

Entwicklungsabhängige Expression von regenerationspezifischen Proteinen in der Netzhaut des Affen *Callithrix jacchus* und der Einfluss des ROCK-Inhibitors Y-27632 auf das axonale Wachstum der RGC in Marmosettaffen und Ratten

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Wiese, Kristina
aus
Salzkotten
2011

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Solon Thanos

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Constantin E. Uhlig

Tag der mündlichen Prüfung: 23.12.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Experimentelle Ophthalmologie
Direktor: Univ.- Prof. Dr. Dr. S. Thanos
Referent: Univ.- Prof. Dr. Dr. S. Thanos
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Constantin E. Uhlig

Zusammenfassung

Entwicklungsabhängige Expression von regenerationspezifischen Proteinen in der Netzhaut des Affen *Callithrix jacchus* und der Einfluss des ROCK-Inhibitors Y-27632 auf das axonale Wachstum der RGC in Marmosettaffen und Ratten

Wiese, Kristina

Das adulte zentrale Nervensystem zeigt eine begrenzte spontane Regenerationsfähigkeit nach axonaler Verletzung, die mit Hilfe verschiedener neurotropher Faktoren oder durch Inhibition intrazellulärer Signalwege gesteigert werden kann. In der folgenden Arbeit soll die altersabhängige Expression von regenerations- und degenerationsassoziierten Proteinen in der Retina des Marmosettaffens *Callithrix jacchus* analysiert werden, um mögliche Ansatzpunkte für eine gezielte Beeinflussung des Regenerationsgeschehens zu identifizieren. Dabei wurden immunhistochemisch bekannte regenerationsassoziierte Proteine wie z. B. GAP-43 oder Kristalline untersucht, aber auch die im Rahmen des Morbus Alzheimer erforschten Proteine APP und β -Amyloid in der Primatennetzhaut detektiert. Weitere immunhistochemische Färbungen wurden mit Antikörpern gegen GFAP, $\alpha_5\beta_1$ -Integrin, Brn-3b und Nestin an kryokonservierter Primatenretina verschiedener Altersstadien durchgeführt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde mit Hilfe des etablierten *in vitro*-Regenerationsmodells der Einfluss einer Blockade der intrazellulären Rho-Kinase auf auswachsende Axone von adulten retinalen Ganglienzellen (RGC) der Ratte und postpartalen Ganglienzellen des *Callithrix jacchus* analysiert. Der verwendete ROCK-Inhibitor Y-27632 beeinflusste nicht das Wachstum der adulten RGC der Ratte, aber hatte einen signifikant wachstumsfördernden Effekt auf die postpartalen Primatenzellen hinsichtlich der Anzahl und Länge der auswachsenden Axone. Dieser regenerationsfördernde Einfluss war unabhängig vom Zeitpunkt der Inhibitorzugabe (zu Beginn der *in vitro*-Kultivierung bzw. nach 24h). Damit konnte in der vorliegenden Arbeit ein signifikanter Effekt von Y-27632 auf die Axone der postpartale Primaten-RGC, nicht jedoch auf adulte Zellen der Ratte nachgewiesen werden, welche offenbar zusätzliche Regenerationsstimuli nach einer axonalen Verletzung benötigen.

Tag der mündlichen Prüfung: 23.12.2011

Eidesstattliche Erklärung:

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Entwicklungsabhängige Expression von regenerationsspezifischen Proteinen in der Netzhaut des Affen Callithrix jacchus und der Einfluss des ROCK-Inhibitors Y-27632 auf das axonale Wachstum der RGC in Marmosettaffen und Ratten

im Institut für Experimentelle Ophthalmologie

unter der Anleitung von: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Vorwort.....	1
1.2 ZNS-Regeneration und Ursachen für ihr Regenerationsdefizit.....	1
1.2.1 Inhibitorische Einflüsse der Gliazellen im ZNS	2
1.2.2 Verlust des intrinsischen Regenerationspotentials	4
1.2.3 Mangel an neurotrophen Faktoren	5
1.3 Strategien zur Überwindung des Regenerationsdefizites	6
1.4 Modelle der Regeneration.....	8
1.5 Aufbau und Funktion der Retina	8
1.6 Proteinexpression in der Retina des <i>Callithrix jacchus</i> in verschiedenen Altersstufen.....	9
1.7 Die Rho-Familie und seine Effektoren	13
1.8 ROCK I und II	15
1.9 Ziele der Arbeit.....	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Versuchstiere	20
2.2 Operationen an den adulten Ratten.....	21
2.2.1 Instrumente und Material	21
2.2.2 Narkose, postoperative Wundversorgung und Tötung der operierten Ratte	21
2.2.3 Offene Quetschung (open crush) und Linsenverletzung (lens injury) bei der adulten Ratte.....	22
2.3 Retinale Gewebekultur	23
2.3.1 Materialien, Lösungen und Kulturmedien	23
2.3.2 Geräte und Instrumente	25
2.3.3 Vorbereitung und Anlegen der Retinakulturen	25
2.4 Bestimmung der Anzahl der regenerierenden Axone.....	28
2.5 Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie	29
2.5.1 Material und Geräte.....	29
2.5.2 Immunhistochemie an empfindlichen kultivierten Gewebe.....	31
2.5.3 Immunhistochemie an Kryoschnitten.....	32
2.6 Western Blot	33
2.6.1 Materialien und Lösungen.....	33
2.6.2 Probenverarbeitung	35
2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
2.6.4 Proteintransfer und Immunoblotting	37
2.7 Experimente mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 <i>in vitro</i>	39
2.8 Statistik	39

3	Ergebnisse.....	40
3.1	Expressionsanalyse bestimmter regenerationspezifischer Proteine in der Retina des Affen <i>Callithrix jacchus</i>	40
3.1.1	Die Entwicklung der Retina des <i>Callithrix jacchus</i>	40
3.1.2	GAP-43.....	41
3.1.3	GFAP 43	
3.1.4	$\alpha_5\beta_1$ -Integrin	43
3.1.5	β - und γ -Kristallin	44
3.1.6	Brn-3b 46	
3.1.7	APP und β -Amyloid	46
3.1.8	Nestin 49	
3.1.9	Weitere immunhistochemischen Färbungen	51
3.2	Western Blot Analyse ausgesuchter regenerationspezifischer Proteine in der Retina des Affen <i>Callithrix jacchus</i>	52
3.3	Immunhistochemische Detektion der Proteinkinasen ROCK I und ROCK II in der Retina verschiedener Spezies	53
3.4	Regeneration der Affenretina	54
3.4.1	Statistische Tests zur Auswertung der Axondichte und -länge in den verschiedenen Gruppen	57
3.4.2	Vergleich der Regeneration bei Zugabe von 50 μ Mol und 100 μ Mol Y-27632 nach 24h	62
3.5	Regeneration der Rattenretina	63
3.5.1	Statistische Testung.....	65
4	Diskussion.....	69
4.1	Immunhistochemische Proteindetektion in der Affenretina	69
4.1.1	GAP-43.....	69
4.1.2	GFAP 72	
4.1.3	$\alpha_5\beta_1$ -Integrin	75
4.1.4	β - und γ -Kristalline.....	79
4.1.5	Brn-3b 83	
4.1.6	APP 87	
4.1.7	β -Amyloid	92
4.1.8	Nestin 93	
4.2	Regeneration der RGC in der Ratte und <i>Callithrix jacchus</i>	96
4.3	ROCK-Inhibition	98
4.4	Regenerationsversuche an Ratten- und Primatenretina	101
5	Zusammenfassung	109
6	Literaturverzeichnis	112
7	Danksagung	136
8	Lebenslauf.....	137
	Anhang.....	X

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Retina	9
Abbildung 2: Rho/Rac GTPasen und ihre Aktinwirkung.....	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung der ROCK-Aktivierung	18
Abbildung 4: Offene Quetschung des Sehnervens und Linsenverletzung	23
Abbildung 5: Explantation und Präparation der Retina	28
Abbildung 6: Immunhistochemische Analyse an kryokonservierter Marmosetretina	42
Abbildung 7: Altersabhängige Expression von Brn-3b (A-E), β -Kristallin (F-J) und γ - Kristallin (K-O) in der Retina des <i>Callithrix jacchus</i>	45
Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von APP (A-E), β -Amyloid (F-J) und Nestin (K-O) in der Netzhaut des Marmosetaffens <i>Callithrix jacchus</i>	48
Abbildung 9: Western Blot mit Gewebe von unterschiedlich alter Marmosetretina.	53
Abbildung 10: Die Expression von ROCK I und II in der Retina von Marmosetaffen (A-J), Ratte (L, N) und Mensch (K, M).....	54
Abbildung 11: Regenerierende <i>Callithrix jacchus</i> -Axone.	56
Abbildung 12: Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung der Axonlänge und -dichte	58
Abbildung 13: Boxplot-Diagramm – Axondichte pro mm (Primatenretina)	59
Abbildung 14: Boxplot-Diagramm – Axonlänge > 500 μ m (Primatenretina)	60
Abbildung 15: Boxplot-Diagramm – Axonlänge > 800 μ m (Primatenretina)	61
Abbildung 16: Übersicht eines Explantates adulter Rattenretina mit auswachsenden Axonen (A) und die im Vergleich zu Marmosetretina geringere Dichte der Neuriten (B).	64
Abbildung 17: Boxplot-Diagramm – Axondichte pro mm (Rattenretina)	65
Abbildung 18: Boxplot-Diagramm – Axonlänge > 500 μ m (Rattenretina)	67
Abbildung 19: Boxplot-Diagramm – Axonlänge > 800 μ m (Rattenretina)	68
Abbildung 20: Die Prozessierung von APP durch Sekretasen	89

Abkürzungsverzeichnis

Abk	Abkürzung
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
APP	Amyloid Precursor Protein
Bcl-2	B-Cell lymphoma 2
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
bHLH	basic helix-loop-helix
BS	phosphate-buffered saline
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cAMP	cyclisches Adenosin –Mono-Phosphat
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CRMP2	collapsin response mediator protein 2
CSPG	Chondroitinsulfatproteoglykane
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbeccos modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERM-Proteine	Ezrin/radixin/moesin-Proteine
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GAP	GTPase activating protein
GAP-43	Growth Associated Protein 43
GCL	Ganglienzellschicht (ganglion cell layer)
GDF11	growth differentiation factor 11
GDI	Guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GEF=GDS	Guanine nucleotide exchange factor=Guanine dissociation stimulator
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GTP	Guanosintriphosphat

HBSS	Hank's buffered salt solution
INL	Innere Kernschicht (inner nuclear layer)
IPL	Innere plexiforme Schicht (inner plexiform layer)
kDa	Kilodalton
LI	Linsenverletzung (lens injury)
LIMK	LIM Kinase I und II
M.	Morbus
MAG	Myelin associated glycoprotein
MAP2	microtubule-associated protein 2
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAPK-Kinase	Mitogen-activated-protein-kinase Kinase = MKK=MEK
MBS	Myosin binding subunit of myosin phosphatase
mc	monoklonal
MLC	leichte Myosinketten (myosin light chains)
MLCP	MLC Phosphatase
MSK1	Mitogen and stress-activated protein-kinase 1
NGF	Nerve growth factor
NgR	Nogo-Rezeptor
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4	Neurotrophin-4
OC	Offene Quetschung (open crush)
OMgp	oligodendrocyte myelin glycoprotein
ON	Optic Nerve
ONbL	Outer Neuroblastic Layer
ONL	Äußere Kernschicht (outer nuclear layer)
OPL	Äußere plexiforme Schicht (outer plexiform layer)
PBS	Phosphate Buffered Saline
pc	polyclonal
PDL	Poly-D-Lysin
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Protein-Kinase A
PKC	Protein-Kinase C

PKN	Proteinkinase N
PNS	Peripheres Nervensystem
PR	Photoreceptor
PRK2	protein-kinase C-related protein-kinase
RGC	Retinal Ganglion Cell
RGM	repulsive guidance molecule
RGZ	Retinale Ganglienzelle/n
ROCK	Rho-associated coiled-coil-Kinase
SDS	sodium dodecyl sulfat
STAT	signal transducer and activator of transcription
TBST	tris-buffered saline-Tween
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor α
VEGF	vascular endothelial growth factor
ZNS	Zentrales Nervensystem
μm	Mikrometer = 1000 nm = 10^{-6} m

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Das periphere und zentrale Nervensystem bestehen aus einem komplexen Muster von Verbindungen zwischen Milliarden von Neuronen und den sie unterstützenden Gliazellen. Diese lebenswichtigen Systeme nehmen Informationen aus der Umwelt und dem Organismus wahr, verarbeiten sie und veranlassen stimulusabhängig eine möglichst optimale Reaktion auf die eintretenden Veränderungen. Nach einer Verletzung des ausdifferenzierten zentralen Nervensystems (ZNS) können die verletzten Axone jedoch meist nicht über eine ausreichende Distanz hinweg regenerieren und auch die vom Axon abgetrennten Nervenzellen sind meist nicht in der Lage, neue synaptische Verbindungen zu bilden. Daher führt eine Schädigung der reifen ZNS-Neurone wie z. B. bei einem Hirninfarkt, einer neurodegenerativen Erkrankung oder nach einer traumatischen Verletzung, zu einem irreversiblen partiellen oder totalen Verlust neuronaler Zellen, der mit einer Störung von Bewegung, Perzeption oder Kognition einhergeht. Diese permanenten funktionellen Einbußen stellen eine große soziale und finanzielle Belastung für die Gesellschaft dar, so dass ein enormes wissenschaftliches Interesse an Förderung der Regenerationsfähigkeit zentraler Neurone besteht. In der Forschung verfolgt man derzeit unterschiedliche Ansätze zur Stimulation der zentralen Regenerationsfähigkeit: Einerseits wird versucht, durch Ersatz der zerstörten Zellen und Nervenbahnen mit Hilfe von Stammzellen und peripheren Nerventransplantaten die neurologischen Defizite auszugleichen, andererseits werden die intrazellulären Signalwege nach Verletzung zentraler Neurone bzw. Axone und während ihrer Regeneration analysiert, um daraus therapeutische Interventionsmöglichkeiten abzuleiten. Im Rahmen dieser Arbeit wird zunächst die altersabhängige Expression regenerationsassoziiierter Proteine in der Netzhaut des Marmosettaffen *Callithrix jacchus* untersucht und anschließend mit Hilfe eines Inhibitors der intrazelluläre Rho-anhängige Signalweg während der axonalen Regeneration von Ratten- und Marmosetretina in Hinblick auf eine veränderte Regenerationsleistung analysiert.

1.2 ZNS-Regeneration und Ursachen für ihr Regenerationsdefizit

Während das periphere Nervensystem (PNS) von Vertebraten und das ZNS von Amphibien und Fischen zeitlebens nach einer Verletzung mit einer axonalen Regeneration und funktioneller Restauration reagieren können (Sperry 1944), geht diese Regenerationsfähigkeit im Laufe der postmitotischen Reifungsprozesse im ZNS bei Vertebraten verloren. Cajal begründete 1928 diese fehlende Regeneration adulter zentraler Neurone

nach einer Verletzung der Nervenfasern mit den wachstumshemmenden Einflüssen im ZNS, da dort im Gegensatz zum PNS keine Schwannzellen, sondern Gliazellen - wie die Oligodendrozyten - die myelinisierten Axone umgeben (y Cajal et al. 1991). Erst 1981 konnte dieses Dogma der Nichtregenerierbarkeit zentraler Neurone durch David und Aguayo aufgehoben werden, indem sie sie am Modell der Rückenmarksverletzung bei Ratten ein Vorwachsen der zentralen Axone in ein peripheres Nerven-Transplantat beobachteten (David et al. 1981). In einer wachstumspermissiven Umgebung sind adulte ZNS-Neurone daher grundsätzlich zu einer axonalen Regeneration befähigt, was in nachfolgenden Studien auch für weitere zentrale Regionen wie dem olfaktorischen System (Friedman et al. 1985) oder dem Sehnerven (Vidal-Sanz et al. 1987) bestätigt werden konnte. Diese Experimente lassen daher vermuten, dass zusätzlich zu dem Verlust der intrinsischen Regenerationsfähigkeit postmitotischer ZNS-Neurone auch die inhibitorischen Eigenschaften der glialen Zellen im ZNS eine entscheidende Rolle bei dem zentralen Regenerationsdefizit spielen.

1.2.1 Inhibitorische Einflüsse der Gliazellen im ZNS

Die im Vergleich zum PNS reduzierte spontane Regenerationsfähigkeit adulter ZNS-Neurone ist u. a. in der Ausbildung einer glialen Narbe an der Läsionsstelle und der Anwesenheit inhibitorischer Proteine im Myelin begründet. Zu diesem Myelin-assoziierten Proteinen gehören NogoA, das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) und das Oligodendrozyten Myelin Glykoprotein (OMgp) (McKerracher et al. 1994; Chen et al. 2000; Qiu et al. 2000; Wang et al. 2002; Schwab 2004), die das axonale Wachstum mit Hilfe eines Trimerkomplexrezeptors (bestehend aus dem Nogo-Rezeptor (NgR), Lingo und entweder p75 oder TROY, siehe unten) hemmen. Zusätzlich zu diesen Molekülen werden im adulten ZNS auch weitere Proteine wie Semaphorin 4D und 5A (Moreau-Fauvarque et al. 2003; Goldberg et al. 2004), Ephrin B3 (Benson et al. 2005) und Netrin-1 (Ellezam et al. 2001) in den Oligodendrozyten wieder hochreguliert, welche u. a. das axonale Wachstum durch eine Destabilisierung ihrer Wachstumskegel hemmen. Neben diesem inhibitorischen Einfluss der glialen ZNS-Umgebung spielt aber auch die unzureichende Versorgung der Neurone mit neurotrophen Faktoren eine Rolle bei der unzureichenden Regenerationsleistung (s. u.).

Oligodendrozyten

Im Gegensatz zu dem im PNS von Schwann'schen Zellen gebildeten Myelin, werden die Myelinscheiden im ZNS von Oligodendrozyten produziert und wirken als eine elektrische Isolierung der Axone, welche essentiell für die Weiterleitung der Aktionspo-

tentiale sind. Die Oligodendrozyten besitzen verschiedene, bereits erwähnte und am endoplasmatischen Retikulum gebundene Proteine wie MAG, OMgp und NogoA, die trotz unterschiedlicher Konfiguration an denselben Rezeptor NgR binden. Dieser Rezeptor benötigt für seinen neuritenhemmenden Effekt wiederum Co-Rezeptoren wie LINGO-1 oder p75 bzw. TROY, um eine intrazelluläre Signalkaskade mit nachfolgender Aktivierung der GTPase RhoA zu ermöglichen. Letztlich kommt der inhibierende Effekt dieser Myelin-assoziierten Proteine über einen Rho-Kinase initiierten Kollaps des Wachstumskegels am Ende des auswachsenden Axons zustande (Schwab et al. 1988; Fournier et al. 2001; Shao et al. 2005). Ein Ansatz zur Aufhebung dieser inhibitorischen Signalkaskade bestand in der Entwicklung von anti-NogoA-Antikörpern (Weibel et al. 1994; Cui et al. 2004) oder einer dominant negativen Form des Nogo-Rezeptors in retinalen Ganglienzellen (Fischer et al. 2004), jedoch war der Effekt dieser regenerationsstimulierenden Versuche relativ gering, sodass multifaktorielle inhibitorische Einflüsse vermutet wurden.

Astrozyten

Neben den Oligodendrozyten spielen auch die im ZNS weit verbreiteten, sternförmigen Astrozyten bei einer Verletzung eine große Rolle. Nach einer lokalisierten Aktivierung und Hypertrophie dieser Zellen füllen sie die durch apoptotische Neurone entstandenen Hohlräume narbig aus und stellen durch die so entstandene Gliose eine mechanische Barriere für auswachsende Axone dar (Graeber et al. 1988; Canning et al. 1996). Darüberhinaus werden von den reaktiven Astrozyten auch weitere inhibitorische Moleküle wie Chondroitinsulfatproteoglykane (CSPG) und Tenascin gebildet, die zusätzlich zu der physikalischen Barriere das Axonwachstum hemmen (Fawcett et al. 1999; Asher et al. 2001). Andererseits exprimieren die Astrozyten auch neurotrophe Faktoren, Zytokine und Extrazellulärmatrix (EZM)-Moleküle wie Laminin, welche ein Neuritenwachstum wiederum unterstützen (Silver et al. 2004). Die Astrozyten stellen also nicht nur den im ZNS häufigsten Zelltyp dar, sondern haben auch viele unterschiedliche Funktionen im Regenerationsgeschehen, die im Einzelnen noch weiter erforscht werden müssen.

Mikroglia

Diese kleinen Gliazellen stammen ursprünglich von myeloiden Vorläuferzellen ab, die vor der Entwicklung der Blut-Hirn-Schranke ins Hirnparenchym eingewandert sind (Moore et al. 1996; Santambrogio et al. 2001). Sie sind damit Teil des mononukleär-phagozytären Systems und erfüllen im ZNS Funktionen des zellulären Immunsystems wie die Phagozytose von Fremdkörpern und Zellbestandteilen, Antigenpräsentation und

Eliminierung apoptotischer Zellen. Nach ihrer Aktivierung sammeln sie sich durch amoeboiden Fortbewegung am Läsionsort an, um mit Hilfe von neurotoxischen Substanzen wie Stickstoffmonoxid oder Wasserstoffperoxid beschädigte Nervenzellen zu phagozytieren. Gleichzeitig beeinflussen sie die Immunreaktion der Lymphozyten und Makrophagen über die Sekretion von Zytokinen wie dem Tumornekrosefaktor α (TNF α). Nach Beseitigung der körperfremden oder körpereigenen Zellbestandteile fördern sie schließlich die Astrozytenproliferation und damit die Gliazellenbildung über die Sekretion anderer Zytokine (Interleukin-1, Interferon- γ), um dadurch weitere Immunreaktionen einzuschränken. Auf der anderen Seite können Mikrogliazellen jedoch auch wachstumsfördernde Faktoren wie Nerve growth factor (NGF), Laminin und *Basic fibroblast growth factor* (bFGF) bilden und auf diese Weise die ZNS-Regeneration beeinflussen (Nagata et al. 1993).

Gliose

Von Ramon y Cajal wurde schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts die Ausbildung einer Wundheilungsnarbe nach einer Verletzung des Nervensystems beobachtet (y Cajal et al. 1991). Diese Gliazellenbildung besteht zum Hauptteil aus reaktiven Astrozyten, welche durch eine Überexpression des glialen fibrillären sauren Proteins (GFAP) gekennzeichnet sind. Weiterhin sind an ihr Fibroblasten, Epithelzellen und Mikrogliazellen beteiligt, die zusammen mit den aktivierten Astrozyten die durch eine Läsion entstandenen Hohlräume narbig ausfüllen (Fawcett 1997; Fawcett et al. 1999). Durch die Ausbildung dieser Narbe soll neben dem eigentlichen Wundverschluss auch eine Abkapselung des beschädigten Gewebes von der Umgebung erfolgen, um diese somit vor schädlichen Substanzen wie z. B. Bakterien und Zytokinen zu schützen. Dadurch hat die Bildung einer Gliazellenbildung neben dieser, für die unmittelbare Umgebung protektiven Wirkung, auch den Effekt einer physikalischen und chemischen Barriere, welche eine Regeneration der zentralen Nervenzellen behindert. Allerdings sind an diesem inhibitorischen Effekt auch maßgeblich Moleküle aus den aktivierten Mikrogliazellen (TNF α , Stickstoffmonoxid) und aus den reaktiven Astrozyten (CSPG, Tenascin und CD44) beteiligt (Chen et al. 2000; Asher et al. 2001).

1.2.2 Verlust des intrinsischen Regenerationspotentials

Neben der inhibitorischen Umgebung im ZNS und der glialen Narbe als physikalische Barriere spielt auch die altersabhängige Abnahme der Regenerationsfähigkeit der adulten ZNS-Neurone eine wichtige Rolle bei ihrer unzureichenden axonalen Regeneration. Im Gegensatz zu den Neuronen im PNS oder den zentralen Neuronen bei Fischen und

Amphibien zeigen die adulten ZNS-Neurone der Säugetiere nach ihrer postmitotischen Reifung und Entwicklung eine partielle bis vollständige Abnahme ihres Regenerationspotentials, welches sich in einer veränderten Regulation von intrazellulären Signalwegen und damit der veränderten Expression wachstumsassoziierter Faktoren widerspiegelt. Dagegen weisen ihre embryonalen Neurone noch eine starke Regenerationsfähigkeit auf, die im weiteren postnatalen Verlauf zunehmend abnimmt. So zeigten in Experimenten von Goldberg et al. Axone von embryonalen RGC eine zehnmal höhere Wachstumsrate als in Kulturen mit postnatalen Ganglienzellen (Goldberg et al. 2002), wohingegen adulte ZNS-Neurone selbst in einer wachstumspermissiven Umgebung nur eine geringe Regenerationsrate aufweisen (David et al. 1981; Vidal-Sanz et al. 1987). Eine Reduktion dieser intrinsischen Regenerationsfähigkeit infolge der postnatalen Reifung führt also insgesamt zu einer Vielzahl an neuen Reaktionsmustern im ZNS wie einer veränderten Neuritenregeneration *in vitro* (Mey et al. 1991; Vanselow et al. 1991), einer anderen Affinität zu EZM-Molekülen (Cohen et al. 1986; Hall et al. 1987), einer veränderten Reaktion auf Neurotrophine (Shen et al. 1999) und einer Modifizierung von Zelladhäsionsmolekülen und Rezeptoren (Cohen et al. 1989; Neugebauer et al. 1991).

Dieser postnatale Verlust der Regenerationsfähigkeit ist jedoch partiell reversibel und kann durch geeignete Modulation der Umgebung, von intrazellulären Signalwegen und Genen oder durch extrinsische Faktoren positiv beeinflusst werden. Dabei korreliert die Regeneration einiger Neurone z. B. mit der Expression von wachstumsassozierten Faktoren wie dem growth associated protein-43 (GAP-43) (Meyer et al. 1994; Schaden et al. 1994) oder Bcl-2, dessen Überexpression in tectalen Explantaten zu einer verbesserten Regeneration von adulten RGC führt (Chen et al. 1997). Daneben soll auch die altersabhängige Abnahme den endogenen Gehaltes an cAMP (Cai et al. 2001) neben vielen anderen Faktoren wie dem in dieser Arbeit untersuchten Rho-Kinase-Signalweg einen Einfluss auf das postnatal reduzierte Regenerationspotential der zentralen Neurone haben.

1.2.3 Mangel an neurotrophen Faktoren

Auch ein Mangel an neurotrophen Signalmolekülen, welche die Differenzierung, das Überleben und die Regeneration von Neuronen beeinflussen, soll neben einer wachstumshemmenden Umgebung und einer altersabhängigen Abnahme der intrinsischen Regenerationsfähigkeit die Regeneration adulter Neurone nach einer Läsion limitieren. Zu diesen neurotrophen Faktoren werden der Nerve growth factor (NGF), Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4 (NT-4) gezählt, welche an transmembranäre Tyrosinkinaserzeptoren binden und anschlie-

ßend intrazelluläre Signalwege aktivieren. Diese neurotrophen Faktoren werden in den axonalen Zielgebieten der Neurone gebildet und über den retrograden, axonalen Transport zu den Zellsomata transportiert (Oppenheim 1991). Nach einer Axotomie kommt es jedoch durch die Unterbrechung dieser Zellwege zu einem Mangel an neurotrophen Faktoren, sodass ein retrograder, vorwiegend apoptotischer Zelltod der Nervenzellen eintritt. Dieser verzögerte, retrograde Zelltod ist dabei von der Art der Verletzung, der Entfernung der Läsionsstelle vom Zellsoma und dem Alter des Tieres abhängig (Mey et al. 1993; Berkelaar et al. 1994).

Auch retinale Ganglienzellen exprimieren verschiedene Rezeptoren für neurotrophe Faktoren, jedoch induzieren diese nach exogener Applikation nur eine moderat gesteigerte axonale Regeneration bzw. eine reduzierte Degeneration der neuronalen Zellen sowohl *in vitro*, als auch *in vivo*-Experimenten (Mey et al. 1993; Peinado-Ramon et al. 1996). Dabei haben sich besonders BDNF und CNTF als effektive neurotrophe Wachstumsfaktoren mit unterschiedlichen Wirkungen auf das Überleben und die Regeneration der RGC herausgestellt (Cui et al. 1999; Leaver et al. 2006; Pernet et al. 2006). Dieses in Experimenten beobachtete limitierte Ansprechen der verletzten Zellen auf verschiedene neurotrophe Faktoren wurde einerseits mit einer verminderten Expression der Rezeptoren für neurotrophe Faktoren nach einer Verletzung begründet (Cui et al. 2002; Miotke et al. 2007), andererseits scheint auch die Bioverfügbarkeit dieser Faktoren nach intravitraler Applikation einen limitierenden Grund dazustellen (Leaver et al. 2006; Lingor et al. 2008). Insgesamt scheinen jedoch nicht einzelne neurotrophe Faktoren, sondern ihr synergistisches Zusammenspiel und ihre Kombination mit cAMP die axonale Regeneration im adulten ZNS zu fördern (Lu et al. 2004; Logan et al. 2006).

1.3 Strategien zur Überwindung des Regenerationsdefizites

Die Ganglienzellen in der Retina zeigen als typische Projektionsneurone nach einer Verletzung ihrer Axone zwar ein geringes Aussprossen, jedoch keine axonale Regeneration über längere Distanzen und daher auch keine Reinnervation ihres ursprünglichen Zielgebietes. Stattdessen erfolgt ein retrograder, axonaler Degenerationsprozess, an dessen Ende weniger als 10% der RGC regenerierende Axone aufweisen (Berkelaar et al. 1994; Fischer et al. 2000; Berry et al. 2008). Daher wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Experimente zur Stimulation der axonalen Regeneration durchgeführt.

Das bei adulten RGC infolge postmitotischer Reifungsvorgänge reduzierte intrinsische Regenerationspotential ist partiell reversibel und wird u. a. durch die direkte neuronale Umgebung beeinflusst. Durch die Transplantation eines peripheren Nervenendes (z. B.

Ischiasnerv) an den axotomierten Sehnerven kann diese wachstumsinhibitorische Umgebung überbrückt werden, so dass eine axonale Regeneration über mehrere Millimeter in das periphere Nerventransplantat hinein erfolgen kann (So et al. 1985; Watanabe et al. 1991; Heiduschka et al. 2000). Weiterhin können auf diesem Weg sogar funktionelle Synapsen ausgebildet werden, welche eine Erholung des Pupillenreflexes, eine Ableitung visuell evozierter Potentiale aus dem Cortex und eine einfach visuelle Perzeption ermöglichen (Thanos et al. 1997).

Eine weitere Strategie zur Reduktion der RGC-Apoptose nach Axotomie besteht in der intravitrealen Applikation von neurotrophen Wachstumsfaktoren (z. B. CNTF oder BDNF) oder anderen trophischen Faktoren, welche der Erhöhung des endogenen cAMP-Gehaltes dienen (Monsul et al. 2004; Leaver et al. 2006; Logan et al. 2006). Durch Kombination dieser beiden Methoden kann die axonale Regeneration *in vivo* und *in vitro* sogar noch gesteigert werden (Cui et al. 1999; Cui et al. 2003). Ein weiterer Faktor, welcher auch die Regeneration fördern kann, wurde in dem von Makrophagen sezernierten Protein Oncomodulin gefunden, das neben cAMP einer der Hauptmediatoren der durch Linsenverletzung induzierten Inflammation sein soll (Yin et al. 2006). Oncomodulin kann in Anwesenheit von Mannose und Forskolin (welches den cAMP-Gehalt der Zellen erhöht) *in vitro* ein stärkeres neuronales Auswachsen als alle bisher bekannten neurotrophen Faktoren bewirken (Benowitz et al. 2008) und zeigt auch *in vivo* in Abhängigkeit von cAMP eine ausgeprägte axonale Regeneration nach Quetschung des adulten Sehnervens (Yin et al. 2006).

Neben diesen wachstumsfördernden Faktoren kann auch ein Inflammationsprozess infolge einer Linsenverletzung mit nachfolgender Aktivierung von Makrophagen die axonale Regeneration fördern (Leon et al. 2000; Fischer et al. 2001). Die neuritogenen und neuroprotektiven Effekte sind dabei auf die Freisetzung intralentaler Faktoren wie z. B. der Kristalline und auf die Auslösung einer intraokulären Entzündung mit Leukozyteninfiltration der Retina zurückzuführen. Durch die Linsenverletzung und die nachfolgenden Prozesse können adulte RGC in einen aktiven Regenerationszustand versetzt werden, so dass bis zu 40% der Ganglienzellen 14 Tage nach der Nervenquetschung überleben und ihre Axone in den zuvor gequetschten Nerven einwachsen.

Neben vielen weiteren Strategien wie der Modifizierung der Expression von regenerationsassoziierten und anti-apoptischen Genen oder der Implantation von Reparaturzellen kann auch die wachstumsinhibitorische Umgebung im ZNS zur Stimulation des axonalen Auswachsens beeinflusst werden. Wie bereits erwähnt beeinflussen verschiedene myelin-assoziierte und nicht-myelin-assoziierte Proteine über einen Rho-GTPase-

abhängigen intrazellulären Signalweg das axonale Wachstum und die Regeneration, indem sie den Kollaps der axonalen Wachstumskegel induzieren. Über eine Blockade dieses intrazellulären Signalweges durch den in dieser Arbeit verwendeten ROCK-Inhibitor Y-27632 soll die Hemmung der axonalen Regeneration partiell aufgehoben werden (siehe unten).

1.4 Modelle der Regeneration

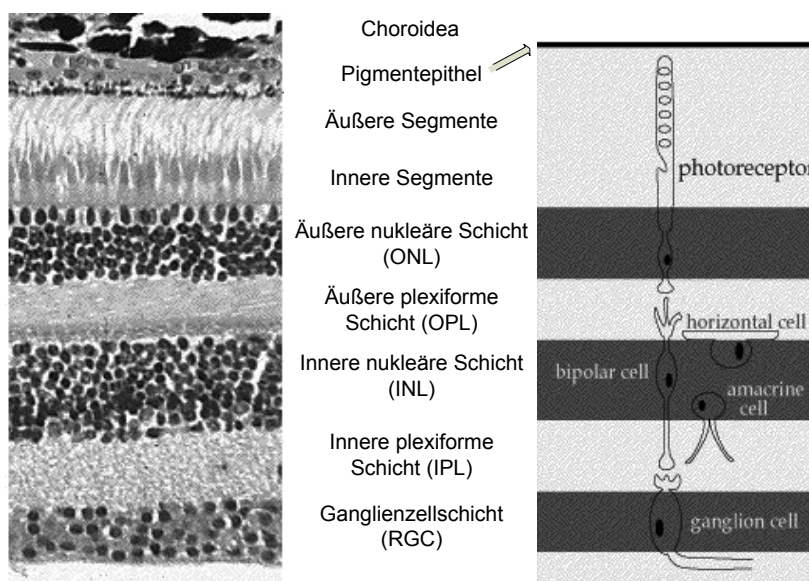
Die Retina und die Ganglienzellaxone bieten als zentralnervöses Gewebe mit einem geschichteten Aufbau und typischen ZNS-Eigenschaften wie myelinisierten Nervenfasern ein gutes Modell zur Analyse neuronaler Regeneration bei Marmosetten und bei Ratten. Durch geeignete Stimulation können auch adulte Neurone eine verstärkte Regenerationsleistung zeigen, indem einige Tage vor Explantation der Retina eine konditionierende Quetschung des Sehnervens sowie eine Verletzung der Augenlinse vorgenommen werden (Ford-Holevinski et al. 1986; Bähr et al. 1988; Fischer et al. 2000; Leon et al. 2000). Dadurch kann ein reproduzierbares und starkes Axonwachstum bei der adulten Rattenretina induziert werden, jedoch müssen dabei auch Seiteneffekte dieser kombinierten Vorbehandlung, wie z. B. eine intraokulare Entzündung mit Aktivierung des Immunsystems oder eine Aktivierung der intraretinalen Gliazellen auch in Betracht gezogen werden (Fischer et al. 2000; Leon et al. 2000; Yin et al. 2003).

Im Gegensatz zur adulten Rattenretina zeigen die Ganglienzellen des Marmosetten *Callithrix jacchus* eine spontane, starke Regeneration ohne konditionierende Vorbehandlung. Dadurch können sowohl interagierende Seiteneffekte, als auch durch die Verwendung von Kadaveraugen zusätzliche Tierversuche vermieden werden. In dieser Arbeit soll mit Hilfe des Inhibitors Y-27632 ein intrazellulärer, Rho-Kinase abhängiger Signalweg blockiert und die dadurch veränderte Regenerationsleistung adulter RGC der Ratte und postpartaler Retina des Marmosetten analysiert werden.

1.5 Aufbau und Funktion der Retina

Als vorgelagerter Teil des Gehirns ist das Auge ein experimentell leicht zugängliches Organ, an welchem die typischen Eigenschaften und das Regenerationsvermögen neuronaler Zellen untersucht werden können. Die Retina ist als geschichtetes Organ der lichtwahrnehmende Teil des Auges, in dem die optischen Signale in elektrische Impulse umgewandelt, anschließend bereits integrativ verarbeitet und schließlich über den Nervus opticus zu weiteren visuellen Verarbeitungszentren im Gehirn wie dem Colliculus superior oder dem Corpus geniculatum weitergeleitet werden. Anhand einer

Grafik (siehe Abbildung 1) soll die Anatomie der Retina im Folgenden kurz vorgestellt werden, da sie in dieser Arbeit als Regenerationsmodell zentraler Neurone fungiert.



Quelle: in Anlehnung an (Weedman Molavi 1997).

Abbildung 1: Aufbau der Retina

Licht tritt zunächst durch die inneren retinalen Schichten hindurch und wird schließlich in den Außensegmenten der Photorezeptoren in ein neuronales Signal umgewandelt. Der bei diesem Prozess benötigte Sehfärbstoff Rhodopsin wird von dem retinalen Pigmentepithel aufgenommen und dort metabolisiert. Das elektrische Signal wird über die Bipolarzellen in der inneren nuklearen Schicht zu den retinalen Ganglienzellen in der äußeren nuklearen Schicht geleitet, welche als typische Projektionsneurone die gebündelten Axone des N. opticus ausbilden. Schon innerhalb der Retina erfolgt eine Modulation der elektrischen Signale durch Horizontalzellen und amakrine Zellen, die als inhibitorische Interneurone v. a. der Kontrastverstärkung der visuellen Signale dienen. Darüberhinaus befinden sich in der inneren nukleären Schicht die Zellkörper der Müllerzellen, deren Fortsätze sich durch die gesamte Retina spannen. Diese Müllerzellen sind spezialisierte Gliazellen, die zahlreiche Funktionen erfüllen, welcher ansonsten im Gehirn von den Astrozyten übernommen werden.

1.6 Proteinexpression in der Retina des *Callithrix jacchus* in verschiedenen Altersstufen

Anhand von kryokonservierter Affenretina unterschiedlichen Alters wurde die Expression von verschiedenen regenerationsassoziierten Proteinen im Verlauf der Alterung nachgewiesen. Dabei wurden fünf verschiedene Altersstufen des Affen *Callithrix jacchus* verwendet: fetales, postpartales Gewebe und Retina im Alter von 4 Wochen, 22 Wochen und 4.5 Jahre.

GAP-43

Das Growth Associated Protein 43 (GAP-43) ist ein intrazelluläres Phosphoprotein, das sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden kann und eine bedeutende Rolle beim Auswachsen der Axone, ihrer Lenkung und bei der Entwicklung der neuronalen Plastizität spielt (Benowitz et al. 1997). In der Retina wird das Protein je nach Alter und Spezies in verschiedenen Schichten exprimiert und kann durch externe Stimuli wie z. B. Ischämie oder Axotomie auch beim adulten Tier erneut hochreguliert werden (Doster et al. 1991; Meyer et al. 1994; Dijk et al. 2007). Neben anderen Proteinen spielt GAP-43 bei der axonalen Regeneration eine zentrale Rolle, da seine verminderte Expression nach der Reifung neuronaler Zellen mit der Abnahme des Regenerationspotentials im adulten ZNS in Verbindung gebracht wird (Benowitz 1997). Es steht daher mitunter im Zentrum des Interesses bei der Suche nach Möglichkeiten einer verbesserten neuronalen Regeneration im ZNS.

GFAP

Das Glial Fibrillary Acid Protein gehört zu den Intermediärfilamenten, die im Zytoplasma von Gliazellen im ZNS vorkommen. In der Retina kann es in den Astrozyten und Müller-Zellen nachgewiesen werden, wo seine verstärkte Expression das typische Kennzeichen nach Stress oder Verletzung des ZNS darstellt. Studien zeigen aber auch eine erhöhte Bildung von GFAP bei hereditärer Degeneration, nach Insult, bei altersbedingter Makuladegeneration oder nach intravitrealer Injektion von bestimmten neurotrophischen oder Wachstumsfaktoren (Lewis et al. 2003). Die genaue Funktion des GFAP ist bislang noch nicht vollständig geklärt, aber es spielt eine Rolle bei der Kontrolle der Zellform und der Beweglichkeit der Astrozyten sowie bei der Interaktion zwischen Astrozyten und Neuronen im ZNS.

$\alpha_5\beta_1$ -Integrin

Integrine sind transmembranöse Zellproteine, die als Rezeptoren für verschiedene extrazelluläre Matrixproteine fungieren und damit vielfältige Funktionen wie Zellproliferation, -migration oder -differenzierung beeinflussen. $\alpha_5\beta_1$ und sein Ligand Fibronectin können in vielen Geweben wie auch der Retina nachgewiesen werden, wo sie hauptsächlich in den Blutgefäßwänden exprimiert werden (Brem et al. 1994). Brem und seine Kollegen vermuteten daher, dass sie durch diese Omnipräsenz in Gefäßen eine Rolle bei der Lenkung von Lymphozyten, Monozyten, Thrombozyten und Blutgerinnungsfaktoren in die Retina spielen. In diesem Zusammenhang könnten die Integrine bei immunologischen Erkrankungen wie z. B. Chorioretinitis und sympathische Ophthalmie von

Bedeutung sein. Andere Studien beweisen eine Korrelation mit verschiedenen retinalen Erkrankungen wie der diabetischen Mikroangiopathie oder der proliferativen Vitreoretinopathie (Roth et al. 1993; Robbins et al. 1994), aber auch einen Zusammenhang mit physiologischem Gefäßwachstum (Yang et al. 1993; Francis et al. 2002; Milner et al. 2002) oder auch pathologischen Gefäßen in Tumoren (Kim et al. 2000). Im Allgemeinen sind Integrine in eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen involviert, weswegen ihre Lokalisation und Expression in der Retina des *Callithrix jacchus* in dieser Arbeit diskutiert werden wird.

β- und γ-Kristallin

Kristalline sind Strukturproteine der Linse, die aber auch in geringerem Ausmaß in der Retina exprimiert werden (Xi et al. 2003; Andley 2007). Als stabile, kalziumionenbindende Proteine und wegen ihrer Ähnlichkeit zu mikrobiellen Stressproteinen (Jaenicke et al. 2001) wird ihnen eine zellprotektive Funktion zugesprochen. So konnte ihre vermehrte Expression bei retinalem Stress durch starke Lichtexposition (Jones et al. 1999; Sakaguchi et al. 2003), durch Ischämie-Reperfusionen (Yoshimura et al. 2003) oder nach Verletzungen (Vázquez-Chona et al. 2004) nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten aktuelle Studien einen das Axonwachstum *in vitro* und *in vivo* fördernden Einfluss zeigen (Liedtke et al. 2007; Fischer et al. 2008), so dass eine Assoziation der Kristalline bei neurodegenerativen Erkrankungen und ZNS-Verletzungen angenommen werden kann.

Brn-3b

Die intrazellulären Brn-3 POU-Domän-Transkriptionsfaktoren spielen in Vertebraten eine bedeutende Rolle während der Differenzierung und dem Überleben von Neuronen in der Retina, im Innenohr und den Spinal- und Trigeminalganglien (Gan et al. 1996; Xiang et al. 1996; Xiang 1998). Dabei weisen die einzelnen Subtypen zwar eine hohe strukturelle Ähnlichkeit besonders im Bereich ihrer DNA-Bindungsstelle auf, aber durch gezielte Gendeletionsversuche der einzelnen Faktoren konnten sehr unterschiedliche Funktionen für Brn-3a, 3b und 3c nachgewiesen werden. Besonders die Brn-3b knockout Experimente an Mäusen haben bewiesen, dass dieser Faktor sowohl für das Wachstum, die Wegfindung und die Bündelung von Axonen, als auch für die terminale Differenzierung und das Überleben der RGC erforderlich ist (Erkman et al. 1996; Gan et al. 1999). Aber auch für die weiteren Brn-3-Subtypen konnten in den letzten Jahren zunehmend Funktionen in der Retina identifiziert werden, obwohl sie hauptsächlich eine Rolle bei der Differenzierung von sensorischen und somatomotorischen Neuronen

im Rückenmark und im Innenohr spielen. Dennoch scheint Brn-3a die dendritische Stratifizierung in der IPL beeinflussen zu können (Badea et al. 2009) und Brn-3c kann zum einen in Abwesenheit von Brn-3b das Axonwachstum fördern, zum anderen hat es aber auch eine eigenständige Rolle bei der Ausbildung von ipsilateralen Projektionen im Chiasma opticum (Wang et al. 2002). Trotz dieser neuen Erkenntnisse spielt v. a. Brn-3b eine herausragende Rolle in der Entwicklung und Differenzierung der Retina, da dessen Verlust zur Apoptose von 60-80 % der RGC, zur Disorganisation von Axonen in der Retina und in der Sehbahn, zur Beeinträchtigung des optokinetischen Reflexes und der licht-abhängigen Pupillenreaktion und damit zu einer Verhaltensveränderung der Tiere führt (Badea et al. 2009).

APP und β -Amyloid

Das transmembranöse Glykoprotein APP und sein Spaltungsprodukt β -Amyloid sind besonders aus der Forschung der neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer bekannt, da die extrazelluläre Ablagerung des A β in senilen Plaques neben Neurofibrillen eines der wichtigsten pathophysiologischen Kennzeichen dieser Erkrankung darstellt (Wisniewski et al. 1989). Seinem Vorläuferprotein APP wird aber nicht nur im Zusammenhang mit M. Alzheimer besondere Bedeutung zuteil, sondern auch seine verstärkte Expression während der neuronalen Differenzierung, nach ZNS-Verletzung oder während der Bildung der Synapsen (Thinakaran et al. 2008) sind Anlass für weitere Forschung auf diesem Gebiet. In der Retina dagegen spielen APP und das von ihm abgespaltene β -Amyloid eine Rolle bei der altersbedingten Makuladegeneration, dem Glaukom oder auch während des physiologischen Alterungsprozesses, so dass ihre altersabhängige Expression in der Retina des *Callithrix jacchus* in dieser Arbeit untersucht werden soll.

Nestin

Das Intermediärfilament Nestin gehört zu den Bestandteilen des Zytoskeletts, die der Stabilität von Zellen dienen. Es wird besonders im Zytoplasma von multipotenten Stammzellen und neuroglialen Vorläuferzellen im ZNS von Vertebraten exprimiert, so dass es als deren Marker fungieren kann (Lendahl et al. 1990; Chen et al. 2002). Aber auch in der Retina wird das Intermediärfilament altersabhängig in Neuronen und Müllergliazellen gebildet, wobei allerdings zwischen verschiedenen Vertebraten starke Expressionsunterschiede bestehen (Mayer et al. 2003; Xue et al. 2006). Daher soll in dieser Arbeit die altersabhängige Synthese von Nestin in der Primatenretina analysiert und mit anderen Vertebraten verglichen werden.

1.7 Die Rho-Familie und seine Effektoren

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde anhand des Regenerationsmodelles der Affen- und Rattenretina der Einfluss einer Blockade von ROCK - des Effektors der kleinen GTPase RhoA - auf das Auswachsen von Neuriten *in vitro* analysiert. Dadurch soll das eingangs beschriebene Regenerationsdefizit von adulten ZNS-Neuronen auf der Ebene eines intrazellulären Signalweges beeinflusst werden.

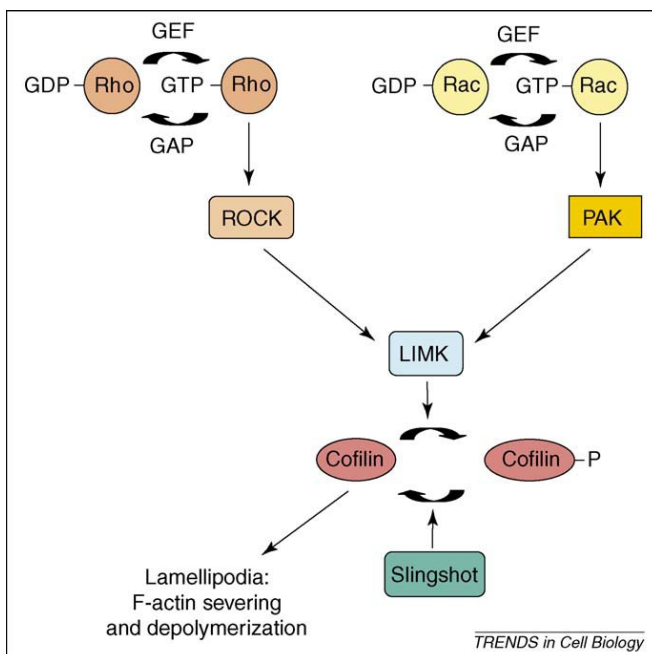
Rho-GTPasen

Die kleinen GTPasen der Rho-Familie kommen in allen Säugetieren, aber auch in anderen Lebewesen wie Amphibien und Hefen vor. Dabei regulieren sie durch ihre Auswirkung auf das Aktinzytoskelett und die Mikrotubuli eine Vielzahl an physiologischen Prozessen wie die Zellmotilität, Zellproliferation und -migration oder auch die Apoptose. Die 22 Rho-GTPasen der Mammalia können in acht Subfamilien unterteilt werden (Aspenström et al. 2004), wobei RhoA, Rac und Cdc42 bei der Analyse der neuronalen Regeneration die wichtigsten Rollen spielen. RhoA ist v. a. an der Formierung von Stressfasern und fokalen Adhäsionskontakten beteiligt, während Rac für die Ausbildung von Lamellipodien und Cdc42 für die von Filopodien mitverantwortlich sind. Strukturell weisen die 20-40 kDa kleinen GTPasen eine hohe Homologie von ca. 30 % interfamiliär und > 50% intrafamiliär auf (Takai et al. 2001).

Wie andere GTPasen kommen auch diese in zwei verschiedenen Aktivitätszuständen, der aktiven GTP-gebundenen und der inaktiven GDP-gebundenen Form vor (siehe Abbildung 2). Nach Austausch von GDP durch GTP kommt es zu einer Konformitätsänderung, so dass GTP-gebundenes Rho an seine nachgeschalteten Effektoren binden kann. Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) sind dabei Aktivatoren dieser nachgeschalteten Signalwege, da sie den Austausch von GDP gegen GTP katalysieren, wohingegen die GTPase activating proteins (GAPs) die intrinsische GTPase-Aktivität stimulieren, so dass eine Hydrolyse des GTP zu GDP und somit ihre Inaktivierung erfolgt. Eine dritte Gruppe der Regulatoren, die guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDIs), bilden einen Komplex mit den Rho-GTPasen und verhindern die Lösung des GDP vom Protein. Darüberhinaus sind sie für den Transfer der GTPasen von der Zellmembran zum Zytosol verantwortlich, wo diese in der inaktiven, GDP-gebundenen Form vorliegen. Diese drei Regulatoren sind in weitaus höherer Anzahl als die einzelnen Rho-GTPasen in der Zelle vorhanden, so dass deren Aktivität je nach Stimulus sehr fein reguliert werden kann (Schmandke et al. 2007).

Effektoren

In der aktiven, GTP-gebundenen Form haben die GTPasen eine Vielzahl an nachgeschalteten Effektoren wie z. B. die Rho-Kinasen ROCK I und II, Proteinkinase N (PKN), Citronkinase und viele andere, zum Teil noch wenig erforschte Kinasen und Strukturproteine. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt dabei auf den Rho-Kinasen, welche nur durch GTP-gebundenes RhoA, aber nicht durch Rac oder Cdc42 aktiviert werden. Allerdings entsteht aufgrund der vielen regulatorischen Querverbindungen zwischen den Rho-Signalwegen das Problem, die unterschiedlichen Funktionen den einzelnen Kinasen zuzuordnen, da nach Aktivierung von verschiedenen GTPasen ähnliche Effekte erzeugt werden können. So kann z. B. LIMK (LIM Kinase I und II), ein nachgeschaltete Effektor von ROCK, auch durch die Serin/Threoninkinase PAK nach dessen Aktivierung durch die GTPase Rac aktiviert werden. Dadurch kann die Phosphorylierung von LIMK und die nachfolgende Inaktivierung von Cofilin sowohl nach Aktivierung von Rho als auch von Rac erfolgen, so dass die Zuordnung einzelner Effekte nicht immer auf eine einzelne Kinase zurückführbar ist (Ridley 2006).



Quelle: (Ridley 2006).

Abbildung 2: Rho/Rac GTPasen und ihre Aktinwirkung

Die Aktivierung der Rho-GTPase erfolgt über eine GTP-Bindung, während durch eine intrinsische GTPase vermittelte Hydrolyse des GTP zu GDP eine Inaktivierung der Rho-Kinase erfolgt. An diesem Prozess sind auch Guaninnukleotid austauschfaktoren und GTPase aktivierende Proteine beteiligt. Sowohl GTP-gebundenes Rho, als auch aktiviertes Rac können über ROCK I oder II bzw. über die PAK Serin/Threonin Kinase LIMKs phosphorylieren und damit aktivieren. Durch die nachfolgende Inaktivierung von Cofilin kommt es zu einer Formveränderung von F-Aktin in Lamellipodien.

1.8 ROCK I und II

Die seit den 1990er Jahren bekannten Rho-Kinasen I und II, welche durch GTP-gebundenes RhoA aktiviert werden, phosphorylieren verschiedene Zielproteine, die Einfluss auf das Zytoskelett und damit auch auf das Wachstum von Neuriten haben. Strukturell sind ROCK Serin/Threonin-Kinasen, welche in zwei Isoformen unterteilt werden: ROCK I (ROK β) und ROCK II (ROK α) weisen eine hohe sequentielle Ähnlichkeit von ca. 65 % in ihrer allgemeinen Aminosäurenstruktur und von 92 % in ihrer Kinasedomäne auf (Riento et al. 2003). Die Kinasedomäne befindet sich am N-terminalen Ende des Moleküls, während sich die Rho-Bindungssequenz am C-terminalen Abschnitt des Mittelteils, der für dieses Protein typischen coiled-coil-Domäne befindet.

Trotz der sehr ähnlichen Struktur der beiden ROCK-Isoformen unterscheiden sie sich in ihrer Verteilung und daher auch in ihren Funktionen *in vivo* (Yoneda et al. 2005). Dabei wird ROCK II hauptsächlich im Gehirn wie z. B. im Hippocampus und im Kleinhirn (Hashimoto et al. 1999) und ROCK I vorwiegend in nicht-neuronalen Geweben wie dem Herz, der Lunge oder dem Skelettmuskel gebildet (Leung et al. 1996). Innerhalb der Zelle weisen aber beide Isoformen eine ähnliche Verteilung auf: Der Hauptanteil befindet sich im Zytosol, aber nach Bindung von aktiviertem RhoA kann es auch in der Zellmembran oder in der Zellperipherie von auswachsenden Zellen beobachtet werden.

Regulation

Die Aktivierung der beiden ROCK-Isoformen erfolgt zum einen nach Bindung von GTP-gebundenen RhoA an die entsprechende Rho-Bindungsstelle in der coiled-coil-Domäne, zum anderen aber auch unabhängig von Rho durch verschiedene Lipide wie Arachidonsäure oder durch Sphingosylphosphorylcholine. Darüberhinaus kann die Aktivität von ROCK auch durch verschiedene Mechanismen inhibiert werden: entweder durch eine autoinhibitorische Domäne, die durch Bindung an die N-terminale Kinase-Region deren Aktivität hemmen kann, oder durch andere kleine GTP-bindende Proteine wie Gem oder Rad (Ward et al. 2002; Schmandke et al. 2007). Neben diesen Regulatormöglichkeiten kann ROCK I während der Apoptose auch noch durch Caspase-3 aktiviert werden, indem die autoinhibitorische Domäne proteolytisch abgespalten wird und somit zu gesteigerter ROCK I-Aktivität führt.

Substrate und Funktionen

ROCKs phosphorylieren viele verschiedene Substrate, aber die leichten Myosinketten (MLC) und die MLC Phosphatase (MLCP) gehören zu ihren hauptsächlichen Zielproteinen durch welche sie die Anordnung des Zytoskeletts beeinflussen können. Durch die Phosphorylierung der MLC kommt es zu einer gesteigerten Aktin-Myosin-Kontraktilität in nicht-muskulären Zellen. Darüberhinaus kann ROCK auch indirekt die Menge der phosphorylierten MLC durch die Hemmung der MLC Phosphatase erhöhen und dadurch die Zellkontraktilität und die Formation von Stressfasern und fokalen Adhäsionskontakten steigern.

Weitere wichtige Zielproteine der ROCKs stellen die LIM Kinasen 1 und 2 (LIMK 1 und 2) dar, die auch bei der Aktinfilamentdynamik mitwirken. Durch die Phosphorylierung der LIMKs wird der durch Cofilin vermittelte Abbau der Aktinfilamente gehemmt, wodurch die Anzahl der bestehenden Aktinfilamente ansteigt. Allerdings können die LIM Kinasen auch durch andere GTPasen wie Cdc42 oder Rac mittels einer anderen Effektor kinase aktiviert werden, so dass dieser Effekt nicht für die ROCKs spezifisch ist.

Darüberhinaus existieren weitere nachgeschaltete Effektoren der ROCKs wie z. B. die ERM-Proteine (Ezrin/radixin/moesin), CRMP2 (collapsin response mediator protein 2), MAP2 (microtubule-associated protein 2) oder Adducin, die auch an der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind, aber in dieser Arbeit nicht im Vordergrund stehen (Riento et al. 2003; Mueller et al. 2005; Schmandke et al. 2007).

Über diese Vielzahl an Zielproteinen regulieren ROCKs die Kontraktilität von nicht-muskulären Zellen und den Aufbau des Aktinzytoskeletts und können somit unterschiedliche physiologische Prozesse wie die Zellproliferation und -migration, aber auch die Zellmotilität und die Ausbildung von Wachstumskegeln beeinflussen. Neuere Studien weisen dabei trotz hoher sequentieller Homologie auf unterschiedliche Funktionen der beiden ROCK-Isoformen hin. So soll eher ROCK I für die Ausbildung von Stressfasern verantwortlich sein, während ROCK II eine wichtige Rolle bei der Regulation von Mikrofilamenten spielt (Yoneda et al. 2005).

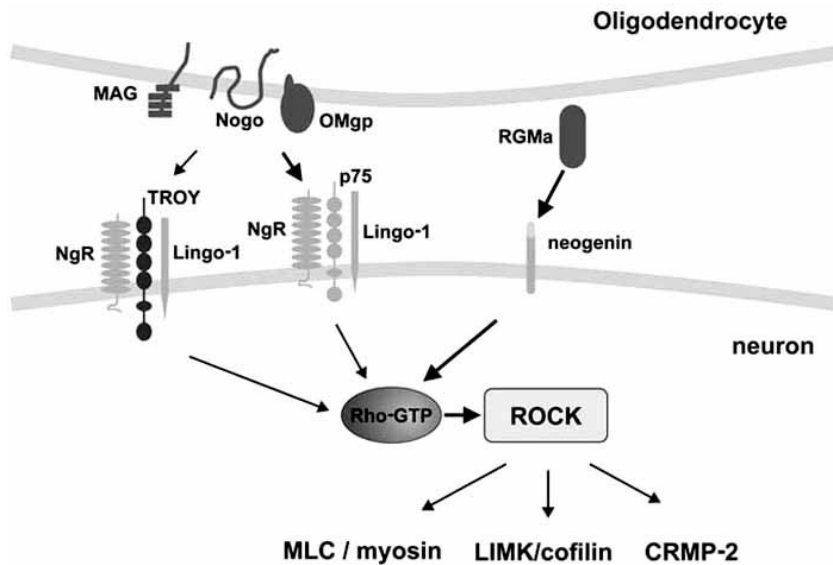
Klinische Relevanz der Rho-Kinasen

Aufgrund der hohen Relevanz der Rho-Kinasen bei der Regulation des Aktinzytoskeletts wurde eine Hemmung dieses Signalweges auch klinisch erprobt. Der ROCK-Inhibitor Fasudil wird in Japan klinisch bei der Therapie von zerebralen

Vasospasmen nach Subarachnoidalblutung eingesetzt, aber auch bei der Therapie der stabilen Angina pectoris oder der pulmonalen Hypertonie hat er sich wegen seiner gefäßtonusrelaxierenden Wirkung in Studien als potentielltes Medikament erwiesen. Darüberhinaus wird seine Wirkung auch bei anderen Erkrankungen wie bei Verletzungen des Rückenmarks, M. Alzheimer, Multiple Sklerose oder bei neuropathischen Schmerzen weiter erforscht (Mueller et al. 2005).

ROCKs im ZNS

Wie eingangs erläutert besteht im ZNS von Säugetieren ein Regenerationsdefizit von adulten Neuronen, so dass eine spontane Regeneration von Axonen über eine längere Distanz nach ihrer Verletzung ausbleibt. Dieses Regenerationsdefizit wird auf verschiedene Faktoren zurückgeführt wie dem Fehlen neurotropher Faktoren oder der Ausbildung einer physikalischen Barriere in Form einer glialen Narbe. Aber auch die Anwesenheit von inhibitorischen Molekülen aus Myelin und aus dem Narbengewebe verhindert ein spontanes, über längere Distanzen anhaltendes Wachstum der Axone (McKerracher et al. 2002; David et al. 2003). Diese das Wachstum inhibierenden Proteine binden an Rezeptoren auf den Neuronen und ihren Wachstumskegeln, aktivieren so die intrazellulären Rho-GTPasen und führen dadurch u. a. zu der nachfolgenden Aktivierung der Rho-Kinasen. Es kommt daraufhin zu einer Veränderung der Aktinpolymerisation und -depolymerisationsdynamik, die zu einem Rückzug des Wachstumskegels (growth cone collapse) und zu einer allgemeinen Hemmung des Wachstums führt (Jalink et al. 1994; Lehmann et al. 1999). Dieser Mechanismus wird in Abbildung 3 verdeutlicht: die aus dem Myelin stammenden Proteine wie z. B. Nogo, Myelin associated glycoprotein (MAG) oder oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) und verschiedene Moleküle aus dem Narbengewebe wie Chondroitinsulfatproteoglykane (CSPG), Semaphorine und Ephrine verhindern eine spontane Regeneration von adulten Neuronen im ZNS. Nach Bindung von Nogo, MAG oder OMgp an einen gemeinsamen Trimerkomplexrezeptor, der aus einzelnen, nacheinander entdeckten Rezeptoren wie Nogo-66a (NgR), p75 Rezeptor für Neurotrophine (p75^{NTR}) bzw. TROY und Lingo-1 besteht, kommt es zu einer Aktivierung der intrazellulären Signalwege und damit zu einer Phosphorylierung der ROCKs (Kubo et al. 2007). Zusätzlich kann auch ein weiterer Neuriteninhibitor in den Oligodendrozyten, RGM (repulsive guidance molecule) den Rho-ROCK-Signalweg über einen weiteren Rezeptor namens Neogenin (auch bekannt als Netrin-1-Rezeptor) aktivieren.



Quelle: (Kubo et al. 2007).

Abbildung 3: Schematische Darstellung der ROCK-Aktivierung

Die auf Oligodendrozyten exprimierten und wachstumshemmenden Proteine MAG, Nogo und OMgp binden an den gleichen Rezeptor NgR. Ein Trimerkomplex dieses Rezeptors aus NgR, p75NTR bzw. TROY und Lingo-1 vermittelt die inhibitorischen Signale von MAG, Nogo und OMgp zu den Neuronen, indem Rho-GTPasen und ROCKs aktiviert werden. Zusätzlich kann dieser intrazelluläre Signalweg auch über einen weiteren Neuriteninhibitor auf Oligodendrozyten namens RGMa über einen anderen Rezeptor aktiviert werden. Die durch ROCK induzierte Regulation nachgeschalteter Effektoren wie MLC, LIMK und CRMP-2 führt schließlich zu einer Inhibition des Neuritenwachstums.

Dadurch dass viele unterschiedliche inhibitorischen Proteine über den gleichen Rezeptorkomplex denselben intrazellulären Signalweg auslösen können, stellt der Rho-ROCK-Signalweg ein potentielltes Angriffsziel für die Aufhebung dieser inhibitorischen Myelinwirkung dar. *In vitro* induziert die Aktivierung dieses Signalweges die Retraktion von auswachsenden Neuriten und einen Rückzug der Wachstumskegel (Yamashita et al. 2002), weswegen verschiedene Methoden der Inhibition dieses Signalweges erforscht werden. Durch Hemmung des Rho-Signalweges durch C3-Transferase, welche Rho ribosyliert und inaktiviert (Lehmann et al. 1999), durch dominant-negatives Rho (N19TRho) (Lehmann et al. 1999) oder durch den ROCK-Inhibitor Y-27632 (Ishizaki et al. 2000) konnten bisher gute Erfolge im Sinne einer Aufhebung der Inhibition auf das Auswachsen von Neuriten erzielt werden. Der Effekt des spezifischen ROCK-Inhibitors Y-27632 auf auswachsende Axone soll in der vorliegenden Arbeit anhand von adulten

Retinakulturen der Ratte und postnatalen Retinakulturen des Primaten *Callithrix jacchus* näher untersucht werden.

1.9 Ziele der Arbeit

Für diese Arbeit wurden zunächst immunhistochemische Färbungen von retinalem Gewebe unterschiedlich alter Marmosettaffen angefertigt und anschließend die Regenerationsleistung von adulten RGC der Ratte und von postpartalen RGC des Marmosetten nach Inhibition eines intrazellulären, wachstumsrelevanten Signalweges analysiert.

Es sollten folgende Aspekte der Regeneration analysiert werden:

- Identifizierung von ausgewählten regenerationsassoziierten Proteinen in der Retina des Affen *Callithrix jacchus* und ihre altersabhängige Expression in fetalem, postnatalem, juvenilem und adultem Gewebe. Einordnung dieser Ergebnisse in die aus der Literatur bekannten Expressionsmuster und Funktionen der untersuchten Proteine sowie Vergleich dieser Proteinexpression in Primaten mit anderen Mammalia.
- Expression der Proteinkinasen ROCK I und ROCK II in der Retina der unterschiedlichen Spezies Ratte, Marmosettaffe und Mensch.
- Semiquantitative Analyse einiger ausgewählter Proteine mit Hilfe des Western Blots in der Retina des *Callithrix jacchus* im Altersverlauf.
- Einfluß des ROCK-Inhibitors Y-27632 (Calbiochem) auf auswachsende Axone der postpartalen Affenretina und auf die vorbehandelte Rattenretina. Dabei sollte die Dichte und Länge der auswachsenden Axone in den beiden verschiedenen Tiermodellen und mit zwei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen analysiert werden. Es sollten neue Erkenntnisse über Art und Ausmaß der neuronalen Regeneration nach Blockade des intrazellulären, Rho-Kinaseabhängigen Signalweges gewonnen werden
- Vergleich der Auswirkung einer ROCK-Inhibition *in vitro* mit Ergebnissen aus anderen *in vivo* und *in vitro* Modellen

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Affen:

Die Weißbüschelaffen *Callithrix jacchus* werden vom Institut für Reproduktionsmedizin in Familienverbänden mit 2-10 Tieren gehalten und gezüchtet (Haltungsgenehmigung-Nummer G67/01). Die Tiere werden in klimatisierten Großraumkäfigen (24°C, 50-55 % relative Luftfeuchtigkeit) mit artgerechten 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Fütterung erfolgt zweimal täglich mit einer Standarddiät (Affen Altromin 0633, Altromin GmbH, Lage), einer Spezialnahrung und Leitungswasser *ad libitum*.

Die Tötung der Tiere erfolgte bei den für diese Versuche verwendeten neugeborenen Affen durch Dekapitation.

Für die nachfolgenden Versuche wurden uns freundlicherweise 5 Affenkadaver von neugeborenen Tieren aus dem Institut für Reproduktionsmedizin zur Verfügung gestellt. Die Augen wurden auf Eis gelagert und möglichst schnell präpariert.

Marmosetaffen wie der hier verwendete Weißbüschelaffe haben bezüglich der Haltung und der experimentellen Versuche zahlreiche Vorteile. Sie sind klein, leicht zu händeln und bilden stabile monogame Zuchtpartnerschaften, wobei die Zucht im Gegensatz zu Makkakenaffen das ganze Jahr möglich ist. Der *Callithrix jacchus* hat eine Trächtigkeitsdauer von 144 Tagen, kann zwei Schwangerschaften pro Jahr austragen und bekommt häufig Zwillinge oder sogar Drillinge.

Ratten:

Als Versuchstiere dienten weibliche und männliche Albinoratten vom Stamm Sprague-Dawley (*Rattus Norvegicus*) mit einem Gewicht von 180-250g, die von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen oder im Tierstall des Universitätsklinikums Münster gezüchtet wurden.

Die Ratten wurden paarweise in Standardkäfigen (Makrolonkäfig) bei Raumtemperatur (18-20 °C) unter einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten und mit einer Standarddiät (Altromin GmbH, Lage) und Leitungswasser *ad libitum* ernährt.

Die Versuche wurden mit Genehmigung des Regierungspräsidiums (s. Anhang) und unter der Verantwortung von Prof. Dr. Dr. Thanos durchgeführt und entsprechend der Tierschutzgesetze (gemäß § 9a (1)) protokolliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Regenerationsversuche insgesamt 13 Ratten benötigt.

2.2 Operationen an den adulten Ratten

Die Operationen an den adulten Ratten wurden nach vorheriger gewichtsadaptierter Anästhesie und nach Feststellung der Schmerzfreiheit durchgeführt.

2.2.1 Instrumente und Material

Die für die Operationen verwendeten Instrumente (feine Pinzetten, Dumontpinzetten Nr. 4 und 5, chirurgische Pinzetten, Kapsulotomie-, Vannas- und Präparationsscheren, Faden- und Skalpellhalter mit Klingen, Knochenzange) stammen von den Firmen Dumont & Fils (Schweiz) und Hermle (Tuttlingen).

Die Operationen wurden mit Hilfe des Zeiss Operationsmikroskops (OMI 19-FC) bei 4-16 facher Vergrößerung durchgeführt.

2.2.2 Narkose, postoperative Wundversorgung und Tötung der operierten Ratte

Nach dem Wiegen der Tiere wurde eine intraperitoneale Anästhesie mit 2mg Xylazin (Xylazin 2%, Sanofi) und 12,5mg Ketamin (Ketanest 10%, Sanofi) pro 100g Körpergewicht durchgeführt. Das Narkosestadium, das ca. 1,5 Stunden anhielt, wurde durch das Erlischen des Lidreflexes und des Zehenreflexes sichergestellt. Danach wurde die Kopfhaut der Ratte großflächig rasiert und das Operationsgebiet mit einem Handstaubsauger erst grob gereinigt und anschließend noch mit Desinfektionsmittel behandelt.

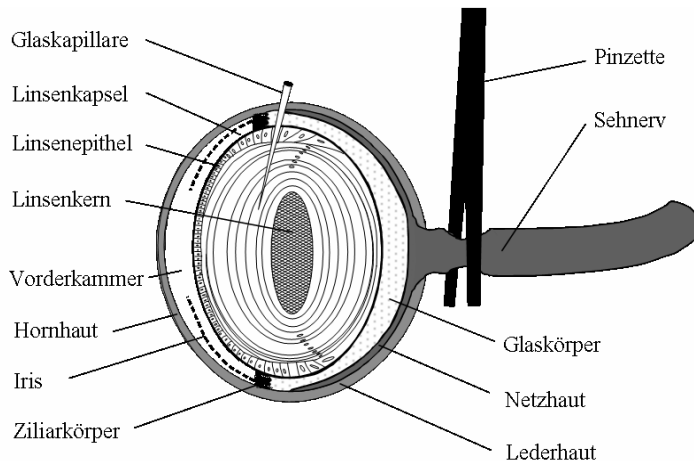
Postoperativ wurde auf die Wunde und Hornhaut eine antibiotische Salbe (Gentamytrex, Dr. Mann Pharma) zur Prophylaxe von Wundinfektionen aufgetragen. Weiterhin wurde das Tier allein in einen neuen Makrolonkäfig mit frischem Streu gesetzt. In den folgenden Tagen erfolgte eine optische Kontrolle der Wundnähte und des Vitalzustandes des operierten Tieres.

Die Tötung der Ratten erfolgte in einer CO₂-Atmosphäre mit anschließendem manuellem Genickbruch.

2.2.3 Offene Quetschung (open crush) und Linsenverletzung (lens injury) bei der adulten Ratte

Die Quetschung des Sehnervens und die nachfolgende Verletzung der Linse erfolgte drei Tage vor der Explantation des Gewebes für das Regenerationsmodell *in vitro*, um den das Neuritenwachstum stimulierenden Effekt dieser Nervenverletzung zu nutzen (Bähr et al. 1988; Fischer et al. 2000). Die Operation erfolgte stets am linken Auge der Ratte, um eine beidseitige Erblindung zu vermeiden.

Zunächst wurde das Tier mit Hilfe einer Maulklemme und Klebeband (Gewebeband, Hartmann) auf dem Operationstisch fixiert. Danach erfolgte mit dem Skalpell ein 1,5cm langer Sagittalschnitt in der Medianlinie des Stirnbeins. Die gelöste Kopfhaut wurde nach lateral geschwungen und mit Hilfe eines chirurgischen Fadens (4.0, Ethicon) und Gewebepandes am Tisch befestigt. Nachfolgend wurde am Orbitarand entlang des Os frontale die bindegewebige Faszia vorsichtig unter Schonung der Blutgefäße durchtrennt und damit ein Zugang zur Orbitahöhle geschaffen. Es erfolgte nun eine Partialresektion des orbitalen Fettgewebes und der Tränendrüse zur besseren Sicht in den Retrobulbärraum. Außerdem wurden kleine extraorbitale Muskeln durchtrennt, um mit Hilfe von Haltefäden an deren Ansätzen den Bulbus aus der Orbitahöhle zu drehen bis der N. opticus sichtbar wurde. Nach Freilegung des Sehnervens wurde das ihn umgebende Perineum längs mit einer Schere aufgeschnitten und der freie N. opticus anschließend ca. 1 cm hinter seinem Eintritt in den Bulbus für 10 sec. mit einer Uhrmacherpinzette gequetscht (open crush). Danach blieb eine sichtbare Läsionsstelle am Sehnerven zurück. Besonders wichtig war bei diesem letzten Schritt der Erhalt der retinalen Gefäßversorgung, da die Art. centralis retinae in den Meningen des Sehnervs verläuft. Die Überprüfung der intakten retinalen Blutversorgung erfolgte funduskopisch im Anschluß an die Operation durch eine Applanation der Cornea. Dabei wurde die Hornhaut mit einem Augengel (Vidisic Gel, Dr. Mann Pharma) benetzt und der Fundus retinae durch einen Objektträger auf der Cornea hindurch betrachtet. Bei einer guten Perfusion der retinalen Gefäße konnte eine Verletzung der Zentralarterie ausgeschlossen werden.



Quelle: (Fischer et al., 2001).

Abbildung 4: Offene Quetschung des Sehnervens und Linsenverletzung

Zur Verstärkung der axonalen Regeneration *in vitro* wurde nach der Quetschung des N. opticus zusätzlich die Linse verletzt (siehe Abbildung 4) und so eine traumatische Katarakt induziert (Fischer et al. 2000). Zunächst wurde die Vorderkammer mit Hilfe einer Glaskapillare punktiert, welche zuvor mit einem Elektrodenpuller (Narishige, Japan) aus Glaskapillaren (50 μ l Einmalkapillaren, Brand, Wertheim) gezogen wurde. Dabei wurden ca. 3 μ l Kammerwasser über einen kleinen Schlauch mit einem Mundstück entfernt, um den intraokulären Druck zu senken. Anschließend wurde der posteriore Anteil der Linse transskleral punktiert und die Kapillare dabei mehrmals um die eigene Achse gedreht, um den Einstichkanal zu vergrößern. Danach wurde entsprechend der Menge an entnommenen Kammerwasser PBS (Phosphate Buffered Saline) injiziert, welches die Auflösung der Linse fördert (Fischer 2000). Der Einstichkanal und die in den folgenden Tagen entstandene traumatische Katarakt zeigten die erfolgreiche Linsenverletzung.

2.3 Retinale Gewebekultur

Zunächst werden die Materialien und Lösungen, anschließend die Explantation und Präparation der Retina für die Kultivierung beschrieben.

2.3.1 Materialien, Lösungen und Kulturmedien

S4- Medium

Die Firma Promocell produziert dieses serumfreie Medium auf der Basis von DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) als „Astrocyte Microglia Growth Medium Cus-

tomer Formulation“ (Needham et al. 1987). Nach Zugabe der drei separat gelieferten Komponenten BSA + Fettsäuren, Insulin und Choleratoxin setzt sich das Medium wie folgt zusammen:

Substrat	Konzentration	Substrat	Konzentration
Glucose	3,50 g/l	MoO3	0,14 µg/l
Hepes	3,57 g/l	ZnSO4 x H2O	0,29 µg/l
Insulin	5 mg/l	Aminosäuren:	
Choleratoxin	0,01 mg/l	L-Alanin	3,6 mg/l
Putreszin	8 mg/l	L-Asparagin	4,0 mg/l
Na2SeO3	4,3 µg/l	L-Asparaginsäure	4,0 mg/l
BSA, Fettsäuren:		L-Glutaminsäure	4,3 mg/l
Rinderserumalbumin	792 mg/l	L-Prolin	8,0 mg/l
Linolsäure	1,51 mg/l	Vitamine:	
Linolensäure	1,00 mg/l	Vitamin C	1 mg/l
Spurenelemente:		MgCl2 x 6 H2O	40 mg/l
CrCl3 x 6 H2O	0,27 µg/l	Biotin	0,024 mg/l
CuSO4 x 5 H2O	0,25 µg/l	DL- α -Liponsäure	0,12 mg/l
MnSO4	0,15 µg/l	Vitamin B12	1,35 mg/l

Hank's Buffered Salt Solution, pH 7,5 (HBSS, Gibco):

Substrat	Konzentration	Substrat	Konzentration
NaCl	8000 mg/l	Glucose	1000 mg/l
KCl	400 mg/l	NaHCO3	350 mg/l
KH2PO4	60 mg/l	Phenolrot	10 mg/l
Na2HPO4	48 mg/l		

Substrate zum Beschichten der Kulturschalen:

Substrat	Firma
Poly-D-Lysin (200 – 400 kDa)	Sigma
Laminin-1	Roche

Phosphat-Buffered Saline (PBS), Gibco:

Substrat	Konzentration
NaCl	9 g

Na ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	1,42 g
KH ₂ PO ₄	0,27 g
Aqua destillata	ad 1000 ml

Verbrauchsmaterial:

Nitrozellulosefilter (Sartorius): schwarz, Durchmesser 50 mm, Porengröße 0,45 µm

Filterpapier (Whatman): weiß und steril

Petripermschalen (Vivascience): hydrophil, Durchmesser 60 mm, steril

Petrischalen (Greiner): steril, Durchmesser 35 mm

2.3.2 Geräte und Instrumente

Geräte

Axiovert 135 (Zeiss): inverses Mikroskop mit Kamera und der dazugehörigen Software Axio Vision Release 4.7

Brutschrank: BB 6060 (Heraeus), Gaszufuhr von O₂ (55%) und CO₂ (5%), Temperatur 37°C

Gewebehacker: McIlwain Tissue Chopper (Mickle Laboratory Engineering, USA)

Kaltlichtquelle (Schott): KL 1500 electronic

Präparations-Stereomikroskop (Zeiss): STEMI-SR

Sterilbank (Biohit-Helios)

Präparationsbesteck

Feine Pinzetten, Löffelchen, Skalpellhalter, Kapsulotomieschere (Hermle, Tuttlingen) spitze und runde Skalpellklingen (Nr. 10, Nr. 11) (Feather)

2.3.3 Vorbereitung und Anlegen der Retinakulturen

Beschichtung der Petripermschalen

Für dieses Regenerationsmodell wurden die Kulturen in Petripermschalen angelegt, deren dünner gaspermeabler Membranboden einen guten Gasaustausch des retinalen Gewebes nach unten erlaubte (Halfter et al. 1984) und somit die kontinuierliche Beobachtung der auswachsenden Neuriten mit einem inversen Mikroskop ermöglichte.

Nach Letourneau (Letourneau 1979) hat sich als Substrat eine natürliche polykationische Oberfläche für das Neuritenwachstum als günstig erwiesen. Laminin-1 (aus Maus-Engelbreth-Holm-Swarm Sarkom, Roche) erfüllt diese Ansprüche und ist bisher damit das beste Wachstumssubstrat für retinale Axone (Smalheiser et al. 1984; Ford-Holevinski et al. 1986; Bähr et al. 1988).

Das große extrazelluläre Glykoprotein Laminin besteht jeweils aus einer α -, β - und γ -Polypeptidkette, welche über Disulfidbrücken verbunden sind und eine kreuzförmige Struktur bilden (Timpl et al. 1979). Es stellt die Hauptkomponente der nicht-kollagenen Glykoproteine der Basalmembran dar und ist darüberhinaus an vielen Zell-Zell-Interaktionen wie z. B. Adhäsion, Migration oder Proliferation beteiligt.

Das Glykoprotein Laminin-1 kann durch die kombinierte Anwendung mit Poly-D-Lysin die ansonsten nur mäßige Adhäsion des retinalen Gewebes an Laminin verbessern und somit die Anzahl der auswachsenden Axone der RGC erhöhen. Poly-D-Lysin (Sigma) ist ein weißer kristalliner Feststoff, der an vielen Materialien wie z. B. Plastik oder Glas haften kann und dadurch die Haftung der retinalen Zellen an die Kulturgefäße fördert.

Die gasdurchlässigen Petripermschalen wurden unter sterilen Bedingungen zunächst mit 1,5 μ l Poly-D-Lysin in HBSS (entspricht 15 μ g/cm²) vollständig bedeckt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung der Flüssigkeit wurden die Petripermschalen dreimalig mit HBSS gewaschen und anschließend jeweils mit 1,5 μ l Laminin-1 in HBSS (entspricht 1,5 μ g/cm²) gefüllt. Diese Schälchen wurden erneut bei 37°C für mind. 3 Stunden inkubiert und die Lösung erst unmittelbar vor Explantation der Retina entfernt.

Explantation, Präparation und Kultivierung

Das zuvor operierte linke Auge wurde mit einer gebogenen Präparationsschere enukleiert und sofort in ein Gefäß mit eiskaltem, sauerstoffgesättigtem HBSS gegeben. Die nachfolgende Präparation musste unter sterilen Bedingungen innerhalb von 30 min erfolgen, damit die Zellen möglichst kurz der Sauerstoff- und Nährstoffunterbrechung ausgesetzt waren.

Folgende zuvor durchgeführten Arbeitsschritte unterstützten eine schnelle Präparation:

- Dünne Whatmanfilterpapiere wurden zuvor geschnitten, autoklaviert und im Trockenschrank bei 90°C getrocknet
- Eiskalte HBSS-Lösung wurde mind. 10 min in einem Falcon-Tube oxygeniert bis es eine violette Farbe annahm und danach auf Eis gekühlt

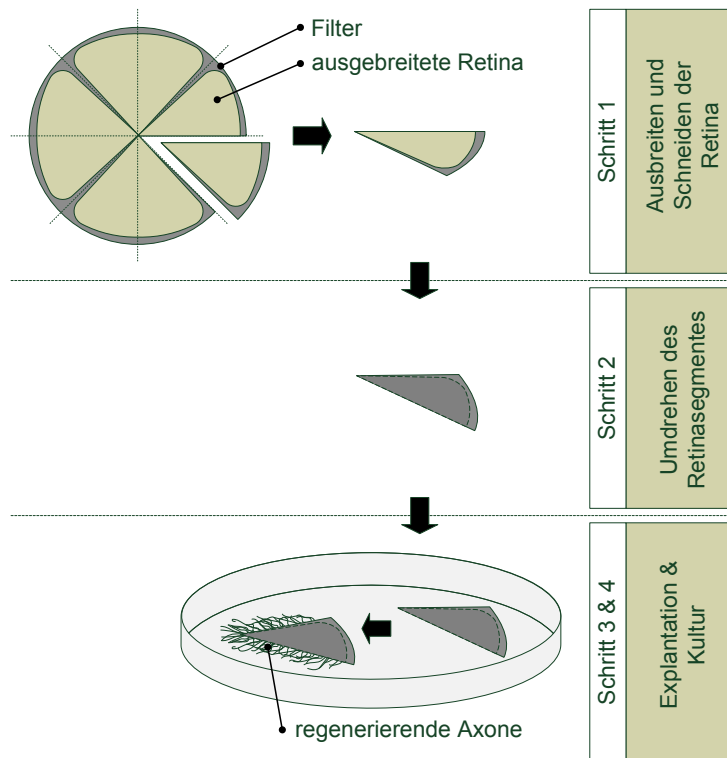
- Das Präparationsbesteck und die abnehmbaren Teile des Gewebhackers wurden mind. 15 min mit 70%igem Ethanol desinfiziert

Die Präparation des operierten Ratten- oder des Affenauges erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank mit einem Präparationsmikroskop bei 8-20facher Vergrößerung.

Zunächst wurde das Auge kurz mit Iod (Povidon-Iod, Betaisadona®) desinfiziert, um eine Kontamination mit Bakterien und Pilzen zu verhindern und vereinzelte Tierhaare noch zu entfernen. Bei den nachfolgenden Schritten wurde stets darauf geachtet, dass sich das Auge in steriler, sauerstoffgesättigter, eiskalter HBSS-Lösung befand. Nach Entfernung der Bindehautreste wurde mit einem spitzen Skalpell das Auge äquatorial eröffnet und mit Hilfe einer Kapsulotomieschere der vordere Teil des Bulbus (Cornea, Iris und Linse) kreisförmig abgetrennt. Nach Übertragung des hinteren Bulbusanteils in eine frische HBSS-Schale wurde dieser durch vier Papillen-zentrierte Einschnitte in vier kleeblattartige Quadranten unterteilt, so dass eine flächige Ausbreitung der Retina auf einem Nitrozellulosefilter ermöglicht wurde. Die Retina konnte mit Hilfe von zwei feinen Pinzetten und einem postpapillären Schnitt von der darunterliegenden Sklera gelöst werden, so dass sie anschließend mit der retinalen Ganglienzellschicht nach oben zeigend auf dem Filter ausgebreitet werden konnte.

Der Filter wurde auf einem Whatmanfilterpapier leicht angetrocknet, wodurch zum Einen die Retina besser auf dem darunterliegenden Filter fixiert wurde und zum Anderem der transparente, gelartige Glaskörper besser abgelöst werden konnte. Zurück in einer neuen Schale mit HBSS-Lösung wurden die überstehenden Filterränder mit einem Skalpell abgetrennt und dann die einzelnen keilförmigen Retina-Filter-Stücke auf die mit HBSS angefeuchtete Arbeitsplattform des Gewebhackers gelegt. Dieser teilte die Retina mitsamt dem Filter in acht (Ratte) bzw. zwölf (Affe) papillenzentrierte Sektoren, welche anschließend mit der RGC-Schicht nach unten in die vorbereiteten Petripermschalen (siehe Abbildung 5) gelegt wurden. Die einzelnen Sektoren wurden vorsichtig peripher angedrückt und leicht angetrocknet, damit sie sich nicht sofort lösten, als ein Tropfen des vorgewärmten Kulturmediums (S4-Medium) hinzugeben wurde. Nach zweistündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde in jede Petripermschale weitere 3ml S4-Medium gegeben, welches als serumfreies Kulturmedi-

um unerwünschtes Fibroblastenwachstum verhindern kann (Needham et al. 1987). Außerdem verhinderte ein Antibiotikum, das zuvor dem S4-Medium (10.000 Einheiten Penicillin/Streptomycin, Sigma) hinzugegeben wurde, eine Kontamination der Kultur mit Bakterien im Brutschrank. Die weitere *in vitro* Kultivierung der RGC erfolgte konstant bei 37°C, einem Sauerstoffpartialdruck von 55%, einem CO₂-Partialdruck von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100%.



Quelle: Eigene Darstellung.

Abbildung 5: Explantation und Präparation der Retina

2.4 Bestimmung der Anzahl der regenerierenden Axone

Nach einer Kultivierungszeit von 72h wurden in den retinalen Explantaten des Affen *Callithrix jacchus* und der zuvor operierten Ratte die *in vitro* auswachsenden Axone mit Hilfe eines inversen Mikroskops (Axiovert 35) bei 200facher Vergrößerung fotografiert und anschließend am Computer mit Hilfe des Programmes Axio Vision 4.7 (Zeiss) gezählt. Für die Analyse der Axondichte wurden nur die Axone gewertet, die über eine imaginäre Linie mit 200µm Abstand vom Filter hinausgewachsen sind. Dabei wurde sowohl eine Doppelzählung von zurückwachsenden Axonen, als auch die Unterschätzung von den in Faszikeln wachsenden Axonen möglichst vermieden. Darüberhinaus

wurden Explantate, deren Haftung an den Petripermschalen unzureichend war, von der Analyse ausgeschlossen. Für die Bewertung der Axonlänge wurde die Anzahl der Neuriten bei in einem Abstand von 500µm und 800µm vom Filterranda gezählt. Die so gezählten Axone wurden für die Berechnung des arithmetischen Mittels und der Standardabweichung der Versuchsgruppen herangezogen.

2.5 Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie

Die Immunhistochemie kann in einem Gewebe mit Hilfe von Antikörpern Proteine oder andere Epitope als Antigen-Antikörper-Reaktion nachweisen. Der Primäantikörper bindet spezifisch das gesuchte Epitop, während sich der fluoreszenzmarkierte Sekundäantikörper wiederum spezifisch an den Primäantikörper anlagert und so den Komplex aus Antikörpern und dem gesuchten Protein unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar macht.

2.5.1 Material und Geräte

Blockierungslösung:

Fötale Kälberserum 10%	Seromed
------------------------	---------

Einbettungsmedium für Kryostatschnitte

Tissue-Tek	Sakura
------------	--------

Fixierlösung

Paraformaldehyd (PFA)	40g
-----------------------	-----

PBS	ad 1000ml
-----	-----------

Die Suspension wird unter Erwärmen bis zur Lösung des Feststoffes gerührt und danach lichtgeschützt gelagert.

Eindeckelmedium

Mowiol 4-88	Hoechst
-------------	---------

Geräte

Kryostat 2800 Frigocut E	Reichert-Jung
--------------------------	---------------

Mikroskop, Axiophot mit Epifluoreszenz	Zeiss
Fluoreszenzfilter 395 – 440nm	Zeiss
450 – 490nm	
510 – 560nm	
AxioCam HRc - Kamera,	Zeiss
Quecksilberhochdrucklampe HBO 100 W	Zeiss
Axiovision 3.0 Programm	Zeiss

Beschichtete Objektträger

Nach Reinigung der Objektträger (Engelbrecht, Edermünde) mit absolutem Alkohol wurden diese mit frisch filtrierter Beschichtungslösung (0,5% Gelatine (Sigma) und 0,05% $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck)) behandelt und anschließend in staubfreier Umgebung luftgetrocknet.

Erstantikörper (alle IgG)

Anti-GFAP (mc, mouse)	Verdünnung 1:500	Sigma
Anti-Rhodopsin (mc, mouse)	Verdünnung 1:100	Chemicon International
Anti-GAP-43 (mc, mouse)	Verdünnung 1:500	Sigma
Anti-Creb (mc, rabbit)	Verdünnung: 1:500	Sigma
Anti-Laminin (mc, mouse)	Verdünnung: 1:1000	Sigma
Anti-Integrin $\alpha_6\beta_1$ (mc, mouse)	Verdünnung: 1:100	Chemicon International
Anti-Integrin $\alpha_5\beta_1$ (mc, mouse)	Verdünnung: 1:100	Chemicon International
Anti-Neurofilament 200 (mc, mouse)	Verdünnung: 1:400	Sigma
Anti- β -Kristalin (rabbit)	Verdünnung: 1:400	freundl. Gabe von Dr. BSA Lab, India

Anti-GFAP (pc, rabbit)	Verdünnung: 1:80	Sigma
Anti- γ -Kristallin (pc, rabbit)	Verdünnung: 1:100	freundl. Gabe von S. Ziegler
Anti- β -Amyloid (pc, rabbit)	Verdünnung: 1:200	Abcam
Anti- β -Amyloid (mc, mouse)	Verdünnung: 1:500	Sigma
Anti-APP (mc, mouse)	Verdünnung: 1:100	Chemicon International
Anti-BDNF (pc, rabbit)	Verdünnung: 1:500	Chemicon International
Anti-BACE-1 (pc, rabbit)	Verdünnung: 1:200	Abcam
Anti-Brn-3 (pc, rabbit)	Verdünnung: 1:1000	Covance
Anti-Nestin (pc, rabbit)	Verdünnung: 1:200	Chemicon International
Anti-ROCK-1 (pc, rabbit)	Verdünnung: 1:200	Sigma
Anti-ROCK-2 (pc, rabbit)	Verdünnung: 1:200	Sigma
Anti- β -Tubulin (mc, mouse)	Verdünnung: 1:500	Covance

Zweitantikörper (alle IgG)

Anti-Mouse-Cy-2 (goat)	Verdünnung 1: 200	Jackson Immuno Research
Anti-Rabbit-Cy-2 (goat)	Verdünnung: 1:200	Jackson Immuno Research
Anti-Mouse-TRITC (goat)	Verdünnung: 1:300	Sigma
Anti-Rabbit-TRITC (goat)	Verdünnung: 1:400	Sigma

2.5.2 Immunhistochemie an empfindlichen kultivierten Gewebe

Zum einen wurden immunhistochemische Färbungen an regeneriertem retinalem Gewebe zur Differenzierung der glialen oder neuronalen Herkunft mittels Färbungen gegen

GFAP und der 200kDa Untereinheit der Neurofilamente (NF) durchgeführt. Zum anderen konnte mittels der Immunhistochemie die Expression von verschiedenen Proteinen wie z. B. ROCK I in auswachsenden Axonen *in vitro* nachgewiesen werden.

Die Färbungen an dem empfindlichen retinalen Gewebe wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Medium abpipettieren und Gewebe mit vorgewärmten (37°C) PBS (pH 7,4) waschen
- Fixierung des Gewebes mit vorgewärmten Paraformaldehyd (4%) für 10 min bei Raumtemperatur und anschließendem Waschen mit PBS (pH 7,4)
- Blockierung mit 12 ml FCS (10%) und 1000µl Triton (1%) bei 4°C für 2h, anschließend Lösung abpipettieren
- Zugabe des mit FCS (10%) verdünnten Primärantikörpers je nach Anweisung und Inkubation bei 4°C über Nacht
- Gewebe 2 x 30min mit gekühltem PBS waschen
- Zugabe des verdünnten Sekundärantikörpers je nach Anleitung für mind. 1h und anschließend das Gewebe 3 x 1h mit gekühltem PBS waschen
- Einbettung des ausgeschnittenen Gewebes mitsamt dem Petripermschalenboden in Mowiol (Hoechst 33258)
- Auswertung der Immunhistochemie mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops

2.5.3 Immunhistochemie an Kryoschnitten

Zur Detektion und Analyse der Expression verschiedener regenerationsspezifischer Proteine in der Retina des Affen *Callithrix jacchus* wurden immunhistochemische Färbungen an unterschiedlich alten Geweben (fetal, postpartal, 4 Wochen, 22 Wochen und 4.5 Jahre) durchgeführt.

Alle immunhistochemischen Färbungen an den 10µm dicken Kryoschnitten wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Fixierung der Schnitte in Methanol (Merck) bei -20°C für 10 min

- Dreimaliges Waschen der Schnitte für jeweils 5min in PBS (pH 7,4)
- Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit FCS (10%) für 30min im Kühlschrank
- Zugabe des mit FCS verdünnten Primärantikörpers entsprechend der empfohlenen Verdünnung (auf Kontrollen wurde nur FCS gegeben) und Inkubation über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer
- Dreimaliges Waschen der Schnitte für jeweils 5min in PBS (pH 7,4)
- Zugabe des Sekundärantikörpers entsprechend der Verdünnung und einstündige Inkubation in dunkler Umgebung
- Waschen der Schnitte für 3 x 5 min in PBS (pH 7,4)
- Eindeckeln der Schnitte in Dapi-Mowiol (Hoechst 33258)
- Lagerung der Objektträger in Dunkelheit bei 4°C
- Betrachtung und Auswertung der immunhistochemischen Färbungen unter dem Fluoreszenzmikroskop mittels zugehöriger Bildanalysesoftware

2.6 Western Blot

Zum semiquantitativen Nachweis der altersabhängigen Proteinexpression wurden in vier verschiedenen Altersstufen der Affenretina ausgewählte Proteine mit Hilfe des Western Blots nachgewiesen. Dabei muss zunächst das Proteingemisch mittels denaturierenden SDS-PAGE (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden, wodurch ein getreuer Abdruck des Proteingemisches entsteht (blotting). Anschließend sind die auf der Membran gebundenen Proteine der Immunodetektion durch eine Antikörper-Antigen-Reaktion zugänglich.

2.6.1 Materialien und Lösungen

Chemikalien

Acrylamid-Stammlösung (0,8% Bisacrylamid, 30% Acrylamid) (Roth)

APS (Ammoniumperoxodisulfat) (Roth)

BSA (Rinderserumalbumin) (Sigma)

Bromphenolblau (3', 3'', 5', 5''-Tetrabromphenol-sulphonaphtalein) (Sigma)
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)
Coomassie Brilliant Blue G 250 (Merck)
ECL (Enhanced Chemoluminescence) (Amersham)
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) (Sigma)
Ethanol (absol.) (J. T. Baker)
Glycerin (Roth)
Glycin (Merck)
Magermilchpulver für die Molekularbiologie (Merck)
 β - Mercaptoethanol (Sigma)
Methanol (Burdick & Jackson)
Natriumchlorid
Natriumazid
Phosphorsäure (Merck)
Ponceau-S (Sigma)
Precision Plus Protein Standards, Dual Color (BioRad)
Salzsäure
Saccharose (Merck)
SDS (Natriumlaurylsulfat) (Sigma)
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethyldiamin) (Sigma)
Trichloressigsäure (Merck)
Tris (Tris-(hydroxymethyl) aminomethan) (Roth)
Triton X-100 (Sigma)
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-monolaurat) (Fluka)

Geräte

Gelgießstand und Zubehör (Glasplatten, Spacer, Probenkämme) (BioRad)
Elektrophoreseapparatur (Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System) (BioRad)
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad)
Power Supply Modell 200/2.0 (BioRad)
Röntgenfilmentwicklungsmaschine: Curix 60 (Agfa)
Schüttler (Vibrax VXR, IKA)

Ultraschallhomogenisator UW 70 (Bandelin)
pH-Elektrode: pH-Meter 766 Calimatic (Knick)
Tischzentrifuge: 5415 C (Eppendorf)
Große Zentrifuge: 6K15 (Sigma)
Photometer: Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech)
Blockthermostat: BT 200 (Kleinfeld)
Thermogefäß (Nalgene)
Pistill (Eppendorf)
Vortexer (Bender & Hobein)

Verbrauchsmaterial:

Küvetten (Sarstedt)
Nitrocellulosemembran Hybond ECL (Amersham)
Röntgenfilme (Cronex 5; Agfa)
Whatmann 3 MM Filterpapier
Eppendorfg Gefäße 1,5ml

2.6.2 Probenverarbeitung

Die für die biochemischen Experimente verwendete Retina des Affen *Callithrix jacchus* stammte aus dem laboreigenen, in flüssigem Stickstoff bei – 80°C konservierten Probenmaterial. Für den semiquantitativen Proteinnachweis im Western Blot wurden vier verschiedene Altersstufen des *Callithrix jacchus* verwendet: postpartale, vier Wochen, vier Monate und 4.5 Jahre alte Retina (eingefrorenes Material vom 14.01.04, 16.05.07, 29.08.06 und 16.05.07).

Nach dem Auftauen der Proben wurde das retinale Gewebe mit Lysepuffer zersetzt, mit einem Pistill und 3 x 5 Ultraschallstößen mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert und der Überstand zum weiteren Gebrauch abgenommen.

Lysispuffer

20mM Tris/HCl, pH 7, 5
300mM Saccharose
0,1mM EDTA

1% Triton

0,1% Mercaptoethanol

Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets in PBS

2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung der zuvor denaturierten Proteine für den Western Blot. Für die Proteindenaturierung wird der Probe ein SDS-haltiger Probenpuffer zugesetzt und das Gemisch anschließend auf 90°C erhitzt, um die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufzubrechen. Danach folgt die Auftrennung der Proteine im 5-14%igen Polyacrylamidgel im elektrischen Feld. Die SDS-Proteinkomplexe wandern entlang des elektrischen Feldes durch ein aus Acrylamid bestehendes Sammel- und Trenngel zur Anode. Dabei bewegen sich kleinere Proteine schneller durch das engmaschige Netz der Gelmatrix, während größere Proteine gebremst werden. Schließlich sind alle Proteine der Größe nach sortiert und können auf die Nitrozellulose-Membran übertragen werden.

Folgende Lösungen und Gele wurden für die Vorbereitung zum Western Blot verwendet:

Sammelgelpuffer:	0,5M Tris/HCl, pH 6,8 0,4% SDS
Laufpuffer:	250mM Tris 1,92M Glycin 0,1% SDS
Trenngelpuffer:	1,5M Tris/HCl, pH 8,8 0,4% SDS
Probenpuffer:	130mM Tris/HCl, pH 6,8 10% SDS 10% Mercaptoethanol 20% Glycerin 0,06% Bromphenolblau
Trenngel (Dichte 12%):	Acrylamid 30% 12ml

Trenngelpuffer (4x) 7,5ml
Aqua bidest 10,5ml

Sammelgel: Acrylamid 30% 3ml
Aqua bidest. 12ml
Sammelgelpuffer (4x) 5ml

2.6.4 Proteintransfer und Immunoblotting

Da die Proteine in der Gelmatrix den Antikörpern nicht zugänglich sind, müssen sie nach der elektrophoretischen Trennung auf eine dünne Membran aus Nitrozellulose übertragen werden. Nach dem Semi-Dry-Verfahren wurden das Gel, die Nitrozellulosemembran und vier Whatmanpapiere in Transferpuffer getränkt und mit Hilfe der Blotting-Apparatur ein Sandwich aus drei Whatmanpapieren, der Nitrozellulosemembran, dem Polyacrylamidgel und weiteren Whatmanpapieren auf der Anodenplatte erstellt. Nach der Entfernung möglicher Luftblasen wurde die Kathodenplatte aufgesetzt und eine Spannung von $1\text{mA}/\text{cm}^2$ angelegt. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde nach 1 Stunde der Blot gestoppt, die Membran mit Ponceau-Rot reversibel gefärbt und anschließend mit Aqua dest. wieder entfärbt, so dass die Proteinbanden sichtbar wurden. Die so transferierten Proteine konnten nun über spezifische Antikörperreaktionen nachgewiesen werden.

Transferpuffer: 25mM Tris
192mM Glycin 20% Methanol

Ponceau-S-Färbelösung: 0,2% Ponceau-S
3% Trichloressigsäure

Die auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine waren nun der immunologischen Detektion mit Hilfe von Antikörpern zugänglich. Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Blockade unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation der Nitrozellulosemembran in einer Proteinblocklösung (Magermilchpulver in TBST)
- Waschen: 1 x 15 min und 3 x 5 min in TBS-T

2.7 Experimente mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 *in vitro*

Der ROCK-Inhibitor Y-27632 hat in bisherigen Studien (Lingor et al. 2007; Lingor et al. 2008; Ahmed et al. 2009) einen positiven Effekt auf die axonale Regeneration und das Überleben der RGC gezeigt. In dieser Arbeit soll der Effekt anhand des hier verwendeten Regenerationsmodells an adulten, zuvor operierten Ratten und an unbehandelten Affen Augen *in vitro* getestet werden.

Die Ratten wurden nach dem oben genannten Vorgehen operiert und 72h später wurden die Augen innerhalb eines Zeitfensters von 25min explantiert und kultiviert. Der Kulturschale wurde drei Stunden nach Präparation zusätzlich zum S4-Medium (3ml, Promocell) der ROCK-Inhibitor Y-27632 (Calbiochem) in einer Konzentration von 50 bzw. 100 μ Mol zugesetzt. In der Kontrollgruppe wurde zu den Explantaten unter ansonsten gleichen Kulturbedingungen nur 3ml S4-Medium gegeben. Analog wurde bei den zuvor unbehandelten Affen Augen vorgegangen, jedoch wurde eine dritte Gruppe, bei welcher der ROCK-Inhibitor erst nach 24-stündiger Vorinkubation im Brutschrank zugesetzt wurde, geschaffen, um einen zeitlichen Unterschied der Rho-assoziierten Proteinkinase-Inhibition zu analysieren.

Nach 72-stündiger Kultivierung der Retina wurden die Dichte und Länge der auswachsenden Neuriten mit dem Programm Axio Vision 7.4 (Zeiss) ausgewertet und mit der Kontrollgruppe verglichen.

2.8 Statistik

Die im Rahmen der Regenerationsstudie erhobenen Daten über die Anzahl und Länge der auswachsenden Axone in den Retinaexplantaten *in vitro* sind als Stichproben aufzufassen und wurden der statistischen Analyse unterzogen. Nach der Prüfung des Vorliegens bzw. Fehlens einer Normalverteilung der Daten wurden die entsprechenden statistischen Tests für unabhängige Stichproben angewendet. Neben einer deskriptiven Statistik mit Berechnung von arithmetischen Mittelwerten, Standardabweichungen und Varianzen wurde auch die Signifikanz der Daten aus der Experimentalgruppe und Kontrollgruppe mit Hilfe des Programmes SPSS (IBM, USA) unter Annahme eines Signifikanzlevels von $\alpha < 0,05$ überprüft.

3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden zunächst die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse von regenerationsassoziierten Proteinen in der Affenretina vorgestellt, anschließend folgt die semiquantitative Analyse einiger ausgesuchter Proteine mit Hilfe des Western Blots. Danach werden die Daten aus den Regenerationsstudien an der Affen- und Rattenretina getrennt nach Experimental- und Kontrollgruppe vorgestellt, wobei der Einfluss des ROCK-Inhibitors Y-27632 auf das axonale Wachstum der RGC *in vitro* analysiert werden soll.

3.1 Expressionsanalyse bestimmter regenerationsspezifischer Proteine in der Retina des Affen *Callithrix jacchus*

Zur immunhistochemischen Analyse der Proteinexpression wurden Kryoschnitte der Affenretina aus fünf Altersstufen durchgeführt: fetale, postpartale, 4 Wochen und 22 Wochen, sowie 4.5 Jahre alte Retina des *Callithrix jacchus*. An diesen Schnitten wurden die entsprechenden Antikörperfärbungen und die Negativkontrollen (nicht gezeigt) durchgeführt, welche im Nachfolgenden aufgeführt sind.

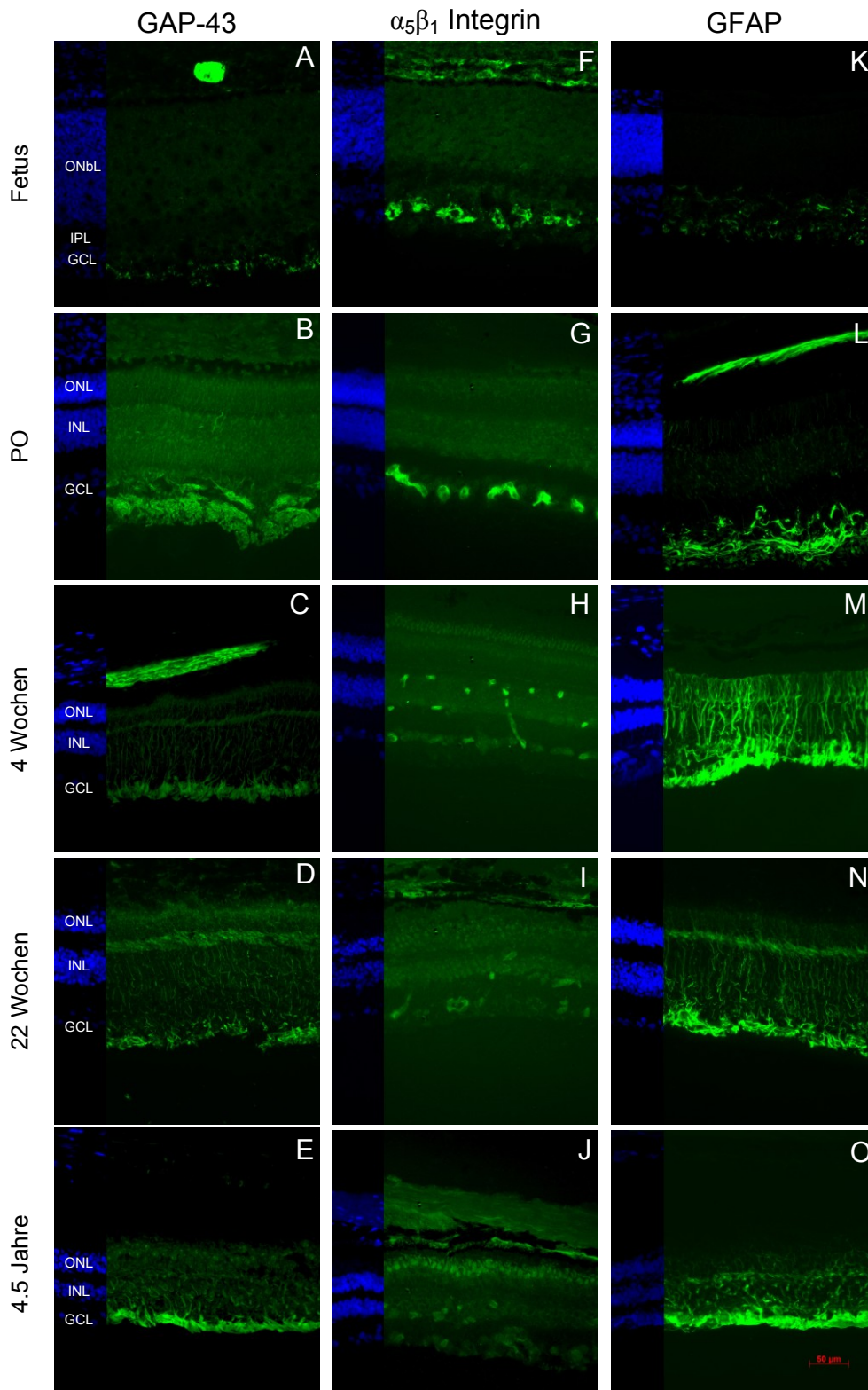
3.1.1 Die Entwicklung der Retina des *Callithrix jacchus*

Die retinale Entwicklung während der Fetalzeit verläuft ähnlich wie bei Makkakenaffen oder Menschen (Mann 1964; Hendrickson 1992; Hendrickson et al. 1992), allerdings ist beim Marmosetaffen die neonatale Unreife und schnelle postnatale Entwicklung der Retina auffallend (Hendrickson et al. 2006). In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Färbungen an der peripheren, v. a. an der midperipheren Marmosetretina durchgeführt, welche sich im ersten Drittel auf der Strecke zwischen der Papilla nervi optici und dem äußeren Rand der Retina befindet. Hendrickson et al. haben 2006 die retinale Entwicklung im *Callithrix jacchus* an verschiedenen fetalen, juvenilen und adulten Tieren analysiert. So ist am 100. Fetaltag eine äußere neuroblastische Schicht (outer neuroblastic layer, ONbL) ohne Anzeichen für eine weitere laminäre Differenzierung erkennbar. Weiterhin stellt sich eine locker gepackte, mehrlagige Ganglienzellschicht (GCL) und eine dünne innere plexiforme Schicht (IPL) dar. Aber schon 3 Wochen später (125. Fetaltag) sind alle normalen retinalen Schichten in der Midperipherie der Netzhaut erkennbar, nachdem sich die ONbL in eine äußere nukleäre (ONL), äußere plexiforme (OPL) und eine innere nukleäre Schicht (INL) aufgetrennt hat. In der weiteren fetalen Entwicklung können die fünf retinalen Schichten noch besser voneinander differenziert werden, wobei die GCL nun aus 2-3 Zelllagen besteht. In

den postpartalen immunhistochemischen Färbungen in dieser Arbeit ist eine schon recht reife Retina mit einer dicken ONL, die bis zu 6 Stäbchenreihen beinhaltet, erkennbar. Auffallend ist eine ab diesem Alter bis zum adulten Stadium abnehmende Netzhautdicke, wobei besonders die Ganglienzellen und in geringerem Ausmaß auch die innere Kernschicht (INL) betroffen sind.

3.1.2 GAP-43

Die Expression des regenerationsspezifischen Proteins GAP-43 wird beim Affen entwicklungsabhängig reguliert (siehe Abbildung 6): es zeigt sich bei der fetalen Reifung der Retina zunächst eine Zunahme, nach der Geburt jedoch wieder eine Abnahme des Signales. Die fetale Retina, die aufgrund der fehlenden laminären Differenzierung 100 Tage oder jünger sein muss (Hendrickson et al. 2006), zeigt eine dicke neuroblastische Schicht (ONbL) und eine locker gepackte mehrlagige Ganglienzellschicht, welche an der Grenze zur vitreo-retinalen Grenzschicht eine Signalzunahme für GAP-43 zeigt. Während der Reifung und Differenzierung der Retina kommt es zu einer starken Signalzunahme von GAP-43, welche besonders in der postpartalen Retina beobachtet werden kann. Eine starke Proteinexpression kann in der Ganglienzellschicht und besonders in der vitreo-retinalen Grenzschicht beobachtet werden, aber auch die anderen nukleären Schichten und die innere plexiforme Schicht werden angefärbt. Im weiteren Verlauf der Entwicklung erfolgt eine Akzentuierung des GAP-43-Signales in den Axonen in der vitreo-retinalen Grenzschicht, außerdem in der äußeren plexiformen und der äußeren nukleären Schicht. Auffallend ist in diesem Altersstadium die Betonung von Strukturen, welche sich durch die gesamte Retina ziehen und Axone bzw. Dendriten darstellen können. Im adulten Stadium (4.5 Jahre) kann weiterhin eine ausgeprägte Färbung der vitreo-retinalen Grenzschicht und der nukleären Schichten gesehen werden. Auch in diesem Alter zeigt sich eine Anfärbung von Axonen bzw. Dendriten, jedoch weniger signalintensiv als in jüngeren Stadien.



Quelle: Eigene Darstellung.

Abbildung 6: Immunhistochemische Analyse an kryokonservierter Marmosetretina

*Expression von GAP-43 (A-E), $\alpha_5\beta_1$ -Integrin (F-J) und GFAP (K-O) in unterschiedlich alter Retina des Affen *Callithrix jacchus**

3.1.3 GFAP

Die Retina des *Callithrix jacchus* zeigt eine altersbedingte Aktivierung und strukturelle Veränderung der Müllerzellen (siehe Abbildung 6). In der fetalen Retina zeigen sich nur die Astrozyten in der Ganglienzellschicht als leicht GFAP-positiv, während in der postnatalen Retina diese Gliazellen schon stärker angefärbt werden können und zusätzlich auch die Fortsätze der Müllerzellen ein leichtes Signal zeigen. Im fortschreitenden Alter werden weiterhin die Astrozyten in der Ganglienzellschicht am stärksten angefärbt, aber auch die Müllerzellen, die als radiäre Glia die gesamte Retina durchziehen, zeigen eine vermehrte Expression des GFAP. Auffällig ist beim adulten Affen (22 Wochen und 4.5 Jahre) ein im Verlauf der Müllerzellen intensiveres GFAP-Signal in der äußeren plexiformen Schicht bzw. an der Grenze zur INL, in der Fortsätze der Horizontalzellen mitangefärbt werden können (Lewis et al. 2003).

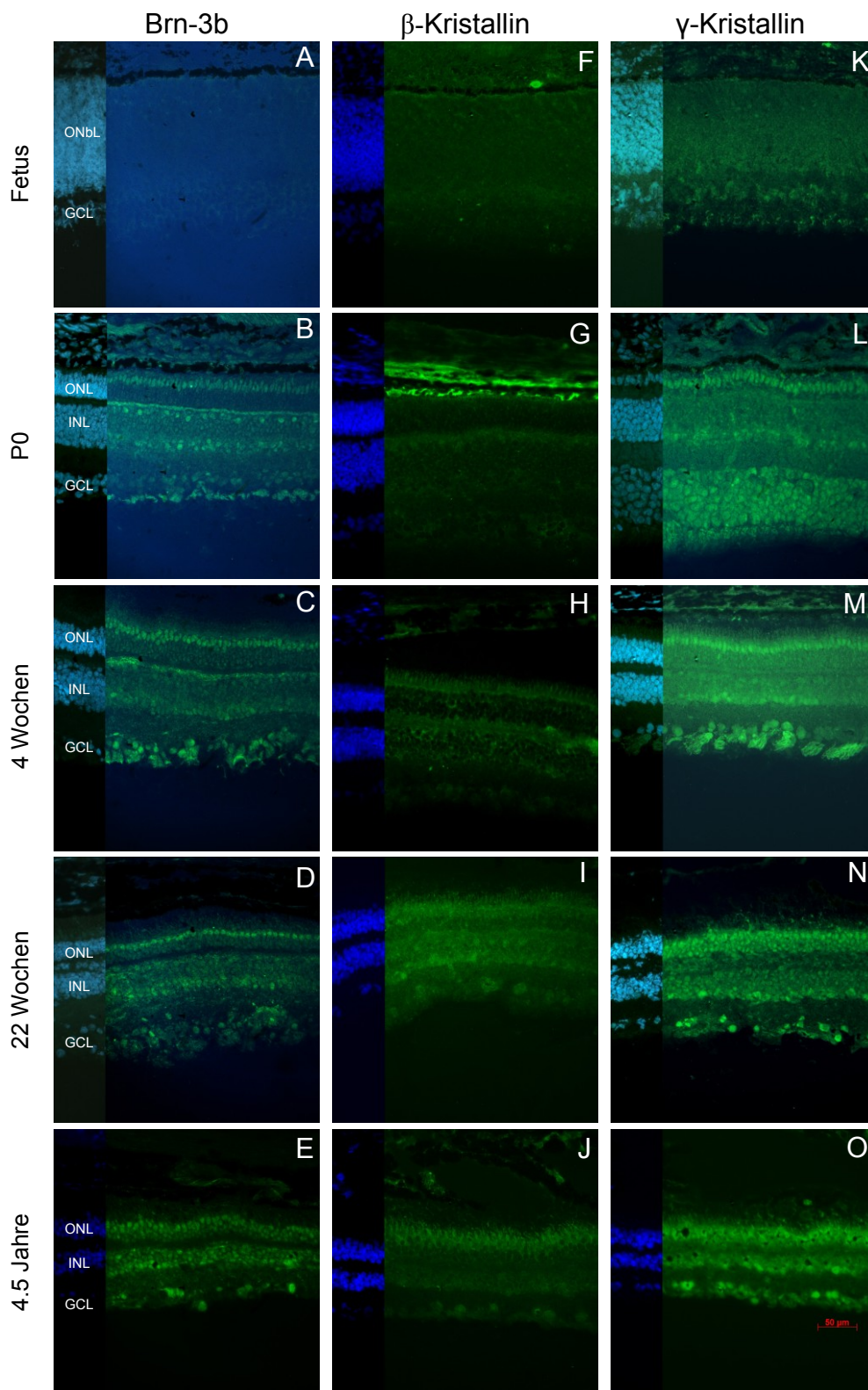
3.1.4 $\alpha_5\beta_1$ -Integrin

Dieses Integrin, das hauptsächlich in choroidalen und retinalen Gefäßen und nur zu einem sehr geringen Anteil in anderen retinalen Geweben exprimiert wird (Brem et al. 1994), wird während der altersbedingten Reifung der Netzhaut variabel reguliert (siehe Abbildung 6). Die immunhistochemische Färbung des fetalen Gewebes mit Anti- $\alpha_5\beta_1$ -Integrin ergibt eine ausgeprägte aggregatförmige Fluoreszenz in der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht, die die Lokalisation von den aus dem Sehnerven dorthin einwachsenden Kapillaren darstellt. Weiterhin ist eine unspezifische Färbung der Choroidea erkennbar, welche für die dichte Anordnung von Kapillaren in der Gefäßhaut spricht. Im Verlauf der fetalen Entwicklung kommt es zunächst zu einer verstärkten Signalintensität und einer Ausbreitung der Fluoreszenz in Richtung der IPL, welche in der postnatalen Retina das Wachstum der Kapillaren widerspiegelt. Sowohl in diesem Stadium, als auch in der 4 Wochen alten Retina kann die röhrenartige Fluoreszenz gut als vaskuläre Struktur identifiziert werden, wobei sie sich auch auf das Areal zwischen der INL und OPL ausbreitet, wo schließlich der äußere Gefäßplexus entsteht. Während der weiteren Reifung der Retina verliert das $\alpha_5\beta_1$ -Signal zunehmend an Intensität, bis das Integrin im adulten Stadium überhaupt nicht mehr exprimiert wird und nur noch eine unspezifische Anfärbung des Hintergrundes erkennbar ist.

3.1.5 β - und γ -Kristallin

Die als Strukturproteine der Linse bekannten Kristalline können auch in der Retina des Affen *Callithrix jacchus* immunhistochemisch nachgewiesen werden (siehe Abbildung 7). Dabei zeigt sich für das β -Kristallin eine altersabhängige Expression im Verlauf der retinalen Reifung: während das Protein in der fetalen Netzhaut überhaupt nicht synthetisiert wird, kommt es zum Zeitpunkt der Geburt zu einer punktuellen Expression in den Segmenten der Photorezeptoren, die sich im weiteren Verlauf der Entwicklung auf die nukleären Schichten ausdehnt. Im Alter von 22 Wochen kann das β -Kristallin demnach beim juvenilen Affen in den inneren und äußeren nukleären Schichten, der Ganglienzellschicht und der Photorezeptorschicht nachgewiesen werden. Auch beim adulten Tier bleibt dieses Expressionsmuster bestehen, allerdings ist in diesem Alter die in der Literatur bekannte punktuelle Anfärbung der Photorezeptorsegmente auffällig (Xi et al. 2003).

Im Unterschied zum β -Kristallin kann das γ -Kristallin in einer diffusen Verteilung in der ONbL mit punktueller Akzentuierung der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht schon in der fetalen Affenretina detektiert werden. Jedoch ist eine präzise Lokalisation des Proteins aufgrund der fehlenden laminären Differenzierung in diesem Alter noch nicht möglich. In der postpartalen Retina kann es dagegen schon in den einzelnen nukleären Schichten nachgewiesen werden. Auch im weiteren Entwicklungsverlauf ändert sich dieses Expressionsmuster mit Anfärbung der GCL, der INL und ONL nicht mehr signifikant, obwohl eine Betonung der Photorezeptorschicht und der Nervenfaserschicht beim juvenilen Tier (4 und 22 Wochen) auffällig ist.



Quelle: Eigene Darstellung.

Abbildung 7: Altersabhängige Expression von Brn-3b (A-E), β -Kristallin (F-J) und γ -Kristallin (K-O) in der Retina des *Callithrix jacchus*

3.1.6 Brn-3b

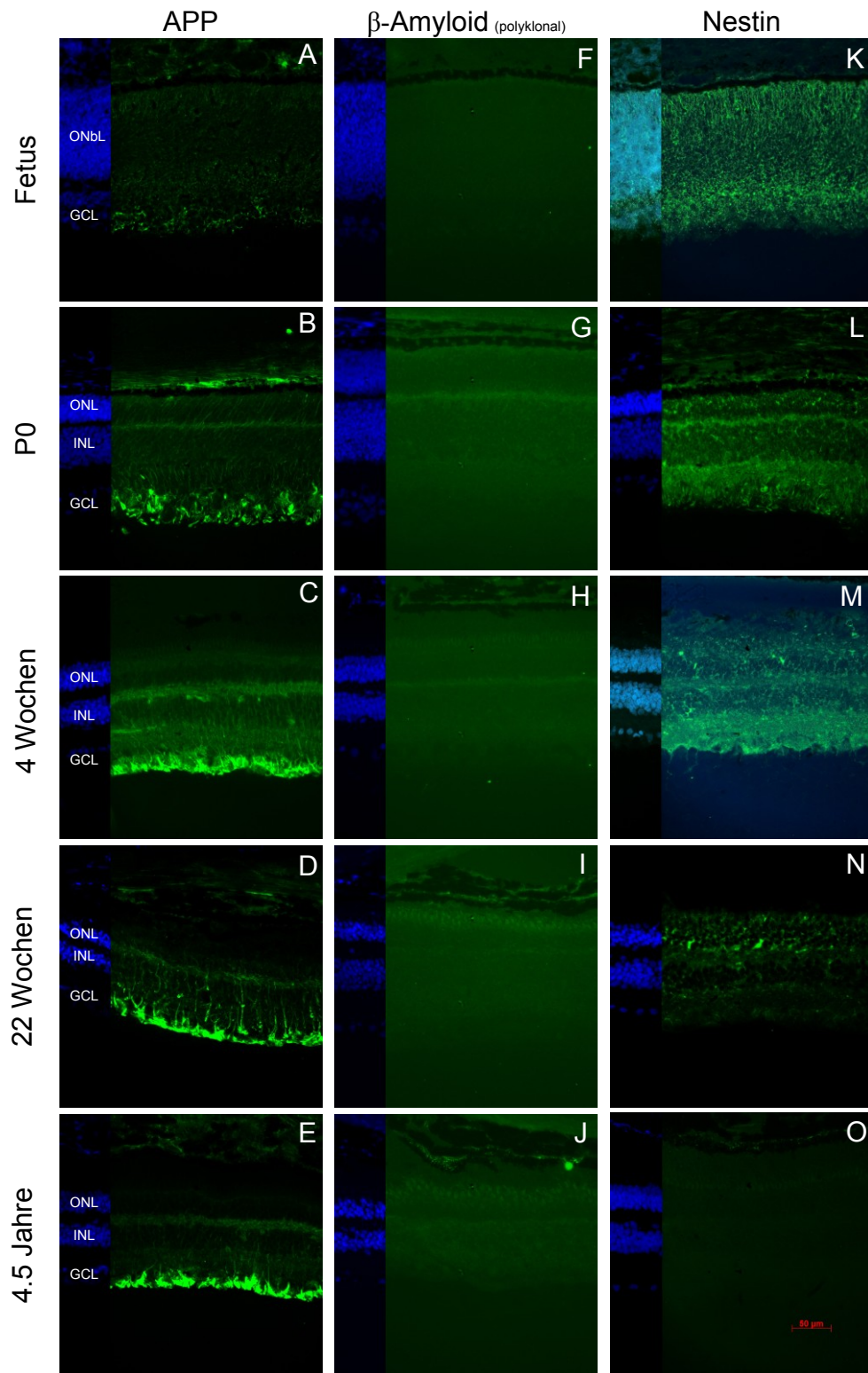
Der Transkriptionsfaktor Brn-3b ist ein nukleäres Protein, das sowohl in den retinalen Vorläuferzellen, als auch in ausdifferenzierten Ganglienzellen vieler verschiedener Vertebraten wie Hühnchen, Maus, Affe oder Mensch nachgewiesen werden konnte (Xiang et al. 1993; Gan et al. 1996). In dieser Arbeit (siehe Abbildung 7) konnte Brn-3b noch nicht in fetalem Gewebe, sondern erst in der postnatalen Retina detektiert werden. Dabei zeigt sich fluoreszenzmikroskopisch ein intensives Signal in den äußeren Photorezeptorkernen, in der OPL, in einigen Kernen der INL und in Ganglienzellen. Auch mit zunehmendem Alter bleibt dieses Fluoreszenzmuster bestehen, allerdings färben sich beim adulten Affen alle Zellkerne der der ONL, INL und Ganglienzellschicht intensiv an. Aufgrund der Vielzahl früherer Studien zur immunhistochemischen Lokalisation dieses Transkriptionsfaktors kann daher von einer fehlerhaften immunhistochemischen Anfärbung der retinalen Strukturen ausgegangen werden, die entweder durch einen Anwendungsfehler oder durch Verwendung eines polyklonalen statt eines monoklonalen Antikörpers bedingt ist.

3.1.7 APP und β -Amyloid

Die immunhistochemische Anfärbung des transmembranösen Amyloid Precursor Proteins (APP) zeigt eine altersabhängige Signalzunahme in der Retina des *Callithrix jacchus* (siehe Abbildung 8). In der fetalen Affenretina kann das APP in der Neurofilamentschicht und um die sich ausbildenden Ganglienzellen detektiert werden, aber auch die anderen retinalen Strukturen werden unspezifisch mit angefärbt. Nach der Geburt ist dagegen die Verteilung des Proteins in den inneren Schichten der Netzhaut (NFL und RGC) und in vertikaler Ausrichtung auch in der restlichen Retina erkennbar. Dabei ist eine Akzentuierung des Signales in der NFL und der OPL auffällig. Die vertikalen Signale und die hohe Signalintensität in der NFL an der Grenze zur Membrana limitans interna sprechen für eine Lokalisation dieses Proteins in den Müllerzellen, besonders in deren Endfüßchen, aber evtl. auch in den Axonen der Ganglienzellen. Auch mit zunehmendem Alter bleibt diese charakteristische Lokalisation des Amyloidvorläuferproteins bestehen, allerdings ist eine altersabhängige Signalzunahme in der NFL zu verzeichnen. Dabei kann immunhistochemisch nicht zwischen einer Proteinlokalisierung in Axonen oder den Endfüßchen der Müllerzellen differenziert werden.

Die immunhistochemischen Färbungen mit sowohl einem monoklonalen, als auch einem polyklonalen Antikörper gegen verschiedene Isoformen des β -Amyloids (Sigma und Abcam) zeigen dagegen überhaupt kein Signal in den unterschiedlichen Altersstu-

fen der Affenretina (siehe Abbildung 8). Diese fehlende Proteinexpression in der jungen Retina korrespondiert dabei mit Ergebnissen aus früheren immunhistochemischen Studien, die β -Amyloid nur bei neurodegenerativen Erkrankungen der Retina oder in der alternden Retina nachweisen konnten (Loffler et al. 1995).



Quelle: Eigene Darstellung.

Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von APP (A-E), β -Amyloid (F-J) und Nestin (K-O) in der Netzhaut des Marmosettaffens *Callithrix jacchus*

3.1.8 Nestin

Das zytoplasmatische Intermediärfilament Nestin zeigt eine altersabhängige Abnahme seiner Expression in der Primatenretina (siehe Abbildung 8). In der fetalen, circa 100 Tage alten Retina ist eine die gesamte Netzhaut durchspannende starke Immunreaktivität für Nestin erkennbar, welche besonders an der äußeren ONbL und der Ganglienzellschicht intensiviert ist. Dieses Expressionsmuster entspricht der Anfärbung der neuroglialen Vorläuferzellen in der fetalen Retina. Nach der Geburt kommt es zu einer zunehmenden Abnahme und Umverteilung des immunhistochemischen Nestinsignals mit einer Akzentuierung der plexiformen Schicht, der GCL und der NFL, welche eine Expression des Proteins in den glialen Müllerzellen der Netzhaut entspricht. In der fortschreitenden Entwicklung kommt es in diesen Schichten zu einer weiteren Abnahme der Immunreaktivität und zudem scheinen die Färbungen im Alter von 4 und 22 Wochen aufgrund der verwaschenen Qualität in der NFL gewissen Fehlern zu unterliegen. In der adulten Primatenretina wird Nestin schließlich überhaupt nicht mehr gebildet, so dass diese Beobachtung mit der altersabhängigen Abnahme des immunhistochemischen Signals kongruiert.

Antikörper	Retinaschicht	Fetus	P0	4 Wochen	22 Wochen	4.5 Jahre
GFAP	PR	-	-	-	-	-
	ONL	-	(+)	+	+	+
	OPL	-	(+)	+	+ - ++	+ - ++
	INL	-	(+)	+	+	+
	IPL	-	(+)	+	+	+
	GCL	+	++	++	++	++
	NFL	+	++	++	++	++
Gap-43	PR	-	-	-	-	+
	ONL	-	+	+	+	+
	OPL	-	-	+	+ - ++	+
	INL	-	+	+	+	+
	IPL	-	+	+	+	+
	GCL	+	++	+	+	+
	NFL	+	++	++	++	++
CREB	PR	-	-	-	-	-
	ONL	-	-	-	-	-
	OPL	-	-	-	-	-
	INL	-	-	-	-	-
	IPL	-	-	-	-	-
	GCL	-	-	-	-	-
	NFL	-	-	-	-	-
$\alpha_6\beta_1$ -Integrin	PR	-	-	-	-	-
	ONL	-	-	-	-	-
	OPL	-	-	-	-	-
	INL	-	-	-	-	-
	IPL	-	-	-	-	-
	GCL	-	-	-	-	-

	NFL	-	-	-	-	-
$\alpha_5\beta_1$ – Integrin	PR	-	-	-	-	-
	ONL	-	-	-	-	-
	OPL	-	-	+	(+)	-
	INL	-	-	-	-	-
	IPL	-	-	+	(+)	-
	GCL	+ - +	++	+	(+)	-
	NFL	+ - +	++	+	(+)	-
Laminin	PR	-	-	-	-	-
	ONL	-	-	-	-	-
	OPL	-	-	-	-	-
	INL	-	-	-	-	-
	IPL	-	-	-	-	-
	GCL	-	-	-	-	-
	NFL	-	-	-	-	-
β – Kristallin	PR	-	++	+	+	+
	ONL	-	-	-	+	(+)
	OPL	-	-	(+)	-	-
	INL	-	(+)	(+)	+	(+)
	IPL	-	-	-	-	-
	GCL	-	-	+	+	+
	NFL	-	-	-	-	-
γ – Kristallin	PR	(+)	-	++	(+)	(+)
	ONL	(+)	+	+	+	+
	OPL	(+)	-	-	-	-
	INL	(+)	+	+	+	+
	IPL	(+)	-	-	-	-
	GCL	+	+	+	+	+
	NFL	+	+	++	+	+
Human β Amyloid (monoklonal)	PR	-	-	-	-	-
	ONL	-	-	-	-	-
	OPL	-	-	-	-	-
	INL	-	-	-	-	-
	IPL	-	-	-	-	-
	GCL	-	-	-	-	-
	NFL	-	-	-	-	-
Human β Amyloid (polyklonal)	PR	-	-	-	-	-
	ONL	-	-	-	-	-
	OPL	-	-	-	-	-
	INL	-	-	-	-	-
	IPL	-	-	-	-	-
	GCL	-	-	-	-	-
	NFL	-	-	-	-	-

Anti-APP	PR	-	-	-	-	-
	ONL	-	(+)	(+)	(+)	-
	OPL	-	+	+	+	+
	INL	-	(+)	(+)	(+)	-
	IPL	-	(+)	(+)	(+)	(+)
	GCL	+	++	++	++	++
	NFL	+	+ - +	++	++	++
Anti-BDNF	PR	-	-	-	-	-
	ONL	-	-	-	-	-
	OPL	-	-	-	-	-
	INL	-	-	-	-	-
	IPL	-	-	-	-	-
	GCL	-	-	-	-	-
	NFL	-	-	-	-	-
Anti BACE-1	PR	-	-	-	-	-
	ONL	-	-	-	-	-
	OPL	-	-	-	-	-
	INL	-	-	-	-	-
	IPL	-	-	-	-	-
	GCL	-	-	-	-	-
	NFL	-	-	-	-	-
Brn-3	PR	-	-	-	-	-
	ONL	-	+	+	+	+
	OPL	-	+	+	-	-
	INL	-	(+)	(+)	+	+
	IPL	-	-	-	-	-
	GCL	-	+	+	+	+
	NFL	-	-	-	-	-
Anti-Nestin (polyklonal)	PR	++	-	-	-	-
	ONL	++	-	-	-	-
	OPL	+	+	(+)	(+)	-
	INL	+	-	-	-	-
	IPL	+	+	(+)	(+)	-
	GCL	++	+	(+)	(+)	-
	NFL	++	+	(+)	(+)	-

Quelle: Eigene Darstellung

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht aller immunhistochemisch untersuchten Proteine und ihre altersabhängige Expression in der Netzhaut des *Callithrix jacchus*.

3.1.9 Weitere immunhistochemischen Färbungen

Es wurden neben den hier vorgestellten immunhistochemischen Analysen auch weitere Färbungen zur Detektion regenerationsassoziierter Proteine in der Retina des Marmosettaffen durchgeführt. Die Färbungen des retinalen Gewebes mit Antikörpern gegen BDNF, CREB, $\alpha_6\beta_1$ -Integrin, Laminin und BACE-1 (siehe Material und Metho-

den) fielen allesamt negativ aus, wobei allerdings nicht zwischen einer fehlenden Expression des untersuchten Proteins in der Affenretina und einer fehlenden Spezifität des Antikörpers gegenüber Gewebe aus Marmosettaffen unterschieden werden kann.

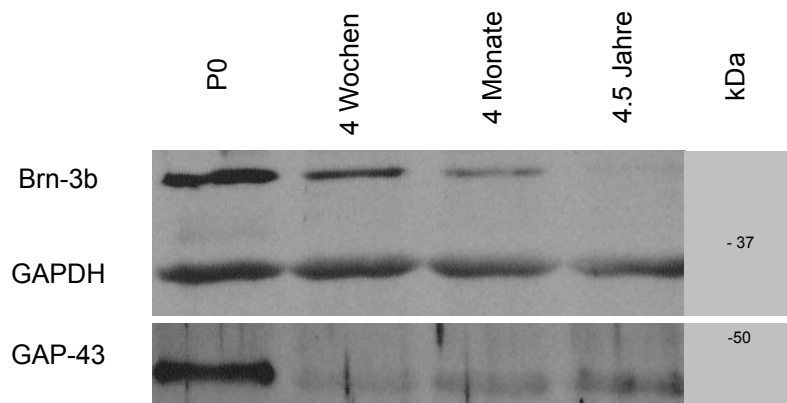
3.2 Western Blot Analyse ausgesuchter regenerationspezifischer Proteine in der Retina des Affen *Callithrix jacchus*

Die Western Blot Analyse dient der Kontrolle einiger immunhistochemischer Ergebnisse. Nach vorheriger elektrophoretischer Separation können damit einzelne Proteine mittels eines Antikörpers semiquantitativ in der Retina des *Callithrix jacchus* nachgewiesen werden.

Das Protein Brn-3b zeigte dabei eine starke postnatale Expression, welche in den folgenden Wochen und Monaten stark abnahm, bis es in der adulten Marmosetretina nicht mehr nachweisbar war. Dieses Ergebnis ergänzt die wahrscheinlich fehlerhafte immunhistochemische Analyse und beweist eine altersabhängige Brn-3b Expression in der Affenretina.

Neben diesem POU-Transkriptionsfaktor weist auch GAP-43 ein entwicklungsabhängiges Expressionsmuster auf: auffallend ist eine deutliche postnatale Proteinbildung, welche zwischen der 4. Woche und dem adulten Stadium stark reduziert wird. Allerdings ist in der Marmosetretina während des gesamten Lebens eine konstante, wenn auch geringe Produktion dieses regenerationsassoziierten Proteins erkennbar.

Es wurden noch weitere Western Blots anderer ausgewählter Proteine durchgeführt, die jedoch aufgrund einer zu kleinen Molekülgröße (β -Amyloid, 4kDa) bzw. eines zu großen Moleküls (Nestin, 200-220kDa) trotz unterschiedlicher Trenngele nicht erfolgreich waren. Auch der Western Blot mit γ -Kristallin erbrachte kein aussagekräftiges Ergebnis, da eine Antigen-Antikörper-Bindung auf dem Trenngel ausblieb. Daher wird entweder dieses Kristallin in der Marmosetretina nicht exprimiert oder der verwendete Antikörper war fehlerhaft.



Quelle: Eigene Darstellung.

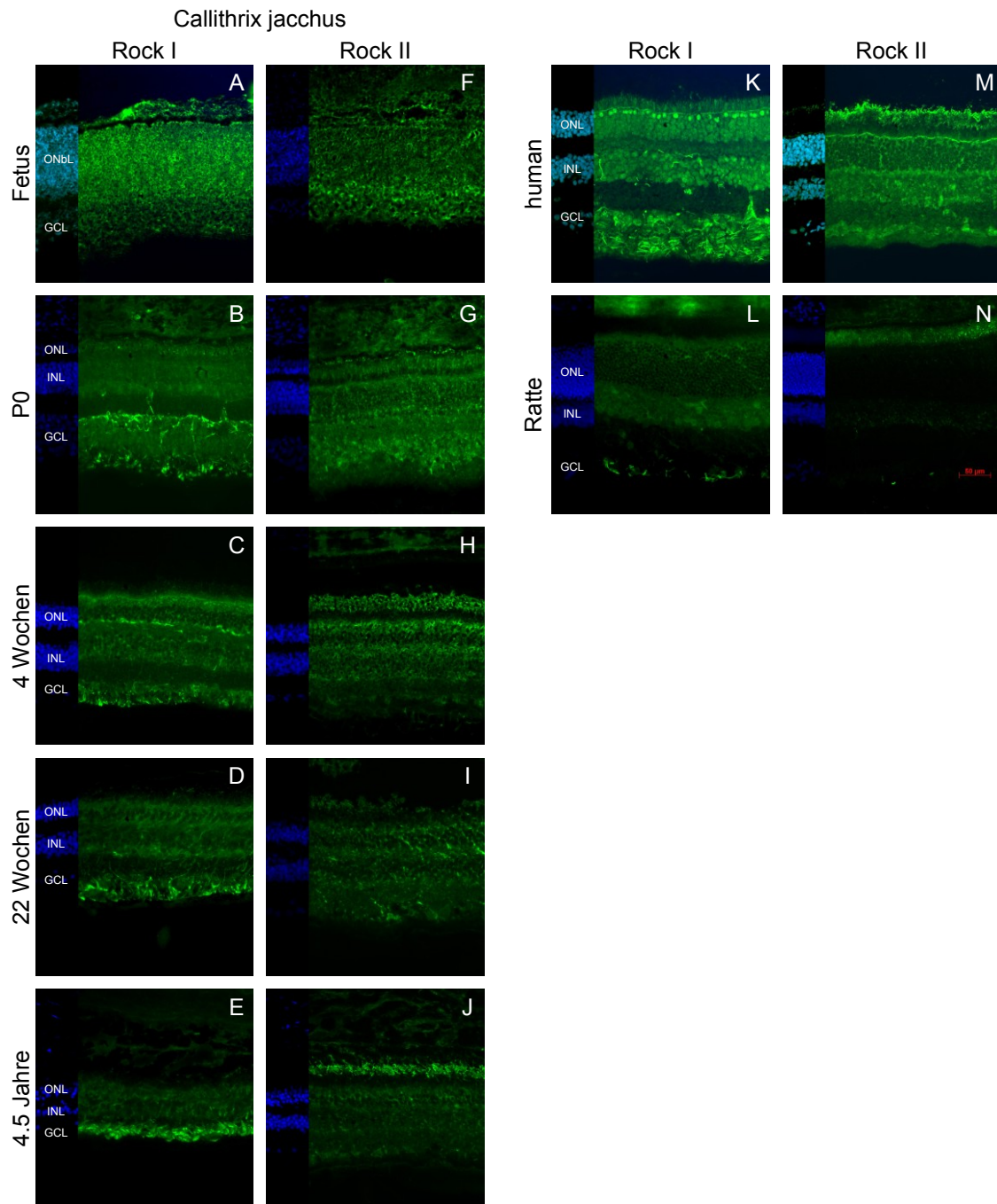
Abbildung 9: Western Blot mit Gewebe von unterschiedlich alter Marmosetretina.

Die obere Abb. zeigt die altersabhängige Expression von Brn-3b (45kDa) und die gleichmäßige Auftragsmenge des Kontrollproteines GAPDH. Brn-3b zeigt eine deutliche postnatale Abnahme seiner Expression, während GAP-43 (46kDa) eine starke postnatale und eine schwache, aber weiterhin konstante Expression in den weiteren Altersstufen aufweist.

3.3 Immunhistochemische Detektion der Proteinkinasen ROCK I und ROCK II in der Retina verschiedener Spezies

Zum Nachweis der Proteinkinasen ROCK I und II in der Retina und damit einer potentiellen Inhibitionsmöglichkeit wurden diese Kinasen in der Netzhaut der Ratte, des Marmosettaffens und des Menschen immunhistochemisch nachgewiesen (siehe Abbildung 10). In der Retina des *Callithrix jacchus* sind beide Proteinkinasen in allen Entwicklungsstadien vorhanden, jedoch zeigt ROCK I eine tendentiell stärkere Expression als ROCK II in den retinalen Schichten, insbesondere in den Ganglienzellschichten. Auch in der humanen Retina sind beide Kinasen vorhanden, wobei auch hier ROCK I eine stärkere Expression in den RGC aufweist. Dagegen wird ROCK II in der Rattenretina überhaupt nicht und ROCK I in der Ganglienzellschicht der Ratten im Vergleich zu der menschlichen und Primatenretina vermindert produziert.

Auch in regenerierenden Axonen neugeborener Marmosettaffen drei Tage nach Explantation werden ROCK I und II exprimiert, so dass dem Inhibitor Y-27632 ein potentielles Angriffsziel geboten wird (siehe Abbildung 11).



Quelle: Eigene Darstellung.

Abbildung 10: Die Expression von ROCK I und II in der Retina von Marmosettaffen (A-J), Ratte (L, N) und Mensch (K, M).

3.4 Regeneration der Affenretina

Aufgrund einer Kooperation mit dem Institut für Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums Münster wurden uns die Kadaver von neugeborenen Marmosettaffen

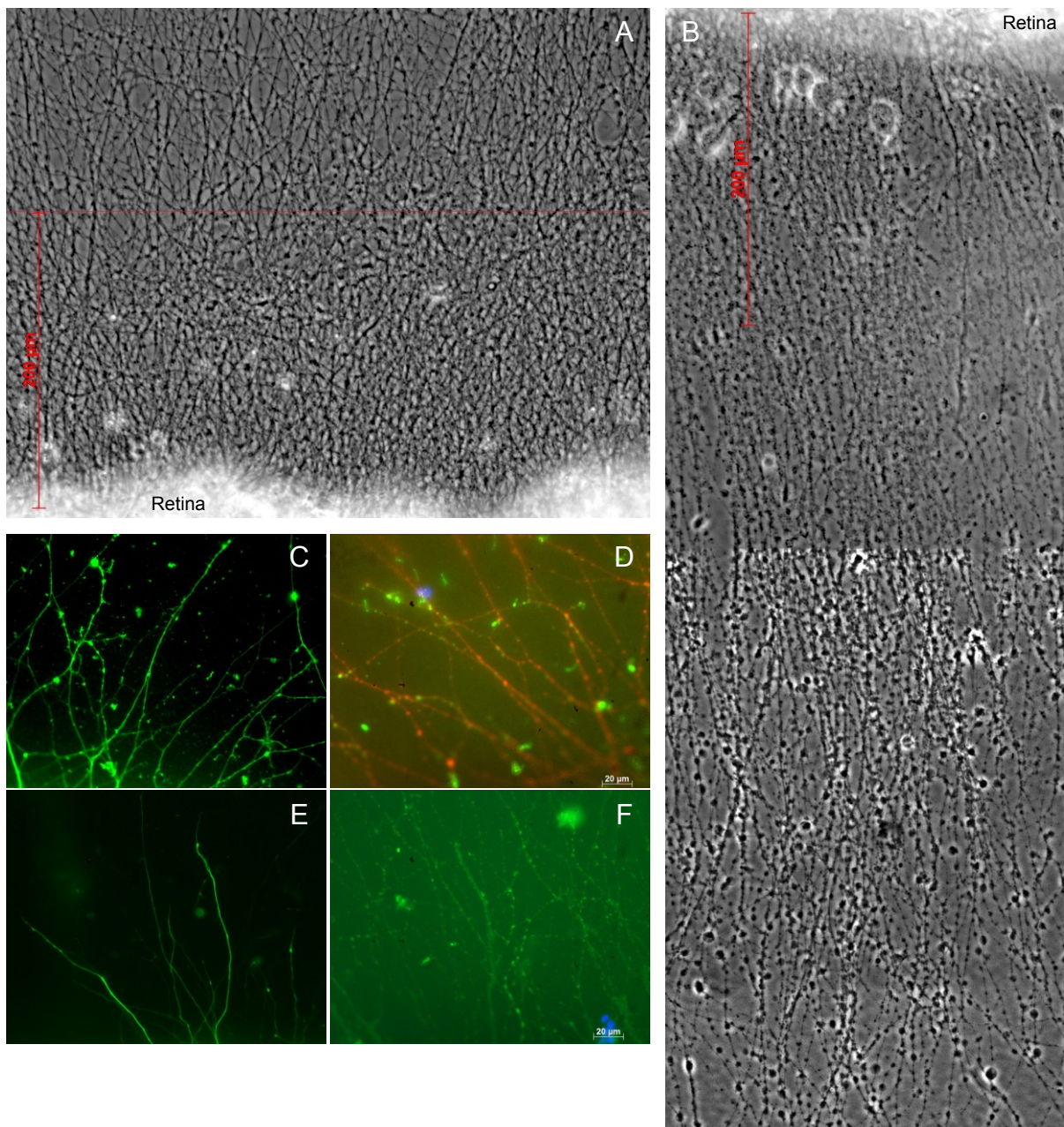
(*Callithrix jacchus*) zur Verfügung gestellt, so dass ohne zusätzliche tierexperimentelle Versuche die Regeneration der RGC an diesem Gewebe analysiert werden konnte. Im Gegensatz zur Rattenretina, die nur in einem kleinen zeitlichen Fenster von 14 bis 24 Tagen nach der Geburt spontan regeneriert, zeigt die Retina der Marmosetten in allen Altersstufen ein spontanes Auswachsen von Axonen (Rose et al. 2008), so dass eine Vorbehandlung *in vivo* nicht erfolgen musste. Das schon an den Ratten seit langem etablierte Explantationsmodell (Ford-Holevinski et al. 1986; Bähr et al. 1988), das ein Auswachsen der RGC *in vitro* unter sorgfältig gewählten Bedingungen (s. Material und Methoden) ermöglicht, wurde auf die Affenretina übertragen und erwies sich wie bei Rose et al. erneut als geeignet und regenerationsförderlich.

Die Retina des *Callithrix jacchus* zeigte ein spontanes, starkes Auswachsen der Axone, das sich über die gesamte Breite des jeweiligen Explantates erstreckte (siehe Abbildung 11). Dabei wurden die einzelnen Fortsätze bis zu 2000 μm lang und verzweigten sich besonders bei zunehmender Länge und Anzahl der Axone stark, so dass sich ihre exakte Quantifizierung als schwierig erwies. Daher wurde die Anzahl und Länge der auswachsenden Axone nach 72h Kultivierung nur noch vorsichtig, eher unter der tatsächlichen Anzahl liegend, gezählt. Mit Hilfe des Programmes AxioVision 4.7 (Zeiss) wurde die Anzahl der regenerierenden Axone in einem Abstand von 200 μm vom Rand des Filters, welcher der Retina auflag, manuell gezählt (siehe Abbildung 11). Dabei konnten die dicht beieinander liegenden, in Faszikeln gebündelten Nervenfasersätze nicht exakt quantifiziert werden, so dass pro Faszikel eine Axonanzahl von $n = 2$ oder bei dickeren Faszikeln von $n = 3$ angenommen wurde. Die in die Statistik eingeflossenen Daten zur Anzahl der Axone pro mm sind daher eher zu niedrige Werte. Im Gegensatz zur Axondichte konnte die Axonlänge genauer quantifiziert werden, da mit zunehmender Entfernung zum Filterrand die Axone besser gezählt werden konnten. Allerdings musste dabei auf die Richtung ändernde Axone geachtet werden, damit diese nicht doppelt gezählt wurden.

Immunhistochemie der Retinaexplantate

Die aus dem Explantat auswachsenden Fasern waren dünn und lang und wiesen daher die typische Morphologie von Axonen auf. Zur Bestätigung der neuronalen Herkunft dieser Fasern wurden an verschiedenen Kulturen immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Neurofilament 200 (NF 200), welcher spezifisch axonale Strukturen anfärbt, durchgeführt (siehe Abbildung 11). Eine weitere Färbung gegen das wachstumsassoziierte GAP-43 zeigte dessen Lokalisation in Transportvesikel und Wachstumskegeln der Axone an (siehe Abbildung 11). Daneben konnten auch die für diese

Arbeit wichtigen Rho-Kinasen ROCK I und II in regenerierenden Fasern nachgewiesen werden. (siehe Abbildung 11).



Quelle: Eigene Darstellung.

Abbildung 11: Regenerierende *Callithrix jacchus*-Axone.

Die Retina neugeborener Marmosettaffen zeigt drei Tage nach Explantation ein spontanes, starkes Auswachsen ihrer RGC-Axone (B), so dass eine quantitative Bestimmung der Neuriten in einem Abstand von 200µm vom Retinarand erschwert wurde (A). Eine immunhistochemische Analyse mit GAP-43 (C), ROCK I (grün) mit β -Tubulin (rot) (D), Neurofilament 200 (E) und ROCK II (F) zeigte die jeweilige Proteinexpression in auswachsenden Axonen.

Einfluss des ROCK-Inhibitors auf die axonale Regeneration

In dieser Arbeit soll aber nicht die Regenerationsleistung des postpartalen retinalen Gewebes von Marmosetten analysiert werden, sondern der schon in früheren Studien beobachtete Einfluss des ROCK-Inhibitors Y-27632 (Calbiochem) auf die auswachsenden Axone der postpartalen Affenretina untersucht werden (Lingor et al. 2007; Lingor et al. 2008; Ahmed et al. 2009). Dabei wurde analog zum etablierten Explantationsmodell der Ratte das Affengewebe sorgfältig und zügig präpariert (siehe Material und Methoden) und anschließend die Affenretina unter den bekannten, konstanten Bedingungen kultiviert. Dabei wurde dem Kulturmedium (S4-Medium, Promocell) entweder 100µMol des ROCK-Inhibitors Y-27632 (n = 4 Augen) nach der Explantation (3h nach der Explantation, als die retinalen Explantate der Pertripermischa anhafteten) oder 24h nach Explantation (n = 3 Augen) hinzugegeben, um sowohl einen Effekt des Inhibitors auf das axonale Wachstum, als auch einen zeitabhängigen Einfluss des Hemmstoffes untersuchen zu können. Die Kontrollgruppe (n = 2 Augen) erhielt dagegen nur das Kulturmedium ohne Zusatz eines Inhibitors. Zusätzlich zu diesen drei Gruppen wurde einigen Explantaten versuchsweise auch nur 50µMol des ROCK-Inhibitors nach 24 stündiger Vorinkubation im Brutschrank hinzugegeben (n = 1 Auge), um einen Unterschied zwischen der Hemmstoffkonzentration und der Axondichte und -länge feststellen zu können.

Nach 72h im Brutschrank wurde der jeweilige Versuch beendet und die auswachsenden Axone im Hinblick auf ihre Dichte und Länge analysiert.

3.4.1 Statistische Tests zur Auswertung der Axondichte und -länge in den verschiedenen Gruppen

Zuerst wurde mit Hilfe des Programmes SPSS Statistics (IBM) eine deskriptive Statistik zur Berechnung von Medianen und Standardabweichungen sowie einer grafischen Darstellung durchgeführt. Anschließend wurde ein statistischer Test für unabhängige Stichproben, der Kruskal-Wallis-Test, durchgeführt, mit dem analysiert werden kann, ob sich die Daten hinsichtlich einer ordinalskalierten Variablen in ihrem Mittelwert unterscheiden. Die im Rahmen der Untersuchung erfassten intervallskalierten Variablen werden hierbei in ordinale Rangstufen eingeteilt. Der gewählte Test kann im Gegensatz zum klassischen t-Test oder zu einer univariaten Varianzanalyse (ANOVA) auch dann zur Anwendung kommen, wenn die der untersuchten Stichprobe zugrunde liegende Grundgesamtheit nicht normalverteilt ist. Im Rahmen eines Shapiro-Wilk- sowie eines Kolmogorow-Smirnov-Tests zur Prüfung auf eine Normalverteilung der untersuchten

Stichprobe konnte kein signifikanter Nachweis für diese Hypothese erbracht werden (siehe Abbildung 12).

Tests auf Normalverteilung der Axonlängen				
	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk	
	Statistik	Signifikanz	Statistik	Signifikanz
Axonlänge > 500µm	,175	,000	,939	,001
Axonlänge > 800µm	,136	,000	,919	,000

Tests auf Normalverteilung der Axondichte				
	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	Statistik	Signifikanz	Statistik	Signifikanz
Axondichte pro mm	,112	,198	,937	,016

Abbildung 12: Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung der Axonlänge und -dichte

Der Vorteil des Kruskal-Wallis-Test gegenüber einem einfachen Mann-Whitney-U-Test besteht darin, dass es sich um einen globalen Test handelt, d.h. er für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen angewendet werden kann, also in diesem Fall für den Vergleich von den drei untersuchten Gruppen.

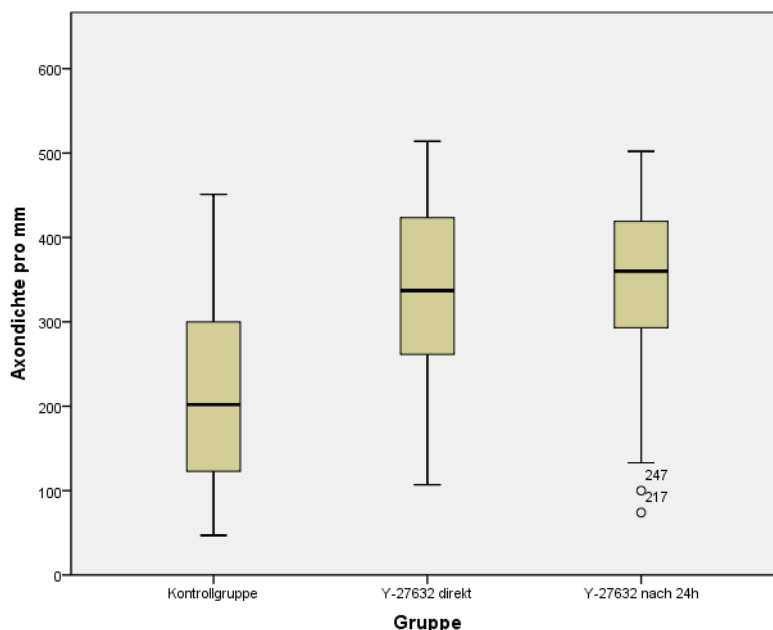
Axondichte

Mit Hilfe des Programmes AxioVision 4.7 (Zeiss) wurde die Anzahl der Axone pro mm in einem Abstand von 200µm vom Filterrand *in vitro* gezählt. Dabei wurde die Anzahl der Axone, wie eingangs schon erläutert, eher unter dem tatsächlichen Wert liegend geschätzt, da eine exakte Quantifizierung der auswachsenden Fasern zu dem gewählten Bewertungszeitpunkt nicht möglich war.

In der Gruppe, welcher der ROCK-Inhibitor Y-27632 in einer Konzentration von 100µMol direkt nach der Explantation hinzugegeben wurde (Y-27632 direkt) liegt der arithmetische Mittelwert bei 332,88 Axonen pro mm, der Median aber 337 Axonen pro mm mit einer Standardabweichung (SA) von 98,2 Axonen. Für diese Statistik verwenden wir aufgrund der unterschiedlichen Werte im Folgenden nur den Median, da dieser von extremen Werten (Ausreißern) kaum beeinflusst wird. Die Gruppe, welcher der ROCK-Inhibitor (100µMol) erst nach 24 stündiger Kultivierung hinzugegeben wurde (Y-27632 nach 24h) zeigt dagegen einen Median von 360 Axonen pro mm (SA = 96,19). Die Mediane dieser beiden Gruppen unterscheiden sich also nur gering, so dass

in diesem Fall die Annahme der Nullhypothese vermutet werden kann. Die relativ hohe Standardabweichung zeigt eine hohe Variabilität der Daten, also deutet auf eine hohe Streuung der Daten hin. Dies beruht auf der Zählung vieler verschiedener Abschnitte der untersuchten Retinaexplantate, da nicht nur die am besten regenerierenden Fasern gezählt wurden. Aufgrund der hohen Anzahl an untersuchten Explantaten (Y-27632 direkt: n = 4 Augen, aufgeteilt auf 48 einzelne Retinaexplantate in 12 Kulturschalen; Y-27632 nach 24h: n = 3 Augen, also 36 Explantate in insgesamt 9 Kulturschalen) sollte sich dieser Effekt zwischen den Gruppen aber ausgleichen. Dagegen betrug die Axondichte in der Kontrollgruppe im Median 202 Axone pro mm (SA = 119,97) und weist damit auf einen möglichen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen hin (Ablehnung der Nullhypothese).

Auch das Boxplotdiagramm kann diese Annahme grafisch unterstützen: Bei der Gegenüberstellung aller drei Gruppen ist erkennbar, dass die Werte in den Gruppen Y-27632 direkt und Y-27632 nach 24h in einem ähnlichen Bereich liegen, der Median der ersten Gruppe zeigt dabei eine geringere Axondichte pro mm an, aber gleichzeitig ist der Streubereich, d.h. der Interquartilabstand bzw. die „box“ im Diagramm größer als in der Y-27632 nach 24h Gruppe. Im Vergleich zur Kontrollgruppe scheint ein signifikanter Unterschied zwischen dieser und der Experimentalgruppe aufzutreten (siehe Abbildung 13).



Quelle: Eigene Darstellung.

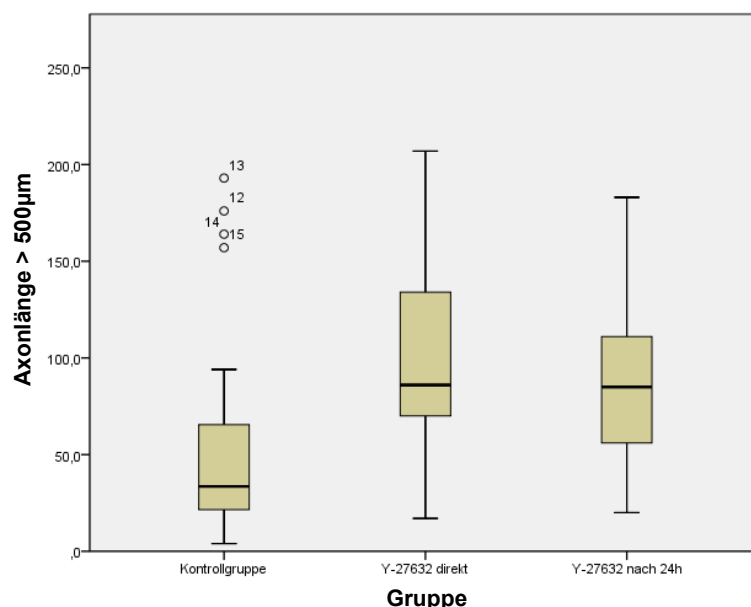
Abbildung 13: Boxplot-Diagramm – Axondichte pro mm (Primatenretina)

Zum Beweis des vermuteten Unterschiedes wurde ein Signifikanztest für unabhängige Stichproben und nicht vollständig normalverteilte Werte verwendet. Der Kruskal-Wallis-Test ist ein Signifikanztest, der das Vorliegen einer Nullhypothese (kein Effekt) überprüft und dessen Ergebnis, der p-Wert, zur Beurteilung einer Datenreihe geeignet ist. Wenn der p-Wert kleiner als das Signifikanzniveau α ($\alpha = 0,05$) ist, gilt das Ergebnis als statistisch signifikant. In dieser Datenreihe konnte zwischen den Gruppen Y-27632 direkt und Y-27632 nach 24h kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,189$), aber zwischen der Kontrollgruppe und den Experimentalgruppen konnte ein signifikanter Unterschied bewiesen werden ($p = 0,00$), so dass die Nullhypothese in diesem Fall verworfen werden konnte.

Der ROCK-Inhibitor scheint daher unter Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% einen die Anzahl der auswachsenden Axone fördernden Effekt zu haben, allerdings scheint der Zeitpunkt der Hemmstoffzugabe in die Kulturschale keine zusätzliche Auswirkung zu haben.

Axonlänge

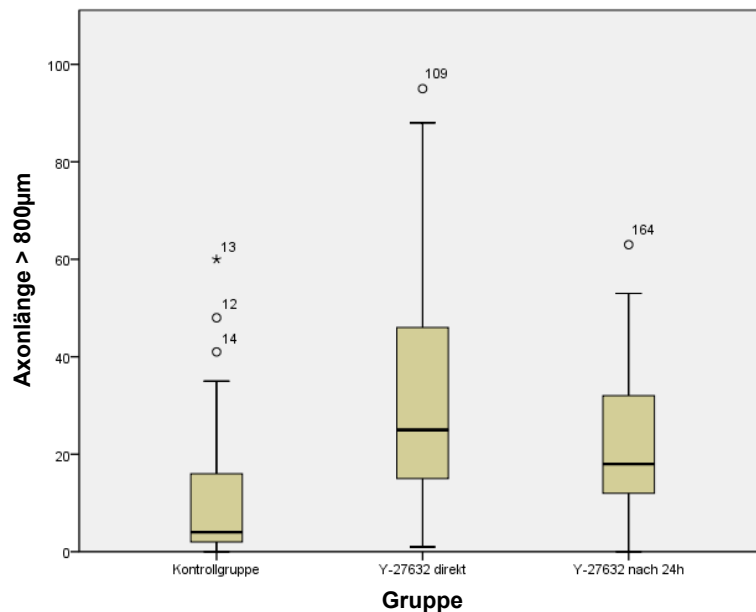
Analog zu der statistischen Datenauswertung der Axondichte wurde auch die Länge der auswachsenden Axone bewertet. Dabei wurde in einem Abstand von $500\mu\text{m}$ und $800\mu\text{m}$ vom Filter die Anzahl der auswachsenden Neuriten gezählt.



Quelle: Eigene Darstellung.

Abbildung 14: Boxplot-Diagramm – Axonlänge > $500\mu\text{m}$ (Primatenretina)

In der Kontrollgruppe wuchsen im Median 33,5 Axone (SA 50,42) über die imaginäre Linie von 500µm vom Filtrerrand hinaus, 4 Axone besaßen eine Länge von > 800µm (SA 15,14). Dagegen hatten in der Y-27632 Gruppe 86 Axone (SA 44,39) eine Länge von > 500µm und 25 Axone (SA 21,67) von > 800µm. Ein ähnliches Ergebnis fällt auch bei der Gruppe Y-27632 nach 24h auf: 85 Axone > 500µm (SA 39,72) und 18 Axone > 800µm (SA 13,54).



Quelle: Eigene Darstellung.

Abbildung 15: Boxplot-Diagramm – Axonlänge > 800µm (Primatenretina)

Ein Vergleich der Daten im Boxplot-Diagramm (siehe Abbildung 14, Abbildung 15) zeigt wie bei der Axonlänge einen ähnlichen Effekt des ROCK-Inhibitors in den Gruppen Y-27632 direkt und Y-27632 nach 24h. Die Mediane dieser beiden Gruppen sind fast identisch, aber bei der Gruppe mit der direkten Hemmstoffzugabe ist die Streubreite der Daten erheblich größer, was an der Länge der „box“ und der „Whisker“ erkennbar ist. Im direkten Vergleich zur Kontrollgruppe, dessen Median einen deutlich kleineren Wert besitzt und die trotz einiger Ausreißer nach oben eine geringere Streubreite der Daten aufweist, scheint es einen signifikanten Effekt des ROCK-Inhibitors auf die auswachsenden RGC-Axone zu geben.

Dieser mögliche Effekt wurde erneut mit dem Kruskal-Wallis-Test statistisch unter Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ untersucht. Dabei konnte im Vergleich zwischen den Experimentalgruppen und der Kontrollgruppe sowohl für den Pa-

parameter Axonlänge > 500µm, als auch für Axonlänge > 800µm die Nullhypothese abgelehnt werden, da der p-Wert jeweils $p = 0,001$ betrug.

Es gibt also nicht nur auf die Axondichte, sondern auch auf die Länge der auswachsenden Neuriten einen regenerationsfördernden Einfluss des Hemmstoffes Y-27632, der in dieser Arbeit statistisch bewiesen werden konnte.

3.4.2 Vergleich der Regeneration bei Zugabe von 50µMol und 100µMol Y-27632 nach 24h

Bei einem einzelnen Experiment wurden die retinalen Explantate eines Affenauges nach 24 h probeweise mit 50µMol statt wie üblicherweise mit 100µMol des ROCK-Inhibitors Y-27632 behandelt, um die Wirkung einer unterschiedlichen Inhibitor-Konzentration auf die axonale Regeneration der RGC zu testen.

Axondichte

Bei den Retinaexplantaten mit 50µMol Y-27632 (nach 24h im Brutschrank) wuchsen im Mittel 198,83 Axone pro mm (SA 57,06) in einem Abstand von 200µm vom Filterrand aus. In der vergleichsweise größeren Gruppe, welcher 100µMol ROCK-Inhibitor nach 24 h hinzugegeben wurde, wurden dagegen 346,65 Axone pro mm (SA 96,19) gezählt.

Die Werte zeigen die ungleiche Verteilung der Daten, wobei die 100µMol-Gruppe aufgrund der größeren Menge an Daten auch eine stärkere Streuung der Werte aufweist. Nach einer Signifikanztestung mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests kann die Nullhypothese bei einem $p = 0,000$ abgelehnt werden, d. h. in diesem Fall, dass die Konzentration des ROCK-Inhibitors durchaus einen Einfluss auf die Anzahl der auswachsenden Neuriten ausübt.

Axonlänge

In der Gruppe 50 µMol Y-27632 nach 24 h nach Explantation konnte die Anzahl der auswachsenden Axone in einem größeren Abstand vom Filterrand folgendermaßen gezählt werden: in einem Abstand von > 500µm wurden 40,4 Axone pro mm (SA 16,84) und von > 800µm wurden 20,9 Axone pro mm (SA 17,87) gemessen. In der Gruppe mit 100µMol Inhibitor konnten dagegen folgende Werte berechnet werden: In einem Abstand von > 500µm wuchsen 86,45 Axone (SA 39,72) und von > 800µm wuchsen 21,95 Neuriten pro mm (SA 13,54).

Der Mann-Whitney-U-Test lehnt für die Messung der Axone $> 500\mu\text{m}$ die Nullhypothese mit $p = 0,000$ ab, während er diese bei den Werte für Axone $> 800\mu\text{m}$ beibehält ($p = 0,631$).

Die vorliegende statistische Auswertung weist somit einen konzentrationsabhängigen Effekt des ROCK-Inhibitors Y-27632 auf die Anzahl der auswachsenden Axone auf. Die Zugabe von $100\mu\text{Mol}$ Inhibitor hat sowohl in einem Abstand von $200\mu\text{m}$, als auch von $500\mu\text{m}$ einen signifikant stärkeren wachstumsfördernden Einfluss auf die Axondichte als $50\mu\text{Mol}$ Y-27632. Allerdings scheint die Anzahl der längsten Neuriten ($> 800\mu\text{m}$) nicht von der Hemmstoff-Konzentration beeinflusst zu werden, da fast identisch viele lange Axone in diesem Abstand vom Retinafilterrand beobachtet werden konnten.

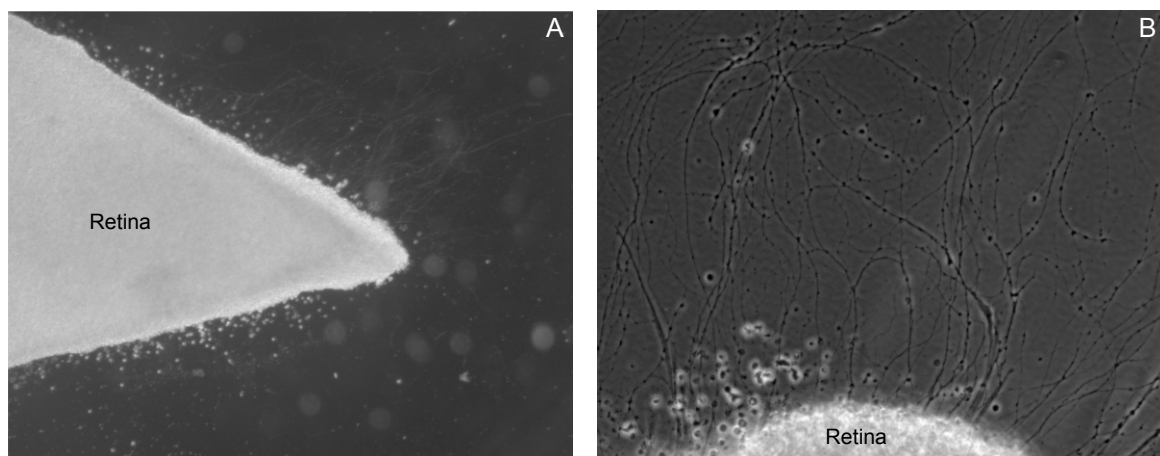
3.5 Regeneration der Rattenretina

Die Retinakultur der Ratte ist ein seit langem etabliertes Regenerationsmodell, welches das Auswachsen von RGC-Axone *in vitro* unter konstanten Bedingungen ermöglicht. Damit die Axone *in vitro* aus dem Retinaexplantat auswachsen können, ist vor der Explantation eine konditionierende, das Neuritenwachstum stimulierende Verletzung bzw. Quetschung des Sehnervens notwendig (Ford-Holevinski et al. 1986; Bähr et al. 1988). Zudem wurde diese Operation mit einer kataraktinduzierenden Linsenverletzung kombiniert, um eine deutliche Steigerung der Regenerationsleistung zu bewirken (Fischer et al. 2000). Diese Eingriffe sind für die Regeneration adulter RGC der Ratte notwendig, da eine spontane Regeneration im Gegensatz zur Affenretina nur in einem engen zeitlichen Fenster von 14-24 Tagen nach der Geburt stattfindet.

Die durch Sehnervquetschung und Linsenverletzung vorbehandelte Rattenretina zeigte *in vitro* ein starkes Auswachsen der Ganglienzellaxone besonders im Bereich der Spitze des einzelnen Retinaexplantates, da diese Lokalisation der früheren Papilla nervi optici entspricht (siehe Abbildung 16). Aber auch an den Kanten des jeweiligen Explantates wurde ein unterschiedlich starkes Axonwachstum beobachtet, welches auch für die Quantifizierung der Axondichte und –länge nach 72 stündiger Kultivierung verwendet wurde. Aus diesem Grund weisen die gewonnenen Daten zur Anzahl der Axone und ihrer Länge eine starke Streuung auf, da nicht nur die an der Retinaspitze besonders stark auswachsenden Neuriten berücksichtigt wurden. Zur Quantifizierung der Axone wurden diese – analog zum Vorgehen bei der Marmosetretina - in einem Abstand von $200\mu\text{m}$ vom Filterrand gezählt, wobei auch in diesen Versuchen die Werte wegen der hohen Axonfaszikulierung unter ihrer tatsächlichen Anzahl liegen. Allerdings kann bei

der Ratte im Vergleich zur Affenretina ein eher geringeres und damit übersichtlicheres Auswachsen der Axone beobachtet werden, so dass die hier gewonnenen Daten eher der tatsächlichen Neuritenanzahl entsprechen. Parallel zur Bestimmung der Axondichte pro mm wurde erneut die Anzahl der auswachsenden Fasern in einem Abstand von 500 μ m und 800 μ m vom Filtrerrand bestimmt, so dass auch eine Aussage zur Länge der Axone getroffen werden kann.

Eine immunhistochemische Färbung der auswachsenden Fasern mit Anti-Neurofilament 200 und GAP-43 bestätigte wie bei der Marmosetretina die neuronale Herkunft der Fasern (nicht abgebildet).



Quelle: Eigene Darstellung.

Abbildung 16: Übersicht eines Explantates adulter Rattenretina mit auswachsenden Axonen (A) und die im Vergleich zu Marmosetretina geringere Dichte der Neuriten (B).

Einfluss des ROCK-Inhibitors auf die axonale Regeneration

Die in vivo vorbehandelte Rattenretina wurde zügig präpariert und unter konstanten Bedingungen (siehe Material und Methoden) im Brutschrank kultiviert. Dem S4-Kulturmedium wurde dabei 3h nach der retinalen Explantation entweder der ROCK-Inhibitor Y-27632 in einer Konzentration von 100 μ Mol (ROCK-Inhibitor direkt) oder überhaupt kein Hemmstoff (Kontrollgruppe) hinzugesetzt, um einen Einfluss der Rho-Kinasehemmung auf die auswachsenden Fasern analysieren zu können.

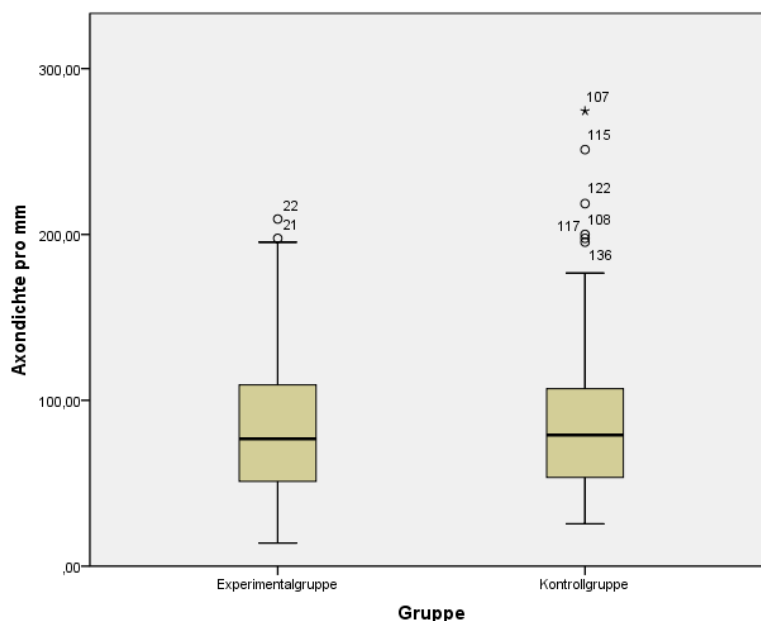
Nach 72 stündiger Kultivierung wurde der Versuch jeweils abgebrochen und die Anzahl bzw. Länge der auswachsenden Axone in der ROCK-Inhibitor direkt Gruppe (n = 7 Augen) und der Kontrollgruppe (n = 6 Augen) quantifiziert.

3.5.1 Statistische Testung

Wie bei der Auswertung der Regenerationsleistung der Marmosetretina wurden auch bei den Versuchen an der Ratte zuerst eine deskriptive Statistik mittels SPSS und anschließend ein Signifikanztest durchgeführt. Allerdings wurde in diesem Fall der Mann-Whitney-U-Test als Signifikanztest für unabhängige paarweise Stichproben gewählt, da nur zwei zu vergleichende Gruppen vorlagen.

Axondichte

Die Anzahl der auswachsenden Fasern wurde mit Hilfe des Programmes AxioVision 4.7 (Zeiss) in einem Abstand von 200µm vom Filterrand quantifiziert. In der ROCK-Inhibitor direkt Gruppe wurde der Median mit 76,74 Fasern pro mm (SA 43,36) bestimmt, während in der Kontrollgruppe 79 Axone pro mm (SA 51,26) gezählt werden konnten.



Quelle: Eigene Darstellung.

Abbildung 17: Boxplot-Diagramm – Axondichte pro mm (Rattenretina)

Besonders im Boxplot-Diagramm kann die Ähnlichkeit der Daten grafisch gut dargestellt werden: Die Mediane und der Interquartilabstand, der die Lage von 50% der Daten

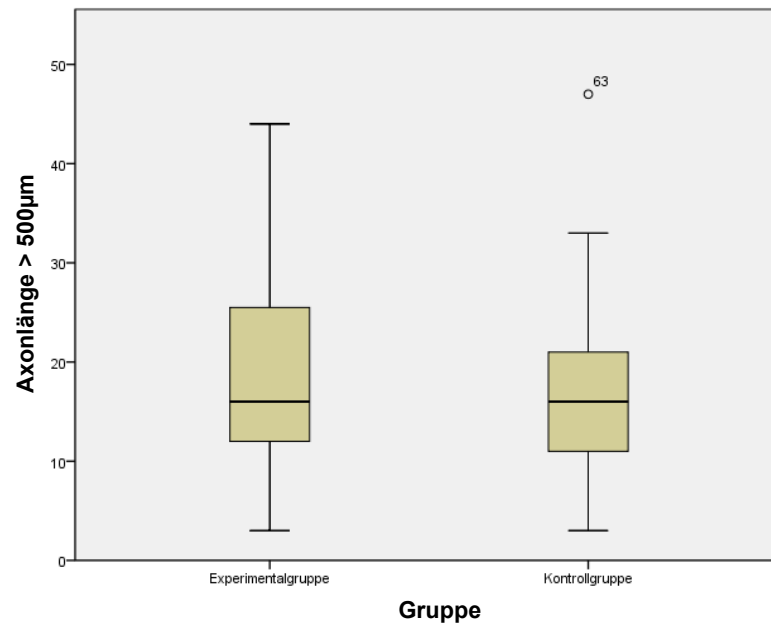
anzeigt, liegen in fast identischen Bereichen (siehe Abbildung 17). Allerdings sind in der Kontrollgruppe deutlich mehr Ausreißer nach oben erkennbar, die ein sehr starkes axonales Wachstum aus einigen Retinaexplantaten demonstrieren. Aufgrund dieser Daten und ihrer Verteilung wurde ein nicht-signifikanter Effekt des ROCK-Inhibitors auf auswachsende Fasern in adulten RGC der Ratte angenommen und somit die Beibehaltung der Nullhypothese vermutet.

Zum Beweis wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests der Signifikanzwert $p = 0,513$ bestimmt, so dass mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von 5% die Nullhypothese beibehalten werden konnte.

Y-27632 scheint demnach keinen hier messbaren Einfluss auf die Anzahl der auswachsenden Axone in der adulten Rattenretina zu haben.

Axonlänge

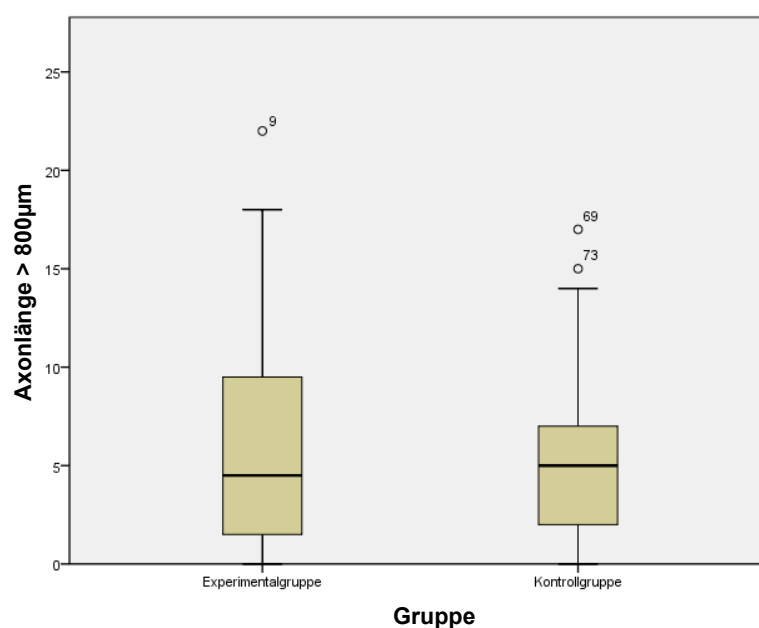
Wie bei den regenerierten Fasern der Affenretina wurden auch die auswachsenden Axone der Rattenretina in einem Abstand von 500 μm und 800 μm vom Filtrerrand bestimmt. Der Median für Neuriten $> 500\mu\text{m}$ liegt dabei bei 16 Axonen pro mm (SA 11,95) in der Experimentalgruppe, welcher 100 μMol des ROCK-Inhibitors nach der Explantation hinzugegeben wurde. In der Kontrollgruppe konnten auch 16 Axone pro mm (SA 8,43) in dieser Entfernung gezählt werden. Ähnliche Daten konnte für die Anzahl der auswachsenden Fasern in einem Abstand von $>800\mu\text{m}$ vom Filtrerrand gewonnen werden: 4,5 Axone pro mm (SA 5,44) in der Gruppe ROCK-Inhibitor direkt und 5 Axone pro mm (SA 4,08) in der Kontrollgruppe.



Quelle: Eigene Darstellung.

Abbildung 18: Boxplot-Diagramm – Axonlänge > 500µm (Rattenretina)

Die grafische Darstellung als Boxplotdiagramm zeigt sowohl bei der Axonlänge > 500µm, als auch bei der Länge > 800µm eine ähnliche Verteilung der Werte in den beiden Gruppen (siehe Abbildung 18, Abbildung 19). Die Mediane nehmen fast identische Werte an, nur die Streuung der Daten ist in der Experimentalgruppe stärker ausgeprägt als in der Kontrolle, wie an der Länge der „Whisker“ und an der Länge der „box“ erkennbar ist.



Quelle: Eigene Darstellung.

Abbildung 19: Boxplot-Diagramm – Axonlänge > 800µm (Rattenretina)

Eine anschließende Testung mit dem Mann-Whitney-U-Test ergab nicht signifikante Werte mit einem $p=0,468$ für die Verteilung der Axone > 500µm und einem $p=0,702$ für den Parameter Axonlänge > 800µm, so dass in diesem Fall die Nullhypothese erneut beibehalten werden konnte.

Die Auswertung der Daten bezüglich der Anzahl der auswachsenden Fasern und der Länge der Axone ergab einen nicht-signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, welche mit Y-27632 in einer Konzentration von 100µMol vorbehandelt wurde. Die RGC der adulten Ratte scheinen damit im Vergleich zu dem postpartalem Gewebe des Marmosettaffen nicht auf eine Inhibition der Rho-Kinase mit einem vermehrten oder verstärkten Auswachsen von regenerierenden Fasern zu reagieren.

4 Diskussion

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde anhand von immunhistochemischen Färbungen an kryokonservierter Affenretina die Expression regenerationsassoziiierter Proteine während der Reifung und Alterung der Retina untersucht. Im ersten Schritt sollte überprüft werden, ob der ausgewählte Antikörper überhaupt für das Gewebe des *Callithrix jacchus* geeignet war, denn viele Antikörper sind nach Herstellerangaben nur für Ratte, Maus oder andere Nager getestet worden. Insofern war es nicht überraschend, dass sechs der 15 verwendeten Antikörper nicht mit dem Gewebe der Affenretina reagierten. Dabei muss bedacht werden, dass in diesen Fällen keine Aussage hinsichtlich der Proteinexpression gemacht werden kann, da eine Unterscheidung zwischen einer fehlenden Proteinexpression oder einer fehlenden Antikörperbindung nicht möglich ist. Im zweiten Schritt wurden bei den positiven immunhistochemischen Färbungen das Regulationsmuster der Proteine im Laufe der weiteren retinalen Entwicklung beschrieben und mit Hilfe der Literatur mit bereits bestehenden Erkenntnissen verglichen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde anhand des etablierten Regenerationsmodelles (Ford-Holevinski et al. 1986; Bähr et al. 1988) nach Quetschung des Sehnervens und Linsenverletzung (Fischer 2000) das Wachstum retinaler Axone *in vitro* initiiert, damit die regenerationsfördernde Wirkung des ROCK-Inhibitors Y-27632 an auswachsenden Axonen analysiert werden konnte. Y-27632 zeigte in verschiedenen Studien (Ishizaki et al. 2000; Lingor et al. 2007; Lingor et al. 2008; Ahmed et al. 2009) eine das Neuritenwachstum stimulierende Wirkung, jedoch wurden diese Experimente in dieser Arbeit erstmals an dem erprobten Regenerationsmodell der adulten Ratte (siehe Material und Methoden) und an dem spontan regenerierenden postpartalen Gewebe des Affen *Callithrix jacchus* durchgeführt.

4.1 Immunhistochemische Proteindetektion in der Affenretina

Im Folgenden werden nur die positiven Antikörperfärbungen einzeln vorgestellt und mit Ergebnissen aus früheren Studien verglichen.

4.1.1 GAP-43

Das zytoplasmatische Growth associated Protein wurde erstmals bei Kröten (Skene et al. 1981), später auch bei anderen Lebewesen wie z. B. Ratten, Schlangen, Kaninchen, Kühen und auch beim Menschen v. a. in der inneren plexiformen Schicht nachgewiesen (McIntosh et al. 1991). Das Phosphoprotein wird allgemein mit neuronaler Plastizität,

ZNS-Entwicklung und Regeneration in Verbindung gebracht, obwohl seine genaue Funktion bis dato noch nicht vollständig geklärt ist. GAP-43 wird schon in der frühen ZNS-Entwicklung ab dem 15. embryonalen Tag in den Somata und Axonen der retinalen Ganglienzellen exprimiert (Reh et al. 1989) und postnatal bei den meisten Vertebraten teilweise oder vollständig herunterreguliert, wobei es sich dann meist in der inneren plexiformen Schicht konzentriert. Dagegen wird es in assoziativen Hirngebieten wie z. B. dem Hippocampus auch im adulten Zustand weiterhin gebildet, weswegen es dort mit der neuronalen Plastizität in Verbindung gebracht wird (Benowitz et al. 1997).

Im ZNS kann GAP-43 schon nach der letzten Zellteilung in Neuronen detektiert werden (Dani et al. 1991). Reh und Kljavin (1989) zeigten, dass GAP-43 in der Retina während der embryonalen Entwicklung und der ersten postnatalen Woche nur in den Somata und Axonen der RGC exprimiert wird. Bei der Ratte ist in der weiteren postnatalen Entwicklung und im adulten Zustand die Immunreaktivität für dieses Antigen auf die innere plexiforme Schicht beschränkt (Reh et al. 1989; McIntosh et al. 1991), welche die Fortsätze der amakrinen, bipolaren und Ganglienzellen enthält. Auch in der inneren nukleären Schicht können einige Zellen beim adulten Tier mit GAP-43 angefärbt werden, aber Reh et al. (Reh et al. 1993) vermuteten, dass es sich hierbei um eine Unterklasse von amakrinen Zellen handelt, welche in direkter Nachbarschaft zur IPL liegt. Generell wird GAP-43 während des Axonwachstums und der Synapsenformierung gebildet und postnatal herunter reguliert, wenn die neuronalen Verbindungen voll entwickelt sind (Skene et al. 1981). Eine Reexpression kann aber durch Axotomie (Doster et al. 1991; Meyer et al. 1994), Ischämie (Ju et al. 2002), ein peripheres Nervenstransplantat (Ng et al. 1995) oder nach einer Behandlung mit dem neurotrophen Faktor CNTF (Jo et al. 1999) erneut initiiert werden.

Die im ZNS von Vertebraten eingeschränkte Regenerationsfähigkeit adulter RGC ist u. a. auf die fehlende bzw. sehr geringe Expression von GAP-43 zurückzuführen (Meyer et al. 1994; Schaden et al. 1994). Während das zytoplasmatische Protein in der embryonalen Entwicklung noch in den RGC, in Axonen und besonders in deren Wachstumskegeln (Skene et al. 1986; Meyer et al. 1994) vorhanden ist, wird es postnatal weniger bis gar nicht mehr exprimiert, sodass ein Zusammenhang mit dem verminderten Regenerationspotential adulter Ganglienzellen angenommen wird (Benowitz et al. 1997). Diese Annahme wird durch vielfältige Versuche in den letzten zwei Jahrzehnten unterstützt. Einerseits konnte mit Hilfe von Experimenten an transgenetischen Mäusen bewiesen werden, dass eine Überexpression von GAP-43 zur spontanen Ausbildung aberranter

Synapsen an der motorischen Endplatte und an den sog. Moosfasern der Körnerzellen im Hippocampus führt (Aigner et al. 1995). Im Hippocampus projizierten diese Moosfasern bei den transgenetischen Mäusen nicht nur vom Gyrus dentatus in das Stratum lucidum, sondern auch darüber hinaus in das Stratum oriens. Aber auch an der motorischen Endplatte konnten Aigner et al. eine verstärkte spontane Synapsenbildung nach Blockade der Erregungsübertragung durch Botulinumtoxin beobachten, sodass sie GAP-43 eine wichtige Rolle bei dem Auswachsen von Axonen zuschrieben.

Andererseits konnte in Studien, in denen die GAP-43 Expression supprimiert wurde, die gegenteilige Bedeutung des Phosphoproteins dargestellt werden. In embryonalen Hühnchen verloren die primären sensorischen Neurone auf einer Poly-D-Lysin-Kultur die Fähigkeit, Axone auszubilden, wenn sie zuvor mit zu GAP-43 mRNA komplementären Antisense-Oligonukleotiden behandelt wurden (Aigner et al. 1993). Sobald diese zuvor mit Antisense-Oligonukleotiden behandelten Zellen aber auf einem Lamininsubstrat kultiviert wurden, bildeten die Neurone immerhin sehr dünne Prozesse mit atrophierten Wachstumskegeln aus. Auch an Mäusen, die eine Nullmutation im Exon des GAP-43 Genes aufzeigten, konnte die Bedeutung des Phosphoproteins für das Axonwachstum bewiesen werden. Diese Mäuse zeigten Defekte während des Auswachsens der Axone durch das Chiasma opticum und verstarben meist kurz nach der Geburt trotz eines ansonsten normalen Nervensystems (Strittmatter et al. 1995).

Studien zeigten immer wieder, dass GAP-43 neben anderen, hier nicht weiter untersuchten Proteinen, einen großen Einfluss auf das Auswachsen der Axone während der Entwicklung des ZNS und während der Regeneration zentraler Neurone wie der RGC hat (Doster et al. 1991; Meyer et al. 1994). Im Gegensatz zu der Ratte, die während der Entwicklung und postnatal GAP-43 in den RGC exprimiert und danach im adulten Zustand herunterreguliert (Benowitz et al. 1997), wird das Protein in der Affenretina auch beim adulten Tier weiterhin gebildet (Rose et al. 2008). Diese altersunabhängige GAP-43-Expression haben Rose et al. mit der lebenslangen, im Alter aber dennoch abnehmenden Regenerationskapazität retinaler Ganglienzellen in Verbindung gebracht. Auch in der Hühnchenretina ist die spontane Regeneration der RGC mit einer konstitutiven GAP-43 Expression assoziiert (Vanselow et al. 1991), wohingegen die Regeneration retinaler Axone bei der Ratte eine konditionierende Vorbehandlung erfordert, aber dann auch mit einer verstärkten GAP-43-Expression einhergeht (Schaden et al. 1994; Leon et al. 2000).

Die immunhistochemischen Ergebnisse dieser Arbeit stehen damit in Einklang mit der derzeitigen Literatur hinsichtlich der konstanten Expression des Phosphoproteins GAP-

43 in der Retina des Affen *Callithrix jacchus*. In der fetalen Retina wird GAP-43 in den Somata und Axonen der RGC gebildet (Reh et al. 1989) und ist somit in unseren immunhistochemischen Färbungen nur in der Ganglienzellschicht und der angrenzenden vitreoretinalen Grenzschrift zu finden. In der weiteren Entwicklung zeigt sich ein Maximum der Proteinexpression in der postnatalen Retina, da zu diesem Zeitpunkt die Synapsenformierung und die terminalen Verzweigungen der Axone im Vordergrund stehen (Benowitz et al. 1997). Während der weiteren Alterung der Retina kommt es zwar – im Vergleich zum postnatalen Stadium - zu einer Reduktion der GAP-43 Bildung in der Affennetzhaut, jedoch ist in allen Altersstufen eine durchgehende Proteinexpression erkennbar. Während in der Rattenretina sich diese hauptsächlich auf die innere plexiforme Schicht beschränkt (McIntosh et al. 1991), ist beim Affen eine Immunreaktivität in der ONL, OPL und besonders in der Ganglienzellschicht erkennbar. Desweiteren werden Strukturen angefärbt, die von den RGC durch die innere nukleäre Schicht zur OPL ziehen und morphologisch den Fortsätzen von bipolaren und interplexiformen Zellen entsprechen. Die Anfärbbarkeit von diesen Strukturen wurde auch schon von McIntosh und Blazynski in der Netzhaut von Menschen beschrieben, sodass hier ein enger Bezug zur Primatennetzhaut hergestellt werden kann.

4.1.2 GFAP

Das Intermediärfilamentprotein GFAP wurde erstmals in Hirngewebe von Patienten mit Multiple Sklerosis Plaques isoliert (Eng et al. 1971) und gilt bis heute als verlässlicher Marker für Astrozyten im ZNS und findet daher u. a. Verwendung bei der Diagnostik von glialen Hirntumoren. Als Hauptintermediärfilament in den reifen Astrozyten hat es vielfältige Aufgaben wie z. B. die Modulation der Astrozytenbeweglichkeit und –form oder ein Einfluss auf die Stabilität der Astrozytenfortsätze. Allgemein kommt es einerseits zu einem graduellen Anstieg dieses zytoplasmatischen Proteins in Astrozyten während des gesamten Lebens (Nichols et al. 1993; Eng et al. 2000), andererseits kommt es als Reaktion auf Stress im ZNS zu einem rapiden Anstieg von GFAP innerhalb weniger Stunden, wenn die Astrozyten auf ein Trauma, Ischämie oder eine Erkrankung reagieren (Eng et al. 2008).

In der Retina von Säugetieren gibt es zwei verschiedene Gliatypen: Die sternförmigen Astrozyten, deren Somata in der Ganglienzellschicht liegen und die mit ihren Fortsätzen die Axone der Ganglienzellen bis zum Sehnerven begleiten. Als radiäre Glia dagegen werden die Müllerzellen bezeichnet, deren Somata in der INL verankert sind und deren Fortsätze sich durch die gesamte Retina ziehen, wodurch sie die benachbarten Zellen stützen. Müllerzellen haben durch ihre spezielle Lokalisation in der Retina vielfältige

Aufgaben wie z. B. die Aufrechterhaltung der Homöostase durch Regulation der intra- und extrazellulären Konzentrationen von Calcium, Kalium und Glutamat, die Kontrolle des retinalen pH-Wertes oder als unterstützende Energiequelle für Neuronen (Newman et al. 1996). Sie kommunizieren dabei über Ionenkanäle, Neurotransmitterrezeptoren und verschiedenen Transportsystemen mit den einzelnen Zellen der Retina.

In der normalen Retina ist die konstitutive GFAP Expression bei den meisten Vertebraten auf die Astrozyten in der Faserschicht beschränkt, aber nach einer Verletzung im okulo-retinalen Bereich wird das zytoplasmatische Protein hauptsächlich in den Müllerzellen verstärkt exprimiert (Dahl 1979). Dabei kann das in den Müllerzellen ansonsten nur gering exprimierte Intermediärfilament als Antwort auf verschiedene degenerative Prozesse oder Verletzungen plötzlich hochreguliert werden: durch Retinitis pigmentosa (Rodrigues et al. 1987), altersbedingte Makuladegeneration (DiLoreto Jr et al. 1995), retinale Ischämie (Fitzgerald et al. 1990; Osborne et al. 2009), Quetschung des N. opticus (Chen et al. 2002), Glaukom (Tanihara et al. 1997) oder durch andere retinale Erkrankungen und Verletzungen (Lewis et al. 2003). Als Folge dieser pathologischen Prozesse kommt es zu einer Aktivierung der retinalen Gliazellen mit konsekutiver Überexpression des Intermediärfilamentes GFAP im Zytoplasma. Reaktive Astrozyten und v. a. Müllerzellen gehen mit einer sog. Astroglie einher, die mit der Inhibierung des axonalen Wachstums und einer Neuronendegeneration assoziiert ist (Ridet et al. 1997). Verschiedene Studien konnten allerdings auch einen regenerationsfördernden Einfluss der aktivierten Gliazellen nachweisen, da die aktivierten Astrozyten auch neurotrophe und regenerationsfördernde Faktoren sezernieren (Cai et al. 2001; Tardy 2002). Die retinalen Gliazellen können also nach einer Verletzung einerseits die neuronale Regeneration durch ihre gliale Narbe inhibieren, andererseits produzieren sie aber auch verschiedene regenerationsfördernde Faktoren, die damit das axonale Wachstum positiv beeinflussen. Verschiedene Studien haben diesen kontroversen Einfluss der Astroglie auf die axonale Regeneration durch Experimente mit Antisense-Oligonukleotiden und GFAP-knockout Mäusen weiter untersucht. So zeigten z. B. Lefrancois et al. in Neuronen-Astrozyten-Cokulturen, dass die Blockade der GFAP-Synthese durch Antisense-Oligonukleotiden zu einer Reduktion der glialen Hypertrophie führt und eine verstärkte neuronale Regeneration zur Folge hat (Lefrancois et al. 1997). So konnte die ansonsten übliche Blockade des Neuritenwachstums wirkungsvoll in einer *in vitro*-Studie unterdrückt werden.

In dieser Arbeit sollte die altersabhängige Expression des zytoplasmatischen Intermediäproteins GFAP in der Retina des Weißbüschelaffens untersucht werden. Bei

der immunhistochemischen Analyse zeigte sich eine altersbedingte Zunahme des Proteins. In der fetalen Retina wurden nur die Astrozyten in der Ganglienzellschicht angefärbt, während in der postnatalen Retina zum einen diese Astrozyten eine deutliche Zunahme in der GFAP-Signalintensität zeigten, zum anderen aber auch schon die Fortsätze der Müllerzellen leicht angefärbt werden konnten. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen aus einer Studie an der menschlichen Retina, in der die GFAP-Expression in der sich normal entwickelnden humanen Retina analysiert wurde (Karim et al. 1996). Das Intermediärprotein konnte schon ab der 24. Schwangerschaftswoche in der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht zuerst in der Nähe des Sehnerveneintrittes und später auch in den übrigen Netzhautarealen nachgewiesen werden. Jedoch konnte eine Anfärbung der Müllerzellen in der humanen Retina erst im adulten Stadium beobachtet werden. Dagegen kommt es in der Primatenretina schon ab dem postnatalen Alter zu einer stetig ansteigenden GFAP-Intensität in den Müllerzellen, wobei diese jedoch immer von einem stärkeren GFAP-Signal in den Astrozyten der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht überlagert wird. Die Annahme, dass sich die GFAP-Expression in der Retina nur auf die Astrozyten beschränkt (Dahl 1979) und dass die Müllerzellen in der normalen Netzhaut nur eine Hochregulation dieses Proteins als Folge von Verletzungen und pathologischen Prozessen (siehe oben) zeigen, konnte in den letzten Jahren widerlegt werden. Lewis und Fisher (2003) berichten in ihrem Review, dass der basale GFAP-Level in den Müllerzellen je nach Spezies variiert. In Mäusen, Ratten und Eichhörnchen kann kein oder nur sehr wenig GFAP gefunden werden, während in den Müllerzellen von Katzen oder Menschen eine moderate Menge an GFAP exprimiert wird. Dieses scheint auch bei den mit dem Menschen nah verwandten Primaten zuzutreffen, denn in der hier untersuchten Retina konnte schon im postnatalen Alter sowie bei dem 4 Wochen alten Affen eine beträchtliche Menge an GFAP in den Müllerzellen nachgewiesen werden, die nicht mit dem graduellen Anstieg der GFAP-Expression im zunehmenden Alter erklärt werden kann (Nichols et al. 1993; Eng et al. 2000). Eine vermehrte GFAP-Synthese und Aktivierung der Müllerzellen kann mit steigendem Alter auch in den hier vorliegenden immunhistochemischen Aufnahmen beobachtet werden. Dieser Prozess ist dabei auf die Reifung der Gliazellen und auf eine altersbedingte retinale Degeneration zurückzuführen (DiLoreto Jr et al. 1995). Aber nicht nur in den Müllerzellen ist eine GFAP-Zunahme mit dem Alter zu verzeichnen, sondern auch die Astrozyten zeigten eine vermehrte Expression dieses Intermediärproteins während ihrer altersbedingten Reifung und nach einer Aktivierung (Eng et al. 2000).

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass GFAP eine alters- und reifungsbedingte Zunahme seiner Expression in der Primatenretina zeigt, wobei diese

nicht nur typischerweise in Astrozyten, sondern auch in Müllerzellen beobachtet werden kann. Überraschend war in diesem Kontext eine konstitutive GFAP-Produktion in den Müllerzellen ab dem Tag der Geburt, da ein GFAP-Signal in diesen Zellen in den meisten Studien nur mit altersbedingter Degeneration oder mit pathologischen Prozessen im oculo-retinalen Bereich assoziiert wird.

4.1.3 $\alpha_5\beta_1$ -Integrin

Die Integrine gehören zu den transmembranösen Zelladhäsionsmolekülen, die den Zell-Zell bzw. Zell-Extrazellulärmatrixkontakt vermitteln und dadurch viele physiologische und pathologische Prozesse wie z. B. Wundheilung, Immunantwort, Thrombozytenaggregation, Tumordinvasion oder Embryogenese beeinflussen können (Elner et al. 1996). Wichtige Bestandteile der Extrazellulärmatrix sind neben den Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen die Glykoproteine wie Kollagen, Laminin und Fibronectin, welche die Substrate für die transmembranösen Integrine darstellen.

Integrine sind heterodimere Moleküle, die aus einer nicht-kovalent gebundenen α - und β -Untereinheit bestehen. Aus den derzeit bekannten 18 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten können durch Kombination mehr als 20 verschiedene Integrine entstehen, die jeweils einen oder mehrere Liganden besitzen (van der Flier et al. 2001; Hynes 2002). Jedes Integrin hat dabei einen langen extrazellulären, einen transmembranösen und einen kurzen intrazellulären Anteil, wobei die intrazelluläre β -Kette das Glykoprotein am Zytoskelett der Zelle verankert. Die extrazelluläre Proteindomäne dagegen erkennt spezifische Ligandenbereiche wie z. B. die Tripeptidsequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (die sog. RGD-Sequenz), wodurch ein extrazelluläres Molekül wie Fibronectin an seinen Rezeptor $\alpha_5\beta_1$ -Integrin gebunden wird. Dadurch kann dieses Integrinmolekül Signale aus der Extrazellulärmatrix oder von umgebenen Zellen an den Intrazellulärraum weiterleiten und spielt daher u. a. eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung und Differenzierung. Dieses konnten Yang et al. in Experimenten an genetisch veränderten Mäusen zeigen, denen das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin während der embryonalen Entwicklung fehlte. Die mutierten Embryonen wiesen schon ab dem 9. Schwangerschaftstag sichtbare Defekte am Hinterstrang und am Mesoderm des Dottersackes auf und verstarben schließlich am 10-11. Tag (Yang et al. 1993). Weiterhin ist auch die embryonale Blutgefäßbildung neben anderen Integrinen, Extrazellulärmolekülen und Wachstumsfaktoren wie VEGF auf das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin und seinen Liganden Fibronectin angewiesen. Mäusen, denen das α_5 -Integrin fehlte, zeigten erweiterte Blutgefäße im Dottersack und im Embryo selbst sowie eine reduzierte Blutgefäßkomplexibilität, die mit der einer verminderten Aggregation von Fibronectin *in vivo* assoziiert war (Francis

et al. 2002). Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass $\alpha_5\beta_1$ -Integrin und Fibronectin für die frühe Vasculogenese und Angiogenese bedeutsam sind. Auch andere Arbeitsgruppen konnten durch Fibronectin-Knockout Versuche den Einfluß dieses Integrins und seines Liganden auf die Gefäßbildung nachweisen wie z. B. auf die Herzgefäße (George et al. 1997). Während $\alpha_5\beta_1$ -Integrin im embryonalen Hühnchengewebe noch weitverbreitet und reichlich vorhanden ist, kommt es dagegen beim adulten Tier zu einer reduzierten Expression (Muschler et al. 1991). Die α_5 -Untereinheit wird dann hauptsächlich in Blutgefäßen und Bindegewebe exprimiert, aber nicht mehr in vielen anderen Geweben wie adulten Neuronen. Diese dramatische Proteinreduktion nach der terminalen Zelldifferenzierung konnte u. a. auch in Keratinozyten nachgewiesen werden (Adams et al. 1990).

Auch im Auge wird der Fibronectinrezeptor $\alpha_5\beta_1$ -Integrin in verschiedenen Geweben gebildet: In der Hornhaut kann er auf epithelialen, stromalen und endothelialen Zellen nachgewiesen werden und spielt dort eine bedeutsame Rolle während der Wundheilung nach cornealen Epithelverletzungen (Lauweryns et al. 1991; Tervo et al. 1991). Daneben konnte er auch im trabekulären Maschenwerk (Zhou et al. 1996) sowie in der humanen Retina und der Choroidea immunhistochemisch detektiert werden (Brem et al. 1994). In der Netzhaut findet sich $\alpha_5\beta_1$ hauptsächlich im Endothel der retinalen Gefäße, aber auch in geringerem Maß in der Photorezeptorschicht, der INL und der Ganglienzellschicht. Weiterhin konnte das EZM-Protein Fibronectin in der Membrana limitans interna und externa lokalisiert werden (Kohno et al. 1987; Russell et al. 1991), wo es zusammen mit Laminin der Befestigung der inneren Grenzmembran sowohl an den Glaskörper, als auch an die Müllerzellen dient (Brem et al. 1994).

Weiterhin zeigten Studien eine Beteiligung der Integrine bei bestimmten pathologischen Prozessen im Auge. So ist eine Akkumulation von EZM-Material in der verdickten Basalmembran bei der diabetischen Mikroangiopathie bekannt. Es kommt dabei auch zu einer veränderten Expression der einzelnen Integrin-Subtypen in den Gefäßendothelzellen und in den proliferativen Membranen, weshalb von einer stärkeren Bindung der Endothelzellen an extrazelluläre Proteine wie Fibronectin, Kollagen und Laminin ausgegangen wird (Roth et al. 1993; Robbins et al. 1994). Daneben zeigten immunhistochemische Studien auch die Expression von verschiedenen Integrin-Untereinheiten wie z. B. α_5 und β_1 in den fibrozellulären Membranen bei einer proliferativen Vitreoretinopathie (Brem et al. 1994) und in choroidealen Neovaskularisationen (Umeda et al. 2006). Bei letzteren konnte aufgrund der Bedeutung des $\alpha_5\beta_1$ -Integrins bei der Angiogenese eine Suppression der neu gebildeten Gefäße durch selektive $\alpha_5\beta_1$ -

Antagonisten erwirkt werden. Umeda zeigte in seinen Experimenten, dass $\alpha_5\beta_1$ in den choroidalen Neovaskularisationen verstärkt exprimiert wird und dass seine kontinuierliche Blockade mit Hilfe einer osmotischen Minipumpe die Gefäßneubildung unterdrückt bzw. diese sich zurückbildet, da in den Endothelzellen die Apoptose ausgelöst wird.

Aber nicht nur in pathologischen Prozessen, sondern auch in der physiologischen Entwicklung der zerebralen Blutgefäße spielt das $\alpha_5\beta_1$ -Integrins eine bedeutsame Rolle. Brem und seine Kollegen zeigten die Omnipräsenz dieses Proteins in retinalen und choroidalen Gefäßen, aber 2002 konnte die Arbeitsgruppe um Milner die differentielle Regulation dieses Integrins während der Angiogenese im ZNS beweisen (Milner et al. 2002). Während der normalen zerebralen Gefäßentwicklung sind Wachstumsfaktoren wie vascular endothelial growth factor (VEGF) und basic fibroblast factor (bFGF), aber auch EZM-Proteine wie Fibronectin und Laminin von entscheidender Bedeutung. Besonders den α_v -Integrinen wurde in diesem Zusammenhang viel Aufmerksamkeit zuteil (Brooks et al. 1994; Clark et al. 1996), aber weitere Versuche zeigten außerdem eine Rolle der β_1 -Integrine während der Angiogenese. So entwickelten embryonale Stammzellen, denen β_1 fehlte, keine Blutgefäße (Bloch et al. 1997) und durch die Neutralisation von $\alpha_5\beta_1$ im Tumorangiogenesemodell in Maus oder Hühnchen wurden die Gefäßneubildung und das Tumorwachstum gehemmt (Kim et al. 2000; Kim et al. 2000). Aufgrund dieser Ergebnisse untersuchten Milner et al. die Integrinexpression im Gefäßsystem von postnatalen und adulten Mäusehirnen und zeigten, dass es während der Reifung der ZNS-Gefäße zu einem Wechsel in der Integrinexpression kommt: Die α_1 und α_6 -Untereinheit zeigen zwischen dem 1. postnatalen Tag bis zum adulten Stadium eine kontinuierliche Expressionssteigerung, wohingegen α_4 und α_5 als typische Fibronectinrezeptoren eine gegensätzliche Reaktion mit Abnahme der postnatal noch hohen Proteinbildung aufweisen. Gleichzeitig nimmt auch die Synthese des Fibronectins vom postnatalen bis zum adulten Alter ab. Die Reifung der ZNS-Gefäße geht also mit einer verstärkten Bildung von $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_6\beta_1$ sowie ihres Liganden Laminin sowie mit einer verminderten Produktion von $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_5\beta_1$ und ihrem Substrat Fibronectin einher. Fibronectin und sein Integrinrezeptor scheinen demnach wegen ihrer Expression in der frühen aktiven Angiogenese die weitere endotheliale Zellproliferation und -migration zu beeinflussen.

In dieser Arbeit wurde nicht wie bei Milner et al. die $\alpha_5\beta_1$ -Integrinexpression in zerebralen, sondern in retinalem Gewebe analysiert. In der fetalen Affennetzhaut zeigt sich eine ausgeprägte Signalintensität des $\alpha_5\beta_1$ nur in Gefäßen der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht, wobei die angefärbten Zellen eher in Aggregaten bzw. Klumpen als in ge-

fäßartigen Röhren angeordnet sind. Diese Ergebnisse stimmen mit der von Hendrickson untersuchten Blutgefäßentwicklung im *Callithrix jacchus* überein (Hendrickson et al. 2006). Ihrer Studie nach gehen am 100. Fetaltag erste Blutgefäße aus dem Gewebe am Sehnerven und an der Sehnervpapille hervor und wachsen weiter peripher in die Nervenfaser- und Ganglienzellschicht ein. Auch die sich entwickelnden Kapillaren des Choroids können zu diesem Zeitpunkt schon angefärbt werden wie an der diffusen Färbung oberhalb der ONbL erkennbar ist. Desweiteren haben Hendrickson und ihre Kollegen auch die Assoziation der Blutgefäße mit Astrozyten durch eine weitere GFAP-Färbung analysiert und haben entdeckt, dass die Astrozyten in der fetalen Entwicklung nicht nur die Blutgefäße während ihres Wachstums begleiten, sondern ihnen auch bis zum Gefäßplexus zwischen INL und IPL immer räumlich vorangehen.

In der hier vorgestellten immunhistochemischen Färbung der postpartalen Retina kann eine im Vergleich zur fetalen Retina zunehmende und sich ausbreitende Fluoreszenz des $\alpha_5\beta_1$ -Integrins beobachtet werden. Die Zunahme dieses Signales ist wahrscheinlich auf die Bedeutung dieses Membranproteins und seines Liganden Fibronektin in der frühen Angiogenese zurückzuführen, da es nach Milner et al. zu diesem Zeitpunkt eine wichtige Rolle bei der Endothelzellproliferation und -migration spielen soll. Die Lokalisation des $\alpha_5\beta_1$ dagegen ist mit der Blutgefäßentwicklung in der Retina assoziiert. Nach der Geburt beginnen die Endothelzellen über die Ganglienzellschicht hinaus zur IPL weiterzuwachsen, um an der Grenze zwischen IPL und INL am Ende des 1. postnatalen Monats einen Kapillarplexus zu bilden. Mit der Fluoreszenzfärbung der 4 Wochen alten Affenretina kann aber nicht nur dieser innere Gefäßplexus dargestellt werden, sondern auch schon der Plexus an der Grenze zwischen INL und OPL, der durch ein weiteres Wachstum der Kapillaren über die INL hinaus entsteht. In der Retina des 1 Monat alten Tieres ist allerdings auffällig, dass die Intensität des Signales für $\alpha_5\beta_1$ im Vergleich zur postnatalen und fetalen Netzhaut abnimmt und dass das Integrin im adulten Stadium überhaupt nicht mehr gebildet wird (in der Abbildung ist eine unspezifische Hintergrundfärbung erkennbar). Diese Beobachtung korreliert mit dem von Milner untersuchten Wechsel der Integrinexpression während der Reifung von zerebralen Blutgefäßen in der Maus. Auch in der Primatenretina kommt es unseren Ergebnissen nach zu dieser Veränderung in der Integrinproduktion und wahrscheinlich würde auch beim Affen eine verstärkte Synthese von Laminin und seinen Rezeptoren α_1 und α_6 dargestellt werden können, da die Endothelzellen im adulten ZNS sehr feste Verbindungen mit der lamininreichen Basalmembran von Blutgefäßen bilden, um die Blut-Hirn-Schranke bzw. in unserem Fall die Blut-Retina-Schranke zu stabilisieren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der hier durchgeführten $\alpha_5\beta_1$ -Integrinfärbung zum einen die Entwicklung und Ausbreitung der Blutgefäße in der Retina des *Callithrix jacchus*, zum anderen die differentielle Regulation des Integrins mit einer Abnahme des α_5 während der Reifung der retinalen Endothelzellen.

4.1.4 β - und γ -Kristalline

Kristalline bilden eine Familie aus wasserlöslichen Proteinen, die aufgrund ihres abnehmenden Molekulargewichtes in eine α -, β - und γ -Gruppe eingeteilt werden und wegen ihrer Hauptlokalisation in der Linse lange Zeit als linsenspezifische Proteine galten, wo sie für Transparenz und Refraktion mitverantwortlich sind (Graw 1997). Nach ihrer Entdeckung in nicht-lentikulären Geweben konnten sie jedoch auch in zahlreichen weiteren Organen wie der Retina, dem Gehirn oder den Hoden nachgewiesen werden (Jones et al. 1999; Magabo et al. 2000), obwohl ihr Expressionslevel außerhalb der Linse vergleichsweise gering ist.

Struktur und Funktion

β - und γ -Kristalline bilden eine gemeinsame Superfamilie, da beide eine charakteristische antiparallele β -Faltblattstruktur besitzen, welche als Greek-key Motiv bezeichnet wird. Diese Struktureigenschaften verleihen ihnen eine hohe Stabilität und die Eigenschaft, Calciumionen binden zu können (Graw 1997; Rajini et al. 2001). β -Kristalline bestehen aus oligomeren Komplexen, die von sechs β -Kristallingenen kodiert werden, wovon aber β B2 aufgrund seines weit verbreiteten Expressionsmusters außerhalb der Linse am bedeutsamsten ist. γ -Kristalline dagegen bilden Monomere und können in weitere sechs Untergruppen eingeteilt werden.

Aufgrund dieser Eigenschaften, ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu mikrobiellen Stressproteinen (Jaenicke et al. 2001) und ihrer hohen intrinsischen Stabilität wird ihnen eine zytoprotektive Bedeutung während Stresssituationen zugesprochen. Jones und seine Kollegen konnten z. B. eine transiente Erhöhung des γ -Kristallins in der Retina von Mäusen an den postnatalen Tagen 13-14, an denen die Tiere erstmals ihre Augen öffnen, nachweisen (Jones et al. 1999). Auch andere Studien zeigten eine vermehrte retinale Kristallinexpression nach Lichtexposition als Stressfaktor: Ein 2-3facher Anstieg der Kristalline in lichtexponierter Rattenretina, v. a. in den äußeren Photorezeptorsegmenten und im Pigmentepithel wurde von Sakaguchi beobachtet, so dass ein möglicher protektiver Einfluss dieser Proteine auf die Photorezeptoren vermutet wurde (Sakaguchi et al. 2003). Aber nicht nur Licht als Stressor kann die

Kristallinproduktion in der Netzhaut erhöhen, sondern auch retinaler Stress durch Ischämie mit anschließender Reperfusion oder durch retinale Verletzungen haben eine erhöhte Kristallinexpression zur Folge (Yoshimura et al. 2003; Vázquez-Chona et al. 2004). In diesen Studien fiel zudem auf, dass das temporale und spatiale Expressionsmuster der Kristalline dem des GFAPs ähnlich ist. Daher vermuteten die Autoren, dass die Kristallinhochregulation wahrscheinlich eine generelle Antwort der Retina auf unterschiedliche Traumata darstellt. In diesem Zusammenhang sind auch die Experimente von Coop bedeutsam, welche die Verlagerung der β -Kristalline von perinukleären zu zytoplasmatischen Regionen neuronaler Zellen nach temporärer Hitzeschockbehandlung *in vitro* zeigte (Coop et al. 1998). Dort könnten die Kristalline durch Bindung überschüssiger zytoplasmatischer Calciumionen oder durch Stabilisierung anderer Proteine neuroprotektiv wirken.

Außerhalb der Retina haben die Kristalline durch ihre Hauptlokalisierung in der Linse vielfältige Funktionen im Bezug auf Transparenz und Refraktion (Andley 2007; Graw 2009). In diesem Zusammenhang sind sowohl Mutationen der β -, als auch der γ -Kristalline mit hereditären und nicht-hereditären Katarakten bekannt. Schon ab den frühen Entwicklungsstadien werden β -Kristalline in der Linse vermehrt produziert und können daher im Linsencortex am stärksten nachgewiesen werden. Dagegen scheinen die γ -Kristalline eher bei der Linsenentwicklung eine Rolle zu spielen, da ihre maximale Proteinexpression zum Zeitpunkt der Geburt erreicht wird und danach stark abfällt. Aber nicht nur die degenerativen Veränderungen der Linse, sondern auch die in der Retina sind mit einer veränderten Kristallinproduktion assoziiert. So konnten verschiedene β - und γ -Kristallinsubtypen vermehrt in Drusen von Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration detektiert werden (Crabb et al. 2002). Darüberhinaus scheinen die Kristalline auch bei der physiologischen Entwicklung von Blutgefäßen im Auge von Bedeutung zu sein (Zhang et al. 2005), so dass schon eine frühe Rolle der Kristalline nicht nur während der Entwicklung der Linse, sondern auch der Blutgefäße und wahrscheinlich auch der Retina angenommen werden kann.

Kristalline und die Regeneration von RGC

Lange Zeit waren die Kristalline nur als Strukturproteine der Linse bekannt und über eine Funktion in der Retina konnte nur spekuliert werden. Ihre Lokalisation in allen nukleären Schichten der Retina und ihre altersunabhängige Expression (Xi et al. 2003; Rose 2004) deuten allerdings auf eine weiterführende Rolle in der Netzhaut hin. In Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass eine Co-Kultivierung RGC mit verletzten Linsen ein neuronales Auswachsen zeigt (Lorber et al. 2002). Daher wurde ange-

nommen, dass dieser Effekt auf den Hauptbestandteil der Linse, den Kristalline, zurückzuführen ist. Weitere Regenerationsversuche mit Kristallinen konnten diesen Verdacht weiter untermauern: Organkulturen des Rückenmarkes und isolierte Motoneurone des Hühnchens reagierten nach Zugabe von Kristallinen *in vitro* mit einer verstärkten Neuritenbildung und Axonelongation (Ahmann 2003). Ebenso konnten Liedtke et al. zeigen, dass bestimmte β -Kristallinsubtypen während des Auswachsens regenerierender Axone im Überstand des Kulturmediums hochreguliert werden und dass dabei v. a. β 2-Kristallin in den Axonen und Filopodia der RGC exprimiert wird (Liedtke et al. 2007). Weitere Experimente mit β 2-Kristallin transfizierten RGC-5-Zellen konnten einen das Neuritenwachstum fördernden Effekt zeigen, so dass die positive Wirkung einzelner Kristalline auf die Axiogenese bewiesen werden konnte. Der einzelne Mechanismus, durch welchen die löslichen Kristalline das retinale Axonwachstum direkt oder indirekt beeinflussen, konnte allerdings erst in einer weiteren Studie genauer untersucht werden. Dabei belegten Fischer et al. die das Axonwachstum von RGC fördernde Wirkung von β - und γ -Kristallinen sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* (Fischer et al. 2008): Die intravitreale Injektion von gereinigten und aufbereiteten β - oder γ -Kristallinen hatte nicht nur einen positiven Effekt auf das Neuritenwachstum *in vitro*, sondern auch *in vivo* konnte dies anhand von mehrmaligen intravitrealen Kristallininjektionen am Regenerationsmodell des peripheren Nerventransplantates gezeigt werden. Darüberhinaus induzieren die Kristalline die Freisetzung des ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinalen Astrozyten, welcher wiederum in den RGC eine erhöhte Regenerationsbereitschaft bewirken könnte. Allerdings ist über diese Wirkung der Kristalline auf die RGC und über den Mechanismus der CNTF-Freisetzung noch nicht allzu viel bekannt, so dass weitere Studien in diesem Bereich notwendig sind.

Diese recht aktuellen Studien beweisen, dass die Kristalline nicht nur im Zusammenhang mit der Linse und deren Veränderungen, sondern auch in Bezug auf die Retina und die Regeneration von RGC weiter betrachtet werden müssen.

Retinale Expression

Die extra-lentikuläre Expression eines α -Kristallins konnte erst 1989 von Bhat und Kollegen (Bhat et al. 1989) und die der β - und γ -Kristalline erst noch später bewiesen werden (Head et al. 1995; Jones et al. 1999). Daher war über die Funktion der β - und γ -Kristalline in der Retina auch lange Zeit wenig bekannt, bis Versuche mit regenerierenden Neuronen einen das Axonwachstum fördernden Einfluss bewiesen (Ahmann 2003; Liedtke et al. 2007; Fischer et al. 2008). Die Expression dieser Proteine in der Retina der Maus bzw. des Affens wurden von Xi (2003) und von Rose (2004) detailliert unter-

sucht. Demnach wird β -Kristallin in der 12.5 Wochen alten Mausretina in allen nukleären Schichten und zusätzlich punktuell in den inneren Segmenten der Photorezeptoren gebildet. Im Entwicklungsverlauf der Primatenretina vom postpartalen zum adulten Gewebe ändert sich dieses Expressionsmuster laut Rose nicht weiter, so dass eine altersunabhängige β_H -Konzentration angenommen wurde. Diese Ergebnisse können durch diese Arbeit nicht unterstützt werden: In unserer immunhistochemischen Analyse konnte eine deutliche altersabhängige β -Kristallin-Produktion mit kontinuierlich ansteigender Proteinbildung nachgewiesen werden. Dabei wird das Protein in der fetalen Retina noch überhaupt nicht, in der postpartalen Retina nur in den Segmenten der Photorezeptoren und erst im weiteren Verlauf dann in den nukleären Schichten exprimiert. Damit kann die von Xi und Rose beobachtete Proteinlokalisierung bestätigt werden, jedoch zeigen die hier vorliegenden Färbungen eine ausgeprägte Altersabhängigkeit. Zum einen kann das unterschiedliche Ergebnis durch die Verwendung verschiedener Antikörper – Rose verwendete einen Anti- β_H -Antikörper (Sanbio), während in dieser Arbeit ein genereller β -Kristallin-Antikörper eingesetzt wurde – verursacht sein, zum anderen beobachtete schon Xi in seiner Studie, dass die immunhistochemische Analyse der β -Kristallin-Expression in verschiedenen Tieren einem großen Schwankungsbereich unterlegen war. Darüberhinaus ist eine ähnliche altersabhängige β -Kristallin-Produktion auch in der Linse bekannt (Graw 2009). Dort wird das Protein zwar schon in frühen Entwicklungsstadien gebildet, aber seine Expression wird nach der Geburt weiter gesteigert, so dass die höchste β -Kristallinkonzentration schließlich im Linsencortex gefunden werden kann. Weiterhin können β -Kristallinsubtypen bei degenerativen Erkrankungen wie der altersbedingten Makuladegeneration nachgewiesen werden (Crabb et al. 2002), was nicht nur seine Involvierung in den Stoffwechsel der Photorezeptoren erklärt, sondern auch durch seine frühe Expression in den Photorezeptorsegmenten der postpartalen Retina weitere entwicklungsabhängige Funktionen vermuten lässt.

Bei den γ -Kristallinen lässt sich dagegen nur eine geringere Altersabhängigkeit ab der postpartalen Entwicklung beobachten. In der fetalen Retina kann die äußere neuroblastische Schicht, der noch jegliche weitere laminäre Differenzierung fehlt, diffus angefärbt werden, während die Ganglienzell- und Nervenfaserschicht eine punktuelle Signalanhebung zeigen. Doch schon ab der Geburt lässt sich die vom Xi und Rose beschriebene Proteinlokalisierung in allen nukleären Schichten auch hier nachweisen. Dabei ist es aufgrund der Aufnahmetechnik bzw. der verwendeten Lichtquelle nicht möglich, die Intensität der einzelnen Fluoreszenzfärbungen näher zu bestimmen, so dass eine Altersabhängigkeit nicht weiter untersucht werden kann. Allerdings kann eine im Vergleich zur postpartalen Retina stärkere Kristallinexpression in den nukleären Schichten vermutet

werden. Diese Annahme einer Altersabhängigkeit und die besonders in der juvenilen Retina beobachtete Kristallinbildung in den Segmenten der Photorezeptoren würden im Kontext der altersbedingten Makuladegeneration (Coop et al. 1998) eine Funktion der γ -Kristalline bei degenerativen Erkrankungen und der Reifung der Photorezeptoren unterstützen. Weiterhin ist bei der γ -Kristallinexpression postpartal und im Alter von 4-22 Wochen eine ausgeprägte Anfärbung der Nervenfaserschicht auffällig, die mit einer möglichen regenerationsfördernden Wirkung der Kristalline in Zusammenhang stehen könnte (Fischer et al. 2008).

4.1.5 Brn-3b

Die POU-Domänen Transkriptionsfaktoren (TF) Brn-3a, 3b und 3c gehören aufgrund ihres gemeinsamen DNA-Bindungsmotivs zu einer Familie, die neben anderen Transkriptionsfaktoren wie HLH oder LIM-Faktoren die neuronale Proliferation und Differenzierung im peripheren und zentralen Nervensystem beeinflussen. Die einzelnen Brn-3-Subtypen zeigen dabei eine hohe strukturelle Ähnlichkeit und charakteristische, überlappende Expressionsmuster in sensorischen Neuronen und sensomotorischen Hirnstammarealen (Xiang et al. 1995).

Die hoch konservierte DNA-bindende POU-Domäne zeigt eine 95%ige, die Regionen außerhalb der POU-Domäne noch eine 70%ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz innerhalb der drei Brn-3 TF (Xiang et al. 1995). Dennoch unterscheidet sich das spatiotemporale Expressionsmuster während der embryonalen Entwicklung und dadurch auch die einzelnen Funktionen der Brn-Subtypen erheblich, was in knockout Versuchen mit Mäusen demonstriert werden konnte: Brn-3a Nullmutatiionsmäuse starben kurz nach der Geburt, da sie durch anormale Ganglia trigeminale und Spinalganglien ihre Saugfähigkeit verloren und außerdem beeinträchtigte motorische und somatosensorische Funktionen aufwiesen (McEvelly et al. 1996; Xiang et al. 1996). Mäuse mit einer Nullmutation für Brn-3c überlebten dagegen und konnten sich auch vermehren, aber sie zeigten einen vollständigen Verlust der Haarzellen im Innenohr, was zu zum einen zu Taubheit, zum anderen zu einem beeinträchtigten Gleichgewichtsvermögen führte (Erkman et al. 1996; Xiang et al. 1997). Auch die Brn-3b defizienten Mäusen waren lebensfähig und fruchtbar, aber zeigten einen erheblichen Verlust an RGC in der Retina (Erkman et al. 1996; Gan et al. 1996).

Brn-3b in der Retina

Der Transkriptionsfaktor Brn-3b wird relativ früh während der Embryogenese in der Retina gebildet, wenn die undifferenzierten Vorläuferzellen postmitotisch werden (Gan et al. 1996; Xiang 1998). In Mäusen kann Brn-3b immunhistochemisch erstmals ab dem Embryonaltag 11.5 in der neuroblastischen Schicht der zentralen Retina in den Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Während der weiteren retinalen Entwicklung dehnt sich auch die Brn-3b Expression auf die peripheren retinalen Bereiche aus und weist ein Maximum an den Embryonaltagen 12.5 bis 15.5 auf, wenn die Mehrheit der Ganglienzellen entsteht. Dabei kann Brn-3b sowohl in den migrierenden RGC der neuroblastischen Schicht, als auch postpartal in den differenzierten Zellen der neu gebildeten Ganglienzellschicht nachgewiesen werden (Turner et al. 1994; Gan et al. 1996; Xiang 1998).

Die zeitliche Assoziation der Brn-3b-Expression während der Entstehung der retinalen Ganglienzellen und ihr Nachweis in den differenzierten Zellen weisen auf seine bedeutende Rolle während der Differenzierung und Proliferation der RGC hin. Durch Brn-3b knockout Versuche an Mäusen konnte in der adulten Retina ein RGC-Verlust von 70-80% verglichen mit Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden. Zwar waren die Ganglienzellen spezifiziert und migrierten zur GCL, aber die meisten Zellen waren nicht fähig, normale Axone zu bilden und schließlich wurden sie im perinatalen und frühen postnatalen Zeitraum apoptotisch (Erkman et al. 1996; Xiang 1998; Gan et al. 1999; Wang et al. 2000). Daher wiesen die Sehnerven der entsprechenden Tiere auch einen signifikant geringeren Durchmesser mit weniger Axonbündeln auf. Der Einfluss von Brn-3b auf die Differenzierung der RGC und das axonale Wachstum konnten seither in vielen unterschiedlichen Studien nachgewiesen werden. Xiang et al. vermuteten 1998, dass Brn-3b für die initiale Differenzierung von ca. 70% der RGC notwendig sei, denn die restlichen 20-30% der Ganglienzellen überlebten bis ins Erwachsenenalter und konnten zwar Axone, wenn auch anormale Neuriten mit Projektionsdefekten bilden. Xiang propagierte daher einen Brn-3b-abhängigen und einen Brn-3b-unabhängigen Differenzierungsweg, wobei Brn-3b in dem von ihm abhängigen Signalweg benötigt wird, um die Differenzierung der RGC anzustoßen. Auch der Einfluss des Brn-3b Proteins auf das axonale Wachstum wurde in weiteren Experimenten analysiert. Wang konnte 2000 demonstrieren, dass der 3b-Faktor für die Polarisierung der RGC notwendig ist: In den 3b-defizienten Mäusen bildeten die Ganglienzellen eher dendritische als axonale Fortsätze. Weiterhin waren diese Neuriten kürzer, wuchsen langsamer und faszikulierten nicht ordnungsgemäß. Daher wurde vermutet, dass Brn-3b zum einen die Dendritenformation

supprimiert, zum anderen dass es die Aktivität von Genen reguliert, welche an der Etablierung der Zellpolarität beteiligt sind.

Zusammenfassend scheint Brn-3b für Wachstum, Wegfindung und Bündelung der Axone sowie für die Differenzierung und das Überleben der Ganglienzellen erforderlich zu sein. Allerdings haben weitere Versuche gezeigt, dass der Verlust von Brn-3b teilweise durch andere Brn-TF kompensiert werden kann. Versuche mit Brn-3b und -3c double knockout Mäuse zeigten nämlich einen weiteren Verlust von RGC und Axonen im Vergleich zu den Brn-3b-defizienten Tieren (Wang et al. 2002), so dass sich überlappende Funktionen für Brn-3b und 3c angenommen werden können. Darüberhinaus konnte durch *in vitro* Expression von Brn-3c mittels eines Vektors in Brn-3b-defiziente RGC sogar das axonale Wachstum gefördert werden, wenngleich diese Axone auch nicht die normale Morphologie aufwiesen. Brn-3c scheint also nur partiell die Funktionen von Brn-3b ersetzen zu können.

Diese Kompensation durch einen anderen Brn-3 Subtyp konnte auch durch einen knock-in Versuch, bei dem das Brn-3a-Gen in den 3b-Locus eingeschleust wurde, dargestellt werden (Pan et al. 2005). Dadurch konnten die ansonsten bei Brn-3b-defizienten Tieren auftretenden retinalen Defekte vermieden werden. Die RGC bildeten Axone, angemessene zentrale Projektionen und umgingen den programmierten Zelltod, solange Brn-3a im gleichen spatiotemporalen Muster vorhanden war wie ansonsten Brn-3b. Dementsprechend wurde von Pan et al. postuliert, dass sich die einzelnen Brn-Faktoren funktionell gleichen und dass ihre verschiedenen Rollen während der Neurogenese auf ihr unterschiedliches spatiotemporales Expressionsmuster zurückzuführen seien.

Jedoch spielt Brn-3b nicht nur beim Axonwachstum in der Retina eine bedeutende Rolle, sondern auch bei der Differenzierung der postmitotischen Vorläuferzellen in entweder RGC oder anderen retinalen Zellen wie amakrine oder Horizontalzellen. Gan behauptete 1999, dass Brn-3b dabei nicht für die initiale Bestimmung des Zellschicksales, sondern für die normale Differenzierung der RGC verantwortlich sei (Gan et al. 1999). Aber dies konnte in einer neueren Studie von Qiu widerlegt werden (Qiu et al. 2008): Demnach fördert Brn-3b die Differenzierung der multipotenten Vorläuferzellen in *early-born* RGC und unterdrückt gleichzeitig die Bildung von *late-born* RGC, amakrinen und horizontalen Zellen, indem es weitere Transkriptionsfaktoren supprimiert. Dieses negative, durch Brn-3b kontrollierte Regulationsprogramm könnte die Differenzierung der Vorläuferzellen in frühe RGC sicherstellen, denn sobald dieser Regelkreis unterbrochen ist, werden zu viele andere retinale Zellen und zu wenige RGC gebildet. Allerdings muss dabei angemerkt werden, dass Brn-3b nicht direkt die Differenzierung der

Vorläuferzellen beeinflussen kann, sondern seine Expression über Math5 reguliert wird, welches wiederum als basic helix-loop-helix (bHLH) TF-Gen durch GDF11 (growth differentiation factor 11) und Follistatin gesteuert wird (Kim et al. 2005). Dieser Studie nach soll Brn-3b also sowohl die Spezifikation der Vorläuferzellen, als auch die Differenzierung der RGC beeinflussen können.

Immunhistochemische Expression von Brn-3b in der Retina

Zahlreiche Studien der letzten Jahre haben Brn-3b immunhistochemisch in den fetalen Vorläuferzellen der RGC und in den ausdifferenzierten Ganglienzellen in Maus, Kaninchen, Affe oder Mensch detektiert (Xiang et al. 1993; Xiang et al. 1995; Gan et al. 1996). Dabei konnte gelegentlich ein angefärbter Nucleus in der IPL oder der INL beobachtet werden, allerdings stellen diese deplatzierte Ganglienzellen dar. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint die immunhistochemische Anfärbung der Retina des *Callithrix jacchus* in dieser Arbeit gewissen Fehlern zu unterliegen. Zum einen könnte ein Anwendungsfehler während der immunhistochemischen Anfärbung oder der Probenverarbeitung aufgetreten sein, zum anderen kann die fehlerhafte Anfärbung der Retina auf den Antikörper selbst zurückführbar sein. Während in anderen Studien ein monoklonaler und damit ein spezifisch bindender Antikörper verwendet wurde, wurde in dieser Arbeit ein polyklonaler Antikörper eingesetzt. Polyklonale Antikörper erkennen mehrere antigene Determinanten, da der Antikörper von verschiedenen B-Zellen im Tier gebildet wurde und zudem noch oft die Antiseren mehrerer Tiere für ein Produkt gemischt werden. Dies führt zu einem breiten Reaktionsspektrum, das Kreuzreaktionen erleichtert, d. h. es kommt zu einer Bindung des Antikörpers an verschiedene Antigene, die das gleiche oder ein ähnlich strukturiertes Epitop besitzen. Zusammengefasst können durch die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers falsch positive Ergebnisse auftreten, falls andere Fehlerquellen wie Benutzerfehler ausgeschlossen werden können. Da nicht nur andere Studien die immunhistochemische Anfärbung von anderen retinalen Strukturen als den Ganglienzellen ausschließen, sondern auch ein intensives Signal in der OPL gegen die Lokalisation des ansonsten nukleär lokalisierten Transkriptionsfaktors spricht, deuten die vorliegenden immunhistochemischen Aufnahmen auf ein falsch positives Ergebnis hin. Der polyklonale Primärantikörper könnte also an strukturell ähnliche Epitope in den retinalen Schichten binden. Die Bindung des Sekundärantikörpers scheint jedoch aufgrund der negativen Kontrollfärbung (nicht abgebildet) keinem Fehler zu unterliegen.

Darüberhinaus ist das negative Signal in der fetalen Affenretina auffallend, da auch die Vorläuferzellen der RGC vor deren Migration zur GCL angefärbt werden können (Gan

et al. 1996). Brn-3b kann in Zellen der fetalen Mausretina schon am Embryonaltag 11 erstmals detektiert werden und besonders zwischen E12 und E15 steigt die Anzahl an Brn-3b-exprimierenden Zellen kontinuierlich an, da zu diesem Zeitpunkt die meisten RGC ihre letzte Mitose durchlaufen und anschließend zur späteren GCL migrieren. Die fehlende Anfärbbarkeit der fetalen Affenretina kann in diesem Fall entweder ein falsch negatives Ergebnis darstellen oder die fetale Affenretina hat ein dem Embryonaltag 11 der Mäuseretina noch nicht vergleichbares Alter erreicht, so dass zu diesem Zeitpunkt noch keine Brn-3b exprimierenden Vorläuferzellen vorhanden sind.

Im Western Blot konnte eine deutliche Expression von Brn-3b in der postnatalen Primatenretina und eine nachfolgende, altersabhängige Abnahme des TF nachgewiesen werden. Leider stand kein fetales Gewebe diesem Proteindetektionsverfahren zur Verfügung, so dass keine Aussage über die Proteinmenge in der fetalen Affenretina getroffen werden kann. Diese altersabhängige Abnahme der Brn-3b-Expression steht in Einklang mit den Ergebnissen aus anderen Studien, die die Bedeutung dieses Proteins für sowohl die Differenzierung und Proliferation der RGC, als auch für das Wachstum und die Wegfindung der Axone (siehe oben) herausgestellt haben.

Zusammengefasst konnte die Bedeutung des POU-Transkriptionsfaktors Brn-3b für das axonale Wachstum und die Differenzierung der RGC dargestellt werden, allerdings konnte die immunhistochemische Färbung dieser Arbeit aufgrund der falsch positiven Ergebnisse keine weiteren Informationen zur altersabhängigen Proteinexpression in der Retina des *Callithrix jacchus* liefern.

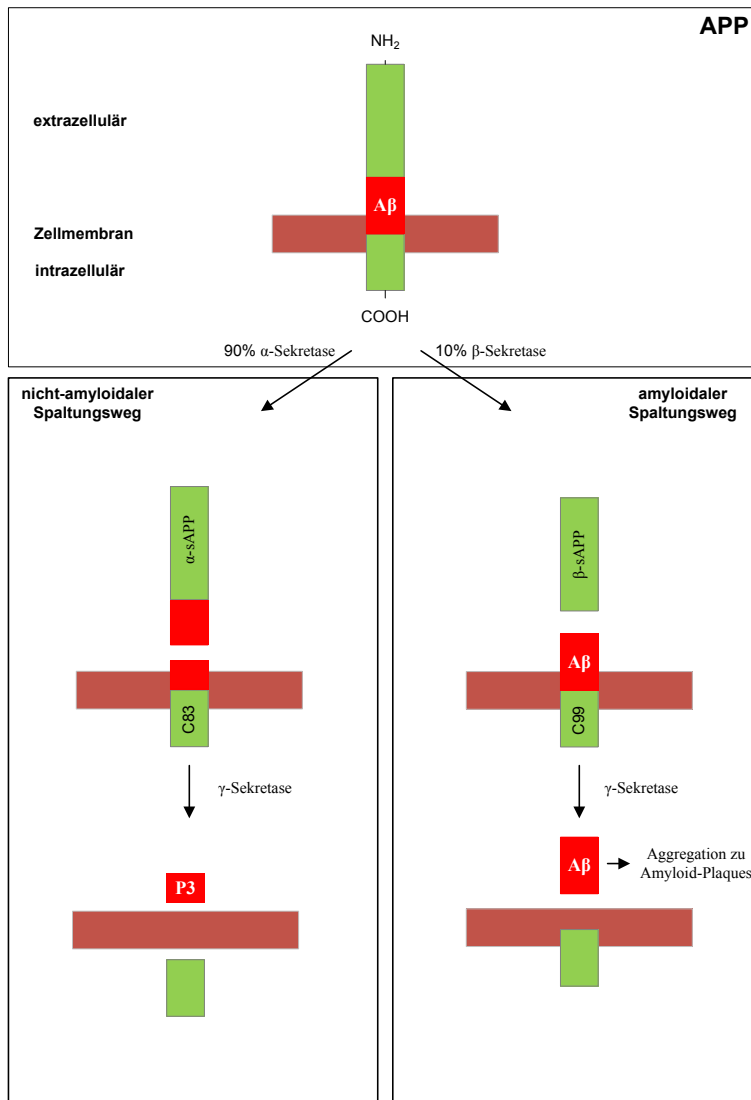
4.1.6 APP

Eine erhöhte Immunreaktivität von APP oder seinem Spaltprodukt β -Amyloid im Gehirn konnte in vielen Studien mit der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder zerebrale Amyloidangiopathie, aber auch mit dem physiologischen Alterungsprozess in Verbindung gebracht werden. In dieser Arbeit wurde dagegen die Expression dieser beiden Proteine in der normalen Retina des *Callithrix jacchus* untersucht.

Das Amyloidvorläuferprotein APP ist ein transmembranöses Glykoprotein, das aus einer großen extrazellulären Domäne, einer singulären integralen Membranregion und einem kurzen intrazellulären Bereich besteht (Glenner et al. 1984; Kang et al. 1987; Hardy et al. 2002). Es gibt drei verschiedene Isoformen des Proteins, die durch alternatives Spleißen generiert werden, aber im Gehirn von Vertebraten stellt APP₆₉₅ die do-

minante Isoform in Neuronen dar. Die einzelnen Funktionen von APP sind schwer zu definieren, da es zum einen durch verschiedene Sekretasen in unterschiedliche Produkte gespalten werden kann, welche wiederum eigene Funktionen im Gehirn innehaben (Turner et al. 2003), zum anderen ändert sich kontinuierlich die Lokalisation des Proteins während seiner Prozessierung in der Zelle (Wolfe et al. 2007).

Das transmembranöse Protein kann auf zwei unterschiedlichen Wegen weiter gespalten werden (siehe Abbildung 20), wobei besonders der β -Amyloid erzeugende Spaltungsweg aufgrund dessen Relevanz in der Pathogenese des M. Alzheimer besondere Beachtung in der Literatur findet (Thinakaran et al. 2008). Der erste Schritt der Prozessierung beinhaltet die APP-Spaltung durch entweder eine α - oder eine β -Sekretase, wobei nur letztere zur Bildung des β -Amyloids führt. Allerdings erfolgt zu 90% die Spaltung auf dem nicht-amyloidogenen Weg, bei dem durch die α -Sekretase ein großes lösliches APP-Fragment (α -sAPP) und ein in der Membran verankertes C83-Fragment entsteht, welches im nächsten Schritt durch die γ -Sekretase weiter zu einem kleinen extrazellulären p3-Peptid aufgespalten wird. Der zu nur 10% stattfindende amyloidogene Prozessierungsweg beinhaltet die aufeinanderfolgende APP-Spaltung durch eine β -Sekretase (BACE) und eine γ -Sekretase. Neben dem löslichen β -sAPP entsteht dabei das für M. Alzheimer charakteristische β -Amyloid in den senilen Plaques. Dieser Prozessierungsweg findet hauptsächlich endosomal und weniger an der Zelloberfläche statt, so dass das β -Amyloid erst durch anschließende Sekretion in den extrazellulären Raum gelangen kann.



Quelle: Eigene Darstellung.

Abbildung 20: Die Prozessierung von APP durch Sekretasen

Das transmembranöse Glykoprotein APP wird entweder durch Sekretasen zu einem kleinen extrazellulären p3-Fragment und einer intrazellulären Domäne von APP gespalten oder es wird über den amyloidalen Signalweg in geringerem Ausmaß zu den bei M. Alzheimer bekannten β -Amyloid prozessiert.

Funktionen des APP

Neben seiner Rolle als Vorläuferprotein für die Entstehung des β -Amyloids hat APP auch neurologische Funktionen, die durch seine große N-terminale extrazelluläre oder seine C-terminale zyttoplasmatische Domäne vermittelt werden. Die extrazelluläre Domäne ist eine cysteinreiche Region, welche eine den Wachstumsfaktoren ähnliche Struktur aufweist (Rossjohn et al. 1999), aber auch u. a. Heparin und Kupfer-bindende

Stellen besitzt. Dadurch kann APP als Zellrezeptor auf Neuronen fungieren und somit zu neuronalem Wachstum, Zelladhäsion und Zellmobilität beitragen.

In der Literatur wird APP eine Vielzahl an unterschiedlichen Funktionen zugeschrieben, aber seine eigentliche physiologische Rolle bleibt noch zu ermitteln. Eine wachstumsfördernde Bedeutung ist die am besten beschriebene Rolle des APP. So soll es das Neuritenwachstum und die Bildung von Synapsen fördern (Milward et al. 1992; Priller et al. 2006), aber auch einen Einfluss auf die Differenzierung von neuronalen Stammzellen haben (Kwak et al. 2006). Darüberhinaus werden dem Amyloidvorläuferprotein anti-apoptotische und neuroprotektive Funktionen zugeschrieben. Eine weitere Rolle wird dem Vorläuferprotein bei der Zelladhäsion zugesprochen, wo es einen fördernden Einfluss besitzen soll. Es soll zusammen mit Integrinen an der Zelloberfläche von Axonen und an Adhäsionsbindungsstellen lokalisiert sein und auch mit extrazellulären Molekülen wie Laminin und Kollagenen interagieren (Beher et al. 1996; Storey et al. 1996; Yamazaki et al. 1997).

Trotz dieser vielen unterschiedlichen Funktionen des APP ist der Phänotyp von APP-defizienten Mäusen eher uninteressant. Diese Mäuse besitzen ein geringeres Körpergewicht und bilden im Alter eine Muskelschwäche aus. Im Gehirn kann eine unspezifische Gliose und eine Beeinträchtigung des Lernverhaltens und des Gedächtnisses sowie der synaptischen Plastizität beobachtet werden (Zheng et al. 1995; Wang et al. 2005; Wolfe et al. 2007).

APP in der Retina

Im gesunden Auge konnte das Amyloidvorläuferprotein sowohl in der inneren Retina (RGC und NFL), als auch in variablen Ausmaß in anderen retinalen Schichten nachgewiesen werden (Loffler et al. 1995). Dabei konnte eine altersabhängige Zunahme des Proteins in der Ganglienzellschicht beobachtet werden, so dass eine Assoziation mit dem altersbedingten Verlust der RGC möglich erscheint (Price et al. 1994). Aber nicht nur während des Alterungsprozesses, sondern auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der altersbedingten Makuladegeneration und dem chronischen Glaukom spielt APP eine bedeutende Rolle (Guo et al. 2007). So konnten verschiedene Studien β -Amyloid in Drusen und sein Vorläuferprotein im Zytoplasma der darüberliegenden retinalen Pigmentepithelzellen in Augen von AMD Patienten detektieren (Johnson et al. 2002; Dentchev et al. 2003; Seth et al. 2008).

Eine weitere Studie weist APP in den Ganglienzellen von Kaninchen nach (Morin et al. 1993): Demnach wird das Protein in den RGC synthetisiert und dann rasch mit Hilfe

kleiner Vesikel zum Sehnerv transportiert, wo es in die axonale Plasmamembran und in den präsynaptischen Nervenendigungen im Corpus geniculatum laterale eingebaut wird. Darüberhinaus weisen Morin et al. das Vorläuferprotein auch immunhistochemisch in den retinalen Müllerzellen nach, allerdings wird die Anfärbung dieser Gliazellen mit einer Aufnahme des zuvor intravitreal injizierten [³⁵S] Methionin [³⁵S] Cystein erklärt. In den für diese Arbeit vorliegenden immunhistochemischen Färbungen konnte APP v. a. in der Neurofilamentschicht und in den Müllerzellen nachgewiesen werden, wobei es bei ersteren eine altersbedingte Zunahme der Signalintensität in der Affenretina zeigt. Demgegenüber ist eine altersabhängige Zunahme seiner Expression in den Ganglienzellen (Löffler et al. 1995) in dieser Arbeit nicht erkennbar. Allerdings wurde auch ein APP-Antikörper verwendet, der laut Herstellerangaben nur für Paraffinschnitte und nicht für kryokonservierte Gewebe entwickelt wurde. Ob diese falsche Handhabung allerdings die Anfärbung der RGC verhindert, ist eher unwahrscheinlich. Dennoch sollte in einer weiteren Studie die in der Literatur beschriebene Lokalisation des APPs in den RGC auch in Affengewebe mittels eines anderen APP-Antikörpers weiter untersucht werden. Neben Morin und Kollegen konnte aber auch Chen das Amyloidvorläuferprotein in Müllerzellen detektieren (Chen et al. 1996). Da die Expression von APP in Müllerzellen und Astrozyten unter verschiedenen pathologischen Umständen schon in früheren Studien beobachtet wurde (Gray et al. 1993; Töpfer et al. 1995), hat Chen die APP-Expression in Müllerzellen und RGC nach Durchtrennung des N. opticus bei der Ratte untersucht. In der Kontrollgruppe konnte er - wie in dieser Studie auch - das Amyloidvorläuferprotein in den Müllerzellfortsätzen und besonders in deren Endfüßchen in der inneren Retina, aber nur zu einem geringen Ausmaß in den Ganglienzellen nachweisen. Nach Durchtrennung des Sehnervens wurde ein signifikanter Anstieg der APP-Expression in Müllerzellen, jedoch nicht in den RGC beobachtet. Diese Reaktion wird mit einer nach RGC-Verletzung veränderten Kaliumleitfähigkeit der Müllerzellen erklärt, wodurch die metabolische Aktivität dieser Gliazellen verändert wird, was wiederum zu einer verstärkten Expression des APP führt. Letztlich zeigt diese Studie, dass die APP-Expression in den retinalen Müllerzellen nicht nur unter physiologischen Bedingungen erfolgt, sondern eine Steigerung der Proteinexpression unter pathologischen Prozessen erfolgt. Daher erscheint auch die gesteigerte APP-Synthese in den Müllerzellen der alternden Affenretina in dieser Studie keinem Fehler zu unterliegen, allerdings scheint die von Löffler et al. beschriebene Hauptlokalisation von APP in den Ganglienzellen nicht auf den Affen übertragbar zu sein, da in den vorliegenden immunhistochemischen Färbungen keine punktuelle APP-Expression in den RGC abgrenzbar ist. Es ist aber noch weiter zu untersuchen, warum Löffler nicht die Bildung des Amyloidvorläuferproteins in den Müllerzellen identifizieren konnte, aber Chen und

diese Studie beide eine intensive Anfärbung dieser retinalen Gliazellen feststellen konnten.

4.1.7 β -Amyloid

Dieses 4KDa schwere Protein ist eines der Hauptbestandteile der extrazellulären Plaques in Gehirnen von Alzheimerpatienten oder auch in den Aggregaten der zerebralen Amyloidangiopathie. Es wird mit Hilfe einer β - und γ -Sekretase aus dem transmembranösen Glykoprotein APP (siehe oben) abgespalten, wobei verschiedene Isoformen wie $A\beta_{40}$ oder $A\beta_{42}$ entstehen können. In gesunden Gehirnen wird das extrazelluläre β -Amyloid allerdings wieder von Astrozyten katabolisiert (Koistinaho et al. 2004), indem es über den Apo-E Rezeptor aufgenommen und enzymatisch abgebaut wird, so dass extrazellulären Amyloid-Ablagerung verhindert werden können. Erst unter pathologischen Bedingungen wie bei der Alzheimererkrankung akkumuliert es im Gehirn. Dabei aggregiert monomeres $A\beta$ zu Oligomeren, zu Protofibrillen und schließlich zu Amyloidfibrillen. Dies erfordert eine erhöhte $A\beta$ -Konzentration, entweder durch vermehrte Produktion von $A\beta$ oder durch einen verminderten Abbau des Amyloids. Diese extrazellulären Amyloidablagerungen sind aber nicht nur die Ursache der Alzheimerkrankheit, sondern sie sind zudem noch neurotoxisch (Jen et al. 1998; Wirths et al. 2001; Takahashi et al. 2004; Kokubo et al. 2005).

In dieser Arbeit sollte die Expression von β -Amyloid in der Affenretina unterschiedlichen Alters untersucht werden. Frühere Studien haben die Akkumulation von $A\beta$ in der Retina mit der Pathogenese von zwei verschiedenen Augenerkrankungen, der AMD und dem Glaukom, in Verbindung gebracht. Die altersbedingte Makuladegeneration ist wie M. Alzheimer auch eine neurodegenerative Erkrankung, bei der die charakteristischen Drusen zwischen der Bruchmembran und dem RPE das β -Amyloid und verschiedene Komplementfaktoren enthalten (Johnson et al. 2002; Dentchev et al. 2003). Dabei sollen das $A\beta$ und die Komplementfaktoren das Pigmentepithel pathophysiologisch beeinflussen (Bruban et al. 2009) und darüberhinaus auch die Synapsen der Photorezeptoren verändern (Johnson et al. 2005), so dass es schließlich zur Degeneration der Photorezeptoren und der RGC kommt. Im AMD-Mausmodell konnte dementsprechend eine Immuntherapie mit Anti- $A\beta$ -Antikörpern die Amyloidablagerungen im Auge und Hirn vermindern, Defizite im ERG verbessern und somit die Progression der AMD verlangsamen (Ding et al. 2008).

Neben seiner retinalen Expression in Drusen von AMD-Patienten konnte β -Amyloid auch eine Rolle in der Pathophysiologie des Glaukoms zugeschrieben werden (Guo et

al. 2007). Im experimentellen Glaukommodell konnte β -Amyloid nicht nur in apoptotischen RGC lokalisiert werden, sondern induzierte zeit- und dosisabhängig auch deren Apoptose. Durch Hemmung der A β -Aggregation konnte zudem noch die RGC-Apoptose *in vivo* reduziert werden, so dass das β -Amyloidmolekül nach Ansicht der Autoren einen neuen potentiellen Angriffsort in der Glaukomtherapie darstellen könnte.

β -Amyloid in der Retina

Immunhistochemische Analysen der Augen von AMD-Patienten konnten β -Amyloid als vesikuläre Struktur in Drusen und punktuell im Zytoplasma der RPE, aber nicht in der neuronalen Retina lokalisieren (Johnson et al. 2002; Dentchev et al. 2003). Da aber eine erhöhte Immunreaktivität von APP (siehe diese Studie) und β -Amyloid auch ein Zeichen des normalen Alterns darstellt (Joachim et al. 1988) haben Löffler et al. immunhistochemisch auch die Lokalisation dieses Proteins in der normalen alternden Retina des Menschen untersucht. Dabei konnten sie in der gesunden Retina außer einer gelegentlichen fokalen Anfärbung von subretinalen, drusenähnlichen Ablagerungen keine gesteigerte Immunreaktivität für Anti-A β im Alter entdecken. Diese Ergebnisse können auch durch die für diese Arbeit angefertigten immunhistochemischen Färbungen bestätigt werden. Mit Hilfe eines monoklonalen und polyklonalen Antikörpers (Sigma und Abcam) konnten verschiedene Isoformen des β -Amyloids in den unterschiedlichen Altersstufen der Affenretina nicht nachgewiesen werden. Auch die adulte Affenretina zeigt immunhistochemisch kein Signal in subretinalen Strukturen, aber da die Lebenserwartung von Marmosettaffen bei circa 12 Jahren liegt, ist die hier verwendete adulte Retina (4,5 Jahre) auch eher als juveniles Gewebe einzustufen und daher waren altersbedingte drusenähnliche Veränderungen der Netzhaut noch nicht zu erwarten.

4.1.8 Nestin

Nestin gehört zu den 10nm großen Intermediärfilamenten Typ VI, die der mechanischen Stabilität von Zellen dienen. Dieses zytoplasmatische Protein wird v. a. während der ZNS-Entwicklung von vielen Zellen exprimiert und wird nach deren Differenzierung durch andere gewebespezifischen Intermediärfilamente wie z. B. Neurofilament oder GFAP ersetzt (Yang et al. 2000; Chen et al. 2002; Shibuya et al. 2002). Aufgrund seiner Expression in multipotenten Stammzellen und den Vorläuferzellen von Neuronen und Gliazellen im ZNS von Säugetieren und seines Expressionsstopps nach deren terminaler Differenzierung wird Nestin als Marker für ZNS-Vorläuferzellen eingesetzt (Ahmad et al. 1999; Ahmad et al. 2000; Messam et al. 2002). Erstmals konnte das transiente Intermediärfilament in radialen Gliazellen und ZNS-Vorläuferzellen im Rückenmark

detektiert werden, aber durch weitere Studien konnte Nestin in vielen sich teilenden Zellarten im ZNS, PNS und anderen Geweben wie Muskelgewebe nachgewiesen werden (Hockfield et al. 1985). Obwohl seine Expression in Neuronen üblicherweise nur transient während deren Entwicklung stattfindet, sind dennoch auch zerebrale Neurone mit kontinuierlicher Nestinbildung wie die Stammzellen in der subventrikulären Zone bekannt (Gu et al. 2002). Darüberhinaus konnte auch in der humanen Retina eine bis ins Erwachsenenalter anhaltende Nestinexpression bewiesen werden (Mayer et al. 2003).

Nestin in der Retina

Die Verteilung des Intermediärproteines in der humanen Retina ist altersabhängig: Schon im 5 Wochen alten Fetus können nestinpositive Zellen im Neuroepithel des Augenblasenstiels und der Augenblase nachgewiesen werden und auch in der weiteren Entwicklung der embryonalen Augenanlage nimmt die Anzahl der nestinexprimierenden Zellen in der neuralen Retina weiter zu (Božani et al. 2006). In der 7-8 Wochen alten Retina kann das Intermediärfilament zudem in der inneren neuroblastischen Schicht und der NFL sowie in dem Sehnerven nachgewiesen werden. Diese Lokalisation entspricht der vorwiegenden Synthese von Nestin in multipotenten Stammzellen und Vorläuferzellen von sowohl Neuronen, als auch Gliazellen im sich entwickelnden ZNS bzw. in der zum Diencephalon gehörender Retina (Chen et al. 2002). Darüberhinaus konnte Nestin auch in der adulten humanen Retina und in chirurgisch entfernten epiretinalen Membranen nachgewiesen werden (Mayer et al. 2003): Sowohl in neuralen bzw. glialen Zellen der GCL und der INL, als auch in Zellen in der peripheren Retina wurden nestinpositive Zellen immunhistochemisch detektiert, so dass die Autoren in der Ora serrata eine Wachstumszone bzw. Keimschicht ähnlich dem pigmentierte Ziliarkörper vermuteten (Tropepe et al. 2000). Diese nestinexprimierenden Zellen könnten demnach eine Population von Vorläuferzellen in der adulten Retina darstellen, welche sich weiter differenzieren könnten, um retinale Narbengewebe zu bilden oder um Regeneration in der Retina zu ermöglichen.

Allerdings kann diese potentielle Funktion von Nestin im adulten menschlichen Auge nicht ohne weiteres auf andere Säugetiere übertragen werden. In der Retina der Ratte wird das Intermediärfilament nur in bestimmter zeitlicher Abfolge gebildet. Während es im postnatalen Alter in den die gesamte Retina durchspannenden retinalen Vorläuferzellen und besonders nahe der Membrana limitans anterior gebildet wird, beschränkt sich seine weitere Expression in den folgenden Lebenswochen auf die radial angeordneten Müllerzellen und ihre Endfüßchen (Xue et al. 2006). Die Intensität des immunhistochemischen Signals nimmt danach in den folgenden Wochen weiter ab, bis ab der 12.

Woche fast kein Nestin mehr in der Rattenretina nachweisbar ist. Dieses Ergebnis unterstützt frühere Studien, nach denen Nestin in sich differenzierenden und differenziereten Müllerzellen nachgewiesen werden kann (Walcott et al. 2003), aber es zeigt auch, dass in der Rattenretina wie in vielen anderen Geweben auch, nach terminaler Differenzierung der Neurone eine Abnahme der Nestinsynthese erfolgt.

In dieser Studie sollte die Expression des transienten Intermediärfilaments in der Retina des *Callithrix jacchus* analysiert werden und wie bei den anderen Säugetieren ist auch hier eine altersabhängige Expression zu verzeichnen. In der fetalen, ca. 100 Tage alten Affenretina ist die Immunreaktivität für Nestin radial in der gesamten Netzhaut verteilt, erstreckt sich also in den retinalen Vorläuferzellen von der ONbL bis zur Ganglienzellschicht, wobei eine Akzentuierung des Signales in der äußeren ONbL und der GCL erkennbar ist. Nach der terminalen Differenzierung der multipotenten Vorläuferzellen in Neurone und Gliazellen der Retina verändert sich auch das Expressionsmuster von Nestin in der Primatenretina. Im postnatalen Alter kann zwar auch noch ein immunhistochemisches Signal in der gesamten Breite der Netzhaut beobachtet werden, allerdings konzentriert sich die Immunreaktivität auf die OPL, IPL und besonders auf die Ganglienzellschicht und die angrenzende NFL, in der faserartige Fortsätze abgegrenzt werden können. Dieses Expressionsmuster spricht für eine Anfärbung der Müllerzellen, welche als spezialisierte Gliazellen die gesamte Retina durchspannen und dadurch zum einen als Stützzellen der Neurone fungieren, zum anderen aber auch für pathologische und physiologische Prozesse wie der Kontrolle von Ionen- und Transmitterkonzentrationen verantwortlich sind (Newman et al. 1996). Zur Bestätigung dieser Vermutung müsste allerdings eine gleichzeitige Anfärbung der nestinproduzierenden Zellen mit Glutaminsynthetase erfolgen, welche als etablierter Marker für Müllerzellen gilt. Auch in der weiteren Entwicklung der Primatenretina können in abnehmender Intensität die plexiformen Schichten und die GCL bzw. NFL angefärbt werden, allerdings wirken die immunhistochemischen Aufnahmen eher unspezifisch und fehlerhaft aufgrund der verwaschenen retinalen Strukturen. In der adulten Affenretina kann dagegen überhaupt kein Nestin mehr detektiert werden, so dass von einer Abnahme der Nestinproduktion in den Müllergliazellen mit zunehmendem Alter ausgegangen werden muss. Diese Beobachtung entspricht auch der retinalen Expression von Nestin in der Rattenretina, in der es ab der 12. postnatalen Woche zu einer Abnahme bzw. zu einem vollständigen Fehlen von Nestin in den retinalen Gliazellen kommt (Xue et al. 2006). Beim Menschen dagegen konnten auch in der adulten Retina nestinpositive Zellen in der GCL, INL und in Gliazellen nachgewiesen werden (Mayer et al. 2003). Die nach Angaben der Autoren potentielle Möglichkeit dieser

nestinproduzierenden Zellen als Ausgangspunkt einer möglichen Regeneration von zentralen Neuronen würde dementsprechend nicht auf die Primatenretina zutreffen. Allerdings ist die Affenretina besonders für die bis ins Erwachsenenalter erhaltene Regenerationsmöglichkeit zentraler Neurone bekannt, so dass diese Funktion anscheinend nicht auf die erhaltene Nestinproduktion in retinalen Zellen zurückführbar ist wie Mayer et al. u. a. vermuteten.

Neben dieser mit der terminalen Differenzierung von Zellen abnehmende Nestinexpression ist auch eine durch unterschiedliche Stimuli induzierbare erneute Nestinproduktion in Müllerzellen bekannt. Nach Laserkoagulation (Kohno et al. 2006), nach Verletzung des N. opticus (Xue et al. 2006), nach erhöhten intraokulärem Druck im Glaukommodell (Xue et al. 2006) oder durch andere pathologische Veränderungen wie epiretinale Membranen (Mayer et al. 2003) kann die Synthese von Nestin erneut induziert werden. Daher sprechen manche Autoren wie Xue et al. von Nestin nicht nur als Marker für neurogliale Vorläuferzellen, sondern auch als potentiellen Marker für retinale Verletzungen, da die Hochregulation des Intermediärproteines innerhalb eines Tages nach der Verletzung und damit sehr rasch erfolgt.

4.2 Regeneration der RGC in der Ratte und *Callithrix jacchus*

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich am Regenerationsmodell der Ratten- und Primatenretina mit den Effekten einer ROCK-Hemmung auf die auswachsenden RGC-Axone *in vitro*. Dabei sollen eingangs zunächst die Probleme und Voraussetzungen für eine Regeneration adulter ZNS-Neurone kurz erläutert werden.

Im Gegensatz zu Fischen und Amphibien, die nach Durchtrennung des Sehnervens eine starke, spontane Regeneration aufweisen (Sperry 1944), kann die Retina der Säugetiere nur unter bestimmten Bedingungen *in vivo* und *in vitro* auswachsen (Heiduschka et al. 2000). Die eingangs beschriebenen möglichen Ursachen einer fehlenden, spontanen Regeneration adulter Neurone lassen sich auf wenige Hauptbereiche beschränken: Die Ausbildung einer glialen Narbe und damit einer möglichen physikalischen Barriere, das Fehlen neurotropher, wachstumsfördernder Faktoren (z. B. CNTF, BDNF) und die Anwesenheit von inhibitorischen Molekülen, die sowohl aus dem Myelin, als auch aus dem Narbengewebe (z. B. Chondroitinsulfatproteoglykane) stammen können. Bei ersteren hat sich der gemeinsame intrazelluläre Rho-ROCK-Signalweg als potentieller Angriffspunkt für die Beeinflussung des Axon- und Neuronenwachstum *in vitro* und *in vivo* herausgestellt (Monnier et al. 2003; Kubo et al. 2007; Lingor et al. 2007; Lingor et al. 2008). Auch in dieser Arbeit sollte durch Hemmung der Rho-Kinasen mit Hilfe des

zellpermeablen Inhibitors Y-27632 ein möglicher Effekt auf die auswachsenden Axone der postnatalen Primatenretina und der adulten RGC der Ratte untersucht werden.

Das dabei verwendete, seit langem etablierte *in vitro* Modell der Retinaexplantatkultur (Ford-Holevinski et al. 1986; Bähr et al. 1988) wurde für die adulte Rattenretina verwendet, da diese nur eine sehr begrenzte spontane Regenerationsfähigkeit aufweist. Durch eine konditionierende Vorbehandlung in Form einer Quetschung des N. opticus und einer kataraktinduzierenden Linsenverletzung drei Tage vor der Explantation (Leon et al. 2000; Fischer et al. 2001) wurden die RGC der adulten Ratte in einen Regenerationszustand versetzt, so dass sie *in vitro* auswachsende Neuriten bildeten, welche durch eine immunhistochemischen Färbung mit NF-200 als Axone identifiziert werden konnten. Zusätzlich bietet dieses Modell im Gegensatz zu den *in vivo*-Modellen wie z. B. der Transplantation eines peripheren Nervens (Vidal-Sanz et al. 1987) den Vorteil von konstanten, reproduzierbaren Kulturbedingungen ohne einen Einfluss von körpereigenen Stoffen aus dem Immun- und Blutssystem: ein chemisch definiertes Medium, eine kontrollierte sauerstoffreiche Atmosphäre, eine konstante Temperatur, eine chemisch definierte Extrazellulärmatrix (Laminin-1) und luftdurchlässige Petriperm-Kulturschalen. Diese exakten und reproduzierbaren Kulturbedingungen wurden in den Versuchen sowohl bei der Regeneration der Rattenretina, als auch bei der der Affenretina angewandt. Allerdings birgt die Vorbehandlung der Ratten die Gefahr zahlreicher Eigeneffekte, welche das Ergebnis beeinflussen können. Der operative Eingriff zur Quetschung des Sehnervens erfordert eine Narkotisierung der Ratten mit Ketamin und Xylaxin intraperitoneal, wobei das Muskelrelaxans als α_2 -Agonist zur Aktivierung des ras-MAPK-Signalweges und zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT führen (Peterson et al. 2000). Weiterhin entstehen durch die Traumatisierung und Verletzung der Retina zahlreiche biochemische Veränderungen wie z. B. die veränderte Regulation von GFAP, CNTF oder c-fos (Wen et al. 1995; Yoshida et al. 1995). Weitere Nebeneffekte entstehen durch die anschließende Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Makrophagen nach der Linsenverletzung (Leon et al. 2000), durch die Entstehung einer Katarakt und die Aktivierung von Gliazellen in der Retina. Doch nicht nur der operative Eingriff, sondern auch die anschließende Explantation und Präparation der Retina können weitere Effekte durch den entstehenden mechanischen Stress zur Folge haben.

Trotz dieser multikausalen Mischeffekte ist dieses Modell geeignet für die Analyse der RGC-Regeneration bei der Ratte, da durch die konditionierende Sehnervquetschung die Ganglienzellen in einen reaktiven, apoptotischen Zustand versetzt werden, welcher zu einer verzögerten Degeneration dieser Zellen führt (Villegas-Pérez et al. 1993). Dage-

gen müssen die durch Operation und Narkose entstehenden Mischeffekte bei der Primatenretina nicht befürchtet werden. Im Gegensatz zur adulten Rattenretina weisen die RGC des *Callithrix jacchus* ein spontanes, starkes Auswachsen der Axone *in vitro* auf, ohne dass eine Vorbehandlung zur Konditionierung notwendig ist. Allerdings müssen auch bei diesem Tiermodell die durch den mechanischen Stress verursachten Nebeneffekte während der Explantation und Präparation der Retina berücksichtigt werden.

Zur Regeneration der *Callithrix*-Retina sind nur wenige Studien bisher vorhanden. Eine Atrophie der RGC nach traumatischer Verletzung des Sehnervs oder der Retina mit Folge eines partiellen, apoptotischen Zelltodes von bis zu 55% der RGC ist bei den Primaten schon seit langem bekannt (Quigley et al. 1977; Quigley et al. 1995; Levkovitch-Verbin et al. 2001). Aber durch neuere Studien konnte das Regenerationsverhalten postnataler und adulter RGC des *Callithrix jacchus* weiter untersucht werden: Rose et al. quantifizierte das spontane, starke Auswachsen der RGC-Axone *in vitro* und verglich dieses mit der Regenerationsfähigkeit von Rattenganglienzellen (Rose et al. 2008). Bei den Primaten zeigte sich mit 0,08% (adulte RGC) bzw. 0,8% (postnatale RGC) eine 2–20fach höhere spontane Regenerationsfähigkeit als die der Ratte (3% nach Vorbehandlung). Damit weist die *Callithrix*-Retina eine der stärksten spontanen Regenerationsfähigkeiten unter den Mammalia auf. Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass die Primaten auch eine vergleichsweise viel höhere Anzahl an RGC im Vergleich zu der Ratte besitzen (1,5 Mio vs. 100 000 bei der Ratte), so dass sich dadurch die verstärkte Regenerationsfähigkeit etwas relativiert. Im direkten Vergleich mit Fischen und Amphibien wirken aber diese Regenerationszahlen noch immer verschwindend gering, da bei diesen nicht-Säugetieren eine spontane Regeneration von 30-60% der RGC beobachtet werden kann (Humphrey et al. 1985; Stelzner et al. 1986). Darüberhinaus untersuchte Rose auch die Regenerationsfähigkeit von adulten *Callithrix*-Ganglienzellen, die während ihres gesamten Lebens eine spontane, wenn auch im Vergleich zur postnatalen Retina geringere Regenerationsfähigkeit erhalten. Dieses Regenerationsmodell, das keine Vorbehandlung in Form eines operativen Eingriffes benötigt, wurde auch in dieser Arbeit für den Vergleich der Auswirkung des ROCK-Inhibitors auf adulte Rattenganglienzellen und auf postnatale Primaten-RGC verwendet.

4.3 ROCK-Inhibition

Erste Hinweise auf eine Rolle der Rho-GTPasen im ZNS von Säugetieren wurden in den 1990er Jahren bei der Untersuchung unterschiedlicher Bereiche von adulten Rattenhirnen gefunden (Olenik et al. 1997). Weitere Studien wiesen dann einzelne Funktionen von den GTPasen Rho, Rac und Cdc42 auf das Wachstum von Axonen nach: Deren

Wachstum wird allgemein formuliert über die Bewegung des Wachstumskegels reguliert, wobei die Rho-abhängige Aktinpolymerisierung eine große Rolle spielt (Lin et al. 1994; Hall 1998). Weiterhin konnte in verschiedenen Zellreihen nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von Rac und Cdc42 zur Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien führt, welche als Bestandteile des Wachstumskegels das Axonwachstum auf diese Weise fördern können (Kozma et al. 1997; Lamoureux et al. 1997). Im Gegensatz zu Rac und Cdc42 bewirkt die Rho-GTPase dagegen eine Retraktion der Neuriten, ein Zusammenfallen des Wachstumskegels und bremst somit axonales Wachstum (Jalink et al. 1994; Niederost et al. 2002; Nikolic 2002; Ahmed et al. 2005). Daher wurde in vielen Studien durch eine entsprechende Inaktivierung von Rho bzw. ROCK versucht, das Auswachsen der Axone und damit die Regeneration adulter ZNS-Neurone positiv zu beeinflussen.

Inhibitoren des Rho/ROCK-Signalweges

Durch die Beeinflussung der Aktindynamik in den Wachstumskegeln der Neuriten und durch Hemmung des gemeinsamen Signalweges der inhibitorischen Moleküle aus Myelin und glialen Narbengewebe (siehe Einleitung) soll die axonale Regeneration im ZNS von Säugetieren gefördert werden. Dabei kann der gemeinsame intrazelluläre Rho/ROCK-Signalweg auf verschiedenen Ebenen gehemmt werden: Zum einen kann die GTPase Rho mit Hilfe der aus *Clostridium botulinum* stammenden C3-Transferase durch ADP-Ribosylierung inaktiviert werden. Dazu kann die C3-Ribosyltransferase entweder direkt zu den Zellen bzw. Axonen gegeben werden (Lehmann et al. 1999) oder mittels eines Adenovirus werden die RGC mit einem Gen für die C3-Transferase transfiziert (Fischer et al. 2004). Beide Methoden führten jedoch nur zu einer geringen axonalen Regeneration in den Sehnerv hinein. Allerdings konnte durch die Kombination der Rho-Hemmung mit der Transplantation eines peripheren Nervens stärkere Effekte erzielt werden (Hu et al. 2007).

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Hemmung der intrazellulären Rho-Kinasen, welche als nachgeschalteten Effektoren der Rho-GTPase einen potentiellen pharmakologischen Angriffspunkt darstellen. Derzeit sind mehrere ROCK-Inhibitoren erhältlich, die aber alle als kompetitive Antagonisten an der ATP-Bindungsstelle wirken. Fasudil ist ein z. B. moderater Hemmstoff der ROCKs, der in Japan sogar schon klinisch als Vasodilatator eingesetzt wird (Shibuya et al. 1992; Hirooka et al. 2005). In Experimenten mit Ratten scheint er zudem auch die neurologischen Symptome nach Verletzung des Rückenmarkes bei systemischer Gabe zu bessern (Hara et al. 2000). In dieser Arbeit wurde allerdings der zellpermeable ROCK-Inhibitor Y-27632 eingesetzt, der sowohl bei

in vitro, als auch *in vivo*-Experimenten eine Förderung des axonalen Wachstums zeigte (Lehmann et al. 1999; Fournier et al. 2003; Monnier et al. 2003; Chan et al. 2005; Lingor et al. 2008; Lingor et al. 2008). Das Pyridin-Derivat hat eine inhibitorische Wirkung auf sowohl ROCK I, als auch ROCK II, aber hemmt darüberhinaus auch noch konzentrationsabhängig andere Kinasen wie die protein kinase C-related protein kinase (PRK-2) oder MSK1 (mitogen- and stress-activated protein kinase-1) (Davies et al. 2000). Damit ist die PRK-2 ein Zielprotein von den beiden GTPasen Rho und Rac, während die ROCKs v. a. von Rho aktiviert werden. Gemeinsam ist ihnen wiederum ihr Einfluss auf die Regulation des Aktinzytoskelettes, wodurch ihnen in der Regenerationsforschung große Beachtung zuteil wird (Vincent et al. 1997). In höheren Y-27632-Konzentrationen ab 50µl werden noch weitere Kinasen wie CaMKII, PKC, cAMP-dependent kinase und die Myosinleichtkettenkinase (MLCK) gehemmt (Narumiya et al. 2000). Bei den hier durchgeführten Versuchen muss daher berücksichtigt werden, dass durch die verwendete Inhibitor-Konzentration (100µMol) nicht alle beobachteten Effekte auf die ROCK-Hemmung zurückführbar sind, sondern es zu einer Effektüberlagerung durch die Blockade anderer Kinasen kommen kann. Eine Studie zu den einzelnen Effekten von ROCK I, II und PRK-2 (Darenfed et al. 2007) analysierte durch individuelle knockdown-Versuche deren Wirkung auf auswachsende Neuriten von Cerebellumkulturen. Dabei stellte sich heraus, dass zwar der knockdown jeder einzelnen Kinase eine regenerationsfördernde Wirkung aufwies, doch nur die gemeinsame Blockade aller drei Kinasen durch Y-27632 hatte ein robustes Wachstum zur Folge, so dass die Wirkung dieses Inhibitors auf der Co-Hemmung mehrerer Kinasen zu beruhen scheint.

Einfluss einer ROCK-Inhibition auf Neurone in vitro und in vivo

Wie anfangs erläutert (siehe Einleitung) wird die Regeneration postmitotischer ZNS-Neurone nicht nur durch ihr abnehmendes intrinsisches Regenerationspotential und durch die Abwesenheit wachstumsfördernder Substanzen limitiert, sondern auch durch inhibitorische Moleküle aus dem Myelin und dem Narbengewebe beeinflusst: Myelin associated glycoprotein (MAG), Nogo, oligodendrocyte myelin glykoprotein (OMgp), Chondroitinsulfatproteoglykane (CSPG), Semaphorine und Ephrine aktivieren trotz ihrer unterschiedlichen Herkunft den gemeinsamen intrazellulären Rho/ROCK-Signalweg und hemmen dadurch das axonale Wachstum (Schnell et al. 1990; Jalink et al. 1994; Fournier et al. 2001; Shamah et al. 2001; Yamashita et al. 2002; Kubo et al. 2007). Die Blockade dieser Signalkaskade eröffnet daher die Möglichkeit die durch inhibitorische Moleküle ausgeübte Regenerationshemmung der RGC aufzuheben, da die

Rho/ROCK-Effektoren in den retinalen Axonen und ihren Wachstumskegeln exprimiert werden (Wahl et al. 2000; Cheng et al. 2003).

Diese regenerationsfördernde Wirkung durch Blockade des Rho/ROCK-Signalweges konnte in vielen unterschiedlichen Studien auf wachstumspermissiven und – inhibitorischen Substraten an Spinalganglienzellen, Rückenmarksneuronen (Dergham et al. 2002; Borisoff et al. 2003; Dubreuil et al. 2003; Fournier et al. 2003) und RGC (Lehmann et al. 1999; Monnier et al. 2003; Bertrand et al. 2005; Lingor et al. 2007; Lingor et al. 2008) sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* dargestellt werden. In diesen Studien wurde anhand verschiedener Zellkulturen bzw. Zelllinien und durch eine unterschiedliche Anordnung der *in vivo*-Experimente stets ein das Neuritenwachstum oder gar ein das Überleben der Zellen fördernder Effekt der Rho/ROCK-Hemmung beobachtet. Allerdings wurden in den meisten Versuchsreihen embryonale oder postnatale Zellen verwendet, die generell schon eine höhere intrinsische Regenerationsfähigkeit als adulte Zellen aufweisen. Daher wurden in dieser Arbeit die *in vitro*-Versuche mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 nicht nur an postnatalen Primatenganglienzellen, sondern auch an adulten RGC der Ratte durchgeführt.

4.4 Regenerationsversuche an Ratten- und Primatenretina

Nach konditionierender Vorbehandlung in Form einer Quetschung des Sehnervens und Verletzung der Linse wurde die adulte Rattenretina drei Tage nach dem operativen Eingriff explantiert und kultiviert. Anschließend wurde der ROCK-Inhibitor Y-27632 in einer Konzentration von 100µMol zu den Retinaexplantaten hinzugegeben (Kontrollgruppe: nur S4-Medium). Eine Quantifizierung der Anzahl und Länge der auswachsenden Neuriten drei Tage nach Explantation zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,513$) zwischen den beiden Gruppen: Der Median der Experimentalgruppe betrug 76,74 Fasern pro mm, der in der Kontrollgruppe 79 Axone pro mm. Auch die Anzahl der auswachsenden Neuriten $> 500\mu\text{m}$ und $> 800\mu\text{m}$ wies keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,468$ bzw. $p = 0,702$) zwischen beiden Gruppen auf (16 und 4,5 Axone pro mm in der Experimentalgruppe vs. 16 und 5 Axone pro mm in der Kontrollgruppe). Daher scheint der ROCK-Inhibitor in der vorliegenden Versuchsreihe mit adultem Retinagewebe der Ratte keinen regenerationsfördernden Einfluss auf das Axonwachstum auszuüben.

Im Gegensatz zu den adulten RGC der Ratte konnte in den Versuchen mit dem postpartalen Retinagewebe des *Callithrix jacchus* ein regenerationsfördernder Effekt der ROCK-Hemmung beobachtet werden. Zwischen den drei Gruppen, den Experimental-

gruppen (100µM ROCK-Inhibitor direkt nach der Retinaexplantation oder erst nach 24 stündiger Kultivierung) und der Kontrollgruppe, besteht ein signifikanter Unterschied sowohl in Hinblick auf die Anzahl, als auch auf die Länge der Axone: Die Axondichte pro mm betrug in der ROCK-Inhibitor direkt-Gruppe 337, in der Inhibitor nach 24h-Gruppe 360 und in der Kontrollgruppe 202 Axone pro mm (Mediane), so dass nach Anwendung eines statistischen Tests und bei Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ ein signifikanter Effekt zwischen den Experimental- und der Kontrollgruppe berechnet werden konnte ($p = 0,00$). Ein ähnliches Ergebnis konnte auch bei der Messung der Axonlängen festgestellt werden: Die Anzahl der Axone $> 500\mu\text{m}$ betrug in der Kontrollgruppe 33,5, in den Experimentalgruppen 86 (Y-27632 direkt) und 85 (Y-27632 nach 24h) Axone pro mm. Die Anzahl der Axone, die $> 800\mu\text{m}$ vom Filterrand entfernt wuchsen, beliefen sich auf 4 Neuriten in der Kontrollgruppe und 25 (Y-27632 direkt) bzw. 18 (Y-27632 nach 24h) Axone pro mm in den Inhibitorgruppen. Durch die anschließende Signifikanztestung konnte auch jeweils für den Parameter Axonlänge > 500 bzw. $> 800\mu\text{m}$ ein signifikanter Unterschied zwischen den Experimentalgruppen und der Kontrollgruppe errechnet werden (jeweils $p = 0,001$). Daher scheint Y-27632 in einer Konzentration von 100µM auf die auswachsenden Axone von postpartalen Primatenganglienzellen einen signifikanten, regenerationsfördernden Einfluss zu haben, wenngleich dieser Effekt in Anbetracht der generell niedrigen Regenerationsleistung der RGC *in vitro* noch immer sehr gering erscheint. Allerdings scheint der Zeitpunkt der Inhibitor-Zugabe (direkt nach Explantation vs. nach 24 h) keine zusätzliche Wirkung zu zeigen, da der p-Wert mit $p = 0,189$ keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Experimentalgruppen beweist.

Dosisabhängiger Effekt des ROCK-Inhibitors

In einem einzelnen Experiment wurde versuchsweise der ROCK-Inhibitor auch in einer anderen Konzentration an der Affenretina getestet, um die optimale Hemmstoffkonzentration für unsere Versuchsreihen zu finden. Der Vergleich von 50µMol und 100µMol Y-27632 auf auswachsende Primatenganglienzellen zeigte im Bezug auf die Axondichte einen signifikant stärkeren wachstumsfördernden Einfluss ($p = 0,000$) der höheren Hemmstoffkonzentration, da unter 100µMol ROCK-Inhibitor durchschnittlich 346,65 Axone und unter 50µMol nur 198,83 Axone pro mm auswuchsen. Eine ähnliche signifikante Wirkung ($p = 0,000$) der höheren Inhibitorkonzentration konnte auch bei der Zählung der Axone in einem Abstand von $> 500\mu\text{m}$ vom Filterrand beobachtet werden: In der Kultur mit 50µMol wuchsen durchschnittlich 40,4 Axone, in der mit 100µMol dagegen 86,45 Axone pro mm aus. Bei der Erfassung der Axonanzahl mit einer Länge $> 800\mu\text{m}$ wurde dagegen kein signifikanter Unterschied ($p = 0,631$) zwischen den beiden

Konzentrationen beobachtet (20,9 Axone in der 50µMol-Gruppe vs. 21,95 Axone pro mm in der 100 µMol-Gruppe), so dass zwar die Anzahl der Axone in einem Abstand von 200 und 500µm vom Filterrand durch die höhere Y-27632-Konzentration, nicht jedoch die Anzahl der längsten Neuriten > 800µm beeinflusst wird.

Es gibt zahlreiche Studien mit unterschiedlichen Y-27632-Konzentrationen, die jeweils die gewählte Konzentration als die optimale herausstellen und höhere bzw. niedrigere Konzentrationen dagegen als toxisch darstellen. Ahmed und Kollegen stellen in ihrer aktuellen Studie (Ahmed et al. 2009) eine ROCK-Inhibitorkonzentration von 10µM als optimale Konzentration dar, welche das Axonwachstum der zusammen mit CNTF auf inhibitorischen Myelinsubstraten wachsenden RGC optimal stimulieren kann. Dieser Studie zufolge sind höhere Y-27632-Konzentrationen wie 20, 30 oder 40µM dagegen eher toxisch, da das Überleben der RGC und das Axonwachstum in der Co-Kultur mit CNTF deutlich reduziert wurde. Auch Lingor und Bähr (Lingor et al. 2008) verwendeten für ihre *in vitro*-Versuche mit RGC-5 Zellkulturen eine ROCK-Inhibitor-Konzentration von 10µM, wodurch sowohl das Überleben der RGC, als auch das durchschnittliche Neuritenwachstum gesteigert werden konnte. Eine ihrer früheren Studien mit humanen Ntera-2 Zellen auf CSPG-Substraten (Lingor et al. 2007) beobachtet dagegen einen das Neuritenwachstum am stärksten fördernden Effekt bei einer Y-27632-Konzentration von 10-50µmol/L. Dies steht im Kontrast zu unseren Ergebnissen und zu denen mit ROCK-Inhibitor-Versuchen am Modell von Rückenmarksverletzungen der Ratte (Chan et al. 2005): Niedrige Y-27632-Konzentrationen (2mmol/L) wirkten sich in diesem *in vivo*-Modell eher schädlich auf die Regenerationsleistung aus, während hohe Konzentrationen (20mmol/L) sowohl die Anzahl der auswachsenden Axone, als auch die funktionelle Erholung der motorischen Aktivität nach der Rückenmarksverletzung verbesserten. Eine die dosisabhängigen Effekte von Y-27632 und Fasudil auf die RGC-Regeneration von Katzen untersuchende Studie von 2008 unterstützt aber auch die Wirkung von hohen Y-27632-Konzentrationen wie die von uns gewählte Dosis (Ichikawa et al. 2008). Ihren Ergebnissen zufolge stellen 100µM die optimale Y-27632-Konzentration dar, da zum einen in dieser Dosis das Wachstum der Fortsätze der Neuriten und Gliazellen zu (fast) gleichen Anteilen gefördert wurde und zum anderen *in vitro* die meisten und längsten Ganglienzellaxone auswuchsen. Allerdings zeigt diese Studie auch einen wachstumshemmenden Effekt von zu hohen Y-27632-Konzentrationen, da bei dem *in vivo*-Modell mit 300µM Inhibitor wieder ein regenerationshemmender Effekt auftrat.

Die in dieser Arbeit gewählte ROCK-Inhibitor-Konzentration von 100µMol wies in unserem Vergleich zu 50µMol einen die Zahl der Axone, nicht jedoch die Länge der Axone fördernden Effekt auf. In der Literatur wird die von uns gewählte Konzentration teils als optimale Dosis, teils aber als toxische Konzentration bewertet. Anscheinend muss für jedes Versuchstier bzw. für jede einzelne Zelllinie die passende Inhibitor-dosis einzeln überprüft werden, da die verschiedenen Studien mit ihren unterschiedlichen Versuchsbedingungen zum Teil gegensätzliche Ergebnisse zur optimalen Y-27632-Dosis hervorbringen. Aber für die Regeneration der postnatalen Primatenganglienzellen scheint unseren Daten zufolge 100µMol Y-27632 einen wachstumsfördernden Effekt auf die Axone zu haben, da sowohl die Anzahl der Axone, als auch ihre Länge im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant anstiegen. Bei den adulten RGC der Ratte konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden, so dass bei dieser Versuchsanordnung noch andere Faktoren eine Rolle spielen müssen.

Vergleich der Regeneration von embryonalen/postnatalen und adulten RGC

Y-27632 hat in verschiedenen Studien einen das Axonwachstum fördernden Effekt auf inhibitorischen und nicht-inhibitorischen Substraten gezeigt: Diese Wirkung konnte an embryonalen Spinalganglienzellen (Borisoff et al. 2003), retinalen Explantaten (Monnier et al. 2003), PC-12 Zellen (Zhang et al. 2006) oder an humanen Ntera-2 Zellen (Lingor et al. 2007) beobachtet werden. Trotz dieser Erfolge ist die Regeneration der RGC noch immer sehr begrenzt, da *in vivo* z. B. nur < 0,02% der Axone nach Verletzung des N. opticus und intravitrealer Y-27632-Injektion regenerieren können und auch *in vitro* sind die Erfolge im Vergleich zur der Anzahl der apoptotischen Zellen trotz verschiedener regenerationsfördernder Maßnahmen klein (Lingor et al. 2007; Berry et al. 2008; Lingor et al. 2008).

Lingor et al. haben 2007 das durch ROCK-Inhibition induzierte verstärkte Neuritenwachstum auf CSPG-Substraten *in vitro* und die vermehrte axonale Regeneration in den Sehnerv *in vivo* beschrieben (Lingor et al. 2007). Ihrer Studie mit Ntera-2 Zellen zufolge schwächt die Zugabe von Y-27632 oder anderen ROCK-Inhibitoren die durch CSPG-vermittelte Wachstumshemmung dosisabhängig *in vitro* und am Modell der Sehnervenquetschung auch *in vivo* ab, so dass ein verstärktes Auswachsen der Neuriten erfolgen konnte. Eine ihrer weiteren Studien mit RGC-5 Zellen, einer RGC-Primärkultur und einem *in vivo*-Modell der Sehnervverletzung zeigt (Lingor et al. 2008), dass Y-27632 und besonders die gemeinsame Applikation mit dem neurotrophi-schen Faktor CNTF das Überleben der RGC sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* signifikant verstärken konnten. Neben diesem neuroprotektiven Effekt konnte *in vitro* und *in vivo*

jeweils für den ROCK-Inhibitor und CNTF ein erhöhtes Neuritenwachstum belegt werden, welches durch die kombinierte Behandlung mit beiden Substanzen noch weiter gesteigert werden konnte. Dieser gemeinsame Effekt soll durch die von beiden Substanzen induzierte synergistische Aktivierung des MAPK-Signalweges, durch Phosphorylierung von Akt und durch Abschwächung des negativen Wachstumsregulators STAT3 vermittelt werden. Diese neuroprotektiven und pro-regenerativen Effekte der Y-27632 und CNTF Kombinationsbehandlung waren jedoch *in vitro* stärker ausgeprägt als *in vivo*, da für die *in vitro*-Versuche RGC-5 Zellen bzw. Primärkulturen von postnatalen RGC und für die *in vivo*-Experimente adulte Rattenretina verwendet wurde. Aufgrund des höheren intrinsischen Regenerationspotentials der embryonalen und postnatalen Zellen können die Y-27632-Effekte nicht direkt auf die *in vivo*-Situation übertragen werden. Da aber die *in vitro*-Versuche von Lingor et al. nur an immortalisierten Zelllinien und Primärkulturen durchgeführt wurden, haben wir in dieser Arbeit das etablierte und aussagekräftigere *in vitro*-Modell der Retinaorgankultur verwendet, um den Effekt der ROCK-Inhibition auf adulte Ganglienzellen der Ratte zu analysieren.

Auch die zeitgleich zu dieser Arbeit durchgeführte Studie von Ahmed et al. (Ahmed et al. 2009) hat aufgrund der Verwendung embryonaler und postnataler Zellen in früheren *in vitro*-Untersuchungen (Fournier et al. 2003; Monnier et al. 2003; Lingor et al. 2008; Lingor et al. 2008) die Effekte von Y-27632 an adulten RGC untersucht. Im Gegensatz zu dieser Arbeit wurden die Versuche zwar auf wachstumshemmenden Myelin-Substraten durchgeführt, aber auch bei dieser Versuchsanordnung konnte der ROCK-Inhibitor Y-27632 allein nicht das Wachstum der RGC-Neuriten stimulieren. Damit bestätigt die Studie von Ahmed et al. unsere Ergebnisse am adulten Retinaorganmodell der Ratte: Y-27632 hat im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen regenerationsfördernden Einfluss auf die Anzahl oder die Länge der auswachsenden Axone der adulten Retina. Allerdings konnten Ahmed et al. durch Co-Stimulation von Y-27632 mit CNTF oder durch erhöhte cAMP-Level das Neuritenwachstum signifikant steigern, wobei die Kombination von Y-27632, CNTF und erhöhtem cAMP-Level die besten Resultate zeigte. Daher vermuten die Autoren, dass adulte RGC eine Co-Stimulation mit neurotrophen Faktoren und/oder mit erhöhten cAMP-Leveln benötigen, um eine robuste Regeneration zu ermöglichen. Das höhere intrinsische Regenerationspotential in embryonalen und postnatalen Neuronen, die einen höheren cAMP-Level als adulte Zellen aufweisen (Cai et al. 2001), befähigt diese dagegen zu einer Regenerationssteigerung unter alleiniger Y-27632-Applikation. Diese Vermutung kann anhand unserer Ergebnisse aus den Versuchen mit postnatalen Primatenganglienzellen bestätigt werden: Die Zugabe von 100µMol Y-27632 direkt nach der Retinaexplantation oder nach 24 stündi-

ger Kultivierung erhöhte sowohl die Anzahl der Axone in einem Abstand von 200 und 500µm vom Filterrand, als auch ihre Anzahl an langen Fortsätzen > 800µm, jedoch hat der Zeitpunkt der Inhibitorzugabe keinen zusätzlichen Effekt auf die Regenerationsleistung. Der erhöhte cAMP-Level in embryonalen und frühen postnatalen Neuronen kann demnach ihr im Vergleich zu adulten Zellen erhöhte Regenerationsfähigkeit erklären, die keine zusätzlichen wachstumsstimulierenden Faktoren benötigt.

Diese und unsere Studie zeigen, dass eine einzige Strategie zur Aufhebung der regenerationshemmenden Mechanismen in adulten ZNS-Neuronen nicht ausreicht, um ein robustes Axonwachstum zu induzieren. Vielmehr die Kombination von mehreren wachstumsfördernden Maßnahmen wie die Hemmung des Signalweges inhibitorischer Moleküle aus Myelin und Narbengewebe, die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels oder die Zugabe von wachstumsfördernden Substanzen wie CNTF kann das Regenerationsdefizit der adulten Neurone überwinden.

Trotz der durch ROCK-Inhibition beobachteten pro-regenerativen Effekte an postnatalen Primatenganglienzellen und an adulten RGC der Ratte nach Co-Stimulation mit CNTF und/oder erhöhten cAMP-Spiegeln stellt sich immer noch die Frage, warum die Hemmung der Rho-Kinase, die bewiesenermaßen ein negativen Regulator des Neuritenwachstums ist, nur eine im Vergleich zum peripheren Nervensystem geringe Regenerationsleistung zur Folge hat. Eine Möglichkeit besteht darin, dass neben dem Rho/ROCK-Signalweg noch andere Signalkaskaden existieren, die durch weitere inhibitorische Moleküle und Rezeptoren das Axonwachstum inhibieren können. Das Narbengewebe nach einer ZNS-Verletzung enthält viele verschiedene inhibitorische Moleküle wie MAG, Nogo, CSPG, RGM, Ephrine und Semaphorine (Moreau-Fauvarque et al. 2003; Benson et al. 2005; Schwab et al. 2005; Fabes et al. 2006; Kubo et al. 2007), die zum Teil unabhängig von Rho die axonale Regeneration beeinflussen können. Dies konnte z. B. für Semaphorin-3A und Semaphorin-4D bewiesen werden, die Rho-unabhängig durch Aktivierung von GSK-3β (Glykogen synthase kinase-3) das Axonwachstum inhibieren und den Kollaps des Wachstumskegels induzieren können. (Eickholt et al. 2002; Ito et al. 2006). Aufgrund dieses parallelen Signalweges ist für eine stärkere Regenerationsantwort evtl. nicht nur eine ROCK-, sondern z. B. auch eine GSK-3β-Inaktivierung notwendig.

Eine zusätzliche Ursache für die ungenügende Regenerationsleistung adulter Neurone nach Y-27632-Behandlung kann in der Hemmung weiterer regenerationsassoziierter Kinasen durch den Inhibitor begründet sein, da neben ROCK I und II auch andere Kinasen wie die protein kinase A (PKA) oder die protein kinase G konzentrationsab-

hängig inhibiert werden (Davies et al. 2000) und dadurch der durch ROCK-Inaktivierung entstandene regenerationsfördernde Effekt abgeschwächt werden kann.

Desweiteren darf nicht nur die GTPase Rho und ihre nachgeschalteten Effektoren allein betrachtet werden, da auch andere GTPasen wie Rac und Cdc42 einen Einfluss auf auswachsende Neuriten ausüben: Die beiden GTPasen Rac und Cdc42 unterstützen das Neuritenwachstum, während Rho eine Retraktion bzw. Wachstumshemmung verursacht (Yamaguchi et al. 2001). Durch den ROCK-Inhibitor Y-27632 wird aber neben den oben genannten Effekten auch noch Rac aktiviert, indem er den inhibitorischen Effekt der Rho-Kinasen auf die GTPase Rac aufhebt. Daher verstärkt Y-27632 die Rac-Aktivität und kann auf diesem Weg zusätzlich wachstumsfördernd auf die Neuriten einwirken.

Schlußfolgerung

Über verschiedene Signalwege wie der Blockade der Rho-Kinasen mittels Y-27632, der Applikation neurotropher Faktoren oder der Anhebung des cAMP-Spiegels kann auch im adulten ZNS die neuronale Regeneration gefördert werden, obwohl die intrinsische Regenerationsfähigkeit im Vergleich zu embryonalen und frühen postnatalen Zellen sehr gering ist. Diese Arbeit und die gleichzeitig publizierte Studie von Ahmed et al. haben die Wirkung des ROCK-Inhibitors Y-27632 auf adulte und postnatale RGC untersucht und konnten zwar einen regenerationsfördernden Effekt des Inhibitors auf postnatale Zellen, jedoch keinen Effekt auf adulte Ganglienzellen nachweisen. Diese benötigen daher zusätzlich eine Co-Stimulation mit wachstumsfördernden Substanzen wie CNTF und/oder eine Anhebung des cAMP-Spiegel. Demnach ist für die Regeneration adulter RGC sowohl eine Aktivierung des intrinsischen Wachstumspotentials, als auch die Blockade von inhibitorischen Signalwegen notwendig, während die postnatalen Ganglienzellen in unseren Versuchen aufgrund ihres noch erhöhten cAMP-Spiegels diese zusätzliche Wachstumsstimulation nicht benötigen. Ein Grund, warum diese Maßnahmen dennoch *in vivo* zu keiner ausgedehnten axonalen Regeneration führen, könnte darauf beruhen, dass die Beseitigung einiger wichtiger Wachstumsbarrieren trotzdem nicht alle vorhandenen inhibitorischen Substrate erfasst und diese somit das Axonwachstum durch andere Signalwege noch beeinträchtigen können. Selbst wenn alle inhibitorischen Moleküle schließlich inaktiviert werden könnten, müsste *in vivo* noch das Wachstumsprogramm der adulten Neurone durch verschiedene Mechanismen wie einer Linsenverletzung oder einer Verletzung des N. opticus stimuliert werden. Erst durch beide Maßnahmen gemeinsam, der Aktivierung des intrinsischen Wachstumspotentials und der Blockade inhibitorischer Moleküle, kann eine robuste Steigerung der

axonalen Regeneration erfolgen (Fischer et al. 2004). Daher ist die Kombination unterschiedlicher regenerationsfördernder Strategien notwendig und die in dieser Arbeit untersuchte isolierte Blockade der Rho-abhängigen Signalwege zur Aufhebung der myelin- und narbengewebeinduzierten Wachstumshemmung für eine Regeneration adulter RGC nicht ausreichend.

5 Zusammenfassung

Das adulte zentrale Nervensystem zeigt im Gegensatz zu fetalem oder postpartalem Gewebe eine abnehmende, spontane Regenerationsfähigkeit, so dass eine Modifikation dieses komplexen Regenerationsvorganges nach Verletzung von zentralen Axonen von großem wissenschaftlichem Interesse ist. Im Rahmen der Regenerationsforschung wurden unterschiedliche Möglichkeiten einer verstärkten axonalen Regeneration durch Beeinflussung der glialen Narbenbildung, Zugabe von neurotrophen Faktoren oder der Blockade von inhibitorischen Molekülen aus dem umgebenen Myelin oder dem Narbengewebe untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Expression regenerations- und degenerationsassoziierten Proteinen in der Primatenretina immunhistochemisch während deren Reifung und Alterung analysiert, um mögliche Ansatzpunkte für eine gezielte Beeinflussung des Regenerationsgeschehens zu finden.

Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen

Die postnatal abnehmende Expression von GAP-43 wird schon seit langem mit der reduzierten Regenerationsfähigkeit adulter RGC in Verbindung gebracht und auch diese Arbeit zeigt eine abnehmende, jedoch in der Primatenretina weiterhin konstitutive Proteinexpression im adulten Gewebe, welche ähnlich wie in der Netzhaut der Menschen während der Alterung erhalten bleibt und damit mit einer lebenslang möglichen Regenerationsfähigkeit assoziiert sein könnte.

Die immunhistochemischen Nachweise von GFAP und $\alpha_5\beta_1$ -Integrin zeigen ein schon in der Literatur bekanntes altersabhängiges Expressionsmuster, welches sich für GFAP auf Astrozyten und Müller-Zellen und bei $\alpha_5\beta_1$ -Integrin auf die die Vaskulo- und Angiogenese der Retina beschränkt.

Kristalline haben neben ihrer Aufgabe als Strukturproteine der Linse auch einen das Axonwachstum fördernden Einfluss. Das β -Kristallin zeigt in den durchgeführten Färbungen eine altersabhängige Verteilung in den nukleären Schichten, welche in anderen Studien nicht nachgewiesen werden konnte. Dagegen weist das γ -Kristallin eine geringe Altersabhängigkeit auf und eine besonders bei der postpartalen und juvenilen Retina auffällige Lokalisation in der Nervenfaserschicht, die mit der vermuteten regenerationsfördernden Wirkung der Kristalline in Zusammenhang stehen kann.

Die im Vergleich zu früheren Studien abweichende imm histochemische Lokalisation von Brn-3b und β -Amyloid in der Retina des *Callithrix jacchus* scheint durch eine fehlende Antigen-Antikörperbindung oder durch fehlende Expression dieses Proteins bedingt zu sein. Eine weitere immunhistochemische Untersuchung mit einem anderen Antikörperprodukt sollte an der Primatenretina in Zukunft noch erfolgen.

Dagegen konnte für APP, dem Vorläuferprotein des β -Amyloids, ein altersabhängiges Expressionsmuster nachgewiesen werden. Dieses Glykoprotein soll neben vielen anderen Funktionen das Neuritenwachstum fördern und anti-apoptische Eigenschaften besitzen. Die altersabhängige Signalzunahme in der GCL und der NFL steht daher neben einer regenerationsfördernden Funktion auch im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen wie der AMD oder dem Glaukom im Vordergrund.

Das Intermediärprotein Nestin wird als Marker für neurogliale Vorläuferzellen benutzt und zeigt entsprechend eine starke Expression in der fetalen Primatenretina mit anschließender Abnahme im weiteren Reifungsprozess. Allerdings kann es nach Angaben anderer Autoren nach verschiedenen pathologischen Stimuli erneut und schnell hochreguliert werden, so dass es sich als Marker für retinale Verletzungen eignet.

Hemmung der intrazellulären Rho-Kinase

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde am etablierten Regenerationsmodell der Ratte und an dem spontan regenerierenden Modell der postpartalen Primatenretina der Einfluss einer Blockade des intrazellulären Rho-Kinase-Signalweges auf das Auswachsen von retinalen Axonen *in vitro* analysiert. Im Gegensatz zu den bisher durchgeführten Experimenten mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 wurden in dieser Studie keine immortalisierten oder embryonalen Zellkulturen verwendet, sondern nach konditionierender Vorbehandlung die Regeneration der RGC von adulten Ratten untersucht. Diese zeigten sowohl in Hinblick auf die Dichte, als auch auf die Länge der auswachsenden Axone keinen signifikanten regenerationsfördernden Einfluss durch die Hemmung der intrazellulären Rho-Kinase. Dagegen zeigte die Blockade des Rho/ROCK-Signalweges in der postpartalen Retina des *Callithrix jacchus* einen regenerationsfördernden Effekt auf die Anzahl der auswachsenden Axone und deren Länge. Allerdings war der Zeitpunkt der Inhibitorzugabe zu den Explantaten (zu Beginn der Kultivierung bzw. nach 24h) für die Regenerationsleistung nicht relevant.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die alleinige Hemmung des Rho-Kinase-Signalweges der inhibitorischen Moleküle aus Myelin und Narbengewebe nicht zu einer robusten Regeneration adulter RGC führen. Im Gegensatz dazu konnte Y-27632 in der

Kultur der postpartalen Ganglienzellen der Primatenretina eine signifikante Steigerung der Regenerationsleistung erzielen, jedoch haben embryonale oder postpartale Zellen aufgrund des noch erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegels ein stärkeres intrinsisches Regenerationspotential. Dagegen benötigen adulte RGC für eine robuste Regenerationsleistung neben einer ROCK-Hemmung zusätzliche wachstumsfördernde Maßnahmen wie die aus anderen Studien bekannte Co-Stimulation mit neurotrophen Faktoren oder eine Anhebung des cAMP-Levels, um das Regenerationsdefizit adulter Neurone zu überwinden.

6 Literaturverzeichnis

Adams, J. C. and F. M. Watt (1990). "Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: Reduction in fibronectin binding precedes $[\alpha]5[\beta]1$ integrin loss from the cell surface." *Cell* 63(2): 425-435.

Ahmad, I., C. Dooley, W. Thoreson, J. Rogers and S. Afiat (1999). "In vitro analysis of a mammalian retinal progenitor that gives rise to neurons and glia." *Brain Research* 831(1-2): 1-10.

Ahmad, I., L. Tang and H. Pham (2000). "Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye." *Biochemical and biophysical research communications* 270(2): 517-521.

Ahmann, P. (2003). In vitro Studie zur neurotrophen Wirkung des Augenlinsen-Proteins BetaH-Kristallin auf Motoneurone des embryonalen Hühnchens (*Gallus gallus*). Dissertation. Universitätsbibliothek Bremen 2003.

Ahmed, Z., M. Berry and A. Logan (2009). "ROCK inhibition promotes adult retinal ganglion cell neurite outgrowth only in the presence of growth promoting factors." *Molecular and Cellular Neuroscience* 42(2): 128-132.

Ahmed, Z., R. Dent, E. Suggate, L. Barrett, R. Seabright, M. Berry and A. Logan (2005). "Disinhibition of neurotrophin-induced dorsal root ganglion cell neurite outgrowth on CNS myelin by siRNA-mediated knockdown of NgR, p75NTR and Rho-A." *Molecular and Cellular Neuroscience* 28(3): 509-523.

Aigner, L., S. Arber, J. P. Kapfhammer, T. Laux, C. Schneider, F. Botteri, H.-R. Brenner and P. Caroni (1995). "Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice." *Cell* 83(2): 269-278.

Aigner, L. and P. Caroni (1993). "Depletion of 43-kD growth-associated protein in primary sensory neurons leads to diminished formation and spreading of growth cones." *The Journal of Cell Biology* 123(2): 417-429.

Andley, U. (2007). "Crystallins in the eye: Function and pathology." *Progress in retinal and eye research* 26(1): 78-98.

Asher, R., D. Morgenstern, L. Moon and J. Fawcett (2001). "Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar." *Progress in Brain Research* 132: 611-619.

Aspenström, P., A. Fransson and J. Saras (2004). "Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system." *Biochemical Journal* 377(Pt 2): 327-337.

Badea, T., H. Cahill, J. Ecker, S. Hattar and J. Nathans (2009). "Distinct roles of transcription factors *brn3a* and *brn3b* in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells." *Neuron* 61(6): 852-864.

Bähr, M., J. Vanselow and S. Thanos (1988). "In vitro regeneration of adult rat ganglion cell axons from retinal explants." *Experimental Brain Research* 73(2): 393-401.

Behr, D., L. Hesse, C. Masters and G. Multhaup (1996). "Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I." *Journal of Biological Chemistry* 271(3): 1613-1620.

Benowitz, L. and Y. Yin (2008). "Rewiring the injured CNS: lessons from the optic nerve." *Experimental neurology* 209(2): 389-398.

Benowitz, L. I. and A. Routtenberg (1997). "GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity." *Trends in Neurosciences* 20(2): 84-91.

Benson, M., M. Romero, M. Lush, Q. Lu, M. Henkemeyer and L. Parada (2005). "Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth." *Science's STKE* 102(30): 10694-10699.

Berkelaar, M., D. Clarke, Y. Wang, G. Bray and A. Aguayo (1994). "Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats." *Journal of Neuroscience* 14(7): 4368-4374.

Berry, M., Z. Ahmed, B. Lorber, M. Douglas and A. Logan (2008). "Regeneration of axons in the visual system." *Restorative neurology and neuroscience* 26(2-3): 147-174.

Bertrand, J., M. Winton, N. Rodriguez-Hernandez, R. Campenot and L. McKerracher (2005). "Application of Rho antagonist to neuronal cell bodies promotes neurite growth in compartmented cultures and regeneration of retinal ganglion cell axons in the optic nerve of adult rats." *Journal of Neuroscience* 25(5): 1113-1121.

Bhat, S. and C. Nagineni (1989). "[alpha] B subunit of lens-specific protein [alpha]-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues." *Biochemical and biophysical research communications* 158(1): 319-325.

Bloch, W., E. Forsberg, S. Lentini, C. Brakebusch, K. Martin, H. Krell, U. Weidle, K. Addicks and R. Fassler (1997). " β 1 integrin is essential for teratoma growth and angiogenesis." *Journal of Cell Biology* 139(1): 265-278.

Borisoff, J., C. Chan, G. Hiebert, L. Oschipok, G. Robertson, R. Zamboni, J. Steeves and W. Tetzlaff (2003). "Suppression of Rho-kinase activity promotes axonal growth on inhibitory CNS substrates." *Molecular and Cellular Neuroscience* 22(3): 405-416.

Božani, D., I. Božani and M. Saraga-Babi (2006). "Involvement of cytoskeletal proteins and growth factor receptors during development of the human eye." *Anatomy and embryology* 211(5): 367-377.

Brem, R., S. Robbins, D. Wilson, L. O'Rourke, R. Mixon, J. Robertson, S. Planck and J. Rosenbaum (1994). "Immunolocalization of integrins in the human retina." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35(9): 3466-3474.

Brooks, P., A. Montgomery, M. Rosenfeld, R. Reisfeld, T. Hu, G. Klier and D. Cheresch (1994). "Integrin [alpha] v [beta] 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels." *Cell* 79(7): 1157-1164.

Bruban, J., A. Glotin, V. Dinet, N. Chalour, F. Sennlaub, L. Jonet, N. An, A. Fausat and F. Mascarelli (2009). "Amyloid- (1-42) alters structure and function of retinal pigmented epithelial cells." *Aging Cell* 8(2): 162-177.

Cai, D., J. Qiu, Z. Cao, M. McAtee, B. Bregman and M. Filbin (2001). "Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate." *Journal of Neuroscience* 21(13): 4731-4739.

Canning, D., A. Höke, C. Malemud and J. Silver (1996). "A potent inhibitor of neurite outgrowth that predominates in the extracellular matrix of reactive astrocytes." *International Journal of Developmental Neuroscience* 14(3): 153-175.

Chan, C., K. Khodarahmi, J. Liu, D. Sutherland, L. Oschipok, J. Steeves and W. Tetzlaff (2005). "Dose-dependent beneficial and detrimental effects of ROCK inhibitor Y27632 on axonal sprouting and functional recovery after rat spinal cord injury." *Experimental neurology* 196(2): 352-364.

Chen, D., G. Schneider, J. Martinou and S. Tonegawa (1997). "Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS." *Nature* 385: 434-439.

Chen, H. and A. Weber (2002). "Expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase by Müller cells after optic nerve damage and intravitreal application of brain-derived neurotrophic factor." *Glia* 38(2): 115-125.

Chen, L., L. Wei, Y. Qiu, H. Liu, Z. Rao, G. Ju and Y. Chan (2002). "Significant up-regulation of nestin protein in the neostriatum of MPTP-treated mice: Are the striatal astrocytes regionally activated after systemic MPTP administration?" *Brain Research* 925(1): 9-17.

Chen, M., A. Huber, M. van der Haar, M. Frank, L. Schnell, A. Spillmann, F. Christ and M. Schwab (2000). "Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1." *Nature* 403(6768): 434-439.

Chen, S., S. Gentleman, L. Garey and L. Jen (1996). "Distribution of [beta]-amyloid Precursor and B-cell Lymphoma Protooncogene Proteins in the Rat Retina after Optic Nerve Transection or Vascular Lesion." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 55(10): 1073-1082.

Cheng, Q., Y. Sasaki, M. Shoji, Y. Sugiyama, H. Tanaka, T. Nakayama, N. Mizuki, F. Nakamura, K. Takei and Y. Goshima (2003). "Cdk5/p35 and Rho-kinase mediate ephrin-A5-induced signaling in retinal ganglion cells." *Molecular and Cellular Neuroscience* 24(3): 632-645.

Clark, R., M. Tonnesen, J. Gailit and D. Cheresch (1996). "Transient functional expression of alphaVbeta 3 on vascular cells during wound repair." *The American journal of pathology* 148(5): 1407-1421.

Cohen, J., J. Burne, J. Winter and P. Bartlett (1986). "Retinal ganglion cells lose response to laminin with maturation." *Nature* 322: 465-467.

Cohen, J., V. Nurcombe, P. Jeffrey and D. Edgar (1989). "Developmental loss of functional laminin receptors on retinal ganglion cells is regulated by their target tissue, the optic tectum." *Development* 107(2): 381-387.

Coop, A., K. Wiesmann and M. Crabbe (1998). "Translocation of [beta] crystallin in neural cells in response to stress." *FEBS letters* 431(3): 319-321.

Crabb, J., M. Miyagi, X. Gu, K. Shadrach, K. West, H. Sakaguchi, M. Kamei, A. Hasan, L. Yan and M. Rayborn (2002). "Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(23): 14682-14687.

Cui, Q., K. Cho, K. So and H. Yip (2004). "Synergistic effect of Nogo-neutralizing antibody IN-1 and ciliary neurotrophic factor on axonal regeneration in adult rodent visual systems." *Journal of neurotrauma* 21(5): 617-625.

Cui, Q., Q. Lu, K. So and H. Yip (1999). "CNTF, not other trophic factors, promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters." *Investigative ophthalmology & visual science* 40(3): 760-766.

Cui, Q., L. Tang, B. Hu, K. So and H. Yip (2002). "Expression of trkA, trkB, and trkC in injured and regenerating retinal ganglion cells of adult rats." *Investigative ophthalmology & visual science* 43(6): 1954-1964.

Cui, Q., H. Yip, R. Zhao, K. So and A. Harvey (2003). "Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons." *Molecular and Cellular Neuroscience* 22(1): 49-61.

Dahl, D. (1979). "The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein." *Experimental Eye Research* 28(1): 63-69.

Dani, J. W., D. M. Armstrong and L. I. Benowitz (1991). "Mapping the development of the rat brain by GAP-43 immunocytochemistry." *Neuroscience* 40(1): 277-287.

Darenfed, H., B. Dayanandan, T. Zhang, S. Hsieh, A. Fournier and C. Mandato (2007). "Molecular characterization of the effects of Y-27632." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 64(2): 97-109.

David, S. and A. Aguayo (1981). "Axonal elongation into peripheral nervous system" bridges" after central nervous system injury in adult rats." *Science* 214(4523): 931-933.

David, S. and S. Lacroix (2003). "Molecular approaches to spinal cord repair." *Annual review of neuroscience* 26(1): 411-440.

Davies, S., H. Reddy, M. Caivano and P. Cohen (2000). "Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors." *Biochemical Journal* 351(1): 95-105.

Dentchev, T., A. Milam, V. Lee, J. Trojanowski and J. Dunaief (2003). "Amyloid-beta is found in drusen from some age-related macular degeneration retinas, but not in drusen from normal retinas." *Molecular Vision* 9: 184-190.

Dergham, P., B. Ellezam, C. Essagian, H. Avedissian, W. Lubell and L. McKerracher (2002). "Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair." *Journal of Neuroscience* 22(15): 6570-6577.

Dijk, F., A. A. B. Bergen and W. Kamphuis (2007). "GAP-43 expression is upregulated in retinal ganglion cells after ischemia/reperfusion-induced damage." *Experimental Eye Research* 84(5): 858-867.

DiLoreto Jr, D. A., M. R. Martzen, C. del Cerro, P. D. Coleman and M. del Cerro (1995). "Müller cell changes precede photoreceptor cell degeneration in the age-related retinal degeneration of the Fischer 344 rat." *Brain Research* 698(1-2): 1-14.

Ding, J., J. Lin, B. Mace, R. Herrmann, P. Sullivan and C. Bowes Rickman (2008). "Targeting age-related macular degeneration with Alzheimer's disease based immunotherapies: Anti-amyloid- antibody attenuates pathologies in an age-related macular degeneration mouse model." *Vision research* 48(3): 339-345.

Doster, S. K., A. M. Lozano, A. J. Aguayo and M. B. Willard (1991). "Expression of the growth-associated protein GAP-43 in adult rat retinal ganglion cells following axon injury." *Neuron* 6(4): 635-647.

Dubreuil, C., M. Winton and L. McKerracher (2003). "Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system." *The Journal of Cell Biology* 162(2): 233-243.

Eickholt, B., F. Walsh and P. Doherty (2002). "An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling." *The Journal of Cell Biology* 157(2): 211-217.

Ellezam, B., I. Selles-Navarro, C. Manitt, T. Kennedy and L. McKerracher (2001). "Expression of netrin-1 and its receptors DCC and UNC-5H2 after axotomy and during regeneration of adult rat retinal ganglion cells." *Experimental neurology* 168(1): 105-115.

Elnér, S. and V. Elnér (1996). "The integrin superfamily and the eye." *Investigative Ophthalmology & Vision Science* 37(5): 696-701.

Eng, L. and R. Ghirnikar (2008). "GFAP and astrogliosis." *Brain Pathology* 4(3): 229-237.

Eng, L., R. Ghirnikar and Y. Lee (2000). "Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000)." *Neurochemical research* 25(9): 1439-1451.

Eng, L. F., J. J. Vanderhaeghen, A. Bignami and B. Gerstl (1971). "An acidic protein isolated from fibrous astrocytes." *Brain Research* 28(2): 351-354.

Erkman, L., R. McEvelly, L. Luo, A. Ryan, F. Hooshmand, S. O'Connell, E. Keithley, D. Rapaport, A. Ryan and M. Rosenfeld (1996). "Role of transcription factors a Brn-3.1 and Brn-3.2 in auditory and visual system development." *Nature*(381): 603-606.

Fabes, J., P. Anderson, R. Yáñez-Muñoz, A. Thrasher, C. Brennan and S. Bolsover (2006). "Accumulation of the inhibitory receptor EphA4 may prevent regeneration of corticospinal tract axons following lesion." *European Journal of Neuroscience* 23(7): 1721-1730.

Fawcett, J. (1997). "Astrocytic and neuronal factors affecting axon regeneration in the damaged central nervous system." *Cell and tissue research* 290(2): 371-377.

Fawcett, J. and R. Asher (1999). "The glial scar and central nervous system repair." *Brain Research Bulletin* 49(6): 377-391.

Fischer, D. (2000). "Protektiver Einfluss von beta- und gamma-Kristallinen auf das neuronale Überleben und die axonale Regeneration im adulten zentralen Nervensystem (Dissertation)" Tectum Verlag Marburg

Fischer, D., T. Hauk, A. Müller and S. Thanos (2008). "Crystallins of the β/γ -superfamily mimic the effects of lens injury and promote axon regeneration." *Molecular and Cellular Neuroscience* 37(3): 471-479.

Fischer, D., Z. He and L. Benowitz (2004). "Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state." *Journal of Neuroscience* 24(7): 1646-1651.

Fischer, D., P. Heiduschka and S. Thanos (2001). "Lens-injury-stimulated axonal regeneration throughout the optic pathway of adult rats." *Experimental neurology* 172(2): 257-272.

- Fischer, D., M. Pavlidis and S. Thanos (2000). "Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cell death and promotes axonal regeneration both in vivo and in culture." *Investigative ophthalmology & visual science* 41(12): 3943-3954.
- Fischer, D., V. Petkova, S. Thanos and L. Benowitz (2004). "Switching mature retinal ganglion cells to a robust growth state in vivo: gene expression and synergy with RhoA inactivation." *Journal of Neuroscience* 24(40): 8726-8740.
- Fitzgerald, M., B. Vana and A. Reiner (1990). "Evidence for retinal pathology following interruption of neural regulation of choroidal blood flow: Müller cells express GFAP following lesions of the nucleus of Edinger-Westphal in pigeons." *Current eye research* 9(6): 583-598.
- Ford-Holevinski, T., J. Hopkins, J. Philip McCoy and B. Agranoff (1986). "Laminin supports neurite outgrowth from explants of axotomized adult rat retinal neurons." *Developmental Brain Research* 28(1): 121-126.
- Fournier, A., T. GrandPre and S. Strittmatter (2001). "Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration." *Nature* 409(6818): 341-346.
- Fournier, A., B. Takizawa and S. Strittmatter (2003). "Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS." *Journal of Neuroscience* 25(4): 1416-1423.
- Francis, S., K. Goh, K. Hodivala-Dilke, B. Bader, M. Stark, D. Davidson and R. Hynes (2002). "Central roles of α 5 β 1 integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22(6): 927-933.
- Friedman, B. and A. Aguayo (1985). "Injured neurons in the olfactory bulb of the adult rat grow axons along grafts of peripheral nerve." *Journal of Neuroscience* 5(6): 1616-1625.
- Gan, L., S. Wang, Z. Huang and W. Klein (1999). "POU domain factor Brn-3b is essential for retinal ganglion cell differentiation and survival but not for initial cell fate specification." *Developmental biology* 210(2): 469-480.
- Gan, L., M. Xiang, L. Zhou, D. Wagner, W. Klein and J. Nathans (1996). "POU domain factor Brn-3b is required for the development of a large set of retinal ganglion cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(9): 3920-3925.
- George, E. L., H. S. Baldwin and R. O. Hynes (1997). "Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells." *Blood* 90(8): 3073-3081.
- Glenner, G. and C. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." *Biochemical and biophysical research communications* 120(3): 885-890.

Goldberg, J., M. Klassen, Y. Hua and B. Barres (2002). "Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells." *Science* 296(5574): 1819-1820.

Goldberg, J., M. Vargas, J. Wang, W. Mandemakers, S. Oster, D. Sretavan and B. Barres (2004). "An oligodendrocyte lineage-specific semaphorin, Sema5A, inhibits axon growth by retinal ganglion cells." *Journal of Neuroscience* 24(21): 4989-4999.

Graeber, M. and G. Kreutzberg (1988). "Delayed astrocyte reaction following facial nerve axotomy." *Journal of neurocytology* 17(2): 209-220.

Graw, J. (1997). "The crystallins: genes, proteins and diseases." *Biological chemistry* 378(11): 1331-1348.

Graw, J. (2009). "Genetics of crystallins: cataract and beyond." *Experimental Eye Research* 88(2): 173-189.

Gray, C. and A. Patel (1993). "Induction of [beta]-amyloid precursor protein isoform mRNAs by bFGF in astrocytes." *NeuroReport* 4(6): 811-814.

Gu, H., S. Wang, C. Messam and Z. Yao (2002). "Distribution of nestin immunoreactivity in the normal adult human forebrain." *Brain Research* 943(2): 174-180.

Guo, L., T. Salt, V. Luong, N. Wood, W. Cheung, A. Maass, G. Ferrari, F. Russo-Marie, A. Sillito, M. Cheetham, S. Moss, F. Fitzke and M. Cordeiro (2007). "Targeting amyloid- β in glaucoma treatment." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(33): 13444-13449.

Halfter, W. and S. Deiss (1984). "Axon growth in embryonic chick and quail retinal whole mounts in vitro." *Developmental biology* 102(2): 344-355.

Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." *Science* 279(5350): 509-514.

Hall, D., K. Neugebauer and L. Reichardt (1987). "Embryonic neural retinal cell response to extracellular matrix proteins: developmental changes and effects of the cell substratum attachment antibody (CSAT)." *The Journal of Cell Biology* 104(3): 623-634.

Hara, M., M. Takayasu, K. Watanabe, A. Noda, T. Takagi, Y. Suzuki and J. Yoshida (2000). "Protein kinase inhibition by fasudil hydrochloride promotes neurological recovery after spinal cord injury in rats." *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* 93(1): 94-101.

Hardy, J. and D. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." *Science* 297(5580): 353-356.

Hashimoto, R., Y. Nakamura, H. Kosako, M. Amano, K. Kaibuchi, M. Inagaki and M. Takeda (1999). "Distribution of Rho-Kinase in the Bovine Brain." *Biochemical and biophysical research communications* 263(2): 575-579.

Head, M., K. Sedowofia and R. Clayton (1995). "B2-crystallin in the mammalian retina." *Experimental Eye Research* 61(4): 423-428.

Heiduschka, P. and S. Thanos (2000). "Restoration of the retinofugal pathway." *Progress in retinal and eye research* 19(5): 577-606.

Hendrickson, A. (1992). "A morphological comparison of foveal development in man and monkey." *Eye (London, England)* 6(Pt 2): 136-144.

Hendrickson, A. and D. Drucker (1992). "The development of parafoveal and mid-peripheral human retina." *Behavioural brain research* 49(1): 21-31.

Hendrickson, A., D. Troilo, D. Possin and A. Springer (2006). "Development of the neural retina and its vasculature in the marmoset *Callithrix jacchus*." *The Journal of Comparative Neurology* 497(2): 270-286.

Hirooka, Y. and H. Shimokawa (2005). "Therapeutic potential of rho-kinase inhibitors in cardiovascular diseases." *American Journal of Cardiovascular Drugs* 5(1): 31-39.

Hockfield, S. and R. McKay (1985). "Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system." *Journal of Neuroscience* 5(12): 3310-3328.

Hu, Y., Q. Cui and A. Harvey (2007). "Interactive effects of C3, cyclic AMP and ciliary neurotrophic factor on adult retinal ganglion cell survival and axonal regeneration." *Molecular and Cellular Neuroscience* 34(1): 88-98.

Humphrey, M. and L. Beazley (1985). "Retinal ganglion cell death during optic nerve regeneration in the frog *Hyla moorei*." *The Journal of Comparative Neurology* 236(3): 382-402.

Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* 110(6): 673-687.

Ichikawa, M., J. Yoshida, K. Saito, H. Sagawa, Y. Tokita and M. Watanabe (2008). "Differential effects of two ROCK inhibitors, Fasudil and Y-27632, on optic nerve regeneration in adult cats." *Brain Research* 1201: 23-33.

Ishizaki, T., M. Uehata, I. Tamechika, J. Keel, K. Nonomura, M. Maekawa and S. Narumiya (2000). "Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases." *Molecular pharmacology* 57(5): 976-983.

Ito, Y., I. Oinuma, H. Katoh, K. Kaibuchi and M. Negishi (2006). "Sema4D/plexin-B1 activates GSK-3 through R-Ras GAP activity, inducing growth cone collapse." *EMBO reports* 7(7): 704-709.

- Jaenicke, R. and C. Slingsby (2001). "Lens crystallins and their microbial homologs: structure, stability, and function." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 36(5): 435-499.
- Jalink, K., E. van Corven, T. Hengeveld, N. Morii, S. Narumiya and W. Moolenaar (1994). "Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho." *Journal of Cell Biology* 126(3): 801-810.
- Jen, L., A. Hart, A. Jen, J. Relvas, S. Gentleman, L. Garey and A. Patel (1998). "Alzheimer's peptide kills cells of retina in vivo." *Nature* 392(6672): 140-141.
- Jo, S. A., E. Wang and L. I. Benowitz (1999). "Ciliary neurotrophic factor is an axogenesis factor for retinal ganglion cells." *Neuroscience* 89(2): 579-591.
- Joachim, C., L. Duffy, J. Morris and D. Selkoe (1988). "Protein chemical and immunocytochemical studies of meningovascular [beta]-amyloid protein in Alzheimer's disease and normal aging." *Brain Research* 474(1): 100-111.
- Johnson, L., W. Leitner, A. Rivest, M. Staples, M. Radeke and D. Anderson (2002). "The Alzheimer's A β -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(18): 11830-11835.
- Johnson, P., M. Brown, B. Pulliam, D. Anderson and L. Johnson (2005). "Synaptic pathology, altered gene expression, and degeneration in photoreceptors impacted by drusen." *Investigative ophthalmology & visual science* 46(12): 4788-4795.
- Jones, S., C. Jomary, J. Grist, J. Makwana and M. Neal (1999). "Retinal expression of {gamma}-crystallins in the mouse." *Investigative ophthalmology & visual science* 40(12): 3017-3020.
- Ju, W.-K., J.-S. Gwon, S.-J. Park, K.-Y. Kim, J.-I. Moon, M.-Y. Lee, S.-J. Oh and M.-H. Chun (2002). "Growth-associated protein 43 is up-regulated in the ganglion cells of the ischemic rat retina." *NeuroReport* 13(6): 861-865.
- Kang, J., H. Lemaire, A. Unterbeck, J. Salbaum, C. Masters, K. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther and B. Müller-Hill (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." *Nature* 325(6106): 733-736.
- Karim, M., K. Fujisawa, N. Kanomata and H. Ito (1996). "Glial fibrillary acidic protein expression in the developing human retina." *The Kobe journal of medical sciences* 42(2): 111-117.

- Kim, J., H. Wu, A. Lander, K. Lyons, M. Matzuk and A. Calof (2005). "GDF11 controls the timing of progenitor cell competence in developing retina." *Science* 308(5730): 1927-1930.
- Kim, S., K. Bell, S. Mousa and J. Varner (2000). "Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin α 5 β 1 with the central cell-binding domain of fibronectin." *American Journal of Pathology* 156(4): 1345-1362.
- Kim, S., M. Harris and J. Varner (2000). "Regulation of integrin α v β 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin α 5 β 1 and protein kinase A." *Journal of Biological Chemistry* 275(43): 33920-33928.
- Kohno, H., T. Sakai and K. Kitahara (2006). "Induction of nestin, Ki-67, and cyclin D1 expression in Müller cells after laser injury in adult rat retina." *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 244(1): 90-95.
- Kohno, T., N. Sorgente, T. Ishibashi, R. Goodnight and S. Ryan (1987). "Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye." *Investigative ophthalmology & visual science* 28(3): 506-514.
- Koistinaho, M., S. Lin, X. Wu, M. Esterman, D. Koger, J. Hanson, R. Higgs, F. Liu, S. Malkani and K. Bales (2004). "Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid- peptides." *Nature medicine* 10(7): 719-726.
- Kokubo, H., R. Kaye, C. Glabe and H. Yamaguchi (2005). "Soluble A [beta] oligomers ultrastructurally localize to cell processes and might be related to synaptic dysfunction in Alzheimer's disease brain." *Brain Research* 1031(2): 222-228.
- Kozma, R., S. Sarner, S. Ahmed and L. Lim (1997). "Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid." *Molecular and cellular biology* 17(3): 1201-1211.
- Kubo, T., K. Hata, A. Yamaguchi and T. Yamashita (2007). "Rho-ROCK inhibitors as emerging strategies to promote nerve regeneration." *Current Pharmaceutical Design* 13(24): 2493-2499.
- Kwak, Y., C. Brannen, T. Qu, H. Kim, X. Dong, P. Soba, A. Majumdar, A. Kaplan, K. Beyreuther and K. Sugaya (2006). "Amyloid precursor protein regulates differentiation of human neural stem cells." *Stem cells and development* 15(3): 381-389.
- Lamoureux, P., Z. Altun-Gultekin, C. Lin, J. Wagner and S. Heidemann (1997). "Rac is required for growth cone function but not neurite assembly." *Journal of Cell Science* 110(5): 635-641.
- Lauweryns, B., J. van den Oord, R. Volpes, B. Foets and L. Missotten (1991). "Distribution of very late activation integrins in the human cornea. An

immunohistochemical study using monoclonal antibodies." *Investigative ophthalmology & visual science* 32(7): 2079-2085.

Leaver, S., Q. Cui, O. Bernard and A. Harvey (2006). "Cooperative effects of bcl-2 and AAV-mediated expression of CNTF on retinal ganglion cell survival and axonal regeneration in adult transgenic mice." *European Journal of Neuroscience* 24(12): 3323-3332.

Lefrancois, T., C. Fages, M. Peschanski and M. Tardy (1997). "Neuritic Outgrowth Associated with Astroglial Phenotypic Changes Induced by Antisense Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) mRNA in Injured Neuron-Astrocyte Cocultures." *J. Neurosci.* 17(11): 4121-4128.

Lehmann, M., A. Fournier, I. Selles-Navarro, P. Dergham, A. Sebok, N. Leclerc, G. Tigyi and L. McKerracher (1999). "Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration." *Journal of Neuroscience* 19(17): 7537-7547.

Lendahl, U., L. Zimmerman and R. McKay (1990). "CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein." *Cell* 60(4): 585-595.

Leon, S., Y. Yin, J. Nguyen, N. Irwin and L. I. Benowitz (2000). "Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve." *Journal of Neuroscience* 20(12): 4615-4626.

Letourneau, P. (1979). "Cell-substratum adhesion of neurite growth cones, and its role in neurite elongation." *Experimental Cell Research* 124(1): 127-138.

Leung, T., X. Chen, E. Manser and L. Lim (1996). "The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton." *Molecular and cellular biology* 16(10): 5313-5327.

Levkovitch-Verbin, H., H. Quigley, L. Kerrigan-Baumrind, S. D'Anna, D. Kerrigan and M. Pease (2001). "Optic nerve transection in monkeys may result in secondary degeneration of retinal ganglion cells." *Investigative ophthalmology & visual science* 42(5): 975-982.

Lewis, G. and S. Fisher (2003). "Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression." *International review of cytology* 230: 263-290.

Liedtke, T., J. Schwamborn, U. Schröer and S. Thanos (2007). "Elongation of axons during regeneration involves retinal crystallin b2 (crybb2)." *Molecular & Cellular Proteomics* 6(5): 895-907.

Lin, C., C. Thompson and P. Forscher (1994). "Cytoskeletal reorganization underlying growth cone motility." *Current Opinion in Neurobiology* 4(5): 640-647.

Lingor, P., N. Teusch, K. Schwarz, R. Mueller, H. Mack, M. Bähr and B. Mueller (2007). "Inhibition of Rho kinase (ROCK) increases neurite outgrowth on chondroitin sulphate proteoglycan in vitro and axonal regeneration in the adult optic nerve in vivo." *Journal of neurochemistry* 103(1): 181-189.

Lingor, P., L. Tonges, N. Pieper, C. Bermel, E. Barski, V. Planchamp and M. Bahr (2008). "ROCK inhibition and CNTF interact on intrinsic signalling pathways and differentially regulate survival and regeneration in retinal ganglion cells." *Brain* 131(Pt 1): 250-263.

Loffler, K., D. Edward and M. Tso (1995). "Immunoreactivity against tau, amyloid precursor protein, and beta-amyloid in the human retina." *Investigative ophthalmology & visual science* 36(1): 24-31.

Logan, A., Z. Ahmed, A. Baird, A. Gonzalez and M. Berry (2006). "Neurotrophic factor synergy is required for neuronal survival and disinhibited axon regeneration after CNS injury." *Brain* 129(2): 490-502.

Lorber, B., M. Berry, A. Logan and D. Tonge (2002). "Effect of lens lesion on neurite outgrowth of retinal ganglion cells in vitro." *Molecular and Cellular Neuroscience* 21(2): 301-311.

Lu, P., H. Yang, L. Jones, M. Filbin and M. Tuszynski (2004). "Combinatorial therapy with neurotrophins and cAMP promotes axonal regeneration beyond sites of spinal cord injury." *Journal of Neuroscience* 24(28): 6402-6409.

Magabo, K., J. Horwitz, J. Piatigorsky and M. Kantorow (2000). "Expression of {beta} B2-Crystallin mRNA and Protein in Retina, Brain, and Testis." *Investigative ophthalmology & visual science* 41(10): 3056-3060.

Mann, I. (1964). "The development of the human eye." 3rd ed. New York: Grune and Stratton.

Mayer, E., E. Hughes, D. Carter and A. Dick (2003). "Nestin positive cells in adult human retina and in epiretinal membranes." *British Journal of Ophthalmology* 87(9): 1154.

McEvelly, R., L. Erkman, L. Luo, P. Sawchenko, A. Ryan and M. Rosenfeld (1996). "Requirement for Brn-3.0 in differentiation and survival of sensory and motor neurons." *Nature* 384: 574-577.

McIntosh, H. and C. Blazynski (1991). "GAP-43-like immunoreactivity in the adult retina of several species." *Brain Research* 554(1-2): 321-324.

McKerracher, L., S. David, D. Jackson, V. Kottis, R. Dunn and P. Braun (1994). "Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth." *Neuron* 13(4): 805-811.

McKerracher, L. and M. Winton (2002). "Nogo on the go." *Neuron* 36(3): 345-348.

Messam, C., J. Hou, J. Berman and E. Major (2002). "Analysis of the temporal expression of nestin in human fetal brain derived neuronal and glial progenitor cells." *Developmental Brain Research* 134(1-2): 87-92.

Mey, J. and S. Thanos (1991). "Ontogenetic changes in the regenerative ability of chick retinal ganglion cells as revealed by organ explants." *Cell and tissue research* 264(2): 347-355.

Mey, J. and S. Thanos (1993). "Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo." *Brain Research* 602(2): 304-317.

Meyer, R. L., J. A. Miotke and L. I. Benowitz (1994). "Injury induced expression of growth-associated protein-43 in adult mouse retinal ganglion cells In vitro." *Neuroscience* 63(2): 591-602.

Milner, R. and I. Campbell (2002). "Developmental Regulation of [beta] 1 Integrins during Angiogenesis in the Central Nervous System." *Molecular and Cellular Neuroscience* 20(4): 616-626.

Milward, E., R. Papadopoulos, S. Fuller, R. Moir, D. Small, K. Beyreuther and C. Masters (1992). "The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth." *Neuron* 9(1): 129-137.

Miotke, J., A. MacLennan and R. Meyer (2007). "Immunohistochemical localization of CNTFR α in adult mouse retina and optic nerve following intraorbital nerve crush: Evidence for the axonal loss of a trophic factor receptor after injury." *The Journal of Comparative Neurology* 500(2): 384-400.

Monnier, P., A. Sierra, J. Schwab, S. Henke-Fahle and B. Mueller (2003). "The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar." *Molecular and Cellular Neuroscience* 22(3): 319-330.

Monsul, N., A. Geisendorfer, P. Han, R. Banik, M. Pease and R. Skolasky (2004). "Intraocular injection of dibutyryl cyclic AMP promotes axon regeneration in rat optic nerve." *Experimental neurology* 186(2): 124-133.

Moore, S. and S. Thanos (1996). "The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration." *Progress in neurobiology* 48(4-5): 441-460.

Moreau-Fauvarque, C., A. Kumanogoh, E. Camand, C. Jaillard, G. Barbin, I. Boquet, C. Love, E. Jones, H. Kikutani and C. Lubetzki (2003). "The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion." *Journal of Neuroscience* 23(27): 9229-9239.

Morin, P., C. Abraham, A. Amaratunga, R. Johnson, G. Huber, J. Sandell and R. Fine (1993). "Amyloid precursor protein is synthesized by retinal ganglion cells, rapidly transported to the optic nerve plasma membrane and nerve terminals, and metabolized." *Journal of neurochemistry* 61(2): 464-473.

Mueller, B., H. Mack and N. Teusch (2005). "Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders." *Nature Reviews Drug Discovery* 4(5): 387-398.

Muschler, J. and A. Horwitz (1991). "Down-regulation of the chicken alpha 5 beta 1 integrin fibronectin receptor during development." *Development* 113(1): 327.

Nagata, K., N. Takei, K. Nakajima, H. Saito and S. Kohsaka (1993). "Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain." *Journal of neuroscience research* 34(3): 357-363.

Narumiya, S., T. Ishizaki and M. Ufhata (2000). "Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632." *Methods in Enzymology* 325: 273-284.

Needham, L., G. Tennekoon and G. McKhann (1987). "Selective growth of rat Schwann cells in neuron- and serum-free primary culture." *Journal of Neuroscience* 7(1): 1-9.

Neugebauer, K. and L. Reichardt (1991). "Cell-surface regulation of β 1-integrin activity on developing retinal neurons." *Nature* 350(6313): 68-71.

Newman, E. and A. Reichenbach (1996). "The Müller cell: a functional element of the retina." *Trends in Neurosciences* 19(8): 307-312.

Ng, T., K. So and S. Chung (1995). "Influence of peripheral nerve grafts on the expression of GAP-43 in regenerating retinal ganglion cells in adult hamsters." *Journal of neurocytology* 24(7): 487-496.

Nichols, N., J. Day, N. Laping, S. Johnson and C. Finch (1993). "GFAP mRNA increases with age in rat and human brain." *Neurobiology of aging* 14(5): 421-429.

Niederost, B., T. Oertle, J. Fritsche, R. McKinney and C. Bandtlow (2002). "Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1." *Journal of Neuroscience* 22(23): 10368-10376.

Nikolic, M. (2002). "The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth." *The international journal of biochemistry & cell biology* 34(7): 731-745.

Olenik, C., H. Barth, I. Just, K. Aktories and D. Meyer (1997). "Gene expression of the small GTP-binding proteins RhoA, RhoB, Rac1, and Cdc42 in adult rat brain." *Molecular Brain Research* 52(2): 263-269.

Oppenheim, R. (1991). "Cell death during development of the nervous system." *Annual review of neuroscience* 14: 453-501.

Osborne, N., F. Block and K. Sontag (2009). "Reduction of ocular blood flow results in glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in rat retinal Müller cells." *Visual Neuroscience* 7(06): 637-639.

Pan, L., Z. Yang, L. Feng and L. Gan (2005). "Functional equivalence of Brn3 POU-domain transcription factors in mouse retinal neurogenesis." *Development* 132(4): 703-712.

Peinado-Ramon, P., M. Salvador, M. Villegas-Perez and M. Vidal-Sanz (1996). "Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study." *Investigative ophthalmology & visual science* 37(4): 489-500.

Pernet, V. and A. Di Polo (2006). "Synergistic action of brain-derived neurotrophic factor and lens injury promotes retinal ganglion cell survival, but leads to optic nerve dystrophy in vivo." *Brain* 129(4): 1014-1026.

Peterson, W., Q. Wang, R. Tzekova and S. Wiegand (2000). "Ciliary neurotrophic factor and stress stimuli activate the Jak-STAT pathway in retinal neurons and glia." *Journal of Neuroscience* 20(11): 4081-4090.

Price, M., DL and P. D. Sisodia, SS (1994). "Cellular and molecular biology of Alzheimer's disease and animal models." *Annual review of medicine* 45(1): 435-446.

Priller, C., T. Bauer, G. Mitteregger, B. Krebs, H. Kretschmar and J. Herms (2006). "Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein." *Journal of Neuroscience* 26(27): 7212-7221.

Qiu, F., H. Jiang and M. Xiang (2008). "A comprehensive negative regulatory program controlled by Brn3b to ensure ganglion cell specification from multipotential retinal precursors." *Journal of Neuroscience* 28(13): 3392-3403.

Qiu, J., D. Cai and M. Filbin (2000). "Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS." *Glia* 29(2): 166-174.

Quigley, H., E. Davis and D. Anderson (1977). "Descending optic nerve degeneration in primates." *Investigative ophthalmology & visual science* 16(9): 841-849.

Quigley, H., R. Nickells, L. Kerrigan, M. Pease, D. Thibault and D. Zack (1995). "Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis." *Investigative ophthalmology & visual science* 36(5): 774-786.

Rajini, B., P. Shridas, C. Sundari, D. Muralidhar, S. Chandani, F. Thomas and Y. Sharma (2001). "Calcium Binding Properties of γ -Crystallin. Calcium ion binds at the greek key $\beta\gamma$ -crystallin fold." *Journal of Biological Chemistry* 276(42): 38464-38472.

Reh, T. and I. Kljavin (1989). "Age of differentiation determines rat retinal germinal cell phenotype: induction of differentiation by dissociation." *J. Neurosci.* 9(12): 4179-4189.

Reh, T., W. Tetzlaff, A. Ertlmaier and H. Zwierns (1993). "Developmental study of the expression of B50/GAP 43 in rat retina." *Journal of neurobiology* 24(7): 949-958.

Ridet, J. L., A. Privat, S. K. Malhotra and F. H. Gage (1997). "Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function." *Trends in Neurosciences* 20(12): 570-577.

Ridley, A. (2006). "Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking." *Trends in cell biology* 16(10): 522-529.

Riento, K. and A. Ridley (2003). "Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4(6): 446-456.

Robbins, S., R. Brem, D. Wilson, L. O'Rourke, J. Robertson, I. Westra, S. Planck and J. Rosenbaum (1994). "Immunolocalization of integrins in proliferative retinal membranes." *Investigative ophthalmology & visual science* 35(9): 3475-3485.

Rodrigues, M., D. Bardenstein, B. Wiggert, L. Lee, R. Fletcher and G. Chader (1987). "Retinitis pigmentosa with segmental massive retinal gliosis. An immunohistochemical, biochemical, and ultrastructural study." *Ophthalmology* 94(2): 180-186.

Rose, K. (2004). *Speziesspezifische proteomische Aspekte der axonalen Regeneration retinaler Ganglienzellen am Beispiel der Ratte (Rattus norvegicus) und des Affen (Callithrix jacchus)*. Dissertation. Universitätsbibliothek Marburg.

Rose, K., U. Schröer, G. F. Volk, S. Schlatt, S. König, A. Feigenspan and S. Thanos (2008). "Axonal regeneration in the organotypically cultured monkey retina: Biological aspects, dependence on substrates and age-related proteomic profiling." *Restorative neurology and neuroscience* 26(4): 249-266.

Rossjohn, J., R. Cappai, S. Feil, A. Henry, W. McKinstry, D. Galatis, L. Hesse, G. Multhaup, K. Beyreuther and C. Masters (1999). "Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein." *Nature Structural & Molecular Biology* 6(4): 327-331.

Roth, T., F. Podesta, M. Stepp, D. Boeri and M. Lorenzi (1993). "Integrin overexpression induced by high glucose and by human diabetes: potential pathway to cell dysfunction in diabetic microangiopathy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(20): 9640-9644.

Russell, S., J. Shepherd and G. Hageman (1991). "Distribution of glycoconjugates in the human retinal internal limiting membrane." *Investigative ophthalmology & visual science* 32(7): 1986-1995.

Sakaguchi, H., M. Miyagi, R. Darrow, J. Crabb, J. Hollyfield, D. Organisciak and J. Crabb (2003). "Intense light exposure changes the crystallin content in retina." *Experimental Eye Research* 76(1): 131-133.

Santambrogio, L., S. Belyanskaya, F. Fischer, B. Cipriani, C. Brosnan, P. Ricciardi-Castagnoli, L. Stern, J. Strominger and R. Riese (2001). "Developmental plasticity of CNS microglia." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(11): 6295-6300.

Schaden, H., C. Stuermer and M. Bahr (1994). "GAP-43 immunoreactivity and axon regeneration in retinal ganglion cells of the rat." *Journal of Neurobiology* 25(12): 1570-1578.

Schmandke, A., A. Schmandke and S. Strittmatter (2007). "ROCK and Rho: biochemistry and neuronal functions of Rho-associated protein kinases." *The Neuroscientist* 13(5): 454-469.

Schnell, L. and M. Schwab (1990). "Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors." *Nature* 343(6255): 269-271.

Schwab, J., S. Conrad, P. Monnier, S. Julien, B. Mueller and H. Schluesener (2005). "Spinal cord injury-induced lesional expression of the repulsive guidance molecule (RGM)." *European Journal of Neuroscience* 21(6): 1569-1576.

Schwab, M. (2004). "Nogo and axon regeneration." *Current Opinion in Neurobiology* 14(1): 118-124.

Schwab, M. and P. Caroni (1988). "Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro." *Journal of Neuroscience* 8(7): 2381-2393.

Seth, A., J. Cui, E. To, M. Kwee and J. Matsubara (2008). "Complement-associated deposits in the human retina." *Investigative ophthalmology & visual science* 49(2): 743-750.

Shamah, S., M. Lin, J. Goldberg, S. Estrach, M. Sahin, L. Hu, M. Bazalakova, R. Neve, G. Corfas and A. Debant (2001). "EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin." *Cell* 105(2): 233-244.

Shao, Z., J. Browning, X. Lee, M. Scott, S. Shulga-Morskaya, N. Allaire, G. Thill, M. Levesque, D. Sah and J. McCoy (2005). "TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration." *Neuron* 45(3): 353-359.

Shen, S., A. Wiemelt, F. McMorris and B. Barres (1999). "Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy." *Neuron* 23(2): 285-295.

Shibuya, M., Y. Suzuki, K. Sugita, I. Saito, T. Sasaki, K. Takakura, I. Nagata, H. Kikuchi, T. Takemae and H. Hidaka (1992). "Effect of AT877 on cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage." *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* 76(4): 571-577.

Shibuya, S., O. Miyamoto, R. Auer, T. Itano, S. Mori and H. Norimatsu (2002). "Embryonic intermediate filament, nestin, expression following traumatic spinal cord injury in adult rats." *Neuroscience* 114(4): 905-916.

Silver, J. and J. Miller (2004). "Regeneration beyond the glial scar." *Nature Reviews Neuroscience* 5(2): 146-156.

Skene, J., R. Jacobson, G. Snipes, C. McGuire, J. Norden and J. Freeman (1986). "A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes." *Science* 233(4765): 783-786.

Skene, J. and M. Willard (1981). "Axonally transported proteins associated with axon growth in rabbit central and peripheral nervous systems." *The Journal of Cell Biology* 89(1): 96-103.

Skene, J. and M. Willard (1981). "Characteristics of growth-associated polypeptides in regenerating toad retinal ganglion cell axons." *J. Neurosci.* 1(4): 419-426.

Smalheiser, N., S. Crain and L. Reid (1984). "Laminin as a substrate for retinal axons in vitro." *Developmental Brain Research* 12(1): 136-140.

So, K. and A. Aguayo (1985). "Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats." *Brain Research* 328(2): 349-354.

Sperry, R. (1944). "Optic nerve regeneration with return of vision in anurans." *Journal of Neurophysiology* 7(1): 57.

Stelzner, D. and J. Strauss (1986). "A quantitative analysis of frog optic nerve regeneration: Is retrograde ganglion cell death or collateral axonal loss related to selective reinnervation?" *The Journal of Comparative Neurology* 245(1): 83-106.

Storey, E., T. Spurck, J. Pickett-Heaps, K. Beyreuther and C. Masters (1996). "The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is found on the surface of static but not actively motile portions of neurites." *Brain Research* 735(1): 59-66.

Strittmatter, S. M., C. Fankhauser, P. L. Huang, H. Mashimo and M. C. Fishman (1995). "Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43." *Cell* 80(3): 445-452.

Takahashi, R., C. Almeida, P. Kearney, F. Yu, M. Lin, T. Milner and G. Gouras (2004). "Oligomerization of Alzheimer's β -amyloid within processes and synapses of cultured neurons and brain." *Journal of Neuroscience* 24(14): 3592-3599.

Takai, Y., T. Sasaki and T. Matozaki (2001). "Small GTP-binding proteins." *Physiological reviews* 81(1): 153-208.

Tanihara, H., M. Hangai, S. Sawaguchi, H. Abe, M. Kageyama, F. Nakazawa, E. Shirasawa and Y. Honda (1997). "Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the retina of primate eyes with experimental glaucoma." *Archives of ophthalmology* 115(6): 752-756.

Tardy, M. (2002). "Role of laminin bioavailability in the astroglial permissivity for neuritic outgrowth." *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 74: 683-690.

Tervo, K., T. Tervo, G. van Setten and I. Virtanen (1991). "Integrins in human corneal epithelium." *Cornea* 10(6): 461-465.

Thanos, S., R. Naskar and P. Heiduschka (1997). "Regenerating ganglion cell axons in the adult rat establish retinofugal topography and restore visual function." *Experimental Brain Research* 114(3): 483-491.

Thinakaran, G. and E. Koo (2008). "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function." *Journal of Biological Chemistry* 283(44): 29615-29619.

Timpl, R., H. Rohde, P. Robey, S. Rennard, J. Foidart and G. Martin (1979). "Laminin-- a glycoprotein from basement membranes." *Journal of Biological Chemistry* 254(19): 9933-9937.

Töpper, R., J. Gehrman, R. Banati, M. Schwarz, F. Block, J. Noth and G. Kreutzberg (1995). "Rapid appearance of β -amyloid precursor protein immunoreactivity in glial cells following excitotoxic brain injury." *Acta neuropathologica* 89(1): 23-28.

Tropepe, V., B. Coles, B. Chiasson, D. Horsford, A. Elia, R. McInnes and D. van der Kooy (2000). "Retinal stem cells in the adult mammalian eye." *Science* 287(5460): 2032-2036.

Turner, E., K. Jenne and M. Rosenfeld (1994). "Brn-3.2: a Brn-3-related transcription factor with distinctive central nervous system expression and regulation by retinoic acid." *Neuron* 12(1): 205-218.

Turner, P., K. O'Connor, W. Tate and W. Abraham (2003). "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory." *Progress in neurobiology* 70(1): 1-32.

Umeda, N., S. Kachi, H. Akiyama, G. Zahn, D. Vossmeier, R. Stragies and P. Campochiaro (2006). "Suppression and Regression of Choroidal Neovascularization by Systemic Administration of an $\alpha 5\beta 1$ Integrin Antagonist." *Molecular pharmacology* 69(6): 1820-1828.

van der Flier, A. and A. Sonnenberg (2001). "Function and interactions of integrins." *Cell and tissue research* 305(3): 285-298.

Vanselow, J., B. Müller and S. Thanos (1991). "Regenerating axons from adult chick retinal ganglion cells recognize topographic cues from embryonic central targets." *Visual Neuroscience* 6(6): 569-576.

Vázquez-Chona, F., B. Song and E. Geisert Jr (2004). "Temporal changes in gene expression after injury in the rat retina." *Investigative ophthalmology & visual science* 45(8): 2737-2746.

Vidal-Sanz, M., G. Bray, M. Villegas-Perez, S. Thanos and A. Aguayo (1987). "Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat." *Journal of Neuroscience* 7(9): 2894-2909.

Villegas-Pérez, M., M. Vidal-Sanz, M. Rasminsky, G. Bray and A. Aguayo (1993). "Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats." *Journal of neurobiology* 24(1): 23-36.

Vincent, S. and J. Settleman (1997). "The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization." *Molecular and cellular biology* 17(4): 2247-2256.

Wahl, S., H. Barth, T. Ciossek, K. Aktories and B. Mueller (2000). "Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase." *The Journal of Cell Biology* 149(2): 263-270.

Walcott, J. and J. Provis (2003). "Müller cells express the neuronal progenitor cell marker nestin in both differentiated and undifferentiated human foetal retina." *Clinical & experimental ophthalmology* 31(3): 246-249.

Wang, K., J. Kim, R. Sivasankaran, R. Segal and Z. He (2002). "P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp." *Nature* 420(6911): 74-78.

Wang, P., G. Yang, D. Mosier, P. Chang, T. Zaidi, Y. Gong, N. Zhao, B. Dominguez, K. Lee and W. Gan (2005). "Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-like protein 2." *Journal of Neuroscience* 25(5): 1219-1225.

Wang, S., L. Gan, S. Martin and W. Klein (2000). "Abnormal polarization and axon outgrowth in retinal ganglion cells lacking the POU-domain transcription factor Brn-3b." *Molecular and Cellular Neuroscience* 16(2): 141-156.

Wang, S., X. Mu, W. Bowers, D. Kim, D. Plas, M. Crair, H. Federoff, L. Gan and W. Klein (2002). "Brn3b/Brn3c double knockout mice reveal an unsuspected role for Brn3c in retinal ganglion cell axon outgrowth." *Development* 129(2): 467-477.

Ward, Y., S. Yap, V. Ravichandran, F. Matsumura, M. Ito, B. Spinelli and K. Kelly (2002). "The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway." *The Journal of Cell Biology* 157(2): 291-302.

Watanabe, M., H. Sawai and Y. Fukuda (1991). "Axonal regeneration of retinal ganglion cells in the cat geniculocortical pathway." *Brain Research* 560(1-2): 330-333.

Weedman Molavi, D. (1997). "Neuroscience Tutorial: Eye and Retina." Retrieved 06.2010, 2010, from thalamus.wustl.edu/course/eye3.gif.

Weibel, D., D. Cadelli and M. Schwab (1994). "Regeneration of lesioned rat optic nerve fibers is improved after neutralization of myelin-associated neurite growth inhibitors." *Brain Research* 642(1-2): 259-266.

Wen, R., Y. Song, T. Cheng, M. Matthes, D. Yasumura, M. LaVail and R. Steinberg (1995). "Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina." *Journal of Neuroscience* 15(11): 7377-7385.

Wirhth, O., G. Multhaup, C. Czech, V. Blanchard, S. Moussaoui, G. Tremp, L. Pradier, K. Beyreuther and T. Bayer (2001). "Intraneuronal A [beta] accumulation precedes plaque formation in [beta]-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice." *Neuroscience letters* 306(1-2): 116-120.

Wisniewski, H., C. Bancher, M. Barcikowska, G. Wen and J. Currie (1989). "Spectrum of morphological appearance of amyloid deposits in Alzheimer's disease." *Acta neuropathologica* 78(4): 337-347.

Wolfe, M. and S. Guenette (2007). "APP at a glance." *Journal of Cell Science* 120(18): 3157-3161.

Xi, J., R. Farjo, S. Yoshida, T. Kern, A. Swaroop and U. Andley (2003). "A comprehensive analysis of the expression of crystallins in mouse retina." *Molecular Vision* 9: 410-419.

Xiang, M. (1998). "Requirement for Brn-3b in Early Differentiation of Postmitotic Retinal Ganglion Cell Precursors." *Developmental biology* 197(2): 155-169.

Xiang, M., L. Gan, D. Li, Z. Chen, L. Zhou, B. O'Malley, W. Klein and J. Nathans (1997). "Essential role of POU-domain factor Brn-3c in auditory and vestibular hair cell development." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(17): 9445-9450.

Xiang, M., L. Gan, L. Zhou, W. Klein and J. Nathans (1996). "Targeted deletion of the mouse POU domain gene Brn-3a causes selective loss of neurons in the brainstem and trigeminal ganglion, uncoordinated limb movement, and impaired suckling." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(21): 11950-11955.

Xiang, M., L. Zhou, J. Macke, T. Yoshioka, S. Hendry, R. Eddy, T. Shows and J. Nathans (1995). "The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons." *Journal of Neuroscience* 15(7): 4762-4785.

Xiang, M., L. Zhou, Y. Peng, R. Eddy, T. Shows and J. Nathans (1993). "Brn-3b: a POU domain gene expressed in a subset of retinal ganglion cells." *Neuron* 11(4): 689-701.

Xue, L., J. Lu, Q. Cao, S. Hu, P. Ding and E. Ling (2006). "Müller glial cells express nestin coupled with glial fibrillary acidic protein in experimentally induced glaucoma in the rat retina." *Neuroscience* 139(2): 723-732.

Xue, L., J. Lu, Q. Cao, C. Kaur and E. Ling (2006). "Nestin expression in Müller glial cells in postnatal rat retina and its upregulation following optic nerve transection." *Neuroscience* 143(1): 117-127.

by Cajal, S., J. DeFelipe and E. Jones (1991). *Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system*, Oxford University Press, USA.

Yamaguchi, Y., H. Katoh, H. Yasui, K. Mori and M. Negishi (2001). "RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway." *Journal of Biological Chemistry* 276(22): 18977-18983.

Yamashita, T., H. Higuchi and M. Tohyama (2002). "The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho." *The Journal of Cell Biology* 157(4): 565-570.

Yamazaki, T., E. Koo and D. Selkoe (1997). "Cell surface amyloid beta-protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neural cells." *Journal of Neuroscience* 17(3): 1004-1010.

Yang, J., W. Bian, X. Gao, L. Chen and N. Jing (2000). "Nestin expression during mouse eye and lens development." *Mechanisms of Development* 94(1-2): 287-291.

Yang, J. T., H. Rayburn and R. O. Hynes (1993). "Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice." *Development* 119(4): 1093-1105.

Yin, Y., Q. Cui, Y. Li, N. Irwin, D. Fischer, A. Harvey and L. Benowitz (2003). "Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration." *Journal of Neuroscience* 23(6): 2284-2293.

Yin, Y., M. Henzl, B. Lorber, T. Nakazawa, T. Thomas, F. Jiang, R. Langer and L. Benowitz (2006). "Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells." *Nature neuroscience* 9(6): 843-852.

Yoneda, A., H. Mulhaupt and J. Couchman (2005). "The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity." *The Journal of Cell Biology* 170(3): 443-453.

- Yoshida, K., Y. Muraki, K. Ohki, T. Harada, T. Ohashi, H. Matsuda and J. Imaki (1995). "C-fos gene expression in rat retinal cells after focal retinal injury." *Investigative ophthalmology & visual science* 36(1): 251-254.
- Yoshimura, N., T. Kikuchi, S. Kuroiwa and S. Gaun (2003). "Differential temporal and spatial expression of immediate early genes in retinal neurons after ischemia-reperfusion injury." *Investigative ophthalmology & visual science* 44(5): 2211-2220.
- Zhang, C., P. Gehlbach, C. Gongora, M. Cano, R. Fariss, S. Hose, A. Nath, W. Green, M. Goldberg and J. Zigler Jr (2005). "A potential role for β - and γ -crystallins in the vascular remodeling of the eye." *Developmental Dynamics* 234(1): 36-47.
- Zhang, Z., A. Ottens, S. Larner, F. Kobeissy, M. Williams, R. Hayes and K. Wang (2006). "Direct Rho-associated kinase inhibition induces cofilin dephosphorylation and neurite outgrowth in PC-12 cells." *Cellular & Molecular Biology Letters* 11(1): 12-29.
- Zheng, H., M. Jiang, M. Trumbauer, D. Sirinathsinghji, R. Hopkins, D. Smith, R. Heavens, G. Dawson, S. Boyce and M. Conner (1995). "beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity." *Cell* 81(4): 525-531.
- Zhou, L., S. Zhang and B. Yue (1996). "Adhesion of human trabecular meshwork cells to extracellular matrix proteins. Roles and distribution of integrin receptors." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37(1): 104-113.

7 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Univ-Prof. Dr. Dr. S. Thanos für die Überlassung dieses interessanten Themas und die hervorragende Betreuung bei der Durchführung dieser Dissertation. Neben seinem Engagement für die Doktoranden hat auch die freundliche und produktive Atmosphäre in der Arbeitsgruppe für experimentelle Ophthalmologie erheblich zur Durchführung dieser Arbeit beigetragen

Ferner bedanke ich mich ganz herzlich bei folgenden Personen:

- Frau Mechthild Wissing für die Anlernung im Bereich der Kryoschnitte und immunhistochemischen Färbungen.
- Frau Mechthild Langkamp-Flock für die Hilfe bei der Durchführung der Western Blots und für alle ihre Erklärungen bezüglich der unterschiedlichen biochemischer Verfahren.
- Herrn Uwe Schröer für die Einarbeitung an den Geräten des Institutes sowie seine Hilfe bei der Erlernung der tierexperimentellen und operativen Grundlagen.
- Frau Katrin Schlich und Peter Charalambous für die nette und produktive Zusammenarbeit im Labor.
- Frau Bernadette Schwegmann für ihre tatkräftige Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.
- Herrn Julian Hans für seine unermüdliche Hilfe bei der statistischen Auswertung und der Struktur bzw. Form dieser Dissertation.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern Brigitte und Franz-Josef Wiese bedanken, ohne die das Medizinstudium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären und die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

8 Lebenslauf

Anhang



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herr
Prof. Dr. Dr. Solon Thanos
Augenklinik der Universität Münster
Experimentelle Ophthalmologie
Domagkstr. 15

48149 Münster

Dienstgebäude:
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 411-2104
Telefax: 411-2115
Raum: 431
Auskunft erteilt:
Herr Skoff
E-Mail:
Dez50@bezreg-muenster.nrw.de
Aktenzeichen:
50.0835.1.0 (G 14/2004)

19 . April 2004

Tierschutz; Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Ihr Antrag vom 13.02.2004

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Dr. Thanos,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der zur Zeit gültigen Fassung (BGBl. I S. 1105, 1818) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

"Proteomisch - genomische Analyse der regenerierenden Rattenretina"

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr
Prof. Dr. Dr. S. Thanos
Augenklinik der Universität Münster
Experimentelle Ophthalmologie
Domagkstr. 15

48149 Münster

Frau
Dr. Rita Naskar
Augenklinik der Universität Münster
Experimentelle Ophthalmologie
Domagkstr. 15

48149 Münster

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300
E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de • Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de
zentrale Telefaxnummer: (0251) 411-2525
Konten der Landeskasse Münster:
Deutsche Bundesbank - Filiale Münster - BLZ: 400 000 00 Konto: 40001 520
WestLB AG Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61820
ÖPNV ab Hbf. Linien 14 • 20 bis Haltestelle Domplatz, Linien 2 • 10 • 11 • 12 bis
Haltestelle Windthorststraße (Haus K) Linie 7 bis Haltestelle Wiener Str. (Haus W)

1/2



Diese Genehmigung gilt bis zum **30.04.2006**.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

200 Ratten

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Ich weise darauf hin, dass diese Genehmigung eine evtl. erforderliche Zustimmung nach dem Gentechnikgesetz für Arbeiten mit transgenen Tieren nicht einschließt.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekanntnisses.

Mit freundlichen Grüßen

im Auftrag



Dr. Piontkowski