

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik

der Universitätsklinik Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

Leiter: Prof. Dr. Gisbert Richard

Stammzell-basierte Neuroprotektion von retinalen Ganglienzellen in einem Mausmodell für das Glaukom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Sorwe Mojtahed Poor

aus Schwalmstadt

Hamburg 2015

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.10.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. U. Bartsch

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. C. Bernreuther

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. A. Hassenstein

„Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür, dass dem forschenden Menschegeist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden: die Begeisterung und die Ehrfurcht.“

Max Planck (1858-1947)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1 Das Auge.....	6
1.1.1 Anatomie und Physiologie.....	6
1.1.2 Die Retina.....	7
1.1.3 Das Kammerwasser.....	9
1.1.4 Das Glaukom.....	9
1.2 Pathophysiologie glaukomatöser Netzhauterkrankungen.....	12
1.2.1 Apoptose.....	12
1.2.2 Exzitoxizität.....	13
1.2.3 Axonaler Zelltransport und neurotrophe Faktoren.....	14
1.3 Tiermodelle für das Glaukom.....	16
1.4 Stammzellen.....	18
1.4.1 Einleitung.....	18
1.4.2 Embryonale Stammzellen.....	18
1.4.3 Neurale Stammzelle und Neurophärenkultur.....	18
1.4.4 Stammzellbasierte Therapieansätze für neurodegenerative Erkrankungen der Netzhaut.....	20
1.5 Neuroprotektion.....	21
1.5.1 Einleitung.....	21
1.5.2 Memantin.....	22
1.5.3 Neurotrophine.....	22
1.5.4 CNTF.....	23
1.5.5 GDNF.....	23
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	25
2. Methoden.....	26
2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	26
2.2 Versuchstiere.....	32
2.3 Lentivirale Vektoren.....	32
2.4 Isolierung und Kultivierung der neuralen Stammzellen.....	33

2.5 Passagieren der Stammzellen.....	34
2.6 Transduktion und Klonierung der Stammzellen	34
2.7 GDNF-Expression in undifferenzierten und differenzierten NSZ.....	34
2.8 Westernblot.....	35
2.9 Intraorbitaler crush des optischen Nerven.....	35
2.10 Vorbereiten der transduzierten Zellen für die intravitreale Transplantation	36
2.11 Intravitreale Injektionen der Stammzellen.....	36
2.12 Präparation der Netzhäute	37
2.12.1 Tötung der Maus und gerichtete Entnahme der Augen.....	37
2.12.2 Anfertigung von retinalen Flatmount Präparaten	37
2.13 Immunhistochemie.....	37
2.14 Quantifizierung der Ganglienzellzahl.....	38
2.15 Statistische Auswertung	40
3. Ergebnisse.....	41
3.1 Lentivirale Transduktion neuronaler Stammzellen.....	41
3.2 Western Blot Analysen und immunhistochemische Evaluation der GDNF Expression	41
3.3 Intravitreale Transplantation.....	45
3.4 Quantifizierung und statistische Auswertung der Neuroprotektion	47
4. Diskussion	50
5. Schlussfolgerung und Zukunftsaussicht.....	62
6. Literaturverzeichnis	66
7. Abkürzungsverzeichnis	74
8. Danksagung	76
9. Curriculum vitae	77
10. Eidesstattliche Versicherung	79

1. Einleitung

1.1 Das Auge

1.1.1 Anatomie und Physiologie

Der fast kugelförmige Augapfel umfasst etwa ein Drittel der knöchernen Aushöhlung des Gesichtsschädels, der so genannten Orbita. In ihr liegt er eingebettet in ein von Nerven und Gefäßen durchzogenes Geflecht aus Fett, Muskulatur und Bindegewebe. Die Wand des Auges setzt sich aus drei Schichten zusammen. Die äußerste Schicht ist die bindegewebige, weißliche und lichtundurchlässige Lederhaut (Sklera). Das gesamte Auge umfassend wirkt sie mechanisch schützend, hält den inneren Augendruck (IOD) aufrecht und dient zugleich als Ansatzpunkt der Augenmuskeln. Sie geht vorne in die transparente Hornhaut (Kornea) über. Gefolgt wird sie von einer gefäßreichen und pigmentierten Schicht, der Uvea. Diese umfasst die Iris, den Ziliarkörper und die Choroidea. Letztere ist zusammen mit der Zentralarterie für die Gefäßversorgung der weiter innen liegenden Netzhaut verantwortlich. Der Ziliarkörper ist an der Kammerwasserproduktion und der Akkommodation beteiligt. Er entspringt der Rückseite der Iris und bildet einen Ring an der vorderen Sklerainnenseite, der an der Ora Serrata in die Choroidea übergeht. Aus seinen Fortsätzen (Processus ciliares) entspringen Fasern, die der Aufhängung der Linse dienen. Kontrahiert sich der den Ziliarkörper auskleidende Muskel, der Musculus ciliaris, entspannen sich die Fasern und die Linse rundet sich aufgrund ihrer Eigenelastizität ab. Nach innen an den Glaskörper (Corpus vitreum) grenzt die Netzhaut (Retina). Sie besteht aus spezialisierten Nervenzellen, die ein Sensorium bilden, das die Information des einfallenden Lichts in eine chemische Signalkette umwandelt und als elektrische Signale an das Gehirn weiterleitet.

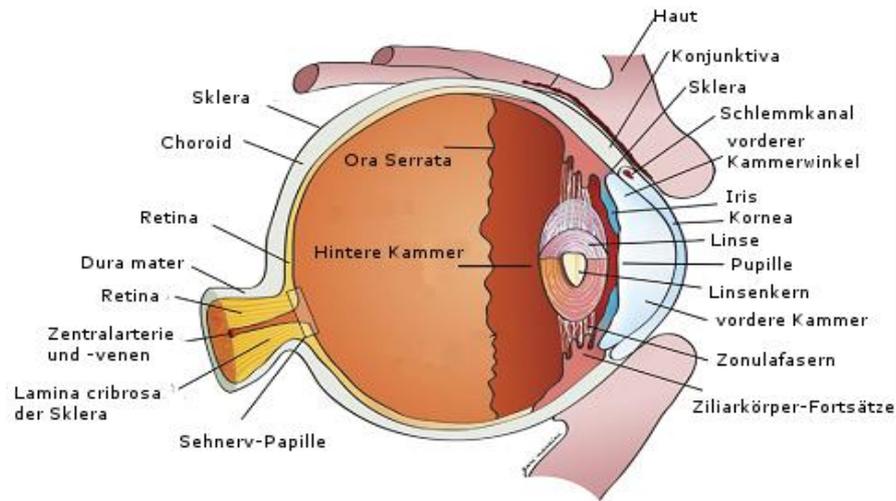


Abbildung 1: menschliches Auge (Querschnitt), modifiziert nach Malhotra, Minja et al. 2011.

Das einfallende Licht durchdringt zunächst die Hornhaut, dann die Iris, die die Funktion einer Blende einnimmt und durch die Regulierung der Pupillengröße die Stärke des Lichteinfalls bestimmt. Es setzt seinen Weg in die mit Kammerwasser gefüllte vordere Augenkammer fort, wo es dann an der Linse gebrochen wird. Während die Kornea einen statischen Brechungsindex aufweist und die stärkste lichtbrechende Struktur des Auges ist, ist die Brechzahl der Linse insgesamt niedriger und durch die mögliche Formänderung über eine Spannung oder Entspannung des Ziliarmuskels zudem variabel. Wichtig ist hierbei auch die Funktion des Kammerwassers und der hohe Augeninnendruck, der die Netzhaut an die Uvea drückt und Wölbungen verhindert, die zu einer Lichtstreuung führen würden. In gleicher Weise gewährleistet der hohe Augeninnendruck die hohe Formstabilität des Bulbus (Malhotra, Minja et al. 2011).

1.1.2 Die Retina

Die Netzhaut stellt das rezeptive Gewebe dieses dioptrischen Apparats dar. In der Netzhaut können zwei Lagen unterschieden werden. Einmal das retinale Pigmentepithel (RPE), das der Choroidea auf ihrer Bruch'schen Membran aufliegt, zum anderen die innen liegende Neuroretina. Die Neuroretina des Menschen und der meisten Säugetiere besteht aus verschiedenen Nervenzelltypen (Photorezeptoren, Bipolare-, Amakrine-, Horizontale- und Ganglienzellen) und Gliazellen (Astrozyten und Müllerzellen) (s. Abb. 2).

Das einfallende Licht durchdringt zunächst alle Schichten, ehe es die an der Außenseite der Netzhaut liegenden Photorezeptoren erreicht. Hier findet die Umwandlung der Lichtreize in elektrochemische Impulse statt. Die Information wird von den drei Hauptklassen retinaler Interneurone verarbeitet. Dies sind die Horizontal-, Amakrine- und Bipolarzellen, die sich jeweils in verschiedenen Subtypen differenzieren lassen. Die bereits teilweise verarbeitete visuelle Information wird dann an die retinalen Ganglienzellen (RGZ) weiter geleitet. Die Axone der RGZ bilden den N. Opticus, der das Auge am hinteren Pol verlässt und hier über die maschenartige, aus Kollagenfasern aufgebaute Lamina cribrosa (LC) austritt. Die LC ist eine strukturelle Stütze, die für den Erhalt des Druckgradienten zwischen Intraokularraum und umgebendem Gewebe zuständig ist. In der menschlichen Retina finden sich etwa 1,5 Millionen RGZ. Beim Glaukom kommt es durch die Degeneration der retinalen Ganglienzellen und ihrer Axone im optischen Nerven zu einer Exkavation des Sehnervenkopfes und zu degenerativen Veränderungen der LC. Die Informationsweiterleitung über den Sehnerv erfolgt auf etwa 20 subkortikale Regionen in Thalamus, Hypothalamus, Mesenzephalon und Mittelhirn.

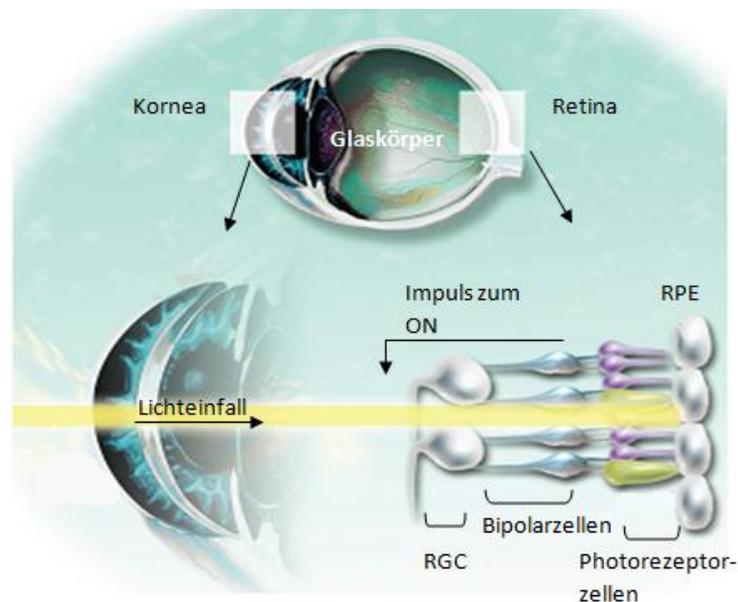


Abbildung 2 Die Information aus dem einfallenden Licht gelangt als elektrischer Impuls in die Gegenrichtung zur Schicht der retinalen Ganglienzellen, die den optischen Nerven bilden. ON = optischer Nerv, RPE = retinales Pigmentepithel, RGC = retinale Ganglienzelle. Modifiziert aus (Blenkinsop, Corneo et al. 2012).

1.1.3 Das Kammerwasser

Die Fortsätze des Ziliarkörpers sind vom Stroma und einem inneren Kapillarnetz durchsetzt. Überdeckt wird jeder einzelne Fortsatz durch eine doppelte Epithelschicht, die gemeinsam mit dem Kapillarnetz an der Kammerwasserproduktion beteiligt ist. Das Kammerwasser hat nutritive, immunologische und antioxidative Eigenschaften. Seine Menge bestimmt den Augeninnendruck (IOD), der entscheidend für den Sehprozess ist, da er die strukturelle Integrität des Auges und damit eine konstante Lichtbrechung gewährleistet. Zudem gleicht der IOD die unregelmäßige Schichtdicke der Hornhaut aus. Über Linse und Pupille, gelangt das Kammerwasser von der hinteren in die vordere Augenkammer. Sein Hauptabfluss erfolgt über den Schlemm Kanal, eine ringförmige venöse Ableitung zwischen Hornhaut und Iris, die im sogenannten Kammerwinkel des Auges liegt. Rund 15% des gesamten Abflusses des Kammerwassers geschieht uveoskleral über die episkleralen Venen. Dabei folgt das Kammerwasser einem Druckgefälle, das sich aus der Differenz zwischen dem IOD und den Abflusswiderständen zusammensetzt. Variation erfährt dieser hydrostatische Druckgradient durch Widerstandsänderungen im Ziliarmuskel oder dem Trabekelmaschenwerk.

1.1.4 Das Glaukom

Das Glaukom (im Volksmund auch „Grüner Star“ genannt) umfasst eine heterogene Gruppe von neurodegenerativen Netzhauterkrankungen, die durch einen fortschreitenden und selektiven Verlust der Zellkörper und Axone der RGZ charakterisiert sind. RGZ leiten mit ihren Axonen die visuellen Informationen von der Netzhaut zum Gehirn. Wenn die Degeneration der RGZ ein bestimmtes Ausmaß überschreitet, kommt es zu Beeinträchtigungen des Sehvermögens, zu Gesichtsfeldausfällen (sogenannten Skotomen) und unter Umständen zur vollständigen Erblindung. In der Augenhintergrundspiegelung findet sich als Folge der axonalen Degeneration typischerweise eine Aushöhlung der Sehnerv-Papille, die als Exkavation bezeichnet wird. Die Gesichtsfeldausfälle liegen typischerweise als so genannte Bogenskotome (Bjerrum-Skotome) vor. Da die Wahrscheinlichkeit an einem Glaukom zu erkranken mit steigendem Lebensalter zunimmt, wird die Bedeutung dieser neurodegenerativen Erkrankung der Netzhaut in den nächsten Jahren weiter zunehmen (Quigley and Broman 2006).

Ein erhöhter Augeninnendruck gilt als Hauptrisiko für die Entwicklung eines Glaukoms. 1857 schlug Albrecht von Graefe auf einem internationalen ophthalmologischen Kongress eine druckentlastende Iridektomie als die bis dahin erste chirurgische Interventionsmaßnahme für die Behandlung des Glaukoms vor (Nathan 2000). Bis heute ist die Drucksenkung, von der auch Patienten mit einem Normaldruck-Glaukom profitieren, die einzige Therapiemöglichkeit im Klinikalltag. Anzumerken ist jedoch, dass nur bei einem Teil der Glaukopatienten ein erhöhter IOD zu messen ist. Etwa 30 bis 40% der Betroffenen mit Glaukom-induzierten Gesichtsfeldausfällen weisen einen im Normbereich liegenden IOD auf (Hendrickx, van den Enden et al. 1994). Außerdem zeigen groß angelegte Studien auch, dass eine adäquate IOD-Senkung nicht bei allen Patienten das Fortschreiten der RGZ Degeneration und der damit verbundenen Gesichtsfeldausfälle aufhält (Kass, Heuer et al. 2002; Anderson 2003). Dieser Sachverhalt macht deutlich, dass alternative und effektivere Behandlungsmöglichkeiten für diese Erkrankung entwickelt werden müssen.

Neben dem erhöhten IOD gehört eine dünne Kornea (Medeiros, Sample et al. 2003) oder eine positive Familienanamnese (Ekstrom 2010) zu den Risikofaktoren, ein Glaukom zu entwickeln. Als weiterer ätiologischer Faktor wird eine gestörte Blutversorgung im Bereich des optischen Nerven, der Retina oder der Choroidea diskutiert (Butt, O'Brien et al. 1997). Die genannten Faktoren stellen keine absolute Voraussetzung für das Auftreten eines Glaukoms dar, scheinen sich aber in ihrer Wirkung zu verstärken und die Ganglienzelle für potentielle Schäden empfänglicher zu machen und damit das Risiko für die Entwicklung eines Glaukoms zu erhöhen.

Weithin anerkannte Erklärungsansätze für die fortschreitende Degeneration der RGZ sind vor allem vaskulärer, biochemischer und mechanischer Art. Letzterer beschreibt eine Druck-induzierte Verformung der Lamina cribrosa, die ihrerseits Scher- und Druckkräfte direkt auf die Ganglienzellaxone überträgt und eine selektive Vulnerabilität der hier passierenden axonalen Fortsätze verursacht (Morgan, Jeffery et al. 1998). Die axonale Schädigung führt dabei zu einer retrograden RGZ Degeneration.

Eine ausreichende Nährstoffversorgung der Retina ist an ihre Blutversorgung gebunden. Das Blut in den kleinen, sie versorgenden Gefäßen, benötigt einen bestimmten Druck,

um einen kontanten Fluss aufrecht zu erhalten. Dieser Perfusionsdruck bestimmt sich aus der Differenz zwischen dem arteriellen Blutdruck und dem IOD. Ursache eines verminderten Perfusionsdrucks und damit einer verminderten Blutversorgung der Retina kann damit entweder ein erhöhter Augeninnendruck oder ein verminderter Blutdruck sein. Der gesteigerte Bulbusdruck beim Glaukom komprimiert die Kapillaren zur Versorgung des Sehnervenkopfs. Die konsekutive unzureichende Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr führt nachfolgend zum Verlust der RGZ (Leske 2009).

Der biochemische Ansatz beinhaltet vielerlei Mechanismen, die allesamt mit einer Hochregulierung proapoptotischer Moleküle einhergehen. 1984 beschrieben So und Aguayo, dass die Axone der RGZ auch nach einer Läsion des ON ein Regenerationspotential aufweisen. Erfolgte die Insertion eines autologen peripheren Nerven an einen lädierten optischen Nerven adulter Ratten, waren 2-5% der axotomierten RGZ in der Lage ihre Axone in das periphere Nerventransplantat zu regenerieren (David and Aguayo 1985; So and Aguayo 1985; Aguayo, Rasminsky et al. 1991). Diese und ähnliche experimentelle Studien (Vidal-Sanz, Bray et al. 1987) waren für zahlreiche weitere Arbeitsgruppen Anlass, den Einfluss von Umgebungsfaktoren auf das Überleben und das Regenerationspotential von RGZ und ihrer Fortsätze detaillierter zu untersuchen. So entstand neben den klassischen Theorien zur Pathogenese des Glaukoms die Hypothese, dass beispielsweise ein erhöhter IOD einen Mangel an neurotrophen Faktoren induzieren kann. Hierbei wird angenommen, dass die einzelnen Nervenzellen untereinander um eine von den Zielgeweben begrenzt bereitgestellte Menge neurotropher Faktoren (target-derived neurotrophic factors) konkurrieren, um zu überleben. In Einklang mit dieser Hypothese zeigte eine Vielzahl von Studien, dass die Trennung einer Nervenzelle von ihrer neurotrophen Versorgung – beispielsweise durch eine axonale Transektion – zu einem signifikanten neuronalen Sterben führt (Barde 1989; Cui and Harvey 1995). Umgekehrt kann eine neuronale Degeneration durch eine Zufuhr neurotropher Faktoren verzögert werden. Eine kontinuierliche Applikation des neurotrophen Faktors „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) über eine adenoviral vermittelte Expression in Müllerzellen führte beispielsweise 16 Tage nach einer Axotomie zu einem 4.5-fach gesteigerten RGZ-Überleben im Vergleich zu Kontroll-Netzhäuten (Di Polo, Aigner et al. 1998). Nach einer Axotomie oder Transektion des ON, reicht das Regenerationspotential der lädierten Axone der RGZ nicht mehr aus um eine signifikante Strecke in den Sehnerven einzuwachsen oder gar

die Zielgebiete im Gehirn zu reinnervieren. Eine wiederholte intravitreale Injektion des neurotrophen Faktors „ciliary neurotrophic factor“ (CNTF) nach einer Axotomie führt neben einer Verzögerung der RGZ-Degeneration auch zu einer Stimulierung der axonalen Regeneration in ein peripheres Nerventransplantat (Cui and Harvey 2000). In einem von Klöcker et al. untersuchten Transektionsmodell der Ratte wurde rekombinantes „glial cell line-derived neurotrophic factor“ (GDNF) am Tag 4, 7 und 10 nach der Läsion intravitreal injiziert. Die Quantifizierung erfolgte 14 Tage nach Transektion mittels retrograder Tracer-Markierung der RGZ. Während in unbehandelten Augen ein RGZ-Verlust von ca. 85% zu konstatieren war, konnte durch die repetitive GDNF-Administration einen absoluter RGZ-Erhalt von ca. 21% erreicht werden (Klocker, Braunling et al. 1997).

Höchstwahrscheinlich ist ein Zusammenspiel mehrerer Ursachen letztendlich für das progressive Ganglienzellsterben verantwortlich. Unabhängig von der zu Grunde liegenden Ursache der RGZ-Degeneration, führt eine Progredienz zunächst zu visuellen Einbußen und schließlich zur Blindheit. Vor dem Hintergrund der Irreversibilität des RGZ-Verlusts ist die Entwicklung von Strategien zur Verzögerung respektive Verhinderung eines Ganglienzellsterbens anzustreben. Für dieses Ziel ist ein gutes Verständnis der Pathomechanismen, die zu einem RGZ-Verlust bzw. einer Dysfunktion führen essentiell.

1.2 Pathophysiologie glaukomatöser Netzhauterkrankungen

1.2.1 Apoptose

Die Apoptose ist ein von der Zelle aktiv vollzogener Tod, der kontrolliert und ohne umliegende Gewebeschädigung mittels einer hintereinandergeschalteten Enzymkette aus Kaspasen eingeleitet oder ausgeführt wird. Kaspasen sind Proteasen, die sich selbst durch proteolytische Zysteinabspaltung kaskadenartig aktivieren und, ohne die Zellumgebung zu strapazieren, durch eine sekundäre Aktivierung pro-apoptotischer Proteine zum Zelltod führen. Die Apoptose hat eine wichtige Bedeutung bei der Entwicklung und beim funktionellen Erhalt eines Gewebeverbands und ist der Hauptmechanismus, über den sowohl im menschlichen als auch im experimentell induzierten Glaukom in Tiermodellen RGZ degenerieren (Quigley 1999). Ihre Regulation erfährt sie über Vertreter der Bcl-2-Familie (Yuan and Yankner 2000), die

aus den Zelltod fördernden (Bax) und den Zelltod inhibierenden (Bcl-2) Proteinen zusammengesetzt ist. Beschrieben wurden zwei Hauptwege für die Einleitung des apoptotischen Zelltods, die beide in einer Aktivierung der Kaspasenkette münden. Der extrinsische Weg wird über eine äußere Ligandenbindung an einen so genannten Todesrezeptor initiiert. Dieser Rezeptor gehört zur Familie der „Tumor Necrosis Factor“ (TNF) und bewirkt eine direkte Aktivierung der Kaspasenkette, angefangen mit der Kaspase 8. Der alternative intrinsische Weg erfolgt unter Teilhabe der Mitochondrien. Eine Überexpression der pro-apoptotischen Moleküle der Bcl2-Familie veranlasst die Freisetzung des Cytochrom C aus der äußeren Mitochondrienmembran. Über Komplexbildung mit weiteren Faktoren wird die Kaspase 9 aktiviert und so die weitere Proteasenkette ausgeführt.

Die Beteiligung der Kaspasenkette als zelltodeinleitender Mechanismus konnte im Glaukom bereits durch verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt werden. Ahmed et al haben hierzu eine chemisch modifizierte siRNA (short interfering RNA), die siCASP2, hergestellt, um so die Expression der Kaspase 2 zu inhibieren. Die Kaspase 2 ist ein hoch konserviertes Protein und an verschiedenen Signalwegen der Apoptose, vor allem der intrinsischen Einleitung des Zelltods, beteiligt. Über eine Inhibierung der Kaspase 2 konnte tatsächlich 7 Tage nach einem crush des Sehnervs, ein dosisabhängiger Erhalt retinaler Ganglienzellen von bis zu 98% erzielt werden (Ahmed, Kalinski et al. 2011). Eine Läsions-induzierte Degeneration der RGZ wird zudem nachweislich über die Expression von Bax reguliert. Bax ist ein pro-apoptotischer Faktor der Bcl2-Familie und entscheidend für das Überleben der Somata von RGZ, nicht jedoch für ihre Fortsätze. RGZ von Knockout-Mäusen, in denen das Bax Gen ausgeschaltet wurde, überlebten eine Axotomie in einer signifikant höheren Anzahl als RGZ von Wildtypmäusen (Libby, Li et al. 2005). 1992 konnte die Gruppe um Garcia zudem zeigen, dass das durch den Entzug des neurotrophen Faktors „nerve growth factor“ (s.u.) induzierte neuronale Zellsterben durch eine Überexpression von Bcl-2 um mehr als eine Woche verzögert werden konnte (Garcia, Martinou et al. 1992).

1.2.2 Exzitoxizität

Setzt eine Nervenzelle den erregend wirkenden Neurotransmitter Glutamat frei, wird dieser unter physiologischen Bedingungen durch die umliegenden Nachbarzellen aufgenommen oder verstoffwechselt. Sind die Vorgänge zur Beseitigung von Glutamat

stark reduziert, und so miteinander interagierende Nervenzellpopulationen numerisch aneinander angeglichen (Oppenheim 1991).

Eine weithin anerkannte Hypothese zur Ursache, warum eine Läsion des Sehnervs einen Ganglienzellverlust bewirkt, beruht auf der Annahme einer retrograden Bereitstellung trophischer Faktoren, so genannter target-derived factors (Vgl. Abb. 3). Es handelt sich hierbei um Moleküle, die Neurone für ihren Erhalt benötigen und die sie mittels retrograden Transports von ihren Zielinnervationsgebieten erhalten. Für die RGZ wird hierbei ein retrograder Transport der NF von ihren Zielgeweben wie dem superioren Colliculus, zum Soma hin beschrieben (Anderson and Hendrickson 1974; Quigley, McKinnon et al. 2000). Führt man nach einem experimentell erhöhten IOD oder nach einer Axotomie von außen NF, beispielsweise durch intravitreale Injektionen, hinzu, kann die Degeneration der RGZ verzögert werden (Mansour-Robaey, Clarke et al. 1994). Es liegt also nahe, dass der Rückgang dieser neurotrophen Unterstützung als Folge eines gestörten oder unterbrochenen axonalen Transports den Zelltod evoziert. Quigley et al. gehörten zu den ersten, die diese Vermutung experimentell bestätigten indem sie zeigten, dass der retrograde Transport radioaktiv markierten BDNFs, ein NF mit neuroprotektiver Wirkung auf RGZ, bei erhöhtem IOD im Rattenauge deutlich gedrosselt ist (Quigley, McKinnon et al. 2000).

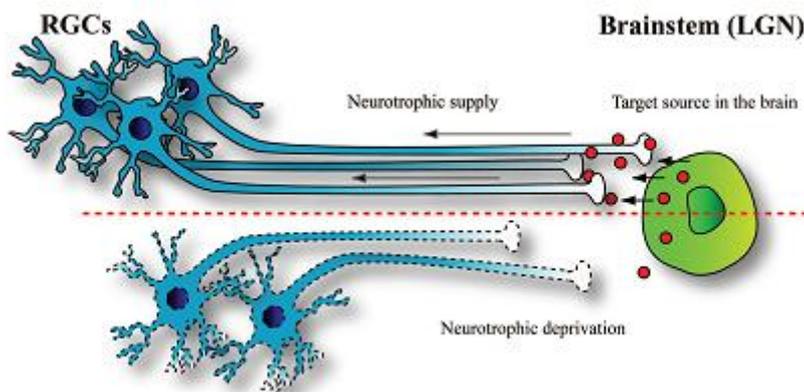


Abbildung 3: Es wird angenommen, dass die Nervenzellen untereinander um eine von den Zielgeweben begrenzt bereitgestellte Menge an trophischen Faktoren (target-derived neurotrophic factors), die sie für ihr Überleben benötigen, konkurrieren. Während hierbei erfolgreiche Nervenzellen überleben, wird in den nicht erfolgreichen Neuronen die Apoptose eingeleitet. Beim Glaukom scheint ein durch eine Unterbrechung des retrograden axonalen Transports bedingter Mangel an neurotrophen Faktoren eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der RGZ-Degeneration zu spielen (nach LEBRUN-JULIEN 2008).

1.3 Tiermodelle für das Glaukom

Das Verständnis der Mechanismen, die der Pathophysiologie des Glaukoms zu Grunde liegen, wurde durch klinische Beobachtung und jüngst auch über Tiermodelle gewonnen. Geeignete Tiermodelle für das Glaukom sind unabdingbar, um den Pathomechanismus dieser Erkrankung zu verstehen und um effektive Therapiemöglichkeiten für das Glaukom zu etablieren.

Wie bereits erläutert, führt unter anderem eine IOD-Erhöhung zu einer fortschreitenden Degeneration der RGZ. Da entsprechend die derzeit in der klinischen Praxis zugelassenen therapeutischen Möglichkeiten sich auf die IOD-Reduktion beschränken, konzentriert sich auch der Großteil der tierexperimentellen Studien auf Tiermodelle, in denen eine RGZ Degeneration durch eine okuläre Hypertension induziert wird. Für diesen Zweck wird entweder auf Tiermodelle zurückgegriffen, in denen eine IOD-Erhöhung genetisch bedingt ist (Thanos and Naskar 2004) oder es erfolgt die experimentelle Induktion einer okulären Hypertension. Eine Möglichkeit hierzu ist die Drosselung des Kammerwasserabflusses, beispielweise durch eine laserinduzierte Verödung des trabekulären Maschenwerks mit oder ohne Einbezug der episkleralen Venen (Levkovitch-Verbin, Quigley et al. 2002) bzw. die Sklerotisierung der Kammerwasserabflusswege mittels hypertoner Salzlösung (Morrison, Moore et al. 1997).

Die DBA/2J-Maus stellt wiederum ein genetisches Tiermodell dar. Mutationen im Tryp1- sowie dem Gpnmb-Gen führen hier zu einer Pigmentdispersion in der vorderen Augenkammer, einer Atrophie der Iris sowie einer Adhäsion von Iris und Kornea (anteriore Synechien). Die hieraus resultierende Blockade des Kammerwasserabflusses induziert eine okuläre Hypertonie sowie eine hiermit assoziierte, mit dem Alter zunehmenden axonalen Transportstörung, die zur Degeneration der RGZ führt (Anderson, Smith et al. 2002).

Eine vom IOD unabhängige Induktion einer Degeneration der RGZ kann durch eine Liganden-getriggerte Überaktivierung von Glutamat-Rezeptoren der Zelle erreicht werden (Exzitoxizität). Die Glutamat-Rezeptoren sind Ionenkanäle, die über eine Ligandenbindung aktiviert werden. Sie gliedern sich in 3 Hauptklassen: N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren), α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure-Rezeptoren (AMPA-Rezeptoren) und Kainat-Rezeptoren. Auf

retinalen Zellen befinden sich verschiedene Kombinationen und Subtypen der Glutamat-Rezeptoren, so dass durch die intravitreale Injektion ihrer Liganden eine gezielte Neurodegeneration erreicht werden kann (Sun, Ooi et al. 2001).

Eine weitere Herangehensweise, um eine Degeneration der RGZ zu induzieren, besteht in einer experimentell induzierten retinalen Ischämie mit anschließender Reperfusion (Szabo, Droy-Lefaix et al. 1991). Hierbei kann die Ischämie über eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden herbeigeführt werden. Eine Herangehensweise besteht in einer kontrollierten Erhöhung des IOD, so dass die Blutversorgung der retinalen und uvealen Strukturen zum Erliegen kommt (Peachey, Green et al. 1993). Technisch aufwendiger ist die chirurgische Freilegung und anschließende kurzzeitige Ligatur der A. centralis retinae (Otori, Shimada et al. 1997). Das Ausmaß der Zellschädigung nimmt mit der Dauer der Ischämiephase zu und hinterlässt einen globalen retinalen Schaden, der nicht auf die RGZ limitiert ist. Pathophysiologisch trägt hierbei das Anfallen reaktiver Sauerstoffintermediate, die im aeroben Stoffwechsel als Zwischenprodukte im mitochondrialen Stoffwechsel, in Peroxisomen sowie im endoplasmatischem Retikulum entstehen und schnell eliminiert werden, entscheidend zur postischämischen Zelldegeneration bei (Jabs 1999). Ob die Exzitotoxizität eine primäre oder durch eine Glutamat-Freisetzung aus degenerierenden Zellen bedingte sekundäre Rolle in diesem Prozess einnimmt, wird kontrovers diskutiert (Vorwerk, Lipton et al. 1996).

Eine direkte Läsion des ON und damit eine selektive RGZ-Degeneration kann dagegen über einen crush - eine Quetschung des Sehnervs - oder eine Transektion - eine vollständige Durchtrennung - erfolgen. Die Transektion stellt eine sichere Methode dar, um alle Axone zu durchtrennen. Sie wird entweder intraorbital hinter dem Augapfel oder intrakraniell in der Nähe des Chiasma opticum durchgeführt. Eine axonale Läsion in Nähe der Zellkörper führt zu einem besonders schnellen Verlust der RGZ, der 4 bis 5 Tage nach der Läsion eingeleitet wird und am siebten bis achten Tag den Höhepunkt erreicht. Nach 2 Wochen sind bereits mehr als 90% aller RGZ degeneriert (Berkelaar, Clarke et al. 1994). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Prozedur der Sehnervenfreilegung sehr komplex ist und eine aufwändige und Zeit einnehmende Operation erfordert (Koeberle and Ball 1998). Bei einem crush des optischen Nerven werden ebenfalls die Axone durchtrennt. Im Vergleich zur Transektion ist der

intraorbitale crush einfacher durchzuführen und löst eine langsamer verlaufende Degeneration der RGZ aus. Die Zeitersparnis, die gute Voraussagbarkeit, die zuverlässige Reproduzierbarkeit und letztlich die Tatsache, dass ein essentieller Mechanismus des Glaukoms mit selektiver Schädigung der RGZ simuliert wird, machen die direkte Axonschädigung durch Transektion oder Quetschung des optischen Nerven für die Auswertung verschiedener Interventionen zu einer geeigneten Methode.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Degeneration der RGZ in Wildtypmäusen durch einen intraorbitalen crush des Sehnerven induziert.

Das Auge der Maus zeichnet sich durch eine strukturelle Ähnlichkeit zum Menschenauge aus. So verfügt es über ein gut definiertes trabekuläres Maschenwerk, ein uveosklerales Kammerwasser-Abflusssystem sowie einen differenzierten Schlemm-Kanal und Ziliarmuskel (Smith, Zabaleta et al. 2001).

1.4 Stammzellen

1.4.1 Einleitung

Die Stammzelle (SZ) ist durch ihre Fähigkeit zur Selbsterhaltung und ihr Potential, in verschiedene Zelltypen zu differenzieren definiert. Bei symmetrischen Teilungen entstehen hierbei zwei neue Stammzellen, bei asymmetrischen Teilungen eine Stammzelle und eine differenziertere Vorläuferzelle. Zellen, die hingegen nur eine eingeschränkte Anzahl an Zellteilungen bis zur Differenzierung durchführen können, werden als Progenitorzellen bezeichnet.

1.4.2 Embryonale Stammzellen

Adulte SZ können lediglich die Haupt-Zelllinien des jeweiligen Gewebes generieren, aus dem sie entstammen (Multipotenz). Die ontogenetisch früheren embryonalen Stammzellen (ES) dagegen können in Zelltypen aller drei Keimblätter, also Entoderm, Ektoderm und Mesoderm differenzieren (Pluripotenz), nicht jedoch einen vollständigen Embryo hervorbringen (Totipotenz). Bis zur Morula, dem 8-Zellstadium, weist die sich teilende befruchtete Eizelle eine Totipotenz auf. Eine Isolation von nun pluripotenten embryonalen Stammzellen gelingt durch die Entnahme von Zellen aus der inneren Zellmasse (Embryoblast) der Blastozyste (Evans and Kaufman 1981).

1.4.3 Neurale Stammzelle und Neurophärenkultur

Die von Cajal aufgestellte Hypothese der Unfähigkeit des adulten ZNS sich zu regenerieren (Ram et Cajal and May 1928) wurde vielfach zitiert und sollte erst einige Jahrzehnte später – zumindest in Teilen - widerlegt werden (Altman and Das 1965).

1989 beschrieb Sally Temple multipotente Zellen in der Subventrikularzone des Maus-Gehirns mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Temple 1989). Einige Jahre später isolierten Brent A. Reynolds und Samuel Weiss erstmals Stammzellen aus zerebralem Gewebe der adulten Maus (Reynolds and Weiss 1992).

Mittlerweile wird dem ZNS ein endogenes, wenn auch begrenztes Regenerationspotential zugesprochen. So beschreiben eine Reihe von Studien die Existenz adulter neuraler Stammzellen, sowie eine Neurogenese im adulten Gehirn, bei der in bestimmten Hirnregionen noch Nervenzellen und Gliazellen generiert werden können (Taupin and Gage 2002)

Das latente Regenerationspotential des zentralen Nervensystems von Säugern kann u.a. durch Ischämien, Verletzungen oder Neuropathien angeregt werden (Nakatomi, Kuriu et al. 2002). Eine restitutio ad integrum wird aber nicht erreicht. Dieses Unvermögen entspringt u.a. der mangelhaften Zelldifferenzierungsfähigkeit und einer begrenzten funktionellen Integrationsfähigkeit der neu generierten Zellen (Arvidsson, Collin et al. 2002) im wachstumshemmenden Milieu des ZNS.

Die Untersuchung von neuralen Stammzellen (NSZ) ist in vivo nur bedingt möglich. Alternativ greift man daher auf Kultursysteme zurück. Klassischerweise werden dabei neurale Stammzellen als sogenannte Neurosphären kultiviert und expandiert. Neurosphären sind frei schwimmende, globuläre Zellverbände, die sich aus neuralen Stammzellen und weiter differenzierten neuralen Zelltypen zusammensetzen.

Die Expansion von NSZ über die Kultivierung von Neurosphären wurde erstmalig 1992 beschrieben (Reynolds and Weiss 1992). Hier machte man sich die Fähigkeit der NSZ, sich selbst zu erneuern und in die drei Hauptzelllinien des ZNS zu differenzieren, zu Nutze. Diese beiden Eigenschaften – die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und die Multipotenz - erfüllen zugleich die zentralen Definitionskriterien einer Stammzelle.

Nur ein geringer Teil der Zellen haben das Potential Neurosphären zu bilden. Jede Neurosphäre beinhaltet, zusätzlich zu den Stammzellen, neurale Zellen unterschiedlichen Differenzierungsstadiums, wie neuronale Progenitorzellen,

postmitotische Nervenzellen und Gliazellen. Unter adhärenter Expansion der Neurosphärenkultur, in Anwesenheit der Wachstumsfaktoren „fibroblast growth factor 2“ (FGF-2) und „epidermal growth factor“ (EGF), kann der Anteil an NSZ in den Kulturen stark gesteigert werden (Conti, Pollard et al. 2005) und aus Neurosphärenkulturen reine Stammzellkulturen abgeleitet werden. Adhärent kultivierte NSZ können klonal expandiert und effizient genetisch manipuliert werden. Weiterhin kann nach einer intravitrealen Transplantation in den Augen von Mäusen über lange Zeiträume ein Überleben dokumentiert werden. (Jung, Sun et al. 2013; Flachsbarth, Kruszewski et al. 2014). Aufgrund dieser Eigenschaften wurden in dieser Arbeit adhärent kultivierte NSZ als „zelluläre Fähren“ eingesetzt, um kontinuierlich und über lange Zeiträume NF in die Netzhäute von Mausmodellen für das Glaukom einzuschleusen.

1.4.4 Stammzellbasierte Therapieansätze für neurodegenerative Erkrankungen der Netzhaut

Stammzellen (SZ) besitzen die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Sie sind in vielen Geweben von der Embryogenese bis hin zum Erwachsenenalter vorhanden. Die Wahl des geeigneten Stammzelltyps für therapeutische Zwecke ist von dem jeweiligen spezifischen Therapieziel abhängig. Die ideale SZ für Zellersatzstrategien muss in der Lage sein, sich morphologisch und funktionell genau in den Zelltyp zu differenzieren, der verloren gegangen ist.

Die Identifizierung neuraler Stammzellen (NSZ) vor annähernd drei Jahrzehnten sowie die Entwicklung effektiver Protokolle zur gezielten Zelldifferenzierung (Gage, Ray et al. 1995) löste eine Welle der Euphorie aus, da man hoffte, über Stammzell-basierte Strategien beispielsweise den neuronalen Zellverlust nach einem Schlaganfall oder einer anderen neurodegenerativen Erkrankung ersetzen zu können (Horner and Gage 2000). Aus adulten Gehirnen können NSZ vor allem aus zwei zerebralen Regionen, in denen eine lebenslange Neurogenese bekannt ist, isoliert werden: Der lateralen Wand der Subventrikularzone und der Subgranularzone des hippocampalen Gyrus dentatus. Während in adulten Amphibien und Vögeln auch retinale Stammzellen nachgewiesen wurden, die eine Regeneration retinaler Läsionen ermöglichen (Otteson and Hitchcock 2003), konnten ähnliche Stammzellen in der Netzhaut des Menschen bisher nicht identifiziert werden.

Sowohl in vitro als auch in vivo konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen (MSZ), die Vorläuferzellen von Bindegewebszellen, diverse NF exprimieren und sezernieren (Crigler, Robey et al. 2006; Wilkins, Kemp et al. 2009). Schnell wurde daraufhin das Interesse geweckt, die Zellen genetisch so zu modifizieren, dass sie bestimmte NF mit einer höheren Expressionsstärke sezernieren. In präklinischen Studien an Tiermodellen für neurodegenerative Erkrankungen konnten mit solchen modifizierten MSZ bereits neuroprotektive Effekte nachgewiesen werden (Kurozumi, Nakamura et al. 2004; Sasaki, Radtke et al. 2009). Auch die lokale Transplantation von MSZ in das Rattenauge mit einem laserinduziertem Glaukom resultierte in einer signifikanten RGZ-Protektion im Vergleich zur Kontrolle bzw. einer systemischen Verabreichung der Zellen (Johnson, Bull et al. 2010). Eine Bereitstellung von NF durch die Transplantation genetisch modifizierter Zellen bietet die Möglichkeit, NF lokal und über lange Zeiträume in erkrankte Gewebe einzuschleusen. Im Vergleich zu Injektionen von rekombinanten NF, die eine nur kurze Halbwertszeit aufweisen, würde eine zellbasierte NF Applikation zudem eine gesteigerte Lebensqualität für den Patienten bedeuten, da lediglich eine einmalige Transplantation der Zellen, und nicht wiederholte Injektionen der rekombinanten Proteine notwendig wären.

1.5 Neuroprotektion

1.5.1 Einleitung

Die Idee der Neuroprotektion entspringt den Bestrebungen, eine Degeneration von Nervenzellen zu verzögern oder gar aufzuhalten. Ein funktioneller Ersatz von retinalen Ganglienzellen erscheint nach dem heutigen Stand der Forschung unrealistisch, denn diese Zellen müssten sich nicht nur funktionell in die Netzhaut integrieren, sondern zusätzlich mit ihren Axone in topographisch korrekter Ordnung die visuellen Projektionsgebiete im Gehirn innervieren. Beim Glaukom sind aus diesen Gründen neuroprotektive Therapieansätze, die ein Erhalt der noch vorhandenen Ganglienzellen zum Ziel haben von besonderer Bedeutung.

Anders als die Zellersatztherapie ist die Neuroprotektion kein kausaler Therapieansatz. Neuroprotektive Ansätze versuchen lediglich den Krankheitsverlauf zu verzögern oder im Idealfall aufzuhalten.

1.5.2 Memantin

Die Gegenregulierung der Glutamat-Exzitoxizität war ein früh diskutierter neuroprotektiver Therapieansatz. Memantin, ein NMDA-Rezeptorantagonist, konnte bereits in verschiedenen Tiermodellen die Degeneration von RGZ verzögern und befindet sich derzeit in der klinischen Erprobung (Danesh-Meyer 2011).

1.5.3 Neurotrophine

Mit Neurotrophinen, eine Gruppe von neurotrophen Faktoren mit insgesamt fünf Vertretern, die sich durch strukturelle und funktionelle Homologien auszeichnen, konnte in Tierversuchen eine Verzögerung der RGZ-Degeneration erzielt werden. Zu den Neurotrophinen gehört der „nerve growth factor“ (NGF), der „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) sowie „neurotrophin-3“ (NT-3), NT-4 und NT-5. Hierbei wird insbesondere BDNF eine bedeutende Rolle bei der RGZ-Protektion zugeschrieben. Nachgewiesen werden konnte eine lokale Expression von BDNF durch die RGZ (Herzog and von Bartheld 1998) sowie retinale Astrozyten (Moretto, Xu et al. 1994) als auch eine zerebrale Bereitstellung von BDNF mit einem nachfolgenden retrograden Transport über die Axone der RGZ in die Netzhaut. Neurotrophine binden an zwei unterschiedliche Rezeptorklassen: die hochaffine Tropomyosin Rezeptor-Kinase (Trk)-A, B und C sowie der niedrigaffine Rezeptor LNGFR (low affinity nerve growth factor receptor). Während NGF bevorzugt an TrkA bindet, wird für BDNF, NT-4 und NT-5 eine bevorzugte Ligandenbindung an TrkB beschrieben. Bis auf TrkC werden alle Rezeptoren der Neurotrophine von RGZ exprimiert, ihre Expressionsstärken können jedoch durch Läsionen oder eine okuläre Hypertension beeinflusst werden (Garcia, Forster et al. 2003; Rudzinski, Wong et al. 2004). So wird nach einer Axotomie in RGZ eine verminderte Expression der TrkB-mRNA beschrieben (Cheng, Sapieha et al. 2002).

In einem weiteren Transsektionsmodell wurden mittels adenoviraler Vektoren Müllerzellen genetisch so verändert, dass sie BDNF überexprimierten (Di Polo, Aigner et al. 1998). Durch die Überexpression von BDNF in den Müllerzellen konnte die Läsions-induzierte Degeneration der RGZ signifikant verzögert werden. Ein vollständiger und dauerhafter Erhalt der lädierten RGZ konnte jedoch mit dieser Strategie nicht erreicht werden.

1.5.4 CNTF

CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) ist im Kontext degenerativer retinaler Erkrankungen der vermutlich am besten untersuchte NF. CNTF hat starke neuroprotektive Effekte auf Photorezeptoren und RGZ und stimuliert weiterhin die axonale Regeneration lädierter RGZ. CNTF gehört zur Interleukin-6 Zytokinfamilie und wurde in Hühnerembryonen identifiziert, in denen er die Entwicklung und das Überleben von embryonalen Neuronen des Ganglion ciliare fördert. CNTF wird auch in der Retina exprimiert (Beltran, Zhang et al. 2003). Für das Zytokin konnte in zahlreichen Tiermodellen für degenerative retinale Erkrankungen signifikante protektive Effekte nachgewiesen werden, insbesondere auch in Tiermodellen für das Glaukom (Danesh-Meyer 2011).

1.5.5 GDNF

„glial cell line derived neurotrophic factor“ (GDNF) wurde aus einer Gliom-Zelllinie der Ratte isoliert. Für GDNF, einem Mitglied der „transforming growth beta“ (TGF- β) Familie, wurden neuroprotektive Wirkungen auf dopaminerge Mittelhirn-Neurone und spinale Motoneurone beschrieben (Lin, Doherty et al. 1993). GDNF ist ein ca. 15 kDa schweres, glykolysierter Homodimer und der erste beschriebene Faktor einer Familie neurotropher Faktoren, zu der außerdem Persephin, Neurturin und Artemin gehört. Die Signalantwort dieses Liganden erfolgt über einen Rezeptorkomplex, der aus einer Liganden-bindenden Domäne (GFR α 1-4) sowie der Signal-transduzierenden Domäne RET besteht. Es wird angenommen, dass der Tyrosinkinase-Rezeptor RET sowie das Glycosylphosphatidylinositol-verankerte (GPI-Anker) GFR α 1 die Hauptakteure in der GDNF-Signalvermittlung darstellen. Nach Bindung eines Liganden, bildet GFR α 1 einen heterotetrameren Komplex mit RET. Eine folgende Phosphorylierung des Tyrosinkinase-Rezeptors führt schließlich zu einer Signalkaskade, an deren Ende die Einleitung einer Gen-Transkription steht (Sariola and Saarma 2003). GDNF ist im peripheren sowie im zentralen Nervensystem weit verbreitet und wird hier vor allem im Bereich der dopaminergen Neurone sowie der Motoneurone angetroffen. Eine Expression konnte weiterhin im Innenohr, in den Nieren sowie im olfaktorischen System und im gastrointestinalen Trakt nachgewiesen werden (Nosrat, Tomac et al. 1996). Im Auge ist eine Expression von GDNF vor allem in der Retina nachweisbar, so dass bereits früh die Annahme einer neuroprotektiven Funktion von GDNF auf retinale

Zelltypen gestellt und untersucht wurde (Koeberle and Ball 1998; Yan, Wang et al. 1999).

Für die vorliegende Arbeit ist der neurotrophe Faktor GDNF von zentraler Bedeutung und wurde in einem „optic nerve crush“-Mausmodell hinsichtlich seiner neuroprotektiven Effekte auf axotomierte Ganglienzellen untersucht. Es handelt sich um ein vergleichsweise wenig untersuchtes Molekül. Auch GDNF scheint über retrograden axonalen Transport vom Zielinnervationsgebiet zu den Zellkörpern der RGZ transportiert zu werden. So kann man auch für GDNF beobachten, dass über eine Applikation dieses Faktors eine Degeneration von axotomierten Ganglienzellen deutlich verzögert werden kann. Hierbei ist der neuroprotektive Effekt von GDNF auf RGZ dosisabhängig (Yan, Wang et al. 1999; Lindqvist, Peinado-Ramonn et al. 2004). Ein ähnlicher neuroprotektiver Effekt kann nach experimenteller Induktion einer globalen, kurzandauernden zerebralen Ischämie im Rattengehirn durch die intrathekale Gabe von GDNF in einem schmalen Zeitfenster von einer Stunde nach Induktion der Ischämie beobachtet werden (Matheson, Wang et al. 1997). Injektionen des rekombinanten Proteins haben jedoch das Problem einer nur kurzzeitigen Bioverfügbarkeit von GDNF. Erstrebenswert ist daher eine andauernd Bereitstellung, die keine wiederholten Injektionen erfordert. Eine kontinuierliche Freisetzung von GDNF aus Mikrosphären, konnte entsprechend im DBA/2J-Mausmodell sowie in einem okulären Hypertensionsmodell der Ratte den Erhalt der RGZ verstärken (Matheson, Wang et al. 1997; Jiang, Moore et al. 2007; Ward, Khoobehi et al. 2007). Durch eine wiederholte intravitreale Injektion so genannter slow-release Poly (DL-Poly-Laktid-Co-Glykolid) (PLGA) Mikrosphären in das Auge der DBA/2J-Maus konnte ein im Vergleich zum unbehandelten kontralateralen Kontrollauge bis zu 3,5-fach höherer RGZ-Erhalt erreicht werden. Die kontinuierliche intravitreale Freisetzung von GDNF konnte hierbei über ELISA-Verfahren nachgewiesen werden (Ward, Khoobehi et al. 2007).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob und in welchem Umfang sich die Degeneration der RGZ in einem Mausmodell für das Glaukom durch eine zellbasierte kontinuierliche intraokuläre Applikation von GDNF verzögern lässt. Dazu wurde in adulten Mäusen durch einen intraorbitalen crush des optischen Nerven, eine Degeneration der RGZ induziert. Um in die Netzhäute dieser Tiere zellbasiert GDNF einzuschleusen, wurden adhärent kultivierte neurale Stammzellen mit einem polycistronischen lentiviralen Vektor transduziert, die unter Kontrolle eines ubiquitär aktiven und starken Promoters für GDNF, das Fluoreszenzprotein „enhanced green fluorescent protein“ (eGFP) und ein Resistenzgen kodiert. Zellen für Kontrollexperimente wurden mit dem gleichen lentiviralen Vektor aber ohne die GDNF cDNA transduziert. Nach Selektion mit einem Antibiotikum, wurden klonale GDNF-exprimierende Stammzelllinien und Kontrollzelllinien mittels „fluorescence activated cell sorting“ (FACS) etabliert. Diese Zelllinien wurden einen Tag nach Läsion des optischen Nerven intravitreal transplantiert. Nach einer Überlebenszeit von 9 oder 14 Tagen, wurden die RGZ in den Netzhäute der experimentellen Tiere immunhistochemisch angefärbt. Eine Abschätzung des neuroprotektiven Effekts der transplantierten GDNF-exprimierenden Stammzellen, erfolgte durch einen Vergleich der Ganglienzelldichten in Augen mit transplantierten GDNF-exprimierenden Stammzellen und transplantierten Kontrollzellen.

2. Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 1: Chemikalien

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Aquapoly mount	Polysciences, Inc. Warrington, PA, USA
Blocking Reagens	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
„bovine serum albumin“ (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMEM/F12 1:1 –L-Glutamine	Gibco Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Dura Extended Duration Substrat	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
„epidermal growth factor“ (EGF)	TEBU, Offenbach
Ethanol	Walter CMP GmbH & Co. KG, Kiel
„fibroblast growth factor-2“ (FGF-2)	TEBU, Offenbach (http://www.tebu-bio.com)
Formamid	Fluka Chemika, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glutamin	Gibco Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Heparin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
4-(2-Hydroxyethyl-)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ketanest S	Parke Davis GmbH, Berlin
Kochsalz (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Matrigel	BD Biosciences, Heidelberg
N2 Supplement	Gibco Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Natriumbikarbonat	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Neomycin	Invivogen, San Diego, USA
NS-A medium	Euro-clone, Pero, Italien (http://www.euroclonogroup.it)
Rompun	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Paraformaldehyd	Fluka Chemika, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
„phosphate buffered saline“ (PBS) steril	Gibco Invitrogen life technologies, Carlsbad, CA, USA
Poly-L-Ornithin (PLO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure (HCl)	Merck KG, Darmstadt
Triton x 100	Fluka Chemika, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zeocin	Invivogen, San Diego, USA

Tabelle 2: Geräte

Binokular	Möller-Wedel international, Wedel
Brutschrank	(Hühnereier) KB-53, WTW, Weilheim
Brutschrank (Zellkultur)	Hera Cell 240, Kendro Laboratory, Thermo electron corporation, Waltham, MA, USA
Brutschrank (Zellkultur)	CO2-Auto-Zero, Heraeus Products, Kendro Laboratory, Thermo electron corporation, Waltham, MA, USA
Heizplatte	Ikamag RCT, Ika Werke GmbH & Co, Staufen
Sterile Werkbank	Steril Card Hood, the Baker Company Inc., Sanford, Maine
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Jena Olympus IX51, Olympus Deutschland, Hamburg
pH-Meter	inoLab, WTW, Weilheim
Waage	Explorer, OHAUS, Giessen Adventurer, OHAUS, Giessen
Wasserbad	Medingen, Firmengruppe Preiss-Daimler, Dresden
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R, Heraeus Products, Thermo electron corporation, Waltham, MA, USA
FACS Sorting Core Unit	Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg

Tabelle 3: Primäre Antikörper

goat anti-Brn3-a Antikörper	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Mouse anti-microtubule associated protein 2 (MAP2) Antikörper	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Rabbit anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) Antikörper	DAKO, Glostrup, Dänemark

Tabelle 4: Sekundäre Antikörper

Cy3-konjugierter anti-goat Antikörper	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Cy5-konjugierter anti-rabbit Antikörper	Jackson Immunoresearch Laboratories inc.

Tabelle 5: Gebrauchswaren

Deckgläschen	Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda Königshofen
Eppendorf-Röhrchen 0,5 – 2 ml	Eppendorf References, Hamburg
Falcon-Röhrchen 15 ml / 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht / greiner bio-one, Frickenhausen
Klebeband	Tesa AG, Hamburg
Kanülen Gr.1 0,9 x 40 mm Sterican	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Objektträger	Marienfeld Laboratory Glassware, LaudaKönigshofen
Pipetten	Eppendorf References, Hamburg
Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Spritzen 5/10/50 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Multi-Well-Platten TPP	Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen TPP	Trasadingen, Schweiz
Zellulose-Nitrat-Filter	(Sartorius AG, Göttingen, Germany)

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien

Verwendeter Zelllinie	lentiviraler Vektor für Transduktion	Klonale/„polyklonale“ Zelllinie
187D (GDNF)	mGDNF pCAG GFP neo	„polyklonal“
203 (GDNF)	mGDNF pCAG GFPneo	klonal
202 (Kontrolle)	pCAG GFP neo	klonal
192 (Kontrolle)	pCAG iVenus 2A Zeo	klonal

Tabelle 7: Versuchstiere

C57BL/6J Mäuse	Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf
----------------	---

Tabelle 8: Computerprogramme

Adobe Photoshop CS3	Adobe Systems, San José, USA
GNU Image Manipulation Program 2.6.11	Free Software Foundation, Inc., Boston, USA
Image J	Public domain, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA (http://imagej.nih.gov/ij/)
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Office Word 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA

2.2 Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden adulte (etwa 2 Monate alte) C57BL/6J Wildtyp-Mäuse für die Evaluation der neuroprotektiven Wirkung der GDNF überexprimierenden Stammzellen verwendet. Für die Transplantationsversuche lag eine Genehmigung der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg vor. Futter und Wasser standen den Mäusen frei zur Verfügung.

Alle Eingriffe an den Versuchstieren wurden unter Beachtung und Einhaltung der lokalen Tierschutzrichtlinien sowie im Einklang mit den Richtlinien des „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“ durchgeführt.

2.3 Lentivirale Vektoren

Lentiviren gehören zur Familie der Retroviren und leiten sich vom HIV-1 ab. Die Sequenzen zur Herstellung viraler Proteine fehlen, so dass sie nicht eigenständig replikationsfähig sind, sondern dafür auf Strukturproteine der Wirtszelle angewiesen sind. Lentiviren haben zudem die Fähigkeit sowohl teilende als auch ruhende Zellen zu infizieren, sich hier stabil in das Wirtsgenom zu integrieren und sowohl in vitro als auch in vivo eine anhaltende Transgenexpression zu induzieren (Naldini, Blomer et al. 1996; Kafri, Blomer et al. 1997). Für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Vektoren orientierten wir uns an die von Weber et al. beschriebenen „lentiviralen gene ontology“ (LeGO) Vektoren (Weber, Bartsch et al. 2008; Weber, Mock et al. 2010).

Die Herstellung und Titration der lentiviralen Partikel richtete sich nach Standardprotokollen (siehe <http://www.lentigo-vectors.de/protocols.htm>). Die HEK 293T Zellen wurden mit Plasmiden für Hüll- und Verpackungsproteine sowie mit entweder einen das Transgen enthaltenden lentiviralen Vektor oder dem Kontrollvektor kotransfiziert. Für das Erreichen hoher viraler Titer, wurden die lentiviralen Partikel mit dem VSV-G Hüllprotein pseudotypisiert.

Der in dieser Arbeit verwendete Grundvektor bestand aus dem „cytomegalovirus enhancer/chicken β -actin“ (CAG) Promoter, der „internal ribosome entry site“ (IRES) des Encephalomyocarditis Virus und einem Fusionsgen bestehend aus dem „enhanced green fluorescent protein“ (GFP) Reportergen und dem Neomycin (neo) Resistenzgen. Der resultierende Vektor pCAG-IRES-GFP/neo wurde verwandt, um neurale

Stammzellen für Kontrollexperimente zu transduzieren. Um den neurotrophen Faktor GDNF in den Stammzellen zu exprimieren, wurde die cDNA für murines GDNF in den Vektor pCAG-IRES-GFP/neo kloniert und so der Vektor pCAG-GDNF-IRES-GFP/neo hergestellt.

Der starke und ubiquitär aktive CAG Promoter wurde ausgewählt, um eine hohe Expression der Transgene in undifferenzierten neuralen Stammzellen und differenzierten neuralen Zelltypen (Astrozyten, Oligodendrozyten und Nervenzellen) zu gewährleisten. Um eine möglichst hohe Expressionsstärke von GDNF zu erreichen, wurde die cDNA für diesen neurotrophen Faktor upstream von der IRES Sequenz in den Vektor kloniert. Über die IRES Sequenz wurde sichergestellt, dass alle Zellen, die GDNF exprimierten, gleichzeitig auch GFP und die neo Resistenz exprimierten. So konnten die GDNF exprimierenden Stammzellen über die Expression des grün fluoreszierenden GFP in vitro identifiziert werden und mittels „fluorescent activated cell sorting“ (FACS) selektiert werden. Die neo-Resistenz erlaubte außerdem eine Selektion der positiven Stammzellen über die Gabe von Antibiotika.

2.4 Isolierung und Kultivierung der neuralen Stammzellen

Für die Ableitung adhärent kultivierter neuraler Stammzellen, (Conti, Pollard et al. 2005; Weber, Mock et al. 2010) wurden aus dem Cortex cerebri 14 Tage alter C57BL/6J Mausembryonen zunächst Neurosphärenkulturen nach Standard-Protokollen (Pressmar, Ader et al. 2001; Ader, Schachner et al. 2004) hergestellt. Die Neurosphären wurden nach zwei bis drei Passagen mit Accutase dissoziiert und die Zellen adhärent in mit 0,1% Matrigel beschichtet Kulturflaschen in DMEM/F12 mit Glutamin (2 mmol/L), HEPES (5 mmol/L), Natriumbicarbonat (3 mmol/L), 0,3% Glucoselösung (im Folgenden NS-Zellmedium), EGF (10 ng/mL) und FGF-2 (10 ng/mL) sowie (10 ng/mL) sowie 1% N2 und 2% B27 kultiviert. Die Transduktion erfolgte in 24 Well Platten über Spinokulation in Anwesenheit von Hexadimethrinbromid (8 µg/mL). Die weitere Expansion und Selektion positiver Stammzellen, erfolgte dann in Matrigel-beschichteten Kulturflaschen in NS-Zellmedium, dem EGF (10 ng/mL), FGF-2 (10 ng/mL), 1% N2, 2% B27 sowie Neomycin (200 µg/mL) für die weitere Selektion zugefügt wurde (Conti, Pollard et al. 2005; Weber, Mock et al. 2010; Jung, Sun et al. 2013).

2.5 Passagieren der Stammzellen

In die beschichteten Flaschen wurde 1 mL Accutase gegeben und diese zur enzymatischen Zellablösung für wenige Minuten bei Raumtemperatur (RT) belassen. Die Vollständigkeit der Zellablösung wurde mikroskopisch überprüft und gegebenenfalls wiederholt. Nach Spülung mit 4 mL NS-Zellmedium, wurden die nun abgelösten Zellen in eine Falconröhrchen überführt und zwei Mal bei 1200 g für jeweils 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und das verbliebene Pellet in 1 mL Expansionsmedium resuspendiert und die Zellen für eine weitere Expansion in neue beschichtete Kulturflaschen gegeben.

2.6 Transduktion und Klonierung der Stammzellen

Die Viren-Überstände wurden durch Zentrifugation aufkonzentriert und für die Transduktion der adhären kultivierten NSZ verwendet. Die Stammzellen wurden in mit Matrigel (0,1 %) beschichteten 24 Well Platten ausgesät und mit 400 µL Virenüberstand bedeckt. Die Transduktion erfolgte durch zentrifugale Inokulation bei 2200 g bei Raumtemperatur für 1 Stunde in Anwesenheit von Polybren wie beschrieben (Weber, Bartsch et al. 2008).

In dieser Arbeit verwendeten wir eine klonale (aus einer mittels FACS selektionierten GDNF exprimierenden Stammzelle abgeleitete Kultur) und eine „polyklonale“ (aus wenigen mittels FACS selektionierten GDNF exprimierenden Stammzellen abgeleitete Kultur) Zellpopulation, die zweimal mit dem Vektor pCAG-GDNF-IRES-GFP/neo transduziert wurden (im Folgenden GDNF-Zellen genannt). Für Kontrollexperimente wurden adhären kultivierte NSZ zwei Mal mit dem Vektor pCAG-IRES-GFP/neo transduziert (im Folgenden Kontrollzellen genannt).

Um klonale und polyklonale Zellkulturen mit einer hohen Expressionsstärke von GDNF abzuleiten, wurden mittels FACS diejenigen Stammzellen isoliert, die die höchste Expressionsstärke des Reportergens GFP aufwiesen. Da die Expressionsstärke von GDNF von dem polycistronischem Vektor proportional zur Expressionsstärke von GFP steht, wurden auf diese Weise Zellen mit einer hohen Expression von GDNF isoliert.

2.7 GDNF-Expression in undifferenzierten und differenzierten NSZ

Für die Detektion der GDNF Expression in undifferenzierten NSZ, die entweder mit dem für GDNF kodierenden Vektor oder mit dem Kontrollvektor transduziert wurden,

erfolgte zunächst eine 15 minütige Fixierung in 4% PFA-Lösung. Anschließend wurden die Zelllinien für 1 Stunde in PBS mit 0,1% BSA und 0,3% Triton X-100 blockiert. Danach wurden die Kulturen mit dem primären anti-GDNF Antikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Kulturen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 4 Stunden mit einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert. Eine Färbung der Zellkerne wurde durch eine 10 minütige Inkubation in DAPI-Lösung erreicht. Für den Nachweis einer GDNF-Expression in differenzierten Zellen, wurden die GDNF exprimierenden Stammzellkulturen und die Kontrollzellen über gerichtete Differenzierungsprotokolle entweder in Astrozyten oder in Neurone differenziert (Jung, Sun et al. 2013). Die differenzierten Zelllinien wurden in 4% PFA-Lösung für 15 Minuten fixiert, anschließend für eine Stunde in Blockierung Puffer (PBS-Lösung mit 0,1% BSA und 0,3% Triton X-100) inkubiert und schließlich simultan mit anti-GDNF Antikörpern und anti-gliale fibrilläre saure Protein (GFAP) oder anti-microtubule associated protein 2 (MAP2) Antikörpern angefärbt. Die Primärantikörper-Detektion erfolgte mit entsprechenden Cy3- und Cy5-konjugierten Sekundärantikörpern. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte über eine Inkubation mit DAPI für 10 Minuten.

2.8 Westernblot

Mit Hilfe des Immunoblots konnte die Sekretion von GDNF durch die klonalen GDNF-Zellen bzw. Kontrollzellen überprüft werden. Das Westernblot lässt hierbei lediglich eine qualitative, jedoch keine quantitative Auswertung zu.

Hierzu wurden die Zellüberstände der Bulkulturen über Heparin-Agarose und Zentrifugation aufkonzentriert. Es folgte eine Detektion des GDNF mit einem goat anti-GDNF Antikörper (1:200). Die Proteinbanden wurden mit Super Signal West Dura Extended Duration Substrat unter Beachtung der Herstellerangaben, sichtbar gemacht.

Die Westernblots wurden hauptsächlich von Stefanie Schlichting und Wanda Jankowiak durchgeführt.

2.9 Intraorbitaler crush des optischen Nerven

Adulte Mäuse wurde durch eine intraperitoneale Injektion von Rompun/Ketanest tief narkotisiert. Anschließend wurde der rechte Sehnerv direkt hinter dem Bulbus unter expliziter Schonung der A. ophthalmica sowie der V. ophthalmica mit einer feinen gebogenen Pinzette für 15 Sekunden zusammengedrückt (crush), jedoch nicht

durchtrennt (Bartsch, Bandtlow et al. 1995). Ein fehlender Pupillenreflex, die Abwesenheit retinaler Blutungen und die Unversehrtheit der retinalen Blutversorgung wurden als Kriterien für einen erfolgreichen crush gewertet. Das kontralaterale nicht manipulierte Auge diente im Verlauf als Kontrolle.

2.10 Vorbereiten der transduzierten Zellen für die intravitreale Transplantation

Für die Transplantationen wurden die GDNF-exprimierenden Stammzellen und Kontrollzellen mit Accutase vom Kultursubstrat abgelöst und bei 1200 g für 5 Minuten zentrifugiert wurden. Die komplette Zell-Dissoziation, wurde mikroskopisch überprüft. Bei nicht vollständiger Ablösung, wurde erneut Accutase hinzugegeben. Die Kulturen wurden zentrifugiert, die Zellpellets in PBS aufgenommen, 10µl der Zellsuspension mit 5µl Trypan-Blau gemischt, und die Zellzahlen mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden 800.000 GDNF exprimierende Stammzellen oder 800.000 Kontrollzellen in 1µl PBS aufgenommen und bis zur Transplantation bei 4°C gelagert.

2.11 Intravitreale Injektionen der Stammzellen

Die Transplantation erfolgte jeweils am Folgetag des crushs des optischen Nervens. Hierbei wurden 2 µL der in PBS gelösten GDNF-exprimierenden Stammzellen oder Kontrollzellen intravitreal transplantiert. Vor der Durchführung der Transplantation, wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von Rompun/Ketanest anästhesiert und eine tiefe Anästhesie durch eine negative Reflexprüfung bestätigt. Die Transplantation erfolgte nur in das Auge mit dem gecrushten Nerven, das kontralaterale Auge diente als Kontrolle. Zunächst wurden 2 µL Kammerwasser durch Einführen einer feinen Glaskanüle, die mit einer Hamilton-Spritze verbunden war, im 45° Winkel am korneoskleralem Limbus entnommen. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass die Linse nicht verletzt wurde. Für die intravitreale Transplantation von 2 µL der Zellsuspension, wurde durch die gleiche Einstichstelle eine feine Glaskanüle in das Auge eingeführt und die Zellen langsam in den intravitrealen Raum unter mikroskopischer Kontrolle injiziert.

2.12 Präparation der Netzhäute

2.12.1 Tötung der Maus und gerichtete Entnahme der Augen

Zu einem definierten Zeitpunkt nach Durchführung des crushs, in dieser Arbeit 9 und 14 Tage nach der Läsion („days post lesion“; dpl), wurden die Mäuse getötet. Hierzu wurden die Tiere mit einer Überdosis eines Narkotikums betäubt. Nach Verschwinden der Reflexe und Eintreten des Atemstillstandes, wurden die Tiere zur endgültigen Sicherstellung des Todeseintritts überstreckt.

Für eine gerichtete Präparation der Netzhäute wurden die Hornhäute der Augen mit einer Kanülenspitze am dorsalen Pol und auf der temporalen Seite markiert.

Die Augen wurden anschließend mit Hilfe einer gebogenen Pinzette aus ihrer Orbitahöhle heraus luxiert und durch Ansetzen an den hinteren Augenpol, das gesamte Auge entnommen. Unmittelbar nach Entnahme der Augen wurden die temporalen Hälften der Hornhäute mit einer Mikroschere entfernt.

2.12.2 Anfertigung von retinalen Flatmount Präparaten

Für die Herstellung von Flatmounts wurden die Augen direkt nach Entfernung der temporalen Hornhauthälfte für 15 Minuten in PFA fixiert. Nach Ablauf der Zeit, wurde das Auge erneut in PBS überführt. Unter Verinnerlichung der Markierung und damit der Ausrichtung wurde die Hornhaut unter Zuhilfenahme einer Mikroschere komplett entfernt und die Linse herausgenommen. Von den Rändern der Retina aus wurden vier Schnitte gemacht, die bis kurz vor die Papille reichten und die Netzhaut in einen superio-temporalen, einen superior-nasalen, einen inferior-temporalen und einen inferior-nasalen Quadranten unterteilten. Unter Verwendung einer Pinzette wurde die Retina nun vorsichtig vom Pigmentepithel gelöst. Die Netzhäute wurden mit der retinalen Ganglienschicht nach oben auf ein Stück Zellulose-Nitrat-Filter gelegt und das PBS soweit entfernt, bis die Netzhäute fest an den Filtern hafteten. Anschließend wurden die Netzhäute ein weiteres Mal in PFA für eine Stunde fixiert.

2.13 Immunhistochemie

Für die weitere Auswertung wurden die retinalen Ganglienzellen (RGZ) in den retinalen Flatmount-Präparaten immunhistochemisch angefärbt. Hierzu wurden die Netzhäute für eine Stunde in PBS mit 1% Triton X-100 und 0,1% Rinderserumalbumin blockiert und

die Netzhäute dann mit polyklonalen anti-Brn3a Antikörpern (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am Folgetag wurde der primäre Antikörper verworfen und die Netzhäute nach dreimaligem Waschen mit PBS mit Cy3-konjugierten sekundären Antikörpern (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Netzhäute wurden erneut drei Mal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1:2000; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) inkubiert, um die Zellkerne anzufärben.

Nach Ablauf der 10 Minuten wurde die DAPI-Lösung abgenommen und die Flatmount-Präparate dreimal mit PBS gewaschen. Die Netzhäute wurden in dann in destilliertes Wasser überführt, mit der Ganglienzellseite nach oben mit Hilfe von Pinzetten auf Objektträger aufgezogen und schließlich mit Aqua Polymount eingedeckelt.

2.14 Quantifizierung der Ganglienzellzahl

Insgesamt wurden fünf voneinander unabhängige intravitreale Zelltransplantationen mit GDNF exprimierenden Stammzellen durchgeführt. Zwei Transplantationen wurden mit einer „polyklonalen“ und drei Transplantationen mit einer klonalen GDNF exprimierenden Zellkultur durchgeführt. Wie oben beschrieben wurde die Ausrichtung des präparierten Auges markiert, wodurch eine gerichtete Einbettung der retinalen Flatmount-Präparate gewährleistet wurde. Die Flatmounts waren in einen superio-temporalen, einen superio-nasalen, einen inferior-temporalen und einen inferior-nasalen retinalen Quadranten aufgeteilt. Für die Zellzählung wurden für jeden retinalen Quadranten mit einem Olympus IX51 Fluoreszenzmikroskop ausgehend von der Papille in Richtung Peripherie der Netzhäute insgesamt fünf aneinandergereihte Aufnahmen gemacht (Abb. 4). Pro Netzhaut wurden damit insgesamt 20 Bildaufnahmen hergestellt. Die 20 Bilder deckten eine Gesamtretnafläche von etwa 1,9 mm² ab. Mit Hilfe von Adobe Photoshop CS3 und ImageJ Software wurden auf diesen Aufnahmen alle eindeutig identifizierbaren Brn3a-positiven retinalen Ganglienzellen ausgezählt.

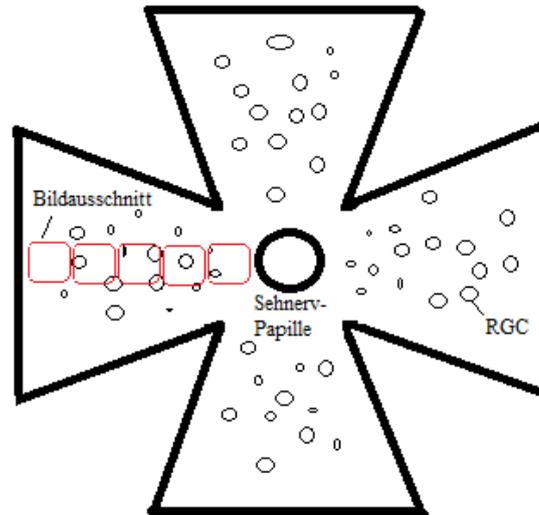


Abbildung 4: In jedem Quadranten der retinalen Flatmount-Präparate wurden ausgehend von der Papille in Richtung Peripherie der Netzhäute fünf aneinandergereihte Bilder (rote Quadrate) aufgenommen. Die Anzahl Brn3a-positiver retinaler Ganglienzellen (Kreise) wurde auf den insgesamt 20 Aufnahmen pro retinale Flatmount-Präparat bestimmt. Die 20 Bildaufnahmen entsprechen einer Gesamtretinafläche von 1,9 mm².

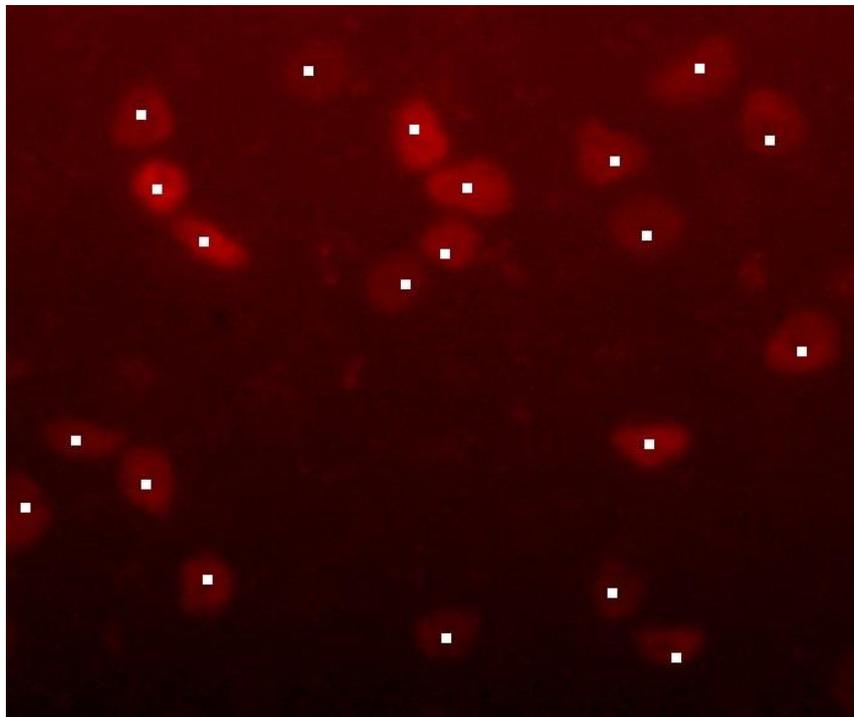


Abbildung 5: Brn3a-positive retinale Ganglienzellen wurden markiert und anschließend in den 20 Bildaufnahmen pro Netzhaut ausgezählt.

Mit Image J Software wurden die markierten RGZ (Abb. 5) auf allen 20 Bildern einer Netzhaut summiert und die Gesamtzahl sowie die durchschnittliche Anzahl pro mm² Retinafläche berechnet.

2.15 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde mit Microsoft Excel Office 2007 ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt. Hierbei wurden die Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben, also die Ganglienzellzahlen in Versuchstieren mit transplantierten GDNF exprimierenden Stammzellen und die Ganglienzellzahlen in Versuchstieren mit transplantierten Kontrollzellen ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1 Lentivirale Transduktion neuraler Stammzellen

Mit dem Ziel der Herstellung von Zellkulturen mit einer möglichst hohen Expressionsrate von GDNF bzw. dem Reporter gen GFP, wurden zunächst adhären kultivierte neurale Stammzellkulturen aus Mausembryonen-Gehirnen abgeleitet (Conti, Pollard et al. 2005; Pollard, Conti et al. 2006). Im Anschluss fand eine Transduktion der Stammzellen mit dem polycistronischen lentiviralen Vektor pCAG-GDNF-IRES-GFP/neo, um GDNF exprimierende Stammzellkulturen zu etablieren (polyklonale Zellkultur 187D/ klonale Zellkultur 203). Außerdem wurden Stammzellen mit dem polycistronischen lentiviralen Vektor pCAG-IRES-GFP/neo transduziert, um Zellkulturen für Kontrollexperimente abzuleiten (Kontroll-Zellkultur). Positive Stammzellen wurden über die Zugabe des Antibiotikums Neomycin zum Kulturmedium selektioniert. Eine weitere Selektion konnte außerdem über ihre Expression des grün fluoreszierenden Reporterproteins GFP mit Hilfe des FACS erfolgen. Aufgrund der positiven Korrelation zwischen Expressionsstärke des Reportergens und des neurotrophen Faktors von dem polycistronischen lentiviralen Vektor wurden dabei mittels FACS Zellen mit der höchsten GFP-Expression und damit der höchsten Expression des neurotrophen Faktors GDNF selektioniert. Es wurden sowohl einzelne Zellen mittels FACS selektioniert und anschließend klonal expandiert (klonale Zellkulturen) als auch mehrere Zellen mittels FACS selektioniert und dann expandiert (polyklonale Zellkulturen).

Die Expression von GDNF in mit pCAG-GDNF-IRES-GFP/neo oder pCAG-IRES-GFP/neo transduzierten Kulturen wurde immunzytochemisch untersucht. Eine Sezernierung des neurotrophen Faktors durch die modifizierten Stammzellen wurde durch Western Blot Analysen der Kulturüberstände überprüft.

3.2 Western Blot Analysen und immunhistochemische Evaluation der GDNF Expression

GDNF weist ein Molekulargewicht von etwa 15 kDa auf. In Western Blot-Analysen konnte GDNF in den Kulturüberständen der klonalen Zellkultur (203) nachgewiesen werden, die mit dem GDNF exprimierenden lentiviralen Vektor transduziert wurde (Abb. 6). In den Kulturüberständen der Kontrollkultur (202), die mit dem

Kontrollvektor pCAG-IRES-GFP/neo transduziert wurde, war dagegen bei 15 kDa keine Proteinbande und somit keine GDNF-Sekretion nachweisbar (Abb. 6).

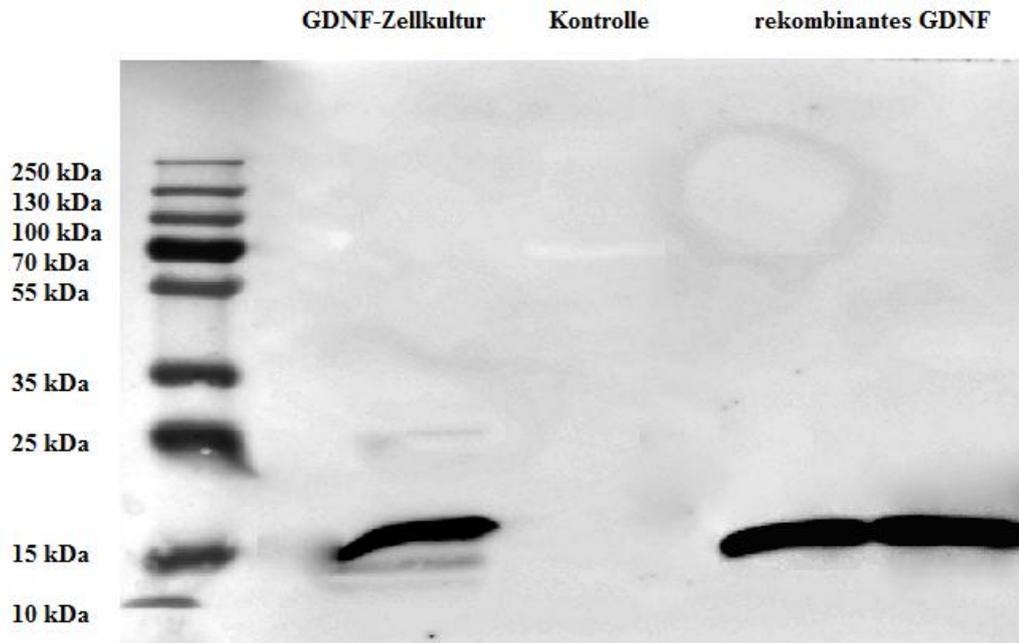


Abbildung 6: Immunoblot-Analyse der Kulturüberstände einer GDNF-Stammzelllinie (Klon 203) und einer Kontroll-Stammzelllinie (Klon 202). Eine Sekretion von GDNF in den Kulturüberstand war nur für die GDNF-Stammzelllinie, nicht aber für die Kontroll-Stammzelllinie nachweisbar. Als interne Kontrolle wurde rekombinantes GDNF geladen.

Als interne positive Kontrolle erfolgte eine Beladung des Blots mit rekombinatem humanen GDNF.

Auch immunhistochemisch konnten wir eine GDNF-Expression nachweisen. Hier war in undifferenzierten neuralen Stammzelllinien, die das GDNF-Transgen aufwiesen, durch eine Inkubation mit anti-GDNF-Antikörpern eine Koexpression von GDNF und dem Reporter gen eGFP in sämtlichen Zellen nachzuweisen (Abb. 7). In den undifferenzierten Kontroll-NSZ war dagegen nur eine Expression des Reportergens GFP, nicht jedoch eine Expression des neurotrophen Faktors GDNF nachweisbar (Abb. 7).

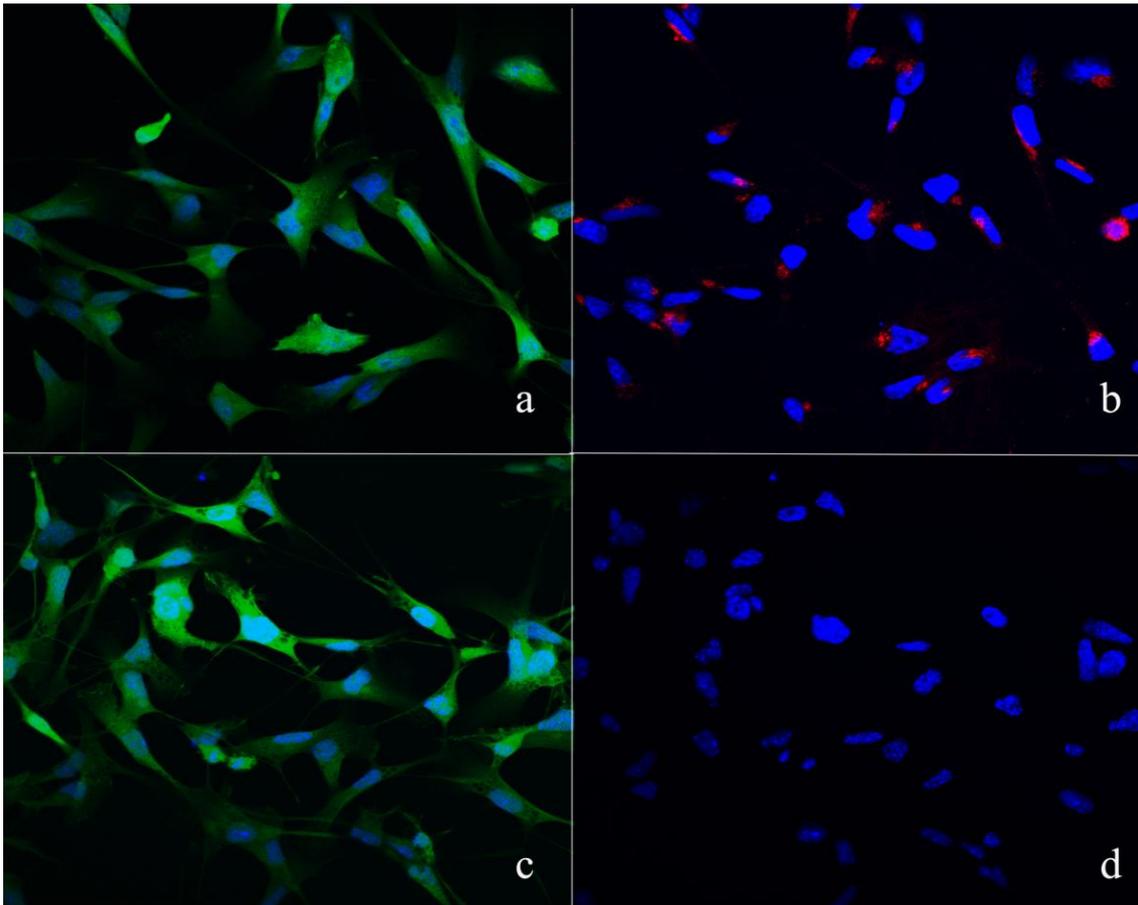


Abbildung 7: Immunzytochemische Analyse undifferenzierter klonaler NSZ Linien. Alle Zellen in der GDNF-Stammzelllinie (a) und der Kontroll-Stammzelllinie (c) exprimierten das Reportergen eGFP. Eine Expression von GDNF war dagegen nur in den GDNF-Stammzellen (b), nicht aber in der Kontroll-Stammzelllinie nachweisbar (rotes Signal in b).

Für den Nachweis einer GDNF-Expression in differenzierten neuronalen Zelllinien erfolgte zunächst eine gerichtete Differenzierung von GDNF exprimierenden NSZ sowie von Kontroll-NSZ in GFAP-positive Astrozyten oder MAP2-positive Neurone (Abb. 8). Während eine Expression des Reportergens GFP in allen neuronalen Zelltypen nachzuweisen war, konnte eine Expression von GDNF nur in Astrozyten und Neuronen beobachtet werden, die aus den GDNF-NSZ abgeleitet waren (Abb. 8). In den Astrozyten und Nervenzellen, die aus den Kontroll-NSZ abgeleitet wurden, konnte dagegen neben dem GFP keine Koexpression von GDNF detektiert werden (Abb. 8).

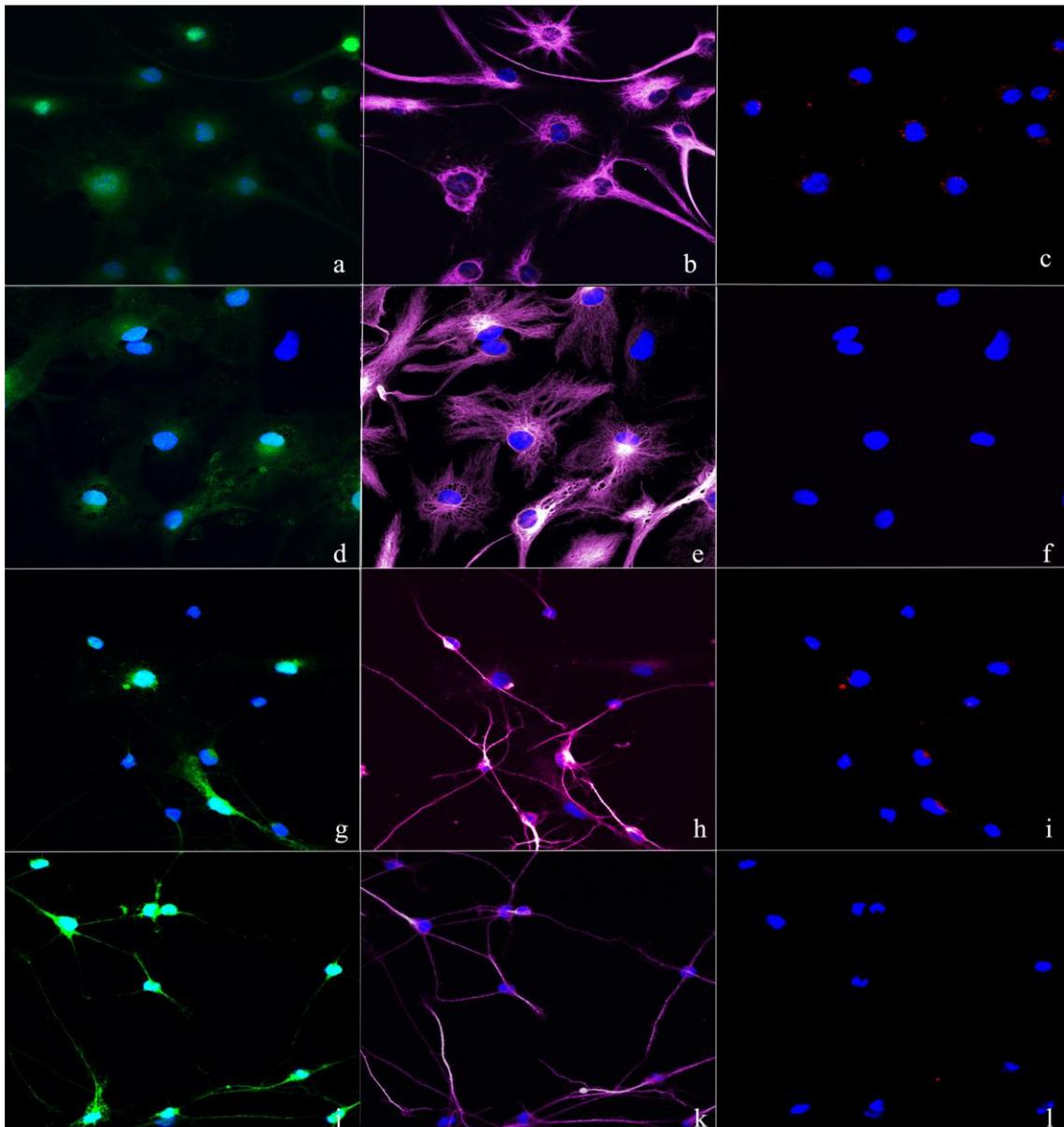


Abbildung 8: Expression von GDNF in neural differenzierten GDNF-Stammzellkulturen und Kontroll-Stammzellkulturen. Die GDNF-Stammzellen (a-c und g-i) sowie die Kontroll-Stammzellen (d-f und j-l) wurden *in vitro* entweder in Astrozyten (a-f) oder in Nervenzellen (g-l) differenziert. Astrozyten wurden mit anti-GFAP Antikörpern (b und e) und Nervenzellen mit anti-MAP2 Antikörpern identifiziert (h und k). Eine Expression des Reportergens GFP konnte in allen Nervenzellen (g, j) und in allen Astrozyten (a, d) nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob sie aus GDNF-Stammzellen oder aus Kontroll-Stammzellen abgeleitet wurden. Eine Expression von GDNF konnte dagegen nur in den Astrozyten und Neuronen detektiert werden, die aus den GDNF-Stammzellen generiert wurden (c und i). In den aus den Kontroll-Stammzellen abgeleiteten Astrozyten (f) und Neuronen (l) konnte dagegen keine Expression von GDNF nachgewiesen werden.

3.3 Intravitreale Transplantation

Die Transplantation von 1,6 Millionen Zellen der modifizierten und selektierten GDNF- bzw. Kontroll-Zellkulturen (in 2 µl PBS gelöst) erfolgte durch intravitreale Injektionen in adulte Mäuse einen Tag nach einem intraorbitalen crush des optischen Nerven. Vor sowie nach der Zellapplikation erfolgte eine dokumentierte Beurteilung des vorderen und hinteren Augenabschnitts sowie der gesamten Konstitution der Maus. Bewertet wurden insbesondere die intakte Blutversorgung der Netzhaut, fehlende Hinweise für eine intravitreale Entzündung sowie eine insgesamt unverletzte Linse. Waren diese Kriterien nicht erfüllt, erfolgte der Ausschluss der Maus aus der weiteren Auswertung.

In anderen Projekten aus unserem Labor konnte gezeigt werden, dass die transplantierten Zellen an der Hinterseite der Linsen sowie an der vitrealen Seite der Netzhäute adhären und dort über Zeiträume von bis zu vier Monaten nach der Transplantation überleben und die Reportergene sowie die neurotrophen Faktoren stabil exprimieren. Eine Integration der Empfängerzellen in die Neuroretina oder negative Auswirkungen der transplantierten Zellen auf die Morphologie der Empfänger Augen konnte dabei nicht beobachtet werden (Jung, Sun et al. 2013; Flachsbarth, Kruszewski et al. 2014).

In retinalen Flatmount-Präparaten erfolgte die Darstellung der RGZ durch eine Brn3a-Färbung. Brn3a-positive RGZ wurden markiert und quantifiziert. Verglichen wurden hierbei Augen, in die entweder klonale Kontroll-NSZ Kulturen oder klonale GDNF-NSZ Kulturen transplantiert wurden. Die Auszählung der überlebenden Brn3a-positiven RGZ in den beiden experimentellen Tiergruppen erfolgte 9 bzw. 14 Tage nach dem crush des optischen Nerven (Abb. 9). Bereits bei qualitativen Analysen waren hierbei deutlich höhere RGZ-Zelldichten in den Flatmount-Präparaten aus GDNF behandelten Augen als in Flatmount-Präparaten aus Kontroll-Augen festzustellen (Abb. 9). In ähnlicher Weise zeigten qualitative Untersuchungen von retinalen Flatmount-Präparaten, dass in Augen mit transplantierten polyklonalen GDNF NSZ Kulturen deutlich mehr Ganglienzellen die Läsion des optischen Nerven überlebt hatten, als in Augen mit transplantierten polyklonalen Kontroll NSZ Kulturen. Ähnliches gilt hierbei beim Vergleich von Flatmounts, die aus zuvor mit polyklonalen GDNF- bzw. Kontroll-NSZ injizierten Augen entstammen (Abb. 10).

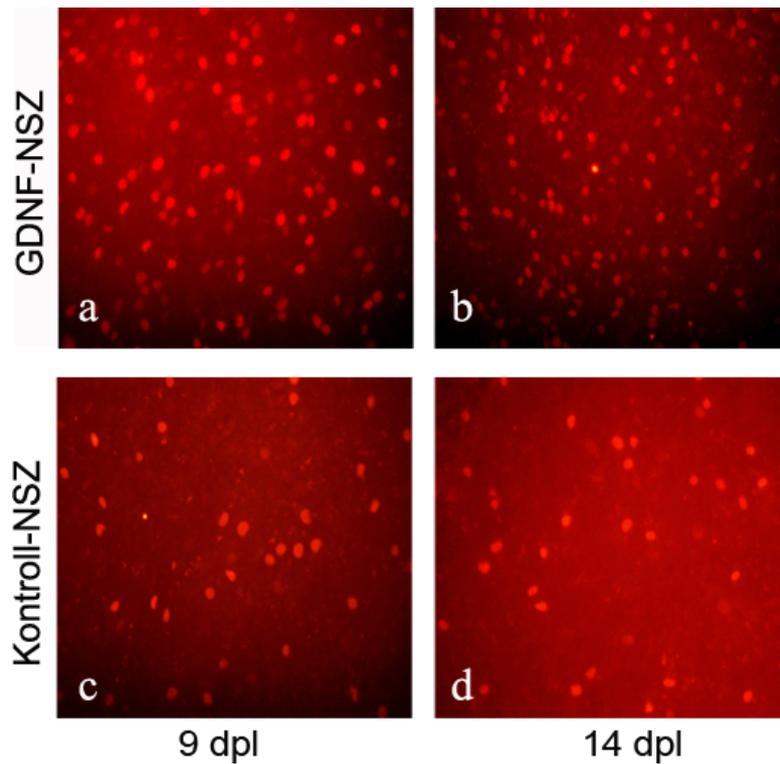


Abbildung 9: Analyse der neuroprotektiven Aktivität von intravitreal transplantierten klonalen GDNF-Stammzellen auf axotomisierte retinale Ganglienzellen. Die optischen Nerven adulter Mäuse wurden intraorbital lädiert und einen Tag später entweder GDNF-Stammzellen (a, b) oder Kontroll-Stammzellen (c, d) intravitreal transplantiert. Die Ganglienzellen wurden anschließend entweder 9 Tage (a, c) oder 14 Tage (b, d) nach der Läsion in retinalen flat mount Präparaten immunhistochemisch mit anti-Brn3a Antikörpern sichtbar gemacht. Sowohl 9 Tage (a) als auch 14 Tage (b) nach der Läsion waren in den GDNF behandelten Augen deutlich mehr Ganglienzellen nachweisbar als in den entsprechenden Kontrollaugen (c, d).

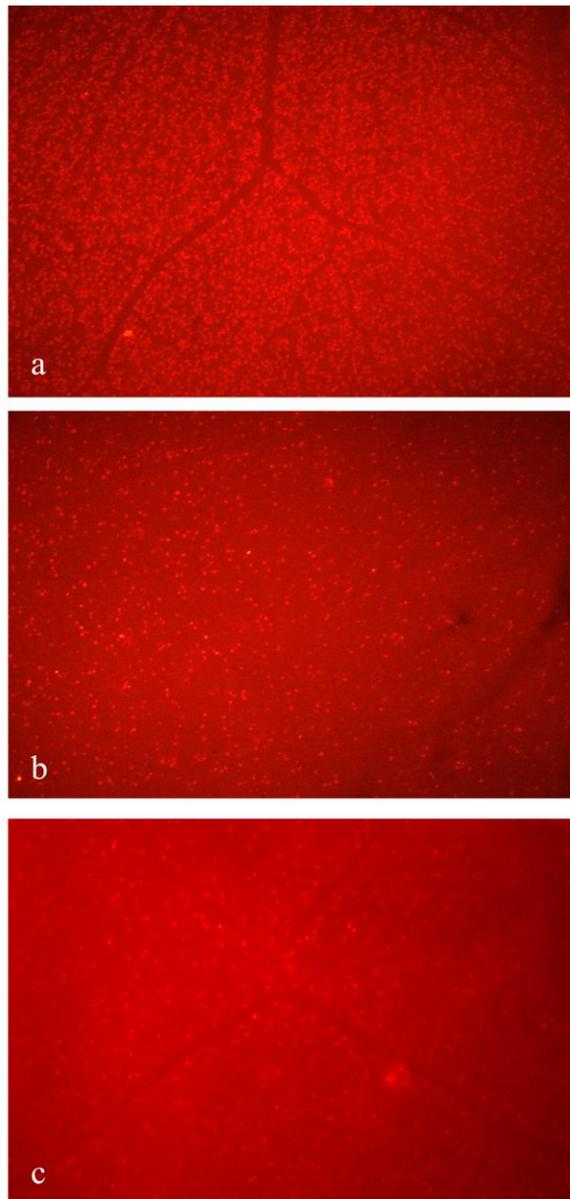


Abbildung 10: . Nach einer intravitrealen Transplantation einer polyklonalen GDNF NSZ Kultur (b) waren 9 Tage nach einem intraorbitalen crush des optischen Nerven deutlich mehr überlebende Brn3a-positive retinale Ganglienzellen zu finden als nach einer intravitrealen Transplantation einer polyklonalen Kontroll NSZ Kultur (c). Als Vergleich sind die Brn3a-positiven Ganglienzellen in einem unbehandelten Kontrolltier gezeigt (a).

3.4 Quantifizierung und statistische Auswertung der Neuroprotektion

Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen zeigten für die Gruppe mit der intravitreal transplantierten GDNF exprimierenden klonalen NSZ Kultur 9 Tage nach dem crush (9dpi), dass $1088,78 \pm 87,41$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) retinale Ganglienzellen die Läsion überlebt hatten. Im Vergleich konnten dagegen in der Gruppe mit der intravitreal transplantierten klonalen Kontroll NSZ Kultur 9 Tage nach dem

crush nur $603,48 \pm 59,37$ überlebende Ganglienzellen nachgewiesen werden. 14 dpl konnten $690,89 \pm 118,37$ überlebende Ganglienzellen in der Interventionsgruppe und $389,78 \pm 86,49$ überlebende Ganglienzellen in der Kontrollgruppe ermittelt werden. Für beide Zeiträume nach der Läsion des optischen Nerven lag die Zahl der überlebenden Ganglienzellen in den GDNF behandelten Augen um das etwa 1,8fache höher als in den Augen mit den transplantierten Kontrollzellen. Der Unterschied der beiden Mittelwerte konnte nach Durchführung eines unabhängigen T-Tests und unter Festlegung eines Alphafehlers $\alpha = 0,01$ (9 dpl) bzw. $\alpha = 0,001$ (14 dpl) unter Annahme eines einseitigen Versuchs als statistisch signifikant bestätigt werden.

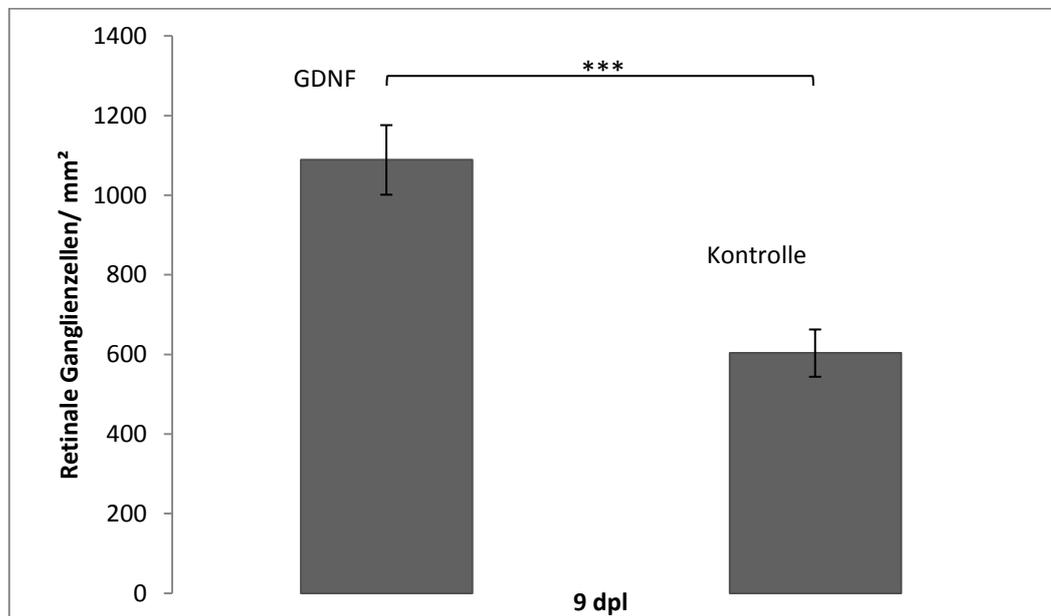


Abbildung 11: Anzahl von RGZ pro mm² Retinafläche 9 Tage nach einem intraorbitalen crush (9 dpl) des optischen Nerven in Augen mit transplantierten GDNF NSZ (GDNF; n=3) und Kontroll NSZ (Kontrolle; n=7). Balken repräsentieren den Mittelwert (\pm Standardabweichung). ***: p-Wert<0,01 im einfachen T-Test.

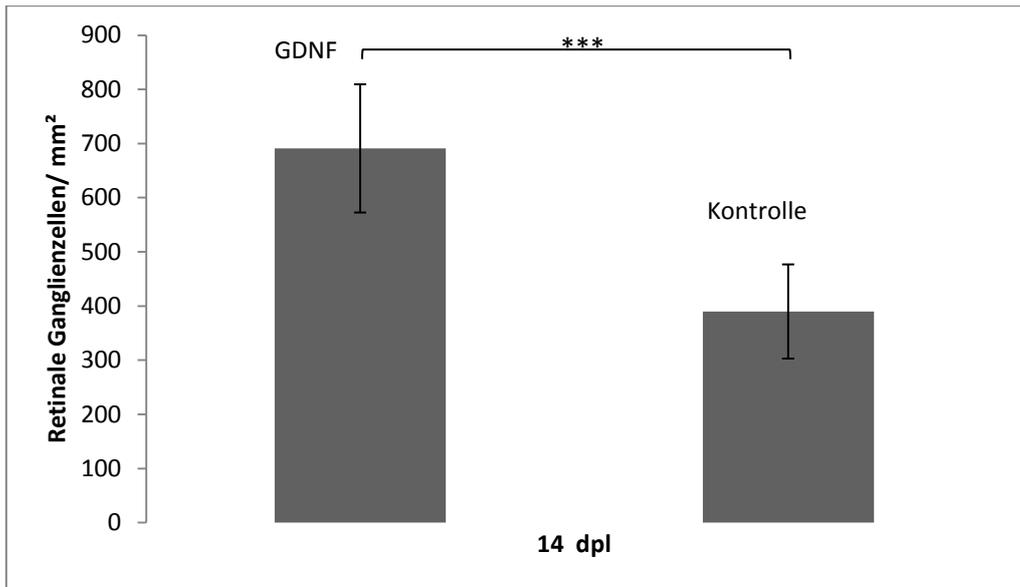


Abbildung 12: Anzahl von RGZ pro mm² Retinafläche 14 Tage nach einem intraorbitalen crush (14 dpl) des optischen Nerven in Augen mit transplantierten GDNF NSZ (GDNF; n=16) und Kontroll NSZ (Kontrolle; n=9). Balken repräsentieren den Mittelwert (\pm Standardabweichung). ***: p-Wert<0,001 im einfachen T-Test.

4. Diskussion

Das Glaukom ist eine multifaktorielle degenerative Erkrankung der inneren Netzhaut, die sich durch eine selektive Degeneration der retinalen Ganglienzellen (RGZ) auszeichnet. Betroffen sind die Zellkörper und Fortsätze (Axone) der RGZ, die den Sehnerv bilden. Charakteristische klinische Folgen der axonalen Degeneration sind eine Exkavation der Sehnervpapille sowie progressive diskrete Gesichtsfeldausfälle. Eine alternde Bevölkerung sowie unzureichende Behandlungsmöglichkeiten tragen entscheidend dazu bei, dass das Glaukom zu den häufigsten Ursachen einer irreversiblen Blindheit zählt (Quigley and Broman 2006).

Es sind unterschiedliche Mechanismen bekannt, die einen Zelluntergang von RGZ induzieren können, wie beispielsweise eine Exzitotoxizität, eine Zellschädigung durch reaktive Sauerstoffspezies, ein erhöhter Augeninnendruck (IOD) oder Läsionen des optischen Nerven. Neben einer primären Schädigung, die durch die sehr eingeschränkte Plastizität des zentralen Nervensystems (ZNS) in der Regel nicht vollständig regeneriert werden kann, tritt eine sekundäre Degeneration durch das vorherrschende Milieu und einen Mangel an neurotrophen Faktoren ein (Schwartz and Yoles 2000). Derzeit stellt die pharmakologische und chirurgische IOD-Senkung die einzige erfolgreiche Therapie des Glaukoms nach dem Konzept der Evidenzbasierten Medizin dar. Bei vielen Patienten schreitet der Krankheitsprozess allerdings trotz einer optimalen Druckeinstellung dennoch weiter fort. Zudem können Patienten mit einem normalen IOD ein Glaukom entwickeln, das so genannte Normaldruckglaukom. Diese Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit alternative und effektive Behandlungsmöglichkeiten für diese klinisch relevante neurodegenerative Erkrankung zu entwickeln.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu evaluieren, ob durch intravitreale Transplantationen von lentiviral modifizierten neuronalen Stammzellen (NSZ) und eine hiermit gewährleistete andauernde intravitreale Applikation des neurotrophen Faktors glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), ein signifikanter Ganglienzellerhalt bzw. ein verzögertes Ganglienzellsterben in einem Mausmodell für das Glaukom erreicht werden kann. Die Induktion der selektiven RGZ-Degeneration erfolgte hierbei durch eine intraorbitale Läsion des optischen Nerven (ON). Verglichen wurde eine Gruppe von C57BL/6J-Mäusen, in die intravitreal NSZ mit einer ektopischen Expression von GDNF-Expression transplantiert wurden mit einer Kontrollgruppe, in

die eine Transplantation mit NSZ ohne detektierbare GDNF-Expression erfolgte. Eine Analyse der experimentellen Netzhäute fand 9 bzw. 14 Tage nach der Läsion über eine Zählung Brn3a-positiver RGZ in retinalen „flat-mount“-Präparaten statt. Unsere Ergebnisse zeigten, dass in den Augen mit intravitreal transplantierten GDNF-exprimierenden NSZ im Vergleich zu den Kontrollaugen sowohl 9 als auch 14 Tage nach der Läsion etwa 1,8-mal mehr überlebende RGZ nachweisbar waren. Der Unterschied war zu beiden Auswertungszeitpunkten statistisch signifikant.

Die Retina ist ein Teil des ZNS, so dass auch hier ein eingeschränktes Regenerationspotential zu konstatieren ist. Der Einsatz einer Stammzelltherapie im Rahmen von retinalen degenerativen Erkrankungen wurde daher bereits früh diskutiert. In diesem Rahmen kam es zur Erprobung unterschiedlicher Zelltypen, insbesondere auch der embryonalen Stammzellen (ESZ). Während die intravitreale Implantation embryonaler Stammzellen in ein rd12-Maus-Modell mit einer langsam progredienten Degeneration der Photorezeptoren mit einer Teratombildung assoziiert war und zu einer Zerstörung der retinalen Struktur führte, zeigten von ESZ abgeleitete Neuroprogenitorzellen eine gute Proliferation, Differenzierung und Integration in die rd12-Retina (Chaudhry, Fecek et al. 2009). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Fähigkeit einer uneingeschränkten Teilung und das hohe Differenzierungspotential embryonaler Stammzellen gleichzeitig die Gefahr einer unkontrollierten Zelldifferenzierung und damit einer Tumorbildung birgt. In der Langzeitbeobachtung entwickelte in einer anderen Studie die Hälfte der subretinal transplantierten ESZ-abgeleiteten neuronalen Vorläuferzellen gravierende intraokuläre Tumore (Arnhold, Klein et al. 2004).

Aufgrund ihrer Fähigkeit, Zellen zu generieren, die sich in der transplantierten Zielstruktur gut integrieren können, ist die Verwendung neuraler Stammzellen im Rahmen von neurodegenerativen Modellen häufig anzutreffen. Entsprechend konnte durch die Transplantation neuraler Stammzellen in unterschiedlichen Tiermodellen von neurodegenerativen Erkrankungen sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem ein neuronaler Zellerhalt erzielt werden. Eine wichtige Eigenschaft der neuralen Stammzellen ist hierbei ihre Fähigkeit zur Migration. So wird eine präferentielle Migration von transplantierten neuralen Stammzellen zu ischämischen, läsionierten oder auch neoplastischen Hirnarealen beschrieben (Bull, Johnson et al. 2008). Diese gerichtete Zellmigration zu geschädigten Hirnregionen macht neurale

Stammzellen zu besonders interessanten Zelltypen für zellbasierte Therapieansätze. Die Ergebnisse aus verschiedenen Publikationen legen zudem nahe, dass neurale Stammzellen durch die simultane Sekretion unterschiedlicher neuroprotektiver Faktoren therapeutische Effekte vermitteln können. Auch beim Glaukom, das multifaktorieller Genese ist, ist diese Eigenschaft von potentiell Interesse. Es wird angenommen, dass Stammzellen eine intrinsische Fähigkeit zur Neuroprotektion aufweisen, die durch eine genetische Modifikation weiter verstärkt bzw. ergänzt werden könnte. Entsprechend versuchen verschiedene Arbeitsgruppen, diesen Zelltyp genetisch so zu verändern, dass er bestimmte neuroprotektive Faktoren in großen Mengen exprimiert und sezerniert.

Die Transplantation von aus dem murinen Rückenmark gewonnenen neuronalen Vorläuferzellen in die gesunde oder dystrophe Retina zeigte ein langes Überleben der Spenderzellen (Pressmar, Ader et al. 2001). Dieser Befund spricht für eine anhaltende Proliferation und Differenzierung der transplantierten Zellen im Empfängergewebe. Auch eine Vielzahl weiterer Studien konnte lange Überlebenszeiten und eine gute intraretinale Integrationsfähigkeit neuronaler Vorläuferzellen nachweisen (Takahashi, Palmer et al. 1998; Wang, Girman et al. 2008). In einem weiter unten diskutierten Parkinson-Tiermodell integrierten genetisch modifizierte NSZ mit einer Überexpression von GDNF in das Striatum der Empfängertiere, generierten dort Nervenzellen, Astrozyten sowie Oligodendrozyten und hielten eine stabile Expression hoher GDNF-Spiegel für mindestens 4 Monate im Empfängergewebe aufrecht (Akerud, Canals et al. 2001). Auch in bisher nicht veröffentlichten Beobachtungen aus unserem Labor konnten neurale Stammzellen mindestens 4 Monate nach ihrer intravitrealen Transplantation in das Empfängerauge nachgewiesen werden (Flachsbarth and Bartsch et al, 2014). Der Einsatz von genetisch modifizierten Stammzellen stellt also einen Lösungsansatz dar, um lokal, kontinuierlich und über lange Zeiträume neuroprotektive Faktoren in erkrankte Netzhäute eingeschleust werden können.

Hervorzuheben sind die Vorteile, die mit einer derart zu erreichenden kontinuierlichen intravitrealen Applikation eines Therapeutikums verbunden sind. So ist über den intravitrealen Raum ein direkter Zugang zur Retina, also der Zielstruktur, möglich. Durch die hiermit einhergehende Umgehung des Systemkreislaufs, wird zum einen das Nebenwirkungsprofil des Therapeutikums gesenkt und zum anderen entfällt die Entwicklung ausgeklügelter Systeme für die Überwindung der Blut-Hirn- oder Blut-

Retina-Schranke im Fall von systemischen Applikationen von Therapeutika. Eine intravitreale Verfügbarkeit beherbergt weiterhin den Vorteil einer lokalen Behandlung in Läsionsnähe. Eine derartige Stammzellinjektion, wäre zudem im Idealfall nur einmalig und im weiteren Verlauf dann unabhängig von der Patienten-Adhärenz.

In der Vergangenheit gab es unterschiedliche Ansätze, neurotrophe Faktoren in den Mittelpunkt der Glaukomtherapie zu stellen. In Anlehnung an die Erkenntnis, dass infolge einer okulären Hypertension und einer damit verbundenen Störung des axonalen Transports Ganglienzellen geringere Mengen des neurotrophen Faktors „nerve growth factor (NGF) zu ihren Zellkörpern transportierten (Sposato, Bucci et al. 2008), untersuchten Lambiase et al. die neuroprotektive Wirkung einer konjunktivalen Applikation von NGF in einem hypertensiven Glaukommodell der Ratte (Lambiase, Aloe et al. 2009). Die Autoren konnten zeigen, dass durch eine täglich mehrfache Applikation der NGF in Form von Augentropfen über einen Zeitraum von 7 Wochen die Ganglienzellichte im Vergleich zu Kontrollen um etwa 37% erhöht war. Die NGF-Augentropfen wurden daraufhin in einer Proof-of-Concept Studie an drei Glaukompatienten getestet. Nach drei Monaten der Anwendung wurden verbesserte Werte in der Elektroretinographie und den visuell evozierten Potentialen gemessen sowie ein erweitertes Gesichtsfeld bestätigt. Für die Anwendung am Menschen waren allerdings sehr hohe Mengen von NGF erforderlich. Die hiermit verbundenen hohen Kosten wären lediglich in Einzelfällen tragbar. Außerdem ist bei einer viermaligen Anwendung pro Tag, insbesondere bei älteren und multimorbiden Patienten, eine geringe Compliance zu erwarten. Der bedenklichste Kritikpunkt ist hierbei allerdings die sehr kleine Gruppengröße, die in dieser Studie ausgewertet wurde. Eine ausreichende Validität des Ergebnisses ist somit nicht gegeben, auch da zudem eine Kontrollgruppe fehlte.

Um eine kontinuierliche intraokuläre Applikation von neurotrophen Faktoren (NF) zu erreichen, haben Ward et al. (Ward, Khoobehi et al. 2007) glaukomatösen Mäusen GDNF-beladene Mikrosphären in 2 monatigen Abständen in den intravitrealen Raum injiziert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich bei den GDNF-behandelten Tieren ein signifikanter Ganglienzellerhalt. Ein früherer Therapiebeginn führte hierbei zu höheren Ganglienzellichten. Durch die Verwendung von Mikrosphären fand zwar eine verzögerte und somit verlängerte Bereitstellung von GDNF statt, jedoch war die

verfügbare Menge an GDNF begrenzt. Zwischen den Intervallen zwischen Ex- und Implantation der Mikrosphären lag zudem keine Versorgung mit NF vor. Unbeachtet bleiben darf auch nicht die hohe Infektionsgefahr, die mit einer notwendigen wiederholten Implantation und Explantation der Mikrosphären assoziiert ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte das Ziel einer kontinuierlichen intraokulären Applikation von GDNF durch intravitreale Transplantationen genetisch veränderter neuraler Stammzellen mit einer ektopischen Expression dieses neurotrophen Faktors erreicht werden. Die Evaluation der Effektivität und Sicherheit der stammzellbasierten GDNF-Applikation erfolgte an einem Mausmodell für das Glaukom. Wir entschieden uns für die Maus als Versuchstier, da in dieser Spezies bereits in der Vergangenheit ein reproduzierbarer Ganglienzellerhalt durch eine Applikation von GDNF gezeigt werden konnte (s.u.). Die Entwicklung muriner transgener oder akut induzierter Krankheitsmodelle hat in der Vergangenheit wesentlich zum Verständnis neurodegenerativer Krankheiten beigetragen (Phillips, Michell et al. 2009). Von Vorteil sind auch die wenig aufwändige und mit vergleichsweise geringen Kosten einhergehende Haltung. Durch den weit verbreiteten Gebrauch von Nagetieren als Tiermodelle für Erkrankungen, können an ihnen untersuchte und etablierte Methoden häufig unverändert übernommen werden. Entscheidend ist auch die im Vergleich zum Menschen vergleichbare Physiologie und Anatomie der Augen. Eine Vielzahl von Untersuchungen an Mausmodellen für das Glaukom beschreibt die Sehnervpapille als den Ort der primären Schädigung bei erhöhtem IOP. Auf Höhe der Lamina cribrosa soll es, ähnlich wie beim Menschen, bei erhöhtem IOP zu einem obstruktiven Hindernis des anterograden und retrograden axonalen Transports kommen und in Folge zu einer unzureichenden Versorgung mit neurotrophen Faktoren und zu einem Verlust von RGZ (Anderson and Hendrickson 1974; Quigley, Flower et al. 1980). Schließlich weist die Sehnervpapille des Mausauges zahlreiche Parallelen zur Sehnervpapille des menschlichen Auges auf (Morrison, Johnson et al. 1999).

Als Glaukommodell diente das sogenannte „optic nerve crush Modell“, bei dem die RGZ-Axone durch eine 15 Sekunden andauernde Quetschung des Sehnervs hinter dem Auge mit Hilfe einer Pinzette durchtrennt werden. Hierdurch wird eine schnelle retrograde axonale Degeneration, mit folgender Ganglienzelldegeneration induziert (Allcutt, Berry et al. 1984). Die Dauer der Quetschung des optischen Nervs hat einen

bedeutenden Einfluss auf das Ausmaß der Schädigung. Mit steigender Dauer der Ausführung steigt nicht nur der Umfang der Verletzung, sondern zudem auch die Gefahr einer Inflammation sowie einer Läsion der versorgenden Blutgefäße. Zum Zweck der Reproduzierbarkeit der Läsion wurde daher eine einheitliche Dauer der Nerv-Quetschung eingehalten. Kriterien eines erfolgreichen crushs waren eine Nichtauslösbarkeit des Pupillenreflexes, die Abwesenheit retinaler Blutungen sowie eine intakte retinale Blutversorgung. Zudem wurde stichprobenartig durch anterograde axonale Markierungen mit entsprechenden Markern sicher gestellt, dass keine intakten Axone distal der Läsion in Richtung des Chiasma opticum nachweisbar waren (Bartsch, Bartsch et al. 1992).

In dieser Arbeit wurden adhärent kultivierte neurale Stammzellen als zelluläre „Fähren“ genutzt, um GDNF kontinuierlich in glaukomatöse Netzhäute von einem Mausmodell für das Glaukom einzuschleusen. Um in diesen Zellen GDNF zu exprimieren, wurde ein polycistronischer lentiviraler Vektor eingesetzt, der außer für GDNF für das grün fluoreszierende Reporterprotein eGFP und ein Resistenzgen kodierte. Nach Transduktion mit diesem Vektor, wurden die positiven Zellen zunächst über Gabe eines Antibiotikums selektioniert. Dabei konnte die Selektionseffizienz über die Expression von eGFP in den Kulturen kontrolliert werden. Anschließend wurde die Tatsache ausgenutzt, dass sich die Expressionsstärken von GDNF und eGFP von dem polycistronischen Vektor proportional zueinander verhalten. Durch Selektion einzelner Zellen mit einer starken eGFP Expression und anschließender klonaler Expansion konnten so klonale NSZ Linien mit einer hohen Expression von GDNF abgeleitet werden. In ähnlicher Weise wurden mittels FACS mehrere Zellen mit einer starken eGFP Expression selektioniert und diese Zellen anschließend expandiert. Diese Kulturen werden in der vorliegenden Arbeit als „polyklonale“ NSZ Linien bezeichnet. Analysen der Expressionsstärke des Reporterproteins eGFP zeigten, dass durch die Strategie klonale und polyklonale NSZ Kulturen mit einer hohen Expressionsstärke des Transgens etabliert werden konnten. Western Blot Analysen der Kulturüberstände zeigten zudem, dass die Kulturen außerdem hohe Expressionsstärken von GDNF aufwiesen.

Die GDNF exprimierenden Stammzellen wurden in dieser Arbeit einen Tag nach Induktion des crushs intravitreal transplantiert. Während der intravitrealen

Zelltransplantationen wurde insbesondere auf eine Unversehrtheit der Linse geachtet, da bei Verletzungen der Linse eine läsionsgetriggerte Aktivierung des Makrophagensystems zu beobachten ist, die eine Ausschüttung neuroprotektiver Faktoren bewirkt und somit Einfluss auf die Ergebnisse nehmen könnte (Lorber, Berry et al. 2005). Das kontralaterale Auge der Maus blieb in allen Fällen unbehandelt und diente nach der Brn3a-Färbung als Kontrolle. Eine beispielsweise konstitutionell bedingte Ursache einer RGZ-Degeneration konnte auf diese Weise weitestgehend ausgeschlossen werden, da diese durch einen beidseitigen Befall gekennzeichnet wäre.

Nachdem die neuroprotektive Wirkung von GDNF zunächst insbesondere im nigrostriatal-dopaminergen System untersucht und nachgewiesen wurde, konnte durch sich anschließende Untersuchungen ein ausgedehnteres Einfluss-Spektrum auch auf weitere neuronale Strukturen sowohl des zentralen als auch des peripheren Nervensystems aufgezeigt werden. Eine neuroprotektive Wirkung konnte unter anderem auf Zellen des Sympathikus, des Parasympathikus sowie des enterischen Nervensystems beobachtet werden (Airaksinen and Saarma 2002). Im Rahmen dieser frühen Studien konnte beispielsweise gezeigt werden, dass tägliche lokale Applikation von GDNF über einen Zeitraum von 2 Wochen in das Hirnparenchym unmittelbar rostral zur Substantia nigra ein durch eine Axotomie oder Neurotoxin-Infusion (6-Hydroxydopamin) induzierter Zelltod aller nigrostriataler Bahnen verhindert werden konnte. In der Vergleichsgruppe, in der eine Kontrollinfusion verabreicht wurde, war dagegen lediglich eine 30%ige Überlebensrate zu beobachten (Lu and Hagg 1997). Neben einem strukturellen und quantitativen Erhalt konnte in den Parkinson-Tiermodellen auch eine Rekonvaleszenz funktioneller Defizite nachgewiesen werden (Gash, Zhang et al. 2005). Weiterhin konnte ein durch GDNF induzierter Erhalt hippocampaler Neurone im Anschluss an eine traumatische Hirnläsion dargestellt werden (Oppenheim, Houenou et al. 1995). Oppenheim et al. konnten hierbei zeigen, dass ein wesentlicher ursächlicher Mechanismus hierbei eine Reduktion des natürlichen programmierten Zelltods ist. Nach lokaler präischämischer Gabe von GDNF in Tiermodelle für einen Schlaganfall, fiel außerdem das durch eine transiente Minderdurchblutung verursachte Läsionsareal signifikant kleiner aus als nach einer Gabe eines Kontrollvehikels. Das Protektionsareal des Nervengewebes beschränkte sich hierbei auf das Verteilungsgebiet des neurotrophen Faktors (Miyazaki, Okuma et al. 1999).

Im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen der Netzhaut konnten Koeberle et al. 14 Tage nach einer Läsion des optischen Nerven durch Gabe von GDNF im Vergleich zu Kontroll-Tieren eine etwa doppelt so hohe Zahl an überlebenden RGZ beobachten. In diesem Rahmen wurde die Existenz einer RGZ-Subpopulation mit einem selektiven bzw. einem verminderten Ansprechen auf GDNF diskutiert (Koeberle and Ball 1998). Während in der frühen Phase dieser Neuroprotektionsstudien mit GDNF noch repetitive intravitreale Injektionen des neurotrophen Faktors notwendig waren, griff man im weiteren Verlauf auf Methoden zurück, über die eine kontinuierliche und lange andauernde Applikation des NF angestrebt wurde. Dies gelang beispielsweise durch die wie weiter oben beschriebene intravitreale GDNF-Freisetzung aus Mikrosphären (Ward, Khoobehi et al. 2007) oder über die singuläre subretinale oder intravitreale Injektion eines für GDNF kodierenden adenoviralen Vektors mit einer hierdurch vermittelten intraokulären Verfügbarkeit von GDNF. Hierbei konnte eine durch eine Rezeptorsättigung limitierte Dosisabhängigkeit der GDNF-Wirkung konstatiert werden (Schmeer, Straten et al. 2002).

Das von uns unter Berücksichtigung der oben diskutierten Vorteile anvisierte Vorhaben über Transplantationen von genetisch modifizierten NSZ, GDNF in erkranktes Nervengewebe einzuschleusen, wurde in unterschiedlichen Krankheitsmodellen bereits erfolgreich umgesetzt. In einem Retinitis pigmentosa Rattenmodell mit einer fortschreitenden Degeneration der Photorezeptoren wurden embryonale Stammzellen der Maus ex vivo genetisch so modifiziert, dass sie zu einer starken GDNF-Expression fähig waren. Die veränderten ESZ wurden Ratten intravitreal injiziert und integrierten sich dann in die inneren Retinaschichten. Hier konnten sie einen langanhaltenden neuroprotektiven Effekt auf die Photorezeptoren über GDNF vermitteln. In den behandelten Augen wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe nach einem Behandlungszeitraum von etwa 3 Monaten signifikant mehr Photorezeptoren nachgewiesen (Gregory-Evans, Chang et al. 2009). Jedoch waren in einigen Netzhäuten traktionelle Ablationen sowie lokale Hyperplasien der Empfänger-Netzhäute vorzufinden. In einem weiteren Modell wurde durch das Toxin 6-Hydroxydopamin eine Degeneration dopaminerger Neurone induziert, wie sie auch im Morbus Parkinson anzutreffen ist. Der Morbus Parkinson ist eine neurodegenerative Erkrankung, die aus dem progredienten Zelltod der Substantia nigra, einer im Mittelhirn gelegenen Region, resultiert. Infolge des Zelluntergangs entsteht ein Dopaminmangel, der zu einem

Symptomkomplex aus Demenz, Rigidität, posturaler Instabilität sowie psychosozialen Auffälligkeiten führt. Durch die genetische Befähigung von NSZ zur GDNF-Expression und ihrer anschließenden Transplantation, konnte ein Erhalt dopaminerger Neurone erzielt werden. Dieser Zellerhalt schloss eine Milderung der klinischen Symptome ein, die aus der Degeneration der Substantia nigra resultierten. Die transplantierten Zellen wiesen eine über 4 Monate anhaltende konstante Expression des Transgens auf (Akerud, Canals et al. 2001). Die Kombination aus neuraler Stammzelle und GDNF wurde ebenso als Therapieansatz zur Behandlung des aganglionären Megakolons untersucht. Es wurden primäre NSZ Kulturen aus postnatalen murinen Kortexen gewonnen und mit rekombinanten Adenoviren, die den Engineered Endothelin Rezeptor Typ B (EDNRB) sowie GDNF exprimierten, infiziert. Nach Transplantation in den aganglionären Kolonabschnitt zeigte sich in dem erkrankten Gewebe eine neuronale Regeneration (Shu, Meng et al. 2013).

Bei der Auswahl des Antikörpers für die immunhistochemische Darstellung der überlebenden Ganglienzellen waren verschiedene Anforderungen zu beachten. Möchte man die neuroprotektive Wirkung eines Faktors überprüfen, ist es wichtig, dass die Expressionsstärke des Markerproteins nicht durch die bloße Läsion in den RGZ abnimmt. Das Markerprotein sollte also in RGZ sowohl in der gesunden als auch in der erkrankten Netzhaut gleichermaßen stabil exprimiert werden. Es sollten also sowohl gesunde als auch axotomierte RGZ gleichermaßen gut markiert werden können. Diese Kriterien erfüllt der Transkriptionsfaktor Brn3a (Sanchez-Migallon, Nadal-Nicolas et al. 2011). Er zeigt eine unveränderte Expression nach einer retinalen Läsion oder nach einer Transektion bzw. eines crush des ON. Abgestorbene Zellen werden dagegen nicht mehr mit anti-Brn3a Antikörpern angefärbt. Brn3a kann also sowohl in der lädierten als auch in der unbehandelten Retina zur zuverlässigen ex-vivo Markierung der RGZ verwendet werden (Nadal-Nicolas, Jimenez-Lopez et al. 2009).

Im Sehnerv findet man versorgende Gefäße und Stützgewebe. Die Hauptkomponente bilden jedoch die parallel angeordneten Axone der RGZ. Sie stehen in einem 1:1-Verhältnis zu den Somata der Ganglienzellen, das heißt jeder Zellkörper hat genau ein Axon. Eine Axondegeneration korreliert demnach mit der Somaschädigung und umgekehrt. Durch einen crush, also einer Sehnervläsion, wird – analog zum Glaukom – ein selektives Ganglienzellsterben durch eine retrograde Degeneration induziert. Um die

neuroprotektive Wirkung von GDNF auf die Ganglienzelle nach einen crush zu evaluieren, führten wir drei voneinander unabhängige Transplantationsversuche mit GDNF exprimierenden neuronalen Stammzellen durch.

Die quantitative Bestimmung der Anzahl überlebender RGZ erfolgte 9 (dpl) oder 14 (dpl) Tage nach dem crush in Mäusen, in die intravitreal GDNF-exprimierende Zellen transplantiert wurden sowie in Mäusen, in die intravitreal Kontrollzellen transplantiert wurden. In der GDNF-Gruppe konnten 9 dpl $1088,78 \pm 87,41$ RGZ/mm² retinaler Fläche (Mittelwert \pm Standardabweichung) nachgewiesen werden, während in der Kontrollgruppe $603,48 \pm 59,37$ RGZ/mm² retinaler Fläche zu finden waren. 14 dpl waren es $690,89 \pm 118,37$ RGZ/mm² in der GDNF-Gruppe und $389,78 \pm 86,49$ RGZ/mm² in der Kontrollgruppe. Dies entspricht einem etwa 1,8 fachen Zellerhalt durch die transplantierten GDNF exprimierenden Stammzellen in Bezug auf die Kontrollgruppe sowohl 9 als auch 14 Tage nach der Läsion des Nerven. Der Unterschied der RGZ-Dichte war zwischen Kontrollen und mit GDNF behandelten Retinas zu beiden postläsionär ausgewerteten Zeitpunkten statistisch signifikant. Für die Auswertung 9 dpl kann hierbei ein P-Wert mit $p < 0,01$ und für 14 dpl ein P-Wert mit $p < 0,001$ (einfacher T-Test) berechnet werden.

Alternativ zur ex vivo Gentherapie wird der Ansatz der Zellersatztherapie diskutiert. Ein funktioneller Ersatz von RGZ gelang bisher jedoch nicht. Besonders bei fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung ist ein funktioneller Ersatz von degenerierten RGZ die einzig denkbare Therapiestrategie. Allerdings ist dieser Therapieansatz mit einer Vielzahl von Problemen konfrontiert, die nach dem heutigen Stand der Wissenschaft nur schwer oder gar nicht lösbar sind. Zunächst müssen genügend Zellen vom adäquaten Typ und der gewünschten spezialisierten Funktion in der Zellkultur generiert werden. Dann muss bedacht werden, dass nach wie vor in den glaukomatösen Netzhäuten ein degeneratives Milieu vorherrscht, das auch im Falle eines erfolgreichen Zellersatzes die neuen RGZ potentiell beeinflussen kann. Weiterhin muss sichergestellt werden, dass die neu eingeführten Ganglienzellen sich in die richtige Stelle der Retina integrieren und funktionell sinnvolle synaptische Verbindungen mit den endogen vorhandenen retinalen Nervenzelltypen ausbilden müssen. Das größte Hindernis, degenerierte Ganglienzellen durch Zelltransplantation funktionell zu ersetzen, liegt aber in der Problematik, dass die neu integrierten Ganglienzellen Axone über weite Strecken

durch den optischen Nerven und den optischen Trakt bis in die visuellen Zielgebiete ausbilden müssten. In diesen Zielgebieten müssten sich dann die neuen Ganglienzellen in topographisch richtiger Weise mit den richtigen Zielzellen synaptisch verbinden.

Das Endresultat neurodegenerativer Krankheiten ist meist der letztliche Einbezug aller Zelltypen des Gewebes. Schließlich sind alle im Gewebeverbund befindlichen Zellen demselben Risikomilieu ausgesetzt. Bei der Therapiewahl sollte dieser Aspekt Beachtung finden und eine Neuroprotektion idealerweise alle neuronalen Zelltypen miteinschließen. Die Verwendung neurotropher Faktoren erfüllt durch das in der Regel breite Wirkspektrum auch dieses Kriterium. Tatsächlich nimmt das Glaukom eine Sonderrolle im Spektrum der neurodegenerativen Erkrankungen ein und zeichnet sich durch ein selektives RGZ- Sterben aus. Der Wirkeinfluss bestimmter neurotropher Faktoren ist spezifisch auf die Zelltypen limitiert, die die entsprechenden Rezeptoren für die jeweiligen Zellen exprimieren (Jelsma, Friedman et al. 1993; Garcia, Forster et al. 2003). Interessanterweise kann man infolge einer Läsion, einen rückläufigen Prozess beobachten. In einer Studie wurden beispielsweise an RGZ die Verhältnisse der Tyrosinkinase-Rezeptoren für Neurotrophine (trkA, trkB und trkC) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einer Sehnerv-Axotomie untersucht. In unbehandelten Netzhäuten fand man nur eine geringe Expression der Rezeptoren. Postläsionär war zunächst ein deutlicher Expressionsanstieg zu verzeichnen, simultan konnte aber eine Herunterregulierung der Expression der trkA- und trkC-mRNA beobachtet werden. Die trkB-mRNA Expression blieb unverändert (Pachnis, Mankoo et al. 1993). Zusätzlich fand eine Verlagerung des Expressionsverhältnisse von trkA zu dem low affinity NGF Rezeptor (LNGFR) und als Folge eine verstärkte Einleitung pro-apoptischer Signalwege statt (Sposato, Bucci et al. 2008).

Es ist festzuhalten, dass nicht nur in den Augen mit transplantierten Kontrollzellen, sondern auch in den Augen mit transplantierten GDNF exprimierenden Stammzellen eine fortschreitende Degeneration der axotomierten Ganglienzellen zu beobachten war. Diese Tatsache zeigt, dass mit neuroprotektiven Therapieansätzen lediglich ein verzögerter Krankheitsverlauf erreicht werden kann. Es handelt sich bei der Neuroprotektion also nicht um eine kausale therapeutische Intervention, die das Fortschreiten einer neurodegenerativen Erkrankung aufhalten könnte. Erstrebenswert ist daher ein möglichst früher Einsatz neuroprotektiver Behandlungsformen. Dies stellt

hohe Anforderung an die Sensitivität einer Diagnostik für die frühe Erkennung eines beginnenden Krankheitsstadiums. Bei Risikopatienten wäre weiterhin ein Einsatz im Sinne einer Primärprävention, also ein Therapiebeginn noch vor erfassbarem Krankheitsausbruch, zu diskutieren.

In einem weiteren Axotomiemodell starben im unbehandelten Auge 14 Tage nach der Läsion über 90% der RGZ, während eine Applikation von GDNF eine dosisabhängige Neuroprotektion von bis zu 47.8% der lädierten RGZ bewirkte. Bei gleicher Dosis war dies allerdings immer noch weniger der durch eine Applikation von BDNF erreichte Zellerhalt. Eine kombinierte Applikation beider neurotropher Faktoren konnte jedoch einen Erhalt von 75.2% der lädierten RGZ erreichen und überstieg damit deutlich die neuroprotektiven Effekte, die mit den einzelnen Faktoren beobachtet wurden (Yan, Wang et al. 1999). Diese Ergebnisse zeigen, dass kombinierte neuroprotektive Therapiestrategien zu signifikanten Therapieeffekten führen können, und möglicherweise klinisch relevante Bereiche erreichen können.

5. Schlussfolgerung und Zukunftsaussicht

Eine Vielzahl von Studien deutet darauf hin, dass eine zu geringe Verfügbarkeit von neurotrophen Faktoren ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Glaukoms darstellen kann. So ist in RGZ einerseits ein gestörter axonaler Transport von neurotrophen Faktoren infolge eines hypertensiven IOD zu beobachten und andererseits ist ein deutlicher Ganglienzellerhalt durch die externe Zufuhr neurotropher Faktoren möglich. Berücksichtigt man zudem die Tatsache, dass eine pharmakologisch oder chirurgisch drucksenkende Therapie die derzeit einzige Therapieoption für das Glaukom darstellt, der Sehverlust aber trotz normaler IOD-Werte in einer signifikanten Anzahl von Patienten durchaus weiter fortschreiten kann, ist es erstrebenswert, zusätzliche Behandlungsmöglichkeiten für diese neurodegenerative Erkrankung der inneren Netzhaut zu etablieren.

Wir konnten zeigen, dass eine Stammzell-vermittelte kontinuierliche intravitreale Applikation des neurotrophen Faktors GDNF diesen postulierten Mangel an NF teilweise kompensieren und einen signifikanten Erhalt von axotomierten RGZ über einen Zeitraum von zwei Wochen bewirken kann.

NSZ bringen für einen Aufbau von zellbasierten Behandlungsmöglichkeiten von neurodegenerativen Erkrankungen eine Vielzahl wichtiger Charakteristiken mit sich. So ist es beispielsweise möglich, NSZ in der Zellkultur massiv zu expandieren. Sie zeigen eine gute Migrations- und Integrationsfähigkeit insbesondere in geschädigte Gewebe und sie sind über einen langen Zeitraum in den Empfängergeweben überlebensfähig. Ihre Rolle zum Beitrag eines andauernden Zellerhalts und Zellfunktionserhalts konnte bereits in zahlreichen Tiermodellen für neurodegenerative Erkrankungen nachgewiesen werden. NSZ sind außerdem vergleichsweise einfach genetisch zu manipulieren und können damit als zelluläre „Fähren“ genutzt werden, um therapeutisch relevante und sezernierte Genprodukte in erkranktes Nervengewebe einzuschleusen.

Bei der Entwicklung von alternativen Behandlungsmöglichkeiten des Glaukoms ist zu beachten, dass der Ganglienzellverlust bei Glaukompatienten in der Regel erst zu einem relativ späten Zeitpunkt bei weit fortgeschrittener Erkrankung diagnostiziert wird. Die Gesichtsfeldausfälle werden von den Patienten zunächst kompensiert und fallen den Betroffenen daher erst in einem späten Stadium auf, wenn 30% oder mehr Ganglienzellen irreversibel verloren sind. In unserem Mausmodell wurde unmittelbar

nach Einsetzen der RGZ Schädigung eine Behandlung eingeleitet. Ein derart früher Therapiebeginn ist im klinischen Alltag nicht realisierbar. Allerdings stellt das optic nerve crush-Modell eine rasant progressive Variante eines Glaukommodells dar, so dass der gewählte Zeitpunkt relativ zu betrachten ist. Eine differenziertere Betrachtung wäre sicherlich möglich, wenn das Tiermodell sowohl die Pathophysiologie als auch den zeitlichen Verlauf der RGZ Degeneration besser widerspiegeln würde. Mit einem besseren Tiermodell, könnte die Effizienz dieses Stammzell-basierten Therapieansatzes auch hinsichtlich des Therapiebeginns evaluiert werden, um so klinisch relevantere Prognosen zum Therapieerfolg bei Glaukompatienten treffen zu können.

Wie oben beschrieben, ist das Glaukom eine multifaktorielle, altersbedingte und äußerst komplexe neurodegenerative Erkrankung der Netzhaut. Beachtet man dies, ist es unwahrscheinlich, dass es für das Aufhalten des RGZ Zelluntergangs eine einfache unikausale Behandlungsmöglichkeit geben wird. Erstrebenswert ist ein detaillierteres Verständnis der Pathophysiologie des Glaukoms. Es ist aber bekannt, dass bereits im Frühstadium eines Glaukoms eine Herunterregulierung der Expression unterschiedlicher neurotropher Faktoren stattfindet. Die Substitution eines einzigen NF wird somit mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zu einem optimalen Therapieerfolg führen können. Therapieansätze, die eine simultane intraokuläre Applikation mehrerer unterschiedlicher neurotropher Faktoren verfolgen, zeigen entsprechen im Vergleich zur Applikation einzelner neurotropher Faktoren bessere Therapieerfolge. Über den Einsatz verschiedener klonaler Stammzelllinien mit einer ektopischen Expression jeweils unterschiedlicher neurotropher Faktoren, lassen sich solche kombinierten Therapiestrategien realisieren.

Retinale Ganglienzellen erhalten die visuelle Information über synaptische Verbindungen an ihren Dendriten und leiten sie über die Axone weiter zu den visuellen Zentren des Gehirns. Bei neurodegenerativen Erkrankungen der inneren Netzhaut kommt es nicht nur zu einem Verlust von RGZ Zellkörpern, sondern auch zu morphologischen Veränderungen der Dendriten von überlebenden Ganglienzellen. Demnach wäre ein weiteres Untersuchungsziel, zu analysieren, ob die Bereitstellung von neuroprotektiven Faktoren auch die Morphologie und Komplexität des dendritischen Apparats der RGZ in glaukomatösen Netzhäuten aufrechtzuerhalten vermag. Eine Möglichkeit, um die funktionelle Integrität der Netzhaut sowie der

Sehbahn darzustellen, ist die Analyse visuell evozierte Potentiale (VEP). Sie beschreiben elektrische Potentialunterschiede, die durch kurze visuelle Stimuli induziert und über der okzipitalen Schädeldecke im Bereich des visuellen Kortex abgeleitet werden können. Gemessen wird die Latenz, die für die Verarbeitung eines visuellen Stimulus benötigt wird. Eine Störung in der Signalverarbeitung äußert sich in einer verzögerten Latenz oder abweichenden Wellenform.

Analog zur RGZ-Degeneration beim Glaukom ist das Absterben von Nervenzellen das Hauptcharakteristikum vieler anderer schwerer und klinisch relevanter neurodegenerativer Erkrankungen des ZNS. Auch hier liegt eine eingeschränkte intrinsische Kapazität zum Zellersatz bzw. zur Zellreparatur vor. Der anatomische Aufbau der Retina ist jedoch weitaus einfacher als der des Gehirns. Auch die kleine Größe des Auges und die geringe Dicke der Netzhaut sind für therapeutische Interventionen von Vorteil, da sie den Einsatz einer nur kleinen Menge eines Therapeutikums erfordert. Als durch die Blut-Retina-Schranke isoliertes Kompartiment ist bei lokalen intraokulären Applikationen von Therapeutika zudem das Risiko von systemischen Nebenwirkungen gemindert. Berücksichtigt man weiterhin die Gegebenheit, dass nicht nur der morphologische Erhalt von Nervenzellen, sondern auch die funktionelle Integration in das erkrankte Nervengewebe das primäre Ziel therapeutischer Interventionen ist, stellt das Gehirn mit einem hoch organisierten sowie einem stark und eng verknüpften neuronalen Netzwerk eine größere Herausforderung dar als die Netzhaut. So werden degenerative Neuropathien und ihre Therapien häufig zunächst in einem ersten Schritt an der Netzhaut etabliert und untersucht. Durch die gute Zugänglichkeit des Sehnervs im Retroorbitalraum ist eine komplette und damit reproduzierbare Axotomie aller Nervenfasern möglich. Durch die räumliche Nähe der Zellkörper der RGZ an den intravitrealen Raum ist außerdem eine gute Verfügbarkeit von intravitreal applizierten Therapeutika gewährleistet. Entscheidend ist auch, dass die morphologische und funktionelle Organisation der Netzhaut gut untersucht und verstanden ist. Dieses Wissen erlaubt eine detaillierte Evaluation der Interaktionen transplanteder Zellen mit dem Empfängergewebe und eine genaue Analyse von möglichen Therapieerfolgen. Auch sind die Methoden der Augenchirurgie, wie die Durchführung intraokulärer Injektionen, das Einsetzen von Linsen, die retinale Lasertherapie oder die intraokuläre Implantation von Fremdewebe etabliert. All diese Erkenntnisse zusammengenommen zeigen, dass die Netzhaut ein ideales Gewebe für

eine initiale Entwicklung und Erprobung von Therapieansätzen für neurodegenerative Erkrankungen darstellt.

6. Literaturverzeichnis

Ader, M., M. Schachner, et al. (2004). "Integration and differentiation of neural stem cells after transplantation into the dysmyelinated central nervous system of adult mice." Eur J Neurosci 20(5): 1205-1210.

Aguayo, A. J., M. Rasminsky, et al. (1991). "Degenerative and regenerative responses of injured neurons in the central nervous system of adult mammals." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 331(1261): 337-343.

Ahmed, Z., H. Kalinski, et al. (2011). "Ocular neuroprotection by siRNA targeting caspase-2." Cell Death Dis 2: e173.

Airaksinen, M. S. and M. Saarma (2002). "The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value." Nat Rev Neurosci 3(5): 383-394.

Akerud, P., J. M. Canals, et al. (2001). "Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease." J Neurosci 21(20): 8108-8118.

Allcutt, D., M. Berry, et al. (1984). "A quantitative comparison of the reactions of retinal ganglion cells to optic nerve crush in neonatal and adult mice." Brain Res 318(2): 219-230.

Altman, J. and G. D. Das (1965). "Post-natal origin of microneurons in the rat brain." Nature 207(5000): 953-956.

Anderson, D. R. (2003). "Collaborative normal tension glaucoma study." Curr Opin Ophthalmol 14(2): 86-90.

Anderson, D. R. and A. Hendrickson (1974). "Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve." Invest Ophthalmol 13(10): 771-783.

Anderson, M. G., R. S. Smith, et al. (2002). "Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice." Nat Genet 30(1): 81-85.

Arnhold, S., H. Klein, et al. (2004). "Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space." Invest Ophthalmol Vis Sci 45(12): 4251-4255.

Arvidsson, A., T. Collin, et al. (2002). "Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke." Nat Med 8(9): 963-970.

Barde, Y. A. (1989). "Trophic factors and neuronal survival." Neuron 2(6): 1525-1534.

Bartsch, U., C. E. Bandtlow, et al. (1995). "Lack of evidence that myelin-associated glycoprotein is a major inhibitor of axonal regeneration in the CNS." Neuron 15(6): 1375-1381.

Bartsch, U., S. Bartsch, et al. (1992). "Immunohistological Localization of Tenascin in the Developing and Lesioned Adult Mouse Optic Nerve." Eur J Neurosci 4(4): 338-352.

Beltran, W. A., Q. Zhang, et al. (2003). "Cloning, mapping, and retinal expression of the canine ciliary neurotrophic factor receptor alpha (CNTFRalpha)." Invest Ophthalmol Vis Sci 44(8): 3642-3649.

Berkelaar, M., D. B. Clarke, et al. (1994). "Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats." J Neurosci 14(7): 4368-4374.

Blenkinsop, T. A., B. Corneo, et al. (2012). "Ophthalmologic stem cell transplantation therapies." Regen Med 7(6 Suppl): 32-39.

Bull, N. D., T. V. Johnson, et al. (2008). "Stem cells for neuroprotection in glaucoma." Prog Brain Res 173: 511-519.

Butt, Z., C. O'Brien, et al. (1997). "Color Doppler imaging in untreated high- and normal-pressure open-angle glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci 38(3): 690-696.

Chaudhry, G. R., C. Fecek, et al. (2009). "Fate of embryonic stem cell derivatives implanted into the vitreous of a slow retinal degenerative mouse model." Stem Cells Dev 18(2): 247-258.

Cheng, L., P. Sapieha, et al. (2002). "TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo." J Neurosci 22(10): 3977-3986.

Conti, L., S. M. Pollard, et al. (2005). "Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell." PLoS Biol 3(9): e283.

Crigler, L., R. C. Robey, et al. (2006). "Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis." Exp Neurol 198(1): 54-64.

Cui, Q. and A. R. Harvey (1995). "At least two mechanisms are involved in the death of retinal ganglion cells following target ablation in neonatal rats." J Neurosci 15(12): 8143-8155.

Cui, Q. and A. R. Harvey (2000). "CNTF promotes the regrowth of retinal ganglion cell axons into murine peripheral nerve grafts." Neuroreport 11(18): 3999-4002.

Danesh-Meyer, H. V. (2011). "Neuroprotection in glaucoma: recent and future directions." Curr Opin Ophthalmol 22(2): 78-86.

David, S. and A. J. Aguayo (1985). "Axonal regeneration after crush injury of rat central nervous system fibres innervating peripheral nerve grafts." J Neurocytol 14(1): 1-12.

Di Polo, A., L. J. Aigner, et al. (1998). "Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Muller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells." Proc Natl Acad Sci U S A 95(7): 3978-3983.

Ekstrom, C. (2010). "Risk factors for incident open-angle glaucoma: a population-based 20-year follow-up study." Acta Ophthalmol.

Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature 292(5819): 154-156.

Flachsbarth, K., K. Kruszewski, et al. (2014). "Neural stem cell-based intraocular administration of ciliary neurotrophic factor attenuates the loss of axotomized ganglion cells in adult mice." Invest Ophthalmol Vis Sci 55(11): 7029-7039.

Gage, F. H., J. Ray, et al. (1995). "Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS." Annu Rev Neurosci 18: 159-192.

Garcia, M., V. Forster, et al. (2003). "In vivo expression of neurotrophins and neurotrophin receptors is conserved in adult porcine retina in vitro." Invest Ophthalmol Vis Sci 44(10): 4532-4541.

Gash, D. M., Z. Zhang, et al. (2005). "Trophic factor distribution predicts functional recovery in parkinsonian monkeys." Ann Neurol 58(2): 224-233.

Gregory-Evans, K., F. Chang, et al. (2009). "Ex vivo gene therapy using intravitreal injection of GDNF-secreting mouse embryonic stem cells in a rat model of retinal degeneration." Mol Vis 15: 962-973.

Hendrickx, K. H., A. van den Enden, et al. (1994). "Cumulative incidence of patients with disc hemorrhages in glaucoma and the effect of therapy." Ophthalmology 101(7): 1165-1172.

Herzog, K. H. and C. S. von Bartheld (1998). "Contributions of the optic tectum and the retina as sources of brain-derived neurotrophic factor for retinal ganglion cells in the chick embryo." J Neurosci 18(8): 2891-2906.

Horner, P. J. and F. H. Gage (2000). "Regenerating the damaged central nervous system." Nature 407(6807): 963-970.

Jabs, T. (1999). "Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals." Biochem Pharmacol 57(3): 231-245.

Jelsma, T. N., H. H. Friedman, et al. (1993). "Different forms of the neurotrophin receptor trkB mRNA predominate in rat retina and optic nerve." J Neurobiol 24(9): 1207-1214.

Jiang, C., M. J. Moore, et al. (2007). "Intravitreal injections of GDNF-loaded biodegradable microspheres are neuroprotective in a rat model of glaucoma." Mol Vis 13: 1783-1792.

Johnson, T. V., N. D. Bull, et al. (2010). "Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci 51(4): 2051-2059.

Jung, G., J. Sun, et al. (2013). "Genetically modified neural stem cells for a local and sustained delivery of neuroprotective factors to the dystrophic mouse retina." Stem Cells Transl Med 2(12): 1001-1010.

- Kafri, T., U. Blomer, et al. (1997). "Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors." Nat Genet 17(3): 314-317.
- Kass, M. A., D. K. Heuer, et al. (2002). "The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma." Arch Ophthalmol 120(6): 701-713; discussion 829-730.
- Klocker, N., F. Braunling, et al. (1997). "In vivo neurotrophic effects of GDNF on axotomized retinal ganglion cells." Neuroreport 8(16): 3439-3442.
- Koeberle, P. D. and A. K. Ball (1998). "Effects of GDNF on retinal ganglion cell survival following axotomy." Vision Res 38(10): 1505-1515.
- Kurozumi, K., K. Nakamura, et al. (2004). "BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model." Mol Ther 9(2): 189-197.
- Lambiase, A., L. Aloe, et al. (2009). "Experimental and clinical evidence of neuroprotection by nerve growth factor eye drops: Implications for glaucoma." Proc Natl Acad Sci U S A.
- Levkovitch-Verbin, H., H. A. Quigley, et al. (2002). "Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats." Invest Ophthalmol Vis Sci 43(2): 402-410.
- Libby, R. T., Y. Li, et al. (2005). "Susceptibility to neurodegeneration in a glaucoma is modified by Bax gene dosage." PLoS Genet 1(1): 17-26.
- Lin, L. F., D. H. Doherty, et al. (1993). "GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons." Science 260(5111): 1130-1132.
- Lindqvist, N., P. Peinado-Ramonn, et al. (2004). "GDNF, Ret, GFRalpha1 and 2 in the adult rat retino-tectal system after optic nerve transection." Exp Neurol 187(2): 487-499.
- Lorber, B., M. Berry, et al. (2005). "Lens injury stimulates adult mouse retinal ganglion cell axon regeneration via both macrophage- and lens-derived factors." Eur J Neurosci 21(7): 2029-2034.
- Lu, X. and T. Hagg (1997). "Glial cell line-derived neurotrophic factor prevents death, but not reductions in tyrosine hydroxylase, of injured nigrostriatal neurons in adult rats." J Comp Neurol 388(3): 484-494.
- Lucas, D. R. and J. P. Newhouse (1957). "The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina." AMA Arch Ophthalmol 58(2): 193-201.
- Malhotra, A., F. J. Minja, et al. (2011). "Ocular anatomy and cross-sectional imaging of the eye." Semin Ultrasound CT MR 32(1): 2-13.

Mansour-Robaey, S., D. B. Clarke, et al. (1994). "Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells." Proc Natl Acad Sci U S A 91(5): 1632-1636.

Matheson, C. R., J. Wang, et al. (1997). "Long-term survival effects of GDNF on neonatal rat facial motoneurons after axotomy." Neuroreport 8(7): 1739-1742.

Medeiros, F. A., P. A. Sample, et al. (2003). "Corneal thickness measurements and visual function abnormalities in ocular hypertensive patients." Am J Ophthalmol 135(2): 131-137.

Miyazaki, H., Y. Okuma, et al. (1999). "Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against delayed neuronal death after transient forebrain ischemia in rats." Neuroscience 89(3): 643-647.

Moretto, G., R. Y. Xu, et al. (1994). "Co-expression of mRNA for neurotrophic factors in human neurons and glial cells in culture." J Neuropathol Exp Neurol 53(1): 78-85.

Morrison, J. C., E. C. Johnson, et al. (1999). "Microvasculature of the rat optic nerve head." Invest Ophthalmol Vis Sci 40(8): 1702-1709.

Morrison, J. C., C. G. Moore, et al. (1997). "A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage." Exp Eye Res 64(1): 85-96.

Nadal-Nicolas, F. M., M. Jimenez-Lopez, et al. (2009). "Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas." Invest Ophthalmol Vis Sci 50(8): 3860-3868.

Nakatomi, H., T. Kuriu, et al. (2002). "Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors." Cell 110(4): 429-441.

Naldini, L., U. Blomer, et al. (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." Science 272(5259): 263-267.

Nathan, J. (2000). "Hippocrates to Duke-Elder: an overview of the history of glaucoma." Clin Exp Optom 83(3): 116-118.

Nosrat, C. A., A. Tomac, et al. (1996). "Cellular expression of GDNF mRNA suggests multiple functions inside and outside the nervous system." Cell Tissue Res 286(2): 191-207.

Oppenheim, R. W. (1991). "Cell death during development of the nervous system." Annu Rev Neurosci 14: 453-501.

Oppenheim, R. W., L. J. Houenou, et al. (1995). "Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF." Nature 373(6512): 344-346.

Otori, Y., S. Shimada, et al. (1997). "Expression of c-fos and c-jun mRNA following transient retinal ischemia: an approach using ligation of the retinal central artery in the rat." Surv Ophthalmol 42 Suppl 1: S96-104.

- Otteson, D. C. and P. F. Hitchcock (2003). "Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration." Vision Res 43(8): 927-936.
- Pachnis, V., B. Mankoo, et al. (1993). "Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis." Development 119(4): 1005-1017.
- Peachey, N. S., D. J. Green, et al. (1993). "Ocular ischemia and the effects of allopurinol on functional recovery in the retina of the arterially perfused cat eye." Invest Ophthalmol Vis Sci 34(1): 58-65.
- Phillips, W., A. Michell, et al. (2009). "Animal models of neurodegenerative diseases." Methods Mol Biol 549: 137-155.
- Pollard, S. M., L. Conti, et al. (2006). "Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain." Cereb Cortex 16 Suppl 1: i112-120.
- Pressmar, S., M. Ader, et al. (2001). "The fate of heterotopically grafted neural precursor cells in the normal and dystrophic adult mouse retina." Invest Ophthalmol Vis Sci 42(13): 3311-3319.
- Quigley, H. A., E. M. Addicks, et al. (1981). "Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage." Arch Ophthalmol 99(4): 635-649.
- Quigley, H. A. and A. T. Broman (2006). "The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020." Br J Ophthalmol 90(3): 262-267.
- Quigley, H. A., R. W. Flower, et al. (1980). "The mechanism of optic nerve damage in experimental acute intraocular pressure elevation." Invest Ophthalmol Vis Sci 19(5): 505-517.
- Quigley, H. A., R. M. Hohman, et al. (1983). "Morphologic changes in the lamina cribrosa correlated with neural loss in open-angle glaucoma." Am J Ophthalmol 95(5): 673-691.
- Quigley, H. A., S. J. McKinnon, et al. (2000). "Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats." Invest Ophthalmol Vis Sci 41(11): 3460-3466.
- Ramón y Cajal, S. and R. M. May (1928). Degeneration and regeneration of the nervous system. Oxford
London, Oxford University Press ;
Humphrey Milford.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science 255(5052): 1707-1710.
- Rudzinski, M., T. P. Wong, et al. (2004). "Changes in retinal expression of neurotrophins and neurotrophin receptors induced by ocular hypertension." J Neurobiol 58(3): 341-354.

Sanchez-Migallon, M. C., F. M. Nadal-Nicolas, et al. (2011). "Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells." Exp Eye Res 92(4): 260-267.

Sariola, H. and M. Saarma (2003). "Novel functions and signalling pathways for GDNF." J Cell Sci 116(Pt 19): 3855-3862.

Sasaki, M., C. Radtke, et al. (2009). "BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury." J Neurosci 29(47): 14932-14941.

Schmeer, C., G. Straten, et al. (2002). "Dose-dependent rescue of axotomized rat retinal ganglion cells by adenovirus-mediated expression of glial cell-line derived neurotrophic factor in vivo." Eur J Neurosci 15(4): 637-643.

Schwartz, M. and E. Yoles (2000). "Self-destructive and self-protective processes in the damaged optic nerve: implications for glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci 41(2): 349-351.

Shu, X., Q. Meng, et al. (2013). "Treatment of aganglionic megacolon mice via neural stem cell transplantation." Mol Neurobiol 48(3): 429-437.

Smith, R. S., A. Zabaleta, et al. (2001). "The mouse anterior chamber angle and trabecular meshwork develop without cell death." BMC Dev Biol 1: 3.

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

Sposato, V., M. G. Bucci, et al. (2008). "Reduced NGF level and TrkA protein and TrkA gene expression in the optic nerve of rats with experimentally induced glaucoma." Neurosci Lett 446(1): 20-24.

Sun, Q., V. E. Ooi, et al. (2001). "N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in adult rat retina is antagonized by single systemic injection of MK-801." Exp Brain Res 138(1): 37-45.

Szabo, M. E., M. T. Droy-Lefaix, et al. (1991). "Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina. Demonstration of a free radical-mediated mechanism." Invest Ophthalmol Vis Sci 32(5): 1471-1478.

Takahashi, M., T. D. Palmer, et al. (1998). "Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina." Mol Cell Neurosci 12(6): 340-348.

Taupin, P. and F. H. Gage (2002). "Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals." J Neurosci Res 69(6): 745-749.

Temple, S. (1989). "Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture." Nature 340(6233): 471-473.

- Thanos, S. and R. Naskar (2004). "Correlation between retinal ganglion cell death and chronically developing inherited glaucoma in a new rat mutant." Exp Eye Res 79(1): 119-129.
- Vidal-Sanz, M., G. M. Bray, et al. (1987). "Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat." J Neurosci 7(9): 2894-2909.
- Vorwerk, C. K., S. A. Lipton, et al. (1996). "Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine." Invest Ophthalmol Vis Sci 37(8): 1618-1624.
- Wang, S., S. Girman, et al. (2008). "Long-term vision rescue by human neural progenitors in a rat model of photoreceptor degeneration." Invest Ophthalmol Vis Sci 49(7): 3201-3206.
- Ward, M. S., A. Khoobehi, et al. (2007). "Neuroprotection of retinal ganglion cells in DBA/2J mice with GDNF-loaded biodegradable microspheres." J Pharm Sci 96(3): 558-568.
- Weber, K., U. Bartsch, et al. (2008). "A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis." Mol Ther 16(4): 698-706.
- Weber, K., U. Mock, et al. (2010). "Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis." Gene Ther 17(4): 511-520.
- Wilkins, A., K. Kemp, et al. (2009). "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro." Stem Cell Res 3(1): 63-70.
- Yan, Q., J. Wang, et al. (1999). "Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF)." J Neurobiol 38(3): 382-390.

7. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
µg	Mikrogramm
ml	Mikroliter
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CMV	Cytomegalovirus
DNA	Deoxyribonucleic acid
dpl	days post lesion
GFP	green fluorescent protein
EGF	Epidermal Growth Factor
ESZ	Embryonale Stammzelle
FACS	fluorescence-activated cell sorting
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
IOD	Intraokulärer Druck
LC	Lamina cribrosa
LNGFR	Low affinity nerve growth factor receptor
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NF	Neurotropher Faktor

NSZ	Neurale Stammzelle(n)
NT	Neurotrophine
Neo	Neomycin
ON	Optischer Nerv
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potentia hydrogenii
RGZ	Retinale Ganglienzelle(n)
RT	Raumtemperatur
SZ	Stammzelle(n)
Trk	Tropomyosin Rezeptor-Kinase
Zeo	Zeomycin

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Udo Bartsch nennen. Ihm danke ich in besonderem Maße. Nicht nur für die Überlassung eines hochinteressanten Themas, die Einführung in sowie die weitere Begleitung durch das Wissenschaftliche Arbeiten sowie die jederzeit verfügbare Hilfestellung, sondern vor allem für seinen außergewöhnlich leidenschaftlichen und damit hochinspirierenden Einsatz für die Forschung. Auch für das hohe Maß an Freiheit und Flexibilität bin ich sehr dankbar, denn dies war wesentlich für ein erfolgreiches und zeitgerechtes Abschließen meines Studiums der Humanmedizin. Herrn Prof. Gisbert Richard, möchte ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken. Auch danke ich für die herzliche Aufnahme durch das Forschungsteam. Insbesondere für die gute Stimmung und die schönen Gespräche, neben der manchmal langwierigen Tätigkeit. Mein besonderer Dank gilt hierbei Kai Flachsbarth, der mir stets mit Rat und Tat zur Hilfe bereit stand und nie die Fassung verlor. Insbesondere Sabine Helbing, Steafanie Schlichting sowie Wanda Jankowiak danke ich für die große Unterstützung in der Zellkultur bzw. beim Westernblot.

Ein unendlicher Dank gilt meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung und das Setzen der Grundbausteine für meine weitere Zukunft.

9. Curriculum vitae

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: