auf diesen Ergebnissen sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit nun die Frage geklärt werden, ob Norrin seine angiogenen Effekte über diese beiden Zelltypen vermittelt und ob dies ausschließlich über den kanonischen Wnt-Signalweg erfolgt. Hierfür wurden dreifach transgene Tiere verwendet, die neben der Deletion von *Ctnnb1* in Müller- bzw. mikrovaskulären Endothelzellen, eine transgene Überexpression von Norrin in der Linse aufweisen ( $\beta$ B1-Norrin/*Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* und  $\beta$ B1-Norrin/*Cdh5Cre-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>*). Zusätzlich wurde zur Induktion von avaskulären Arealen eine OIR in diesen Tieren induziert.

#### 4.4.1 Norrin vermittelt seine angiogenen Effekte nach OIR nicht über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen

Für die folgenden Untersuchungen wurden  $\beta$ B1-Norrin/Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäuse und entsprechende Kontrolltiere im Anschluss an die Sauerstoffexposition von P12 bis P15 mit TX-Augentropfen behandelt. An P17 wurden die Tiere zur Visualisierung der Gefäße mit FITC-Dextran perfundiert.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung (vgl. Abb. 30) zeigte in Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren (B, D) eine größere avaskuläre Zone im Vergleich zu den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren (A, C). Bei der quantitativen Auswertung (vgl. Abb. 30 I) ergab sich für Tiere mit Müllerzell-spezifischer Deletion von *Ctnnb1* ein rel. vasoobliteriertes Areal von  $19,53 \pm 1,45$  % in Bezug auf die Gesamtfläche der Retina. Dieses Areal war damit um ca. 10 % signifikant größer als in den Cre-negativen Geschwistertieren ( $11,62 \pm 1,19$  %). Damit konnten die bisherigen Ergebnisse bestätigt werden, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass der neu generierte Mischhintergrund aus FVBN und C57BL/6 eine ausreichende Vulnerabilität des Gefäßsystems zur Induktion einer OIR aufweist. Entsprechend früherer Studien zeigte sich, dass die Überexpression von Norrin in den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren (E, G) die Revaskularisierung deutlich verbessert. Auf Grund der geringen Fallzahl konnte hierbei aber keine Signifikanz gegenüber den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen erreicht werden. Allerdings war die rel. avaskuläre Fläche der  $\beta$ B1-Norrin/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tiere im Vergleich zu der in Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen um  $13,05 \pm 2,55$  % hochsignifikant kleiner. Ebenso zeigte sich auch in den dreifach transgenen Tieren (F, H) eine deutlich kleinere avaskuläre Zone in der zentralen Retina. Bei der quantitativen Auswertung ergab sich hier, dass diese Verringerung in  $\beta$ B1-Norrin/Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen im Vergleich zu den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen ( $9,72 \pm 1,19$  %) sowie den Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen ( $17,63 \pm 1,45$  %) hochsignifikant war. Entsprechend dieser Ergebnisse scheint die Überexpression von Norrin, auch bei Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen, zu einer deutlichen Induktion der Revaskularisierung zu führen die mit der in den Norrin-Überexpressionstieren vergleichbar ist.





**Abb. 30: Norrin verbessert die Revaskularisierung nach OIR nicht über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen**

A-H: Retinale Häutchenpräparate von Tieren der Linie  $\beta B1\text{-Norrin}/Slc1a3\text{-Cre}^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  nach OIR und TX-Behandlung. Zur Darstellung der Gefäße wurden die Tiere an P17 mit FITC-Dextran perfundiert. Zur Verdeutlichung wurde das vasoobliterierte Areal farblich (rot) markiert (C, D, G, H). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zeigte sich eine stärker ausgeprägte vasoobliterierte Zone in der zentralen Retina bei den  $Slc1a3\text{-Cre}^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  (B, D) im Vergleich zu den  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrollen (A, C). In den  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrolltieren mit einer Überexpression von Norrin war die vasoobliterierte Zone bereits nahezu vollständig revaskularisiert (E, G). Ebenso führte Norrin in den dreifach transgenen  $\beta B1\text{-Norrin}/Slc1a3\text{-Cre}^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Tieren zu einer verstärkten Revaskularisierung in die vasoobliterierte Zone (F, H). Maßstabsbalken: 500 $\mu$ m.

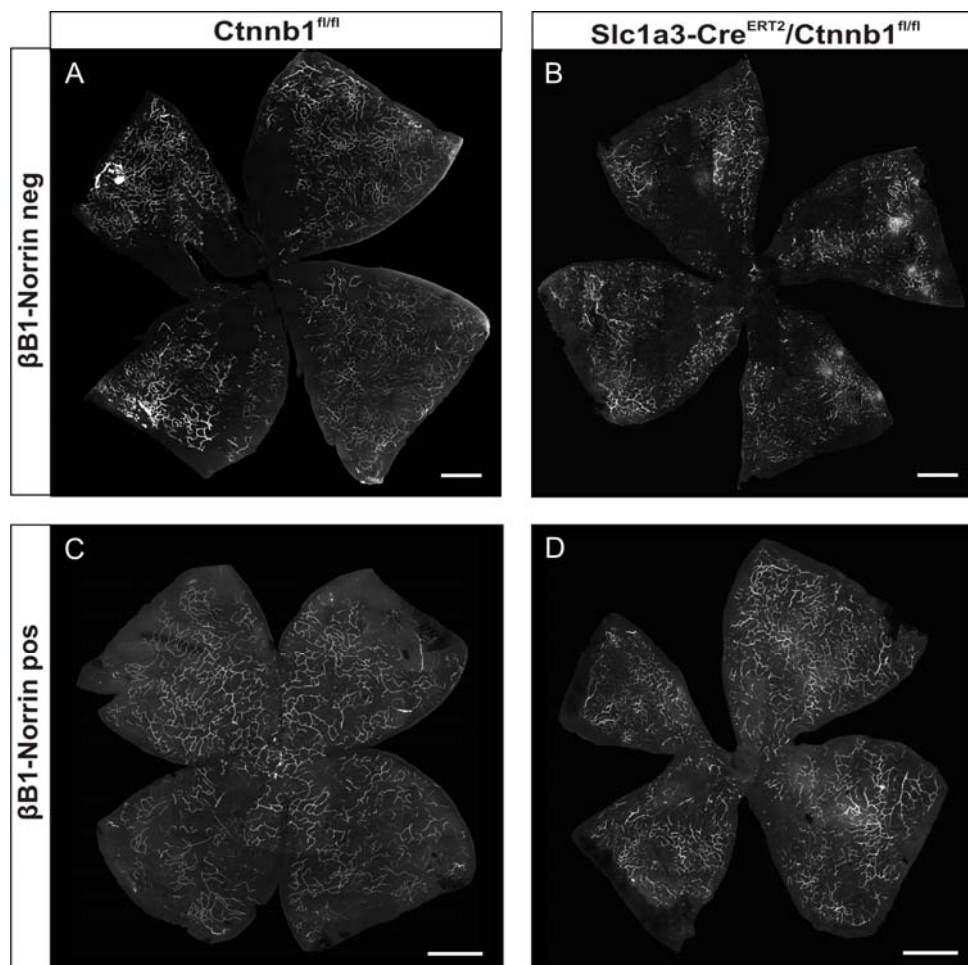
I: Bei der Quantifizierung der Vasoobliteration in Relation zur Gesamtfläche der Retina ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied von  $\beta B1\text{-Norrin}/Ctnnb1^{fl/fl}$  zu  $Slc1a3\text{-Cre}^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen. Für  $\beta B1\text{-Norrin}/Slc1a3\text{-Cre}^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  konnte eine hochsignifikant verringerte relative Vasoobliteration gegenüber den  $Slc1a3\text{-Cre}^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen und den  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrollen quantifiziert werden. Zudem wurde der bereits vorher gezeigte Unterschied zwischen den  $Slc1a3\text{-Cre}^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  und den  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen bestätigt (Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 Würfen; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

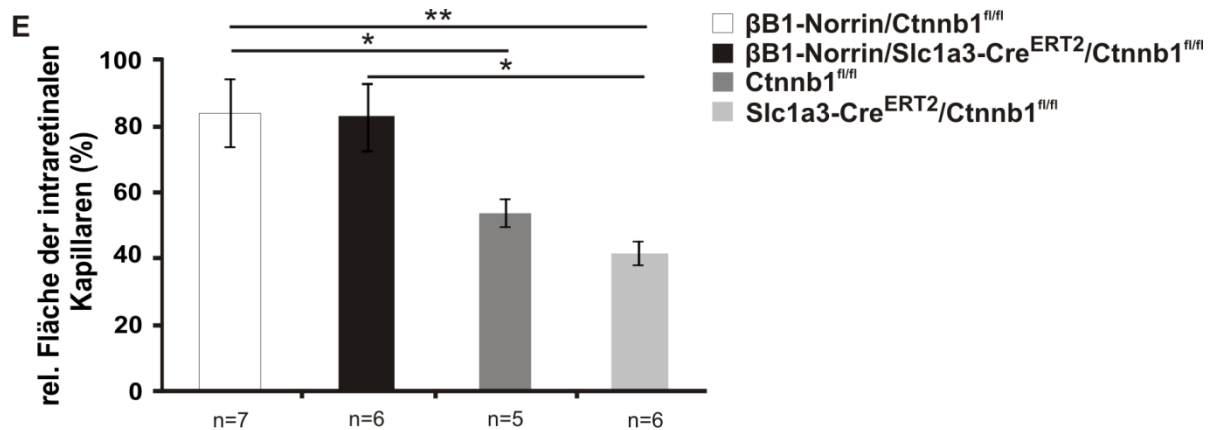
Weiterhin wurde untersucht, ob der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Müllerzellen für die Norrin-vermittelte Induktion von intraretinalen Gefäßen notwendig ist (vgl. Abb. 31).

Im Vergleich zeigte sich eine verzögerte Ausbildung von intraretinalen Kapillaren in  $Slc1a3\text{-Cre}^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen (B) gegenüber den  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrollen (A). Die quantitative Auswertung ergab dabei, dass der Verlust von  $\beta$ -Catenin in Müllerzellen, gegenüber den Kontrollen, in einer ca. 10% kleineren Fläche an intraretinalen Gefäßen in Bezug auf die Gesamtfläche der Retina resultiert. Hiermit konnten die in den vorherigen Untersuchungen generierten Daten zwar tendenziell bestätigt werden, auf Grund der hohen Standardabweichung konnte aber keine Signifikanz erreicht werden. In  $\beta B1\text{-Norrin}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Tieren zeigte sich ein großteils ausgebildeter tiefer Plexus (C). Die entsprechende rel. Fläche war mit  $81,29 \pm 6,59$  % signifikant größer als in den  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrollen ( $53,83 \pm 4,28$  %). Gegenüber den  $Slc1a3\text{-Cre}^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  ( $41,17 \pm 3,25$  %) ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied von ca. 40 % womit das Areal der intraretinalen Kapillaren in  $\beta B1\text{-Norrin}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Tieren

ca. doppelt so groß war. Bei der quantitativen Analyse der dreifach transgenen Tiere konnte der morphologische Befund (D) bestätigt werden, dass die Überexpression von Norrin, trotz der Deletion von *Ctnnb1*, zur Ausbildung von intraretinalen Gefäßen fast in der gesamten Netzhaut führt. Wie die quantitative Analyse bestätigte, war die rel. Fläche mit  $82,81 \pm 9,91 \%$  in etwa so groß wie die in den  $\beta$ B1-Norrin/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Mäusen ( $81,29 \pm 6,59 \%$ ). Im Vergleich zu den *Slc1a3-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Mäusen, führte die zusätzliche Expression von Norrin in den dreifach transgenen Tieren also zu einer signifikant verbesserten Ausbildung von intraretinalen Gefäßen, wobei die quantifizierte rel. Fläche mit  $82,81 \pm 9,91 \%$  ca. doppelt so groß war wie in den konditionellen Knockout-Tieren ohne Norrin-Überexpression ( $41,17 \pm 3,25 \%$ ). Gegenüber den *Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Kontrollen zeigte sich zwar eine um  $28,97 \pm 9,91 \%$  größere rel. Fläche an intraretinalen Kapillaren, allerdings konnte auf Grund der geringen Fallzahl keine Signifikanz erreicht werden.

Diesen Beobachtungen zur Folge, scheint Norrin die Ausbildung von intraretinalen Kapillaren auch bei Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen zu induzieren.





**Abb. 31: Norrin verbessert die Ausbildung von intraretinalen Kapillaren nach OIR unabhängig von der Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen**

A-D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der intraretinalen Kapillaren von retinalen Häutchenpräparaten von Tieren der Linie  $\beta$ B1-Norrin/Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> nach OIR und TX-Behandlung. Zur Darstellung der Gefäße wurden die Tiere an P17 mit FITC-Dextran perfundiert. Hierbei zeigte sich, dass in Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen (B) die Ausbildung der intraretinalen Gefäße noch nicht so weit fortgeschritten war wie in den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrollen (A). Die Überexpression von Norrin in den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren führte hingegen zu einer deutlich stärkeren Ausbildung von intraretinalen Gefäßen die bereits in die zentrale Retina reichte (C). Eine ebenso großflächige Formation von tiefen Gefäßen war bei den dreifach transgenen  $\beta$ B1-Norrin/Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren zu beobachten (D). Maßstabsbalken: 500 $\mu$ m.

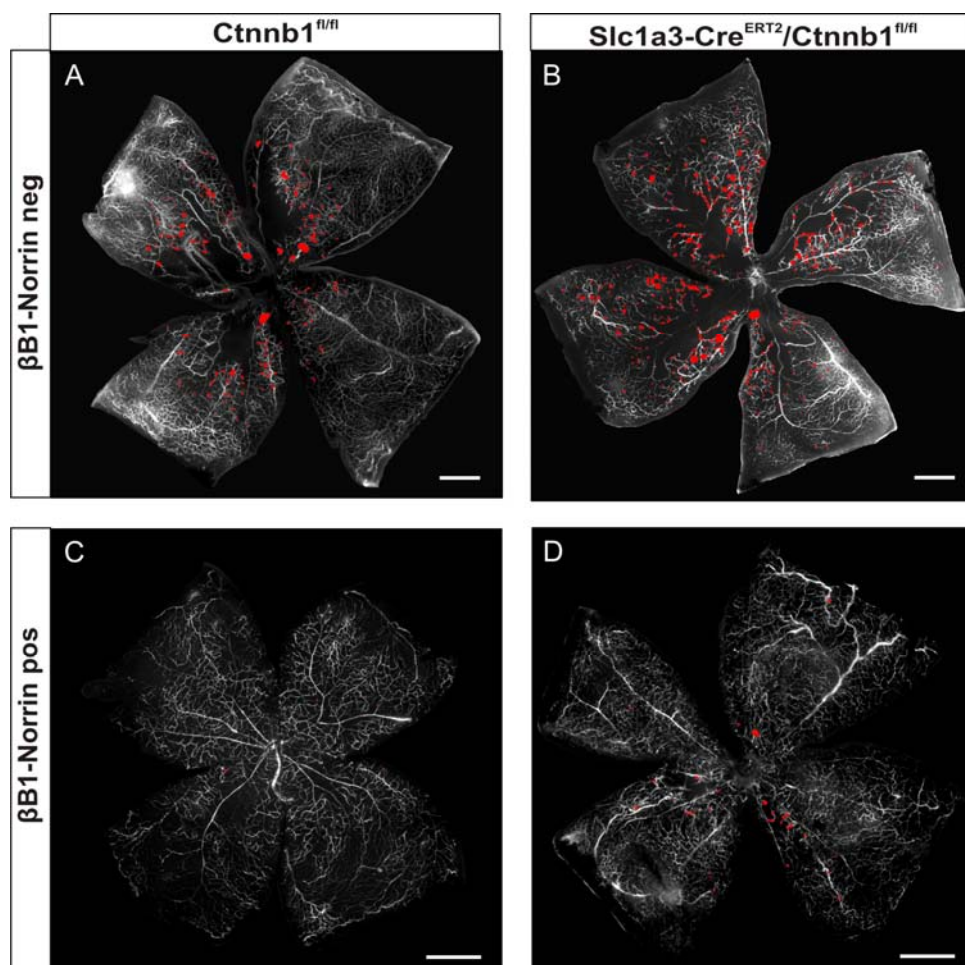
E: Die Quantifizierung der Fläche der intraretinalen Kapillaren in Relation zur Gesamtfläche der Retina bestätigte, dass diese in  $\beta$ B1-Norrin/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren signifikant größer war im Vergleich zu der in Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren und hochsignifikant zu der in Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen. In  $\beta$ B1-Norrin/Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren entsprach die relative Fläche der intraretinalen Gefäße in etwa der von  $\beta$ B1-Norrin/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren und war damit signifikant größer als in Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen (Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 Würfen; \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01).

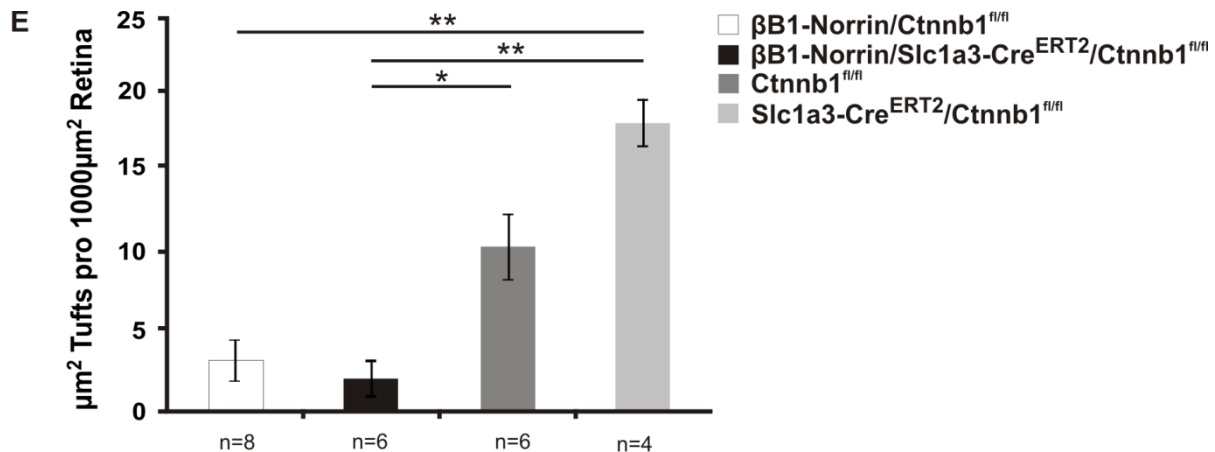
Bei der Analyse der Neovaskularisationen (vgl. Abb. 32) konnten zunächst die früheren Ergebnisse, dass es in Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen (B) mit  $18,19 \pm 1,50 \mu\text{m}^2$  Tufts pro  $1000\mu\text{m}^2$  Retina gegenüber den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren (A,  $10,27 \pm 2,09 \mu\text{m}^2$  Tufts pro  $1000\mu\text{m}^2$  Retina) zu einer verstärkten Ausbildung von präretinalen Tufts kommt, zumindest tendenziell, bestätigt werden. Auf Grund der hohen Standardabweichung und der geringen Fallzahl konnte keine Signifikanz erreicht werden. Wie für  $\beta$ B1-Norrin Mäuse bekannt, zeigte sich auch im Zuge dieser Arbeit, dass die Überexpression von Norrin in den hier verwendeten  $\beta$ B1-Norrin/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen die Ausbildung von Neovaskularisationen stark vermindert (C). Gegenüber Mäusen mit einer Deletion von Ctnnb1 in Müllerzellen (B) in denen sich eine rel. Fläche von präretinalen Tufts von  $18,19 \pm 1,50 \mu\text{m}^2$  pro  $1000\mu\text{m}^2$  Retina zeigte, war diese in den Norrin-Überexpressionstieren mit  $2,91 \pm 1,26 \mu\text{m}^2$  Tufts pro  $1000\mu\text{m}^2$  Retina hochsignifikant reduziert. In Bezug zu den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrollen ( $10,27 \pm 2,09 \mu\text{m}^2$  Tufts pro  $1000\mu\text{m}^2$  Retina) war die Fläche der Tufts in  $\beta$ B1-Norrin/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen damit zwar ebenfalls geringer, das Signifikanzniveau konnte



wegen der geringen Tierzahl und der hohen Schwankungen allerdings nicht erreicht werden ( $p=0,062$ ). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der dreifach transgenen Tiere (D) konnten ebenfalls nur kleine Areale mit Neovaskularisationen detektiert werden. Bei der quantitativen Auswertung ergab sich eine rel. Fläche von präretinalen Neovaskularisationen von  $1,92 \pm 1,13 \mu\text{m}^2$  pro  $1000\mu\text{m}^2$  Retina womit sich eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den Kontrolltieren ( $10,27 \pm 2,09 \mu\text{m}^2$  Tufts pro  $1000\mu\text{m}^2$  Retina) sowie eine hochsignifikante Reduktion gegenüber den  $\text{Slc1a3-Cre}^{\text{ERT2}}/\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$  Mäusen ( $18,19 \pm 1,50 \mu\text{m}^2$  Tufts pro  $1000\mu\text{m}^2$ ) ergab.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Überexpression von Norrin, auch in der Netzhaut von Tieren mit einer Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen, zu einer verbesserten Revaskularisierung vasoobliterierter Areale sowie der Ausbildung von intraretinalen Gefäßen und einer verminderten Bildung von Neovaskularisationen führt. Folglich scheint für die Vermittlung der proangiogenen Effekte von Norrin nach Induktion einer OIR die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen eine untergeordnete Rolle zu spielen.





**Abb. 32: Norrin vermindert die Ausbildung von pathologischen Neovaskularisationen nach OIR unabhängig von einer Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs in Müllerzellen**

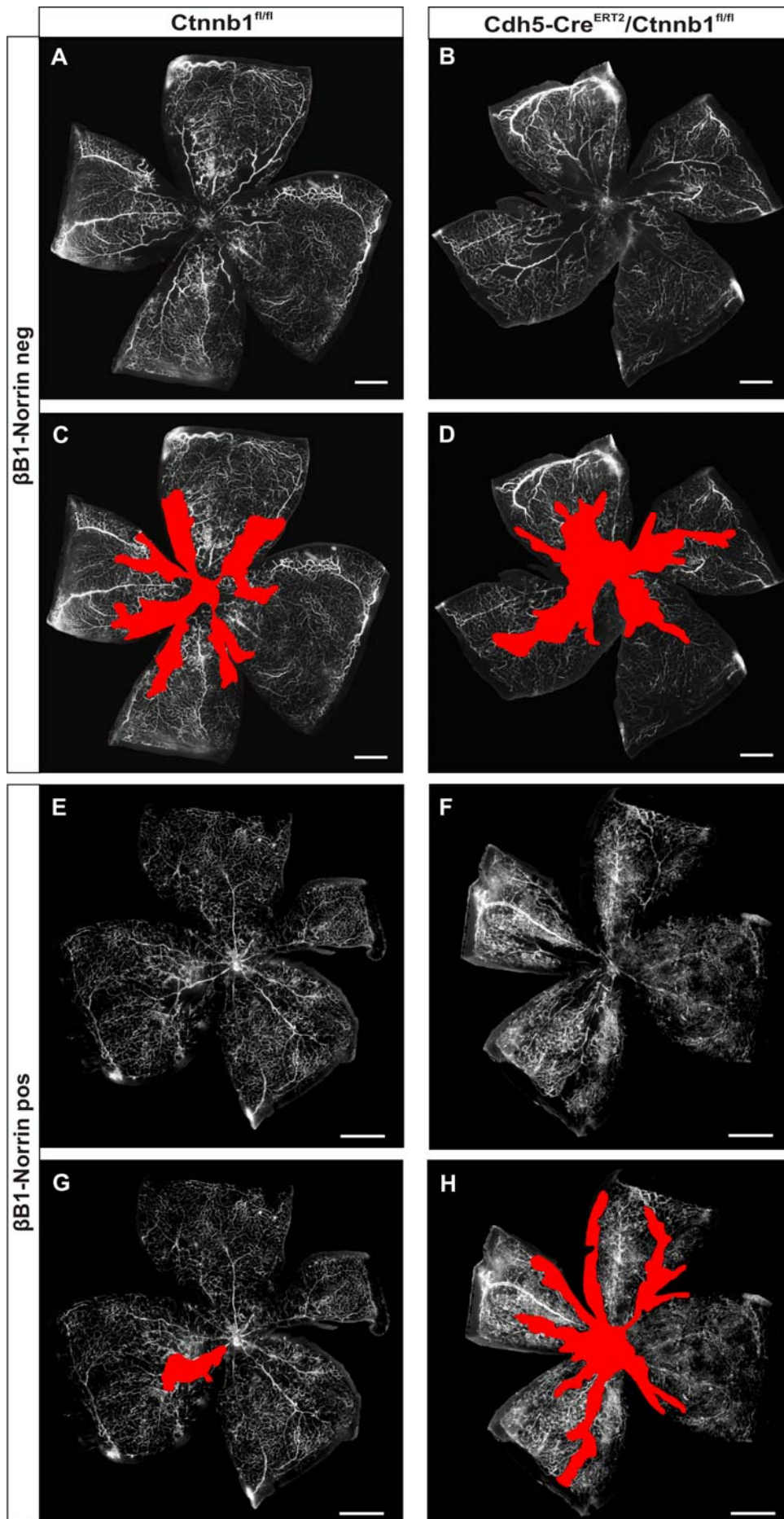
A-D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen retinaler Häutchenpräparate von Tieren der Linie βB1-Norrin/Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> nach OIR und TX-Behandlung. Zur Darstellung der Gefäße wurden die Tiere an P17 mit FITC-Dextran perfundiert. Die quantifizierten Bereiche der neovaskulären Tufts wurden in rot markiert. In Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen (B) zeigten sich gegenüber den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrollen (A) vermehrt neovaskuläre Tufts. Die Norrin-Überexpression in Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren verhindert die Entstehung von Neovaskularisationen dagegen fast vollständig (C). Auch in den dreifach transgenen Mäusen (D) zeigen sich nur wenige Tufts. Maßstabsbalken: 500μm.

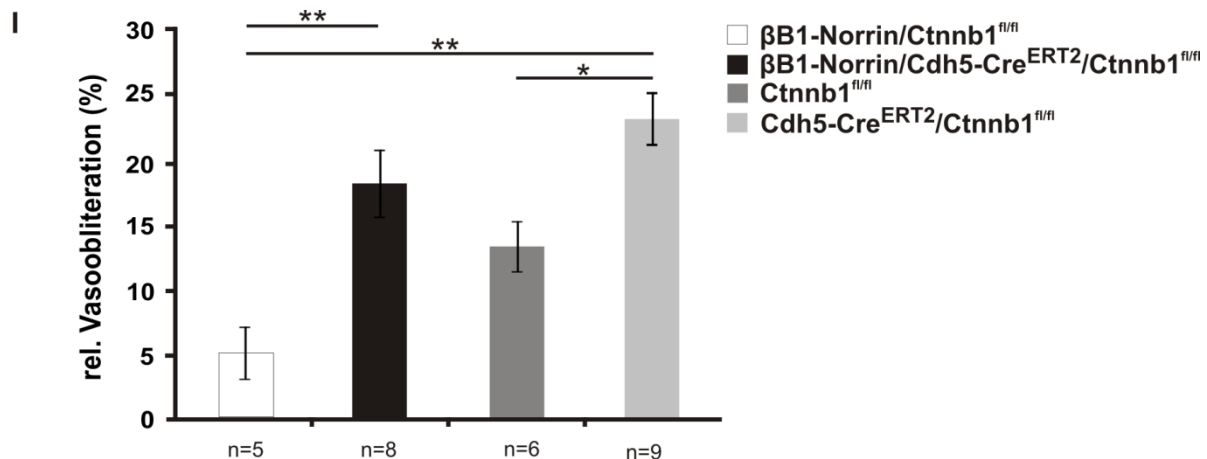
E: Die Quantifizierung der Fläche der neovaskulären Tufts pro 1000μm<sup>2</sup> Retina zeigt, dass diese in βB1-Norrin/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> und βB1-Norrin/Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren verglichen mit Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen hochsignifikant vermindert ist. In dreifach transgenen Tieren ist die Fläche der Tufts zu den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren signifikant verringert. (Mittelwert ± SEM von 3 Würfen; \*p<0,05; \*\*p<0,01).

#### 4.4.2 Norrin vermittelt seine angiogenen Effekte zumindest teilweise über Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen

Um zu untersuchen, ob Norrin seine angiogenen Effekte über Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen und/oder durch Aktivierung anderer Signalwege vermittelt, wurde untersucht welche Auswirkungen die ektopische Überexpression von Norrin auf die Revaskularisierung von Mäusen mit einer Deletion von *Ctnnb1* in mikrovaskulären Endothelzellen (Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>) nach OIR hat.

Hierfür wurden βB1-Norrin/Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäuse und die entsprechenden Kontrolltiere nach OIR (P12 bis P15) mit TX-Augentropfen behandelt und an P17 mit FITC-Dextran perfundiert.





**Abb. 33: Norrin vermittelt die Revaskularisierung der avaskulären Areale nach OIR, zumindest teilweise, über die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs in Endothelzellen**

A-H: Retinale Häutchenpräparate von Tieren der Linie βB1-Norrin/Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> nach Induktion einer OIR und TX-Behandlung. Zur Darstellung der Gefäße wurden die Tiere an P17 mit FITC-Dextran perfundiert. Zur Verdeutlichung wurde das vasoobliterierte Areal farblich (rot) markiert (C, D, G, H). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zeigte sich eine stärker ausgeprägte vasoobliterierte Zone in der zentralen Retina bei den Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> (B, D) im Vergleich zu den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren (A, C). In den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren mit einer Überexpression von Norrin war die vasoobliterierte Zone bereits nahezu vollständig revaskularisiert (E, G). Demgegenüber konnte in den dreifach transgenen βB1-Norrin/Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren Norrin keine verbesserte Revaskularisierung in die vasoobliterierte Zone induzieren (F, H). Maßstabsbalken: 500µm.

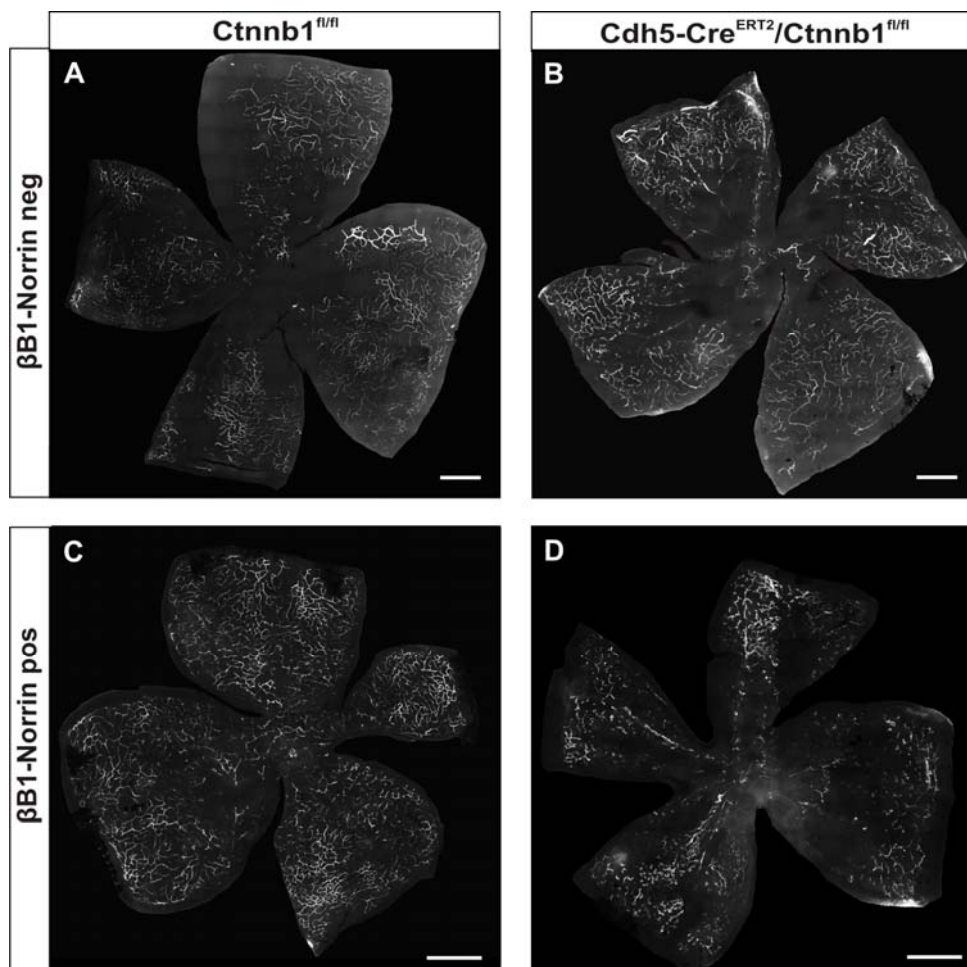
I: Die Quantifizierung der Vasoobliteration in Relation zur Gesamtfläche der Retina bestätigt, dass diese in Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen im Vergleich zu den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren signifikant größer war. βB1-Norrin/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> wiesen sowohl zu den Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> als auch zu den βB1-Norrin/Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen eine hochsignifikant kleinere vasoobliterierte Zone auf. Gegenüber den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren konnte aufgrund der geringen Fallzahl keine Signifikanz erreicht werden. (Mittelwert ± SEM von 3 Würfen; \*p<0,05; \*\*p<0,01).

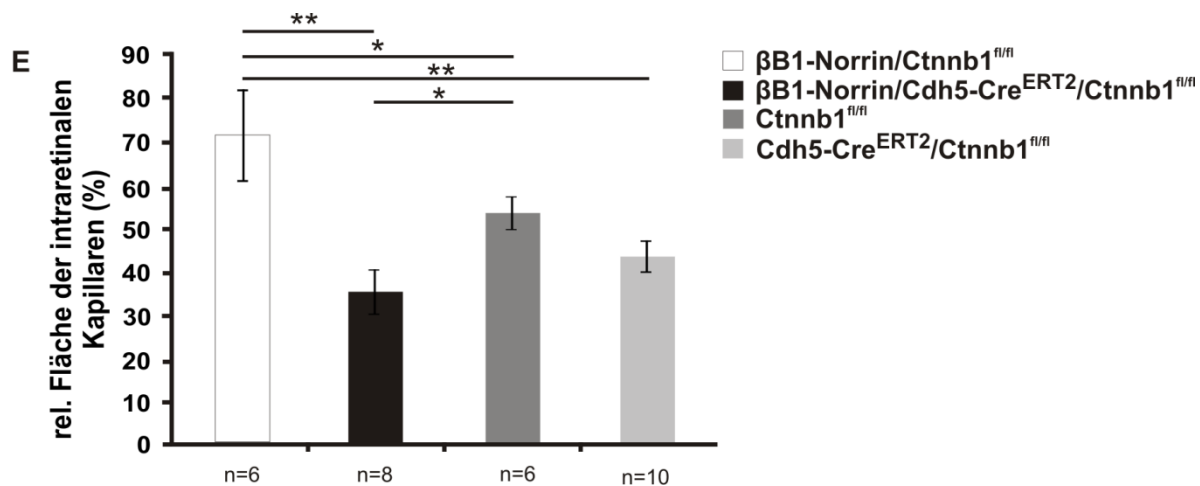
In den Häutchenpräparaten (vgl. Abb. 33) von Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen (B) zeigte sich dabei im Vergleich zu den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren (A) eine größere avaskuläre Zone. In der quantitativen Analyse (vgl. Abb. 33 E) konnte ein Unterschied von ca. 10 % bestätigt werden, wobei in Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen die rel. Fläche mit 23,08 ± 2,06 % signifikant größer war als in den Cre-negativen Geschwistertieren (13,38 ± 1,99 %). Da dies mit den Werten übereinstimmt, die in vorherigen Untersuchungen in der Arbeitsgruppe generiert wurden (Daniel Wöhl, unveröffentlichte Daten), scheint der durch die Kreuzung entstandene Mischhintergrund aus FVBN und C57BL/6 demnach keine offensichtlichen Auswirkungen auf die Induktion einer OIR und die Revaskularisierung der avaskulären Areale auszuüben. Entsprechend der Kenntnis, dass Norrin nach OIR einen proangiogenen Einfluss auf das Gefäßwachstum ausübt, zeigte sich in βB1-Norrin/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren (C) eine deutlich verbesserte Revaskularisierung der avaskulären Areale. Mit 5,23 ± 1,97 % war die rel. vasoobliterierte Fläche

hochsignifikant kleiner als in den  $Cdh5-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen ( $23,08 \pm 2,06 \%$ ). Eine ebenfalls gesteigerte Revaskularisierung von avaskulären Arealen zeigte sich auch im Vergleich zu den  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrolltieren ( $13,38 \pm 1,99 \%$ ). Auf Grund der geringen Fallzahl konnte hierbei aber keine Signifikanz erreicht werden.

Interessanterweise konnte im Vergleich zwischen den  $\beta B1-Norrin/Ctnnb1^{fl/fl}$  (C) und den  $\beta B1-Norrin/Cdh5-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen (D) ebenfalls ein deutlicher Unterschied beobachtet werden. Die Fläche der rel. Vasoobliteration in den  $\beta B1-Norrin/Cdh5-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen war mit  $18,07 \pm 2,62 \%$  hochsignifikant größer als in den Überexpressionstieren ohne  $\beta$ -Catenin-Defizienz. Da das Ausmaß der Vasoobliteration in den dreifach transgenen Tieren in etwa dem der  $Cdh5-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäuse entspricht, scheint Norrin seine angiogene Wirkung, zumindest teilweise, über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen zu vermitteln.

Weiterführend sollte untersucht werden inwieweit sich bereits intraretinale Gefäße in der Netzhaut ausgebildet haben (vgl. Abb. 34).





**Abb. 34: Norrin vermittelt, zumindest teilweise, die Entwicklung von intraretinalen Gefäßen nach OIR über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen**

A-D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen intraretinaler Kapillaren von Tieren der Linie  $\beta$ B1-Norrin/Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> nach OIR und TX-Behandlung. Zur Darstellung der Gefäße wurden die Tiere an P17 mit FITC-Dextran perfundiert. Hierbei zeigte sich, dass in Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen (B) die Ausbildung der intraretinalen Gefäße nicht so weit fortgeschritten war wie in den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrollen (A). Die Überexpression von Norrin in den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren führte hingegen zu einer deutlich stärkeren Ausbildung von intraretinalen Gefäßen, die bereits in die zentrale Retina reichte (C). In den dreifach transgenen  $\beta$ B1-Norrin/Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> (D) fand sich trotz der Überexpression von Norrin keine größere Fläche an intraretinalen Gefäßen im Vergleich zu Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen (B). Maßstabsbalken: 500 $\mu$ m.

E: Die Quantifizierung der Fläche der intraretinalen Kapillaren in Relation zur Gesamtfläche der Retina bestätigte, dass diese in  $\beta$ B1-Norrin/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren signifikant im Vergleich zu der in Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren größer war und hochsignifikant im Vergleich zu der in Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> und  $\beta$ B1-Norrin/Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren war die relative Fläche der intraretinalen Gefäße nicht größer als die von Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren und sogar signifikant kleiner gegenüber der in Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen (Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 Würfen; \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01).

Im Vergleich von Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen (B) mit Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrollen (A) zeigte sich, dass der Verlust von  $\beta$ -Catenin in den mikrovaskulären Endothelzellen zu einer verzögerten Ausbildung intraretinaler Kapillaren führt. Die quantitative Auswertung (vgl. Abb. 34 E) ergab, dass diese Fläche in Bezug auf die Gesamtfläche der Retina in Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen mit  $43,07 \pm 3,45$  % im Vergleich zu den Kontrolltieren ( $53,16 \pm 3,56$  %), wenn auch nicht signifikant, um ca. 10 % geringer war. In  $\beta$ B1-Norrin/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren (C) zeigte sich ein fast komplett ausgebildeter tiefer Plexus. Die entsprechende Fläche war mit  $71,10 \pm 10,26$  % signifikant größer gegenüber den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrollen. Gegenüber zu den Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> ( $43,07 \pm 3,45$  %) und  $\beta$ B1-Norrin/Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen (D,  $34,80 \pm 5,26$  %) war das Areal der intraretinalen Kapillaren in  $\beta$ B1-Norrin/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren sogar hochsignifikant größer. Bei der quantitativen Analyse der dreifach transgenen Tiere konnte mit  $34,80 \pm 5,26$  % eine signifikant kleinere Fläche der intraretinalen Gefäße, verglichen mit den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen ( $53,16 \pm 3,56$  %), ausgemacht werden.

Hier zeigte sich also ähnlich wie in den  $Cdh5-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen eine retardierte Ausbildung intraretinaler Gefäße.

Letztlich wurde das Auftreten von Neovaskularisationen analysiert (vgl. Abb. 35).

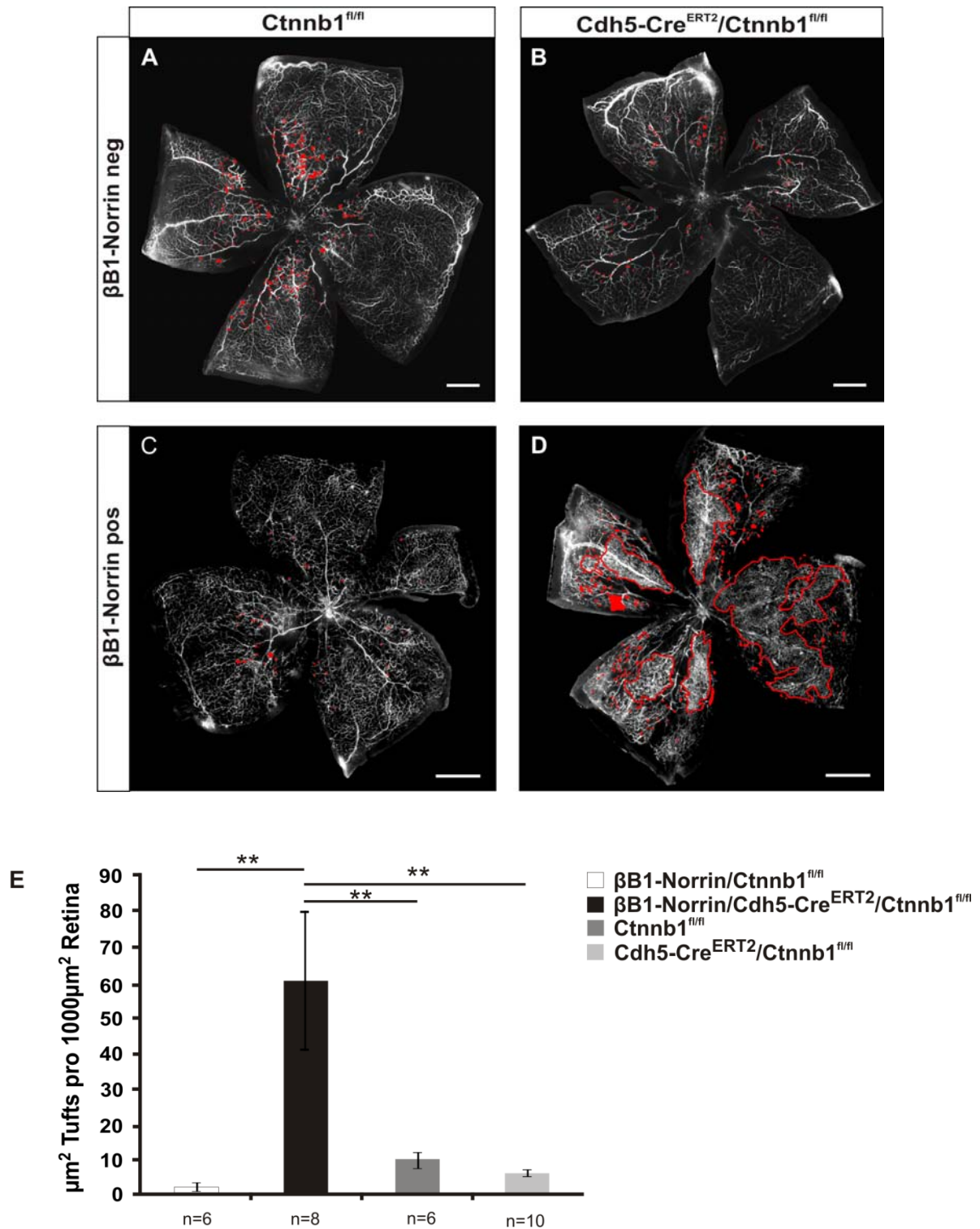


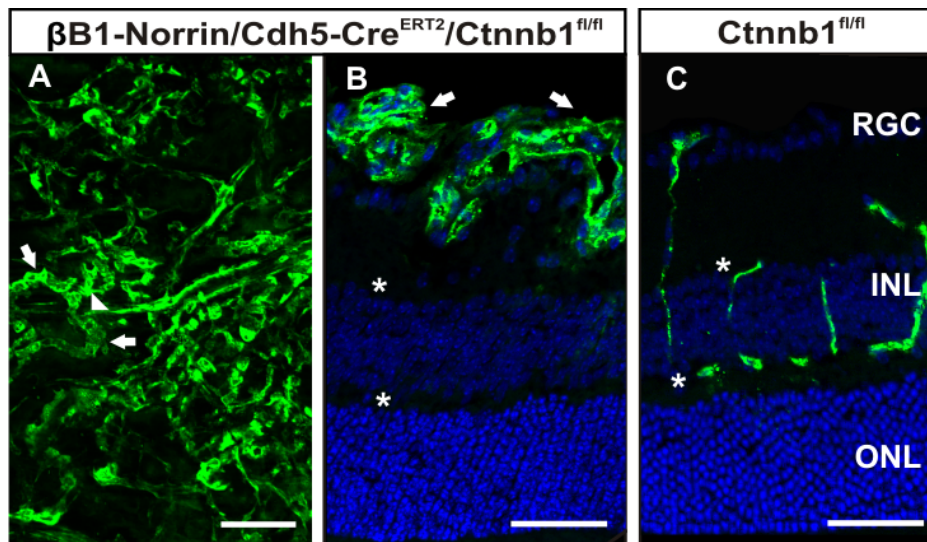
Abb. 35: Norrin induziert die Bildung von Neovaskularisationen in der Netzhaut von Mäusen mit einer Deletion von  $\beta$ -Catenin in mikrovaskulären Endothelzellen

A-D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen retinaler Häutchenpräparate von Tieren der Linie  $\beta$ B1-Norrin/Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> nach OIR und TX-Behandlung. Zur Darstellung der Gefäße wurden die Tiere an P17 mit FITC-Dextran perfundiert. Zur besseren Darstellung wurden die quantifizierten Bereiche der neovaskulären Tufts in rot markiert. Bei den  $\beta$ B1-Norrin/Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> wurden die großen Areale in denen auch plumpe großlumige Gefäßformationen detektiert wurden mit rot umrandet. Die mikroskopische Untersuchung zeigt, dass in Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen (B) gegenüber Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrollen (A) die Ausbildung von neovaskulären Tufts geringer ist. In  $\beta$ B1-Norrin/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren finden sich nur vereinzelte Neovaskularisation (C). Im Gegensatz dazu führt Norrin in den dreifach transgenen  $\beta$ B1-Norrin/Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> zu einem starken Anstieg der Neovaskularisation, womit große Areale der Retina bedeckt sind (D). Maßstabsbalken: 500 $\mu$ m.  
 E: Die quantitative Auswertung der Fläche der neovaskulären Tufts pro 1000 $\mu$ m<sup>2</sup> Retina bestätigt, dass diese in  $\beta$ B1-Norrin/Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren zu der von Mäusen aller anderen Vergleichsgruppen hochsignifikant größer ist. (Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 Würfen; \*\*p<0,01).

Hierbei zeigte sich bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse bereits eine verminderte Ausbildung von präretinalen Tufts in Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen (B) gegenüber den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren (A). Die quantitative Auswertung (vgl. Abb. 35 E) ergab für Tiere mit konditionellem Knockout  $6,35 \pm 0,71 \mu\text{m}^2$  Tufts pro 1000  $\mu\text{m}^2$  Retina. Auf Grund der hohen Abweichungen und der geringen Fallzahl war dieser Wert nicht signifikant höher als der der Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tiere ( $10,27 \pm 2,09 \mu\text{m}^2$  Tufts pro 1000  $\mu\text{m}^2$  Retina). In gleicher Weise zeigte sich auch in  $\beta$ B1-Norrin/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen (C) zwar nur eine geringe Ausbildung von Neovaskularisationen ( $2,44 \pm 1,77 \mu\text{m}^2$  Tufts pro 1000  $\mu\text{m}^2$  Retina), aber auch hier wurde bei der Quantifizierung das Signifikanzniveau zu Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> bzw. Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen nicht erreicht. Demgegenüber konnte aber bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der dreifach transgenen Tiere (D) ein sehr großes Areal mit Neovaskularisationen beobachtet werden. Die quantitative Auswertung ergab einen Wert von  $60,46 \pm 19,48 \mu\text{m}^2$  Tufts pro 1000  $\mu\text{m}^2$  Retina und damit eine hochsignifikante Steigerung um das 24-fache zu den in  $\beta$ B1-Norrin/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren. Gegenüber den Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> bzw. den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen konnte ein ebenfalls hochsignifikanter Anstieg um das 10- bzw. 6-fache nachgewiesen werden.

Wie bereits erwähnt, zeigte sich in den  $\beta$ B1-Norrin/Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen eine besonders starke Neovaskularisation. Neben den präretinalen Tufts fanden sich aber auch plumpe, großlumige Gefäßformationen (Pfeil), die sich zum Teil über den Gefäßen des oberflächlichen Plexus (Dreieck) befanden (Abb. 36A). In Sagittalschnitten dieser Augen sind Gefäßkonvolute im Bereich der RGC-Schicht zu sehen, die zum Teil in die darunterliegende innere plexiforme Schicht reichen, dort aber blind enden (Abb. 36 B). Ein Einwachsen der Gefäße und somit die Ausbildung eines intermediären und tiefen Plexus (\*) wie in den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren (Abb. 36C), unterbleibt weitestgehend.





**Abb. 36: Norrin-Überexpression in  $Cdh5-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  induziert die Ausbildung von ausgedehnten präretinalen Gefäßformationen und verhindert die Entstehung von regulären intraretinalen Kapillaren**

A: Detailaufnahme eines Retinahäutchens von einem  $\beta B1-Norrin/Cdh5-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Tier nach OIR und TX-Behandlung. Die Visualisierung der retinalen Gefäße erfolgte durch Perfusion mit FITC-Dextran. Neben den charakteristischen präretinalen Tufts sind großlumige plumpe Gefäßstrukturen zu erkennen (Pfeile) die sich scheinbar über den Gefäßen des oberflächlichen Plexus (Dreieck) befinden. B-C: Sagittalschnitte von Augen einer  $\beta B1-Norrin/Cdh5-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Maus und einem  $Ctnnb1^{fl/fl}$  Kontrolltier. Die Gefäße sind durch FITC-Dextran in grün dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. In  $\beta B1-Norrin/Cdh5-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Tieren waren Gefäßkonvolute im Bereich der RGC-Schicht zu erkennen. Zum Teil drangen diese in die darunter liegende innere plexiforme Schicht vor, endeten allerdings als plumpe Gefäßstümpfe. Im Vergleich zu den Kontrolltieren in denen deutlich das Einwachsen der Gefäße und die Ausbildung eines intermediären und tiefen Plexus (\*) zu sehen war, unterblieb dies in den  $\beta B1-Norrin/Cdh5-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Tieren. Maßstabballen: 50  $\mu m$ .

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Überexpression von Norrin die durch Deletion von  $\beta$ -Catenin in mikrovaskulären Endothelzellen entstandenen negativen Auswirkungen auf die vaskulären Reparaturmechanismen nach OIR nicht positiv beeinflusst. Weder die Revaskularisierung vasoobliterierter Areale noch die Ausbildung von intraretinalen Gefäßen konnte verbessert werden. Vielmehr findet ein starker Anstieg von Neovaskularisation statt. Neben den typischen präretinalen Tufts, die teilweise sehr große Netzhautareale betreffen, sind auch plumpe, großlumige Gefäßformationen zu erkennen, die auf undifferenzierte Gefäße hindeuten könnten. Norrin scheint demnach, zumindest teilweise, seine angiogenen Effekte nach OIR über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen zu vermitteln. Weiterhin kann spekuliert werden, ob Norrin auch an der Bildung von neuen undifferenzierten Gefäßen, im Sinne einer Vaskulogenese, beteiligt sein könnte.

## 5 Diskussion

### 5.1 Charakterisierung der $Slc1a3Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$ Mauslinie

Um zu klären ob Norrin seine proangiogenen Effekte über eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen und / oder Müllerzellen vermittelt, wurden im Zuge dieser Arbeit  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäuse mit einer Tamoxifen-induzierbaren, Müllerzell-spezifischen Deletion von *Ctnnb1* verwendet. Zur Induktion dieses konditionellen Knockouts wurde zunächst ein Behandlungsschema zur Verabreichung von Tamoxifen etabliert. Wie gezeigt wurde, kann Tamoxifen vor allem bei einer systemischen Verabreichung zu schweren Nebenwirkungen wie Metaplasien und Hyperplasie im Bereich des Magens (Huh, Khurana et al. 2012) führen. Da durch eine systemische Behandlung der Tiere mit Tamoxifen schwerwiegende Nebenwirkungen an neugeborenen Mäusen zu erwarten gewesen wären, wurde ein Schema etabliert, bei dem Jungtiere (P<21), für fünf aufeinanderfolgende Tage, dreimal täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (5mg/ml Tamoxifen in *Corn Oil*; je 10 $\mu$ l pro Auge) behandelt wurden. Im Gegensatz dazu war es nicht möglich auf dieselbe Weise die Aktivität der Cre-Rekombinase auch im adulten Tier zu induzieren. Um den konditionellen Knockout in adulten Tieren zu induzieren wurden die Tiere nach dem Protokoll von Mori et al. fünf Tage zweimal täglich mit einer intraperitonealen Injektion von je 50  $\mu$ l der Tamoxifen-Lösung (20mg/ml Tamoxifen in *Corn Oil*) behandelt (Mori, Tanaka et al. 2006). Für beide Behandlungsschemata konnte in der verwendeten  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mauslinie, nach entsprechender Behandlung mit Tamoxifen, mittels LacZ-Färbung, eine spezifische Expression der Cre-Rekombinase in Müllerzellen nachgewiesen werden. In Astrozyten, die ebenfalls zu den retinalen Gliazellen gehören und in ihrer Funktionalität den Müllerzellen sehr ähneln, wurde keine Expression der Cre-Rekombinase detektiert. Hierbei ist zu erwähnen, dass der *Slc1a3* Promotor zwar in Astrozyten des Zentralen Nervensystems (ZNS) von Ratten und Menschen nachgewiesen werden konnte (Schmitt, Asan et al. 1997; Kanai, Clemencon et al. 2013), allerdings weisen verschiedene Untersuchungen auf eine breite Heterogenität im Expressionsmuster innerhalb der Astrozyten hin, die möglicherweise direkt im Zusammenhang mit deren Abstammungen aus unterschiedlichen Bereichen des

Gehirns steht (Bayraktar, Fuentealba et al. 2015). Es konnten sogar bereits Unterschiede in der Genexpression von Astrozyten des Sehnervs und der Retina detektiert werden (Mudhar, Pollock et al. 1993). Zudem wurde in der Studie, die im Zuge der Etablierung der hier verwendeten Cre-Mauslinie angestellt wurde, gezeigt, dass eine hohe Expression von *Slc1a3* lediglich in Astrozyten des Gehirns zu detektieren ist, während innerhalb der Retina die Expression ausschließlich in Müllerzellen zu lokalisieren war (Mori, Tanaka et al. 2006). In Bezug auf die Effektivität des Systems konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die aktivierte Cre-Rekombinase zu einem signifikant reduzierten  $\beta$ -Catenin-Spiegel in der gesamten Netzhaut um ca. 50% führt. Dies entspricht den Erwartungen dahingehend, dass es neben den Müllerzellen noch andere Zellpopulationen gibt in denen *Ctnnb1* nicht deletiert wird. Wie die immunhistologischen Färbungen auf  $\beta$ -Catenin zeigen, ist eine Reduktion des Signals vor allem im Bereich der INL zu beobachten, in der die Zellkerne der Müllerzellen lokalisiert sind. Im Gegensatz dazu entspricht die Intensität des Fluoreszenzsignals in der RGC Schicht von *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen dem der Kontrollen.  $\beta$ -Catenin wird von Zellen in diesem Bereich also weiterhin unverändert exprimiert. Zusätzlich ist hierbei auch anzuführen, dass die Rekombination nicht in allen Müllerzellen stattfindet. Wie in anderen Studien bereits beschrieben wurde, liegt die Effizienz des Systems in retinalen Müllerzellen bei ca. 80% (Mori, Tanaka et al. 2006). In weiteren Analysen wurde zudem untersucht, ob es durch die permanente Expression der Cre-Rekombinase oder durch die Behandlung mit Tamoxifen zu strukturellen Veränderungen innerhalb der Netzhaut der Tiere kommt. Die morphologische Analyse zeigte dabei keine Auffälligkeiten, weder während der Entwicklung noch im adulten Tier. Bei der Vermessung der Dicke der gesamten Retina sowie der INL und ONL in adulten Tieren, zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede. Ebenso konnten keine auffälligen Beobachtungen bei den immunhistochemischen Analysen gemacht werden, die auf Reaktionen des Immunsystems sowie Gliosereaktionen der Müllerzellen hinweisen. Offensichtliche toxische Effekte basierend auf der Tamoxifen-Behandlung oder Cre-Expression innerhalb der Netzhaut die einen Einfluss auf die folgenden Untersuchungen haben könnten, konnten demnach nicht festgestellt werden. Neben dem Einfluss des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen auf die physiologische Gefäßentwicklung und -stabilität sollte auch dessen Rolle bei der Revaskularisierung im Schadensmodell der OIR untersucht werden. Es ist bekannt,

dass der genetische Hintergrund der verwendeten Tiere einen maßgeblichen Einfluss auf die Resistenz gegenüber hyperoxischem Schaden haben kann, der sich folglich in der Größe des vasoobliterierten Areals auswirkt. So wurde beispielsweise gezeigt dass C57BL/6 Mäuse im Vergleich zu BALB/c Mäusen im OIR-Schadensmodell eine signifikant größere avaskuläre Zone in der zentralen Retina ausbilden. (O'Bryhim, Radel et al. 2012). Obwohl sich die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Tiere auf Grund der konstitutiven Expression der Cre-Rekombinase ebenfalls genetisch unterscheiden, konnte in Untersuchungen beider Versuchsgruppen direkt nach Hyperoxie an P12 unabhängig vom Genotyp der Tiere vergleichbar große avaskuläre Areale nachgewiesen werden. Die Expression der Cre-Rekombinase scheint demnach keine Auswirkungen auf die Empfindlichkeit gegenüber Hyperoxie und somit auf die Entstehung des vasoobliterierten Areals zu haben.

### **5.2 Einfluss des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen auf die retinale Gefäßentwicklung und -stabilität**

Basierend auf den Daten die im Zuge dieser Arbeit generiert wurden, konnte die Hypothese, dass die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen das Einwachsen der retinalen Gefäße in die Tiefe vermittelt, nicht bestätigt werden. Es ist demnach davon auszugehen, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Müllerzellen bei der retinalen Vaskularisierung keine bedeutende Rolle spielt.

Als Grundlage für diese Hypothese dienten Ergebnisse früherer Studien, die zeigten, dass das Protein Norrin, im Gegensatz zu anderen angiogenen Faktoren, in der Lage ist, ein gerichtetes Gefäßwachstum in der Retina zu induzieren. Phänotypische Analysen von Norrin-defiziente *Ndp*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten dabei eine retardierte Gefäßentwicklung im Bereich des oberflächlichen Plexus, persistierende Hyaloidalgefäße und einen kompletten Verlust von intraretinalen Kapillaren (Richter, Gottanka et al. 1998; Ohlmann, Adamek et al. 2004). Zudem konnte in weiterführenden Untersuchungen die Entwicklung dieses Phänotyps durch Überexpression von Norrin in der Linse in doppelt transgenen  $\beta$ B1-Norrin/*Ndp*<sup>-/-</sup> Mäusen vollständig verhindert werden (Ohlmann, Scholz et al. 2005). Seine proangiogenen Effekte vermittelt Norrin dabei über die Aktivierung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs und ist somit entscheidend an der Vaskularisierung der

Retina beteiligt ist (Xu, Wang et al. 2004). Bei der phänotypischen Analyse der *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Tiere konnte zunächst beobachtet werden, dass eine Defizienz von  $\beta$ -Catenin während der frühen Phase der retinalen Gefäßentwicklung (P1-P5) zu einer erhöhten Persistenz der Hyaloidalgefäße an P7 und P10 führt. Im Weiteren wurde festgestellt, dass es sich hierbei um eine altersprogressive Verzögerung in der Regression der hyaloidalen Gefäße handelt. Die an P7 und P10 signifikant größere Anzahl an hyaloidalen Gefäßen ist möglicherweise eine Reaktion auf die erhöhte Hypoxie in der Retina, die auf deren verminderter Vaskularisierung in *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Tieren beruhen könnte. Wie an P7 gezeigt wurde ist die Ausbildung des oberflächlichen Plexus verzögert wenn *Ctnnb1* in Müllerzellen deletiert wurde. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit Befunden, die an *Ndp<sup>y/-</sup>*, *Fzd4<sup>-/-</sup>* und *Lrp5<sup>-/-</sup>* Mäusen erhoben wurden und die neben fehlenden intraretinalen Gefäßen auch eine Persistenz der hyaloidalen Gefäße aufweisen. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass das hyaloidale Gefäßsystem zur Kompensation einer retardierten Entwicklung von retinalen Kapillaren aufrechterhalten wird (Saint-Geniez and D'Amore 2004). Letztendlich kommt es aber in *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Tieren zu einer kompletten Rückbildung des Hyaloidalsystems und, wenn auch leicht verzögert, zu einer vollständigen sowie physiologischen Entwicklung des oberflächlichen Plexus. Die Ursache dieser Verzögerung wurde nicht weiter aufgeklärt, da diese vermutlich keine physiologische Relevanz besitzt. Wie bereits gezeigt sind an der Entwicklung des oberflächlichen Gefäßsystems maßgeblich Astrozyten, und nicht Müllerzellen, beteiligt (West, Richardson et al. 2005; Dorrell and Friedlander 2006). Vorstellbar wäre allerdings, dass Wachstumsfaktoren, die im etwas späteren Verlauf der Entwicklung von Müllerzellen ausgeschüttet werden (Stone, Itin et al. 1995), in diesen Bereich diffundieren und damit einen kleinen Beitrag zur Gefäßentwicklung des primären Plexus leisten. Letztendlich ist davon auszugehen, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg nur eine untergeordnete Rolle bei der Entwicklung des oberflächlichen Gefäßsystems spielt.

Im Gegensatz dazu konnten in der Netzhaut der eben erwähnten Tiere keinerlei intraretinale Kapillaren gefunden werden. Auf Grund dessen wurde im Zuge dieser Arbeit untersucht welche Auswirkungen die Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen auf die Formation von intraretinalen Gefäßen hat. Interessanterweise konnte dabei für keinen der untersuchten Zeitpunkte offensichtliche Veränderungen in der Entstehung

sowohl des tiefen als auch des intermediären Gefäßplexus beobachtet werden. Wie bereits gezeigt werden konnte, dienen bereits die unreifen Müllerzellen als Leitstruktur für Neurone während der frühen Entwicklung der Retina (Willbold, Berger et al. 1997). Die Differenzierung zu reifen Müllerzellen findet in der murinen Retina erst zwischen P5 und P8 statt (Young 1984; Reichenbach and Reichelt 1986). Durch die Induktion des konditionellen Knockouts sowohl zwischen P1-P5 als auch zwischen P5-P8 wurden beide Stadien dieser Entwicklung berücksichtigt. Parallel zu diesen Versuchen an  $Slc1a3\text{-Cre}^{\text{ERT2}}/\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$  Tieren wurde in unserer Arbeitsgruppe von Daniel Wöhl auch die Mauslinie  $\text{Cdh5-Cre}^{\text{ERT2}}/\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$  untersucht, die eine konditionelle Deletion von  $\text{Ctnnb1}$  in mikrovaskulären Endothelzellen aufweist. Zur Untersuchung der Formation der intraretinalen Gefäße wurde auch in diesen Tieren der konditionelle Knockout durch Behandlung mit Tamoxifen-Augentropfen von P5-P8 induziert. Dabei stellte sich in der phänotypischen Analyse heraus, dass die Ausbildung der intraretinalen Kapillaren in diesen Tieren stark retardiert war (Daniel Wöhl, unveröffentlichte Daten). Zusammengefasst ergibt sich daraus, dass Norrin das Einwachsen der Gefäße in die tieferen Schichten der Retina nicht über die Aktivierung des  $\text{Wnt}/\beta\text{-Catenin}$ -Signalwegs in Müllerzellen vermittelt. Vielmehr legen die Daten von Daniel Wöhl nahe, dass die Aktivierung des  $\text{Wnt}/\beta\text{-Catenin}$ -Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen bei diesem Prozess eine bedeutend Rolle einzunehmen scheint. Grundlegend hierfür scheint auch zu sein, dass Norrin, wie in entsprechenden *in vitro* Studien gezeigt werden konnte, die Proliferation, Migration und Tube Formation in mikrovaskulären Endothelzellen induziert (Ohlmann, Seitz et al. 2010).

Neben dem Einfluss des  $\text{Wnt}/\beta\text{-Catenin}$ -Signalwegs in Müllerzellen auf die physiologische Entwicklung der retinalen Gefäße wurde in weiteren Untersuchungen der Frage nachgegangen, ob dieser Signalweg möglicherweise auch einen Einfluss auf die Stabilität des etablierten Gefäßsystems hat. Grund hierfür waren Studien die darauf hindeuten, dass Müllerzellen für die Bildung der BRB von Bedeutung sind, da sie die Ausbildung von *Tight junctions* in Endothelzellen vermitteln (Tout, Chan-Ling et al. 1993; Wolburg, Liebner et al. 1999). Zudem produzieren sie eine Reihe von Faktoren die die Dichtigkeit der BRB positiv (z.B. *glial cell-line derived neurotrophic factor* GDNF, PEDF) (Igarashi, Chiba et al. 2000; Eichler, Yafai et al. 2004) oder negativ (z.B. TNF, VEGF) (Drescher and Whittum-Hudson 1996; Jingjing, Xue et al. 1999) regulieren. Wie anhand von Fluoreszenzangiographie nachgewiesen werden

konnte, zeigen auch *Ndp*<sup>fl/fl</sup> Mäuse Defekte innerhalb der BRB (Luhmann, Lin et al. 2005; Schafer, Luhmann et al. 2009). Zusätzlich ist bekannt, dass Norrin auch in der adulten Retina weiterhin kontinuierlich exprimiert wird (Ye, Wang et al. 2009). Aufgrund dieser Tatsachen wurden im Rahmen dieser Arbeit *Slc1a3-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Tiere im Alter von 8 Wochen nach entsprechender Tamoxifen-Behandlung untersucht. Bei der Analyse des retinalen Gefäßsystems, zwei Wochen nach Induktion des konditionellen Knockouts in Müllerzellen, zeigten sich keine auffälligen Veränderungen durch die Deletion von *Ctnnb1*. Alle drei Gefäßplexus waren regelrecht ausgebildet und die Kapillaren wiesen eine physiologische Morphologie auf. Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen zeigten zudem keinerlei Expression des Fenestrationsmarkers PLVAP in den retinalen Gefäßen. Lediglich innerhalb der Choriocapillaris, deren Kapillaren zur Versorgung der darüber liegenden Zellen des RPE sowie der Außensegmente der Photorezeptoren fenestriert sind, konnte PLVAP detektiert werden. Dementsprechend scheint der *Wnt/β-Catenin*-Signalweg in Müllerzellen keine offensichtliche Rolle im Bezug auf die Erhaltung des etablierten Gefäßsystems in der Retina sowie der Integrität der BRB zu spielen.

### **5.3 Einfluss des *Wnt/β-Catenin*-Signalwegs in Müllerzellen auf die Revaskularisierung der Retina nach OIR**

Die Daten, die in den Versuchen unter Verwendung des OIR-Modells generiert wurden, weisen darauf hin, dass über die Aktivierung des *Wnt/β-Catenin*-Signalwegs in Müllerzellen ein proangiogener Einfluss auf die Revaskularisierung von avaskulären Arealen sowie die Ausbildung von intraretinalen Kapillaren vermittelt wird. Ebenfalls konnte eine Beteiligung an der Formation von Neovaskularisationen festgestellt werden. Grundlegend für die Durchführung dieser Untersuchungen waren Erkenntnisse früherer Studien in denen gezeigt werden konnte, dass der kanonische *Wnt*-Signalweg neben der physiologischen Gefäßentwicklung in der Netzhaut auch eine bedeutende Rolle bei der Gefäßprotektion und sogar bei der Vermittlung von vaskulären Reparaturmechanismen spielt. Beispielsweise zeigen *βB1-Norrin* Mäuse, mit einer ektopen linsenspezifischen Überexpression von Norrin, nach OIR eine geringere Vasoobliteration im Vergleich zu wildtypischen Mäusen. Zusätzlich führt die

Norrin-Überexpression zu einer verbesserten Revaskularisierung nach OIR wobei es zu einem gerichteten Einwachsen der Gefäße in die avaskulären Netzhautareale kommt und die Bildung von Neovaskularisationen verhindert wird (Ohlmann, Seitz et al. 2010).

Die phänotypischen Auswertungen von Retinahäutchen sowie die quantitativen Analysen wurden nach gängigem Protokoll an P17 nach Hyperoxie (P7 bis P12) durchgeführt (Connor, Krahl et al. 2009). Die Induktion des konditionellen Knockouts erfolgte dabei im Anschluss an die Sauerstoffexposition. Es zeigte sich, dass die Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen zu einer um ca. 10% größeren avaskulären Zone im zentralen Bereich der Retina führt. Ein entsprechender Befund ergab sich im Bezug auf die Formation von intraretinalen Kapillaren, wobei die Deletion von *Ctnnb1* die Vaskularisierung einer kleineren Fläche zur Folge hatte. Beide Befunde lassen darauf schließen, dass es durch den Verlust des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signals in Müllerzellen nach hyperoxischem Schaden zu einem verzögerten Gefäßwachstum kommt. Dies steht im Widerspruch zu Befunden der physiologischen Entwicklung, bei denen keine Auswirkungen durch die Deletion von *Ctnnb1* beobachtet werden konnten. Eine wahrscheinliche Erklärung hierfür wäre, dass über den kanonischen Wnt-Signalweg, zumindest teilweise, die Aktivierung der Müllerzellen im Zuge einer Gliosereaktion vermittelt wird, woraufhin diese Faktoren ausschütten, um dem pathologischen Einfluss entgegen zu wirken. Wie bekannt ist, weisen Müllerzellen einen speziellen Metabolismus auf, in dem sie, sogar unter ausreichender Sauerstoffversorgung, primär anaerobe Glykolyse betreiben (Winkler, Arnold et al. 2000). Auf Grund dieser Tatsache sind Müllerzellen besonders resistent gegenüber Hypoxie (Winkler, Arnold et al. 2000). Dies befähigt sie auch dazu, auf eben diesen Einfluss zu reagieren und so, vor allem die neuronalen Zellen innerhalb der Retina, vor einer Schädigung zu schützen (Bringmann, Pannicke et al. 2006). Tatsächlich konnte bereits in einer Vielzahl von Studien gezeigt werden, dass Müllerzellen, beispielsweise unter hypoxischen Bedingungen, reaktiviert werden und Veränderungen in der Genexpression aufweisen. Charakteristisch für diesen Prozess ist hierbei die Induktion von GFAP und ERK (*extracellular signal regulated kinase*) (Bringmann and Reichenbach 2001; Takeda, Takamiya et al. 2002). Zudem wird vermehrt VEGF exprimiert, während zeitgleich die Expression von anti-angiogenen Faktoren wie PEDF, TSP-1 (Thrombospondin-1) und TGF $\beta$ 2 (*transforming growth factor  $\beta$* ) vermindert wird (Eichler, Yafai et al. 2004). In der gesunden Netzhaut ist



das Gleichgewicht zwischen diesen pro- und anti-angiogenen Faktoren entscheidend für die Aufrechterhaltung des Gefäßsystems (Bouck 2002; Volpert, Zaichuk et al. 2002). VEGF wird als zentraler Faktor konstitutiv im retinalen Gewebe exprimiert und vermittelt auf diese Weise ein Überlebenssignal an die Endothelzellen (Eichler, Yafai et al. 2004). Damit aber eine übermäßige Proliferation und Migration der Endothelzellen verhindert wird, werden Faktoren wie PEDF und TSP-1 ausgeschüttet um ein anti-proliferatives Milieu für die Endothelzellen zu etablieren (Eichler, Yafai et al. 2004; Bringmann, Pannicke et al. 2006). Unter pathologischen Bedingungen entsteht demnach eine Disbalance zu Gunsten des pro-angiogenen Faktors VEGF wodurch die endotheliale Proliferation begünstigt wird (D'Amore 1994). Auf Grund der Defizienz von  $\beta$ -Catenin in Müllerzellen, läuft dieser Prozess möglicherweise nur bedingt ab, so dass die Revaskularisierung verzögert ist. Allerdings weisen die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen, auf die im späteren noch detaillierter eingegangen wird, daraufhin, dass eine verminderte Expression von spezifischen angiogenen Faktoren wie IGF-1 und Angpt-2 ebenfalls an der verzögerten Revaskularisierung beteiligt sein könnte.

In den parallel dazu durchgeführten Analysen von Tieren mit einer Defizienz von  $\beta$ -Catenin in mikrovaskulären Endothelzellen zeigten sich ähnliche Befunde wie in den  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Tieren. Auch hier kam es zu einer verringerten Revaskularisierung in den vasoobliterierten Bereich und zu einer verminderten Formation von intraretinalen Kapillaren (Daniel Wöhl, unveröffentlichte Daten). In diesem Fall scheint hier aber weniger eine verminderte VEGF-Expression der Grund zu sein, da die Gliazellen in diesem Tiermodell unverändert sind. Wahrscheinlicher ist, dass der Verlust des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signals zu einer generellen Inhibition der Proliferation in den Endothelzellen führt. Wie bei *in vitro* Experimenten gezeigt werden konnte, führt eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen durch Behandlung mit Norrin zu einer gesteigerten Proliferation, Migration und Tube Formation (Ohlmann, Seitz et al. 2010). Anhand dieser These lässt sich auch erklären, dass in Retinae von  $Cdh5-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Tieren an P17 nach OIR im Vergleich zu den Kontrolltieren eine geringe Ausbildung von neovaskulären Tufts zu beobachten ist (Daniel Wöhl, unveröffentlichte Daten). Hingegen konnte an, in dieser Arbeit untersuchten Mäusen, nach Müllerzell-spezifischer Deletion von  $Ctnnb1$ , ein massiver Anstieg der Neovaskularisationen um das ca. 3-fache im Vergleich zu den Kontrolltieren detektiert werden. Dies lässt sich

ebenfalls durch das pro-angiogene Milieu erklären, welches, wie bereits oben detailliert beschrieben, durch die erhöhte Expression von VEGF und die gleichzeitige Reduktion von anti-angiogenen Faktoren zustande kommt. Zudem konnte in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Norrin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nicht in der Lage ist die Expression von VEGF zu induzieren. So konnten in primären Müllerzellen nach Behandlung mit Norrin keine veränderten Spiegel an VEGF mRNA nachgewiesen werden. Ebenso führte auch eine intravitreale Injektion von Norrin zu keinem Anstieg in der VEGF Expression. Auf Grund dieser Tatsachen scheint die VEGF-Induktion durch Hypoxie im retinalen Gewebe induziert zu werden, wodurch auch der Anstieg der Neovaskularisationen erklärt werden kann. Wie bekannt ist, spielt VEGF bei diesem Prozess eine entscheidende Rolle (D'Amore 1994). So konnte einerseits die Überexpression von VEGF in diesen Bereichen nachgewiesen werden. Zum anderen ist die Inhibierung von VEGF mittels Antikörpern der gängigste therapeutische Ansatz zur Verminderung von Neovaskularisation (Kim and D'Amore 2012). Im Gegensatz zu VEGF zeigte sich in den früheren *in vitro*-Analysen eine Induktion von Angpt2 und IGF-1 nach Behandlung mit Norrin. Dieser Effekt konnte durch die gleichzeitige Inkubation mit DKK-1, einem Antagonisten des Co-Rezeptors Lrp5/6 und damit Inhibitor des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs, wieder aufgehoben werden. Die Induktion dieser angiogenen Faktoren wird also vermutlich, zumindest teilweise, über die Aktivierung dieses Signalwegs vermittelt.

Zudem ist bekannt, dass eine Überexpression von Norrin zu einem gerichteten und physiologischen Gefäßwachstum in die avaskulären Areale führt und die Ausbildung von intraretinalen Gefäßen unterstützt während Neovaskularisationen unterbunden werden. Auch bei den im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte eine Verzögerung bei der Revaskularisierung sowie bei der Bildung der intraretinalen Kapillaren nach Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen beobachtet werden. In den Expressionsanalysen konnte hierbei eine um ca. 20% verminderte Expression von IGF-1 und Angpt-2 in der Retina von *Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen an P17 nach OIR nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass Norrin seine angiogenen Effekte in diesem Zusammenhang, zumindest teilweise, durch die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen und die dadurch induzierte Ausschüttung der angiogenen Faktoren IGF-1 und Angpt-2 vermittelt. Dafür spricht auch, dass sich auch *in vivo* bei  $\beta$ B1-Norrin Mäusen eine erhöhte Expression von IGF-1 nach OIR im

Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen zeigte, wobei zusätzlich nachgewiesen werden konnte, dass die verbesserte Revaskularisierung in  $\beta$ B1-Norrin Mäusen durch  $\alpha$ -IGF-1 Antikörper wieder vermindert wird (Zeilbeck L. et al., unveröffentlichte Daten). Desweiteren konnte *in vitro* an HRMEC auch eine Norrin-vermittelte Induktion von Angpt-2 nachgewiesen werden (Ohlmann, Seitz et al. 2010). Im Gegensatz zu IGF-1 und Angpt-2 konnte bei der Analyse der VEGF-Expression eine entsprechende Erhöhung der mRNA-Level festgestellt werden. Zwar wurde für diese, auf Grund der hohen Standardabweichung, keine Signifikanz erreicht, allerdings wurde eine entsprechende Induktion von VEGF nach OIR bereits mehrfach beschrieben (Shweiki, Itin et al. 1992; D'Amore 1994; Aiello, Northrup et al. 1995; Kim and D'Amore 2012). Wie bereits erwähnt, spielt VEGF eine zentrale Rolle bei der Ausbildung von pathologischen Neovaskularisationen. Demnach ist es möglich, dass der hier detektierte Anstieg in der VEGF-Expression eine Erklärung für die verstärkte Ausbildung von neovaskulären Tufts in  $Slc1a3-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  Mäusen nach OIR darstellt. Vorstellbar ist, dass VEGF hierbei, auf Grund der fehlenden anti-angiogenen Faktoren sowie der reduzierten Expression von spezifischen pro-angiogenen Faktoren wie IGF-1 und Angpt-2, die ein gerichtetes Wachstum induzieren könnten, eine übergeordnete Stellung einnimmt. Von den drei Isoformen die für VEGF bekannt sind, ist VEGF120 sehr und VEGF 164 mäßig löslich (Ng et al 2001; Stalmans I. 2005). Demnach sind diese Faktoren in der Lage in den Glaskörper zu diffundieren und die Proliferation der Endothelzellen in diesem Bereich verstärkt zu induzieren und damit die Ausbildung von neovaskulären Tufts zu fördern. Zusätzlich wird die VEGF-Expression durch die ausgeprägte Hypoxie im retinalen Gewebe verstärkt, die auf der verringerten Präsenz der spezifischen angiogenen Faktoren IGF-1 und Angpt-2, und dem daraus resultierendem verringerten Einwachsen der Gefäße, basiert. Zusammengefasst deuten diese Daten daraufhin, dass der endogene Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Müllerzellen während der hypoxischen Phase nach OIR eine wichtige Rolle bei der Revaskularisierung der vasoobliterierten Areale einnimmt. Als potenzielle nachgeschaltete Signalmoleküle könnten, zumindest teilweise, IGF-1 und Angpt-2 beteiligt sein.

## 5.4 Wirkung von Norrin auf die Revaskularisierung nach OIR bei $\beta$ -Catenin-Defizienz in Müller- und mikrovaskulären Endothelzellen

Basierend auf den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen zeigte sich, dass eine Überexpression von Norrin in der Linse auch bei Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen in der Lage ist die Revaskularisierung in vasoobliterierte Areale zu verbessern und ein gerichtetes Wachstum von intraretinalen Kapillaren zu induzieren. Parallel dazu wird die Entstehung von neovaskulären Tufts deutlich reduziert. Demnach ist davon auszugehen, dass Norrin seine proangiogenen Effekt nach OIR nicht über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen induziert.

Wie im vorangegangenen Abschnitt dargestellt führt die Deletion von *Ctnnb1* sowohl in Müller- als auch in mikrovaskulären Endothelzellen zu einer verminderten Revaskularisierung und zu Veränderungen in der Entstehung von Neovaskularisationen nach OIR. Zudem konnte in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bereits bei phänotypischen Untersuchungen von  $\beta$ B1-Norrin Mäusen eine verbesserte und anatomisch korrekte Revaskularisierung in vasoobliterierte Netzhautareale nachgewiesen werden. Auf Grund dessen sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Frage geklärt werden, ob Norrin diese angiogenen Effekte über beide Zelltypen (Müller- und/oder mikrovaskuläre Endothelzellen) vermittelt und ob dies ausschließlich über die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs erfolgt. Hierfür wurden dreifach transgene Tiere generiert, die neben der Deletion von *Ctnnb1* in Müller- oder mikrovaskulären Endothelzellen, eine transgene Überexpression von Norrin in der Linse aufweisen ( $\beta$ B1-Norrin/*Slc1a3-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> und  $\beta$ B1-Norrin/*Cdh5Cre-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup>).

Es ist bekannt, dass der genetische Hintergrund Einfluss auf die Ausbildung von avaskulären Arealen nach OIR hat (O'Bryhim, Radcliff et al. 2012). Bei der Zucht der dreifach transgenen Mäuse wurde ein Mischhintergrund aus FVBN und C57BL/6 generiert. Um dies zu berücksichtigen wurde im Zuge der phänotypischen Analysen zunächst untersucht ob die in den vorangegangenen Untersuchungen detektierte Unterschiede, in Bezug auf die verzögerte Revaskularisierung, eine verminderte Ausbildung von intraretinalen Gefäßen sowie die gesteigerte Neovaskularisation in *Slc1a3-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Mäusen im Vergleich zu den *Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup> Mäusen bestätigt werden konnten. Zwar konnte eine Signifikanz nur im Bezug auf die Größe der

avaskulären Zone erreicht werden. Bei den Analysen bezüglich der Größe der Fläche der intraretinalen Kapillaren und der Neovaskularisationen konnte aber eine entsprechende Tendenz beobachtet werden. Das Nichterreichen des Signifikanzniveaus ist dabei in der hohen Standardabweichung begründet, die auf einer zu geringen Anzahl von untersuchten Tieren basiert. Dennoch scheint der durch die Zucht entstandene Mischhintergrund der Tiere aus FVBN und C57BL/6 keinen offensichtlichen Einfluss auf die Ausprägung des retinalen Gefäßphänotyps zu haben. Weiterhin konnte eine signifikant verbesserte Revaskularisierung in vasoobliterierte Areale, Ausbildung der intraretinalen Gefäße sowie eine signifikant verringerte Neovaskularisation in der Netzhaut von Tieren mit einer linsenspezifischen Überexpression von Norrin ( $\beta$ B1-Norrin/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>) nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den Daten überein, die im Zuge der Untersuchung von  $\beta$ B1-Norrin Mäusen im Vergleich zu Wildtypen durchgeführt wurden (Ohlmann, Seitz et al. 2010). Auf Grund dessen finden sich in Retinae dieser Tiere keine bzw. nur noch sehr kleine vasoobliterierte Flächen sowohl im Bereich des oberflächlichen als auch der intraretinalen Plexus. Ebenfalls sind kaum neovaskuläre Tufts detektierbar (Ohlmann, Seitz et al. 2010). Im Vergleich zu Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen zeigte sich in den Retinae der dreifach transgenen Tiere eine deutlich kleinere vasoobliterierte Zone, eine größere Fläche an intraretinalen Kapillaren sowie eine reduzierte Ausbildung von neovaskulären Tufts. Für alle diese Befunde konnte in der quantitativen Auswertung eine Signifikanz erreicht werden. Interessanterweise weist der retinale Gefäßphänotyp der dreifach transgenen Tiere damit eine große Ähnlichkeit zu dem der Norrin-Überexpressionsmäuse  $\beta$ B1-Norrin/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> auf. Daraus ergibt sich, dass eine Überexpression von Norrin in der Netzhaut die durch Deletion von Ctnnb1 in Müllerzellen entstandenen Defekte bei den vaskulären Reparaturmechanismen nach OIR vollständig aufhebt. Darüberhinaus wird die Revaskularisierung in vasoobliterierte Areale, die Ausbildung von intraretinalen Gefäßen in einem Umfang verbessert der den in Norrin-Überexpressionsmäusen entspricht. Gleiches gilt für die Vermeidung der Bildung von Neovaskularisationen. Folglich weisen diese Ergebnisse daraufhin, dass Norrin nach OIR seine angiogenen Effekte vermutlich nicht über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen vermittelt. Möglicherweise kommt es durch das ektope Norrin zu einer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in Endothelzellen, wobei die gesteigerte Aktivität auf Grund der Überexpression zu einer Kompensation des

fehlenden Signals in den Müllerzellen führt. Dafür sprechen auch Ergebnisse die im Zuge von *in vitro*-Analysen generiert wurden. Dabei zeigte sich eine gesteigerte Aktivität des endogenen Wnt-Signalwegs in nicht konfluenten Endothelzellen und demnach unter proliferativen Konditionen im Gegensatz zu konfluenten Endothelzellen (Goodwin, Sullivan et al. 2006). Diese Beobachtung wird durch *in vivo* Beobachtungen gestützt wobei in ausdifferenzierten Gefäßen nur in sehr geringem Umfang cytosolisches  $\beta$ -Catenin detektiert werden konnte, wohingegen in den Endothelzellen während der Embryonalentwicklung große Mengen an  $\beta$ -Catenin im Cytoplasma sowie im Nukleus nachgewiesen werden konnten (Eberhart and Argani 2001). Dass Norrin seine angiogenen Effekte nach OIR vor allem durch Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Endothelzellen vermittelt, wird auch durch die Ergebnisse gestützt, die im Zuge der Untersuchung von  $\beta$ B1-Norrin/Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tieren generiert wurden. Im Gegensatz zu den  $\beta$ B1-Norrin/Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Mäusen, konnte eine Überexpression von Norrin in der Netzhaut von Tieren mit einer Deletion von Ctnnb1 in mikrovaskulären Endothelzellen die dadurch entstandenen negativen Auswirkungen auf die vaskulären Reparaturmechanismen nach OIR nicht vermeiden. Weder die Revaskularisierung vasoobliterierter Areale noch die Ausbildung von intraretinalen Gefäßen konnte verbessert werden. Vielmehr fand sich ein immenser Anstieg von Neovaskularisationen. Auch hier ist zu erwähnen, dass auch in dieser Linie der genetische Mischhintergrund der Tiere aus FVBN und C57BL/6 keine offensichtlichen Auswirkungen auf die Ausbildung von avaskulären Arealen nach OIR zu haben scheint. Im Zuge der phänotypischen Analyse wurden dafür, wie bereits bei Tieren der  $\beta$ B1-Norrin/Slc1a3-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Linie, Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>/Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tiere und Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Tiere verglichen. Hierbei konnten die durch Daniel Wöhl generierten Daten weitestgehend bestätigt werden. In Tieren mit einer Deletion von Ctnnb1 in mikrovaskulären Endothelzellen konnte eine größere vasoobliterierte Zone sowie ein kleineres Areal an intraretinalen Kapillaren gegenüber den Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren nachgewiesen werden. Ebenso fiel dabei die Ausbildung von neovaskulären Tufts geringer aus. Auf Grund der geringen Tierzahl konnte in den Versuchen dieser Arbeit eine Signifikanz allerdings nur für die Größe der avaskulären Zone erreicht werden. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass die ektopische Überexpression bei Tieren mit einer Defizienz von  $\beta$ -Catenin in mikrovaskulären Endothelzellen die Revaskularisierung der vasoobliterierten Netzhautareale sowie die Formation von

intraretinalen Gefäßen nach OIR nicht verbessert. Ebenso konnte die Ausbildung von Neovaskularisationen nicht vermieden werden. Norrin scheint demnach seine angiogenen Effekte nach OIR Großteils über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen zu vermitteln. Dies entspricht der momentanen Erkenntnislage insofern, dass Norrin wie mittels *in vitro* Analysen gezeigt werden konnte, in der Lage ist neben der Proliferation auch die Migration und Tube Formation in retinalen mikrovaskulären Endothelzellen zu induzieren. Zusätzlich führte die Behandlung dieser Zellen mit Norrin auch zu einer Induktion in der Expression von angiogenen Faktoren wie Angpt-2 und IGF-1 (Ohlmann, Seitz et al. 2010). *In vitro* konnte zudem gezeigt werden, dass der endogene Wnt-Signalweg in Endothelzellen unter proliferativen Umständen induziert wird und demnach bei der Angiogenese eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Goodwin, Sullivan et al. 2006). Zudem ist bekannt, dass die Aktivierung des kanonischen Signalwegs durch Norrin ein gerichtetes Gefäßwachstum induzieren kann (Ohlmann, Seitz et al. 2010). Bleibt eine entsprechende Aktivierung auf Grund des Verlusts von  $\beta$ -Catenin aus, so unterbleibt auch die Revaskularisierung. Interessanterweise konnte im Gegensatz dazu, ein starker Anstieg in der Ausbildung von Neovaskularisationen beobachtet werden, wodurch zum Teil sogar sehr große Areale der Netzhaut betroffen waren. Bekannt ist allerdings, dass der kanonische Wnt-Signalweg eine bedeutende Rolle für die Proliferation von Endothelzellen spielt. Dies konnte sowohl in den von Daniel Wöhl als auch durch die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen beobachtet werden, da die Deletion von *Ctnnb1* in mikrovaskulären Endothelzellen zu einer verminderten Ausbildung von neovaskulären Tufts nach OIR führte. Entsprechend diesen Ergebnissen ist davon auszugehen, dass Norrin seine angiogenen Effekte möglicherweise auch über die Aktivierung anderer Signalwege vermitteln kann. Vorstellbar wäre hierbei die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs. Dafür spricht, dass in Rpe65-Norrin-Mäusen mit einer Überexpression von Norrin im RPE eine gesteigerte Phosphorylierung von Akt nachgewiesen werden konnte (Braunger, Ohlmann et al. 2013). Wie bereits bekannt ist, stehen die beiden Signalwege (der kanonische Wnt- und der PI3K/Akt Signalweg) über die GSK3 $\beta$  eng miteinander in Verbindung (Kato 2006). Interessant wäre es hierbei auch die Expression von IGF-1 zu untersuchen. Diese kann, wie bereits *in vitro* gezeigt werden konnte, in Müllerzellen durch die Behandlung mit Norrin induziert werden (Zeilbeck, L. nicht veröffentlichte Daten). Nach Daten aus früheren Studien könnte

IGF-1 demnach die durch VEGF, über Aktivierung des MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Signalwegs, vermittelten angiogenen Effekte fördern (Smith, Shen et al. 1999; Hellstrom, Perruzzi et al. 2001). Da VEGF in direktem Zusammenhang mit der Entstehung von Neovaskularisationen steht (Pierce, Avery et al. 1995; Ozaki, Hayashi et al. 1997), könnte dies eine mögliche Erklärung für deren verstärkte Ausbildung nach Deletion von *Ctnnb1* in mikrovaskulären Endothelzellen liefern.

Darüber hinaus kann spekuliert werden, ob Norrin auch an der Bildung von neuen undifferenzierten Gefäßen, im Sinne einer Vaskulogenese, beteiligt sein könnte. Neben der verstärkten Ausbildung von Neovaskularisationen konnten zudem plumpe großlumige Gefäßformationen detektiert werden, die auf undifferenzierte Gefäße hindeuten. Um diese Zellen allerdings näher zu identifizieren müssten weiterführende Analysen durchgeführt werden. Denkbar wäre die Durchführung von immunhistochemischen Untersuchungen, beispielsweise auf die Expression von, Tie-2 und CD31, beides Marker für differenzierte Endothelzellen (Peters, Kontos et al. 2004; Privratsky and Newman 2014). Im Gegensatz dazu könnte eine immunhistochemische Färbung auf VEGFR2 zur Detektion von Angioblasten durchgeführt werden, um so einen möglichen Hinweis für Vaskulogenese zu erhalten (Yamaguchi, Dumont et al. 1993; Fruttiger 2002). Bisher spricht die Datenlage eher dagegen, dass der Prozess der Vaskulogenese, zumindest während der physiologischen Vaskularisierung der Retina, in der Maus eine Rolle spielt (Fruttiger 2002). Nicht auszuschließen ist aber eine Beteiligung unter pathologischen Umständen als kompensatorischer Prozess bei einem Verlust von zentralen angiogenen Faktoren.

Zusammenfassend lässt sich an Hand der in dieser Arbeit gewonnen Daten der Schluss ziehen, dass Norrin seine angiogenen Effekte unter physiologischen Bedingungen nicht über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen vermittelt. Vielmehr spielt hierbei die Aktivierung dieses Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen eine Rolle. In Bezug auf die vaskulären Reparaturmechanismen nach OIR ist der kanonische Wnt-Signalweg in Müllerzellen zwar involviert, wobei die Effekte zumindest teilweise über Angpt-2 und IGF-1 vermittelt werden, allerdings spielt er auch dort lediglich eine untergeordnete Rolle. Primär scheint Norrin seine angiogenen Effekte unter pathologischen Bedingungen über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen zu vermitteln.



## 6 Zusammenfassung

Norrin ist ein sezerniertes Signalprotein, das in der Netzhaut von Müllerzellen exprimiert wird wobei seine angiogenen Effekte über Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs vermittelt werden. Wie sich in Tieren mit einem kompletten Knockout des entsprechenden Gens *Ndp* zeigte, wird hierdurch die Ausbildung von intraretinalen Gefäßen vollständig verhindert. Eine Überexpression von Norrin in der Linse führt zur Aufhebung des Phänotyps in *Ndp*<sup>-/-</sup> Tieren und scheint somit eine essentielle Rolle bei der retinalen Vaskularisierung während der Entwicklung zu spielen. Darüberhinaus induziert eine Norrin-Überexpression in Wildtyp-Mäusen die gerichtete und anatomisch korrekte Revaskularisierung in vasoobliterierte Netzhautareale nach hyperoxischem Schaden und vermindert die Ausbildung von pathologischen Neovaskularisationen.

Im Zuge dieser Dissertation sollte die Frage geklärt werden, welche Rolle die Norrin-vermittelte Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in Müllerzellen auf die retinale Vaskularisierung während der physiologischen Entwicklung bzw. auf die Revaskularisierungsprozesse nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (OIR) spielt.

Um dies zu untersuchen wurden Mäuse mit einer Tamoxifen-induzierbaren konditionellen Deletion von  $\beta$ -Catenin in Müllerzellen (*Slc1a3-Cre*<sup>ERT2</sup>/*Ctnnb1*<sup>fl/fl</sup>) verwendet. Die Charakterisierung dieser Linie bestätigte eine spezifische Expression der Cre-Rekombinase in Müllerzellen die zu einer Reduktion von  $\beta$ -Catenin auf Proteinebene führte. Die phänotypische Analyse von retinalen Häutchenpräparaten zeigte nach Deletion von *Ctnnb1* in Müllerzellen eine verzögerte Regression der hyaloidalen Gefäße einhergehend mit einer retardierten Ausbildung des oberflächlichen Gefäßplexus. Beides wurde im altersprogressiven Verlauf aber wieder ausgeglichen. Letztendlich kam es zu einer regelrechten physiologischen Ausbildung aller drei retinalen Gefäßplexus die am postnatalen Tag (P)21 vollständig abgeschlossen war. Bei der Analyse des retinalen Gefäßsystems in adulten Tieren konnten keine morphologischen Veränderungen beobachtet werden, wonach der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Müllerzellen keinen Einfluss auf dessen Stabilität zu haben scheint. Ebenso konnte keine Beteiligung an der Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke nachgewiesen werden. Neben dem geringen Einfluss des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen auf das retinale Gefäßsystem unter

physiologischen Bedingungen, wurde auch dessen Bedeutung bei vaskulären Reparaturmechanismen untersucht. Nach OIR zeigte sich in Mäusen mit einer Müllerzell-spezifischen Deletion von *Ctnnb1* eine verzögerte Revaskularisierung in vasoobliterierte Areale und eine retardierte Ausbildung von intraretinalen Kapillaren. Zusätzlich konnte ein starker Anstieg in Bezug auf die Entstehung von pathologischen Neovaskularisationen beobachtet werden. Entsprechende Expressionsanalysen deuten daraufhin, dass diese Effekte vermutlich über eine verminderte Expression von angiogenen Faktoren wie IGF-1 und Angpt-2 vermittelt werden.

In parallelen Studien in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Defizienz von  $\beta$ -Catenin in mikrovaskulären Endothelzellen ebenfalls zu einer verminderten Revaskularisierung nach OIR führt, wobei auch die Ausbildung von neovaskulären Tufts vermindert ist. Auf Grund dessen sollte im Zuge dieser Arbeit geklärt werden, ob Norrin seine angiogenen Effekte unter pathologischen Bedingungen über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müller- und/oder mikrovaskulären Endothelzellen vermittelt. Hierfür wurden dreifach transgene Tiere generiert, die neben der jeweiligen zellspezifischen Deletion von *Ctnnb1* eine Überexpression von Norrin in der Linse aufweisen. Wie die phänotypischen Analysen ergaben, ist die Überexpression von Norrin in der Lage die durch  $\beta$ -Catenin-Defizienz in Müllerzellen entstandenen negativen Einflüsse vollständig aufzuheben und darüberhinaus die Revaskularisierung in vasoobliterierte Areale zu verbessern und Neovaskularisationen zu verhindern. Im Gegensatz dazu konnte ektopes Norrin in Tieren mit einer  $\beta$ -Catenin-Defizienz in mikrovaskulären Endothelzellen die Revaskularisierung nicht verbessern. Es zeigte sich sogar ein starker Anstieg an Neovaskularisation. In Bezug auf die vaskulären Reparaturmechanismen scheint Norrin seine angiogenen Effekte demnach vor allem über den kanonischen Wnt-Signalweg in Endothelzellen zu vermitteln.

## 7 Anhang

### 7.1 Literaturverzeichnis

- Aiello, L. P., J. M. Northrup, et al. (1995). "Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells." Arch Ophthalmol **113**(12): 1538-1544.
- Aiello, L. P., E. A. Pierce, et al. (1995). "Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(23): 10457-10461.
- Amin, R. H., R. N. Frank, et al. (1997). "Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(1): 36-47.
- Andersen, S. R. and M. Warburg (1961). "Norrie's disease: congenital bilateral pseudotumor of the retina with recessive X-chromosomal inheritance; preliminary report." Arch Ophthalmol **66**: 614-618.
- Battinelli, E. M., Y. Boyd, et al. (1996). "Characterization and mapping of the mouse NDP (Norrie disease) locus (Ndp)." Mamm Genome **7**(2): 93-97.
- Bayraktar, O. A., L. C. Fuentealba, et al. (2015). "Astrocyte Development and Heterogeneity." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **7**(1).
- Berg Jeremy M., J. L. T., Lubert Stryer (2003). "Biochemie." Spektrum Akademischer Verlag Gmbh Heidelberg **5. Auflage**: 1153.
- Berger, W., D. van de Pol, et al. (1996). "An animal model for Norrie disease (ND): gene targeting of the mouse ND gene." Hum Mol Genet **5**(1): 51-59.
- Boehm, B. O., G. Lang, et al. (2003). "Low content of the natural ocular anti-angiogenic agent pigment epithelium-derived factor (PEDF) in aqueous humor predicts progression of diabetic retinopathy." Diabetologia **46**(3): 394-400.
- Braunger, B. M., A. Ohlmann, et al. (2013). "Constitutive overexpression of Norrin activates Wnt/beta-catenin and endothelin-2 signaling to protect photoreceptors from light damage." Neurobiol Dis **50**: 1-12.
- Bringmann, A., T. Pannicke, et al. (2006). "Muller cells in the healthy and diseased retina." Prog Retin Eye Res **25**(4): 397-424.
- Chan-Ling, T. (2010). "Development of the Retinal Vasculature." Editor-in-Chief: Darlene A. Dartt (ed) Encyclopedia of the Eye. Academic Press, Oxford.: pp. 22–33.
- Chan-Ling, T., D. S. McLeod, et al. (2004). "Astrocyte-endothelial cell relationships during human retinal vascular development." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(6): 2020-2032.
- Chomczynski, P. (1993). "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples." Biotechniques **15**(3): 532-534, 536-537.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.
- Connor, K. M., N. M. Krah, et al. (2009). "Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis." Nat Protoc **4**(11): 1565-1573.
- D'Amore, P. A. (1994). "Mechanisms of retinal and choroidal neovascularization." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(12): 3974-3979.

- Dawson, D. W., O. V. Volpert, et al. (1999). "Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis." Science **285**(5425): 245-248.
- Diez-Roux, G. and R. A. Lang (1997). "Macrophages induce apoptosis in normal cells in vivo." Development **124**(18): 3633-3638.
- Donnai, D., R. C. Mountford, et al. (1988). "Norrie disease resulting from a gene deletion: clinical features and DNA studies." J Med Genet **25**(2): 73-78.
- Dorrell, M. I., E. Aguilar, et al. (2002). "Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(11): 3500-3510.
- Dorrell, M. I. and M. Friedlander (2006). "Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina." Progress in Retinal and Eye Research **25**(3): 277-295.
- Dreher, Z., S. R. Robinson, et al. (1992). "Muller cells in vascular and avascular retinae: a survey of seven mammals." J Comp Neurol **323**(1): 59-80.
- Drescher, K. M. and J. A. Whittum-Hudson (1996). "Herpes simplex virus type 1 alters transcript levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in retinal glial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **37**(11): 2302-2312.
- Eberhart, C. G. and P. Argani (2001). "Wnt signaling in human development: beta-catenin nuclear translocation in fetal lung, kidney, placenta, capillaries, adrenal, and cartilage." Pediatr Dev Pathol **4**(4): 351-357.
- Eichler, W., Y. Yafai, et al. (2004). "PEDF derived from glial Muller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis." Exp Cell Res **299**(1): 68-78.
- Fong, G. H. (2009). "Regulation of angiogenesis by oxygen sensing mechanisms." J Mol Med (Berl) **87**(6): 549-560.
- Fortes Filho, J. B., G. U. Eckert, et al. (2010). "The influence of gestational age on the dynamic behavior of other risk factors associated with retinopathy of prematurity (ROP)." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **248**(6): 893-900.
- Fruttiger, M. (2002). "Development of the Mouse Retinal Vasculature: Angiogenesis Versus Vasculogenesis." Investigative Ophthalmology & Visual Science **43**(2): 522-527.
- Fruttiger, M. (2007). "Development of the retinal vasculature." Angiogenesis **10**(2): 77-88.
- Gariano, R. F. (2003). "Cellular mechanisms in retinal vascular development." Progress in Retinal and Eye Research **22**(3): 295-306.
- Gerhardt, H., M. Golding, et al. (2003). "VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia." The Journal of Cell Biology **161**(6): 1163-1177.
- Goodwin, A. M., K. M. Sullivan, et al. (2006). "Cultured endothelial cells display endogenous activation of the canonical Wnt signaling pathway and express multiple ligands, receptors, and secreted modulators of Wnt signaling." Dev Dyn **235**(11): 3110-3120.
- Hartzer, M. K., M. Cheng, et al. (1999). "Localization of the Norrie disease gene mRNA by in situ hybridization." Brain Res Bull **49**(5): 355-358.
- He, X., M. Semenov, et al. (2004). "LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way." Development **131**(8): 1663-1677.
- Heckmann, M. (2008). "Pathogenese der Retinopathia praematurorum." Der Ophthalmologe **105**(12): 1101-1107.
- Hellstrom, A., E. Engstrom, et al. (2003). "Postnatal serum insulin-like growth factor I deficiency is associated with retinopathy of prematurity and other complications of premature birth." Pediatrics **112**(5): 1016-1020.

- Hellstrom, A., C. Perruzzi, et al. (2001). "Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(10): 5804-5808.
- Hellstrom, M., M. Kalen, et al. (1999). "Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse." Development **126**(14): 3047-3055.
- Honjo, M., H. Tanihara, et al. (2000). "Differential expression of cadherin adhesion receptors in neural retina of the postnatal mouse." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(2): 546-551.
- Hsieh, M., D. Boerboom, et al. (2005). "Mice null for Frizzled4 (Fzd4<sup>-/-</sup>) are infertile and exhibit impaired corpora lutea formation and function." Biol Reprod **73**(6): 1135-1146.
- Hughes, S., H. Yang, et al. (2000). "Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(5): 1217-1228.
- Huh, W. J., S. S. Khurana, et al. (2012). "Tamoxifen induces rapid, reversible atrophy and metaplasia in mouse stomach." Gastroenterology **142**(1): 21-24.e27.
- Igarashi, Y., H. Chiba, et al. (2000). "Expression of receptors for glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and neurturin in the inner blood-retinal barrier of rats." Cell Struct Funct **25**(4): 237-241.
- Ishida, S., K. Yamashiro, et al. (2003). "Leukocytes mediate retinal vascular remodeling during development and vaso-obliteration in disease." Nat Med **9**(6): 781-788.
- Jadhav, A. P., K. Roesch, et al. (2009). "Development and neurogenic potential of Muller glial cells in the vertebrate retina." Prog Retin Eye Res **28**(4): 249-262.
- Jingjing, L., Y. Xue, et al. (1999). "Human Muller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(3): 752-759.
- Johnson, J., T. K. Chen, et al. (1996). "Multiple gamma-Aminobutyric acid plasma membrane transporters (GAT-1, GAT-2, GAT-3) in the rat retina." J Comp Neurol **375**(2): 212-224.
- Junge, H. J., S. Yang, et al. (2009). "TSPAN12 Regulates Retinal Vascular Development by Promoting Norrin- but Not Wnt-Induced FZD4/ $\beta$ -Catenin Signaling." Cell **139**(2): 299-311.
- Kanai, Y., B. Clemencon, et al. (2013). "The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family." Mol Aspects Med **34**(2-3): 108-120.
- Kato, M., M. S. Patel, et al. (2002). "Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor." J Cell Biol **157**(2): 303-314.
- Katoh, M. (2006). "Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3beta to regulate beta-catenin and SNAIL signaling cascades." Cancer Biol Ther **5**(9): 1059-1064.
- Kim, L. A. and P. A. D'Amore (2012). "A brief history of anti-VEGF for the treatment of ocular angiogenesis." Am J Pathol **181**(2): 376-379.
- Konstantin, B. A. B. (2007). "Duale Reihe Anatomie." Georg Thieme Verlag Stuttgart Ausgabe **1**: 1064-1075.
- Krohne, T. U., S. Aisenbrey, et al. (2012). "[Current therapeutic options in retinopathy of prematurity]." Ophthalmologe **109**(12): 1189-1197.
- Kubota, Y. and T. Suda (2009). "Feedback mechanism between blood vessels and astrocytes in retinal vascular development." Trends Cardiovasc Med **19**(2): 38-43.
- Leone, D. P., S. t. Genoud, et al. (2003). "Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells." Molecular and Cellular Neuroscience **22**(4): 430-440.

- Lindahl, P., B. R. Johansson, et al. (1997). "Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice." Science **277**(5323): 242-245.
- Lofqvist, C., E. Andersson, et al. (2006). "Longitudinal postnatal weight and insulin-like growth factor I measurements in the prediction of retinopathy of prematurity." Arch Ophthalmol **124**(12): 1711-1718.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 781-810.
- Luhmann, U. F., J. Lin, et al. (2005). "Role of the Norrie disease pseudoglioma gene in sprouting angiogenesis during development of the retinal vasculature." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(9): 3372-3382.
- Luhmann, U. F., D. Meunier, et al. (2005). "Fetal loss in homozygous mutant Norrie disease mice: a new role of Norrin in reproduction." Genesis **42**(4): 253-262.
- MacDonald, B. T., K. Tamai, et al. (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." Dev Cell **17**(1): 9-26.
- Meindl, A., W. Berger, et al. (1992). "Norrie disease is caused by mutations in an extracellular protein resembling C-terminal globular domain of mucins." Nat Genet **2**(2): 139-143.
- Meitinger, T., A. Meindl, et al. (1993). "Molecular modelling of the Norrie disease protein predicts a cystine knot growth factor tertiary structure." Nat Genet **5**(4): 376-380.
- Mori, T., K. Tanaka, et al. (2006). "Inducible gene deletion in astroglia and radial glia—A valuable tool for functional and lineage analysis." Glia **54**(1): 21-34.
- Mudhar, H. S., R. A. Pollock, et al. (1993). "PDGF and its receptors in the developing rodent retina and optic nerve." Development **118**(2): 539-552.
- Nagelhus, E. A., Y. Horio, et al. (1999). "Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains." Glia **26**(1): 47-54.
- Newman, E. and A. Reichenbach (1996). "The Muller cell: a functional element of the retina." Trends Neurosci **19**(8): 307-312.
- Nikopoulos, K., H. Venselaar, et al. (2010). "Overview of the mutation spectrum in familial exudative vitreoretinopathy and Norrie disease with identification of 21 novel variants in FZD4, LRP5, and NDP." Hum Mutat **31**(6): 656-666.
- Norrie, G. (1927). "Causes of blindness in children." Acta ophthalmol. (Copenh.) **5**: 377-386.
- O'Bryhim, B. E., J. Radel, et al. (2012). "The genetic control of avascular area in mouse oxygen-induced retinopathy." Molecular Vision **18**: 377-389.
- Ohlmann, A., M. Scholz, et al. (2005). "Ectopic Norrin Induces Growth of Ocular Capillaries and Restores Normal Retinal Angiogenesis in Norrie Disease Mutant Mice." The Journal of Neuroscience **25**(7): 1701-1710.
- Ohlmann, A., R. Seitz, et al. (2010). "Norrin promotes vascular regrowth after oxygen-induced retinal vessel loss and suppresses retinopathy in mice." J Neurosci **30**(1): 183-193.
- Ohlmann, A. and E. R. Tamm (2012). "Norrin: Molecular and functional properties of an angiogenic and neuroprotective growth factor." Progress in Retinal and Eye Research **31**(3): 243-257.
- Ohlmann, A. V., E. Adamek, et al. (2004). "Norrie Gene Product Is Necessary for Regression of Hyaloid Vessels." Investigative Ophthalmology & Visual Science **45**(7): 2384-2390.
- Otori, Y., S. Shimada, et al. (1994). "Marked increase in glutamate-aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA following transient retinal ischemia." Brain Res Mol Brain Res **27**(2): 310-314.

- Ozaki, H., H. Hayashi, et al. (1997). "Intravitreal sustained release of VEGF causes retinal neovascularization in rabbits and breakdown of the blood-retinal barrier in rabbits and primates." Exp Eye Res **64**(4): 505-517.
- Paes, K. T., E. Wang, et al. (2011). "Frizzled 4 is required for retinal angiogenesis and maintenance of the blood-retina barrier." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(9): 6452-6461.
- Perez-Vilar, J. and R. L. Hill (1997). "Norrie Disease Protein (Norrin) Forms Disulfide-linked Oligomers Associated with the Extracellular Matrix." Journal of Biological Chemistry **272**(52): 33410-33415.
- Peters, K. G., C. D. Kontos, et al. (2004). "Functional significance of Tie2 signaling in the adult vasculature." Recent Prog Horm Res **59**: 51-71.
- Pierce, E. A., R. L. Avery, et al. (1995). "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(3): 905-909.
- Privratsky, J. and P. Newman (2014). "PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity." Cell and Tissue Research **355**(3): 607-619.
- Provis, J. M. (2001). "Development of the Primate Retinal Vasculature." Progress in Retinal and Eye Research **20**(6): 799-821.
- Rehm, H. L., G. A. Gutierrez-Espeleta, et al. (1997). "Norrie disease gene mutation in a large Costa Rican kindred with a novel phenotype including venous insufficiency." Hum Mutat **9**(5): 402-408.
- Reichenbach, A. and W. Reichelt (1986). "Postnatal development of radial glial (Muller) cells of the rabbit retina." Neurosci Lett **71**(2): 125-130.
- Reichenbach, A., J. U. Stolzenburg, et al. (1993). "What do retinal muller (glial) cells do for their neuronal 'small siblings'?" J Chem Neuroanat **6**(4): 201-213.
- Richter, M., J. Gottanka, et al. (1998). "Retinal vasculature changes in Norrie disease mice." Investigative Ophthalmology & Visual Science **39**(12): 2450-2457.
- Ruether, K., D. van de Pol, et al. (1997). "Retinoschisislike alterations in the mouse eye caused by gene targeting of the Norrie disease gene." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(3): 710-718.
- Saint-Geniez, M. and P. A. D'Amore (2004). "Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature." Int J Dev Biol **48**(8-9): 1045-1058.
- Saint-Geniez, M., A. S. Maharaj, et al. (2008). "Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on muller cells and photoreceptors." PLoS One **3**(11): e3554.
- Salhia, B., L. Angelov, et al. (2000). "Expression of vascular endothelial growth factor by reactive astrocytes and associated neovascularization." Brain Res **883**(1): 87-97.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual."
- Schafer, N. F., U. F. Luhmann, et al. (2009). "Differential gene expression in Ndpk-knockout mice in retinal development." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(2): 906-916.
- Schmitt, A., E. Asan, et al. (1997). "Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: nonradioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry." J Neurosci **17**(1): 1-10.
- Scott, A. and M. Fruttiger (2009). "Oxygen-induced retinopathy: a model for vascular pathology in the retina." Eye **24**(3): 416-421.
- Seiberth, V. and O. Linderkamp (2000). "Risk factors in retinopathy of prematurity. a multivariate statistical analysis." Ophthalmologica **214**(2): 131-135.

- Seitz, R., S. Hackl, et al. (2010). "Norrin mediates neuroprotective effects on retinal ganglion cells via activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway and the induction of neuroprotective growth factors in Muller cells." J Neurosci **30**(17): 5998-6010.
- Shastry, B. S. and M. T. Trese (2003). "Overproduction and partial purification of the Norrie disease gene product, norrin, from a recombinant baculovirus." Biochem Biophys Res Commun **312**(1): 229-234.
- Shweiki, D., A. Itin, et al. (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." Nature **359**(6398): 843-845.
- Siemerink, M. J., A. J. Augustin, et al. (2010). "Mechanisms of ocular angiogenesis and its molecular mediators." Dev Ophthalmol **46**: 4-20.
- Singer, D. and C. Muhlfeld (2007). "Perinatal adaptation in mammals: the impact of metabolic rate." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **148**(4): 780-784.
- Smallwood, P. M., J. Williams, et al. (2007). "Mutational Analysis of Norrin-Frizzled4 Recognition." Journal of Biological Chemistry **282**(6): 4057-4068.
- Smith, L. E. (2003). "Pathogenesis of retinopathy of prematurity." Semin Neonatol **8**(6): 469-473.
- Smith, L. E., W. Shen, et al. (1999). "Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor." Nat Med **5**(12): 1390-1395.
- Smith, L. E., E. Wesolowski, et al. (1994). "Oxygen-induced retinopathy in the mouse." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(1): 101-111.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Analytical Biochemistry **150**(1): 76-85.
- Stahl, A., K. M. Connor, et al. (2010). "The Mouse Retina as an Angiogenesis Model." Investigative Ophthalmology & Visual Science **51**(6): 2813-2826.
- Stone, J., A. Itin, et al. (1995). "Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia." J Neurosci **15**(7 Pt 1): 4738-4747.
- Strauss, O. (2009). "[The role of retinal pigment epithelium in visual functions]." Ophthalmologie **106**(4): 299-304.
- Tout, S., T. Chan-Ling, et al. (1993). "The role of Muller cells in the formation of the blood-retinal barrier." Neuroscience **55**(1): 291-301.
- Uckermann, O., L. Vargova, et al. (2004). "Glutamate-evoked alterations of glial and neuronal cell morphology in the guinea pig retina." J Neurosci **24**(45): 10149-10158.
- Umopathy, N. S., W. Li, et al. (2005). "Expression and function of glutamine transporters SN1 (SNAT3) and SN2 (SNAT5) in retinal Muller cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(11): 3980-3987.
- Wallace, D. K., J. A. Kylstra, et al. (2000). "Poor postnatal weight gain: a risk factor for severe retinopathy of prematurity." J AAPOS **4**(6): 343-347.
- Warburg, M. (1961). "Norrie disease: a new hereditary bilateral pseudotumor of the retina." Acta ophthalmol. **39**: 757-772.
- Warburg, M. (1963). "Norrie's disease (atrofia bulborum hereditaria)." Acta Ophthalmol (Copenh) **41**: 134-146.
- Warburg, M. (1966). "Norrie's disease. A congenital progressive oculo-acoustico-cerebral degeneration." Acta Ophthalmol (Copenh): Suppl 89:81-47.
- West, H., W. D. Richardson, et al. (2005). "Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes." Development **132**(8): 1855-1862.



- Willbold, E., J. Berger, et al. (1997). "On the role of Muller glia cells in histogenesis: only retinal spheroids, but not tectal, telencephalic and cerebellar spheroids develop histotypical patterns." J Hirnforsch **38**(3): 383-396.
- Winkler, B. S., M. J. Arnold, et al. (2000). "Energy metabolism in human retinal Muller cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(10): 3183-3190.
- Wirotko, B., T. Y. Wong, et al. (2008). "Vascular endothelial growth factor and diabetic complications." Progress in Retinal and Eye Research **27**(6): 608-621.
- Wolburg, H., S. Liebner, et al. (1999). "The pecten oculi of the chicken: a model system for vascular differentiation and barrier maturation." Int Rev Cytol **187**: 111-159.
- Xu, Q., Y. Wang, et al. (2004). "Vascular Development in the Retina and Inner Ear." Cell **116**(6): 883-895.
- Yamaguchi, T. P., D. J. Dumont, et al. (1993). "flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors." Development **118**(2): 489-498.
- Ye, X., P. Smallwood, et al. (2011). "Expression of the Norrie disease gene (Ndp) in developing and adult mouse eye, ear, and brain." Gene Expr Patterns **11**(1-2): 151-155.
- Ye, X., Y. Wang, et al. (2009). "Norrin, Frizzled4, and Lrp5 signaling in endothelial cells controls a genetic program for retinal vascularization." Cell **139**(2): 285-298.
- Ye, X., Y. Wang, et al. (2010). "The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease." Trends Mol Med **16**(9): 417-425.
- Young, R. W. (1984). "Cell death during differentiation of the retina in the mouse." J Comp Neurol **229**(3): 362-373.

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
a	Adenin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ad	zu
<i>ad libitum</i>	nach Belieben
Akt	Proteinkinase B
AP	alkalische Phosphatase
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AUT	Österreich
BBB	Blut-Hirn-Schranke
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BEL	Belgien
BRB	Blut-Retina-Schranke
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Cytosin, Zenti-
C57BL/6	Maus-Inzuchtstamm
CAN	Kanada
CD31	<i>Cluster of differentiation 31</i>
Cdh5	Cadherin 5
cDNA	komplementäre DNA
Ch	Choroidea
CK1	Casein kinase 1, alpha 1
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
C <sub>t</sub>	<i>Cycle threshold</i>
Cu	Kupfer
Ctnnb1	β-Catenin
d. h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DDSA	2-Dodeceny succinic-acid-anhydride
DEN	Dänemark
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DKK-1	Dickkopf-1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
Dvl2	<i>Dishevelled 2</i>
E	Extinktion
Edn2	Endothelin 2
EDTA	Ethylendiamintereessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Östrogen-Rezeptor
ERG	Elektroretinogramm
<i>et al.</i>	und andere
FEVR	Familiäre exudative Vitreoretinopathie
Fgf2	<i>Fibroblast growth factor 2</i>
FIN	Finnland
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fl	<i>loxP site</i>
FVB/N	Maus-Inzuchtstamm
Fzd4/	Frizzled-4-Rezeptor
g	Erdbeschleunigung, Gramm, Guanin
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GAT-3	$\gamma$ -Aminobuttersäure-Transporter 3
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GLAST	Glutamat/Aspartat Transporter
GS	Glutamine Synthetase
GSK3- $\beta$	<i>Glycogen synthase kinase-3<math>\beta</math></i>
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Hydrogenchlorid
HDMEC	humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit</i>
HRMEC	humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Iba-1	<i>Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IGF-1R	IGF-1-Rezeptor
<i>in silico</i>	per Computersimulation
<i>in situ</i>	an Ort und Stelle
<i>in utero</i>	in der Gebärmutter
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	am lebenden Objekt
INL	innere Körnerschicht
i.p.	intraperitoneal
IPL	innere plexiforme Schicht
IS	Innensegmente
J	Joule

---

K <sup>+</sup>	Kalium
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KO	Knockout, Kontrolle
l	Liter
Lef	<i>Lymphoid enhancer binding factor</i>
Lrp	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein</i>
m	Meter
m	Milli-
M	molar
min	Minute
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MNA	Methylnadicanhydrid
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
n	Nano-
N.	<i>Nervus</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NBL	Neuroblastenschicht
Ndp	<i>Norrie disease (pseudoglioma)</i>
NED	Niederlande
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NV	Neovaskularisierung
OIR	Sauerstoff-induzierte Retinopathie
ONL	äußere Körnerschicht
OPL	äußere plexiforme Schicht
OS	Außensegmente
P	postnataler Tag
p	<i>Probability</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGFB	<i>Platelet-derived growth factor β</i>
PEDF	<i>Pigment epithelium derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PhP	0,1 M Phosphatpuffer
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLVAP	<i>Plasmalemma vesicle associated protein</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RGC	retinale Ganglienzellen
rhNorrin	rekombinantes humanes Norrin
RNA	Ribonukleinsäure
ROP	<i>Retinopathia praematurorum</i>
RPE	retinales Pigmentepithel
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase, Raumtemperatur

---

s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler
Slc1a3	<i>Solute carrier family 1 member 3</i>
t	Thymin
Taq Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TCF	<i>T-cell factor</i>
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
Tie2	<i>Endothelial-specific receptor tyrosine kinase 2</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
Tspan12	Tetraspanin 12
TX	Tamoxifen
U	Enzymeinheit
UK	Vereinigtes Königreich
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR2	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
vs.	versus
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
Wnt	<i>Wingless/integrated</i>
x	mal, -fach
z . B.	zum Beispiel
$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$\beta$ B1-Norrin	$\beta$ B1-Crystallin-Norrin
$\beta$ -Trcp	<i>Beta-Transducin repeat containing</i>
$\Delta$	Delta
$\kappa$	Kappa

## 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der retinalen Schichten und Zelltypen im menschlichen Auge .....	1
Abb. 2: Morphologie der Müllerzelle .....	3
Abb. 3: Entwicklung des retinalen Gefäßsystems.....	5
Abb. 4: Der Norrin/ $\beta$ -Catenin-Signalweg. ....	11
Abb. 5: Schematische Darstellung des Mausmodells der OIR .....	17
Abb. 6: Enzymatische Reaktion der $\beta$ -Galactosidase (Berg Jeremy M. 2003) .....	51
Abb. 7: Verifizierung der spezifischen Expression der TX-abhängigen Cre-Rekombinase in Slc1a3-Cre <sup>ERT2</sup> /ROSA26LacZ-Tieren an P14 .....	56
Abb. 8: Verifizierung des konditionellen $\beta$ -Catenin Knockouts auf Proteinebene .....	57
Abb. 9: Morphologische Analyse von Slc1a3-Cre <sup>ERT2</sup> /Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup> sowie Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup> Mäusen mittels Lichtmikroskopie.....	59
Abb. 10: Deletion von $\beta$ -Catenin in Müllerzellen sowie TX-Behandlung während der Entwicklung haben keine immunologische Reaktion und Gliosereaktion zur Folge .	61
Abb. 11: Deletion von $\beta$ -Catenin in Müllerzellen verzögert die Regression der Hyaloidalgefäße.....	63
Abb. 12: Deletion von $\beta$ -Catenin in Müllerzellen verzögert die Entwicklung des oberflächlichen Plexus.....	64
Abb. 13: Deletion von $\beta$ -Catenin in Müllerzellen von P1-P5 hat keinen Einfluss auf die Ausbildung intraretinaler Kapillaren an P10.....	66
Abb. 14: Deletion von $\beta$ -Catenin in Müllerzellen von P1-P5 hat keinen Einfluss auf die Ausbildung intraretinaler Kapillaren an P14.....	67
Abb. 15: Untersuchung der retinalen Gefäßplexus von Slc1a3-Cre <sup>ERT2</sup> /Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup> und Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup> Mäusen an P21 nach TX-Behandlung von P1-P5 .....	68
Abb. 16: Deletion von $\beta$ -Catenin in Müllerzellen von P5-P8 hat keinen Einfluss auf die Ausbildung intraretinaler Kapillaren an P10.....	70
Abb. 17: Deletion von $\beta$ -Catenin in Müllerzellen von P5-P8 hat keinen Einfluss auf die Ausbildung intraretinaler Kapillaren an P14.....	71
Abb. 18: Untersuchung der retinalen Gefäßplexus von Slc1a3-Cre <sup>ERT2</sup> /Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup> und Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup> Mäusen an P21 nach TX-Behandlung von P5-P8 .....	72
Abb. 19: Verifizierung der TX-induzierbaren Cre-Rekombinase in adulten Slc1a3-Cre <sup>ERT2</sup> -Tieren .....	75

Abb. 20: Morphologische Analyse adulter Retinae von Slc1a3-Cre <sup>ERT2</sup> /Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup> und Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup> Mäusen mittels Lichtmikroskopie nach Behandlung mit TX (i.p.) im Alter von 6 Wochen .....	76
Abb. 21: Cre-Expression, TX-Behandlung und Deletion von $\beta$ -Catenin führen zu keinen Veränderungen in der Gesamtdicke der Retina, sowie der INL und ONL .....	77
Abb. 22: Deletion von $\beta$ -Catenin in Müllerzellen sowie TX-Behandlung im adulten Tier haben keine immunologische Reaktion und Gliosereaktion zur Folge .....	79
Abb. 23: Untersuchung der retinalen Gefäßplexus in adulten Slc1a3-Cre <sup>ERT2</sup> /Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup> und Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup> Tieren.....	81
Abb. 24: Deletion von $\beta$ -Catenin sowie die TX-Behandlung haben keinen Verlust der inneren BRB in adulten Tieren zur Folge.....	82
Abb. 25: Relative Vasoobliteration in Slc1a3-Cre <sup>ERT2</sup> /Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup> und Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup> Mäusen nach OIR an P12 .....	85
Abb. 26: Verzögerte Revaskularisierung in Slc1a3-Cre <sup>ERT2</sup> /Ctnnb1 <sup>fl/fl</sup> Tieren nach Induktion einer OIR.....	87
Abb. 27: Hemmung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signals in Müllerzellen führt zu einem verminderten Einwachsen von Gefäßen in die Netzhaut nach Induktion einer OIR .	88
Abb. 28: Deletion des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen induziert die Bildung von neovaskulären Tufts nach OIR .....	90
Abb. 29: $\beta$ -Catenin Defizienz in Müllerzellen führt zu Veränderungen in der Expression von angiogenen Faktoren in der Netzhaut .....	91
Abb. 30: Norrin verbessert die Revaskularisierung nach OIR nicht über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen .....	95
Abb. 31: Norrin verbessert die Ausbildung von intraretinalen Kapillaren nach OIR unabhängig von der Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen .....	97
Abb. 32: Norrin vermindert die Ausbildung von pathologischen Neovaskularisationen nach OIR unabhängig von einer Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen .....	99
Abb. 33: Norrin vermittelt die Revaskularisierung der avaskulären Areale nach OIR, zumindest teilweise, über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Endothelzellen .....	101
Abb. 34: Norrin vermittelt, zumindest teilweise, die Entwicklung von intraretinalen Gefäßen nach OIR über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen .....	103

Abb. 35: Norrin induziert die Bildung von Neovaskularisationen in der Netzhaut von Mäusen mit einer Deletion von  $\beta$ -Catenin in mikrovaskulären Endothelzellen ..... 104

Abb. 36: Norrin-Überexpression in  $Cdh5-Cre^{ERT2}/Ctnnb1^{fl/fl}$  induziert die Ausbildung von ausgedehnten präretinalen Gefäßformationen und verhindert die Entstehung von regulären intraretinalen Kapillaren ..... 106



## 7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Reagenzien .....	21
Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte und Materialien .....	22
Tabelle 3: Auflistung der Verbrauchsmaterialien .....	23
Tabelle 4: Auflistung der Enzyme und Reagenzien-Kits .....	23
Tabelle 5: Oligonukleotidprimer .....	24
Tabelle 6: Liste der eingesetzten Antikörper für Western Blot Analysen und Immunhistochemie .....	25
Tabelle 7: Rezepte der eingesetzten Lösungen und Puffer .....	27
Tabelle 8: Übersicht der durchgeführten Experimente .....	31
Tabelle 9: Liste der für die Perfusion verwendeten Lösungen .....	33
Tabelle 10: Reaktionsansatz (1x) für Genotypisierungs-PCRs .....	36
Tabelle 11: Thermocyclerprogramme für Genotypisierungs-PCRs .....	37
Tabelle 12: 10 µl Reaktionsansätze (1x) für cDNA-Synthese .....	39
Tabelle 13: Thermocyclerprogramm für cDNA-Synthese .....	39
Tabelle 14: 15 µl Reaktionsansatz (1x) für die quantitative real-time RT-PCR .....	41
Tabelle 15: Cyclerprogramm für die quantitative real-time RT-PCR .....	41
Tabelle 16: Rezepte für die verwendeten SDS-Gele .....	43
Tabelle 17: Schema für den Aufbau des Semidry-Blots .....	45
Tabelle 18: Protokolle für die Blockierung und Antikörperinkubation zum Nachweis spezifischer Proteine .....	46
Tabelle 19: Protokoll für die immunhistochemische Färbung von $\beta$ -Catenin an Gefrierschnitten .....	50
Tabelle 20: Protokoll für immunhistochemische Färbungen von Iba-1, GFAP, GS und PLVAP an Paraffinschnitten .....	50

## 7.5 Erklärung

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

Regensburg, den 27.04.2015

Birgit Barbara Müller