

Neuroprotektive und neuroregenerative Eigenschaften von Norrin in Müllerzellen



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin (Dr. med.)

der naturwissenschaftlichen Fakultät III

-Biologie und vorklinische Medizin-

der Universität Regensburg

Durchgeführt am Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie der
Universität Regensburg

vorgelegt von

Christian Eimer

im Jahr 2021

Diese Arbeit wurde angeleitet von PD Dr. med. Andreas Ohlmann

Promotionsgesuch eingereicht am

Meinen Eltern

für unendliche Geduld und Unterstützung

Inhalt

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Retinopathia pigmentosa | 1 |
| 1.2 | Das VPP-Schadensmodell | 3 |
| 1.3 | Norrin – das Norrie disease pseudoglioma Genprodukt..... | 7 |
| 1.4 | Der WNT/ β -Catenin Signalweg | 11 |
| 1.5 | Müllerzellen – die potentiellen Stammzellen der Netzhaut | 16 |
| 2 | Zielsetzung der Arbeit | 19 |
| 3 | Materialien und Methoden | 20 |
| 3.1 | Grundausrüstung..... | 20 |
| 3.1.1 | Materialien/Geräteliste | 20 |
| 3.1.2 | Reagenzienliste | 22 |
| 3.1.3 | Oligonukleotidprimer und DNA-Leiter | 24 |
| 3.1.4 | Enzyme und Reagenzien-Kits..... | 24 |
| 3.1.5 | Antikörper..... | 25 |
| 3.1.6 | Zusammensetzung der verwendeten Gele, Lösungen und Puffer | 25 |
| 3.2 | Molekularbiologie..... | 27 |
| 3.2.1 | DNA-Extraktion aus Mausschwanzbiopsien..... | 27 |
| 3.2.2 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 27 |
| 3.2.3 | Agarose-Gelelektrophorese | 29 |
| 3.3 | <i>In vitro</i> Versuche..... | 30 |
| 3.3.1 | Arbeitstechniken | 30 |
| 3.3.2 | Behandlung der Müllerzellkulturen..... | 32 |
| 3.3.3 | Charakterisierung von Neurosphären | 33 |
| 3.3.4 | Auswertung | 34 |
| 3.4 | <i>In vivo</i> Versuche | 35 |
| 3.4.1 | Versuchstiere und Tierhaltung | 35 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.4.2 | Aufbereitung von Geweben aus Maus und Ratte..... | 36 |
| 3.4.3 | Intravitreale/intraperitoneale Injektion | 36 |
| 3.5 | Methoden der Histologie..... | 39 |
| 3.5.1 | Herstellung von Paraffinschnitten | 39 |
| 3.5.2 | Herstellung von Semidünnschnitten..... | 40 |
| 3.5.3 | Histologische Färbungen | 40 |
| 3.5.4 | Immunhistochemische Färbungen..... | 41 |
| 3.6 | Mikroskopie | 44 |
| 3.7 | Auswertung & Statistik..... | 45 |
| 4 | Ergebnisse | 47 |
| 4.1 | Verzögerung der Photorezeptordegeneration im VPP-Schadensmodell durch Norrinüberexpression | 48 |
| 4.1.1 | Norrin verzögert die Degeneration der Photorezeptoren | 48 |
| 4.1.2 | Norrin verzögert das Fortschreiten der Degeneration im VPP - Schadensmodell..... | 55 |
| 4.1.3 | Norrin reduziert die Schädigung von Photorezeptoren im fortgeschrittenen Stadium der Degeneration..... | 63 |
| 4.2 | Rekombinantes Norrin verstärkt das Proliferationspotential nach exogener Schädigung | 70 |
| 4.3 | Rekombinantes Norrin beeinflusst die Induktion von Neurosphären aus murinen Müllerzellen | 72 |
| 4.3.1 | EGF induziert die Bildung von Neurosphären aus Müllerzellen | 72 |
| 4.3.2 | rhNorrin verstärkt die Neurosphäreninduktion aus Müllerzellen durch EGF konzentrationsabhängig..... | 74 |
| 5 | Diskussion | 76 |
| 5.1 | Norrin verzögert die Degeneration von Photorezeptoren | 76 |
| 5.1.1 | Die VPP - Mutation führt zur progressiven Degeneration von Photorezeptoren im FVB/n / Balb/C - Hintergrund | 77 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 5.1.2 | Konstitutive Expression von Norrin vermindert Schäden an Photorezeptoren..... | 80 |
| 5.2 | Norrin fördert die Proliferation von Müllerzellen / retinalen Zellen | 84 |
| 5.2.1 | Konstitutive Überexpression von Norrin führt möglicherweise zur Bildung retinaler Neuronen | 88 |
| 5.3 | Rekombinantes Norrin fördert die Bildung von Neurosphären aus Müllerzellkulturen konzentrationsabhängig | 90 |
| 6 | Ausblick | 92 |
| 7 | Zusammenfassung | 93 |
| 8 | Anhang | 95 |
| 8.1 | Literaturverzeichnis | 96 |
| 8.2 | Allgemeines Abkürzungsverzeichnis | 115 |
| 8.3 | Tabellenverzeichnis..... | 120 |
| 8.4 | Abbildungsverzeichnis..... | 121 |
| 8.5 | Danksagung | 122 |
| 8.6 | Erklärung..... | 123 |

1 Einleitung

1.1 Retinopathia pigmentosa

Im Jahre 1857 prägte der niederländische Physiologe und Mitbegründer der modernen Ophthalmologie Franciscus Cornelis Donders (1818-1889) erstmals die Bezeichnung Retinitis pigmentosa (Misnomer, veraltet für Retinopathia pigmentosa, RP). Er beschrieb damals seine Beobachtungen an Retinae von Patienten mit eingeschränktem peripheren Gesichtsfeld bis hin zu absolutem Sehverlust, bei denen im Rahmen der Spiegelung des Augenhintergrundes vermehrt periphere knochenbälkchenartige Pigmentablagerungen, Gefäßverengungen und Papillenveränderungen auffielen (Donders 1857).

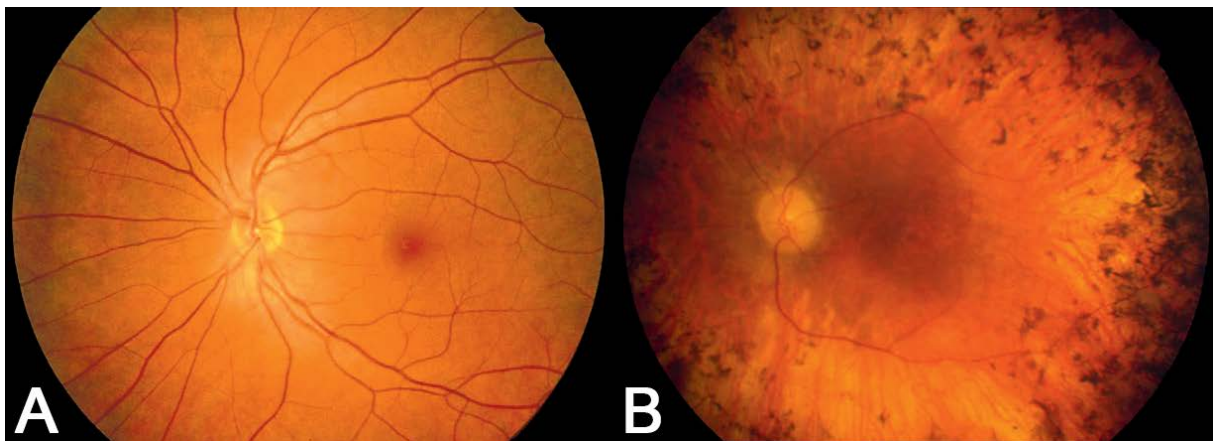


Abbildung 1: Ophthalmoskopiebefunde. A: normaler Fundusbefund mit Papilla nervi optici, Macula lutea mit Fovea centralis, normale Darstellung der Gefäße; B: Klassischer Fundusbefund bei Retinopathia pigmentosa. Trias aus knochenbälkchenartigen Pigmentveränderungen, verengte arterielle Netzhautgefäße und wachsartige Blässe der Papilla nervi optici. (Modifiziert nach Encyclopedia of the eye, Elsevier Verlag)

Heute ist Retinopathia pigmentosa die Bezeichnung für eine heterogene Gruppe von hereditären nicht-entzündlichen Netzhautdegenerationen mit variablem Krankheitsbeginn, Verlauf und unterschiedlicher Ausprägung, denen ein progressiver

Untergang der Photorezeptoren gemein ist. Die Variabilität in der Ausprägung dieser Erkrankung erklärt sich einerseits dadurch, dass mehrere Gene auf verschiedenen Chromosomen auf unterschiedliche Weise für Aufbau, Funktion und Homöostase der Photorezeptoren kodieren, andererseits sind pro Gen mittlerweile mehrere Loci bekannt, deren Mutation zu einem bestimmten Phänotyp führt. Zum jetzigen Zeitpunkt sind für die autosomal dominante Variante (adRP) 20, für die autosomal rezessive (arRP) 35 und für die X-chromosomale (X-linked RP = XLRP) fünf Genloci identifiziert (für aktuelle Informationen siehe <https://sph.uth.edu/Retnet/sum-dis.htm>). Zusätzlich tritt Retinopathia pigmentosa als sekundäre Form im Rahmen von syndromalen Erkrankungen wie dem Usher Syndrom (30%), dem Waardenburg Syndrom, dem Alport Syndrom, Morbus Refsum und einigen weiteren auf (Daiger 2007; Goodwin 2008; Saihan et al. 2009).

Weltweit wird die Diagnose RP bei einem von 5000 Menschen gestellt, wobei der Beginn der Krankheit äußerst variabel zwischen beidseitiger Blindheit bereits bei der Geburt (kongenitale Amaurose Leber) und ersten Symptomen um das fünfzigste Lebensjahr auftreten kann. Endpunkt bei allen Formen der RP ist meist Blindheit. Die klassische Form der RP, die Stäbchen-Zapfen-Degeneration, ist gekennzeichnet durch initiale Nachtblindheit, progredienten Verlust der Photorezeptoren (anfangs vor allem Stäbchen), meist ausgehend von der mittleren Peripherie, und daraus resultierenden Gesichtsfeldeinschränkungen mit Ringskotomen und einem stark veränderten ERG (Elektroretinogramm). Den Betroffenen verbleibt häufig für einige Jahre ein sogenanntes Flintenrohrgesichtsfeld, bei dem der Visus bei komplett ausgefallener Netzhautperipherie erhalten bleibt, dies erklärt sich aus der primären Stäbchendegeneration. Stäbchen dienen der monochromatischen Wahrnehmung von Kontrasten bei geringer Helligkeit (skotopisches Sehen), die Zapfen hingegen, welche für das Farbsehen bei ausreichender Helligkeit (photopisches Sehen) verantwortlich sind, bleiben anfangs noch erhalten. Ophthalmoskopisch ist hier auch die klassische Trias aus knochenbälkchenartigen Pigmentablagerungen, Gefäßverengungen und atrophischer Papille sichtbar.

Mit Ausnahme des Refsum-Syndroms, bei dem eine phytansäurearme Diät die assoziierte RP zum Stillstand bringen kann, ist bis heute keine Form der RP weder heilbar noch zufriedenstellend behandelbar. Die medikamentösen Ansätze reichen von hochdosiertem Vitamin-A, über DHA (Docosahexaensäure, Omega-3-Fettsäure)

und Ursodesoxycholsäure, bis hin zu hyperbarer Sauerstofftherapie, wobei die besten klinischen Ergebnisse lediglich in einer leichten Reduktion des Fortschreitens der Krankheit resultieren (Vingolo et al. 2007; Rayapudi et al. 2013; Vang et al. 2014). Neben biomechanischen Ansätzen, wie Entwicklung und Einsatz von subretinalen Implantaten, sind Stammzelltherapien und gentherapeutische Ansätze Gegenstand aktueller Forschung (Jiang et al. 2014b; Li et al. 2014; Stingl et al. 2010).

1.2 Das VPP-Schadensmodell

Eine der häufigeren und erfreulicherweise langsam fortschreitenden Formen der RP ist die autosomal dominante Form, bei der in vielen Fällen eine Mutation im Opsin-Gen der Stäbchen (Skotopsin) vorliegt. Skotopsin ist ein G-Protein, welches zusammen mit 11-cis-Retinal das Chromophor Rhodopsin der Stäbchen bildet. In der gesunden Retina liegt Rhodopsin in den Disks der Außensegmente und bildet den Anfang der Signaltransduktionskette beim Sehvorgang. Hierbei führt einfallendes Licht (Photon ausreichender Energie) zur Isomerisierung des an Skotopsin gebundenen 11-cis-Retinal zum all-trans-Retinal und konsekutiv zur Konformationsänderung des gekoppelten G-Proteins, was über eine Signalkaskade über die Schließung von Na⁺-Kanälen letztlich zu einem Aktionspotenzial und damit zu einem Seheindruck führt. Das all-trans-Retinal wird nach Freigabe durch das Skotopsin zum all-trans-Retinol reduziert und mittels IRBP (interstitial retinoid binding protein) zum RPE transportiert, wo es über mehrere Zwischenschritte wieder zum 11-cis-Retinal umgewandelt wird. Nach Rücktransport zum Photorezeptor steht es wieder für den visuellen Zyklus zu Verfügung.

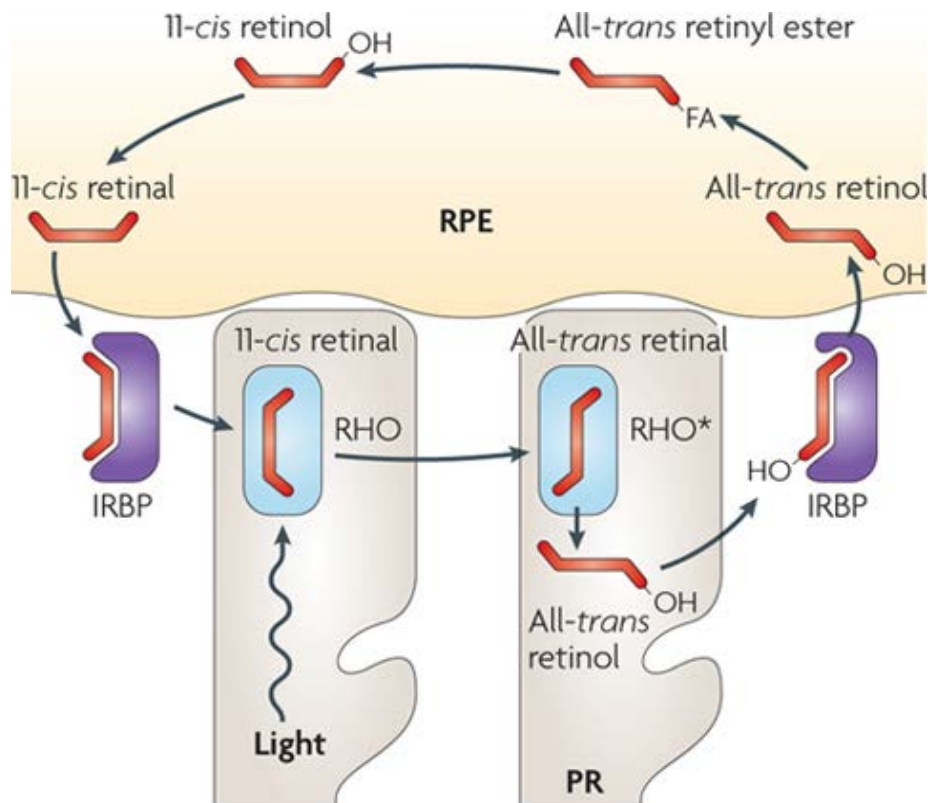


Abbildung 2: Übersicht des visuellen Zyklus. Skotopsin in hellblau dargestellt. Recycling des isomerisierten All-trans-Retinals über dargestellte Zwischenschritte im RPE zum 11-cis-Retinal (Wright et al. 2010b)

Eine der (in den USA) häufigsten Mutationen im Opsin-Gen von adRP-Patienten ist Pro-23 → His (P23H) an dem für Skotopsin kodierenden Anteil. Studien haben gezeigt, dass diese Mutation zu einer Fehlfaltung des Rhodopsins führt (Mendes et al. 2005). Das mutierte Rhodopsin (m-Rho) wird in diesem Fall konkomitant mit dem normalen Rhodopsin (Rho) exprimiert, wobei das m-Rho zwar möglicherweise an der Signalkaskade teilnimmt (Wu et al. 1998), jedoch nach Isomerisierung des 11-cis-Retinals zum all-trans-Retinal nicht wieder regeneriert und folglich im ER (endoplasmatisches Retikulum) akkumuliert (Mendes et al. 2005; Jiang et al. 2014a). Dies führt wiederum zur Aktivierung des UPR (unfolded protein response) mit Up-Regulation von Chaperonen und letztlich, wie in diesem Fall, bei weiterer Akkumulation zur Induktion der Apoptose der Photorezeptoren (Hetz 2012).

Bereits 1993 generierte die Arbeitsgruppe um Muna Naash ein Mausmodell für die adRP, indem sie ein mutiertes Opsin-Gen in das Erbgut von C57Bl/6 Mäusen einfügten. Das veränderte Opsin-Gen enthält drei Punktmutationen nahe dem N-Terminus des murinen Rhodopsin-Gens: Val-20 → Gly (V20G), Pro-23 → His (P23H)

und Pro-27→Leu (P27L), namensgebend für dieses Modell (VPP) (Naash et al. 1993). Die beiden Punktmutationen V20G und P27L wurden eingefügt, um die Spezifität eines Antikörpers gegen m-Rho zu erhöhen. Bei beiden Mutationen konnte kein Einfluss auf die Photorezeptorhomöostase nachgewiesen werden (Baehr et al. 1988; al-Ubaidi et al. 1990).

VPP-positive C57Bl/6-Mäuse zeigen bei Geburt eine normal entwickelte Retina mit der Ausnahme, dass die Außensegmente der Photorezeptoren nie die normale Länge erreichen. Analog zu adRP-Patienten, welche die P23H Mutation tragen, kommt es zu einer langsam progressiven Degeneration der Photorezeptoren und konsekutiv zu verminderten bis erloschenen Potentialen im ERG (Elektroretinogramm) (Naash et al. 1993). Naash et al. konnten zusätzlich zeigen, dass Albinismus in VPP-Mäusen zu einer schnelleren Progression und folglich zu einer Exazerbation der Photorezeptorschädigung führt (Naash et al. 1996).

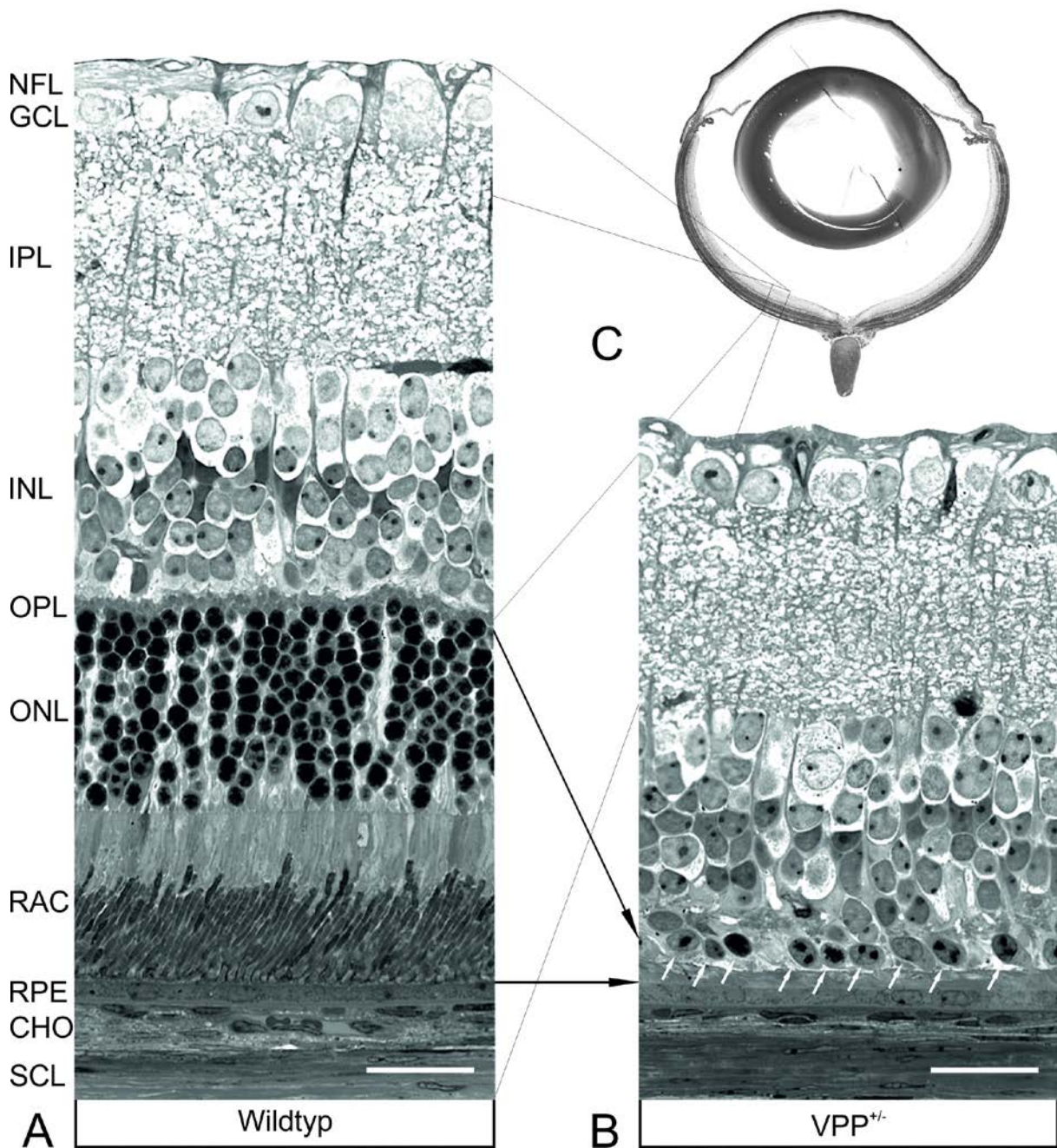


Abbildung 3: Übersicht Aufbau Retina. A: Semidünnschnitt der Retina einer Wildtyp-Maus im Alter von ca. 4 Monaten mit normalem Aufbau der retinalen Strukturen; B: Semidünnschnitt der Retina einer VPP-positiven Balb/c Maus im Alter von 4 Monaten. Nahezu vollständiger Verlust der äußeren Körnerschicht und der Stäbchen und Zapfen. Vereinzelt sichtbare verbliebene Nuclei von Photorezeptoren (weiße Pfeile), keine erkennbare Architektur in ONL und RAC; C: kompletter Axialschnitt des Auges einer Wildtypmaus; NFL: Nerve fiber layer, Nervenfaserschicht. GCL: Ganglion cell layer, Ganglienzellschicht. IPL: Inner plexiform layer, Innere plexiforme Schicht. INL: Inner nuclear layer, Innere Körnerschicht. OPL: Outer plexiform layer, Äußere plexiforme Schicht. ONL: Outer nuclear layer, Äußere Körnerschicht. RAC: Rods and cones, Stäbchen und Zapfen. RPE: retinales Pigmentepithel. CHO: Choroidea. SCL: Sclera. Messbalken 25 μ m

Nach den Ergebnissen von Mendes et al. und Jiang et al. könnte dies durch den vermehrten Lichteinfall, die fehlende Streulichtabsorption des Pigmentepithels und der daraus folgenden erhöhten Akkumulationsrate von fehlgefaltetem m-Rho im Endoplasmatischen Retikulum erklärt werden (Mendes et al. 2005; Jiang et al. 2014a).

1.3 Norrin – das Norrie disease pseudoglioma Genprodukt

1961 berichtete die dänische Ophthalmologin Mette Warburg über eine bis dato unbekannte hereditäre X-chromosomale degenerative Augenerkrankung mit sieben identischen Fällen in einer dänischen Familie über sieben Generationen (ANDERSEN und Warburg 1961; ANDERSEN 1961). Die histologische Untersuchung eines bei Verdacht auf Retinoblastom enukleierten Auges eines 12 Monate alten Jungen zeigte unter anderem einen retinalen vaskulären Pseudotumor umgeben von undifferenziertem glialem Gewebe, eine Hyperplasie des Pigmentepithels der Retina, des Ziliarkörpers und der Iris, Nekrose der inneren Retinaschichten, Katarakt und Phtisis bulbi. Fünf der betroffenen Familienmitglieder entwickelten eine Taubheit und vier litten an mentaler Retardierung. Warburg identifizierte 48 weitere nahezu identische Fälle mit X-chromosomalem Vererbungsmuster in neun Familien in der Literatur (ANDERSEN und Warburg 1961; Warburg 1971) und prägte die Bezeichnung Norrie-Syndrom zu Ehren des dänischen Ophthalmologen Gordon Norrie (1855-1941), der bereits 1927 ähnliche Fälle beschrieb (Norrie 1927).

Erst 1992 gelang es, den exakten Genlokus des Norrie-disease-pseudoglioma-Gens (Ndp) auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp11.4) und dessen Produkt Norrin zu identifizieren (Meindl et al. 1992; Berger et al. 1992a). Das NDP-Gen besteht aus drei Exons und kodiert für Norrin, welches beim Menschen aus 133, bei der Maus aus 131 Aminosäuren aufgebaut ist, wobei die Aminosäuresequenz stark konserviert ist (95% homolog, Exon 3 zu 99% homolog) (Battinelli et al. 1996). Norrin ist ein sezerniertes Protein mit einer N-terminalen Signalsequenz und einem Cysteinreichen C-terminalen Ende, bei dem Computeranalysen ein Cystin-Knot-Motiv, ähnlich dem der Transforming-Growth-Factor- β (TGF- β) - Superfamilie, nahelegen

(Meitinger et al. 1993). Es liegt *in vivo* in Form von über Disulfidbrücken gebundenen Homomultimeren vor und kann an die extrazelluläre Matrix binden (Perez-Vilar und Hill 1997; Ke et al. 2013), was für eine parakrine Signalfunktion spricht.

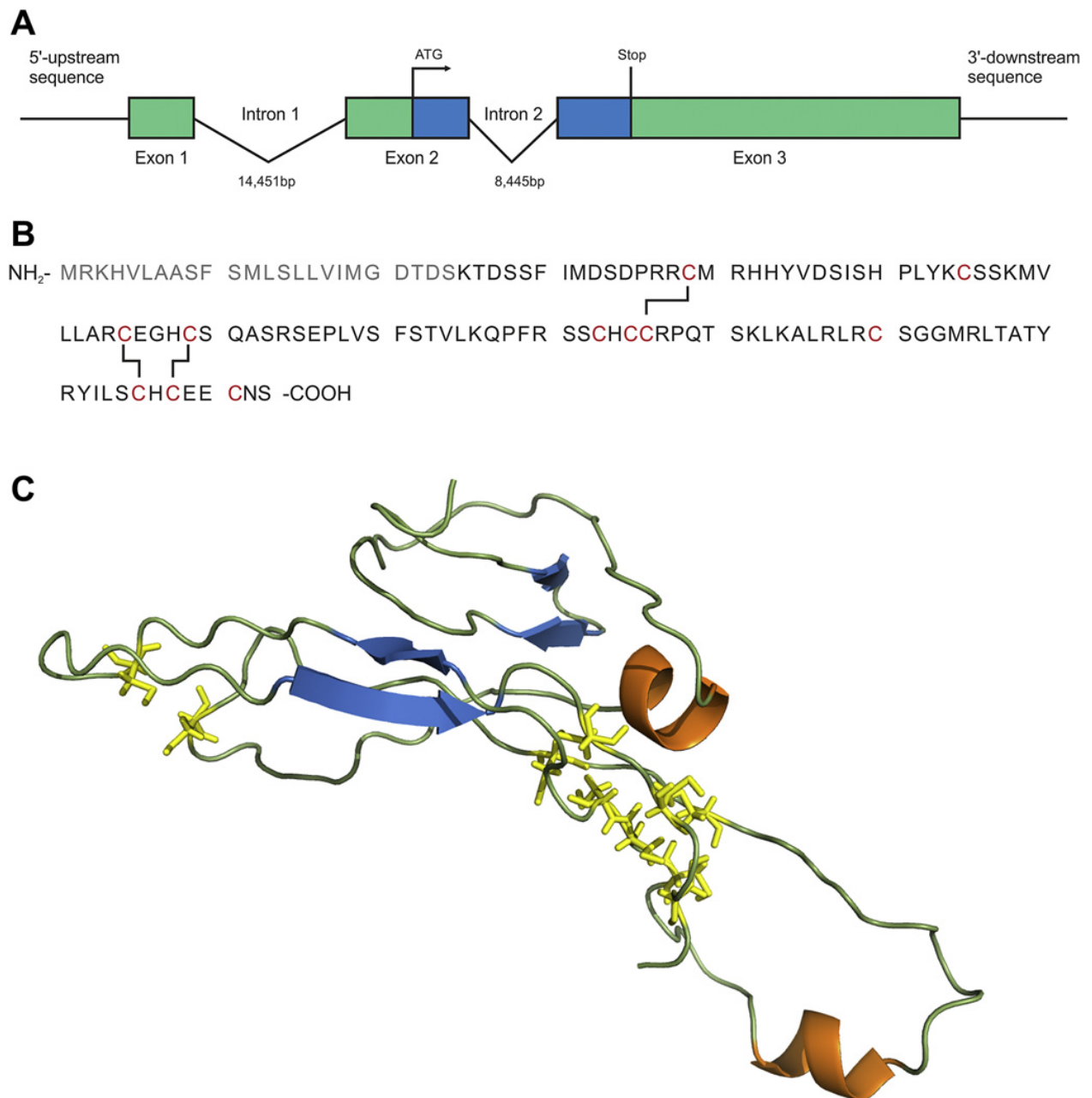


Abbildung 4: Norrin A: Darstellung des NDP-Gens bestehend aus drei Exons; B: Aminosäuresequenz von humanem Norrin, dargestellt sind die drei Disulfidbrücken, welche möglicherweise das Cystin-knot-motif bilden. Das mutmaßliche Signalpeptid in grau; C: Tertiärstruktur im 3D-Modell. (Ohlmann und Tamm 2012)

Während der Embryonalentwicklung wird Norrin zuerst im Neuralrohr, im Rhombenzephalon und an der Papilla nervi optici exprimiert, postnatal in Telenzephalon, Diencephalon und Cerebellum, im Innenohr, der Niere, den Gonaden und den Müllerzellen der Retina (Paxton et al. 2010; Ye et al. 2011; Ye et al. 2009, 2009). Aktuell sind mehr als 95 verschiedene Mutationen im NDP-Gen bekannt, welche neben dem Norrie-Syndrom auch mit der X-chromosomalen familiären exsudativen Vitreoretinopathie (FEVR), Morbus Coats, einem persistierenden hyperplastischen primären Glaskörper (PHPV) und der Frühgeborenenretinopathie (retinopathy of prematurity, ROP) assoziiert sind (Nikopoulos et al. 2010).

Um die Funktion von Norrin erschließen zu können, etablierten Berger et al. ein Norrin-defizientes Mausmodell ($Ndp^{y/-}$), bei welchem unter anderem der okuläre Phänotyp starke Parallelen zu den Defekten bei Patienten mit Norrie-Syndrom aufweist (Berger et al. 1996). Auffallend zeigten sich zunächst die vaskulären Veränderungen. Wie bei Wildtyp-Tieren entwickelt sich der primäre Gefäßplexus ausgehend von der A. centralis retinae normal und verzweigt sich in der Peripherie zwischen Nervenfaserschicht und Ganglienzellschicht (Fruttiger 2007), allerdings kommt es nicht zu einer anschließenden Aussprossung von Kapillaren in die tieferen Schichten der Retina und auch die Bildung der tieferen Gefäßplexus bleibt aus (Richter et al. 1998; Rehm et al. 2002; Luhmann, U. F. O. 2005; Ohlmann et al. 2005). Zusätzlich kommt es zu einer Persistenz der A. hyaloidea, welche sich normalerweise nach Bildung der tieferen Gefäßplexus beim Menschen etwa nach der Hälfte der Embryonalentwicklung und bei der Maus etwa zum Zeitpunkt der Geburt zurückbildet (Fruttiger 2007). Die verbliebenen Gefäße zeigen außerdem eine gestörte Blut-Retina-Schranke durch das Vorhandensein von Fenestrae im Gefäßendothel (Paes et al. 2011; Wang et al. 2012). Über die Kreuzung mit von unserer Arbeitsgruppe generierten Mäusen, welche ektopes Norrin unter der Kontrolle des linsenspezifischen $\beta B1$ -Crystallin-Promoters transgen exprimieren ($\beta B1$ -Norrin), konnte der Gefäßphänotyp von $Ndp^{y/-}$ -Mäusen vollständig aufgehoben werden. Des Weiteren zeigten die doppeltransgenen Tiere ein nahezu normales ERG, was auf eine Wiederherstellung der Netzhautfunktion hindeutet (Ohlmann et al. 2005). Dass Norrin nicht nur in der okulären Gefäßentwicklung eine Rolle spielt, sondern auch angioprotektive Eigenschaften aufweist, konnten Ohlmann et al. mit Hilfe der $\beta B1$ -Norrin-Maus und der Rpe65-Norrin-Maus, welche ektopes Norrin über das retinale Pigmentepithel transgen exprimiert, zeigen (Ohlmann et al. 2010). Nach

einer Schädigung der retinalen Gefäße im ROP-Modell (Retinopathy of Prematurity) (Smith et al. 1994) konnte durch okuläre Überexpression von Norrin ein reduzierter Gefäßverlust beobachtet, sowie die nachfolgende Revaskularisierung des Kapillarnetzes anatomisch besser organisiert und beschleunigt werden (Ohlmann et al. 2010).

Neben den vaskulären Veränderungen finden sich auch neuronale Defekte in der Retina von Norrin-defizienten Mäusen. Dazu zählen fehlerhafte Anordnung der inneren nukleären Schicht (INL), der Photorezeptoren (ONL, RAC) bis hin zu deren kompletten Verlust, jedoch vor allem ein progredienter Untergang der retinalen Ganglienzellen (RGCs) (Richter et al. 1998; Berger et al. 1992b; Ohlmann et al. 2005; Seitz et al. 2010; Ohlmann und Tamm 2012). Gleiche Beobachtungen machten Schröder et al. bei der Untersuchung enukleierter Augen eines sechs Monate alten Säuglings mit einer Null-Mutation im NDP-Gen (Schroeder et al. 1997). Dies wurde anfangs mit der mangelnden Blutversorgung während der Entwicklung in Zusammenhang gebracht (Richter et al. 1998), jedoch zeigten Mäuse mit ektopter Norrin-Überexpression eine erhöhte Proliferationsrate von RGC-Progenitorzellen sowie konsekutiv eine höheren Anzahl retinaler Ganglienzellen (Ohlmann et al. 2005). Über die Kreuzung mit $Ndp^{y/-}$ -Mäusen konnten deren okuläre neuronale Defekte vollständig verhindert werden (Ohlmann et al. 2005). Neuroprotektive Effekte von Norrin konnten in weiteren Studien sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* festgestellt werden. So zeigten immortalisierte retinale Ganglienzellen (RGC5) nach Schädigung durch Staurosporin eine signifikante Reduktion der Apoptoserate, wenn die Zellen zusätzlich mit Norrin behandelt wurden (Lin et al. 2009). Ebenso zeigten retinale Ganglienzellen nach Schädigung durch intravitreale Injektion von N-methyl-D-Aspartat (NMDA) in Kombination mit rhNorrin eine erhöhte Überlebensrate als nach einer alleinigen Injektion von NMDA (Seitz et al. 2010). Zusätzlich konnte durch Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine konstitutive Überexpression von Norrin in der Netzhaut eine durch Lichtschaden induzierte Photorezeptordegeneration abschwächt (Braunger et al. 2013). Diese neuroprotektive Funktion wird durch eine Norrin-vermittelte Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs und konsekutiver Ausschüttung neurotropher und neuroprotektiver Faktoren wie BDNF (brain derived neurotrophic factor), Fgf2 (Fibroblast growth factor 2), Edn2 (Endothelin 2) und Ldngf (lens-epithelium derived growth factor) vermittelt (Seitz et al. 2010; Braunger et al. 2013). *In vitro* Versuche an

kultivierten Müllerzellen zeigten ebenfalls eine gesteigerte Expression dieser Faktoren nach Behandlung mit rhNorrin (Seitz et al. 2010). Ebenso konnte eine verstärkte Phosphorylierung von pAkt beobachtet werden (Braunger et al. 2013). Der Akt/PKB-Signalweg wird durch neurotrophe Faktoren wie BDNF, NGF (Nerve growth faktor) und IGF1 (insulin-like growth factor 1) aktiviert, der Mechanismus der durch pAkt-vermittelten Protektion ist allerdings erst teilweise aufgeklärt. Mehrere Studien konnten jedoch nachweisen, dass die Aktivierung von Akt in vielen Prozessen, wie der Überlebensrate und der Proliferation von Zellen, ebenso wie der Entstehung von Krebs, eine Rolle spielt (Risso et al. 2015). Durch weitere Studien wurde nachgewiesen, dass Norrin eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke (Engelhardt und Liebner 2014; Paes et al. 2011) und bei der Regulation des Zellzyklus in neuronalen Progenitorzellen spielt (McNeill et al. 2013).

1.4 Der WNT/ β -Catenin Signalweg

WNT-Signalwege spielen bei einer Vielzahl von Prozessen, sowohl während der embryonalen Entwicklung als auch im adulten Organismus eine tragende Rolle. So ist eine WNT-vermittelte Signaltransduktion bei der Zellproliferation und Zelldifferenzierung, sowie bei der Ausbildung der Zellpolarität beteiligt (Logan und NUSSE 2004). Bei Säugetieren wurden bereits 19 unterschiedliche Wnt-Proteine identifiziert, welche 10 verschiedene Frizzled-Rezeptoren aktivieren können (MacDonald et al. 2009; Clevers und NUSSE 2012). Bisher wurden mehrere differente Signalwege charakterisiert, welche durch Wnt-Proteine induziert werden, wobei der planar-cell-polarity (PCP)-Signalweg, der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg und der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu den am besten beschriebenen zählen (Clevers und NUSSE 2012; Clevers 2006) (Weiterführende und aktuelle Informationen unter <http://wnt.stanford.edu>).

Durch den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg wird die Konzentration von β -Catenin in der Zelle reguliert. β -Catenin ist ein zentrales Mediatormolekül, welches in der Zelle konstitutiv exprimiert wird und neben der Regulation von Zell-Zell-Adhäsion bei der Transduktion in den Zellkern als Signalmolekül zur Transkription verschiedener Gene fungiert, die unter anderem stimulierend in den Zellzyklus eingreifen oder zur Expression von Wachstumsfaktoren führen. Um eine

unkontrollierte Aktivierung der Zellteilung und Expression von Wachstumsfaktoren zu verhindern, wird β -Catenin kontinuierlich durch Phosphorylierung und anschließender Ubiquitinylierung inaktiviert. Die primäre Phosphorylierung wird dabei von einem sogenannten „Destruction-Complex“, der unter anderem aus dem Tumorsuppressorprotein APC (Adenomatöse Poliposis Coli-Protein), Axin, GSK3- β (Glykogen-Synthase-Kinase-3 β) und CKI (Casein-Kinase-I) besteht, welche ebenfalls ubiquitär im Zytosol vorhanden sind, übernommen. Nach Phosphorylierung wird β -Catenin durch die E3 Ubiquitin-Ligase Untereinheit β -Trcp (beta-Transducin repeat containing protein) ubiquitinyliert und danach sehr schnell im Proteasom abgebaut (He 2004; Logan und NUSSE 2004; MacDonald et al. 2009; Dijksterhuis et al. 2014).

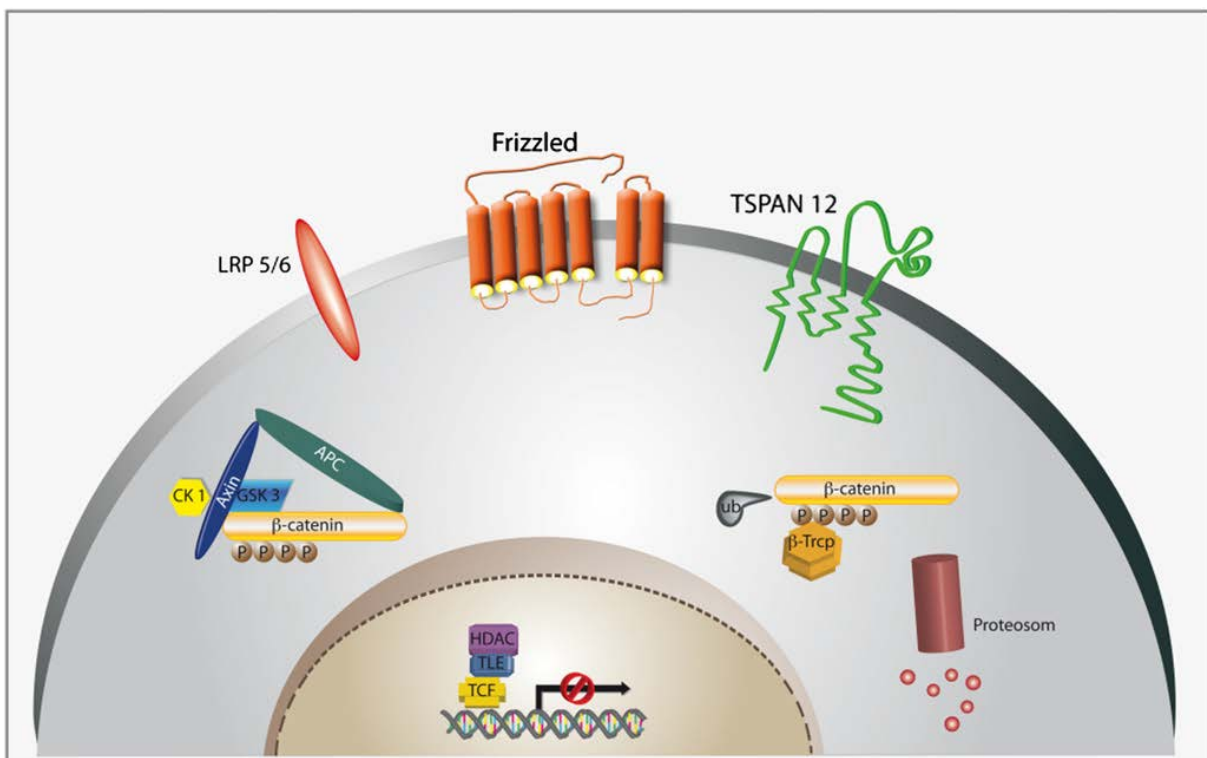


Abbildung 5: Nicht aktivierter Wnt-Signalweg. Der Destruction-Complex aus Axin, APC, CK1 und GSK3 phosphoryliert konstitutiv exprimiertes β -Catenin, woraufhin es durch β -Trcp ubiquitinyliert und konsekutiv im Proteasom abgebaut wird. TCF/TLE fungiert ohne Bindung von β -Catenin als Transkriptionsinhibitor (Logan und NUSSE 2004). (Nach Ohlmann und Tamm 2012)

Bindet nun ein Wnt-Ligand an einen 7-Transmembrandomänen-Rezeptor der Frizzled-Familie (Fzd) mit gebundenem Lrp5/6-Corezeptor, wird gemeinsam mit Dvl (Dishevelled) der Axin/GSK3-Komplex zur Plasmamembran rekrutiert. Hier wird Axin

durch Phosphorylierung destabilisiert und die Aktivität von GSK3 - und damit die Aktivität des Degradationskomplexes - inhibiert. Konsekutiv akkumuliert β -Catenin in der Zelle und kann in den Zellkern translozieren. β -Catenin bindet hier an Mitglieder der TCF/LEF (T-cell-factor/lymphoid enhancer factor)-Familie und führt folgend zur Aktivierung spezifischer Zielgene (MacDonald et al. 2009). Eine Überexpression von β -Catenin, ebenso wie Mutationen von am „Destruction-Complex“ beteiligten Proteinen, führen zu permanenter Aktivierung der Zellteilung, folglich zur Entstehung verschiedenster Tumorerkrankungen, zum Beispiel der familiären adenomatösen Poliposis coli (Mutation im APC-Gen) (Kinzler et al. 1991).

DNA-Analysen bei Patienten mit Norrie-Syndrom, X-chromosomaler familiärer exsudativer Vitreoretinopathie (FEVR), Frühgeborenenretinopathie (ROP) und Morbus Coats ließen einen Zusammenhang mit Mutationen im NDP-Gen vermuten (Dickinson et al. 2006; Warden et al. 2007; Smith et al. 2012). Interessanterweise zeigen Frizzled-4-defiziente ($Fzd^{-/-}$) (Xu et al. 2004; Hsieh 2005), Lrp5-defiziente ($Lrp^{-/-}$) (Kato et al. 2002; Xia et al. 2008) und Tspan12-defiziente ($Tspan^{-/-}$) Versuchstiere (Junge et al. 2009; Poulter et al. 2012) sehr ähnliche okuläre Phänotypen mit fehlender oder reduzierter Aussprossung von Kapillaren in die tieferen Schichten der Retina und einer persistierenden A. hyaloidea. Bindungsstudien von Xu et al. haben gezeigt, dass Norrin über die Bindung an den Fzd4-Rezeptor und dessen Corezeptor Lrp5/6 den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Abwesenheit eines Wnt-Liganden aktiviert (Xu et al. 2004; Smallwood et al. 2007; Wang et al. 2012). Tspan12 (Tetraspanin 12) führt zu einer Multimerisation von Fzd4/Lrp5/6 Rezeptoren nach Bindung von Norrin und folglich zu einer Verstärkung des nachgeschalteten Signals (Junge et al. 2009; Ye et al. 2009; Ye et al. 2010; Cruciat und Niehrs 2013).

Nach der Bindung von Norrin kommt es zur regulären Signaltransduktion analog zum kanonischen Wnt-Signalweg. Der Komplex aus Norrin/Fzd4/Lrp5/6 rekrutiert gemeinsam mit Dvl (Dishevelled) den Axin/GSK3-Komplex und führt zu dessen Inhibition (Li et al. 2012). Somit kann der Degradationskomplex nicht mehr gebildet werden und es akkumuliert β -Catenin, welches nach Translokation in den Zellkern an Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF Familie bindet und damit die Expression von Wnt-Zielgenen induziert (MacDonald et al. 2009; Dijksterhuis et al. 2014).

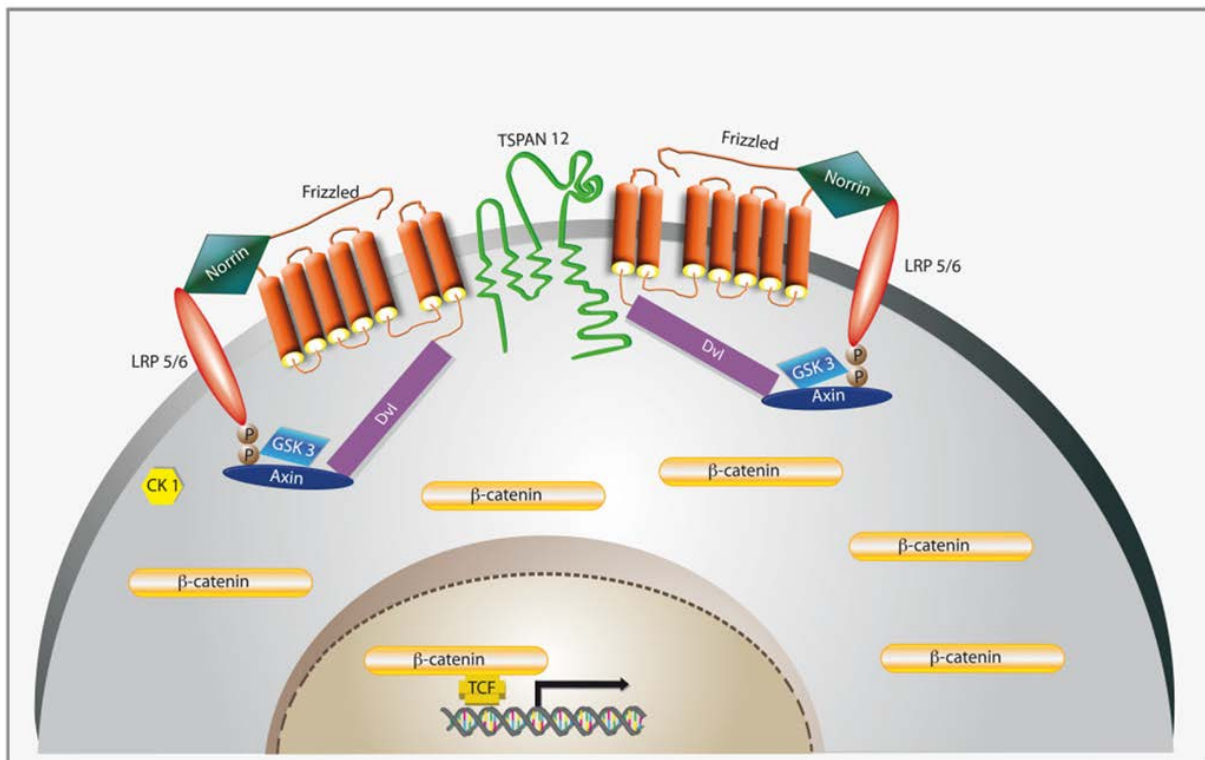


Abbildung 6: Aktiver Norrin-vermittelter β -Catenin Signalweg. Nach der Bindung von Norrin an den Frizzled4-Rezeptor und LRP5/6-Corezeptor wird Dvl an den Rezeptorkomplex rekrutiert und LRP5/6 phosphoryliert. Anschließend wird durch Bindung von Axin/GSK3 der Destruction-Complex inhibiert und β -Catenin kann nach Akkumulation in der Zelle in den Zellkern translozieren. Hier bindet es an TCF/LEF und führt zur Expression spezifischer Zielgene. TSPAN12 führt zusätzlich zu einer Multimerisierung von Fzd-Rezeptoren und damit zu einer Verstärkung der Signaltransduktion durch weitere Bindung von Axin/GSK3. (Nach Ohlmann und Tamm 2012)

Norrin bindet mit der cysteinreichen Domäne am C-terminalen Ende mit hoher Spezifität an Fzd4, jedoch an keinen der anderen derzeit bekannten Fzd-Rezeptoren (Xu et al. 2004). Aktuelle Studien konnten allerdings zeigen, dass Norrin auch an den 7-Transmembrandomänen-Rezeptor LGR4 (Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4) sowie an BMP2 und 4 (bone morphogenic protein 2/4) mit unterschiedlichen Stellen seiner Proteinstruktur binden kann (Deng et al. 2013). Durch die Bindung an einen LGR4/LRP5/6-Komplex kann Norrin ebenfalls den β -Catenin-Signalweg aktivieren (Deng et al. 2013), eine Bindung an BMP2/4 führt demgegenüber zur Inhibition des TGF β -Signalwegs (Xu et al. 2012). Seitz et al. postulierten ein Modell der neuroprotektiven Wirkung von Norrin anhand des NMDA-Schadensmodells. Hierbei exprimieren retinale Ganglienzellen nach Schaden durch N-methyl-D-Aspartat Endothelin-2, wodurch die Sekretion von LIF (leukemia inhibitory factor) und FGF-2 (fibroblast growth factor-2) durch Müllerzellen induziert wird. Eine akute Schädigung in Anwesenheit von Norrin führt zu einer Aktivierung

des β -Catenin-Signalwegs, was letztlich in einer verstärkten Expression von neuroprotektiven Faktoren mündet (Seitz et al. 2010; Ohlmann und Tamm 2012; Braunger et al. 2013).

1.5 Müllerzellen – die potentiellen Stammzellen der Netzhaut

Müllerzellen sind in vielfacher Weise besondere Zellen der Retina. So sind sie nicht nur die häufigsten glialen Zellen der Netzhaut - obwohl sie nicht unmittelbar am Sehvorgang teilnehmen – sie sind auch der einzige Zelltyp, der die gesamte Netzhaut von der Membrana limitans externa bis zur Membrana limitans interna durchspannt. Die Perikarien der Müllerzellen befinden sich in der inneren Körnerschicht, gemeinsam mit den Zellkörpern der amakrinen Zellen, der Bipolarzellen und der Horizontalzellen, wobei ihre Fortsätze Kontakt zu nahezu jedem benachbarten Neuron haben und deren Somata und Fortsätze umschlingen. Sie sind essentieller Bestandteil der Netzhautarchitektur und -funktion, indem sie als Stützzellen und Lichtleiter fungieren und die retinale Homöostase aufrechterhalten (Reichenbach und Bringmann 2013; Goldman 2014).

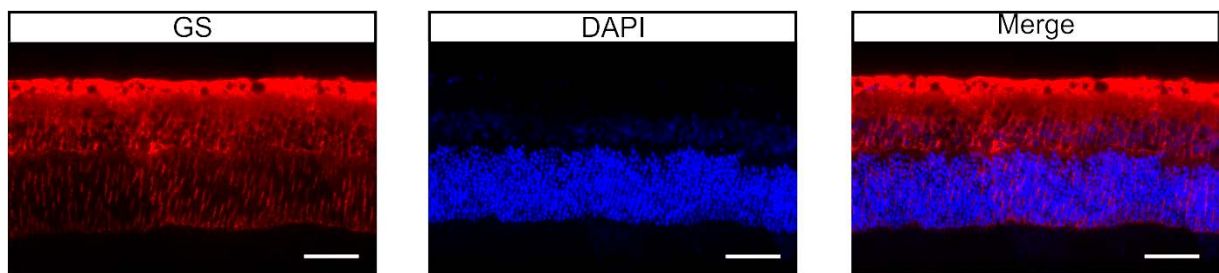


Abbildung 7: Immunhistochemische Darstellung von Müllerzellen in der Rattenretina mittels Glutaminsynthetase (GS). Maßstabsbalken 50 μm

Sie stellen eine anatomische und funktionelle Verbindung zwischen den retinalen Neuronen und den benachbarten Strukturen wie dem intravitrealen Raum, dem subretinalen Raum und den retinalen Gefäßen dar. Hierbei sind sie an der Bildung und am Recycling von Neurotransmittern beteiligt, regeln die Ionenbalance im extrazellulären Raum und produzieren neurotrophe Faktoren, wie beispielsweise FGF-2 (Bringmann et al. 2009; Newman und Reichenbach 1996; Tout et al. 1993; Goldman 2014; Newman 2003). Dazu haben Studien gezeigt, dass Müllerzellen an Recyclingprozessen im visuellen Kreislauf teilnehmen, indem sie verbrauchte Photorezeptoraußensegmente phagozytieren, beim Wiederaufbau der Außensegmente zu Membranstapel beteiligt sind und das zapfenspezifische Chromophor Rhodopsin regenerieren (Wang et al. 2005). Zusätzlich zeigen sie eine

Barriere- und auch Transportfunktion für bestimmte Moleküle und Transmitter zwischen den verschiedenen retinalen Schichten und beteiligen sich dabei an der Blut-Retina-Schranke (Choi und Kim 2008).

Die Retina ist durch den hohen Sauerstoffverbrauch während der Lichtexposition einem extrem hohen oxidativen Stressniveau ausgesetzt. Gleichzeitig sind vor allem die äußeren retinalen Schichten einem permanenten circadianen Wechsel zwischen Hyperoxie (unter Lichtexposition) und Hypoxie (im Dunkeln) ausgesetzt (Linsenmeier 1986), welche ebenfalls zu oxidativem Stress durch eine vermehrte Bildung von beispielsweise oxidierenden Substanzen (ROS, reaktive Sauerstoffspezies) führen. Allein durch die Produktion verschiedenster Antioxidantien, unter anderem dem prominenten Vertreter Glutathion, und deren Sekretion in den extrazellulären Raum durch Müllerzellen wird eine reguläre Funktion und Homöostase der retinalen Zellen sichergestellt (Reichenbach und Bringmann 2013). Eine besondere Rolle nimmt die Müller-Glia bei der Beendigung des neuronalen Impulses bei einem Lichtreiz ein: Der von den neuronalen Zellen im synaptischen Spalt freigegebene exzitatorische Neurotransmitter Glutamat wird dabei schnell aus dem extrazellulären Raum entfernt und mittels des Enzyms Glutamat-Ammonium-Ligase (GLUL) in das Vorläufermolekül Glutamin verstoffwechselt und den Neuronen daraufhin wieder zur Verfügung gestellt. (Matsui et al. 1999).

Die Müller-Glia unterstützt neben der strukturellen Integrität der Retina auch gezielt das Überleben von Photorezeptoren und retinalen Neuronen durch Sekretion von neuroprotektiven Faktoren (Bringmann et al. 2006; Goldman 2014; Newman und Reichenbach 1996; Reichenbach und Bringmann 2013; Seitz et al. 2010). Der für diese Arbeit interessanteste Aspekt der Müllerzellen ist jedoch deren Funktion bei reaktiven Prozessen der Retina auf Schäden verschiedenster Art. Bei Zebrafischen entdifferenzieren die Müllerzellen nach retinaler Schädigung zu multipotenten Progenitorzellen und sind in der Lage, jede Art von Zelle der Netzhaut zu regenerieren und Schäden zu reparieren (Bernardos et al. 2007; Goldman 2014). In Säugetieren zeigt die Müller-Glia zwar nach Schädigung keine massive Entdifferenzierung und Proliferation von Stammzellen *in vivo*, jedoch konnte gezeigt werden, dass diese Zellen Charakteristika von Progenitorzellen aufweisen und unter bestimmten Voraussetzungen retinale Vorläuferzellen bilden können (Fischer und Reh 2001; Jones et al. 2003; Wan et al. 2008). Auch wurde beschrieben, dass

humane primäre Müllerzellkulturen unter Behandlung mit Wachstumsfaktoren wie EGF und FGF-2 Photorezeptorzellen und retinale Ganglienzellen bildeten, welche bei Transplantation in geschädigte Netzhäute von Mäusen beziehungsweise Ratten retinale Funktionen teilweise wiederherstellten (Lawrence et al. 2007; Singhal et al. 2012; Giannelli et al. 2011).

Mehrere Studien haben nur wenige Erfolge bei dem Versuch gezeigt, murine oder humane Müllerzellen über eine reaktive Gliose hinaus zu einer regenerativen Antwort auf retinale Schädigung anzuregen. Neben anderen Signalkaskaden, wie sonic hedgehog-, EGFR (epidermal growth factor receptor)- und Glutamat-abhängiger Signaltransduktion, scheint die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs eine große Rolle bei der Stimulation zur Proliferation von Müllerzellen und konsekutiv für die neuronale Regeneration zu spielen (Osakada et al. 2007). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine exzitatorische Schädigung mittels N-methyl-D-Aspartat und kombinierter Behandlung mit EGF eine deutliche Proliferationsreaktion von Müllerzellen in Retinae von Mäusen induziert. Diese Reaktion scheint über die Aktivierung von MAPK (Mitogen-activated protein kinase), PI3K (phosphoinositide-3-kinase) und BMP (bone morphogenic protein)-Signalwegen vermittelt zu werden (Ueki und Reh 2013; Goldman 2014).

2 Zielsetzung der Arbeit

Dass Norrin *in vivo* eine neuroprotektive Wirkung nach exzitotoxischer Schädigung im NMDA-Modell sowie im Lichtschadensmodell zeigt, konnte durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Seitz et al. 2010; Braunger et al. 2013). In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob eine intrinsische Überexpression von Norrin einen protektiven Effekt auf Photorezeptoren im Rahmen einer hereditären Netzhautschädigung im VPP-Schadensmodell vermitteln kann.

In Knochenfischen wächst die Retina zeitlebens mit dem Wachstum des Fisches und beschädigte retinale Zellen können durch Regeneration ersetzt werden. Dabei konnte am Beispiel des Zebrafisches gezeigt werden, dass eine Müllerzellpopulation insbesondere im Bereich der Ora serrata als Stammzellreservoir fungiert (Fausett und Goldman 2006; Nagashima et al. 2013; Ramachandran et al. 2011). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob Norrin durch Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auch in murinen Müllerzellen zur Expression von Stammzeleigenschaften führt. Hierfür sollte einerseits untersucht werden, ob die Neurosphärenbildung aus murinen Müllerzellen (Monnin et al. 2007) durch Norrin *in vitro* beeinflusst wird. Andererseits sollte geklärt werden, ob sich nach exzitatorischer Netzhautschädigung Hinweise auf eine Norrin-vermittelte neuroregenerative Wirkung *in vivo* zeigen.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Wird eine hereditäre chronische Degeneration von Photorezeptorzellen durch eine Überexpression von Norrin verzögert?
- Zeigen sich in diesem Modell neben einer Neuroprotektion auch Hinweise für eine neuroregenerative Wirkung von Norrin?
- Beeinflusst rhNorrin die Bildung von Neurosphären aus murinen Müllerzellen *in vitro*?
- Zeigt intravitreal appliziertes rhNorrin bei einer gleichzeitigen exzitotoxischen Schädigung der Retina ebenfalls neuroregenerative Eigenschaften?

3 Materialien und Methoden

3.1 Grundausrüstung

3.1.1 Materialien/Geräteliste

| Materialien/Geräte | Bezugsquelle |
|---|--------------------------------|
| abgeschrägte 35G Injektionskanüle | W.P.I., Berlin |
| Axio Imager.Z1 mit ApoTome Zusatzmodul | Carl Zeiss, Jena |
| Axiovert 40 CF L | Carl Zeiss, Jena |
| BD Microlance Kanüle | BD Bioscience, Heidelberg |
| Biosphere Filter Tips | Sarstedt, Nümbrecht |
| Casy Cell Counter and Analyser | Roche/Innovatis, Bielefeld |
| Cellobserver | Carl Zeiss, Jena |
| Dispomed Einmalspritze | Dispomed Withh oHG, Geinhausen |
| Easyflasks Nunclon™ | Nunc, Roskilde, DEN |
| Ecoflow Perfusionsbesteck | Dispomed Withh oHG, Geinhausen |
| Einbettautomat EM TP (Epon) | Leica, Wetzlar |
| Einbettautomat H MP 110 (Paraffin) | Microm, Waldorf |
| Einwegkanülen 0,40x0,20 | BD Microlance |
| Falcon Reaktionsgefäße 15ml, 50ml | Sarstedt, Nümbrecht |
| Glaspipetten | Brand, Wertheim |
| Glaswaren | Schott, Roth, VWR |
| Hamiltonspritze 25µl | Roth, Karlsruhe |
| Hera Cell 150 Brutschrank | Heraeus, Hanau |
| Hera Safe Sterilwerkbank | Heraeus, Hanau |

| | |
|--|---|
| Julabo SW20 Wasserbad | Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern |
| Liquid Blocker PAP-Pen | SCI-Science Services, München |
| Multi-Reaktionsgefäße 0,5ml; 1,5ml; 2ml | Roth, Karlsruhe |
| MiliQ Plus PF Reinwasseranlage | Millipore Corp., Billerica, USA |
| Ohrmarken | Hauptner & Heberholz, Solingen |
| Omnifix sterile Einmalspritzen | B. Braun, Wertheim |
| Pasteurpipetten | Brand, Wertheim |
| Petrischale | Sarstedt, Nümbrecht |
| Pipetman Pipetten | Gilson, den Haag, NED |
| Pipettenspitzen | Sarstedt, Nümbrecht |
| Power Supply | Consort, Turnhout, BEL |
| Präparierbesteck | Fine Science Tools, Heidelberg |
| Rotilabo 0,22µm Spritzenfilter | Roth, Karlsruhe |
| Serologische Pipetten | Sarstedt, Nümbrecht |
| Stemi 2000 CS | Carl Zeiss, Jena |
| Sterican Einmal-Injektions-Kanüle | B. Braun, Wertheim |
| Supercut 2050 (Paraffin) | Reichert-Jung, Kirchseeon |
| Superfrost Ultra Plus Objektträger | Menzel-Gläser, Braunschweig |
| Thermal Cycler T100 | Biorad, München |
| Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg |
| Ultracut E-Ultramikrotom | Reichert-Jung, Kirchseeon |
| Vertikale Gelelektrophorese-Kammer | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries Inc., New York, USA |
| Wellplatten 24 / 96 Well | Nunc, Roskilde, DEN |
| Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R | Eppendorf, Hamburg |

Tabelle 1: Materialien/Geräteliste

3.1.2 Reagenzienliste

| Reagenzien | Bezugsquelle |
|---|----------------------------|
| 10x PCR-Puffer | Qiagen, Hilden |
| 2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl)phenol (DPM-30) | Serva, Heidelberg |
| 2-Dodecenylsuccinylsäureanhydrid (DDSA) | Serva, Heidelberg |
| Azur II 1% (5g in 500ml A.bid.) | Merck, Darmstadt |
| BrdU | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Casyton [®] | Roche/Innovatis, Bielefeld |
| Collagenase A | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Dimethylarsinsäure (Cacodylsre) | Merck, Darmstadt |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Roth, Karlsruhe |
| Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | Merck, Darmstadt |
| DMEM-GlutaMax [™] -I 500ml | PAA, Pasching, AUT |
| dNTPs | Qiagen, Hilden |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium with Ham's F12 Nutritional Supplement 500ml (DMEM/F12) | PAA, Pasching, AUT |
| EGF | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Epon H | Serva, Heidelberg |
| Ethanol, absolut | Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Serva, Heidelberg |
| Fetal Calf Serum (FCS) | Invitrogen, Karlsruhe |
| FGF-2 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Gelatine | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Gentamycin (5mg/ml) | Invitrogen, Karlsruhe |
| Glutaraldehyd | Serva, Heidelberg |

| | |
|--|---|
| Glycerin | Roth, Karlsruhe |
| Glycidether | Serva, Heidelberg |
| Heparin-Natrium 25000 I.E./5ml | Ratiopharm, Ulm |
| Isofluran | Baxter, Unterschleißheim |
| Isopropanol | Roth, Karlsruhe |
| Isopto Max | Alcon Pharma, Freiburg |
| Kaliumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Ketamin | Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte (WDT), Garbsen |
| Magermilchpulver | Roth, Karlsruhe |
| Magnesiumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Magnesiumchlorid (25mM) | Qiagen, Hilden |
| Methylenblau 1% (5g in 500ml Natrium-tetraboratlsg) | Merck, Darmstadt |
| Methylnadicanhydrid (MNA) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydrogenphosphat- Monohydrat | Merck, Darmstadt |
| Natriumtetraborat (Borax) | AppliChem, Darmstadt |
| N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Nonidet P-40 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Paraffin | Engelbrecht, München |
| Paraformaldehyd (PFA) | Merck, Darmstadt |
| Penicillin/Streptomycin | Invitrogen, Karlsruhe |
| Penicillin-Streptomycin | Life-Technologies, Paisley, UK |
| Protein buffer solution (PBS) | Life-Technologies, Paisley, UK |
| Proteinase K | Roth, Karlsruhe |
| Saccharose | Roth, Karlsruhe |
| Salzsäure (HCl) | Merck, Darmstadt |
| Tris/HCl | Roth, Karlsruhe |
| Triton-X-100 | Roth, Karlsruhe |
| Trypsin/EDTA (0,05%) | Life Technologies, Paisley, UK |
| Tween 20 | Roth, Karlsruhe |

| | |
|---|--------------------------------------|
| Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI | Vector Laboratories, Burlingame, USA |
| Wasser Rotisolv (RNase-frei) | Roth, Karlsruhe |
| X100 N₂-Supplement 5ml | PAA, Pasching, AUT |
| Xylazin | Serumwerk Bernburg, Bernburg |
| Xylol | Roth, Karlsruhe |

Tabelle 2: Reagenzienliste

3.1.3 Oligonukleotidprimer und DNA-Leiter

Die hier verwendeten Oligonukleotidprimer wurden von Life Technologies, Paisley, UK hergestellt. Der eingesetzte Größenstandard bei der Agarose-Gelelektrophorese war Generuler 100bp Plus DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

| Primer | Orientierung | Sequenz 5' nach 3' |
|-------------------------------|---------------------|-----------------------------|
| SV40 (f. Rpe65-Norrin) | forward | gtgaaggaaccttacttctgggtg |
| | reverse | gtccttgggtcttctaccttctc |
| VPP | forward | agactgacatggggaggaattcccaga |
| | reverse | gagctgctcgaagtgactccgacc |

Tabelle 3: Oligonukleotidprimer

3.1.4 Enzyme und Reagenzien-Kits

Die verwendeten Enzyme und Reagenzienkits sind in Tab. 4 aufgelistet.

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---------------------------|---------------------|
| Taq DNA Polymerase | Qiagen, Hilden |
| TUNEL Assay | Promega, Mannheim |

Tabelle 4: Enzyme und Reagenzien-Kits

3.1.5 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 5 und 6 aufgelistet. Die angegebenen Verdünnungen wurden mit der jeweiligen 1:10 - Blockierlösung der spezifischen Färbung hergestellt.

| Sekundär/Tertiärantikörper | Bezugsquelle |
|--|--------------------------|
| Alexa Flour® 488-konjugiertes Streptavidin | Mo Bi Tec, Göttingen |
| goat α mouse Biotin | Vector, Peterborough, UK |

Tabelle 5: Sekundär-/Tertiärantikörper

| Primärantikörper | |
|---------------------|-----------------------|
| mouse α BrdU | Invitrogen, Karlsruhe |

Tabelle 6: Primärantikörper

3.1.6 Zusammensetzung der verwendeten Gele, Lösungen und Puffer

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|---------------------------|--|
| 10x TBE | 108g Tris 55g Borat 40ml 0,5M EDTA ad 1l mit Aqua bidest.; pH 8 |
| 5X Glycerol (Loading Dye) | 1mM Cresolrot 60% Glycerol (autoklaviert) mit Aqua bidest. auffüllen |
| Agarosegel | 1g Agarose 100ml 1xTBE 5 μ l Ethidiumbromid |
| Cacodylatpuffer | 20,14g Cacodylsäure, in 0,5l Aqua bidest. pH 7,2 |
| EM-Fixans | 2,5% Paraformaldehyd 2,5% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer |
| Epon H (Serva Mix A+B) | 43,2g Glycid Ether 16,8g DDSA 30g MNA 1,5ml DMP-30 |

| | |
|--|---|
| Färbelösung nach Richardson | 1 Teil Azur II 1% 1 Teil Methylenblau 1% 2 Teile Aqua bidest. |
| Mausschwanz-Lysepuffer | 50mM Kaliumchlorid 10 mM Tris/HCl, pH 8,3 2mM Magnesiumchlorid 0,1mg/ml Gelatine 0,45% Nonidet P-40 0,45% Tween 20 Proteinase K (500µg/ml) |
| Medium zur Neurosphäreninduktion (Induktionsmedium) | 500ml DMEM/F12 5ml Penicillin/Streptomycin 5ml X100 N ₂ -Supplement 5% CO ₂ |
| Müllerzellmedium | 500ml DMEM +GlutaMax™II 5ml Penicillin/Streptomycin 1ml Gentamycin 50ml FCS 5% CO ₂ |
| PFA 4% | 4g PFA 100ml PhP unter Rühren und Erwärmen lösen pH 7,4 |
| Phosphatpuffer (PhP) 0,1M | P1: Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O: 35,6g auf 2l A.bid. P2: NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O: 13,8g auf 1l A.bid. P1:P2 = 5:1 pH 7,4 |

Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Gele, Lösungen und Puffer

3.2 Molekularbiologie

3.2.1 DNA-Extraktion aus Mausschwanzbiopsien

Um transgene Mäuse genotypisieren zu können, wurde genomische DNA aus Mausschwanzbiopsien gewonnen. Dazu wurden die etwa 0,5 cm langen Gewebeproben in 200 µl Mausschwanz-Lysepuffer überführt und über Nacht bei 55 °C im Schüttler lysiert. Nach Inaktivierung der im Puffer enthaltenen Proteinase K mittels Inkubation der Proben bei 95 °C für 10 min und anschließendem Zentrifugieren mit 13200 U/min für 10 min, konnte die im Überstand gelöste DNA als Template für die folgende Genotypisierungs-PCR verwendet werden.

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein etabliertes Verfahren, wobei spezifische DNA-Abschnitte in einer vorliegenden DNA-Probe enzymabhängig so amplifiziert werden, dass sie per Gel-Elektrophorese nachgewiesen werden können. Um den Genotyp der untersuchten Mäuse zu bestimmen, wurden je nach Mauslinie unterschiedliche Reaktionsansätze (Mastermix) zusammen mit der zu untersuchenden Probe in 0,2 ml Reaktionsgefäße auf Eis pipettiert, kurz anzentrifugiert und in einem Thermocycler amplifiziert. Die spezifische Zusammensetzung der PCR-Ansätze sowie die Protokolle für die PCR sind in Tabelle 8 mit 10 aufgelistet. Anschließend wurde dem Versuchsansatz ein Loading Dye zugesetzt, um das Einbringen in die Geltaschen bei der folgenden Gel-Elektrophorese zu erleichtern und den Fortschritt der Elektrophorese zu überwachen.

| Rpe65-Norrin MM | 1x | VPP MM | 1x |
|---|---------|--------------------------|---------|
| 10x PCR-Puffer | 2,5 µl | 10x PCR-Puffer | 2,5 µl |
| SV40 fwd (1:10) | 0,5 µl | VPP fwd (1:10) | 0,5 µl |
| SV40 rev (1:10) | 0,5 µl | VPP rev (1:10) | 0,5 µl |
| dNTPs (10mM) | 0,5 µl | dNTPs (10mM) | 0,5 µl |
| MgCl ₂ (25mM) | 1,2 µl | MgCl ₂ (25mM) | 1,2 µl |
| Loading Dye | 3 µl | Loading Dye | 3 µl |
| H ₂ O | 14,5 µl | H ₂ O | 14,5 µl |
| Taq.-Polymerase | 0,3 µl | Taq.-Polymerase | 0,3 µl |
| Gesamtvolumen Mastermix 23 µl + 2µl DNA-Template | | | |

Tabelle 8: Zusammensetzung Reaktionsansätze (Mastermix) der Genotypisierungs-PCR für Rpe65-Norrin und VPP

| PCR SV40 | Temperatur | Dauer |
|---|------------|-------|
| 1. Initialisierung | 96 °C | 2 min |
| 2. Denaturierung | 94 °C | 45 s |
| 3. Hybridisierung | 58 °C | 1 min |
| 4. Elongation | 72 °C | 1 min |
| Schritt 2-4: 35x | | |
| 5. Finale Elongation | 72 °C | 5 min |
| 6. Halten | 12 °C | ∞ |
| Länge des Produkts (SV40): 300bp | | |

Tabelle 9: PCR-Protokoll SV40 für Rpe65-Norrin

| PCR VPP | Temperatur | Dauer |
|---|------------|--------|
| 1. Initialisierung | 94 °C | 5 min |
| | | |
| 2. Denaturierung | 94 °C | 30 s |
| 3. Hybridisierung | 68 °C | 45 s |
| 4. Elongation | 72 °C | 45 s |
| Schritt 2-4: 30x | | |
| | | |
| 5. Finale Elongation | 72 °C | 10 min |
| 6. Halten | 12 °C | ∞ |
| Länge des Produkts (VPP): 450 bp | | |

Tabelle 10: PCR-Protokoll VPP

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Länge des amplifizierten DNA-Fragments wurde anschließend mittels Gel-Elektrophorese bestimmt. Dazu wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x-TBE-Puffer durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst und unter fließendem Wasser auf etwa 60 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid wurde die Lösung in Gelschlitten gegossen, von Luftbläschen befreit und mit 25-zahnigen Kämmen zur Formung von Gel-Taschen versehen. Nach Aushärtung des Gels wurden die Kämmen entfernt und der befüllte Schlitten in eine Elektrophoresekammer gelegt, woraufhin diese mit 1x-TBE-Puffer befüllt wurde bis das Gel vollständig bedeckt war. Nun wurden jeweils 10 µl der Proben in die Geltaschen pipettiert und zur Verifizierung der Produktlänge 3,5 µl des Molekulargewichtstandards Generuler 100 bp PLUS DNA-Leiter in einer separaten Tasche eingesetzt. Nach Auftrennung der Proben durch das Anlegen einer Spannung von 130 V für 45 min konnten die entstandenen Banden durch Interkalation des Ethidiumbromids mit der amplifizierten DNA mittels Transilluminator sichtbar gemacht und fotodokumentiert werden.

3.3 *In vitro* Versuche

3.3.1 Arbeitstechniken

Die Kultivierung und Behandlung der Müllerzellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Lösungen und Puffer wurden steril filtriert, verwendete Kunststoffmaterialien, wie Pipetten, Kulturflaschen, Zellkulturröhrchen oder Petrischalen waren steril verpackt, Glaswaren autoklaviert. Das Herstellen der Lösungen und Kulturmedien, der Wechsel des Kulturmediums (alle zwei Tage) und die Behandlung der Zellen erfolgte unter einer Sterilwerkbank. Die Kultivierung der Zellen fand in speziellen Brutschränken bei konstanter Temperatur und konstanter CO₂-Konzentration in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre statt.

3.3.1.1 Isolation von Müllerzellen

Für die Isolation von Müllerzellen aus Wistar Ratten wurden die Tiere 8-12 Tage (P8-P12) nach Geburt durch cervikale Dislokation getötet und die durch E nukleation gewonnenen Augen nach Perforation der Corneae ca. 12h in serumhaltigem Müllerzellmedium bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden diese mehrfach mit PBS gespült und für 45 Minuten bei 37 °C in eine Verdauungslösung (2 ml DMEM/Glutamax serumfrei, 500 µl Trypsin, 15 µl Collagenase-1) überführt. Die enzymatische Reaktion wurde mittels serumhaltigem Müllerzellmedium abgestoppt und die Augen auf Eis erneut mehrfach mit PBS gespült. Anschließend wurden diese auf Höhe der pars plana zirkulär eröffnet und die Retinae vorsichtig von den restlichen hinteren Augenabschnitten getrennt. Die so erhaltenen Retina-Präparate wurden zerkleinert, in einem 15 ml Zellkulturröhrchen in PBS gesammelt und 5 min bei 4 °C mit 1000 U/min zentrifugiert. Das Zellkonglomerat wurde daraufhin in serumhaltigem Müllerzellmedium resuspendiert, je nach Anzahl der präparierten Retinae auf kleine Zellkulturflaschen verteilt (3-5 Retinae auf eine Flasche) und kultiviert. Vor jedem Mediumwechsel oder Passagieren wurden mögliche Verunreinigungen durch andere Zellpopulationen der Retina (beispielsweise Mikroglia) durch seitliches Beklopfen der

Kulturflasche abgelöst und mit dem Medium entfernt. Die Reinheit der Müllerzellkultur wurde einerseits durch konditioniertes Müllerzellmedium, andererseits durch mikroskopische Kontrollen der Zellmorphologie sichergestellt.

3.3.1.2 Passagieren der Zellen

Um eine durch die Zellkontakthemmung verursachte Verlangsamung der Zellteilungsrate zu verhindern, wurden die Müllerzellen bei einer Konfluenz von etwa 80% passagiert. Dabei wurde nach Absaugen des Kulturmediums zweimal mit PBS gespült und etwa 1 ml Trypsin/EDTA 0,05 % in die Zellkulturflasche gegeben. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigem Kulturmedium abgestoppt sobald die Zellen begannen sich abzurunden und abzulösen. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zellkulturröhrchen überführt und 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das erhaltene Zellpellet in frischem Müllerzellmedium gelöst und im Verhältnis 1:4 ausgesät.

3.3.1.3 Zellzahlbestimmung mittels Casy® Cell Counter

Vor dem Aussähen der Müllerzellen auf 96er-Wellplatten wurden die Zellen analog zum Passagieren abtrypsiniert und in DMEM/F12 + P/S resuspendiert. 50 µl dieser Suspension wurden in 10 ml Casyton®-Elektrolytlösung gelöst und anschließend die Zellzahl und -vitalität per Casy® Cell Counter bestimmt.

Das Prinzip des Casy® Cell Counters basiert auf den unterschiedlichen elektrischen Leitfähigkeitseigenschaften von Zellen abhängig von deren Größe und Vitalität. Vitale Zellen sind von einer geschlossenen Zellmembran umgeben und wirken bei niedriger Spannung als Isolatoren. Dabei hängt die Höhe des Widerstandes von der Größe der Zellen ab. Avitale Zellen mit löchriger Zellmembran (nur der Zellkern wirkt als elektrischer Widerstand) und Zelltrümmer zeigen eine wesentlich erhöhte elektrische Leitfähigkeit. Bei jeder Messung werden 400 µl der Casyton®-Zellsuspension in eine Kapillare mit einem Durchmesser von 150 µm und einem definierten elektrischen Widerstand eingesaugt. Dringt eine Zelle in diese Kapillare ein, ändert sich je nach Größe und Vitalität der Zelle der Widerstand in der Kapillare. Der Casy® Cell

Counter verrechnet anschließend Anzahl und Größe (entsprechend des Widerstandes) der Zellen und erstellt eine Größenverteilung. Durch die Definition von Größengrenzen können avitale Zellen, Zelltrümmer und Zellkonglomerate herausgefiltert und auch der Anteil an vitalen Zellen berechnet werden.

3.3.2 Behandlung der Müllerzellkulturen

Nach etwa fünfmaligem Passagieren wurde die erforderliche Zellzahl zur Durchführung des Experiments erreicht. Um die Behandlung der Müllerzellen vorzubereiten, wurden etwa 20.000 Müllerzellen/Well in Müllerzellmedium auf einer 96-Well-Platte ausgesät und bis zu einer 80%igen Konfluität inkubiert. Danach wurde das Nährmedium abgesaugt und die Wells jeweils mit PBS gewaschen und mit DMEM/F12+P/S auf ein Volumen von 200µl aufgefüllt. Gleichzeitig wurde jedes Well - mit Ausnahme der Wells A+B/1+2 - mit N₂-Supplement versehen. Anschließend wurden entsprechend des Pipettierschemas (vgl. Tabelle 11: Pipettierschema zur Neurosphäreninduktion) EGF, FGF-2 und rh-Norrin hinzugefügt. Bereits im Vorfeld wurden von den Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2, sowie von rh-Norrin unterschiedliche Konzentrationen in DMEM/F12+P/S+N₂-S. hergestellt, um in allen behandelten Wells das gleiche Endvolumen zu erreichen. Als positiv-Kontrolle wurde eine Kombination aus 4 ng/ml FGF-2 und 8 ng/ml EGF in DMEM/F12+P/S+N₂-S. verwendet.

| Well | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | | | | | | | |
|------|---|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|----|------|----|--------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|
| A | neg. KO ohne N ₂ - Supp. | | 1,0 | | 2,0 | | 4,0 | | 8,0 | | 10,0 | | EGF in ng/ml | +Norrin 40ng/ml | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | pos. KO | | 1,0 | | 2,0 | | 4,0 | | 8,0 | | 10,0 | | | | EGF in ng/ml | +Norrin 40ng/ml | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | neg. KO | | 1,0 | | 2,0 | | 4,0 | | 8,0 | | 10,0 | | | | | | EGF in ng/ml | +Norrin 40ng/ml | | |
| F | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | neg. KO | | 1,0 | | 2,0 | | 4,0 | | 8,0 | | 10,0 | | | | | | | | EGF in ng/ml | +Norrin 40ng/ml |
| H | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Tabelle 11: Pipettierschema zur Neurosphäreninduktion

3.3.3 Charakterisierung von Neurosphären

Werden neuronale Progenitorzellen oder embryonale Stammzellen in Kulturmedium ohne die Zelladhärens fördernde Substrate mit Wachstumsfaktoren (EGF, endothelial growth factor; FGF-2, fibroblast growth factor 2) versorgt, bilden sich von diesen Vorläuferzellen ausgehend dreidimensionale Zellkonglomerate. Diese „3D-Cluster“ werden als Neurosphären bezeichnet, welche aus einem kleinen Anteil neuronaler Stammzellen besteht. Von den Neurosphären breitet sich bei Kontakt mit dem Boden der Zellkulturflasche in weiterer Kultur eine einzelne Zellschicht aus neuronalen Vorläuferzellen aus (Reynolds und Weiss 1992; Reynolds und Weiss 1996; Jensen und Parmar 2006).

Als Neurosphären wurden Zellkonglomerate bezeichnet, die sich auf einer reinen konfluenten Müllerzellkultur nach Zugabe von rekombinantem Norrin beziehungsweise Wachstumsfaktoren (EGF, FGF-2) bildeten und ähnliche morphologische Eigenschaften aufwiesen wie von Reynolds und Weiss vorherbeschriebene Neurosphären.

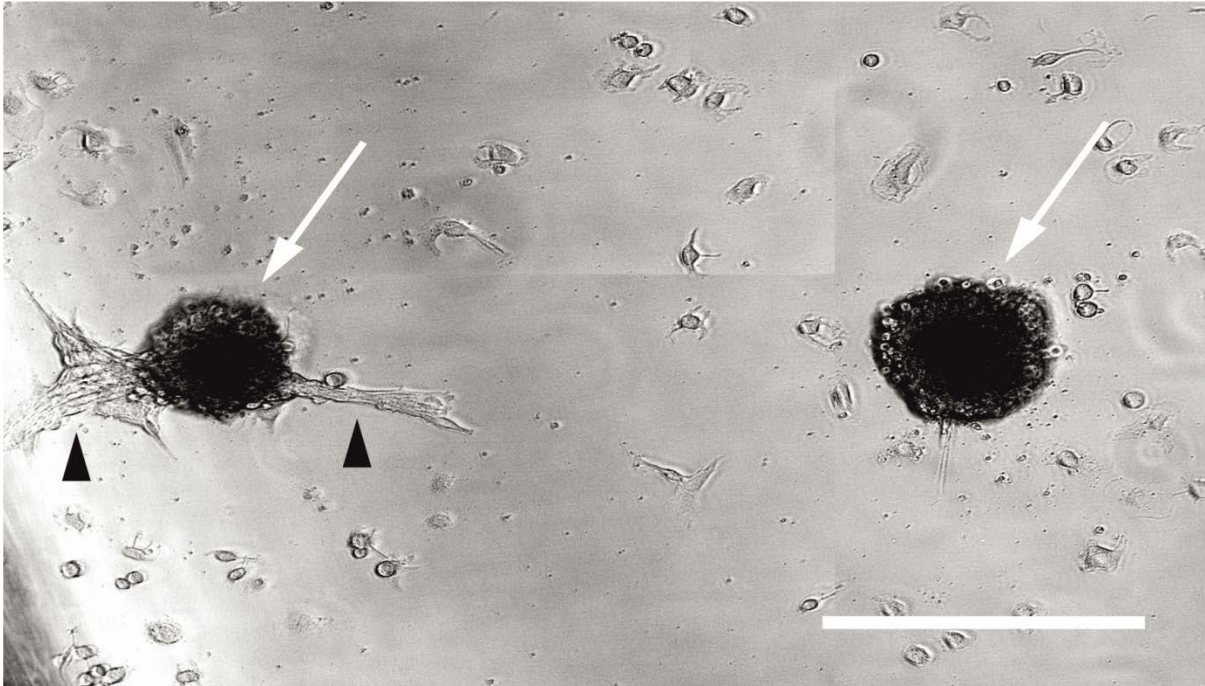


Abbildung 8: Neurosphären aus Müllerzellkultur. Nach Behandlung einer konfluenten Kultur von Müllerzellen mit EGF (endothelial growth factor), FGF-2 (fibroblast growth factor) oder rhNorrin bildeten sich kugelige Zellkonglomerate, sogenannte Neurosphären (weiße Pfeile). Unter der linken Neurosphäre sind noch Ausläufer der darunterliegenden am Boden der Kulturflasche anhaftenden Müllerzelle zu sehen (schwarze Pfeilspitzen). Maßstabsbalken 200 µm.

3.3.4 Auswertung

Nach Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ für 72 h wurde jedes Well mikroskopisch analysiert (Cell Observer, Carl Zeiss, Jena), mit der MosiaX-Funktion der Software Axiovision fotodokumentiert und die Anzahl, sowie Länge (=a) und Breite (=b) der gebildeten Neurosphären mit dem Messwerkzeug „Länge“ ermittelt. Gezählt wurden nur Neurosphären, welche einen minimalen Durchmesser von 80 µm überschritten. Aus den generierten Daten wurden mittels der Formel für das erweiterte Drehellipsoid $V = \frac{4\pi}{3} ab^2$ das Volumen jeder Neurosphäre annäherungsweise errechnet und die Volumina pro Well addiert. Die Mittelwerte der Gesamtvolumina der mit rhNorrin behandelten Wells wurden in Relation zu den Mittelwerten der Wells mit gleicher Wachstumsfaktorkonzentration ohne rhNorrin gestellt und verglichen.

3.4 *In vivo* Versuche

3.4.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die in den Versuchen der vorliegenden Arbeit benötigten Ratten und Mäuse wurden im Tierlabor der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg unter artgerechten Bedingungen gehalten (Temperatur $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, relative Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 5\%$, Hell-Dunkel-Intervall 12 h, Futter und Wasser ad libitum). Die Haltung und Behandlung der Tiere erfolgte in Übereinstimmung mit dem „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“.

Die Wistar Ratten für die Behandlung im NMDA-Schadensmodell wurden von Charles River, Sulzfeld bezogen.

Die Rpe65-Norrin Maus im FVB/n-Hintergrund, welche ektopes Norrin über das retinale Pigmentepithel konstitutiv exprimiert, wurde von unserer Arbeitsgruppe generiert (Ohlmann et al. 2010).

Die VPP-Maus, welche eine mutierte Form des Opsin-Gens transgen exprimiert, wurde als Schadensmodell der autosomal dominanten Retinopathia Pigmentosa von der Arbeitsgruppe um Muna Naash generiert (Naash et al. 1993) und unserer Arbeitsgruppe im Balb/c-Hintergrund freundlicherweise von Prof. C. Grimm (Labor für Retinale Zellbiologie, Universitätsspital Zürich) zur Verfügung gestellt.

Zur Aufrechterhaltung der transgenen Zuchtlinien wurde jeweils ein transgenes Tier mit einem wildtypischen Tier des gleichen genetischen Hintergundes verpaart. Die Zucht der Rpe65-Norrin/VPP-Mäuse erfolgte durch Verpaarung eines VPP-transgenen Tieres im Balb/c-Hintergrund mit einem Rpe65-Norrin-positiven Tier im FVB/n-Hintergrund. Dadurch wurde auch die Entwicklung einer autosomal rezessiven retinalen Degeneration (rd1) vermieden, welche sich im homozygoten FVB/n-Hintergrund zeigt. Es wurde nur die F1-Generation dieser Verpaarung für die Versuche herangezogen.

3.4.2 Aufbereitung von Geweben aus Maus und Ratte

3.4.2.1 Gewinnung von retinalen Präparaten für die histologische Untersuchung

Um Präparate für histologische Untersuchungen herzustellen, wurden Mäuse im Alter von 3, 5 und 8 Wochen per Isoflurannarkose betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Die Ratten wurden an Tag 8-12 postpartal durch zervikale Dislokation getötet. Nach Eukleation der Augen mittels stumpfer, gebogener Pinzette wurden diese je nach Art der geplanten Weiterverarbeitung entweder in 4 % PFA oder EM-Fixans gelagert.

Zur Herstellung von Augenpräparaten von WiStar Ratten im Zuge des NMDA-Schadensmodells wurden diese einen Tag nach abgeschlossener Behandlung per intraperitonealer Injektion von Ketamin/Xylazin (120 mg/kgKG, 8 mg/kgKG) anästhesiert, Abdomen sowie Thorax eröffnet und das Herz freigelegt. Anschließend wurde eine Kanüle über die Herzspitze in den linken Ventrikel eingeführt, der rechte Vorhof eröffnet und solange mit NaCl 0,9 % perfundiert, bis sich die Leber entfärbt darstellte. Daraufhin wurde weiter mit PFA 4 % perfundiert bis eine zufriedenstellende Fixierung des Gewebes erreicht wurde. Anschließend wurden die Augen enukleiert und für die Weiterverarbeitung zu Paraffinpräparaten in PFA 4 % bei 4 °C über Nacht verbracht.

3.4.3 Intravitreale/intraperitoneale Injektion

3.4.3.1 Das NMDA Schadensmodell

Um die neuroregenerativen Eigenschaften von rekombinantem Norrin nach einer exzitotoxischen Schädigung retinaler Ganglienzellen zu untersuchen, wurde das NMDA Schadensmodell verwendet. Dabei kommt es nach irreversibler Bindung des Glutamat-Analogons NMDA an NMDA-Rezeptoren zur Konformationsänderung an daran gekoppelten Ca^{2+} -Kanälen und konsekutiv zu einem anhaltenden Ca^{2+} -

Einstrom, welcher in der Apoptose der betroffenen Zelle resultiert. Die intravitreale Injektion von NMDA führt zu einem selektiven Zelluntergang von amakrinen Zellen und Ganglienzellen, da lediglich diese den NMDA-Rezeptor-Kanal in der Netzhaut exprimieren (Siliprandi et al. 1992; Shen et al. 2006).

3.4.3.2 Das Prinzip der BrdU-Behandlung

Das synthetisch hergestellte Thymidin-Analogon Bromodesoxyuridin (BrdU) wird in Zellen aufgenommen und in seiner phosphorylierten Form anstatt Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Dort kann es im Zuge der immunhistochemischen Aufarbeitung - nach Denaturierung mittels HCl, Proteinase K oder Hitzeeinwirkung zur Freilegung der Bindestellen im Zellkern - mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern detektiert und somit zur Darstellung von proliferierenden Zellen verwendet werden.

3.4.3.3 Die Durchführung der intravitrealen Injektion von NMDA

Zur Untersuchung der neuroregenerativen Eigenschaften von rhNorrin wurden WiStar Ratten im Alter von drei Wochen mittels Inhalationsnarkose mit Isofluran anästhesiert. Danach wurde unter Sicht mit Hilfe eines Stereomikroskops mit einer 35G-Injektionsnadel, die nach topischer Desinfektion der Cornea mittels Jodlösung auf Höhe der pars plana in das Corpus vitreum eingeführt wurde, 5 µl NMDA 10mM in das rechte Auge und 5 µl NMDA 10mM + rhNorrin (5 ng/µl) in das linke Auge injiziert. Die korrekte Platzierung der Nadelspitze im Glaskörper wurde unter Sicht durch die Pupille sichergestellt. Die Nadel wurde daraufhin noch etwa 20 Sekunden im Auge belassen, um einen volumenbedingten Druckausgleich zu ermöglichen und letztlich einen Reflux der eingebrachten Substanzen aus dem Wundspalt zu verhindern.

3.4.3.4 Durchführung der intraperitonealen Injektion von BrdU

Direkt nach erfolgreicher intravitrealer Injektion und jeweils an den zwei folgenden Tagen wurde den Tieren unter Isoflurannarkose etwa 700 µl BrdU (10 mg/ml) entsprechend 7 mg BrdU mittels einer sterilen 1 ml Einmalspritze intraperitoneal verabreicht.

Am dritten Tag nach erfolgter intravitrealer Injektion von NMDA und dreimaliger intraperitonealer Applikation von BrdU wurden die Versuchstiere perfusionsfixiert (siehe 3.4.2.1) und die Augen zur weiteren Verarbeitung entnommen.

3.5 Methoden der Histologie

3.5.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Paraffinschnitte wurden für immunhistochemische Färbungen (TUNEL, BrdU) angefertigt.

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden die entnommenen Augen bei 4 °C über Nacht in 4 % PFA gelagert, wobei zur besseren Fixierung nach einer Stunde mittels Einmalkanüle die Cornea perforiert wurde. Zur Einbettung wurden die Präparate dreimal mit 0,1 M Phosphatpuffer gespült, im Einbettautomaten über Isopropanol (50 %, 70 %, 80 %, 96 % und 100 % für jeweils 1-2 Stunden) und zweimal Xylol 100 % (jeweils eine Stunde) in Paraffin überführt und anschließend auf Ausbettrahmen in Paraffin fixiert. Per Supercut-Microtom wurden daraufhin sagittale Schnitte von etwa 5 µm angefertigt und diese nach Standardprotokoll entparaffiniert und rehydriert.

| | |
|---------------------------|-------------------------------|
| Entparaffinieren: | |
| • 100 % Xylol | 2 x 10 min |
| Hydrieren bis aqua dest.: | |
| • 100 % Isopropanol | 2 x 10 min |
| • 96 % “ | 2 x 5 min |
| • 80 % “ | 2 x 5 min |
| • 70 % “ | 5 min |
| • (50 % “ | 5 min, nur für TUNEL-Färbung) |
| • Aqua dest. | 5 min |

Tabelle 12: Protokoll zum Entparaffinieren

3.5.2 Herstellung von Semidünnschnitten

Zur Herstellung von Semidünnschnitten wurden die Augen nach Eukleation direkt in EM-Fixans überführt, nach einer Stunde die Cornea mittels Mikroschere perforiert und nach 24 h Immersionsfixation mindestens viermal für 30 min in Cacodylatpuffer gespült. Daraufhin wurden die Präparate mit Osmiumtetroxid 1 % nachfixiert und mehrmals über mindestens zwei Stunden mit Aqua bidest. gewaschen (Moses und Claycomb 1982). Anschließend wurden die Augen in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mittels Propylenoxid im Einbettautomaten nach Standardprotokoll in Epon eingebettet (Propylenoxid/Epon H 3:1, 2:1, 1:3, Epon H 100 %). Das Aushärten erfolgte im Brutschrank bei 60 °C über mindestens 48 h. Für die Herstellung von Epon H wurde Servamix A und B im Verhältnis 1:1 mit 2 % Beschleuniger DMP-30 verwendet. Mittels „Ultracut-E“-Ultramikrotom wurden sagittale Semidünnschnitte von etwa 1 µm angefertigt, wobei annähernd mediane Schnitte mit Anschnitt der Papilla nervi optici präferiert wurden.

3.5.3 Histologische Färbungen

3.5.3.1 Färbung nach Richardson

Die angefertigten getrockneten Semidünnschnitte wurden jeweils für 15-30 Sekunden bei 60 °C mit der Färbelösung nach Richardson (K. C. Richardson, L. Jarett, E. H. Finke) überschichtet. Danach wurden diese ausgiebig mit Aqua dest. gespült. Nach erneuter Trocknung wurden die Präparate mittels Epon mit einem Deckglas eingedeckelt und für 60 Minuten zur Trocknung und Aushärtung in einen Wärmeschrank verbracht. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur gelagert.

3.5.4 Immunhistochemische Färbungen

3.5.4.1 TUNEL-Analyse

Zur Darstellung von apoptotischen Zellen an Sagittalschnitten der Retinae von Rpe65/VPP - Mäusen wurde der „Dead-End TUNEL-Assay“ (Promega, Mannheim) verwendet.

Die TUNEL-Analyse (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) ist eine etablierte Methode, um Zellen, die sich in der Apoptose befinden, spezifisch nachzuweisen. Dabei bedient man sich der Tatsache, dass die DNA in der Endphase der Apoptose durch Endonukleasen fragmentiert wird. Die dabei entstehenden 3'-OH-DNA-Enden werden wiederum mittels des Enzyms Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) mit Fluorescein gekoppelten dUTPs hochspezifisch verknüpft und hierdurch in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht.

Für die vorliegende Arbeit wurden von den zu untersuchenden Mäusen drei bzw. fünf Wochen post partum die Augen entnommen, in Paraffin eingebettet und anschließend mediane Sagittalschnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden entparaffiniert, rehydriert und der TUNEL-Analyse zugeführt. Die Färbung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers (Promega). Das Versuchsprotokoll ist in Tab. 13 in Kürze dargestellt.

| Schritt | Dauer |
|--|-----------|
| Waschen mit 1x PBS | 2 x 5 min |
| Fixieren mit PFA 4 % | 15 min |
| Waschen mit 1x PBS | 2 x 5 min |
| Umranden mit Liquid Blocker PAP-Pen | |
| Andau mit Proteinase K (25 µl/Schnitt) | 8 min |
| Waschen mit 1x PBS | 2 x 5 min |
| erneutes Fixieren mit PFA 4 % | 5 min |
| Waschen mit 1x PBS | 2 x 5 min |

| | |
|--|--------------------------|
| Inkubation mit Equilibration Buffer | 10 min |
| Inkubation mit TdT-Reaction Mix | 1 h bei 37 °C im Dunkeln |
| Waschen mit 2x SSC | 15 min im Dunkeln |
| Waschen mit 1x PBS | 2 x 5 min im Dunkeln |
| Eindeckeln mit DAPI-Mountingmedium | |

Tabelle 13: Protokoll der TUNEL-Färbung

Nach der Färbung wurden die Schnitte bis zur Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager (Carl Zeiss, Jena) bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

3.5.4.2 Immunhistochemische Färbung von BrdU

Zur Identifikation proliferierender retinaler Zellen nach Behandlung von Augen mit NMDA mit und ohne rhNorrin wurde das Thymidinanalogon BrdU verwendet (siehe 3.4.3.2), das nach seinem Einbau in die DNA mittels immunhistochemischer Färbung nachgewiesen wurde. Bei der hier durchgeführten indirekten Immunfluoreszenz bindet ein Primärantikörper an das in die DNA eingebaute BrdU, während der sekundäre Antikörper, welcher mit Biotin gekoppelt ist, an ein Epitop des Primärantikörpers bindet. In einem letzten Schritt wird der Antikörperkomplex mit einem Fluorochrom-gekoppeltem Streptavidin visualisiert.

Zusätzlich zur indirekten Immunfluoreszenz wurde zur Darstellung der Zellkerne der im Mountingmedium enthaltene Fluoreszenzfarbstoff DAPI, welcher sich bevorzugt an AT-reiche DNA-Abschnitte anlagert, verwendet.

Die Anregung dieser Fluorochrome erfolgte jeweils mit Licht eines bestimmten Anregungsspektrums (Alexa 488: 488nm; DAPI: 381nm) und ermöglichte so die Identifikation und Quantifizierung proliferierender Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Für die immunhistochemischen Fluoreszenzfärbungen wurden jeweils sagittale Paraffinschnitte der Augen von Rpe65-Norrin/VPP Mäusen beziehungsweise WiStar-

Ratten herangezogen. Diese wurden in vorher beschriebener Weise (siehe 3.5.1) entparaffiniert und teilweise für Färbungen von Epitopen im Zellkern mit Proteinase - K beziehungsweise 2 N HCl vorbehandelt, um etwaige Bindungsstellen durch Permeabilisierung der Zellkernmembran freizulegen. Die sich auf den beschichteten Objekträgern befindenden sagittalen Schnitte wurden daraufhin mit einem Fettstift umrandet und die gesuchten Epitope mittels Inkubation mit einem spezifischen primären Antikörper markiert und anschließend mit einem Fluorochrom - gekoppelten sekundären Antikörper behandelt, welcher spezifisch an den primären Antikörper bindet. Anschließend erfolgte die Beschichtung mit Mountingmedium (DAPI) und einem Deckgläschen. In der **Tabelle 14** wurden die Schritte der Fluoreszenzfärbung noch einmal im Detail dargestellt.

| Schritt | Dauer |
|--|------------------|
| Waschen mit aqua dest. | 5 min bei RT |
| Waschen mit 0,1M Phosphatpuffer | 3 x 5 min bei RT |
| Umranden mit Liquid Blocker PAP Pen | |
| Inkubation mit Blockierlösung (3 % BSA/ 0,2 % CWFG/0,3 % Triton in 0,1M Phosphatpuffer) | 60 min bei RT |
| Inkubation mit primärem Antikörper verdünnt in 1:10 Blockierlösung | ÜN bei 4 °C |
| Waschen mit 0,1M Phosphatpuffer | 3 x 5 min bei RT |
| Inkubation mit sekundärem Antikörper verdünnt in 1:10 Blockierlösung | 45 min bei RT |
| Waschen mit 0,1M Phosphatpuffer | 3 x 5 min bei RT |
| Eindeckeln mit DAPI - Mountingmedium | |

Tabelle 14: Protokoll der Fluoreszenzfärbungen

Nach der Färbung wurden die Schnitte bis zur Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager (Carl Zeiss, Jena) bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

3.6 Mikroskopie

Zur Darstellung und Dokumentation immunhistochemischer Fluoreszenzfärbungen aus Paraffinschnitten wurde das Mikroskop Axio Imager Z1 (Carl Zeiss, Jena) mit ApoTome Zusatzmodul benutzt. Die Analyse der Semidünnschnitte und der Neurosphärenbildung erfolgte mit Hilfe des inversen Mikroskops Cellobserver (Carl Zeiss). Alle Aufnahmen wurden mit der Software Axiovision (Carl Zeiss) erstellt und bearbeitet oder in das *tagged image file*-format (*.tif) zur Weiterbearbeitung konvertiert. Bei *in vitro* Experimenten, unter anderem zur Zell-morphologischen Kontrolle, kam das inverse Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss) zum Einsatz. Das Stereomikroskop Stemi 2000-CS (Carl Zeiss) wurde für die intraokulären Injektionen sowie für die Gewebepreparation und -verarbeitung verwendet.

3.7 Auswertung & Statistik

Die Daten zur Vermessung der Länge bzw. Schichtdicken der Retina (ONL, RAC) aus Semidünnschnitten, sowie das Auszählen der Kernkondensationen und TUNEL-positiven Zellen wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm Fiji (Image J, Open Source) generiert. Mit der Software Axiovision (Carl Zeiss, Jena) wurde die Fläche der äußeren Körnerschicht (ONL) vermessen. Zur genauen Vermessung der Schichtdicken der Retina wurde die Strecke jeweils temporal und nasal entlang der Membrana limitans externa gemessen und automatisiert in neun gleiche Abschnitte geteilt. Die Schichtdicke an Ora serrata und Papilla nervi optici wurde jeweils mit „0“ angenommen, die Schichtdicke von ONL und RAC an den mittleren acht Punkten wurde vermessen und dokumentiert.

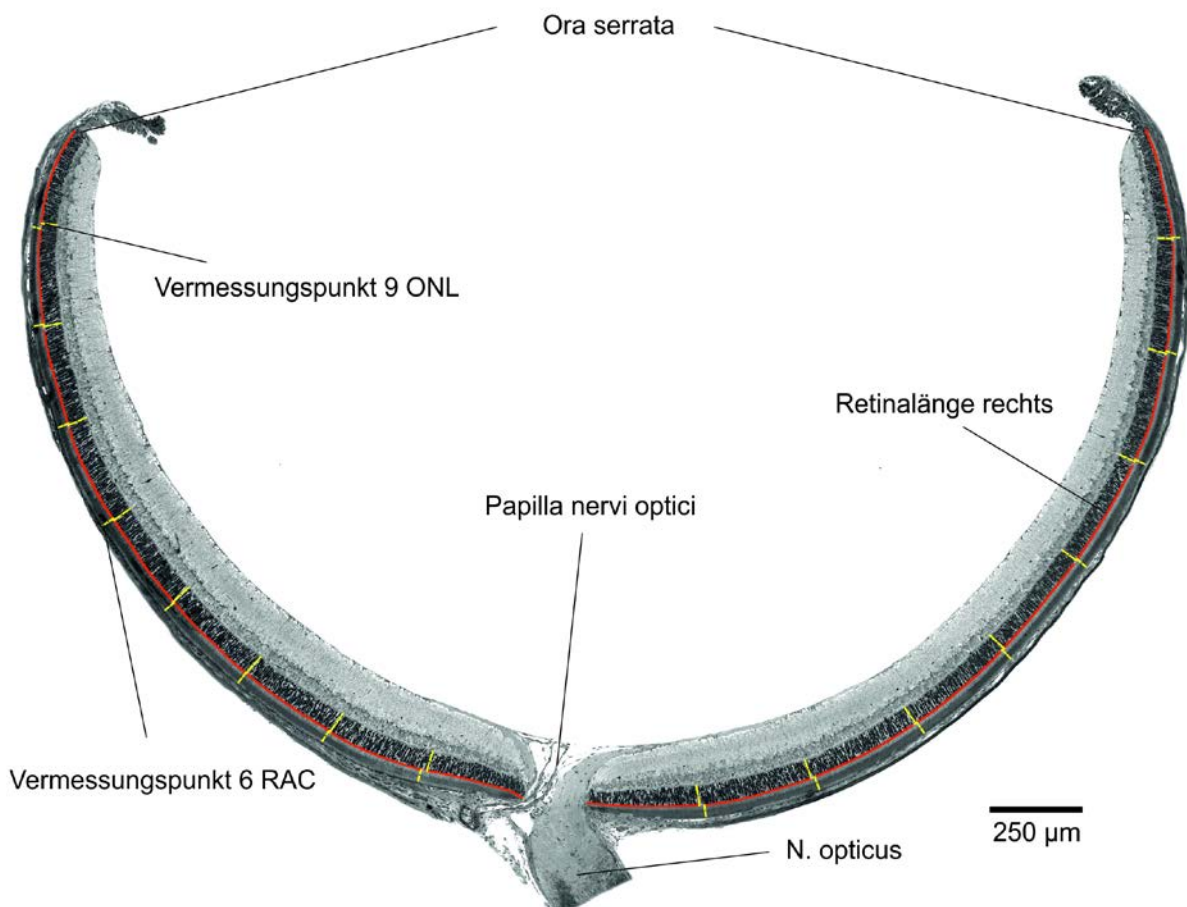


Abbildung 9: Exemplarische Darstellung der Vermessung von retinalen Sagittalschnitten. Die Längenmessung der beidseitigen retinalen Längen (rote Linien) und der Schichtdicken der äußeren Körnerschicht (ONL) beziehungsweise der Fortsätze der Photorezeptoren (RAC) (gelbe Linien) an zehn korrespondierenden Stellen sind dargestellt. Die Dicke an Papilla nervi optici und Ora serrata wurde mit null angegeben.

Die Dokumentation und Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) oder dem Statistikprogramm SPSS (IBM, Armonk, USA). Die Überprüfung auf statistische Signifikanz zweier unabhängiger Stichproben wurde mittels zweireihigem Students t-Test vorgenommen, bei mehr als zwei Variablen wurde ein einseitiger ANOVA-Test durchgeführt. Unterschiede von $p < 0.05$ (*) wurden als signifikant, $p < 0,01$ (**) als hochsignifikant und $p < 0,001$ (***) als höchst signifikant bewertet. Alle Diagramme wurden mit Microsoft Excel 2010 erstellt und mit CorelDraw X7 (Corel, Ottawa, Ontario, Kanada) in Vektorgrafiken umgewandelt, wobei stets Mittelwerte mit dem dazugehörigen Standardfehler (SEM) dargestellt wurden.

4 Ergebnisse

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass Norrin neben angiogenen Effekten auch den Untergang retinaler Ganglienzellen oder Photorezeptoren nach akuter Schädigung deutlich reduziert und damit zu einer Verbesserung der retinalen Funktion führt (Braunger, Ohlmann et al. 2013; Ohlmann et al. 2010; Ohlmann et al. 2005). Norrin übt diesen Effekt unter anderem über eine Aktivierung des WNT/ β -Catenin-Signalwegs und konsekutiv verstärkter Expression neuroprotektiver Faktoren wie Endothelin-2 oder BDNF aus. Zusätzlich wird vermutet, dass Norrin über ein Eingreifen in Zellzyklus und Apoptose zu einer Stabilisierung von neuronalen Zellen der Retina führt.

Um zu untersuchen, ob Norrin auch eine progressive hereditäre Photorezeptordegeneration wie die autosomal dominante Form der Retinopathia pigmentosa verzögern kann, wurden Versuchstiere mit VPP-Mutation im Balb/C-Hintergrund mit Tieren verpaart, welche Norrin konstitutiv über das retinale Pigmentepithel überexprimieren (Rpe65-Norrin, FVB/N). Da unpigmentierte VPP Tiere innerhalb der ersten acht bis zwölf Lebenswochen eine nahezu vollständige Degeneration der Photorezeptoren zeigen, wurden die Versuchstiere nach drei, fünf und acht Wochen post partum getötet und deren Phänotyp untersucht und quantifiziert. Hierbei wurde die Histomorphologie und die Schichtdicke der Photorezeptorschichten, der äußeren Körnerschicht (ONL) und der Fortsätze der Photorezeptoren (RAC), beurteilt. Zusätzlich wurde bei diesen Versuchstieren die Anzahl der Kernkondensationen bestimmt und die Apoptoserate mittels TUNEL-Analyse verifiziert.

4.1 Verzögerung der Photorezeptordegeneration im VPP-Schadensmodell durch Norrinüberexpression

4.1.1 Norrin verzögert die Degeneration der Photorezeptoren

Um eine neuroprotektive Wirkung von Norrin zu Beginn einer hereditären Photorezeptordegeneration zu untersuchen, wurden die Rpe65-Norrin/VPP-Versuchstiere an P21 durch zervikale Dislokation getötet und deren Augen enukleiert. Nach Einbettung der Gewebepreparate in Epon beziehungsweise Paraffin wurden möglichst median geschnittene Semidünnschnitte angefertigt und daraufhin lichtmikroskopisch und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Morphologisch zeigten sich bei der histologischen Untersuchung von Rpe65-Norrin Mäusen und wildtypischen Kontrolltieren keine mikroskopisch offensichtlichen retinalen Unterschiede. Der Aufbau der Netzhaut war in beiden Fällen histologisch unauffällig mit physiologischer Netzhautarchitektur in einem altersentsprechenden Entwicklungsstadium. Insbesondere das retinale Pigmentepithel (RPE) und die Schichten der Photorezeptoren (ONL, RAC) der Rpe65-Norrin-Mäuse, welche ektopes Norrin über das RPE exprimieren, zeigten lichtmikroskopisch keinerlei morphologische oder strukturelle Unterschiede im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren. In beiden Fällen sah man eine physiologisch kolumnale Anordnung der Nuclei der Photorezeptoren in etwa zehn bis zwölf Reihen mit äußerst selten vorkommenden Kernkondensationen (etwa 1-2 Kernkondensationen per μm^2 , vgl. Abb. 13A). Ebenfalls konnte bei den Fortsätzen der Photorezeptoren (RAC) kein lichtmikroskopischer Unterschied in Aufbau und Architektur, insbesondere im Verhältnis zwischen Innen- und Außensegmenten beobachtet werden. In beiden Fällen waren bei Längsanschnitten der Außensegmente die Segmente der Disks bereits lichtmikroskopisch erkennbar. Bei den für Rpe65-Norrin transgenen Tieren konnte dazu kein Unterschied weder in der anatomischen Anordnung noch in der Morphologie des RPE festgestellt werden (Vgl. Abb. 10, Abb. 11)

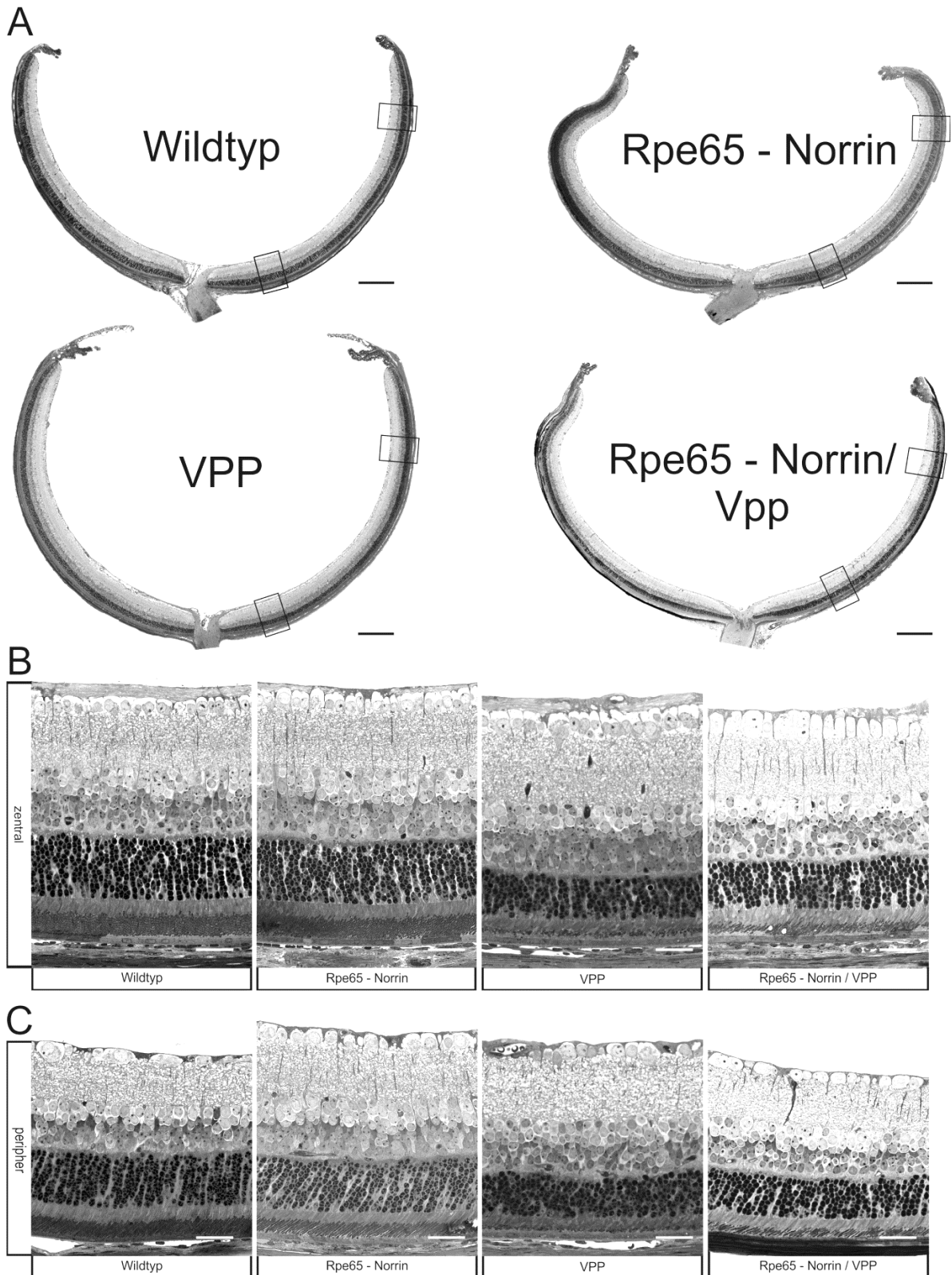


Abbildung 10: Lichtmikroskopie von Sagittalschnitten der Retinae drei Wochen alter Rpe65-Norrin/VPP Versuchstiere. **A** Netzhautübersicht medianer Semidünnschnitte mit Papilla nervi optici. Die Rechtecke entsprechen den jeweiligen zentralen und peripheren Ausschnitten von Rpe65-Norrin-, VPP-, Rpe65Norrin/VPP-Versuchstieren und deren wildtypischen Kontrolltieren, welche zum direkten Vergleich in den Detailaufnahmen **B** (zentral) und **C** (peripher) vergrößert dargestellt sind. Maßstabsbalken: **A** 250 μm ; **B, C** 25 μm .

Demgegenüber zeigten VPP-Tiere (n=9) bereits nach drei Wochen eine deutliche Degeneration vor allem der Aussensegmente der Photorezeptoren (Vgl. Abb. 10, Abb. 11) mit ebenfalls deutlicher Reduktion der äußeren Körnerschicht (ONL) verglichen mit den Wildtyp-Tieren (n=9). Hierbei sah man in der äußeren Körnerschicht erwartungsgemäß eine deutliche Zunahme an Kernkondensationen mit Reduktion der Anzahl an Photorezeptorzellen und konsekutiver mikroskopisch erkennbarer Schichtdickenreduktion mit etwa sechs- bis achtreihiger Anordnung. Die kolumnale Struktur des ONL schien unorganisiert, aufgelockert und teilweise ausgefranzt. Die Fortsätze der Photorezeptoren waren bereits deutlich längengemindert mit anteilig höhergradigem Schaden an den Aussensegmenten, welche keine längliche Anordnung beziehungsweise Aufteilung in Disks erkennen ließen. Die Anordnung der Fortsätze war sichtbar aufgelockert mit größtenteils ballonierter Konfiguration der Innensegmente, was möglicherweise auf eine Akkumulation des mutierten Opsins zurückzuführen ist. Das retinale Pigmentepithel, sowie die restlichen Schichten der Netzhaut wiesen lichtmikroskopisch keine Unterschiede zu wildtypischen Geschwistertieren auf (Vgl. Abb. 10, Abb. 11).

Im Vergleich zu den retinalen Veränderungen der VPP-Versuchstiere waren bereits lichtmikroskopisch deutliche morphologische Unterschiede in der Netzhaut doppeltransgener Tiere sichtbar. Die Zahl der apoptotischen Zellen in der äußeren Körnerschicht war zwar im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren massiv erhöht, jedoch im Vergleich mit VPP-Tieren deutlich reduziert. Zusätzlich fielen vermehrt Mitosen vor allem in der Nähe apoptotischer Zellen auf. Die Gesamtarchitektur des ONL zeigte sich abgesehen von der Schichtdicke mit etwa acht bis zehn Reihen eher geordnet. Die deutlichste histomorphologische Differenz ließ sich nach drei Wochen jedoch an der Länge der Fortsätze der Photorezeptoren insbesondere der Aussensegmente feststellen. Hier zeigte sich zwar eine deutlich Längenreduktion im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, jedoch konnte man noch eine annähernd physiologische Anordnung mit teils segmentaler Aufspaltung in Membranstapel erkennen. Die Innensegmente zeigten sich vereinzelt leicht verdickt, standen jedoch morphologisch in keinem Vergleich zu den VPP-Versuchstieren ohne Norrinüberexpression. Die restliche retinale Architektur wies histomorphologisch keine erkennbaren Veränderungen im Vergleich zu Geschwistertieren ohne Mutation auf (Vgl. Abb. 10, Abb. 11).

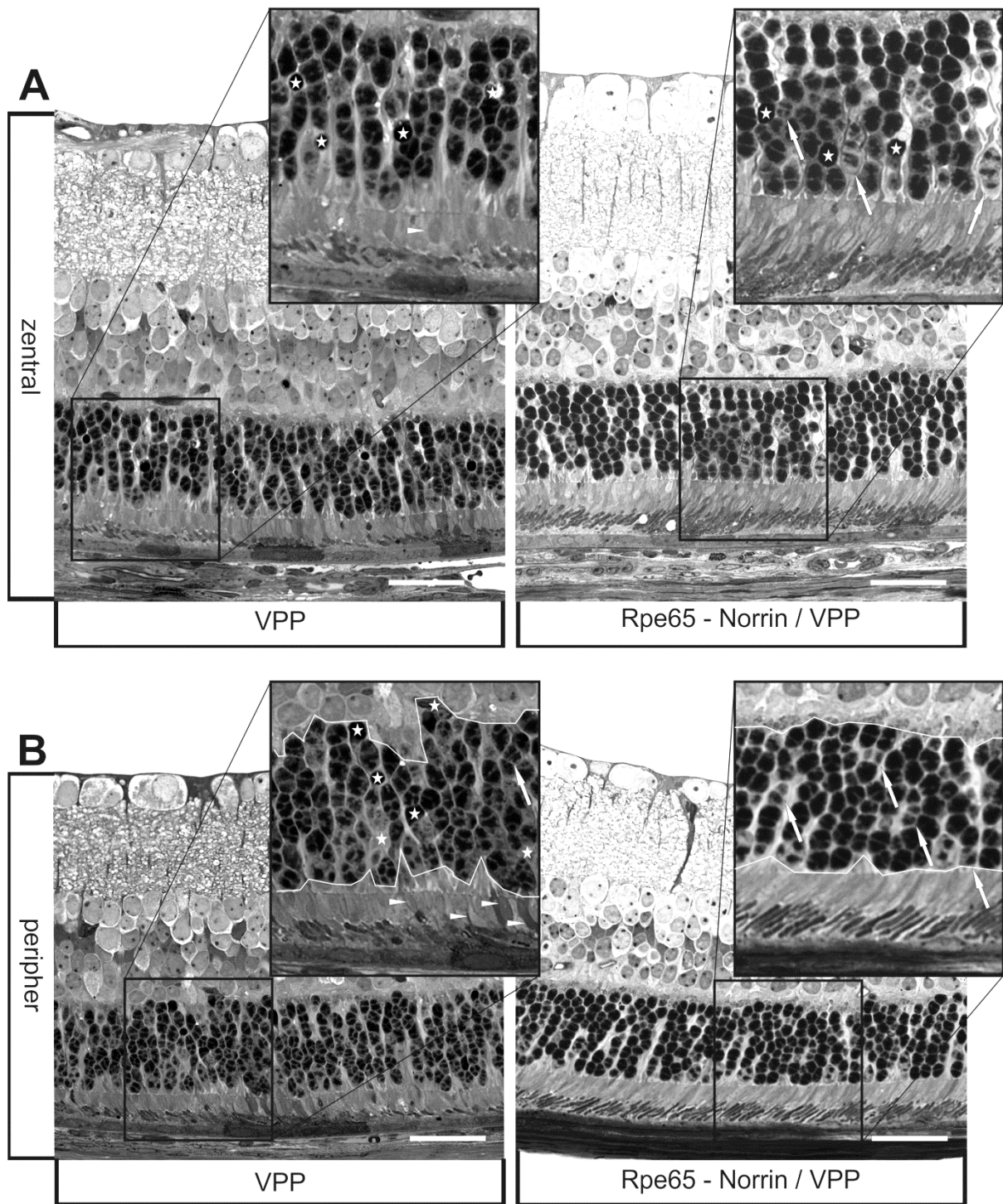


Abbildung 11: Detailaufnahmen von Semidünnschnitten der Netzhaut von VPP- und Rpe65-Norrin/VPP-Tieren im Alter von drei Wochen. Vergleich des zentralen (A) und peripheren (B) Netzhautbereichs. Exemplarische Kennzeichnung von Kernkondensationen (weiße Sterne), Mitosen (weiße Pfeile) und ballonierten Fortsätzen der Photorezeptoren (weiße Pfeilspitzen). In B sind zusätzlich die Grenzen der äußeren Körnerschicht mit einer weißen Linie hervorgehoben. Maßstabsbalken: 25 μm .

Zur quantitativen Analyse der retinalen Schichtdicken wurden bei den Semidünnschnitten der Augen aller Versuchstiere die äußere Körnerschicht (ONL) und die Fortsätze der Photorezeptoren (RAC) nasal sowie temporal an jeweils zehn Stellen vermessen und die korrespondierenden Durchschnittswerte in Spiderdiagrammen visualisiert. Die Schichtdicken an Ora serrata und Papilla nervi optici wurden jeweils mit „0“ angegeben.

Im Falle der äußeren Körnerschicht (ONL) (vgl. Abb. 12) war an P21 bereits beim Vergleich von Wildtyptieren (n=9) mit Rpe65-Norrin transgenen Tieren (n=7) eine teils signifikant geringere Schichtdicke im zentralen Bereich nachweisbar. Dies könnte durch die Überexpression von Norrin und dessen Eingriff in Zellteilung und Zelldifferenzierung verursacht sein und dadurch möglicherweise zu einer zeitlichen Verzögerung der retinalen Entwicklung und Reifung geführt haben. Erwartungsgemäß war dagegen die ONL-Schichtdicke von VPP-Versuchstieren (n=9) im Gegensatz zu den Wildtypen über die gesamte Retina höchstsignifikant reduziert. Die durchschnittliche Dicke der äußeren Körnerschicht doppeltransgener Versuchstiere (n=9) zeigte sich im Vergleich dazu über die gesamte Netzhaut leicht im Phänotyp gebessert, jedoch nur an wenigen Stellen signifikant.

Bei Betrachtung der Fortsätze der Photorezeptoren konnte man bei Norrin-überexprimierenden Mäusen im zentralen Bereich erneut eine signifikante Dickenminderung im Vergleich zu Wildtypen feststellen, jedoch zeigten diese dasselbe Verhältnis zwischen Innen- und Aussensegmenten. Der auffallendste Unterschied zeigte sich wiederum zwischen Wildtyp und VPP-Versuchstieren. Hier war die Länge der Photorezeptorforsätze, vor allem der Aussensegmente, um mehr als 60% reduziert. Dagegen konnte bei einer zusätzlichen Überexpression von Norrin über die gesamte Netzhaut eine teils höchstsignifikante Minderung der Reduktion der Photorezeptorforsätze um circa 20% beobachtet werden (Vgl. Abb 12).

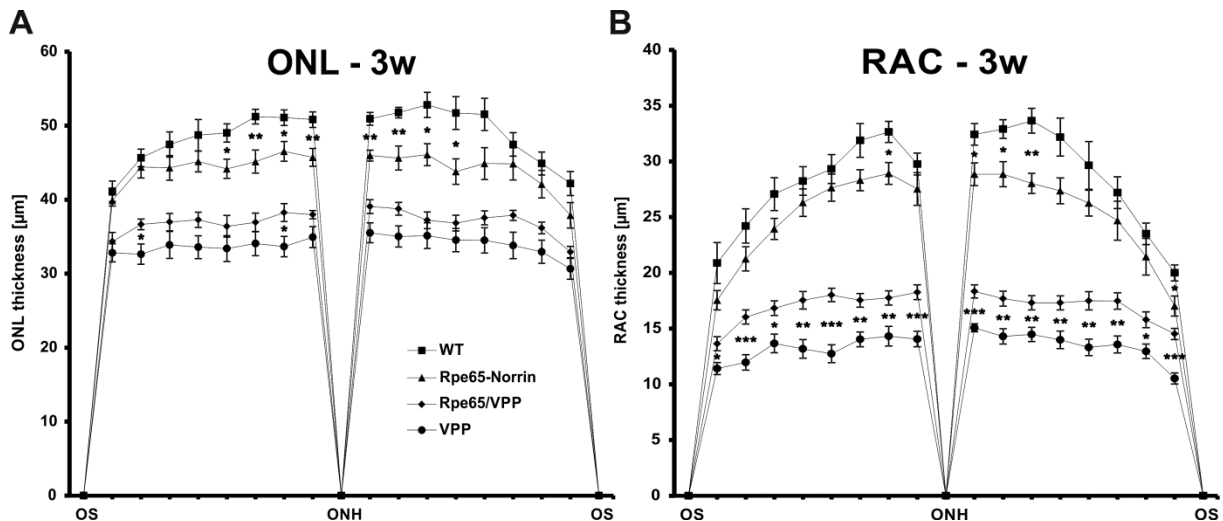


Abbildung 12: Spiderdiagramme der Schichtdickenmessung von äußerer Körnerschicht (ONL, outer nuclear layer) (A) und den Fortsätzen der Photorezeptoren (RAC, rods and cones) (B) im Alter von drei Wochen. Untersucht wurden Rpe65-Norrin-, VPP-, Rpe65/VPP-Versuchstiere und deren wildtypische Geschwistertiere. Hierbei wurde jede Netzhauthälfte von Papilla nervi optici (ONH, optic nerve head) bis zur Ora serrata (OS) in zehn voneinander gleichweit entfernte Messpunkte aufgeteilt und dort die jeweilige Schichtdicke vermessen und graphisch dargestellt.

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden bei den Semidünnschnitten die Kernkondensationen in der äußeren Körnerschicht gezählt und auf deren Fläche verrechnet. Hierbei zeigten sich etwa 60fach mehr Kernkondensationen bei VPP-positiven Versuchstieren ($558/\text{mm}^2$ ONL) im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistertieren ($10/\text{mm}^2$ ONL). Bei nur für Rpe65-Norrin transgenen Versuchstieren ($12/\text{mm}^2$ ONL) fand sich hierbei kein Unterschied zu den Wildtypen. Im Vergleich zu den nur für VPP transgenen Versuchstieren konnte bei einer zusätzlichen Expression von Norrin eine höchstsignifikante Reduktion ($p < 0,001$) der Kernkondensationen um mehr als 50 % auf $226/\text{mm}^2$ ONL beobachtet werden (vgl. Abb. 13)

Da sowohl Karypyknose als auch Karyorrhesis bei Apoptose und Zellnekrose auftreten, wurden zusätzlich TUNEL-Färbungen von Paraffinschnitten derselben Versuchstiere (jeweils linkes Auge, vgl. Abb. 14) angefertigt, die Anzahl der apoptotischen Zellen ermittelt und ebenfalls auf die Fläche der äußeren Körnerschicht normiert. Hierbei konnte man bei den VPP Versuchstieren einen Anstieg der Apoptoserate der Photorezeptorzellen auf $1043 / \text{mm}^2$ ONL beobachten. Die TUNEL-positiven apoptotischen Zellen lagen ausschließlich in der äußeren Körnerschicht. Durch die Kreuzung mit Versuchstieren, welche Norrin konstitutiv

transgen überexprimieren, wurde eine deutlich geringere Anzahl apoptotischer Zellen (491 TUNEL-positive Zellen pro mm²) beobachtet (p = 0.017; vgl Abb. 13B)

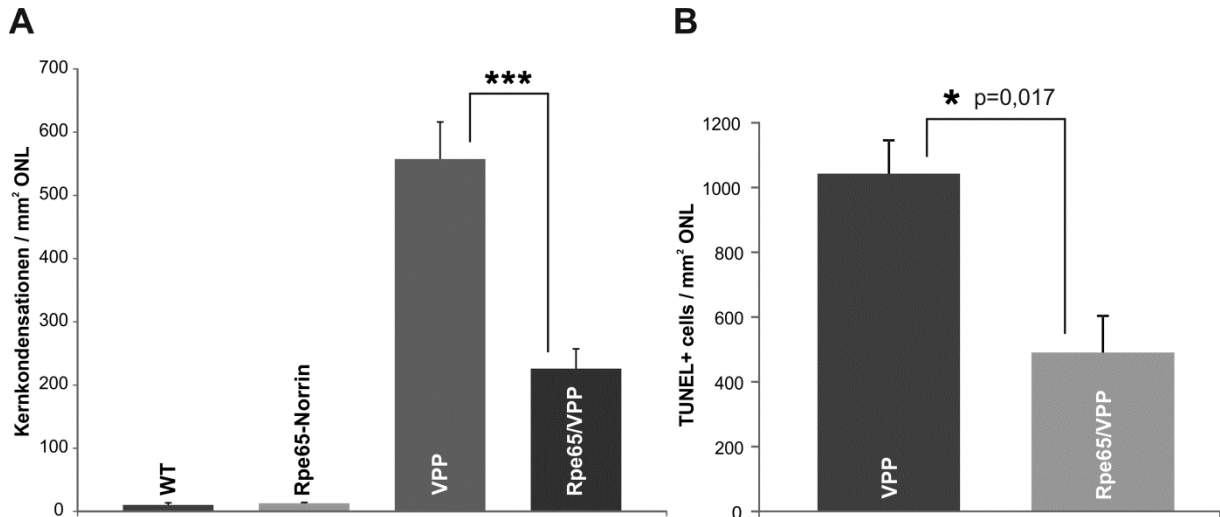


Abbildung 13: Quantitative Darstellung der Kernkondensationen (A) und apoptotischen Zellen (B) in der äußeren Körnerschicht (ONL) im Alter von drei Wochen. A Die Anzahl der Kernkondensationen im ONL von Rpe65-Norrin-, VPP-, Rpe65/VPP-Versuchstieren und deren Kontrolltieren wurde ermittelt und auf die jeweilige Fläche der äußeren Körnerschicht normiert. **B** Zur Darstellung der Apoptoserate der Photorezeptoren wurden die TUNEL+ Zellen in der äußeren Körnerschicht von VPP- und Rpe65/VPP-Versuchstieren gezählt und auf die jeweilige Fläche des ONL normiert.

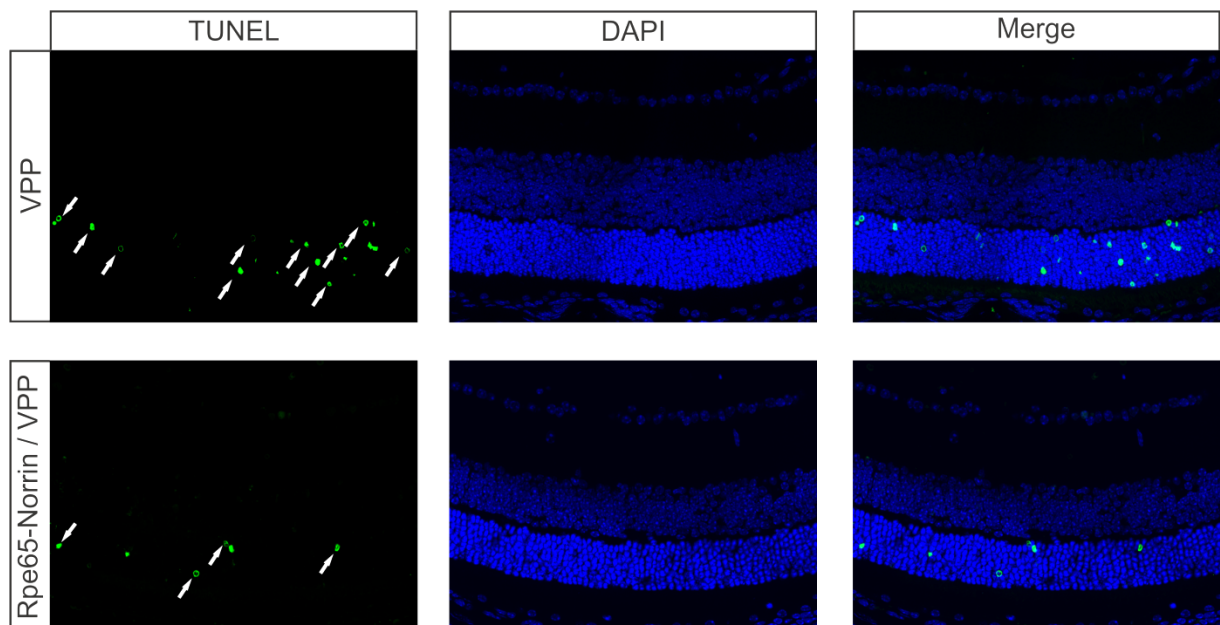


Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopie von TUNEL-Analysen von Rpe65-Norrin/VPP-Mäusen im Alter von drei Wochen. Es zeigt sich eine deutlich geringere Apoptoserate (weiße Pfeile) in der äußeren Körnerschicht bei Versuchstieren, die konstitutiv Norrin überexprimieren.

4.1.2 Norrin verzögert das Fortschreiten der Degeneration im VPP - Schadensmodell

Um die neuroprotektive Wirkung von Norrin im mittleren Stadium der Degeneration zu untersuchen, wurden Rpe65-Norrin/VPP-Versuchstiere fünf Wochen post partum untersucht. Hierzu wurden die Tiere narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Nach Entnahme der Augen und Einbettung in Epon beziehungsweise Paraffin wurden sagittal geschnittene histologische Präparate angefertigt und lichtmikroskopisch beziehungsweise fluoreszenzmikroskopisch untersucht und verglichen.

Wie bei den im Alter von drei Wochen untersuchten Tieren zeigten sich bei den nur für Rpe65-Norrin transgenen Versuchstieren (n=11) und den wildtypischen Kontrolltieren (n=7) keine mikroskopisch offensichtlichen morphologischen Pathologien. Die Retinae wiesen in beiden Fällen eine altersentsprechend entwickelte und physiologisch normale Netzhautarchitektur auf. Insbesondere zeigten sich wiederum bei den Versuchstieren, welche ektopes Norrin über das retinale Pigmentepithel transgen exprimieren, keine histologisch erkennbaren Veränderungen, welche auf eine gestörte Homöostase des RPE hindeuten könnten. Der direkte Vergleich der Photorezeptorschichten wies ebenso keine Auffälligkeiten bezüglich der histologischen Architektur auf, jedoch konnte man in beiden Fällen bereits lichtmikroskopisch ein vermehrtes Vorkommen von Kernpyknosen feststellen. Diese Beobachtung könnte mit einer vermehrten Photorezeptordegeneration durch Lichtschaden in nichtpigmentierten Versuchstieren vereinbar sein. Die Fortsätze der Photorezeptoren zeigten sich schlank in einer physiologisch geordneten transversalen Anordnung mit lichtmikroskopisch sichtbarer Aufteilung in Innen- und Aussensegmente. Wie bei den Versuchstieren, die an P21 untersucht wurden, waren auch hier die Membranstapel der Aussensegmente bereits lichtmikroskopisch erkennbar (vgl. Abb. 15, Abb. 16).

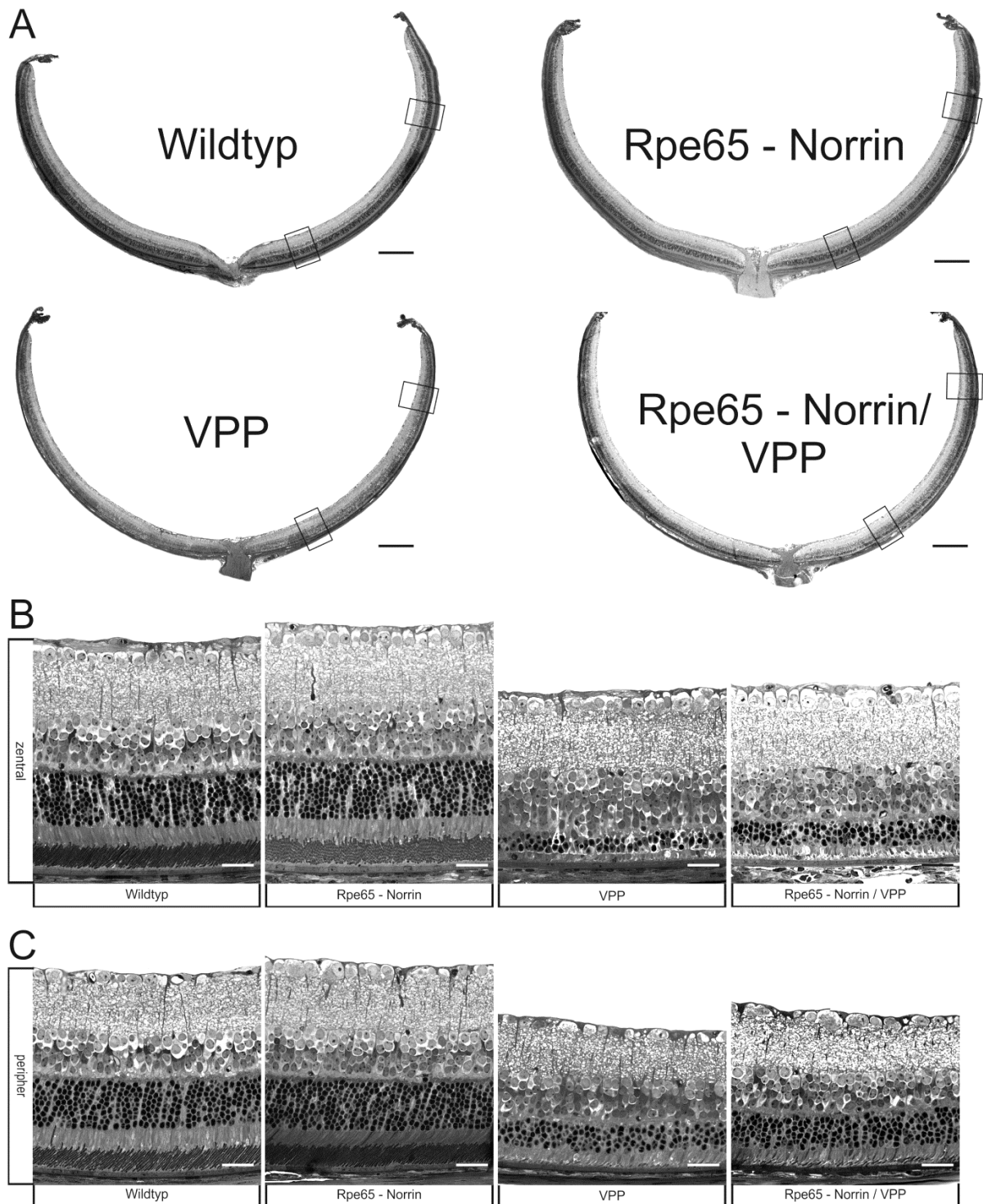


Abbildung 15: Lichtmikroskopie der Netzhaut von fünf Wochen alten Versuchstieren. A Übersicht über mediane Semidünnschnitte mit Papilla nervi optici. Die Rechtecke bezeichnen die jeweiligen zentralen und peripheren Ausschnitte, welche in B und C vergrößert dargestellt sind. Maßstabsbalken 250 μ m. **B** Detailaufnahmen der zentralen Retinae. Kein offenkundiger morphologischer Unterschied zwischen Wildtyp und Rpe65-Norrin. Bei VPP Versuchstieren ist eine deutliche Schichtdickenreduktion im ONL (äußere Körnerschicht) und RAC (Fortsätze der Photorezeptoren) erkennbar bei vollständig degenerierten Außensegmenten. Die doppeltransgenen Versuchstiere zeigen eine sichtbare Reduktion der Schädigung mit deutlich mehr morphologisch intakten Zellkernen im ONL und deutlich längeren Fortsätzen der Photorezeptoren. Maßstabsbalken 25 μ m. **C** Detailaufnahmen der peripheren Retinae. Analog zum zentralen Bereich ist kein morphologischer Unterschied zwischen Wildtyp und Rpe65-Norrin erkennbar. Dagegen ist bei VPP Versuchstieren eine deutliche Reduktion von ONL und RAC sichtbar, wobei die äußere Körnerschicht ungeordnet und teils ausgefranzt imbibiert und die Aussensegmente der Photorezeptoren nur rudimentär vorhanden sind. Durch Kreuzung mit Rpe65-Norrin Mäusen zeigen sich bereits in der Übersicht deutlich mehr Zellkerne im ONL in

physiologischerer Anordnung und eindeutig erkennbare Reste von Außensegmenten. Maßstabsbalken: **A** 250 µm; **B, C** 25 µm

Im Gegensatz zu den Wildtypen zeigten die VPP-Versuchstiere (n = 8) im Alter von fünf Wochen eine ausgeprägte Degeneration der Photorezeptorschichten. Vor allem in den zentralen Netzhautabschnitten wies die äußere Körnerschicht nur noch eine zwei- bis dreireihige Anordnung – im Vergleich zu etwa elf Reihen bei Wildtypen – auf. Die Morphologie der Somata der Photorezeptoren zeigte sich äußerst heterogen mit vielen sich in verschiedenen Stadien der Apoptose beziehungsweise Nekrose befindlichen Zellen. Lichtmikroskopisch äußerte sich dies in einer Mischung aus Kariopyknose, Kariorrhaxis und sichtbaren lytischen Zellen. Intermittierend waren einzelne sich in Mitose befindliche Zellen erkennbar. Im Unterschied dazu waren in der Peripherie mehr morphologisch intakte in vier bis fünf Reihen angeordnete Photorezeptorzellen erkennbar, jedoch schien die Struktur hier auch aufgelockert und teilweise ausgefrantzt mit mehreren Kernkondensationen und vereinzelt Mitosen. Die Fortsätze der Photorezeptoren im zentralen Netzhautbereich waren morphologisch nur noch rudimentär vorhanden. Alle Innensegmente waren balloniert und endeten stumpf vor dem retinalen Pigmentepithel ohne Übergang in die Aussensegmente, das histologische Korrelat der Membranstapel, welche komplett fehlten. Je weiter man die Fortsätze in Richtung Peripherie verfolgte, desto länger wurden die Innensegmente, blieben aber weiterhin im Vergleich zu den Wildtypen sehr kurz, balloniert und endeten zum größten Teil blind. Im Bereich der Ora serrata konnte man noch Teile von Aussensegmenten erkennen, jedoch war keine sichere lichtmikroskopische Differenzierung von Membranstapel möglich. Gerade im Bereich der degenerierten Aussensegmente zeigte sich ein sehr amorphes Bild ohne mögliche strukturelle Zuordnung. Analog zu den nach drei Wochen untersuchten Tieren zeigte sich in den restlichen retinalen Schichten kein Hinweis auf eine exogene oder endogene Schädigung (vgl. Abb. 15, Abb. 16).

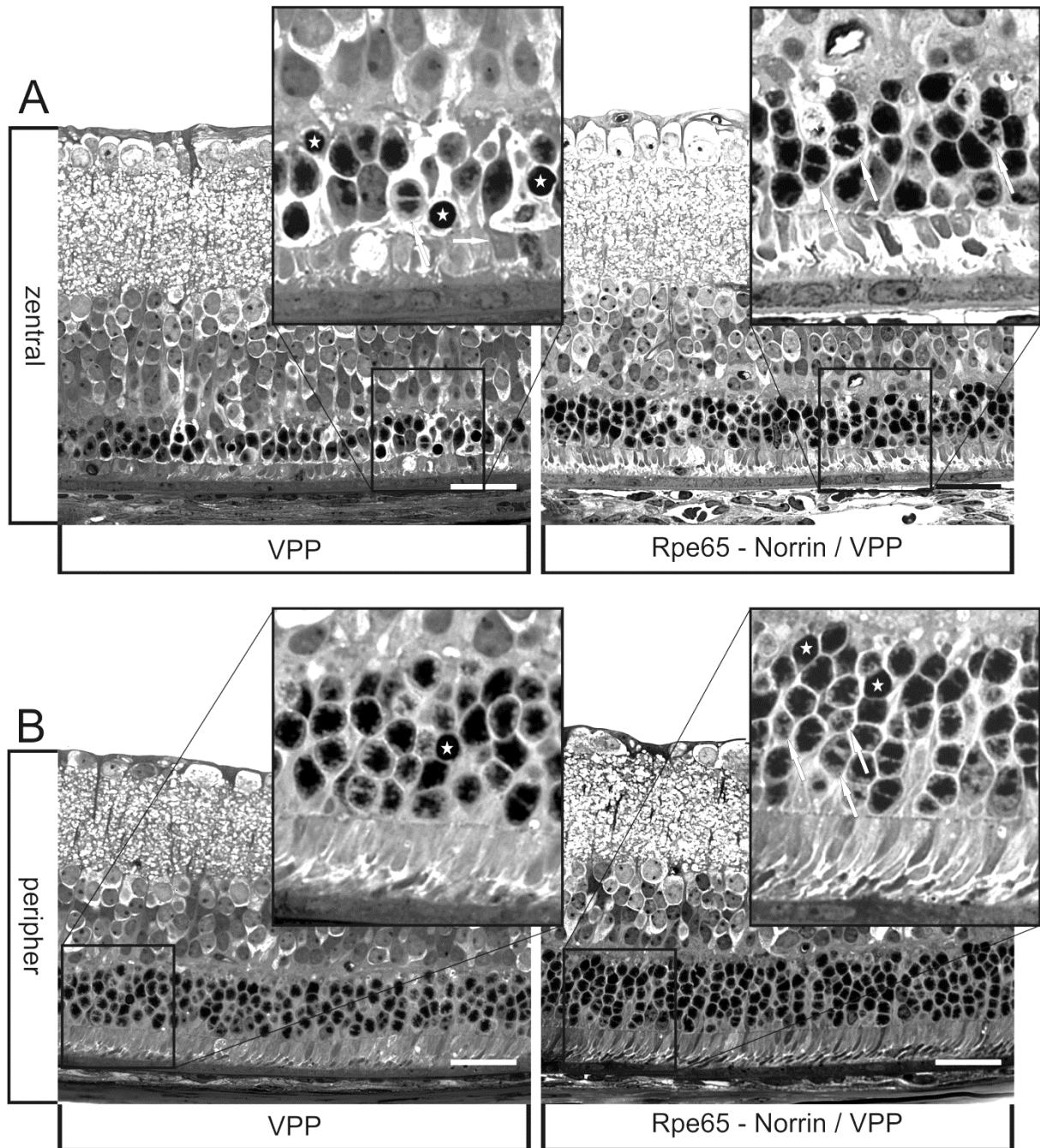


Abbildung 16: Detailaufnahmen der Netzhaut von VPP- und Rpe65-Norrin/VPP-Tieren im Alter von fünf Wochen. **A** Vergleich des zentralen Netzhautbereichs. Bei VPP-Tieren zeigt sich eine komplett desorganisierte äußere Körnerschicht (ONL) mit in verschiedenen Stadien der Degeneration befindlichen Zellen (exemplarische Darstellung von Kernkondensationen mit weißen Sternen). Es finden sich noch wenige morphologisch intakte Zellkerne in etwa zwei- bis maximal dreireihiger Anordnung. Die Fortsätze der Photorezeptoren (RAC) zeigen sich als amorphe Masse mit einzeln differenzierbaren ballonierten Innensegmenten (waagrecht Pfeil). Im ebenfalls deutlich desorganisierten ONL der doppeltransgenen Versuchstiere erkennt man deutlich mehr valide Zellkerne in circa vier- bis fünfreihiger Anordnung. Es zeigen sich ebenfalls deutlich weniger apoptotische Zellen und eine erhöhte Anzahl an Mitosen (weiße Pfeile). Zusätzlich findet sich eine ausgeprägte Degeneration der RAC, wobei noch Innensegmente differenzierbar sind. **B** Vergleich des peripheren Netzhautbereichs. Im Vergleich zum zentralen Bereich erkennt man deutlich mehr morphologisch intakte Zellkerne im ONL mit weniger Apoptosen und vereinzelt Mitosen. Die Innensegmente der Fortsätze der Photorezeptoren sind balloniert, aber erkennbar und enden zumeist blind. Vereinzelt finden sich minimale Reste der Aussensegmente. In Rpe65/VPP Tieren zeigen sich peripher deutlich mehr morphologisch intakte Zellkerne in fünf- bis siebenreihiger Anordnung. Es treten gehäuft Mitosen (Weiße Pfeile), vor allem in der Nähe von Apoptosen auf. Die Innensegmente im RAC sind deutlich länger und weniger balloniert, zusätzlich finden sich deutlich mehr Aussensegmente mit lichtmikroskopisch erkennbarer Struktur. Maßstabsbalken 25 µm

Im Vergleich zu den VPP-Versuchstieren ließen sich in Mäusen, die zusätzlich ektopes Norrin über das retinale Pigmentepithel transgen exprimieren, bereits lichtmikroskopisch mehrere Unterschiede feststellen. In der äußeren Körnerschicht zeigten sich deutlich mehr morphologisch intakte Zellen, im zentralen Bereich in vier- bis fünfreihiger und im peripheren Bereich in fünf- bis siebenreihiger Anordnung. Mit zunehmendem Abstand zur Papilla nervi optici fand sich auch wieder eine physiologische kolumnale Struktur. Im Vergleich zu den nur für VPP positiven Versuchstieren fanden sich dabei bereits lichtmikroskopisch deutlich weniger Kernkondensationen, wobei vor allem in den peripheren Netzhautabschnitten eine erhöhte Anzahl an Mitosen auffiel. Die Fortsätze der Photorezeptoren waren im zentralen Bereich im Gegensatz zu den VPP-Versuchstieren zwar balloniert, jedoch konnte man die einzelnen Fortsätze noch differenzieren. Ebenso sah man vereinzelt noch Übergänge in Aussensegmente, jedoch ohne mikroskopischen Nachweis der Membranstapel. In der Peripherie konnte man, neben im Vergleich zu den VPP-Tieren deutlich längeren Innensegmenten, auch eindeutig differenzierbare Außensegmente mit teils lichtmikroskopisch sichtbaren Membranstapel erkennen. Auch zeigten sich die Innensegmente weniger balloniert. Die restliche Netzhautarchitektur, insbesondere auch die des retinalen Pigmentepithels, wies keine offensichtlichen Besonderheiten im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren auf (vgl. Abb. 15, Abb. 16).

Zur quantitativen Aufarbeitung wurden bei den medianen Semidünnschnitten von Augen der fünf Wochen alten Versuchstiere die retinalen Schichtdicken analog der drei Wochen alten Versuchstiere erfasst und ausgewertet.

Bei Betrachtung der äußeren Körnerschichten (ONL) zeigte sich im Alter von fünf Wochen keinerlei Unterschied zwischen den Rpe65-Norrin Tieren (n=11) und den wildtypischen Geschwistertieren (n=7). Die ONL-Schichtdicke von VPP-Versuchstieren (n=8) war dagegen um teils mehr als 50% reduziert, wobei die Hauptschädigung im zentralen Bereich der Retina zu sehen war und Richtung Peripherie leicht abnahm. Bei zusätzlicher transgener Expression von Norrin (n=9) zeigte sich nahezu über die gesamte äußere Körnerschicht eine signifikant geringere Schädigung, wobei im Bereich um die Ora serrata die deutlichste Schadensreduktion zu verzeichnen war ($p < 0,001$, Vgl. Abb. 17A).

Die Messung der Photorezeptorfortsätze von Rpe65-Norrin Mäusen ergab ebenso keinen Unterschied in Länge und Ausprägung der Inneren und Äußeren Segmente der RAC. Im Gegensatz dazu zeigten die VPP-Versuchstiere eine Reduktion der Innensegmente und ein komplettes Fehlen der Außensegmente, was in einer Längenminderung um 50-70% resultierte. Bei zusätzlicher konstitutiver Expression von Norrin in der Netzhaut konnte dieser Untergang der Photorezeptorfortsätze um teilweise mehr als 30% vermindert werden. Vor allem in der Netzhautperipherie fand sich eine hochsignifikante Besserung im Phänotyp des adRP-Tiermodells (Vgl. Abb. 17B).

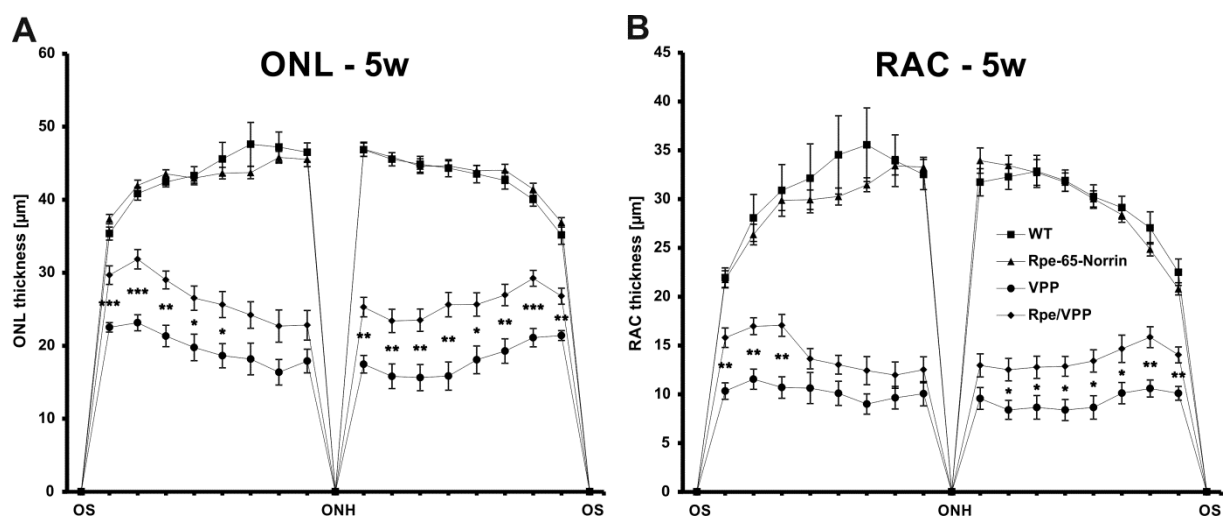


Abbildung 17: Graphische Darstellung der retinalen Schichtdicken von Rpe65-Norrin-, VPP-, Rpe65/VPP-Versuchstieren und deren wildtypischen Geschwistertieren im Alter von fünf Wochen mittels sogenannter Spiderdiagramme. Vermessen wurde (A) die äußere Körnerschicht (ONL, outer nuclear layer) und (B) die Fortsätze der Photorezeptoren (RAC, rods and cones) an jeweils 10 korrespondierenden Stellen jeder Netzhauthälfte. ONH: Papilla nervi optici, optic nerve head; OS: Ora serrata.

Die Zählung der Kernkondensationen in der äußeren Körnerschicht im Alter von fünf Wochen wies eine Zunahme der Photorezeptordegeneration bei wildtypischen Kontrolltieren auf circa 81 pyknotische Zellkerne pro Quadratmillimeter ONL auf. Dies ist möglicherweise auf einen phototoxischen Schaden bei nicht pigmentierten Versuchstieren zurückzuführen. Im Falle der nur für Rpe65-Norrin transgenen Versuchstiere konnte man eine leichte, jedoch nicht signifikante Reduktion auf etwa 63 Kernkondensationen pro Quadratmillimeter verzeichnen. Im starken Kontrast dazu war die Anzahl der Zelldegenerationen bei VPP-Versuchstieren im Vergleich mit den Kontrolltieren erwartungsgemäß um etwa das zehnfache auf über 800/mm² erhöht. Demgegenüber konnte die Anzahl an Apoptosen durch zusätzliche konstitutive

Expression von Norrin um über 60% auf etwa 300 Kondensationen pro Quadratmillimeter ONL reduziert werden ($p = 0,0016$) (Vgl. Abb. 18A).

Da wiederum vor allem in den nur für VPP transgenen Versuchstieren die Differenzierung zwischen nekrotischen und sich in Apoptose befindlichen Zellen durch das sehr heterogene Zellbild nicht möglich war, wurde zusätzlich eine TUNEL-Analyse des jeweils korrespondierenden linken Auges durchgeführt. Hierbei zeigte sich analog zur Zählung der Kernpyknosen ein leichter Anstieg der Apoptoserate in der äußeren Körnerschicht bei den Wildtyptieren auf etwa $15/\text{mm}^2$ ONL, welche bei Versuchstieren, die nur für Rpe65-Norrin transgen waren, um etwa 50% auf circa $7/\text{mm}^2$ ONL reduziert waren. Dagegen war die Zahl der apoptotischen Zellen in der äußeren Körnerschicht der VPP-Versuchstiere ebenso erwartungsgemäß massiv auf etwa $1000/\text{mm}^2$ ONL erhöht. Durch die zusätzliche konstitutive Expression von Norrin über das retinale Pigmentepithel wurde die Anzahl an Apoptosen höchstsignifikant auf etwa $360/\text{mm}^2$ ONL vermindert ($p < 0,001$) (Vgl. Abb. 18B, Abb. 19).

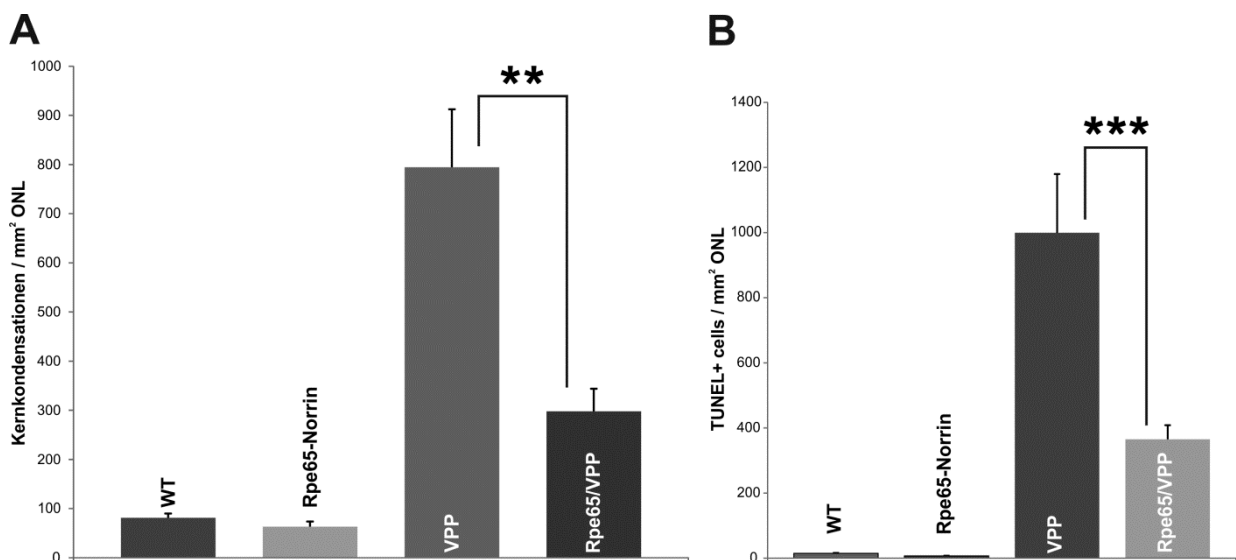


Abbildung 18: Quantitative Darstellung der Kernkondensationen und apoptotischen Zellen in der äußeren Körnerschicht (ONL) im Alter von fünf Wochen. **A** Kernkondensationen/ mm^2 ONL. Bei VPP-positiven Versuchstieren zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Kernkondensationen, welcher bei zusätzlicher Expression von Norrin hochsignifikant reduziert wird ($p = 0,0016$); **B** TUNEL+-Zellen/ mm^2 ONL. Analog zu A zeigt sich bei der TUNEL-Analyse eine signifikante Reduktion der Apoptoserate bei zusätzlicher Norrinüberexpression im Vergleich zu den nur für VPP transgenen Versuchstieren ($p < 0,001$).

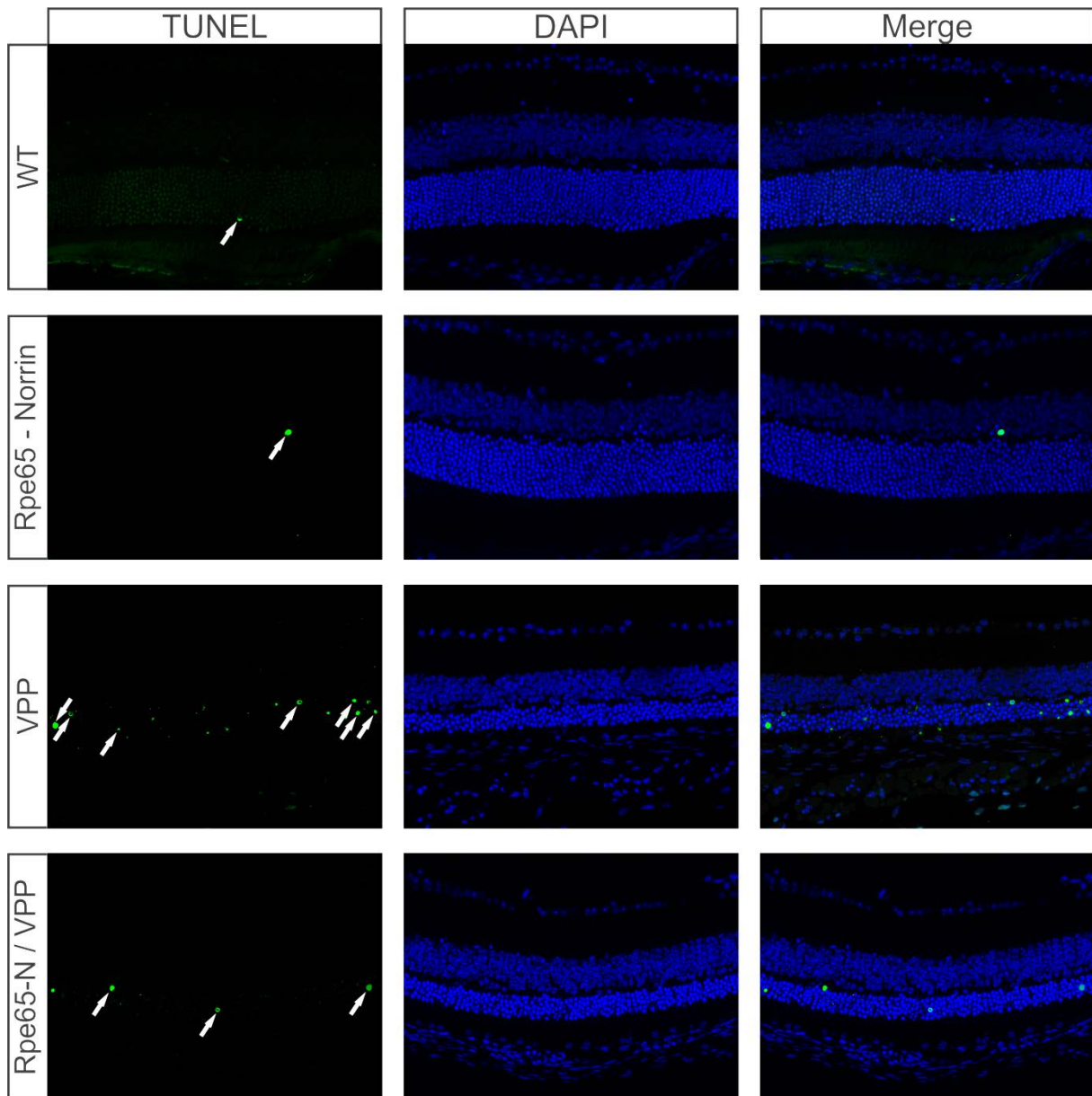


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopie zentraler Netzhautabschnitte von TUNEL-Analysen von Rpe65-Norrin/VPP Versuchstieren im Alter von fünf Wochen. In den altersgemäß entwickelten äußeren Körnerschichten (ONL) von Rpe65-Norrin Mäusen und Wildtypen finden sich vereinzelt Apoptosen (weiße Pfeile). Im Vergleich dazu zeigt sich eine deutliche Zunahme der Apoptoserate normiert auf die ONL-Fläche bei VPP-positiven Tieren. Die äußere Körnerschicht ist hier durch die kontinuierliche Schädigung sichtbar reduziert. Demgegenüber sieht man deutlich weniger Apoptosen in der etwas breiteren äußeren Körnerschicht der doppeltransgenen Versuchstiere.

4.1.3 Norrin reduziert die Schädigung von Photorezeptoren im fortgeschrittenen Stadium der Degeneration

Um eine neuroprotektive Funktion von Norrin am Ende der degenerativen Netzhauterkrankung zu untersuchen, wurden Rpe65-Norrin/VPP Versuchstiere im Alter von acht Wochen post partum herangezogen. Hierzu wurden die Versuchstiere narkotisiert und mittels zervikaler Dislokation getötet. Nach E nukleation der Augen und deren Einbettung in Epon beziehungsweise Paraffin wurden sagittale Schnitte angefertigt und diese histologisch untersucht und verglichen.

Wie bei den zuvor beschriebenen Retinae der drei und fünf Wochen alten Versuchstiere sah man bei den nur für Rpe65-Norrin transgenen Mäusen (n=6) im Vergleich zu den wildtypischen Kontrolltieren (n=10) keinen offensichtlichen mikroskopischen Unterschied in Aufbau und Struktur der Netzhaut. Insbesondere das retinale Pigmentepithel der Rpe65-transgenen Tiere, welche ektopes Norrin konstitutiv über das RPE exprimieren, zeigte keine histomorphologischen Unterschiede zu wildtypischen Geschwistertieren. Im Bereich der äußeren Körnerschicht sah man in beiden Fällen wie bei den im Alter von fünf Wochen untersuchten Tieren vereinzelt Kernkondensationen, welche möglicherweise auf einen vermehrten Lichteinfall und damit einen Lichtschaden bei nichtpigmentierten Versuchstieren zurückzuführen sind. Die Innen- und Außensegmente der Photorezeptorfortsätze ließen einen schlanken Aufbau in physiologischer transversaler Anordnung erkennen, allerdings fiel bei genauerer Betrachtung eine subjektive leichte Längenminderung der Fortsätze, hauptsächlich zu Lasten der Innensegmente im Vergleich zu den Wildtypen auf. Ebenso wie bei den zuvor untersuchten Rpe65-Versuchstieren und Wildtypen konnte man bereits lichtmikroskopisch eine Aufteilung der Außensegmente in Membranstapel beobachten. Die restlichen retinalen Schichten zeigten keine offensichtlichen histomorphologischen Unterschiede im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren.

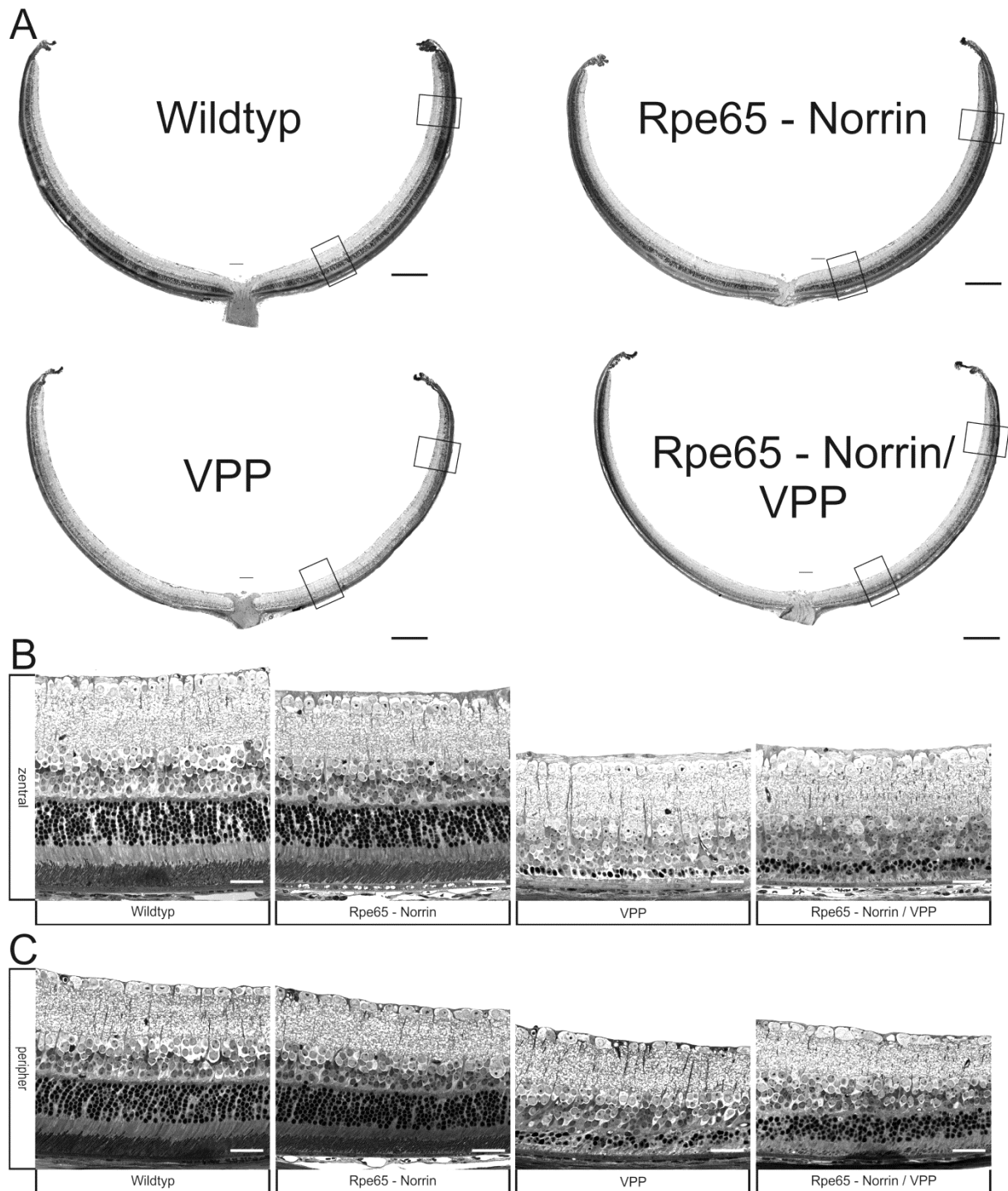


Abbildung 20: Lichtmikroskopie der Netzhaut von acht Wochen alten Versuchstieren. **A** Übersicht über mediane Semidünnschnitte mit Papilla nervi optici. Die Rechtecke bezeichnen die jeweiligen peripheren und zentralen Ausschnitte, welche in **B** und **C** vergrößert dargestellt sind. **B** Detailaufnahmen der zentralen Retinae. Auch im Alter von acht Wochen kein offensichtlicher morphologischer Unterschied in Aufbau und Struktur zwischen Wildtyp und Rpe65-Norrin Mäusen. Bei VPP-positiven Versuchstieren sieht man nur noch eine Zellschicht in der äußeren Körnerschicht (ONL) mit sehr heterogenem Zellbild. Es findet sich keine differenzierbare Schicht der Photorezeptorfortsätze. Das ONL der Rpe65-Norrin/VPP Tiere zeigt ein bis zwei Zellschichten mehr, ebenso sind Ansätze von Innensegmenten der Fortsätze (RAC) erkennbar. Maßstabsbalken 25µm **C** Detailaufnahmen der peripheren Retinaabschnitte. Analog zum zentralen Bereich ist kein offensichtlicher Unterschied in Aufbau und Struktur zwischen Rpe65-Norrin und Wildtyp erkennbar. Demgegenüber ist eine deutliche Reduktion von ONL und RAC erkennbar, wobei die äußere Körnerschicht nur maximal drei Zellschichten zählt und keine erkennbare Struktur aufweist. Vereinzelt sind Ansätze von Innensegmenten zu erkennen, die Außensegmente fehlen. Dagegen ist das ONL der doppeltransgenen Versuchstiere mit etwa sechs

Zellschichten noch deutlich zu erkennen. Ebenso sieht man bereits in dieser Vergrößerung noch Innensegmente in transversaler Anordnung mit Ansätzen von Aussensegmenten. Maßstabsbalken: **A** 250 µm; **B, C** 25 µm

Im Alter von acht Wochen ist die Schädigung der Photorezeptoren im adRP-Modell im zentralen Netzhautbereich an ihrem Endpunkt angelangt. Die äußere Körnerschicht der VPP-Versuchstiere bestand nur noch aus einer mehrfach unterbrochenen Zellschicht mit mehreren nekrotischen oder sich in Apoptose befindlichen Zellen. Vereinzelt waren Übergänge in die Fortsätze der Photorezeptoren erkennbar, jedoch endeten diese plump und balloniert in einer ansonsten amorphen Masse, welche direkt an das retinale Pigmentepithel angrenzte. Im weiteren Verlauf Richtung Ora serrata zeigte sich nur eine leichte Zunahme der Zellzahl im ONL, jedoch blieb das äußerst heterogene Zellbild mit Nekrosen und Apoptosen in einer aufgelösten und ausgefranzten Struktur bestehen. Es fanden sich nur vereinzelt Ansätze von ballonierten und plumpen Innensegmenten in einer nicht differenzierbaren Schicht zwischen äußerer Körnerschicht und retinalem Pigmentepithel. Analog zu den nach drei und fünf Wochen untersuchten Tieren zeigten sich in den restlichen retinalen Schichten der VPP-positiven Versuchstiere keine Hinweise auf eine exogene oder endogene Schädigung (vgl. Abb. 20, Abb. 21).

Bei einer zusätzlichen konstitutiven Expression von Norrin war die Anzahl morphologisch intakter Zellkerne, welche in ebenfalls teilweise unterbrochenen zwei bis drei Zellreihen angeordnet waren, im zentralen Bereich der äußeren Körnerschicht im Vergleich mit den nur für VPP transgenen Geschwistertiere deutlich erhöht. Ebenso fanden sich mehrere sich in Mitose befindliche Zellen, deren Häufigkeit in Richtung Peripherie mit Zunahme von Zellzahl und Schichtdicke ebenfalls anstieg. In Richtung Ora serrata fanden sich noch etwa fünf Zellreihen in der äußeren Körnerschicht. Obwohl das ONL in diesem Bereich im Vergleich zum Wildtypen deutlich reduziert und ausgefranzt war, zeigte sich teilweise eine physiologische kolumnale Struktur. Überraschenderweise fanden sich bei näherer histomorphologischer Untersuchung der Fortsätze der Photorezeptoren im zentralen Netzhautbereich noch vereinzelt längere Innensegmente, welche zwar blind in der dünnen amorphen Schicht zwischen ONL und RPE endeten, jedoch nicht balloniert waren. Je weiter man die Fortsätze in Richtung Peripherie verfolgte, desto häufiger zeigten sich transversal angeordnete Innensegmente. Im Bereich der Ora serrata konnte man noch häufiger Übergänge in kurze Außensegmente erkennen, eine

sichere Differenzierung der Membranstapel war hier jedoch lichtmikroskopisch nicht mehr möglich. Die restlichen Schichten der Retina, insbesondere das retinale Pigmentepithel, wiesen auch nach acht Wochen keine offensichtlichen lichtmikroskopischen Besonderheiten im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren auf.

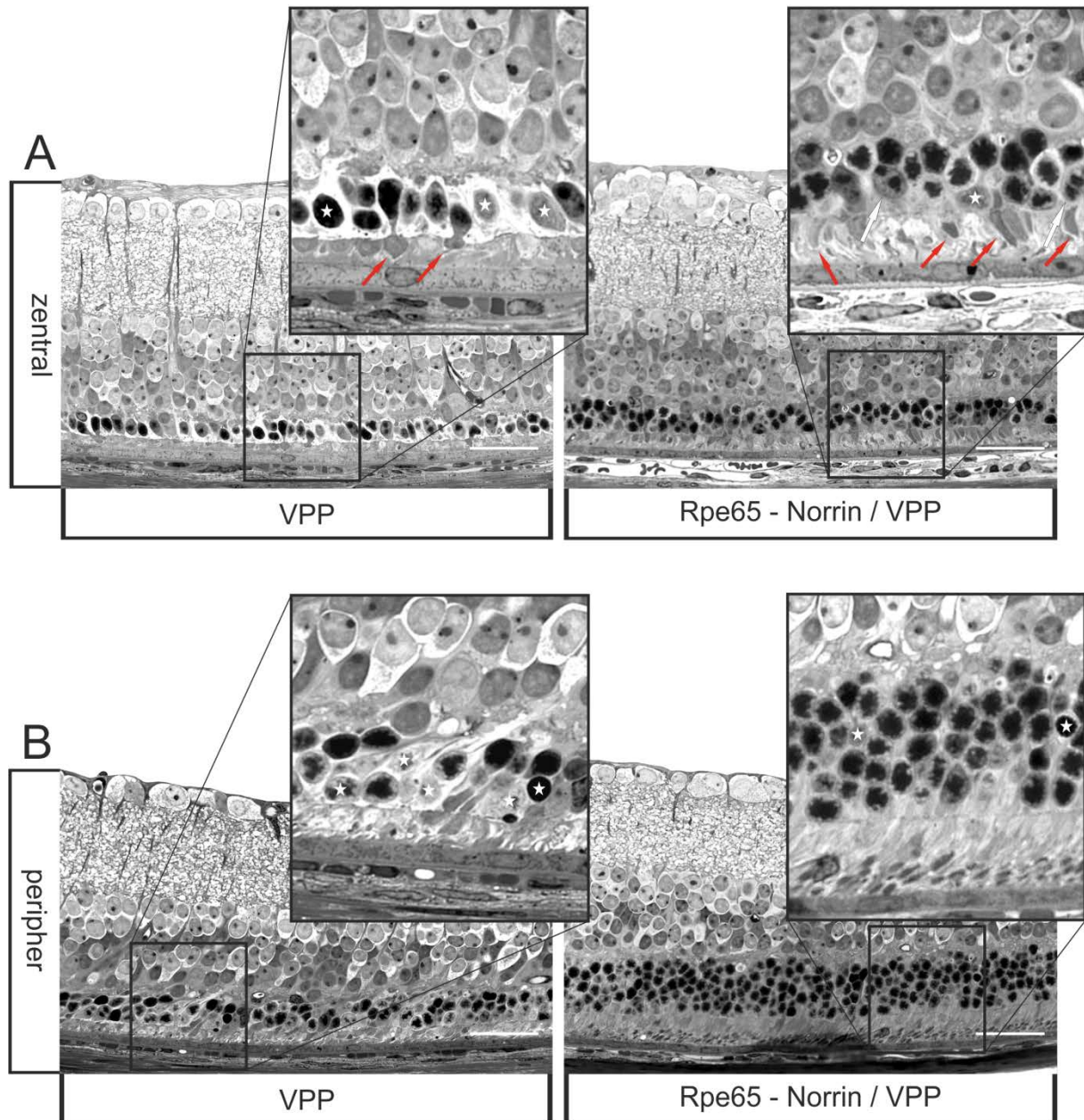


Abbildung 21: Detailaufnahmen von Semidünnschnitten der Netzhaut von VPP- und Rpe65-Norrin/VPP-Versuchstieren im Alter von acht Wochen. **A** Vergleich des zentralen Netzhautbereichs mit zusätzlicher Detailvergrößerung. Nahezu vollständige Degeneration der Photorezeptoren der VPP-positiven Versuchstiere. Es zeigt sich eine einzelne Zellschicht mit sehr heterogener Darstellung der Zellkerne mit Kernkondensationen und lysierten Zellen (exemplarische Darstellung mittels weißer Sterne). Vereinzelt sind Übergänge in rudimentäre, plumpe Fortsätze erkennbar, welche abrupt in einer amorphen Masse vor dem RPE enden (rote Pfeile). Bei zusätzlicher Norrinexpression zeigen sich deutlich mehr morphologisch intakte Zellen mit Übergang in schlankere, jedoch ebenso blind endende Innensegmente (rote Pfeile). Zusätzlich finden sich vereinzelte Mitosen. **B** Vergleich des peripheren Netzhautbereichs. Die äußere Körnerschicht der VPP-positiven Tiere zeigt sich

ebenfalls nahezu vollständig zerstört. Es finden sich nur wenige morphologisch intakte Zellen neben Nekrosen und Apoptosen (weiße Sterne). Die Fortsätze der Photorezeptoren sind bis auf vereinzelte rudimentäre plumpe Innensegmente auf eine amorphe Masse reduziert. Bei den doppeltransgenen Versuchstieren findet sich eine deutliche Besserung des Phänotyps mit circa fünfzehntägigem ONL mit größtenteils morphologisch intakten Zellkernen. Dazwischen finden sich regelmäßig nekrotische oder apoptotische Zellen, ebenso intermittierend Mitosen (in der Detailaufnahme nicht dargestellt). Im RAC nachweisbare Innen- und ansatzweise Aussensegmente kann man in teils transversaler Anordnung erkennen. Maßstabsbalken 25µm.

Um die retinalen Schichtdicken der acht Wochen alten Versuchstiere zu erfassen, wurden analog zu den bereits bei drei und fünf Wochen untersuchten Rpe65-Norrin/VPP Mäusen Semidünnschnitte der enukleierten Augen vermessen und ausgewertet.

Hierbei zeigte sich bei der Auswertung der äußeren Körnerschicht von Rpe65-Norrin Mäusen (n=6) und deren wildtypischen Geschwistertieren (n=10) im Alter von acht Wochen im Bereich der peripheren Netzhaut eine leichte Minderung der Schichtdicke. Im Vergleich zur Schädigung des ONL bei VPP-positiven Versuchstieren (n=7) war dies jedoch vernachlässigbar. Hier ließ sich auch quantitativ eine nahezu vollständige, zentral betonte Degeneration der Photorezeptorzellen mit einer maximalen durchschnittlichen Schichtdicke von fünf Mikrometern im Bereich der Ora serrata, was etwa ein bis zwei Zellreihen entspricht, beobachten. Bei der Auswertung der Versuchstiere, die zusätzlich konstitutiv Norrin über das RPE exprimieren (n=7), fand sich eine über die gesamte Netzhaut signifikante Besserung des Phänotyps. Vor allem in der Netzhautperipherie fand sich noch eine durchschnittliche Schichtdicke von 17 bis 19 Mikrometern, nahezu 50% der äußeren Körnerschicht eines wildtypischen Geschwistertieres (Vgl. Abb. 22A).

Die quantitative Längenauswertung der Fortsätze der Photorezeptorzellen von Mäusen, welche nur für Rpe65-Norrin transgen waren, erbrachte eine fast durchgehend signifikante Verkürzung im Vergleich zu Wildtyptieren, lediglich im zentralen Bereich um den Nervus opticus fanden sich keine Unterschiede. Die nur für VPP transgenen Versuchstiere zeigten ein annähernd vollständiges Verschwinden des RAC, wobei hier wiederum im Bereich der Ora serrata noch minimale Reste von ballonierten Innensegmenten vermessen werden konnten. Wie bei der Auswertung der äußeren Körnerschicht führte eine zusätzliche Norrinexpression zu einer signifikanten Schadensreduktion im RAC. Insbesondere in der Netzhautperipherie konnte eine nahezu vierfache Länge der Photorezeptorfortsätze beobachtet werden (vgl. Abb 22B).

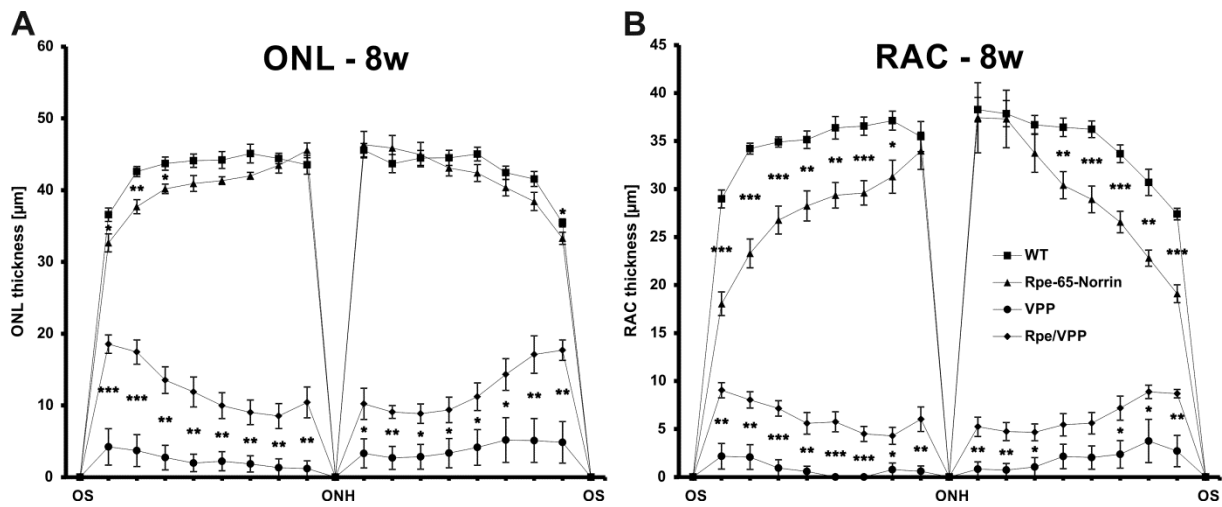


Abbildung 22: Graphische Darstellung der retinalen Schichtdicken von Rpe65-Norrin-, VPP-, Rpe65/VPP-Versuchstieren und deren wildtypischen Geschwistertieren im Alter von acht Wochen mittels sogenannter Spiderdiagramme. Vermessen wurde (A) die äußere Körnerschicht (ONL, outer nuclear layer) und (B) die Fortsätze der Photorezeptoren (RAC, rods and cones) an jeweils 10 korrespondierenden Stellen pro Netzhauthälfte. ONH: Papilla nervi optici, optic nerve head; OS: Ora serrata.

Da sich bei den Versuchstieren im VPP-Schadensmodell im Alter von acht Wochen ein Großteil der Zellen der äußeren Körnerschicht in verschiedenen Stadien des Zelluntergangs befand und die Fläche des ONL extrem reduziert war, wurde auf eine Quantifizierung mittels Zählung von Kernkondensationen oder TUNEL-Assay mangels valider Vergleichbarkeit verzichtet. Zusätzlich fielen bei den doppeltransgenen Mäusen im Bereich der Netzhautperipherie vermehrt Mitosen auf, eine quantitative Auswertung im Vergleich zu VPP-Tieren entfiel aus gleichen Gründen (vgl. Abb. 23).

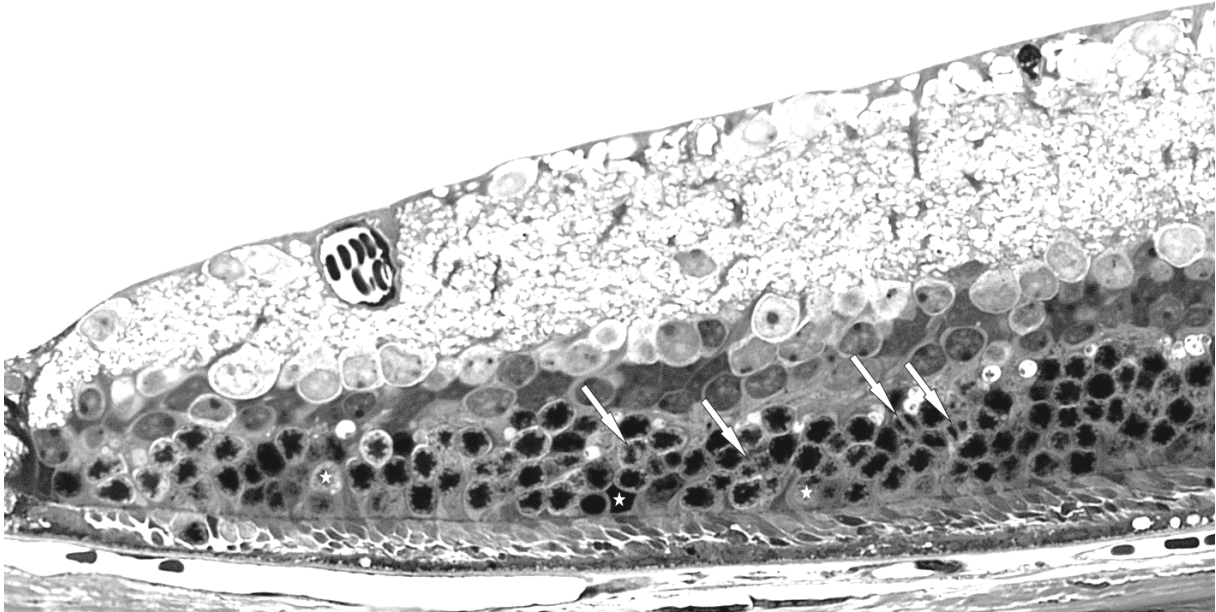


Abbildung 23: Detailaufnahme der Marginalzone um die Ora serrata einer Rpe65-Norrin/VPP Maus im Alter von acht Wochen. Exemplarische Markierung einiger nekrotischer Zellen (weiße Sterne) und einiger Zellen in Mitose (weiße Pfeile)

4.2 Rekombinantes Norrin verstärkt das Proliferationspotential nach exogener Schädigung

Die Beobachtung von vermehrten Mitosen im Bereich der Ora serrata, ebenso wie die teils höchst signifikante Besserung des Phänotyps von VPP-positiven Mäusen, welche konstitutiv Norrin über das retinale Pigmentepithel exprimieren, ließ uns vermuten, dass möglicherweise in den peripheren Netzhautbereichen vermehrt Zellen mit höherem Proliferationspotenzial zu finden sind. Frühere Studien haben gezeigt, dass auch in Retinae von Säugetieren Zellen der Müller-Glia in der Marginalzone um die Ora serrata existieren, welche ein erhöhtes regeneratives Potential aufweisen (Reh und Levine 1998; Reichenbach und Bringmann 2013; Goldman 2014). Zusätzlich wurde beschrieben, dass eine exzitatorische Schädigung der retinalen Ganglienzellen mittels N-methyl-D-Aspartat (NMDA) und eine Behandlung mit dem Wachstumsfaktor EGF (endothelial growth factor) einen der größten Proliferationsreize für Müllerzellen darstellt (Ueki und Reh 2013; Goldman 2014).

Daher wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der neuroregenerativen Eigenschaften von rekombinantem Norrin das exzitatorische Schadensmodell mittels N-methyl-D-Aspartat herangezogen. Hierbei wurden intravitreale Injektionen mit NMDA in das rechte Auge beziehungsweise NMDA/rhNorrin in das linke Auge von drei Wochen alten WiStar-Ratten durchgeführt und anschließend intraperitoneal BrdU an drei aufeinanderfolgenden Tagen appliziert. Danach wurden die Augen der Versuchstiere nach Perfusion in Narkose enukleiert und nach Einbettung in Paraffin histologisch aufgearbeitet.

Zur Identifizierung und Quantifizierung proliferierender Zellen wurden sagittale Paraffinschnitte der Rattenaugen angefertigt. Die Zellen, die sich in den vergangenen drei Tagen geteilt hatten, wurden durch Bindung eines fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörpers gegen das in die DNA eingebrachte Bromodesoxyuridin markiert und sichtbar gemacht. Die Anzahl der somit quantifizierbaren BrdU-positiven Zellen wurde auf die Länge der jeweiligen Retina normiert und miteinander

verglichen. Um überwiegend proliferierende Müllerzellen zu erfassen, wurden nur BrdU-positive Zellen in der inneren Körnerschicht gezählt.

Im Falle der nur mit NMDA behandelten rechten Augen (n=10) sah man 72 Stunden nach exzitatorischem Schaden etwa drei BrdU-positive Zellen pro Millimeter Retina in der inneren Körnerschicht. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung fiel keine besondere Verteilung der mit BrdU markierten Zellen auf spezifische Bereiche der Retina auf.

Bei gleichzeitiger Applikation von NMDA und rekombinantem Norrin in das linke Auge (n=10) war eine hochsignifikante Verdopplung auf circa sechs BrdU-positive Zellen pro Millimeter Retina zu verzeichnen ($p=0,018$). Zusätzlich fiel eine subjektive Häufung von BrdU-positiven Zellen in den peripheren Netzhautbereichen auf.

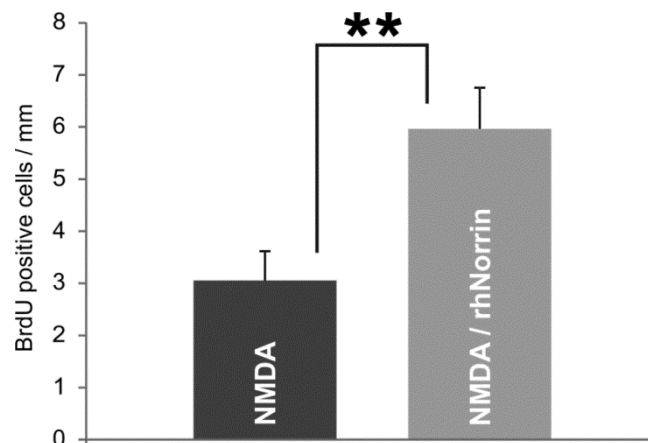


Abbildung 24: Auswertung BrdU-positiver Zellen der inneren Körnerschicht nach intravitrealer Injektion von NMDA (rechtes Auge) und NMDA/rhNorrin (linkes Auge) normiert auf die Retinalänge.

4.3 Rekombinantes Norrin beeinflusst die Induktion von Neurosphären aus murinen Müllerzellen

Wie bereits geschildert, stellt eine Behandlung von Müllerzellen mit EGF (endothelial growth factor) oder FGF-2 (fibroblast growth factor-2) einen großen Reiz zur Proliferation beziehungsweise Entdifferenzierung zu pluripotenten Stammzellen dar (Reichenbach und Bringmann 2013; Goldman 2014; Ueki und Reh 2013; Monnin et al. 2007). Ebenso wurde bereits nachgewiesen, dass unter anderem der WNT/ β -Catenin Signalweg eine große Rolle bei der Bildung von retinalen Stammzellen aus Müller-Glia spielt (Goldman 2014).

Da es durch die Injektion von rekombinantem Norrin zu einer verstärkten Proliferation von Zellen in der inneren Körnerschicht kam und unsere Arbeitsgruppe in früheren Studien bereits gezeigt hat, dass Norrin den WNT/ β -Catenin Signalweg in Müllerzellen aktivieren kann und so zur Expression von verschiedenen neurotrophen und neuroprotektiven Faktoren führt (Seitz et al. 2010; Ohlmann und Tamm 2012), haben wir untersucht, ob rhNorrin die Bildung von Neurosphären aus murinen Müllerzellkulturen induzieren beziehungsweise verstärken kann. Hierzu wurden Müllerzellen aus den Retinae von WiStar-Ratten gewonnen und kultiviert. Danach wurden diese bei 80% Konfluenz mit dem Wachstumsfaktor EGF in aufsteigenden Konzentrationen jeweils mit und ohne rhNorrin für 72 Stunden inkubiert. Die sich daraufhin gebildeten Neurosphären wurden gezählt und deren Volumina vermessen und verglichen.

4.3.1 EGF induziert die Bildung von Neurosphären aus Müllerzellen

Bereits 2007 konnte durch Monnin et al. die Bildung von Neurosphären aus murinen Müllerzellen und deren Differenzierung zu teils neuronalen Progenitorzellen durch die Behandlung mit EGF (endothelial growth factor) und FGF-2 (fibroblast growth factor-2) nachgewiesen werden (Monnin et al. 2007; Goldman 2014). Um unseren Versuchsaufbau zu verifizieren, wurde für die Neurosphäreninduktion aus

Müllerzellkulturen unserer Versuchstiere eine 72-stündige Inkubation mit den beiden Wachstumsfaktoren EGF (8 ng/ml) und FGF-2 (4 ng/ml) als Positivkontrolle verwendet.

Nach 72-stündiger Inkubation von Müllerzellkulturen aus Ratten mit EGF und FGF-2 konnte man eine eindeutige Bildung von Neurosphären beobachten, welche die selben morphologischen Charakteristika wie bereits vorherbeschriebene Neurosphären aufwiesen. Sie zeigten sich als kugelige Zellkonglomerate, welche sich selbstständig aus einem konfluenten Zellrasen in Abwesenheit von Zelladhärens-fördernden Substraten bildeten und sich bei weiterer Kultur wieder am Boden der Kulturschale ausbreiteten. (vgl. Abb. 25).

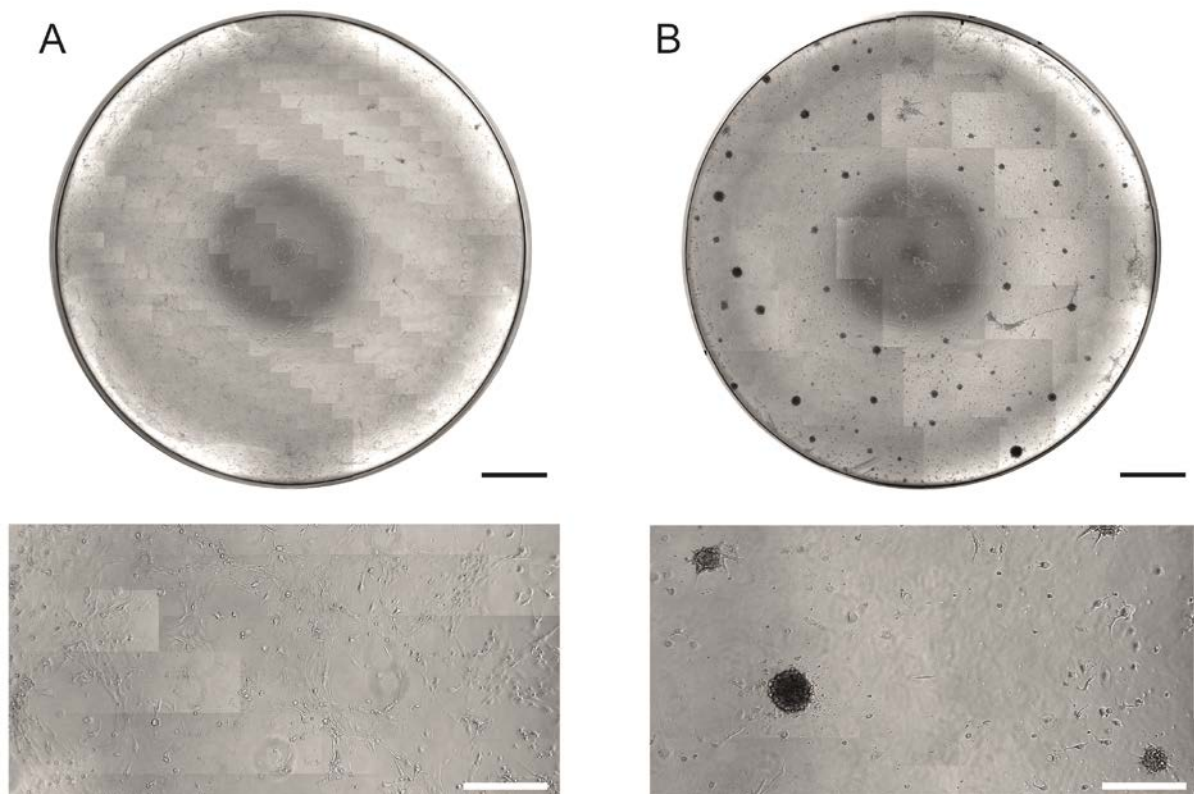


Abbildung 25 Neurosphäreninduktion. **A** Negativ-Kontrolle nach 72h Inkubation, sichtbarer Zellrasen. **B** Positiv-Kontrolle nach Inkubation mit EGF und FGF-2. Deutlich sichtbare Neurosphärenbildung, kein Zellrasen erkennbar. Maßstabsbalken schwarz 800 μm , weiß 200 μm .

4.3.2 rhNorrin verstärkt die Neurosphäreninduktion aus Müllerzellen durch EGF konzentrationsabhängig

Um die Wirkung von rekombinantem Norrin auf die Bildung von Neurosphären aus murinen Müllerzellen in Verbindung mit dem Wachstumsfaktor EGF zu untersuchen, wurden konfluente Müllerzellkulturen mit aufsteigenden Konzentrationen von EGF jeweils mit oder ohne die Zugabe von 40 ng rekombinantem Norrin inkubiert und nach 72 Stunden mittels Phasenkontrastmikroskop untersucht und verglichen. Die Inkubation erfolgte in DMEM/F12 mit N₂-Supplement ohne die Zugabe von Substraten, welche die Zelladhärens fördern.

Die alleinige Behandlung mit EGF führte zu einer konzentrationsabhängigen Bildung von Neurosphären. Bis zum Erreichen des maximalen Induktionseffektes bei 0,8 ng/ml EGF stiegen die Volumina und die Anzahl der Neurosphären linear an. Bei dieser EGF-Konzentration wurde circa das halbe Neurosphärenvolumen der Positivkontrolle erreicht. Durch eine weitere Steigerung der eingesetzten EGF-Konzentration zeigte sich eine leichte lineare Abnahme der Anzahl beziehungsweise der Gesamtvolumina der gebildeten Neurosphären bis zu einem etwa halbierten Neurosphärenvolumen bei einer EGF-Konzentration von 2,0 ng/ml.

Bei zusätzlicher Inkubation mit rekombinantem Norrin konnte Anzahl sowie Gesamtvolumina der Neurosphären bis zum Erreichen des maximalen Induktionseffektes tendentiell erhöht werden, jedoch nicht signifikant. Den größten Induktionseffekt zeigte Norrin bei einer EGF-Konzentration von 0,2 ng/ml. Ab einer EGF-Konzentration von 0,8 ng/ml konnte durch die zusätzliche Behandlung mit Norrin kein weiterer positiver Effekt auf Anzahl und Volumina der Neurosphären verzeichnet werden. Ab einer Konzentration von 2 ng/ml EGF mit gleichzeitiger Inkubation mit Norrin kam es wiederum zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl und Volumina der Neurosphären, jedoch konnte man hier ebenfalls keine Signifikanz nachweisen (vgl. Abb. 26).

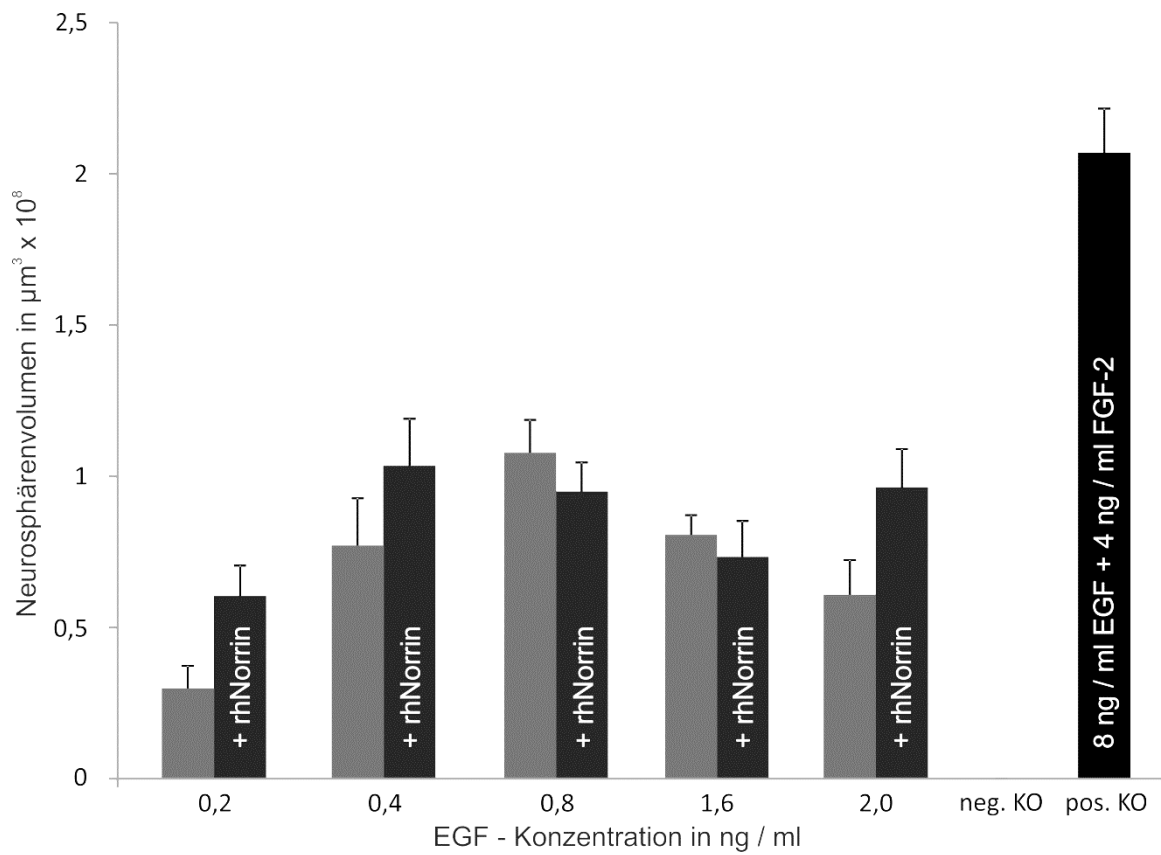


Abbildung 26: Vergleich des kumulativen Neurosphärenvolumens nach Inkubation mit EGF +/- rhNorrin. Konzentrationsabhängige Zunahme der Neurosphärenvolumina durch zusätzliche Inkubation mit rhNorrin.

5 Diskussion

5.1 Norrin verzögert die Degeneration von Photorezeptoren

Durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Norrin neben angiogenen Eigenschaften den Zelltod retinaler Ganglienzellen oder Photorezeptoren nach akuter exogener Schädigung reduzieren kann (Seitz et al. 2010; Ohlmann und Tamm 2012; Braunger et al. 2013). Ein Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob eine transgene okuläre Überexpression von Norrin das Fortschreiten einer hereditären Degeneration von Photorezeptoren verlangsamen kann. Hierzu wählten wir das murine Modell der autosomal dominanten Retinopathia Pigmentosa (adRP), das VPP-Schadensmodell (Naash et al. 1993), und kreuzten diese Tiere mit Mäusen, welche Norrin transgen im retinalen Pigmentepithel exprimieren (Rpe65-Norrin) (Ohlmann et al. 2010). Die Rpe65-Norrin Versuchstiere wurden im FVB/n-Hintergrund generiert, bei welchem die rezessive RD1-Mutation (retinal degeneration 1, PDE6B) homozygot vorliegt. Durch die Kreuzung mit VPP-positiven Versuchstieren im Balb/C-Hintergrund lag diese Mutation in der ersten Generation nur in der heterozygoten Form vor, was bei wildtypischen Kontrolltieren zu keiner Ausbildung eines RD1-spezifischen Phänotyps führt. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Keeler 1927; Chang et al. 2002).

Bei den meisten Patienten mit adRP wird die Erstdiagnose nach dem Auftreten erster Symptome durchschnittlich im Alter von 35 Jahren gestellt (TsujiKawa et al. 2008). Da die Entwicklung der murinen Netzhaut erst nach circa drei Wochen abgeschlossen ist und die nichtpigmentierten VPP-Versuchstiere bereits in diesem Alter Schäden an den Photorezeptoren zeigten, wählten wir dieses Alter als Ausgangspunkt unserer Untersuchungen. Durch die deutliche Progression der Photorezeptorschädigung in nichtpigmentierten Versuchstieren (Naash et al. 1996) zeigte sich bereits eine massive Degeneration der Photorezeptoren nach 8-12 Wochen post partum mit einem nahezu vollständigen Verlust von Zellen in der äußeren Körnerschicht (ONL, outer nuclear layer) und der Fortsätze der Photorezeptoren (RAC, rods and cones). Um den Einfluß von Norrin auf die Degeneration der Photorezeptoren im Verlauf beurteilen zu können, wurden daher die Untersuchungszeitpunkte auf drei, fünf und acht Wochen festgelegt.

5.1.1 Die VPP-Mutation führt zur progressiven Degeneration von Photorezeptoren im FVB/n / Balb/C-Hintergrund

Bereits bei der ersten histologischen Beurteilung der sagittalen Retinaschnitte der VPP-positiven Versuchstiere im Alter von drei Wochen sahen wir deutliche Veränderungen der Photorezeptoren. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Naash et al., wonach bei deren VPP-positiven nichtpigmentierten Versuchstieren bereits kurz nach der Geburt eine deutliche Längenminderung der Aussensegmente zu beobachten war (Naash et al. 1996; Naash et al. 1993). Dies kann durch ein vermindertes Angebot an intakt gefaltetem Opsin zum Aufbau der Membranstapel erklärt werden (Wu et al. 1998). Ebenso zeigte sich ein gesteigerter Verlust von Zellkernen in der äußeren Körnerschicht, was in einer deutlich erhöhten Anzahl an Kernkondensationen und TUNEL-positiver Zellen im Vergleich zum Wildtypen deutlich wurde und nach acht Wochen post partum zu einem nahezu vollständigem Verlust der Photorezeptoren führte. Dies ist möglicherweise der bereits vorbeschriebenen Akkumulation des fehlgefalteten Opsins im endoplasmatischen Retikulum (Mendes et al. 2005) und der konsekutiven Induktion der UPR (unfolded protein response) zuzuschreiben, welche zu einer massiven Zunahme des oxidativen Stresslevels und folglich zur Apoptose beziehungsweise Nekrose der betroffenen Zelle führt (Kroeger et al. 2014; Rana et al. 2014; Chaudhari et al. 2014). Ebenso konnten neuere Untersuchungen zeigen, dass bei Versuchstieren mit der P23H-Mutation Veränderungen in pro-apoptotischen Signalwegen vorliegen und dadurch eine gesteigerte Vulnerabilität von Photorezeptoren gegenüber der Apoptose besteht (Sizova et al. 2014). Durch die Aktivierung des UPR kommt es hierbei zu einer Induktion des Transkriptionsfaktors CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein), welches Teil eines durch ER-Stress induzierten Signalweges ist und proapoptotische Gene aktiviert (Jin et al. 2007; Wright et al. 2010a).

Die Akkumulation des fehlgefalteten Opsins im endoplasmatischen Retikulum könnte ebenso für die histomorphologisch beobachtete zunehmende Verbreiterung und Verplumpung der Photorezeptorfortsätze verantwortlich sein. Die Außensegmente, welche die Membranstapel mit dem intakten Rhodopsin beinhalten, nahmen im zeitlichen Verlauf der Schädigung kontinuierlich an Länge ab. Physiologischerweise werden diese Membranstapel in einem circadianen Rhythmus am distalen Ende

abgestoßen und vom retinalen Pigmentepithel phagozytiert. Die Regeneration erfolgt normalerweise durch Neubildung der Membranstapel am proximalen Anteil der Aussensegmente (Young 1967; Chuang et al. 2007). Die Regeneration der Disks könnte bei den VPP-Versuchstieren wie bereits erwähnt durch ein vermindertes Angebot an intakt gefaltetem Opsin beeinträchtigt sein (Wu et al. 1998). Gleichzeitig könnte eine Störung der physiologischen Zellhomöostase durch die Akkumulation des fehlgefalteten Opsins ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der Regeneration der Membranstapel führen.

Die beobachtete Auflockerung der physiologischen Struktur erklärt sich ebenfalls durch den massiven Verlust an Photorezeptoren. Die in der physiologischen Morphologie entstandenen Schäden werden nicht oder nicht schnell genug repariert. Zelltrümmer von apoptotischen Photorezeptoren und Detritus akkumulieren im interzellulären Raum (Bejarano-Escobar et al. 2017), was möglicherweise zu einer weiteren Anhäufung von radikalen Sauerstoffspezies und einer Ansäuerung des Interstitiums führt. In der retinalen circadianen Rhythmik kommt es bereits physiologisch zu oxidativem Stress durch den Wechsel zwischen niedrigen (im Dunkeln) sowie hohen (im Hellen) Sauerstoffpartialdrücken (Linsenmeier 1986). Zusätzlich kommt es beim Zelluntergang von Photorezeptoren zur Akkumulation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Interstitium. Diese besitzen ein sehr großes Reduktionspotential und stoßen Kettenreaktionen mit Bildung von freien Radikalen an (Reichenbach und Bringmann 2013; Wright et al. 2010a; West und Marnett 2006).

Die Schäden zeigten sich am ausgeprägtesten im zentralen Netzhautbereich und nahmen in Richtung Peripherie kontinuierlich ab. Dies erklärt sich möglicherweise durch die Linsen-bedingte Fokussierung des Lichts auf die Netzhaut und der daraus resultierenden Intensitätssteigerung des punktuellen oxidativen Stresslevels durch einen gesteigerten Rhodopsinumsatz. Sichtbares und ultraviolettes Licht sind an sich nicht energetisch genug, um Zellschäden zu verursachen. Jedoch können Zellschäden durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies entstehen (RONS), welche bei Interaktion von Licht mit photosensitivierenden Molekülen, wie Retinoiden, gebildet werden (Wright et al. 2010a). Insbesondere konnte gezeigt werden, dass Photorezeptorschäden durch Licht (der Wellenlänge 500 nm) eine Freisetzung von all-trans-Retinal aus aktiviertem Rhodopsin voraussetzen (Sun und Nathans 2001;

Travis et al. 2007). Wenn nun wie im Falle der P23H-Mutation eine Regeneration des all-trans-Retinals zu 11-cis-Retinal nicht mehr möglich ist, kommt es neben der Akkumulation im ER zur Bildung von toxischen Bis-Retinoiden und weiteren reaktiven Sauerstoffspezies (Sparrow et al. 1999; Wu et al. 2009). Erstere bilden den Hauptteil des Lipofuszins, welches in retinalen Geweben bei vielen Erkrankungen mit Photorezeptordegeneration vermehrt nachweisbar ist (Fleckenstein et al. 2009; Robson et al. 2008).

Zudem konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, dass eine langanhaltende Stimulation von Müllerzellen durch exzitatorische pathogene Stimuli deren neuroprotektive Funktion in eine zytotoxische umkehrt. Hierbei schüttet die Müller-Glia proinflammatorische Zytokine wie TNF (Tumornekrosefaktor) und CCL2 (CC-chemokine ligand 2) aus, welche eine weitere Entzündungsreaktion induzieren. Ebenso führen langanhaltende pathogene Stimuli bei Müllerzellen zu einer Reduktion des Glutamatuptake, was zu einer neuronalen Hyperexzitabilität und Ödembildung führt, sowie konsekutiv zu einer verminderten Bildung von Glutathion aus Glutamat durch die Müllerzellen, was einen weiteren Anstieg des oxidativen Stresslevels zur Folge hat (Bringmann et al. 2009; Bringmann und Wiedemann 2012).

Am Endpunkt unserer Untersuchungen lagen bei den VPP-positiven Versuchstieren nur noch wenige polymorphe Zellkerne in der Peripherie mit nahezu nicht mehr nachweisbaren Fortsätzen vor. Ohne diese Fortsätze, vor allem ohne die Aussensegmente mit ihren Membranstapel, in welchen der visuelle Zyklus abläuft, ist ein Seheindruck nicht möglich, sodass davon auszugehen ist, dass die Versuchstiere im Alter von 8 Wochen amaurotisch waren. Dies müsste jedoch letztlich verifiziert werden, beispielsweise durch ein Elektroretinogramm.

5.1.2 Konstitutive Expression von Norrin vermindert Schäden an Photorezeptoren

Versuchstiere, die zusätzlich konstitutiv Norrin im retinalen Pigmentepithel exprimierten, zeigten eine deutlich langsamere Progression der Photorezeptorschädigung durch die VPP-Mutation. Dies äußerte sich zum einen in einer länger bestehenden physiologischen Architektur der retinalen Schichten, zum anderen in deutlich höheren Schichtdicken der Photorezeptorschichten, sowohl der äußeren Körnerschicht mit den Perikarien, als auch der Schicht der Fortsätze der Photorezeptoren.

5.1.2.1 Direkte Wirkung von Norrin an Photorezeptoren

Bereits 2001 wurde eine deutliche Expression von Fzd4 in Photorezeptoren selbst beschrieben (Wang et al. 2001). Eine Überexpression von Norrin könnte damit auch eine protektive Wirkung auf die Photorezeptoren selbst ausüben.

Eine Gruppe um Dale Hunter konnte 2004 zeigen, dass die Photorezeptorentwicklung maßgeblich über den Fzd4-Rezeptor beeinflusst wird. Hierbei wurde nachgewiesen, dass Wnt4 über die Bindung an Fzd4 zu einer deutlichen Erhöhung der Zahl an Photorezeptoren *in vitro* führt. Ebenso konnte eine Coexpression von Wnt4 während der Photorezeptorgenese nachgewiesen werden. Als Gegenspieler wurde WIF-1 (Wnt-inhibitory-factor-1) identifiziert, welcher an Wnt4 bindet und somit eine Bindung an den Fzd4-Rezeptor verhindert (Hunter et al. 2004).

Somit könnte Norrin durch Bindung an den Fzd4-Rezeptor und konsekutiver Aktivierung des Wnt-Signalweges zu einer Stabilisierung der Photorezeptoren selbst führen.

5.1.2.2 Indirekte Wirkung von Norrin über die Aktivierung von Müllerzellen

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass Norrin über die Aktivierung des WNT/ β -Catenin-Signalweges zu einer Aktivierung von Müllerzellen führen kann

(Ohlmann und Tamm 2012; Braunger et al. 2013; Seitz et al. 2010). Die größere Schichtdicke der äußeren Körnerschicht in Retinae von Rpe65-Norrin/VPP-Mäusen ist Folge einer deutlich erhöhten Anzahl mikroskopisch sichtbarer vitaler Zellen. Dies ist möglicherweise ein Effekt, den Norrin durch die Aktivierung von Müllerzellen und letztlich einer Norrin-vermittelten verstärkten Expression von neuroprotektiven Faktoren wie Endothelin-2 und BDNF, welche nachweislich unter anderem durch Senkung der Apoptoserate eine Stabilisierung neuronaler Zellen bewirken, auslöst (Braunger et al. 2013; McNeill et al. 2013; Ribelayga und Mangel 2005). Dies könnte beispielsweise durch die Aktivierung des Akt/PKB-Signalwegs, welcher die Proliferations- und Apoptoserate von Zellen modulieren kann, erklärt werden (Risso et al. 2015; Constantinou et al. 2008). Zusätzlich konnte bereits gezeigt werden, dass Müllerzellen ebenfalls durch die Expression von *ciliary neurotrophic factor* und *pigment epithelium-derived factor* die Apoptoserate von retinalen Neuronen verringern (Bringmann et al. 2009; Shen et al. 2012; Wang et al. 2005).

Braunger et al. konnten zeigen, dass die erhöhte Norrinexpression in Rpe65-Norrin Versuchstieren eine protektive Wirkung auf Photorezeptoren im Lichtschadensmodell hat und dass diese Wirkung durch die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mit konsekutiver Expression neuroprotektiver Faktoren wie BDNF vermittelt wird (Braunger et al. 2013). Eine Expression von neuroprotektiven Faktoren durch Photorezeptoren selbst wurde bis dato noch nicht nachgewiesen, dagegen aber eine durch Müller-Glia (Übersichtsartikel: Bringmann et al. 2009, Artikel 6). Im Rahmen dieser Arbeiten konnte auch gezeigt werden, dass die Resilienz von Photorezeptoren in verschiedenen Schadensmodellen von Müllerzellen abhängt. Photorezeptoren exprimieren den TrkB-Rezeptor (BDNF-Rezeptor) nicht (Rohrer et al. 1999), Müllerzellen dagegen schon (Wahlin et al. 2000). Möglicherweise spricht dies für eine parakrine Aktivierung der Müllerzellen und damit indirekter Protektion der Photorezeptoren durch andere neuroprotektive oder stabilisierende Faktoren.

Harada et al. konnten zeigen, dass eine Licht-induzierte Photorezeptordegeneration zu einer vermehrten Expression von TrkC (Neurotrophin-3 Rezeptor) in Photorezeptoren führt. Im Einklang mit der vermehrten Expression von TrkC-Rezeptoren bilden aktivierte Müller-Glia vermehrt nFGF und Neurotrophin 3. Von beiden neuroprotektiven Faktoren ist bekannt, dass sie die Überlebensrate von Photorezeptoren im Rahmen einer Schädigung deutlich verbessern (Harada et al.

2000; Bringmann et al. 2009; Reichenbach und Bringmann 2013). Die beobachtete Reduktion der Anzahl von Kernkondensationen und Apoptosen in Rpe65-Norrin/VPP Mäusen stimmte mit diesen Beobachtungen überein.

5.1.2.3 Reduktion des oxidativen Stresslevels und Aufrechterhaltung der Homöostase durch aktivierte Müllerzellen

Es ist davon auszugehen, dass die konkomitante Expression des fehlgefalteten Opsins durch ein Überangebot von Norrin nicht beeinflusst wird. Jedoch zeigten sich im Vergleich zu den VPP-positiven Versuchstieren weniger ballonierte und längere Innensegmente der Photorezeptoren. Dies könnte möglicherweise auf einen gesteigerten Abbau des fehlgefalteten Opsins beziehungsweise dessen Abbauprodukte nach Verarbeitung im Proteasom hindeuten. Von Tsacopoulos und Magistretti konnte gezeigt werden, dass Müllerzellen metabolische Abfälle der retinalen Zellen phagozytieren und abbauen (Tsacopoulos und Magistretti 1996). Bereits 1932 beschrieben Friedenwald und Chan erstmals die phagozytische Aktivität von Müllerzellen (Friedenwald JS 1932). Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen, welche eine Aktivierung von Müllerzellen und Mikroglia durch Phagozytose von apoptotischen Zellen der Retina sowie Zelldetritus belegen (Übersichtsartikel: Bejarano-Escobar et al. 2017). Eine Norrin-vermittelte Aktivierung von Müllerzellen könnte also zu einer vermehrten Abbaufähigkeit von anfallenden Stoffwechselprodukten, wie beispielsweise dem fehlgefalteten Opsin, apoptotischer Zellen oder auch Zelldetritus, und somit auch zu einer Reduktion des extrazellulären oxidativen Stresslevels führen. Dies könnte einen Grund für die weniger ballonierten Aussensegmente der Photorezeptoren oder die länger erhaltene physiologische Zellarchitektur darstellen.

Weitere Studien haben gezeigt, dass Müllerzellen einige Metaboliten, unter anderem Glutamin, Laktat, Alanin, Adenosin und Glutathion für den oxidativen Stoffwechsel der retinalen Neuronen bereitstellen (Poitry et al. 2000; Schutte und Werner 1998; Reichenbach und Bringmann 2013; Reichelt et al. 1997) und damit das oxidative Stresslevel der Photorezeptoren deutlich senken. Neben diesen protektiven Funktionen wurde bereits nachgewiesen, dass Müllerzellen durch Regulation des interstitiellen Kalium- und Wasserhaushalts zur extrazellulären Homöostase

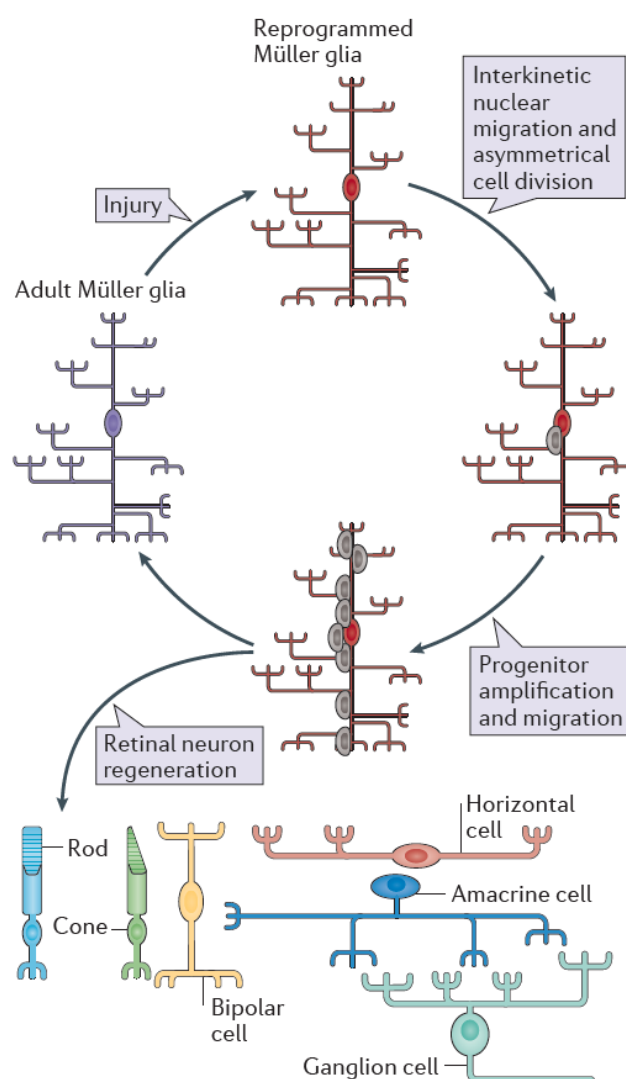
beitragen (Bringmann et al. 2006; Nagelhus et al. 2004; Reichenbach und Bringmann 2013). Ebenso wird die Regulation des pH-Wertes über die Aufnahme und Verstoffwechslung von CO₂ durch Müllerzellen sichergestellt (Reichenbach und Bringmann 2013).

Wird in Müllerzellen der Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch Norrin aktiviert, führt dies möglicherweise zu einer gesteigerten Müllerzellaktivität und damit zu einer Verbesserung der intra- und extrazellulären Homöostase in einer durch apoptotische Degeneration gestressten Retina. Alleine eine Regulation des extrazellulären Elektrolyt- und Säure/Base-Haushaltes könnte zu einer deutlichen Reduzierung der intrazellulären Aufnahme freien Wassers führen, was wiederum ebenfalls die weniger ballonierten Aussensegmente der Photorezeptoren erklären könnte. Eine Reduktion des oxidativen Stress durch vermehrte Bildung von Glutathion führt ebenso zu einer Verringerung der Apoptoserate der empfindlichen neuronalen Zellen (Reichenbach und Bringmann 2013). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in intestinalen Zellen die Expression von Glutathion-Peroxidase-2 (Gpx2) induziert und damit zur Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies beiträgt (Kipp et al. 2012). Eine Gpx-Induktion in Gliazellen wurde bis dato noch nicht beschrieben.

Diese Mechanismen könnten damit für die länger bestehende physiologische Architektur der Photorezeptorschichten verantwortlich sein. Einerseits, weil Müllerzellen eine Stützfunktion in der gesamten Retina übernehmen, andererseits durch Stabilisierung der Photorezeptorzellen selbst durch die Aufrechterhaltung der extra- und intrazellulären Homöostase.

5.2 Norrin fördert die Proliferation von Müllerzellen / retinalen Zellen

Große Aufmerksamkeit wurde in den letzten 50 Jahren den adulten Müllerzellen in Knochenfischen zuteil, da diese die Fähigkeit besitzen, retinale Schäden jedweder Zellpopulation zu reparieren (Bernardos et al. 2007; Goldman 2014; Jones et al. 2003; Avanesov und Malicki 2004; Lenkowski und Raymond 2014). Die Retina in Knochenfischen wächst zeitlebens mit dem Wachstum des Fisches. Nach einem Schaden der Retina nehmen Müllerzellen durch epigenetische Veränderungen sowie



Änderungen im Genexpressionsmuster Stammzeleigenschaften an (Powell et al. 2013). Es kommt zu einer Wanderung des Zellkerns der Müllerzelle (interkinetic nuclear migration) (Nagashima et al. 2013) in die äußere Körnerschicht und einer asymmetrischen Teilung nahe der Membrana limitans externa. Hierbei werden pluripotente Progenitorzellen generiert, welche in die verschiedenen Zelllagen migrieren und dort die geschädigten Zellen ersetzen sowie die Müllerzellpopulation wiederherstellen (Goldman 2014; Fausett und Goldman 2006; Ramachandran et al. 2015).

Abbildung 27: Reprogrammierung der Müller-Glia nach Schädigung der Netzhaut in Zebrafischen (Goldman 2014)

Als größten Unterschied in der zellulären Anatomie zu Säuge- sowie Nagetieren fällt bei Fischen eine Progenitorzellpopulation in der Marginalzone (Nähe Ziliarkörper/Ora serrata), welche zeitlebens retinale Neuronen und Glia, sowie Stäbchenprogenitorzellen bilden, in der äußeren Körnerschicht auf (Johns 1977; Johns und Fernald 1981).

Eine ähnliche Reaktion der Müllerzellen wurde auch in der Retina von Kücken beobachtet. Nach einem extrinsischen Schaden an der Netzhaut reagieren diese mit Proliferation sowie Expression verschiedener Progenitorzellmarker, wie beispielsweise paired box 6 (PAX6) und achaete-scute homologue 1 (ASCL-1) (Fischer und Reh 2001). Letzteres zeigte sich, neben der Wnt/ β -Catenin Signaltransduktion, als essentiell für die Reprogrammierung und Proliferation von Müllerzellen beim Zebrafisch (Ramachandran et al. 2011; Fausett et al. 2008). Im Laufe der postnatalen Entwicklung verlieren die Müllerzellen der Kücken jedoch die Fähigkeit zur Regeneration.

In einer aktuellen Studie wurde gezeigt, dass eine ASCL1-abhängige Progenitorzellaktivierung in NMDA-geschädigten Retinae von Mäusen bis zum 16. postnatalen Tag möglich ist. Danach scheinen epigenetische Prozesse einen Zugriff auf die Informationen zur Bildung von neuronalen Stammzellen zu verhindern. Eine zusätzliche Behandlung der Retinae mit einem Histon-Deacetylase-Inhibitor macht die Bildung von neuronalen Progenitorzellen allerdings wieder möglich (Jorstad et al. 2017b).

Die Müller-Glia in Säugetieren reagiert zwar *in vivo* auf pathogene exogene Stimuli mit Proliferation und einer Änderung der Expression von Genen, welche mit Stammzellen assoziiert sind (Roesch et al. 2008), jedoch werden hierbei keine Progenitorzellen generiert, sondern weitere Müllerzellen, welche Detritus phagozytieren und zur Homöostase beitragen. Andererseits wurde *in vitro* beobachtet, dass Nagetier- sowie humane Müllerzellen in Zellkultur retinale Neuronen und Glia bilden können, interessanterweise mitreguliert über den Wnt-Signalweg (Das et al. 2006; Lawrence et al. 2007).

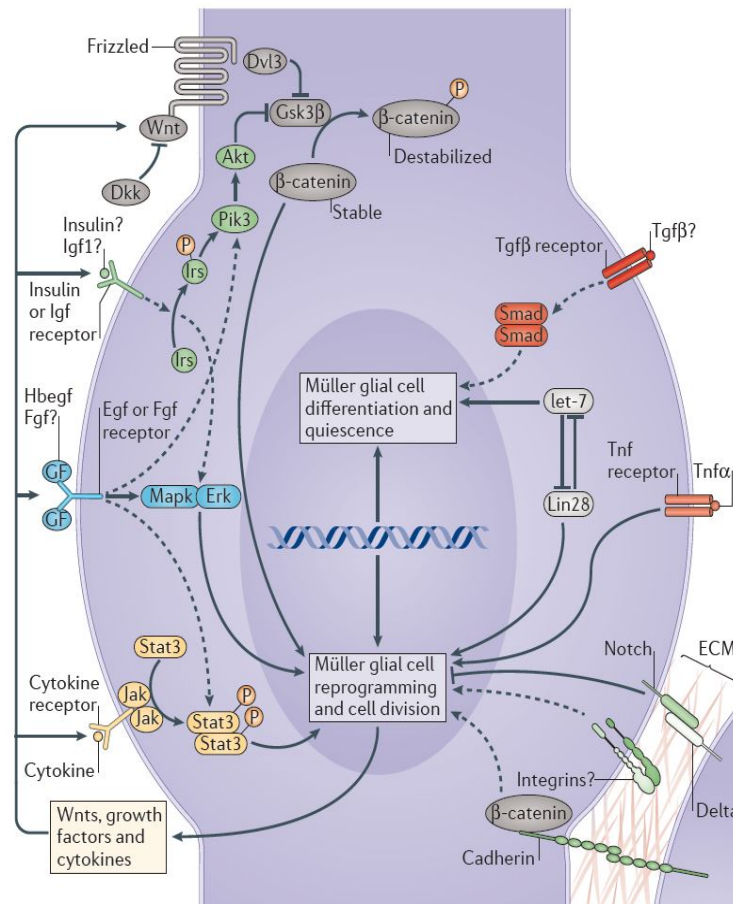


Abbildung 28: Graphische Darstellung der Signalkasakaden, welche zur Reprogrammierung von Müller Glia und zur Proliferation von Progenitorzellen in Zebrafischen führen (aus Goldman 2014)

Das et al. konnten zeigen, dass Müllerzellkulturen nach Inkubation mit FGF signifikant mehr Neurosphären in Anwesenheit eines Wnt-Agonisten (in diesem Fall Wnt2b) bildeten. Diese Neurosphären zeigten eine signifikant erhöhte Expression neuronaler Marker wie Pax6, Nestin oder Musashi2 (MSI2, ein Protein, welches in humanen neuronalen Stammzellen eine Rolle bei Erhaltung und Proliferation spielt). Zusätzlich konnte auch eine erhöhte cyclinA- und cyclinD1-Expression nachgewiesen werden, als Marker eines aktivierten Zellzyklus (Das et al. 2006).

Dazu konnten Lawrence et al. an immortalisierten humanen Müllerzellen eine Differenzierung zu postmitotischen retinalen Neuronen *in vitro* nachweisen. Nach Neurosphärenbildung und weiterer Kultur zeigten diese Zellen teilweise eine neuronale Morphologie. Eine Untersuchung auf neuronale Marker der retinalen Zelltypen zeigte eine Expression von PKC (protein kinase C, ein Bipolarzellmarker), Peripherin und Rhodopsin (Photorezeptormarker), HuD und Brn3

(Ganglionzellmarker), sowie 160KDa neurofilament protein und Calretinin (beides Marker von Amakrinen Zellen, Ganglionzellen und Horizontalzellen) (Lawrence et al. 2007).

5.2.1 Konstitutive Überexpression von Norrin führt möglicherweise zur Bildung retinaler Neuronen

Wie bereits beschrieben, aktiviert Norrin den Wnt/ β -Catenin-Signalweg über eine Bindung an den Fzd4/Lrp5/6-Komplex und führt so zu einer intrazellulären Konzentrationserhöhung von β -Catenin und konsekutiv zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie mit nachfolgender Transkription der Wnt-Zielgene (Clevers 2006; NUSSE und Clevers 2017; NUSSE 2005; Ye et al. 2010). Vorarbeiten unter anderem unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass Norrin in Müllerzellen zu einer verstärkten Expression neuroprotektiver Faktoren wie beispielsweise bFGF, Endothelin-2, BDNF oder PEDF führt (Braunger et al. 2013; Ohlmann et al. 2010; Bringmann et al. 2009) und hierdurch die Apoptoserate von retinalen Neuronen senkt.

Eine alleinige neuroprotektive Funktion der Überexpression von Norrin erklärt jedoch nicht unsere Beobachtung, dass insbesondere die retinalen Randbereiche in den Retinae der doppeltransgenen Versuchstiere deutlich länger höhere Schichtdicken durch eine höhere Anzahl von Photorezeptorzellen aufwiesen. In diesem Zusammenhang ist festzuhalten, dass der physiologisch gebündelte Lichteinfall im zentralen Netzhautbereich mit hier konsekutiv deutlich erhöhtem oxidativem Stresslevel für dieses Phänomen verantwortlich sein könnte. Eine Kombination aus peripher vermindertem Lichteinfall und verstärkter Induktion von Müllerzellen könnte hierfür eine Erklärung bieten. Jedoch zeigten sich bei den Rpe65-Norrin/VPP-Versuchstieren im Bereich der Ora serrata vermehrt Mitosen in der äußeren Körnerschicht. Ein quantitativer Vergleich mit den VPP-Mäusen war nicht möglich, da bei diesen nach acht Wochen nahezu keine messbare äußere Körnerschicht mehr existierte, jedoch zeigten sich auch hier vereinzelt Mitosen im Bereich der Ora serrata (vgl. Abb. 21, Abb.23).

Die Beobachtung dieser vermehrten Mitosen im Bereich der Ora serrata, ebenso wie die teils höchst signifikante Reduktion des Verlusts von Photorezeptoren in VPP-positiven Mäusen, welche konstitutiv Norrin über das retinale Pigmentepithel exprimieren, ließ vermuten, dass möglicherweise in den peripheren Netzhautbereichen spezialisierte Müllerzellen mit erhöhtem Proliferationspotenzial zu finden sind. Frühere Studien haben gezeigt, dass neben Zebrafischen auch in

Retinae von Säugetieren Zellen der Müller-Glia in der Marginalzone um die Ora serrata existieren, welche ein erhöhtes regeneratives Potential aufweisen (Reh und Levine 1998; Reichenbach und Bringmann 2013; Goldman 2014).

In den letzten Jahrzehnten haben intensive Studien am Wnt/ β -Catenin Signalweg gezeigt, dass dieser unter anderem für die Aufrechterhaltung von Stammzellen beziehungsweise eines Stammzellkontingents unterschiedlichster Gewebe verantwortlich ist. So führt beispielsweise eine Überexpression von Dickkopf (Dkk), einem Wnt-Antagonisten, welcher an LRP5/6 bindet und somit die Signaltransduktion im Wnt/ β -Catenin-Signalweg unterbricht, zu einer Reduktion beziehungsweise komplettem Fehlen von Stammzellen zur Bildung von intestinale Schleimhautgewebe, von Haarfollikeln, der Brustdrüse, von Knochen sowie von Vorläuferzellen des hämatopoietischen Systems (van Amerongen et al. 2012; van Camp et al. 2014; Barker et al. 2007; Clevers und NUSSE 2012; NUSSE und Clevers 2017). Ebenso wurde gezeigt, dass eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs die Proliferationsrate von ossären, intestinalen sowie hämatopoietischen Stammzellen erhöht (Willert et al. 2003; Zeng und NUSSE 2010; Minear et al. 2010).

Eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch konstitutiv überexprimiertes sowie rekombinantes Norrin könnte daher in spezialisierten Müllerzellen nahe der Ora serrata zu einer Erhöhung der Proliferationsrate beziehungsweise Verbesserung der Fähigkeit, differenzierte Zellen zu generieren, führen. Hierfür spricht eine Zunahme der Mitosen im doppeltransgenen Mausmodell sowie eine signifikante Erhöhung der Anzahl an BrdU-positiven proliferierenden Zellen im Bereich der Ora serrata im NMDA-Schadensmodell (Vgl. Abb. 23, Abb. 24).

5.3 Rekombinantes Norrin fördert die Bildung von Neurosphären aus Müllerzellkulturen konzentrationsabhängig

Wie bereits beschrieben, führt eine Schädigung der Netzhaut von Knochenfischen zu einer Aktivierung von Müllerzellen mit folgender asymmetrischer Teilung und Bildung von pluripotenten Stammzellen. Diese Stammzellen migrieren dann wieder in die designierten Zellschichten - beziehungsweise die Zellkerne (interkinetic nuclear migration) - und regenerieren dort durch Zelldifferenzierung die fehlende Zellpopulation (Powell et al. 2013; Ramachandran et al. 2015; Fausett und Goldman 2006). In Säugetieren konnten bisher nur sehr spärliche Ergebnisse *in vivo* als auch *in vitro* erzielt werden, jedoch zeigten viele Studien, dass Müllerzellen in Säugetieren die Fähigkeit besitzen, unter gewissen Bedingungen Neuronen der Retina zu bilden und damit auch die Möglichkeit bieten, einen retinalen Schaden zu reparieren (Singhal et al. 2012). Eine für diese Arbeit besonders interessante Studie zeigte eine Verbesserung der Stäbchen-Funktion in einer Ratte mit P23H-Mutation (analog zum VPP-Schadensmodell) durch subretinale Injektion von *in vitro* mit verschiedenen Wachstumsfaktoren behandelten humanen Müllerzellen (Jayaram et al. 2014).

Für eine Aktivierung der Stammzeleigenschaften der Müllerzellen wurden unter anderem EGFR- (epidermal growth factor receptor-), sonic hedgehog-, Glutamat-, ASCL1- sowie Wnt/ β -Catenin-abhängiges Signalling identifiziert (Osakada et al. 2007; Wan et al. 2008; Pollak et al. 2013). Es wird sogar vermutet, dass eine Wnt/ β -Catenin abhängige Signaltransduktion die Erzeugung der von Müllerzellen abstammenden Progenitorzellen kontrolliert (Osakada et al. 2007), beziehungsweise deren Pluripotenz aufrechterhält und eine Differenzierung verhindert. Nicht nur in Müllerzellen ist ein Zusammenhang zwischen dem Wnt-Signalweg und der Erhaltung von Stammzeleigenschaften bekannt. Mittlerweile werden Wnt-Agonisten zur Erhaltung von Stammzellkulturen eingesetzt (Zeng und Nusse 2010; Berge et al. 2011; Sato et al. 2011)

Unsere Intention war es zu untersuchen, ob Müllerzellen *in vitro* morphologische Stammzeleigenschaften, beziehungsweise Eigenschaften neuronaler Stammzellen, aufweisen, wenn sie durch rekombinantes Norrin stimuliert werden. Monnin et al. konnten bereits zeigen, dass eine Kultur von Müllerzellen aus Ratten in DMEM-F12

unter Behandlung mit EGF zu einer Bildung von Neurosphären (Charakterisierung von Neurosphären vgl. 4.3.3) führt. Ebenso konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass diese Müllerzellen nach Stimulation Progenitorzeleigenschaften, wie beispielsweise die Expression von Nestin, CRALBP (cellular retinaldehyde binding protein) und GFAP (glial fibrillary acidic protein), aufweisen (Monnin et al. 2007).

Durch die zusätzliche Inkubation mit rekombinantem Norrin zeigte sich eine EGF - konzentrationsabhängige Verstärkung der Neursphärenbildung, jedoch konnte diese Verstärkung in der niedrigen Anzahl an Versuchsansätzen (n=4) nicht signifikant verifiziert werden. Es kann also nur darüber spekuliert werden, ob Norrin hier ebenfalls über eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs zu einer verstärkten Proliferation und Reprogrammierung zu neuronalen Progenitorzellen führt. Wie bereits beschrieben, konnten auch Harada et al. sowie Lawrence et al. nachweisen, dass so gebildete Neurosphären aus Müllerzellen die Fähigkeit besitzen, Müllerzellen mit Stammzeleigenschaften sowie jede Zellart der Retina zu generieren (Lawrence et al. 2007; Harada et al. 2000).

6 Ausblick

Daten dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine Überexpression von Norrin in der murinen Netzhaut durch eine Aktivierung von Müllerzellen einer kontinuierlichen Degeneration von Photorezeptoren entgegenwirken, beziehungsweise diese verzögern kann. Um zu verifizieren, ob der protektive Effekt von Norrin über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg vermittelt wird, wäre eine zusätzliche Behandlung mit Dkk als Wnt-Inhibitor möglich. Gleichzeitig könnte man die Expression von β -Catenin und damit indirekt die gesteigerte Wnt-Signaltransduktion beispielsweise mittels Western-Blot nachweisen. Ebenso sollte in weiterführenden Studien der potentielle Signalweg des Norrin-vermittelten Schutzes gegen eine chronische Degeneration von Photorezeptoren untersucht werden. Dies könnte über eine Expressionsanalyse von potentiellen protektiven Faktoren in der Netzhaut von Rpe65-Norrin/VPP Mäusen mittels real-time RT-PCR erfolgen.

Weiterhin deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass eine Inkubation von Müllerzellen mit dem Wnt-Liganden Norrin in Anwesenheit von EGF zu einer vermehrten Bildung von Neurosphären führen könnte. Hier sollte in einem nächsten Schritt verifiziert werden, ob und in welchem Verhältnis es sich um Stammzellen handelt. Dies wäre durch Nachweis verschiedener Stammzellmarker wie beispielsweise Nestin, Pax6 oder GFAP mittels Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie oder real-time RT-PCR möglich.

Eine Reperatur exogener oder endogener Schäden der murinen Retina durch Bildung von Stammzellen aus der Müllerzellpopulation ist *in vivo* nur sehr begrenzt möglich und nicht annähernd ausreichend. Jüngere Studien lassen vermuten, dass eine Aktivierung der *Ascl1*-Gene essentiell für eine β -Catenin-vermittelte Stammzellbildung aus Müllerzellen ist (Jorstad et al. 2017a). Interessant wäre demnach, ob eine Überexpression von ASCL1 in Kombination mit Norrin eine degenerative Netzhautschädigung, beispielsweise im VPP- oder rd1-Modell weiter reduziert oder einen exogenen Netzhautschaden, beispielsweise im NMDA- oder Lichtschadensmodell zusätzlich vermindert.

7 Zusammenfassung

Norrin ist das sezernierte Produkt des NDP-Gens, welches sowohl während der embryonalen Entwicklung als auch postnatal in verschiedenen neuronalen als auch anderen Geweben des Körpers exprimiert wird. Durch Bindung von Norrin an den Fzd4/Lrp5/6-Rezeptorkomplex kann der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktiviert werden. Mutationen im NDP-Gen werden mit dem Norrie-Syndrom, der Frühgeborenenretinopathie (ROP), der X-chromosomalen familiären exsudativen Vitreoretinopathie (FEVR), einem persistierenden hyperplastischen primären Glaskörper (PHPV) und Morbus Coats assoziiert.

In verschiedenen Vorarbeiten wurde gezeigt, dass Norrin neben angioprotektiven auch neuroprotektive Eigenschaften durch die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen vermittelt und hierdurch extrinsische Netzhautschäden im NMDA- und Lichtschadensmodell abgeschwächt werden können. Nach retinaler Schädigung in Zebrafischen entdifferenzieren die Müllerzellen zu multipotenten Progenitorzellen, die letztlich in der Lage sind, jede Art von Zelle der Netzhaut zu regenerieren und Schäden zu reparieren.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine retinale Überexpression von Norrin die Progression einer hereditären Photorezeptorschädigung am Beispiel der Retinopathia pigmentosa im Tiermodell abschwächen kann. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob Norrin neben neuroprotektiven auch regenerative Eigenschaften durch die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen haben könnte. Hierzu wurde das Modell des extrinsischen Schadens retinaler Neuronen nach intravitrealer Injektion von NMDA verwendet. Zusätzlich wurde untersucht, ob Norrin die Bildung von Neurosphären aus Müllerzellen *in vitro* induzieren kann.

Eine transgene Überexpression von Norrin im retinalen Pigmentepithel konnte die Degeneration von Photorezeptoren im VPP-Schadensmodell signifikant verzögern. Des Weiteren zeigte sich eine erhöhte Anzahl an Mitosen im Bereich der Ora serrata im fortgeschrittenen Stadium der Netzhautdegeneration, was auf eine neuroregenerative Wirkung von Norrin hinweisen könnte.

Die intravitreale Injektion von rhNorrin führte zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl BrdU-positiver Zellen im NMDA-Schadensmodell, was eine erhöhte Proliferationsrate retinaler Zellen nahelegt. Ebenso konnte rhNorrin die Induktion von Neurosphären konzentrationsabhängig verstärken.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Norrin im Rahmen einer hereditären Photorezeptorschädigung neben einer neuroprotektiven Funktion auch neuroregenerative Eigenschaften aufweisen könnte. Dies geschieht möglicherweise durch die Norrin-vermittelte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in Müllerzellen. Norrin könnte damit neue Therapieansätze zu Behandlung hereditärer degenerativer Netzhauterkrankungen eröffnen.

8 Anhang

8.1 Literaturverzeichnis

al-Ubaidi, M. R.; Pittler, S. J.; Champagne, M. S.; Triantafyllos, J. T.; McGinnis, J. F.; Baehr, W. (1990): Mouse opsin. Gene structure and molecular basis of multiple transcripts. In: *J Biol Chem* 265 (33), S. 20563–20569.

ANDERSEN, S. R.; Warburg, M. (1961): Norrie's disease: congenital bilateral pseudotumor of the retina with recessive X-chromosomal inheritance; preliminary report. In: *Arch Ophthalmol* 66, S. 614–618.

ANDERSEN, S. R. Y. (1961): Norrie's Disease. In: *Arch Ophthalmol* 66 (5), S. 614. DOI: 10.1001/archopht.1961.00960010616003.

Avanesov, Andrei; Malicki, Jarema (2004): Approaches to study neurogenesis in the zebrafish retina. In: *Methods in cell biology* 76, S. 333–384.

Baehr, W.; Falk, J. D.; Bugra, K.; Triantafyllos, J. T.; McGinnis, J. F. (1988): Isolation and analysis of the mouse opsin gene. In: *FEBS Lett* 238 (2), S. 253–256.

Barker, Nick; van Es, Johan H.; Kuipers, Jeroen; Kujala, Pekka; van den Born, Maaïke; Cozijnsen, Miranda et al. (2007): Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. In: *Nature* 449 (7165), S. 1003–1007. DOI: 10.1038/nature06196.

Battinelli, E. M.; Boyd, Y.; Craig, I. W.; Breakefield, X. O.; Chen, Z. Y. (1996): Characterization and mapping of the mouse NDP (Norrie disease) locus (*Ndp*). In: *Mamm Genome* 7 (2), S. 93–97.

Bejarano-Escobar, Ruth; Sánchez-Calderón, Hortensia; Otero-Arenas, Josué; Martín-Partido, Gervasio; Francisco-Morcillo, Javier (2017): Müller glia and phagocytosis of cell debris in retinal tissue. In: *Journal of anatomy* 231 (4), S. 471–483. DOI: 10.1111/joa.12653.

Berge, Derk ten; Kurek, Dorota; Blauwkamp, Tim; Koole, Wouter; Maas, Alex; Eroglu, Elif et al. (2011): Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. In: *Nature cell biology* 13 (9), S. 1070–1075. DOI: 10.1038/ncb2314.

Berger, W.; Meindl, A.; van de Pol, T J; Cremers, F. P.; Ropers, H. H.; Doerner, C. et al. (1992a): Isolation of a candidate gene for Norrie disease by positional cloning. In: *Nat Genet* 1 (3), S. 199–203. DOI: 10.1038/ng0692-199.

Berger, W.; van de Pol, D.; Bachner, D.; Oerlemans, F.; Winkens, H.; Hameister, H. et al. (1996): An Animal Model for Norrie Disease (ND). Gene Targeting of the Mouse Nd Gene. In: *Human Molecular Genetics* 5 (1), S. 51–59. DOI: 10.1093/hmg/5.1.51.

Berger, W.; van de Pol, D; Warburg, M.; Gal, A.; Bleeker-Wagemakers, L.; Silva, H. de et al. (1992b): Mutations in the candidate gene for Norrie disease. In: *Hum Mol Genet* 1 (7), S. 461–465.

Bernardos, Rebecca L.; Barthel, Linda K.; Meyers, Jason R.; Raymond, Pamela A. (2007): Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (26), S. 7028–7040. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1624-07.2007.

Braunger, Barbara M.; Ohlmann, Andreas; Koch, Marcus; Tanimoto, Naoyuki; Volz, Cornelia; Yang, Ying et al. (2013): Constitutive overexpression of Norrin activates Wnt/ β -catenin and endothelin-2 signaling to protect photoreceptors from light damage. In: *Neurobiology of Disease* 50, S. 1–12. DOI: 10.1016/j.nbd.2012.09.008.

Bringmann, Andreas; Iandiev, Ianors; Pannicke, Thomas; Wurm, Antje; Hollborn, Margrit; Wiedemann, Peter et al. (2009): Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. In: *Progress in Retinal and Eye Research* 28 (6), S. 423–451. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2009.07.001.

Bringmann, Andreas; Pannicke, Thomas; Grosche, Jens; Francke, Mike; Wiedemann, Peter; Skatchkov, Serguei N. et al. (2006): Müller cells in the healthy and diseased retina. In: *Progress in Retinal and Eye Research* 25 (4), S. 397–424. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2006.05.003.

Bringmann, Andreas; Wiedemann, Peter (2012): Müller glial cells in retinal disease. In: *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde* 227 (1), S. 1–19. DOI: 10.1159/000328979.

Chang, B.; Hawes, N. L.; Hurd, R. E.; Davisson, M. T.; Nusinowitz, S.; Heckenlively, J. R. (2002): Retinal degeneration mutants in the mouse. In: *Vision Research* 42 (4), S. 517–525. DOI: 10.1016/S0042-6989(01)00146-8.

Chaudhari, Namrata; Talwar, Priti; Parimisetty, Avinash; Lefebvre d'Hellencourt, Christian; Ravanan, Palaniyandi (2014): A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 8, S. 213. DOI: 10.3389/fncel.2014.00213.

Choi, Yoon Kyung; Kim, Kyu-Won (2008): Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. In: *BMB reports* 41 (5), S. 345–352. Online verfügbar unter http://www.bmbreports.org/jbmb/jbmb_files/%5B41-5%5D1003021730_%28345-352%29BMB095%2808-131%29.pdf, zuletzt geprüft am 07.05.2016.

Chuang, Jen-Zen; Zhao, Yu; Sung, Ching-Hwa (2007): SARA-regulated vesicular targeting underlies formation of the light-sensing organelle in mammalian rods. In: *Cell* 130 (3), S. 535–547. DOI: 10.1016/j.cell.2007.06.030.

Clevers, Hans (2006): Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. In: *Cell* 127 (3), S. 469–480. DOI: 10.1016/j.cell.2006.10.018.

Clevers, Hans; NUSSE, Roel (2012): Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. In: *Cell* 149 (6), S. 1192–1205. DOI: 10.1016/j.cell.2012.05.012.

Constantinou, Thecla; Baumann, Fabrizio; Lacher, Markus D.; Saurer, Susanne; Friis, Robert; Dharmarajan, Arun (2008): SFRP-4 abrogates Wnt-3a-induced beta-catenin and Akt/PKB signalling and reverses a Wnt-3a-imposed inhibition of in vitro mammary differentiation. In: *Journal of molecular signaling* 3, S. 10. DOI: 10.1186/1750-2187-3-10.

Cruciat, C.-M.; Niehrs, C. (2013): Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (3), a015081-a015081. DOI: 10.1101/cshperspect.a015081.

Daiger, Stephen P. (2007): Perspective on Genes and Mutations Causing Retinitis Pigmentosa. In: *Arch Ophthalmol* 125 (2), S. 151. DOI: 10.1001/archopht.125.2.151.

Das, Ani V.; Mallya, Kavita B.; Zhao, Xing; Ahmad, Faraz; Bhattacharya, Sumitra; Thoreson, Wallace B. et al. (2006): Neural stem cell properties of Müller glia in the

- mammalian retina. Regulation by Notch and Wnt signaling. In: *Developmental Biology* 299 (1), S. 283–302. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.07.029.
- Deng, C.; Reddy, P.; Cheng, Y.; Luo, C.-W.; Hsiao, C.-L.; Hsueh, A. J. W. (2013): Multi-functional norrin is a ligand for the LGR4 receptor. In: *Journal of Cell Science* 126 (9), S. 2060–2068. DOI: 10.1242/jcs.123471.
- Dickinson, Joanne L.; Sale, Michèle M.; Passmore, Abraham; FitzGerald, Liesel M.; Wheatley, Catherine M.; Burdon, Kathryn P. et al. (2006): Mutations in the NDP gene. Contribution to Norrie disease, familial exudative vitreoretinopathy and retinopathy of prematurity. In: *Clin Exp Ophthalmol* 34 (7), S. 682–688. DOI: 10.1111/j.1442-9071.2006.01314.x.
- Dijksterhuis, J. P.; Petersen, J.; Schulte, G. (2014): WNT/Frizzled signalling. Receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: IUPHAR Review 3. In: *Br J Pharmacol* 171 (5), S. 1195–1209. DOI: 10.1111/bph.12364.
- Donders, F. C. (1857): Beiträge zur pathologischen Anatomie des Auges. In: *Graefes Archiv für Ophthalmologie* 3 (1), S. 139–165. DOI: 10.1007/BF02720685.
- Engelhardt, Britta; Liebner, Stefan (2014): Novel insights into the development and maintenance of the blood–brain barrier. In: *Cell Tissue Res* 355 (3), S. 687–699. DOI: 10.1007/s00441-014-1811-2.
- Fausett, Blake V.; Goldman, Daniel (2006): A role for alpha1 tubulin-expressing Müller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. In: *J. Neurosci.* 26 (23), S. 6303–6313. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0332-06.2006.
- Fausett, Blake V.; Gumerson, Jessica D.; Goldman, Daniel (2008): The proneural basic helix-loop-helix gene *ascl1a* is required for retina regeneration. In: *J. Neurosci.* 28 (5), S. 1109–1117. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4853-07.2008.
- Fischer, A. J.; Reh, T. A. (2001): Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. In: *Nature neuroscience* 4 (3), S. 247–252. DOI: 10.1038/85090.
- Fleckenstein, M.; Charbel Issa, P.; Fuchs, H. A.; Finger, R. P.; Helb, H-M; Scholl, H. P. N.; Holz, F. G. (2009): Discrete arcs of increased fundus autofluorescence in

retinal dystrophies and functional correlate on microperimetry. In: *Eye (London, England)* 23 (3), S. 567–575. DOI: 10.1038/eye.2008.59.

Friedenwald JS, Chan E. (1932): Pathogenesis of retinitis pigmentosa with a note on the phagocytic activity of Meller's fibers. In: *American Journal of Ophthalmology* 15 (12), S. 1190–1208. DOI: 10.1016/S0002-9394(32)93337-6.

Fruttiger, Marcus (2007): Development of the retinal vasculature. In: *Angiogenesis* 10 (2), S. 77–88. DOI: 10.1007/s10456-007-9065-1.

Giannelli, Serena G.; Demontis, Gian Carlo; Pertile, Grazia; Rama, Paolo; Broccoli, Vania (2011): Adult human Müller glia cells are a highly efficient source of rod photoreceptors. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 29 (2), S. 344–356. DOI: 10.1002/stem.579.

Goldman, Daniel (2014): Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. In: *Nature reviews. Neuroscience* 15 (7), S. 431–442. DOI: 10.1038/nrn3723.

Goodwin, Peter (2008): Hereditary retinal disease. In: *Current Opinion in Ophthalmology* 19 (3), S. 255–262. DOI: 10.1097/ICU.0b013e3282fc27fc.

Harada, T.; Harada, C.; Nakayama, N.; Okuyama, S.; Yoshida, K.; Kohsaka, S. et al. (2000): Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. In: *Neuron* 26 (2), S. 533–541.

He, X. (2004): LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ -catenin signaling. Arrows point the way. In: *Development* 131 (8), S. 1663–1677. DOI: 10.1242/dev.01117.

Hetz, Claudio (2012): The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. In: *Nat Rev Mol Cell Biol.* DOI: 10.1038/nrm3270.

Hsieh, M. (2005): Mice Null for Frizzled4 (Fzd4^{-/-}) Are Infertile and Exhibit Impaired Corpora Lutea Formation and Function. In: *Biology of Reproduction* 73 (6), S. 1135–1146. DOI: 10.1095/biolreprod.105.042739.

Hunter, Dale D.; Zhang, Minlei; Ferguson, Jill W.; Koch, Manuel; Brunken, William J. (2004): The extracellular matrix component WIF-1 is expressed during, and can modulate, retinal development. In: *Molecular and cellular neurosciences* 27 (4), S. 477–488. DOI: 10.1016/j.mcn.2004.08.003.

Jayaram, Hari; Jones, Megan F.; Eastlake, Karen; Cottrill, Phillippa B.; Becker, Silke; Wiseman, Joseph et al. (2014): Transplantation of photoreceptors derived from human Muller glia restore rod function in the P23H rat. In: *Stem cells translational medicine* 3 (3), S. 323–333. DOI: 10.5966/sctm.2013-0112.

Jensen, Josephine B.; Parmar, Malin (2006): Strengths and Limitations of the Neurosphere Culture System. In: *MN* 34 (3), S. 153–162. DOI: 10.1385/MN:34:3:153.

Jiang, Haibo; Xiong, Siqi; Xia, Xiaobo (2014a): Retinitis pigmentosa associated rhodopsin mutant T17M induces endoplasmic reticulum (ER) stress and sensitizes cells to ER stress-induced cell death. In: *Mol Med Rep* 9 (5), S. 1737–1742. DOI: 10.3892/mmr.2014.1987.

Jiang, Li; Frederick, Jeanne M.; Baehr, Wolfgang (2014b): RNA interference gene therapy in dominant retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy mouse models caused by GCAP1 mutations. In: *Front Mol Neurosci* 7. DOI: 10.3389/fnmol.2014.00025.

Jin, Shengkan; DiPaola, Robert S.; Mathew, Robin; White, Eileen (2007): Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. In: *Journal of Cell Science* 120 (Pt 3), S. 379–383. DOI: 10.1242/jcs.03349.

Johns, P. R. (1977): Growth of the adult goldfish eye. III. Source of the new retinal cells. In: *The Journal of comparative neurology* 176 (3), S. 343–357. DOI: 10.1002/cne.901760304.

Johns, P. R.; Fernald, R. D. (1981): Genesis of rods in teleost fish retina. In: *Nature* 293 (5828), S. 141–142.

Jones, Bryan W.; Watt, Carl B.; Frederick, Jeanne M.; Baehr, Wolfgang; Chen, Ching-Kang; Levine, Edward M. et al. (2003): Retinal remodeling triggered by photoreceptor degenerations. In: *The Journal of comparative neurology* 464 (1), S. 1–16. DOI: 10.1002/cne.10703.

Jorstad, Nikolas L.; Wilken, Matthew S.; Grimes, William N.; Wohl, Stefanie G.; VandenBosch, Leah S.; Yoshimatsu, Takeshi et al. (2017a): Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice. In: *Nature* 548 (7665), S. 103–107. DOI: 10.1038/nature23283.

Jorstad, Nikolas L.; Wilken, Matthew S.; Grimes, William N.; Wohl, Stefanie G.; VandenBosch, Leah S.; Yoshimatsu, Takeshi et al. (2017b): Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice. In: *Nature* 548 (7665), S. 103–107. DOI: 10.1038/nature23283.

Junge, Harald J.; Yang, Stacey; Burton, Jeremy B.; Paes, Kim; Shu, Xiao; French, Dorothy M. et al. (2009): TSPAN12 Regulates Retinal Vascular Development by Promoting Norrin- but Not Wnt-Induced FZD4/ β -Catenin Signaling. In: *Cell* 139 (2), S. 299–311. DOI: 10.1016/j.cell.2009.07.048.

K. C. Richardson, L. Jarett, E. H. Finke: Embedding in Epoxy Resins for Ultrathin Sectioning in Electron Microscopy. Online verfügbar unter <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.3109/10520296009114754>, zuletzt geprüft am 09.06.2014.

Kato, Masaki; Patel, Millan S.; Levasseur, Regis; Lobov, Ivan; Chang, Benny H.-J.; Glass, Donald A. et al. (2002): Cbfa1 -independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. In: *J Cell Biol* 157 (2), S. 303–314. DOI: 10.1083/jcb.200201089.

Ke, J.; Harikumar, K. G.; Erice, C.; Chen, C.; Gu, X.; Wang, L. et al. (2013): Structure and function of Norrin in assembly and activation of a Frizzled 4-Lrp5/6 complex. In: *Genes & Development* 27 (21), S. 2305–2319. DOI: 10.1101/gad.228544.113.

Keeler, Clyde E. (1927): Rodless retina, an ophthalmic mutation in the house mouse, *mus musculus*. In: *J. Exp. Zool.* 46 (4), S. 355–407. DOI: 10.1002/jez.1400460402.

Kinzler, K.; Nilbert, M.; Su, L.; Vogelstein, B.; Bryan, T.; Levy, D. et al. (1991): Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. In: *Science* 253 (5020), S. 661–665. DOI: 10.1126/science.1651562.

Kipp, Anna P.; Müller, Mike F.; Göken, Eva M.; Deubel, Stefanie; Brigelius-Flohé, Regina (2012): The selenoproteins GPx2, TrxR2 and TrxR3 are regulated by Wnt signalling in the intestinal epithelium. In: *Biochimica et biophysica acta* 1820 (10), S. 1588–1596. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.05.016.

Kroeger, Heike; Lavail, Matthew M.; Lin, Jonathan H. (2014): Endoplasmic reticulum stress in vertebrate mutant rhodopsin models of retinal degeneration. In: *Advances in*

experimental medicine and biology 801, S. 585–592. DOI: 10.1007/978-1-4614-3209-8_74.

Lawrence, Jean M.; Singhal, Shweta; Bhatia, Bhairavi; Keegan, David J.; Reh, Thomas A.; Luthert, Philip J. et al. (2007): MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25 (8), S. 2033–2043. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0724.

Lenkowski, Jenny R.; Raymond, Pamela A. (2014): Müller glia. Stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. In: *Progress in Retinal and Eye Research* 40, S. 94–123. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.12.007.

Li, Vivian S.W.; Ng, Ser Sue; Boersema, Paul J.; Low, Teck Y.; Karthaus, Wouter R.; Gerlach, Jan P. et al. (2012): Wnt Signaling through Inhibition of β -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. In: *Cell* 149 (6), S. 1245–1256. DOI: 10.1016/j.cell.2012.05.002.

Li, Yao; Wu, Wen-Hsuan; Hsu, Chun-Wei; Nguyen, Huy V.; Tsai, Yi-Ting; Chan, Lawrence et al. (2014): Gene therapy in patient-specific stem cell lines and mice with membrane frizzled-related protein (MFRP) defects. In: *Mol Ther.* DOI: 10.1038/mt.2014.100.

Lin, Song; Cheng, Mei; Dailey, Wendelin; Drenser, Kimberly; Chintala, Shravan (2009): Norrin attenuates protease-mediated death of transformed retinal ganglion cells. In: *Molecular vision* 15, S. 26–37. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2615462/pdf/mv-v15-26.pdf>, zuletzt geprüft am 09.03.2016.

Linsenmeier, R. A. (1986): Effects of light and darkness on oxygen distribution and consumption in the cat retina. In: *The Journal of general physiology* 88 (4), S. 521–542.

Logan, Catriona Y.; NUSSE, Roel (2004): THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20 (1), S. 781–810. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126.

Luhmann, U. F. O. (2005): Role of the Norrie Disease Pseudoglioma Gene in Sprouting Angiogenesis during Development of the Retinal Vasculature. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46 (9), S. 3372–3382. DOI: 10.1167/iovs.05-0174.

MacDonald, Bryan T.; Tamai, Keiko; He, Xi (2009): Wnt/ β -Catenin Signaling. Components, Mechanisms, and Diseases. In: *Developmental Cell* 17 (1), S. 9–26. DOI: 10.1016/j.devcel.2009.06.016.

Matsui, K.; Hosoi, N.; Tachibana, M. (1999): Active role of glutamate uptake in the synaptic transmission from retinal nonspiking neurons. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19 (16), S. 6755–6766. Online verfügbar unter <http://www.jneurosci.org/content/19/16/6755.full.pdf#page=1&view=FitH>, zuletzt geprüft am 07.05.2016.

McNeill, B.; Mazerolle, C.; Bassett, E. A.; Mears, A. J.; Ringuette, R.; Lagali, P. et al. (2013): Hedgehog regulates Norrie disease protein to drive neural progenitor self-renewal. In: *Human Molecular Genetics* 22 (5), S. 1005–1016. DOI: 10.1093/hmg/dds505.

Meindl, Alfons; Berger, Wolfgang; Meitinger, Thomas; van de Pol, Dorien; Achatz, Helene; Dörner, Christa et al. (1992): Norrie disease is caused by mutations in an extracellular protein resembling C-terminal globular domain of mucins. In: *Nat Genet* 2 (2), S. 139–143. DOI: 10.1038/ng1092-139.

Meitinger, T.; Meindl, A.; Bork, P.; Rost, B.; Sander, C.; Haasemann, M.; Murken, J. (1993): Molecular modelling of the Norrie disease protein predicts a cystine knot growth factor tertiary structure. In: *Nat Genet* 5 (4), S. 376–380. DOI: 10.1038/ng1293-376.

Mendes, Hugo F.; van der Spuy, Jacqueline; Chapple, J. Paul; Cheetham, Michael E. (2005): Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa: implications for therapy. In: *Trends in Molecular Medicine* 11 (4), S. 177–185. DOI: 10.1016/j.molmed.2005.02.007.

Minear, Steven; Leucht, Philipp; Jiang, Jie; Liu, Bo; Zeng, Arial; Fuerer, Christophe et al. (2010): Wnt proteins promote bone regeneration. In: *Science translational medicine* 2 (29), 29ra30. DOI: 10.1126/scitranslmed.3000231.

Monnin, Julie; Morand-Villeneuve, Nadege; Michel, Germaine; Hicks, David; Versaux-Botteri, Claudine (2007): Production of neurospheres from mammalian Muller cells in culture. In: *Neuroscience letters* 421 (1), S. 22–26. DOI: 10.1016/j.neulet.2007.04.073.

Moses, R. L.; Claycomb, William C. (1982): Ultrastructure of terminally differentiated adult rat cardiac muscle cells in culture. In: *Am. J. Anat.* 164 (2), S. 113–131. DOI: 10.1002/aja.1001640203.

Naash, M. I.; Hollyfield, J. G.; al-Ubaidi, M. R.; Baehr, W. (1993): Simulation of human autosomal dominant retinitis pigmentosa in transgenic mice expressing a mutated murine opsin gene. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (12), S. 5499–5503.

Naash, M. I.; Ripps, H.; Li, S.; Goto, Y.; Peachey, N. S. (1996): Polygenic disease and retinitis pigmentosa: albinism exacerbates photoreceptor degeneration induced by the expression of a mutant opsin in transgenic mice. In: *J Neurosci* 16 (24), S. 7853–7858.

Nagashima, Mikiko; Barthel, Linda K.; Raymond, Pamela A. (2013): A self-renewing division of zebrafish Müller glial cells generates neuronal progenitors that require N-cadherin to regenerate retinal neurons. In: *Development* 140 (22), S. 4510–4521. DOI: 10.1242/dev.090738.

Nagelhus, E. A.; Mathiesen, T. M.; Ottersen, O. P. (2004): Aquaporin-4 in the central nervous system. Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. In: *Neuroscience* 129 (4), S. 905–913. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.08.053.

Newman, E.; Reichenbach, A. (1996): The Müller cell: a functional element of the retina. In: *Trends in neurosciences* 19 (8), S. 307–312. Online verfügbar unter http://ac.els-cdn.com/0166223696100400/1-s2.0-0166223696100400-main.pdf?_tid=b28571ec-1431-11e6-a34f-00000aacb35f&acdnat=1462611616_5b4a27aba5184293829cdb2922300f62, zuletzt geprüft am 07.05.2016.

Newman, Eric A. (2003): New roles for astrocytes. Regulation of synaptic transmission. In: *Trends in neurosciences* 26 (10), S. 536–542. DOI: 10.1016/S0166-2236(03)00237-6.

Nikopoulos, Konstantinos; Venselaar, Hanka; Collin, Rob W J; Riveiro-Alvarez, Rosa; Boonstra, F. Nienke; Hooymans, Johanna M M 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. In: *Hum Mutat* 31 (6), S. 656–666. DOI: 10.1002/humu.21250.

NORRIE, GORDON (1927): CAUSES OF BLINDNESS IN CHILDREN. In: *Acta Ophthalmologica* 5 (1-3), S. 357–386. DOI: 10.1111/j.1755-3768.1927.tb01019.x.

NUSSE, Roel (2005): Wnt signaling in disease and in development. In: *Cell Res* 15 (1), S. 28–32. DOI: 10.1038/sj.cr.7290260.

NUSSE, Roel; Clevers, Hans (2017): Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. In: *Cell* 169 (6), S. 985–999. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.016.

Ohlmann, A.; Scholz, Michael; Goldwich, Andreas; Chauhan, Bharesh K.; Hudl, Kristiane; Ohlmann, Anne V. et al. (2005): Ectopic Norrin Induces Growth of Ocular Capillaries and Restores Normal Retinal Angiogenesis in Norrie Disease Mutant Mice // Ectopic norrin induces growth of ocular capillaries and restores normal retinal angiogenesis in Norrie disease mutant mice. In: *Journal of Neuroscience* 25 (7), S. 1701–1710. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4756-04.2005.

Ohlmann, A.; Seitz, R.; Braunger, B.; Seitz, D.; Bosl, M. R.; Tamm, E. R. (2010): Norrin Promotes Vascular Regrowth after Oxygen-Induced Retinal Vessel Loss and Suppresses Retinopathy in Mice. In: *Journal of Neuroscience* 30 (1), S. 183–193. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3210-09.2010.

Ohlmann, Andreas; Tamm, Ernst R. (2012): Norrin: Molecular and functional properties of an angiogenic and neuroprotective growth factor. In: *Progress in Retinal and Eye Research* 31 (3), S. 243–257. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2012.02.002.

Osakada, Fumitaka; Ooto, Sotaro; Akagi, Tadamichi; Mandai, Michiko; Akaike, Akinori; Takahashi, Masayo (2007): Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (15), S. 4210–4219. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4193-06.2007.

Paes, Kim T.; Wang, Ernest; Henze, Kathy; Vogel, Peter; Read, Robert; Suwanichkul, Adisak et al. (2011): Frizzled 4 Is Required for Retinal Angiogenesis and Maintenance of the Blood-Retina Barrier. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52 (9), S. 6452. DOI: 10.1167/iovs.10-7146.

Paxton, Christian N.; Bleyl, Steven B.; Chapman, Susan C.; Schoenwolf, Gary C. (2010): Identification of differentially expressed genes in early inner ear development. In: *Gene Expr Patterns* 10 (1), S. 31–43. DOI: 10.1016/j.gep.2009.11.002.

Perez-Vilar, J.; Hill, R. L. (1997): Norrie Disease Protein (Norrin) Forms Disulfide-linked Oligomers Associated with the Extracellular Matrix. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (52), S. 33410–33415. DOI: 10.1074/jbc.272.52.33410.

Poitry, S.; Poitry-Yamate, C.; Ueberfeld, J.; MacLeish, P. R.; Tsacopoulos, M. (2000): Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial (Muller) cells. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20 (5), S. 1809–1821.

Pollak, Julia; Wilken, Matthew S.; Ueki, Yumi; Cox, Kristen E.; Sullivan, Jane M.; Taylor, Russell J. et al. (2013): ASCL1 reprograms mouse Muller glia into neurogenic retinal progenitors. In: *Development* 140 (12), S. 2619–2631. DOI: 10.1242/dev.091355.

Poulter, James A.; Davidson, Alice E.; Ali, Manir; Gilmour, David F.; Parry, David A.; Mintz-Hittner, Helen A. et al. (2012): Recessive Mutations in TSPAN12 Cause Retinal Dysplasia and Severe Familial Exudative Vitreoretinopathy (FEVR). In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53 (6), S. 2873. DOI: 10.1167/iovs.11-8629.

Powell, Curtis; Grant, Ana R.; Cornblath, Eli; Goldman, Daniel (2013): Analysis of DNA methylation reveals a partial reprogramming of the Müller glia genome during retina regeneration. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (49), S. 19814–19819. DOI: 10.1073/pnas.1312009110.

Ramachandran, Rajesh; Fausett, Blake V.; Goldman, Daniel (2015): Ascl1a regulates Müller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, let-7 microRNA signalling pathway. In: *Nature cell biology* 17 (4), S. 532. DOI: 10.1038/ncb3144.

Ramachandran, Rajesh; Zhao, Xiao-Feng; Goldman, Daniel (2011): Ascl1a/Dkk/beta-catenin signaling pathway is necessary and glycogen synthase kinase-3beta inhibition is sufficient for zebrafish retina regeneration. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (38), S. 15858–15863. DOI: 10.1073/pnas.1107220108.

Rana, T.; Shinde, V. M.; Starr, C. R.; Kruglov, A. A.; Boitet, E. R.; Kotla, P. et al. (2014): An activated unfolded protein response promotes retinal degeneration and triggers an inflammatory response in the mouse retina. In: *Cell death & disease* 5, S. e1578. DOI: 10.1038/cddis.2014.539.

Rayapudi, Sobharani; Schwartz, Stephen G.; Wang, Xue; Chavis, Pamela: Vitamin A and fish oils for retinitis pigmentosa. Online verfügbar unter <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/14651858.CD008428.pub2/asset/CD008428.pdf?v=1&t=hwc4mlvf&s=4dbf92ea0cd21d9d2cefda12ffb3e45ed99818bd>, zuletzt geprüft am 12.06.2014.

Reh, T. A.; Levine, E. M. (1998): Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina. In: *J. Neurobiol.* 36 (2), S. 206–220. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4695(199808)36:2<206::AID-NEU8>3.0.CO;2-5.

Rehm, Heidi L.; Zhang, Duan-Sun; Brown, M. Christian; Burgess, Barbara; Halpin, Chris; Berger, Wolfgang et al. (2002): Vascular defects and sensorineural deafness in a mouse model of Norrie disease. In: *J. Neurosci.* 22 (11), S. 4286–4292, zuletzt geprüft am 06.07.2014.

Reichelt, W.; Stabel-Burow, J.; Pannicke, T.; Weichert, H.; Heinemann, U. (1997): The glutathione level of retinal Muller glial cells is dependent on the high-affinity sodium-dependent uptake of glutamate. In: *Neuroscience* 77 (4), S. 1213–1224.

Reichenbach, Andreas; Bringmann, Andreas (2013): New functions of Müller cells. In: *Glia* 61 (5), S. 651–678. DOI: 10.1002/glia.22477.

Reynolds, B.; Weiss, S. (1992): Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. In: *Science* 255 (5052), S. 1707–1710. DOI: 10.1126/science.1553558.

Reynolds, Brent A.; Weiss, Samuel (1996): Clonal and Population Analyses Demonstrate That an EGF-Responsive Mammalian Embryonic CNS Precursor Is a Stem Cell. In: *Developmental Biology* 175 (1), S. 1–13. DOI: 10.1006/dbio.1996.0090.

Ribelayga, Christophe; Mangel, Stuart C. (2005): A circadian clock and light/dark adaptation differentially regulate adenosine in the mammalian retina. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25 (1), S. 215–222. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3138-04.2005.

Richter, M.; Gottanka, J.; May, C. A.; Welge-Lüssen, U.; Berger, W.; Lütjen-Drecoll, E. (1998): Retinal vasculature changes in Norrie disease mice. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39 (12), S. 2450–2457, zuletzt geprüft am 06.07.2014.

Risso, Guillermo; Blaustein, Matías; Pozzi, Berta; Mammi, Pablo; Srebrow, Anabella (2015): Akt/PKB. One kinase, many modifications. In: *Biochem. J.* 468 (2), S. 203–214. DOI: 10.1042/BJ20150041.

Robson, Anthony G.; Michaelides, Michel; Saihan, Zubin; Bird, Alan C.; Webster, Andrew R.; Moore, Anthony T. et al. (2008): Functional characteristics of patients with retinal dystrophy that manifest abnormal parafoveal annuli of high density fundus autofluorescence; a review and update. In: *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology* 116 (2), S. 79–89. DOI: 10.1007/s10633-007-9087-4.

Roesch, Karin; Jadhav, Ashutosh P.; Trimarchi, Jeffrey M.; Stadler, Michael B.; Roska, Botond; Sun, Ben B.; Cepko, Constance L. (2008): The transcriptome of retinal Müller glial cells. In: *The Journal of comparative neurology* 509 (2), S. 225–238. DOI: 10.1002/cne.21730.

Rohrer, B.; Korenbrot, J. I.; LaVail, M. M.; Reichardt, L. F.; Xu, B. (1999): Role of neurotrophin receptor TrkB in the maturation of rod photoreceptors and establishment of synaptic transmission to the inner retina. In: *J Neurosci* 19 (20), S. 8919–8930.

Saihan, Zubin; Webster, Andrew R.; Luxon, Linda; Bitner-Glindzicz, Maria (2009): Update on Usher syndrome. In: *Current Opinion in Neurology* 22 (1), S. 19–27. DOI: 10.1097/WCO.0b013e3283218807.

Sato, Toshiro; van Es, Johan H.; Snippert, Hugo J.; Stange, Daniel E.; Vries, Robert G.; van den Born, Maaïke et al. (2011): Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. In: *Nature* 469 (7330), S. 415–418. DOI: 10.1038/nature09637.

Schroeder, B.; Hesse, L.; Bruck, W.; Gal, A. (1997): Histopathological and immunohistochemical findings associated with a null mutation in the Norrie disease gene. In: *Ophthalmic Genet* 18 (2), S. 71–77.

Schutte, M.; Werner, P. (1998): Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. In: *Neuroscience letters* 246 (1), S. 53–56.

Seitz, R.; Hackl, S.; Seibuchner, T.; Tamm, E. R.; Ohlmann, A. (2010): Norrin Mediates Neuroprotective Effects on Retinal Ganglion Cells via Activation of the Wnt/-Catenin Signaling Pathway and the Induction of Neuroprotective Growth Factors in

Muller Cells. In: *Journal of Neuroscience* 30 (17), S. 5998–6010. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0730-10.2010.

Shen, Weiyong; Fruttiger, Marcus; Zhu, Ling; Chung, Sook H.; Barnett, Nigel L.; Kirk, Joshua K. et al. (2012): Conditional Muller cell ablation causes independent neuronal and vascular pathologies in a novel transgenic model. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (45), S. 15715–15727. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2841-12.2012.

Shen, Yin; Liu, Xiao-Ling; Yang, Xiong-Li (2006): N-Methyl-D-Aspartate Receptors in the Retina. In: *MN* 34 (3), S. 163–180. DOI: 10.1385/MN:34:3:163.

Siliprandi, R.; Canella, R.; Carmignoto, G.; Schiavo, N.; Zanellato, A.; Zanoni, R.; Vantini, G. (1992): N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. In: *Visual neuroscience* 8 (6), S. 567–573.

Singhal, Shweta; Bhatia, Bhairavi; Jayaram, Hari; Becker, Silke; Jones, Megan F.; Cottrill, Phillippa B. et al. (2012): Human Müller glia with stem cell characteristics differentiate into retinal ganglion cell (RGC) precursors in vitro and partially restore RGC function in vivo following transplantation. In: *Stem cells translational medicine* 1 (3), S. 188–199. DOI: 10.5966/sctm.2011-0005.

Sizova, Olga S.; Shinde, Vishal M.; Lenox, Austin R.; Gorbatyuk, Marina S. (2014): Modulation of cellular signaling pathways in P23H rhodopsin photoreceptors. In: *Cellular signalling* 26 (4), S. 665–672. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.12.008.

Smallwood, Philip M.; Williams, John; Xu, Qiang; Leahy, Daniel J.; Nathans, Jeremy (2007): Mutational analysis of Norrin-Frizzled4 recognition. In: *J Biol Chem* 282 (6), S. 4057–4068. DOI: 10.1074/jbc.M609618200.

Smith, L. E.; Wesolowski, E.; McLellan, A.; Kostyk, S. K.; D'Amato, R.; Sullivan, R.; D'Amore, P. A. (1994): Oxygen-induced retinopathy in the mouse. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 35 (1), S. 101–111, zuletzt geprüft am 09.03.2016.

Smith, Sharon E.; Mullen, Thomas E.; Graham, Dionne; Sims, Katherine B.; Rehm, Heidi L. (2012): Norrie disease: extraocular clinical manifestations in 56 patients. In: *Am J Med Genet A* 158A (8), S. 1909–1917. DOI: 10.1002/ajmg.a.35469.

Sparrow, J. R.; Parish, C. A.; Hashimoto, M.; Nakanishi, K. (1999): A2E, a lipofuscin fluorophore, in human retinal pigmented epithelial cells in culture. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40 (12), S. 2988–2995.

Stingl, K.; Greppmaier, U.; Wilhelm, B.; Zrenner, E. (2010): Subretinal visual implants. In: *Klin Monbl Augenheilkd* 227 (12), S. 940–945. DOI: 10.1055/s-0029-1245830.

Sun, H.; Nathans, J. (2001): ABCR, the ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt macular dystrophy, is an efficient target of all-trans-retinal-mediated photooxidative damage in vitro. Implications for retinal disease. In: *J Biol Chem* 276 (15), S. 11766–11774. DOI: 10.1074/jbc.M010152200.

Tout, S.; Chan-Ling, T.; Holländer, H.; Stone, J. (1993): The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. In: *Neuroscience* 55 (1), S. 291–301, zuletzt geprüft am 07.05.2016.

Travis, Gabriel H.; Golczak, Marcin; Moise, Alexander R.; Palczewski, Krzysztof (2007): Diseases caused by defects in the visual cycle. Retinoids as potential therapeutic agents. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 47, S. 469–512. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105225.

Tsacopoulos, M.; Magistretti, P. J. (1996): Metabolic coupling between glia and neurons. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16 (3), S. 877–885. Online verfügbar unter <http://www.jneurosci.org/content/16/3/877.full.pdf#page=1&view=FitH>, zuletzt geprüft am 07.05.2016.

Tsujikawa, Motokazu; Wada, Yuko; Sukegawa, Marie; Sawa, Miki; Gomi, Fumi; Nishida, Kohji; Tano, Yasuo (2008): Age at onset curves of retinitis pigmentosa. In: *Arch Ophthalmol* 126 (3), S. 337–340. DOI: 10.1001/archophth.126.3.337.

Ueki, Yumi; Reh, Thomas A. (2013): EGF stimulates Müller glial proliferation via a BMP-dependent mechanism. In: *Glia* 61 (5), S. 778–789. DOI: 10.1002/glia.22472.

van Amerongen, Renée; Bowman, Angela N.; NUSSE, Roel (2012): Developmental stage and time dictate the fate of Wnt/ β -catenin-responsive stem cells in the mammary gland. In: *Cell stem cell* 11 (3), S. 387–400. DOI: 10.1016/j.stem.2012.05.023.

van Camp, J. K.; Beckers, S.; Zegers, D.; van Hul, W. (2014): Wnt signaling and the control of human stem cell fate. In: *Stem cell reviews* 10 (2), S. 207–229. DOI: 10.1007/s12015-013-9486-8.

Vang, Sheila; Longley, Katie; Steer, Clifford J.; Low, Walter C. (2014): The Unexpected Uses of Urso- and Tauroursodeoxycholic Acid in the Treatment of Non-liver Diseases. In: *Glob Adv Health Med* 3 (3), S. 58–69. DOI: 10.7453/gahmj.2014.017.

Vingolo, Enzo Maria; Rocco, Monica; Grenga, PierLuigi; Salvatore, Serena; Pelaia, Paolo (2007): Slowing the degenerative process, long lasting effect of hyperbaric oxygen therapy in retinitis pigmentosa. In: *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246 (1), S. 93–98. DOI: 10.1007/s00417-007-0652-z.

Wahlin, K. J.; Campochiaro, P. A.; Zack, D. J.; Adler, R. (2000): Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Müller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41 (3), S. 927–936.

Wan, Jin; Zheng, Hua; Chen, Zu-Lin; Xiao, Hong-Lei; Shen, Zhen-Jue; Zhou, Guo-Min (2008): Preferential regeneration of photoreceptor from Müller glia after retinal degeneration in adult rat. In: *Vision Research* 48 (2), S. 223–234. DOI: 10.1016/j.visres.2007.11.002.

Wang, Xiaofei; Iannaccone, Alessandro; Jablonski, Monica M. (2005): Contribution of Müller cells toward the regulation of photoreceptor outer segment assembly. In: *Neuron glia biology* 1, S. 1–6. DOI: 10.1017/s1740925x05000049.

Wang, Y.; Huso, D.; Cahill, H.; Ryugo, D.; Nathans, J. (2001): Progressive cerebellar, auditory, and esophageal dysfunction caused by targeted disruption of the frizzled-4 gene. In: *J Neurosci* 21 (13), S. 4761–4771.

Wang, Yanshu; Rattner, Amir; Zhou, Yulian; Williams, John; Smallwood, Philip M.; Nathans, Jeremy (2012): Norrin/Frizzled4 Signaling in Retinal Vascular Development and Blood Brain Barrier Plasticity. In: *Cell* 151 (6), S. 1332–1344. DOI: 10.1016/j.cell.2012.10.042.

Warburg, M. (1971): Norrie's disease. In: *Birth Defects Orig Artic Ser* 7 (3), S. 117–124.

- Warden, Scott M.; Andreoli, Christopher M.; Mukai, Shizuo (2007): The Wnt signaling pathway in familial exudative vitreoretinopathy and Norrie disease. In: *Semin Ophthalmol* 22 (4), S. 211–217. DOI: 10.1080/08820530701745124.
- West, James D.; Marnett, Lawrence J. (2006): Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. In: *Chemical research in toxicology* 19 (2), S. 173–194. DOI: 10.1021/tx050321u.
- Willert, Karl; Brown, Jeffrey D.; Danenberg, Esther; Duncan, Andrew W.; Weissman, Irving L.; Reya, Tannishtha et al. (2003): Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. In: *Nature* 423 (6938), S. 448–452. DOI: 10.1038/nature01611.
- Wright, Alan F.; Chakarova, Christina F.; Abd El-Aziz, Mai M.; Bhattacharya, Shomi S. (2010a): Photoreceptor degeneration. Genetic and mechanistic dissection of a complex trait. In: *Nat Rev Genet* 11 (4), S. 273–284. DOI: 10.1038/nrg2717.
- Wright, Alan F.; Chakarova, Christina F.; Abd El-Aziz, Mai M.; Bhattacharya, Shomi S. (2010b): Photoreceptor degeneration. Genetic and mechanistic dissection of a complex trait. In: *Nat Rev Genet* 11 (4), S. 273–284. DOI: 10.1038/nrg2717.
- Wu, T.-H; Ting, T.D; Okajima, T.-I.L; Pepperberg, D.R; Ho, Y.-K; Ripps, H.; Naash, M.I (1998): Opsin localization and rhodopsin photochemistry in a transgenic mouse model of retinitis pigmentosa. In: *Neuroscience* 87 (3), S. 709–717. DOI: 10.1016/S0306-4522(98)00173-0.
- Wu, Yalin; Fishkin, Nathan E.; Pande, Ajay; Pande, Jayanti; Sparrow, Janet R. (2009): Novel lipofuscin bisretinoids prominent in human retina and in a model of recessive Stargardt disease. In: *J Biol Chem* 284 (30), S. 20155–20166. DOI: 10.1074/jbc.M109.021345.
- Xia, C.-H.; Liu, H.; Cheung, D.; Wang, M.; Cheng, C.; Du, X. et al. (2008): A model for familial exudative vitreoretinopathy caused by LPR5 mutations. In: *Human Molecular Genetics* 17 (11), S. 1605–1612. DOI: 10.1093/hmg/ddn047.
- Xu, Qiang; Wang, Yanshu; Dabdoub, Alain; Smallwood, Philip M.; Williams, John; Woods, Chad et al. (2004): Vascular Development in the Retina and Inner Ear. In: *Cell* 116 (6), S. 883–895. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00216-8.

Xu, Suhong; Cheng, Feng; Liang, Juan; Wu, Wei; Zhang, Jian; Stemple, Derek L. (2012): Maternal xNorrin, a Canonical Wnt Signaling Agonist and TGF- β Antagonist, Controls Early Neuroectoderm Specification in *Xenopus*. In: *PLoS Biol* 10 (3), e1001286. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001286.

Ye, Xin; Smallwood, Philip; Nathans, Jeremy (2011): Expression of the Norrie disease gene (Ndp) in developing and adult mouse eye, ear, and brain. In: *Gene Expression Patterns* 11 (1-2), S. 151–155. DOI: 10.1016/j.gep.2010.10.007.

Ye, Xin; Wang, Yanshu; Cahill, Hugh; Yu, Minzhong; Badea, Tudor C.; Smallwood, Philip M. et al. (2009): Norrin, Frizzled-4, and Lrp5 Signaling in Endothelial Cells Controls a Genetic Program for Retinal Vascularization. In: *Cell* 139 (2), S. 285–298. DOI: 10.1016/j.cell.2009.07.047.

Ye, Xin; Wang, Yanshu; Nathans, Jeremy (2010): The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease. In: *Trends in Molecular Medicine* 16 (9), S. 417–425. DOI: 10.1016/j.molmed.2010.07.003.

Young, R. W. (1967): The renewal of photoreceptor cell outer segments. In: *The Journal of cell biology* 33 (1), S. 61–72.

Zeng, Yi Arial; NUSSE, Roel (2010): Wnt proteins are self-renewal factors for mammary stem cells and promote their long-term expansion in culture. In: *Cell stem cell* 6 (6), S. 568–577. DOI: 10.1016/j.stem.2010.03.020.

8.2 Allgemeines Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| μ | mikro (10 ⁻⁶) |
| °C | Grad Celsius |
| Abb. | Abbildung |
| ad | zu |
| adRP | Autosomal dominant retinopathia pigmentosa |
| AK | Antikörper |
| APC | Adenomatöse Poliposis Coli-Protein |
| arRP | Autosomal recessive retinopathia pigmentosa |
| ASCL-1 | Achaete-scute-homologue-1 |
| β-Trcp | Beta-transducin-repeat-containing-protein |
| BDNF | Brain-derived-neurotrophic-factor |
| BMP2/4 | Bone morphogenic-protein 2/4 |
| bp | Basenpaare |
| BrdU | Bromdesoxyuridine |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CCl2 | CC-chemokine-ligand-2 |
| CHO | Choroidea |
| CK1 | Casein-Kinase-1 |
| CNF | Ciliary-neurotrophic-factor |
| CRALBP | Cellular-retinaldehyde-binding-protein |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid |

| | |
|--------|--|
| DHA | Docosahexaensäure, Omega-3-Fettsäure |
| DKK-1 | Dickkopf-1 |
| DMEM | Dulbecco´s modified eagle medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | 2'-desoxyribonukleotide-5'-triphosphate |
| Dvl | Dishevelled |
| ECM | Extrazelluläre Matrix |
| Edn2 | Endothelin-2 |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | Endothelial-growth-factor |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERG | Elektroretinogramm |
| et al. | et alii/-ae/-a, und andere |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| FEVR | Familiäre exsudative Vitreoretinopathie |
| FGF-2 | Fibroblast-growth-factor-2 |
| Fzd4 | Frizzled-4 |
| g | Gramm |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GCL | Ganglion cell layer |
| GFAP | Glial-fibrillary-acidic-protein |
| GLUL | Glutamat-Ammonium-Ligase |
| Gpx2 | Glutathion-Peroxidase-2 |

| | |
|------------------------|--|
| GS | Glutaminsynthetase |
| GSK3-β | Glycogen-Synthase-Kinase-3-β |
| h | Stunde |
| H ₂ O dest. | Einfach destilliertes Wasser |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase |
| IGF1 | Insuline-like-growth-factor-1 |
| INL | Inner nuclear layer |
| IPL | Inner plexiform layer |
| IRBP | Interstitial retinoid binding protein |
| kDa | kiloDalton |
| l | Liter |
| Ledgf | Lens-epithelium-derived-growth-factor |
| LGR4 | Leucie-rich-repeat-containing-G-protein-coupled-receptor-4 |
| LIF | Leukemia-inhibitory-factor |
| LRP5 | Low density-like related protein 5 |
| m | milli (10 ⁻³) |
| M | Molar |
| MAPK | Mitogen-activated-protein-kinase |
| m-Rho | Fehlgefaltetes Rhodopsin |
| min | Minute |
| mind. | Mindestens |
| mRNA | Messenger Ribunukleinsäure |

| | |
|----------|---|
| MSI2 | Musashi-2 |
| n | Nano (10^{-9}) |
| NDP | Norrie disease pseudoglioma |
| NFL | Nerve fiber layer |
| NGF | Nerve-growth-factor |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| ONL | Outer nuclear layer |
| OPL | Outer plexiform layer |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PAX6 | Paired-box-6 |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PEDF | Pigment-epithelium-derived-factor |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PhP | Phosphatpuffer |
| PHPV | Persistierender hyperplastischer primärer Glaskörper |
| PI3-K | Phosphoinositide-3-kinase |
| PKB | Proteinkinase B (Akt) |
| PKC | Proteinkinase C |
| RAC | Rods and cones |
| rhNorrin | rekombinantes humanes Norrin |
| RGC | Retinale Ganglienzellen |

| | |
|--------------|--|
| Rho | Rhodopsin |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROP | Retinopathy of prematurity |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| RP | Retinopathia pigmentosa |
| RPE | retinales Pigmentepithel |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes |
| SCL | Sclera |
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung |
| TCF/LEF | T-cell-factor/lymphoid-enhancer-factor-Familie |
| TGF- β | Transforming-growth-factor- β |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan |
| TSPAN12 | Tetraspanin-12 |
| TUNEL | TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling |
| UPR | Unfolded protein response |
| VEGF | Vascular-endothelial-growth-factor |
| WIF-1 | Wnt-inhibitory-factor-1 |
| Wnt | Wingless type |
| XLRP | X-linked retinopathia pigmentosa |

8.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Materialien/Geräteliste | 21 |
| Tabelle 2: Reagenzienliste | 24 |
| Tabelle 3: Oligonukleotidprimer | 24 |
| Tabelle 4: Enzyme und Reagenzien-Kits..... | 24 |
| Tabelle 5: Sekundär-/Tertiärantikörper | 25 |
| Tabelle 6: Primärantikörper | 25 |
| Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Gele, Lösungen und Puffer | 26 |
| Tabelle 8: Zusammensetzung Reaktionsansätze (Mastermix) der Genotypisierungs-PCR für Rpe65-Norrin und VPP | 28 |
| Tabelle 9: PCR-Protokoll SV40 für Rpe65-Norrin | 28 |
| Tabelle 10: PCR-Protokoll VPP | 29 |
| Tabelle 11: Pipettierschema zur Neurosphäreninduktion | 33 |
| Tabelle 12: Protokoll zum Entparaffinieren | 39 |
| Tabelle 13: Protokoll der TUNEL-Färbung..... | 42 |
| Tabelle 14: Protokoll der Fluoreszenzfärbungen | 43 |

8.4 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Ophthalmoskopiebefunde..... | 1 |
| Abbildung 2: Übersicht des visuellen Zyklus..... | 4 |
| Abbildung 3: Übersicht Aufbau Retina..... | 6 |
| Abbildung 4: Norrin..... | 8 |
| Abbildung 5: Nicht aktivierter Wnt-Signalweg..... | 12 |
| Abbildung 6: Aktiver Norrin-vermittelter β -Catenin Signalweg..... | 14 |
| Abbildung 7: Müllerzellfärbung..... | 16 |
| Abbildung 8: Neurosphären aus Müllerzellkultur..... | 34 |
| Abbildung 9: Übersicht Vermessung der Retinae..... | 45 |
| Abbildung 10: Sagittalschnitte Retinae Rpe65/VPP, 3 Wochen..... | 49 |
| Abbildung 11: Detailaufnahmen von Semidünnschnitten, 3 Wochen..... | 51 |
| Abbildung 12: Spiderdiagramme der Schichtdicken, 3 Wochen..... | 53 |
| Abbildung 13: Balkendiagramm Apoptose, 3 Wochen..... | 54 |
| Abbildung 14: TUNEL-Analyse, 3 Wochen..... | 54 |
| Abbildung 15: Sagittalschnitte Retinae Rpe65/VPP, 5 Wochen..... | 56 |
| Abbildung 16: Detailaufnahmen von Semidünnschnitten, 5 Wochen..... | 58 |
| Abbildung 17: Spiderdiagramme der Schichtdicken, 5 Wochen..... | 60 |
| Abbildung 18: Balkendiagramm Apoptose, 5 Wochen..... | 61 |
| Abbildung 19: TUNEL-Analyse, 5 Wochen..... | 62 |
| Abbildung 20: Sagittalschnitte Retinae Rpe65/VPP, 8 Wochen..... | 64 |
| Abbildung 21: Detailaufnahmen von Semidünnschnitten, 8 Wochen..... | 66 |
| Abbildung 22: Spiderdiagramme der Schichtdicken, 8 Wochen..... | 68 |
| Abbildung 23: Detailaufnahme der Marginalzone um die Ora serrata..... | 69 |
| Abbildung 24: Auswertung BrdU-positiver Zellen..... | 71 |
| Abbildung 25: Neurosphärenbildung..... | 73 |
| Abbildung 26: Vergleich des kumulativen Neurosphärenvolumens..... | 75 |
| Abbildung 27: Reprogrammierung der Müller-Glia nach Schädigung..... | 84 |
| Abbildung 28: Signalkasakaden bei Reprogrammierung von Müller Glia..... | 86 |

8.5 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich vielmals bei Herrn Prof. Dr. med. Ernst Tamm für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation an seinem Lehrstuhl durchführen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. med. Armin Kurtz danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Herzlichst danke ich PD Dr. med. Andreas Ohlmann für die interessante Fragestellung, die Übernahme des Erstgutachtens und vor allem für die langjährige Unterstützung und ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit. Ohne seine Ideen, sein immer offenes Ohr und seine große Geduld wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Bei den Seelen des Instituts, Margit Schimmel, Elke Stauber, Angelika Pach und Sylvia Babl, möchte ich mich für die Einweisung in die Geheimnisse des Laboralltags und die langjährige Unterstützung in der Histologie, bei Färbungen, am Mikroskop und natürlich für das tägliche Lächeln herzlich bedanken.

Allen Laborkollegen möchte ich für die freundschaftliche Atmosphäre sowohl in, als auch außerhalb des Instituts danken. Besonders möchte ich hier Martin Gallenberger, Leonie Herrnberger, Rosi Seitz, Sabrina Ullmann, Patrick Zadavec, und Ludwig Zeilbeck erwähnen, ohne die der Laboralltag an nicht wenigen Tagen deutlich langweiliger gewesen wäre.

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

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern für Ihre Liebe und die unendliche Geduld und Unterstützung. Danke, dass ihr an mich geglaubt habt!

Danke an meine Frau Leonie, die mir in all den Jahren immer eine seelische Stütze und Antrieb war und ist. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht fertiggestellt worden.

Zuletzt möchte ich meiner Dissertation danken. Ohne sie hätte ich meine bezaubernde Frau und meine süßen Mädels nicht.

8.6 Erklärung

Diese Dissertation wurde angeregt durch PD Dr. med. Andreas Ohlmann, welcher die Ausarbeitung dieser Arbeit ebenfalls überwacht hat.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(C. Eimer)