

Aus der Klinik für kleine Haustiere
(Ophthalmologie)
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Potentielle Therapie neurodegenerativer Retinopathien über die
Aktivierung des BDNF-TrkB-Signalweges mittels modifizierten
Aptamers**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von:

Evangelia Lilou
Tierärztin
aus Serres, Griechenland

Berlin, 2024

Journal-Nr.: 4404

**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Corinna Eule

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Sonja Bröer

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

retinopathy

retina

aptamers

oligonucleotides

retinoblastoma

brain-derived neutrophic factor

signal transduction

Tag der Promotion: 15.02.2024

*meinem geliebten Mann Kostas,
unseren Kindern Iliana und Antonis
...und
meinen Eltern für ihre anhaltende Unterstützung über all die Jahre*

Inhaltsverzeichnis

Abbildungen.....	VI
Tabellen.....	VII
Abkürzungen	VIII
1. Einleitung.....	1
2. Literatur	2
2.1 Anatomie des Auges	2
2.2 Aufbau der Retina	4
2.3 Degeneration der Retina	6
2.3.1 Glaukom	7
2.3.2 <i>Retinitis pigmentosa</i>	9
2.4 Neue Therapieansätze	12
2.4.1 Wachstumsfaktoren als Therapieoption	12
2.5 Der BDNF-TrkB-Signalweg	13
2.6 Therapeutische Versuche mit BDNF	14
2.7 Aptamere.....	16
2.8 Forschungsansatz	17
2.9 Schweineauge für die Organkultur.....	18
2.10 CoCl ₂ Degenerationsmodell	19
3. Material und Methoden	20
3.1 Verbrauchsmaterial für die Zell- und Organkultur	20
3.2 Assays & Kits	21
3.3 Geräte	21
3.4 Antikörper.....	23
3.5 Primer	24
3.6 Aptamer.....	25
3.7 Zelllinien	25
3.8 Kultivierung von ARPE-19-Zellen	26
3.9 Kultivierung von primären dissoziierten Retinazellen	26
3.10 Nachweis der Bindung des TrkB-Aptamers an primäre dissoziierte Zellen	27
3.11 Isolierung und Kultivierung von Retinaexplantate	27
3.12 Kultivierung von Retinaexplantaten in Inserts	28
3.13 Toxikologie	29
3.13.1 MTS-Assay	29
3.13.2 Kristallviolett-färbung.....	30
3.14 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	31
3.14.1 cDNA-Synthese	31

3.14.2 Quantifizierung.....	32
3.14.3 qRT-PCR	32
3.15 Western Blot	35
3.16 Kryoschnitte	38
3.17 Immunfluoreszenz (IF).....	38
3.18 Statistische Auswertung	38
4. Ergebnisse.....	39
4.1 Biokompatibilität des TrkB-Aptamers.....	39
4.2 Verweildauer des TrkB-Aptamers.....	44
4.3 Aktivierung des TrkB-Signalwegs bei Retinaexplantaten.....	46
4.4 Spezifität des TrkB-Aptamers	48
4.5 TrkB-Aptamer hat einen neuroprotektiven Effekt nach längerer Inkubationszeit	51
4.6 Das TrkB-Aptamer hat eine neuroprotektive Wirkung auf CoCl ₂ -geschädigte retinale Explantate.....	52
5. Diskussion	63
5.1 Überblick der Ergebnisse	63
5.2 Wachstumsfaktoren als Therapeutika	66
5.3 BDNF-Wachstumsfaktor in der Ophthalmologie	67
5.4 Aptamer als Therapeutikum.....	69
5.5 Limitationen des Verfahrens	71
6. Zusammenfassung	72
7. Summary	73
8. Literaturverzeichnis.....	74
9. Publikationverzeichnis	83
10. Danksagung.....	84
11. Finanzierungsquellen.....	85
12. Interessenkonflikte.....	85
13. Selbstständigkeitserklärung	85

Abbildungen

Abbildung 1: Aufbau des menschlichen Auges	4
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Retina	5
Abbildung 3: Symptome der Retinitis pigmentosa	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung der BDNF/TrkB-Rezeptor-Signalkaskade und ihrer nachgeschalteten zellulären Effekte	14
Abbildung 5: Neuroprotektiver Effekt von BDNF auf RGZ (direkter Effekt) sowie auf die Müller-Gliazellen (indirekter Effekt)	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung des TrkB-Aptamers	25
Abbildung 7: Vorbereitung der Retinaexplantate	28
Abbildung 8: Das TrkB-Aptamer besitzt keine toxischen Effekte auf die ARPE-19-Zellen und die primären dissoziierten Retinazellen	40
Abbildung 9: Die Behandlung von retinalen Explantaten mit 200nM TrkB-Aptamer führt zu einem signifikanten Anstieg mRNA-Expression der Zellmarker	41
Abbildung 10: mRNA-Expression spezifischer Marker nach Behandlung mit TrkB-Aptamer oder CoCl_2 der retinalen Explantate	42
Abbildung 11: TrkB Behandlung induzierte einen Anstieg der TUBB3-Expression in Retinaexplantaten	43
Abbildung 12: Adhärenz des TrkB-Aptamers an primären dissoziierten retinalen Zellen	45
Abbildung 13: Adhärenz des TrkB-Aptamers auf Retinaexplantaten	46
Abbildung 14: Behandlung mit dem TrkB-Aptamer führt zur Aktivierung des TrkB-Signalweges bei Retinaexplantaten	47
Abbildung 15: Nachweis der spezifischen Bindung des TrkB-Aptamers mittels PCR	49
Abbildung 16: Im Gegensatz zur Inkubation mit BDNF erhöht das TrkB-Aptamer die Menge an phosphoryliertem ERK (pERK)	49
Abbildung 17: Nachweis der spezifischen Bindung des TrkB-Aptamers in Retina mittels Immunfluoreszenz	50
Abbildung 18: Die Langzeitinkubation retinaler Explantate mit dem TrkB-Aptamer resultierte in einem stärkerem neuroprotektiven Effekt als die Inkubation mit BDNF	52
Abbildung 19: Versuchsaufbau	53
Abbildung 20: Bei mit CoCl_2 -geschädigten retinalen Explantaten hatte die anschließende Inkubation mit dem TrkB-Aptamer den stärksten neuroprotektiven Effekt	55
Abbildung 21: Die Behandlung mit TrkB-Aptamer an CoCl_2 -geschädigten retinalen Explantaten zeigte einen stärkeren neuroprotektiven Effekt des TrkB-Aptamers auf Müllerzellen im Vergleich zur Behandlung mit BDNF	57
Abbildung 22: Neuroprotektiver Effekt des TrkB-Aptamers nach CoCl_2 induzierter Schädigung mittels Immunofluoreszenz-Mosaik-Aufnahmen	60
Abbildung 23: Neuroprotektiver Effekt des TrkB-Aptamers nach CoCl_2 induzierter Schädigung mittels Western Blot	62
Abbildung 24: Kompensation des CoCl_2 induzierten Schadens durch die TrkB-Aptamer Behandlung nach dem Nachweis von Interleukin (IL-1beta).	63

Tabellen

Tabelle 1: Anatomische Unterschiede im hinteren Auge zwischen Schweine- und Menschaugen	19
Tabelle 2: Verwendete Antikörper, die im Western Blot bei den Retinaexplantaten verwendet werden	23
Tabelle 3: Verwendete Antikörper, die in der Immunhistochemie bei den Retinaexplantaten verwendet werden	23
Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Primer, die im PCR bei den Retinaexplantaten verwendet werden	24
Tabelle 5: Zielproteine der verwendeten Erstantikörper, die im Western Blot bei den Retinaexplantaten verwendet werden	37
Tabelle 6: Verdünnungen von primären und sekundären Antikörpern, die im Western Blot bei den Retinaexplantaten verwendet werden	37

Abkürzungen

AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
BDNF	Vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (<i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i>)
bFGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovines Serum Albumin</i>)
CNTF	Ziliärer neurotropher Faktor (<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>)
ERG	Elektroretinogramm
EWG	Akutes Winkelblockglaukom
GDNF	Gliazellen abgeleiteter neurotropher Faktor (<i>Glial cell line-derived Neurotrophic Factor</i>)
GFAP	Saures Gliafaserprotein (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
HSP70	Hitzeschockprotein 70 (<i>Heat shock protein 70</i>)
IL-1-beta	Interleukin 1 β
IOD	Intraokulärer Druck
Math5	Atonaler bHLH-Transkriptionsfaktor 7 (<i>atonal bHLH transcription factor 7</i>)
DR	Diabetische Retinopathie
VEGF	Vaskuläre Endothelialer Wachstumsfaktor (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
NGF	Nervenwachstumsfaktor (<i>Nerve Growth Factor</i>)

ZNS	Zentralnervensystem
p21(oder CDK-Inhibitor 1)	Cyclin-abhängige Kinase (<i>Cyclin Dependent Kinase</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
POWG	Primäres Offenwinkelglaukom
RGZ	Retinale Ganglienzellen
RP	Retinitis Pigmentosa
rtPCR	Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (<i>real-time Polymerase Chain Reaction</i>)
TrkB	Tyrosinkinase-Rezeptor B
TUBB3	β -III-Tubulin

1. Einleitung

Degenerationsprozesse der Retina, wie sie unter anderem beim Glaukom oder der Retinitis pigmentosa auftreten, resultieren beim Glaukom im Verlust retinaler Ganglienzellen. Auch Müllerzellen und Astrozyten können hiervon betroffen sein. Bei Retinitis pigmentosa münden diese Degenerationsprozesse in der Zerstörung von Photorezeptoren und können bis zur Erblindung führen. Die Wachstumsfaktor-basierte Therapie ist ein vielfach untersuchter Ansatz, um eine Verlangsamung oder den Stillstand der Sehzelldegeneration zu erzielen. BDNF ist ein vielversprechender neurotropher Wachstumsfaktor, der das Überleben bestehender Neuronen und die Wachstumsförderung neuer Neuronen und Synapsen unterstützt. BDNF entfaltet seine Wirkung über die Aktivierung der TrkB-Signalkaskade. Durch ein bereits publiziertes und getestetes von der Arbeitsgruppe von Huang (Huang et al. 2017) Aptamer, welches spezifisch an den TrkB-Rezeptor bindet, soll in der vorliegenden Arbeit der neuroprotektive Effekt von BDNF imitiert werden, um darauf aufbauend eine mögliche Therapiestrategie für die oben genannten Krankheiten zu entwickeln. Die erfolgreiche Aktivierung des BDNF/TrkB-Signalweges durch die Bindung des TrkB-Aptamers adressiert spezifisch die gewünschten Zellen, wirkt beschützend und reduziert somit ungewünschte Wirkungen, die bei der BDNF-Therapie auftreten können. Dabei erfolgt die Ausschließung der Schädlichkeit des TrkB-Aptamers sowohl an primären dissoziierten retinalen Zellen als auch im Organmodell (Retinaexplantaten). In einem weiteren Schritt werden die Verweildauer sowie die Bindungseffizienz des TrkB-Aptamers an primären dissoziierten retinalen Zellen sowie an Retinaexplantaten getestet. Dabei wird grundlegend von der bereits publizierten 200nM Konzentration (Huang et al. 2017) als die am besten geeignete Ausgangskonzentration von TrkB-Aptamer ausgegangen. Parallel soll die erfolgreiche Aktivierung des BDNF/TrkB-Signalweges durch die Bindung des Aptamers getestet werden. Der Erfolg der Aktivierung des BDNF/TrkB-Signalweges wird über den Nachweis von den entsprechenden *downstream* Molekülen (*HSP70*, *CNTF*, *bFGF*, *GDNF*) kontrolliert. Weiter erfolgt die Überprüfung der Spezifität des TrkB-Aptamers mithilfe eines unspezifischen Kontroll-Aptamers (Ko-Apt). Das Ko-Apt kann nicht an den TrkB-Rezeptor binden, da es zwar die gleiche Länge und die gleichen chemischen Modifikationen besitzt, jedoch eine andere Sequenz hat. In einem nächsten Schritt sollen

die Retinaexplantate über einen längeren Zeitraum mit dem TrkB-Aptamer inkubiert werden mit dem Ziel zu überprüfen, über welchen Zeitraum der gewünschte Effekt anhält. Anschließend soll der neuroprotektive Effekt des TrkB-Aptamers in einem retinalen Schädigungsmodell – welches zuvor mit einem bereits etablierten CoCl₂ induziert worden ist – getestet werden. Letztlich zielt die vorliegende Arbeit auf die Generierung neuer Daten für mögliche Therapieoptionen bei degenerativen Retinaerkrankungen ab.

2. Literatur

2.1 Anatomie des Auges

Das menschliche Auge ist das Sinnesorgan des Sehens, an das verschiedenste Anforderungen gestellt werden. Der – im Grunde als „Auge“ bezeichnete – Augapfel (*Bulbus oculi*) hat eine nahezu kugelige Form, liegt zum größten Teil in der knöchernen Augenhöhle (*Orbita*) und besteht aus drei Schichten. Die Vorderseite wird von zwei Lidern (Ober- und Unterlid) geschützt.

1) Die äußere schützende Schicht des Auges, die sich an der Vorderseite des Augapfels befindet, besteht aus:

- der Sklera (Lederhaut). Die Sklera ist der sichtbare, weiße, elastische Teil des Auges, der das Auge schützt¹.
- der Cornea (Hornhaut). Die Cornea ist ein transparentes, klares, avaskuläres Gewebe, das als strukturelle Barriere fungiert und das Auge vor Infektionen schützt. Sie funktioniert wie eine Linse, die die Hauptbrechungsrolle im Fokus des Lichts spielt².

2) Die mittlere Schicht, die als Uvea bezeichnet wird, besteht aus der Regenbogenhaut (*Iris*), der Aderhaut (*Choroidea*) und dem Ziliarkörper³.

Die Iris ist ein Teil des Auges, der für die Augenfarbe einer jeden Person verantwortlich ist. Sie hinterlässt in der Mitte eine runde Öffnung, die Pupille, um Licht durchzulassen. Die Iris hat Muskeln, die je nach den vorherrschenden Lichtverhältnissen eine Kontraktion (*Miosis*) oder eine Erweiterung (*Mydriasis*) verursachen.

Der Raum zwischen Hornhaut und Iris wird als vordere Augenkammer bezeichnet. Diese enthält das Kammerwasser, das klar ist und für die Ernährung der Linse und der Hornhaut sowie für den Augendruck verantwortlich ist. Die

hintere Augenkammer liegt zwischen der Iris und dem Glaskörper. Sie nimmt das vom Ziliarkörper produzierte Kammerwasser auf und leitet es weiter in die Vorderkammer.

Hinter der Pupille befindet sich die klare Linse, deren Krümmung schwankt, sodass sich die Lichtstrahlen auf der Netzhaut (*Retina*) bündeln. Der Ziliarkörper verändert die Form der Linse und ermöglicht dem Auge, sich auf verschiedene Objekte und Entfernungen zu fokussieren (Akkommodation), sodass sie scharf auf der Retinaebene abgebildet werden können⁴. Hinter der Linse befindet sich der gelartige Glaskörper, der zwei Drittel des Auginneren ausfüllt.

Die Aderhaut ist eine Membran zwischen Lederhaut und Netzhaut, die dank ihrer Blutgefäße Sauerstoff und Nährstoffe zur weiter innen liegenden Netzhaut transportiert.

- 3) Die innerste Schichte, die Netzhaut (*Retina*), nimmt drei Viertel der inneren Oberfläche des Auges ein und enthält die Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen). In der Peripherie der Netzhaut befinden sich die Stäbchen, die die periphere Sicht ermöglichen und für das Sehen bei Nacht verantwortlich sind. In der Mitte der Netzhaut (*Makula*) befinden sich die Zapfen, die für das detaillierte Sehen, die Farberkennung und das Sehen bei hellem Licht verantwortlich sind.

Die Rückfläche der Augenlider und der vordere Bereich des Orbitas werden von der sogenannten Bindehaut (*Konjunktiva*) bedeckt. Die Bindehaut ist eine dünne Membran, enthält sehr dünne Gefäße und ist für die Durchblutung und den zellulären Abwehrmechanismus verantwortlich⁵.

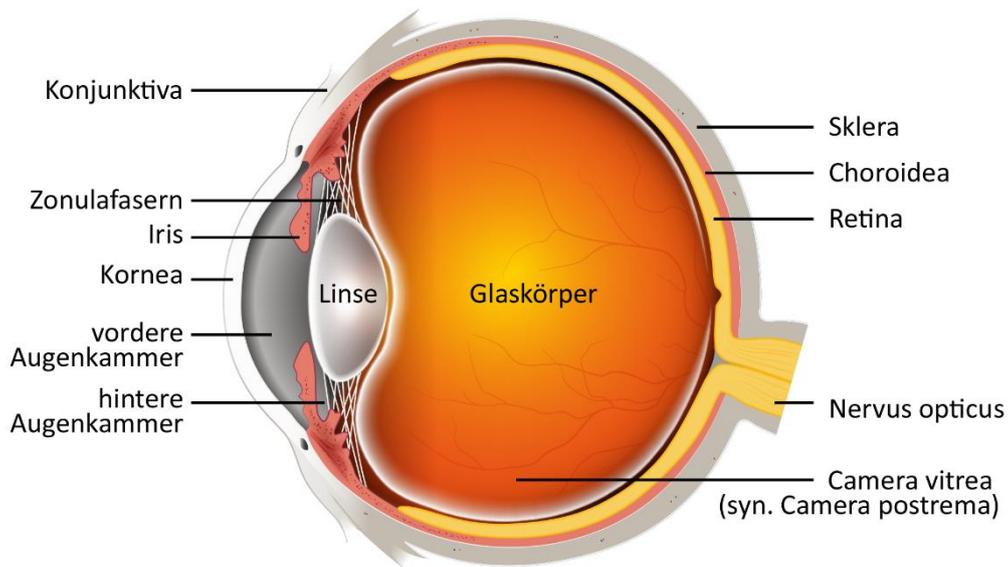


Abbildung 1: Aufbau des menschlichen Auges

(modifiziert nach Huppelsberg und Walter; Kurzlehrbuch Physiologie, Thieme, 2013)

2.2 Aufbau der Retina

Die Retina kann morphologisch und funktionell nach Lichtempfindlichkeit in zwei Teile gegliedert werden⁶:

- ***Pars optica retinae***: ist der größte Teil der Retina und besitzt die lichtempfindlichen Photorezeptoren
- ***Pars caeca retinae***: besteht nur aus Pigmentepithel und überzieht im vorderen Bereich des Auges die Rückseiten von Iris und Ziliarkörper

Der *Pars optica retinae* Abschnitt besteht wiederum aus zwei Blättern^{7,8}:

- Das äußere Blatt besteht aus einem einschichtigen Pigmentepithel (*Stratum pigmentosum*), dessen Aufgabe die Versorgung der Photorezeptoren mit Sauerstoff und Nährstoffen ist.
- Das innere Blatt ist die lichtempfindliche Schicht (*Stratum nervosum*) und besteht von außen nach innen aus den folgenden Zelltypen:
 - ◆ Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen)
 - ◆ Müllerzellen
 - ◆ Horizontalzellen
 - ◆ Bipolarzellen

- ◆ Amakrinzellen
- ◆ Ganglienzellen
- ◆ Astrozyten
- ◆ Mikrogliazellen

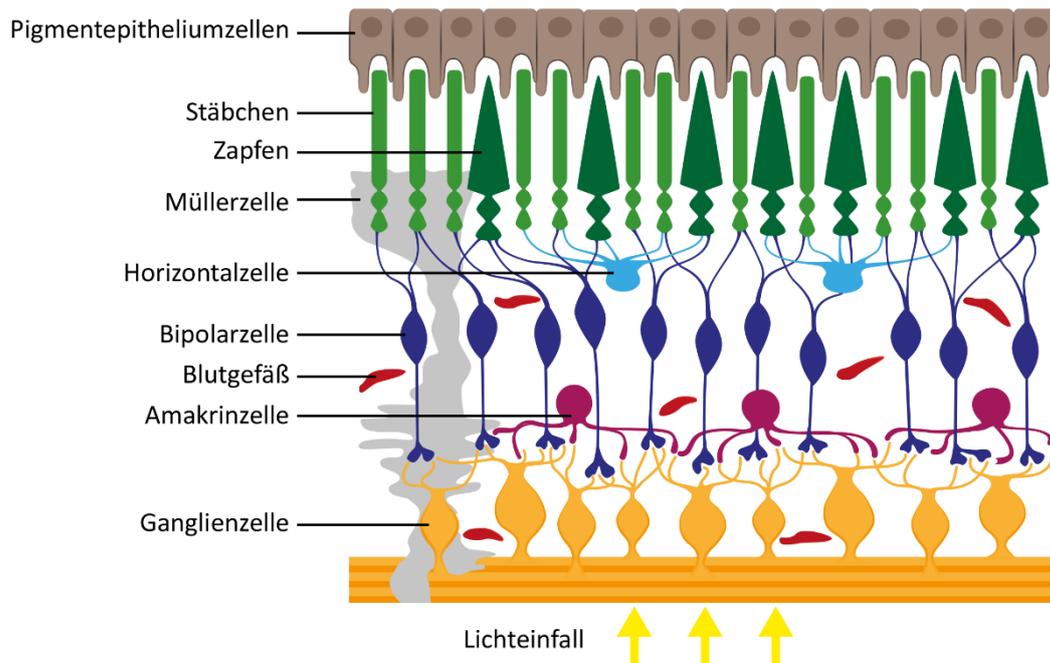


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Retina

(modifiziert nach journals.cambridge.org;)

Der Sehnerv ist die Fortsetzung der Netzhaut und besteht aus den Axonen der retinalen Ganglienzellen (RGZ). Wenn Licht in das Auge einfällt, wird in den Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) ein elektrisches Signal erzeugt. Bei Dunkelheit setzen sie permanent den Neurotransmitter Glutamat frei. Sobald ein Lichtstrahl auf die Photorezeptoren fällt, wird weniger Glutamat ausgeschüttet. Das elektrische Signal wird über die Bipolarzellen zu den nachfolgenden Ganglienzellen geleitet⁹. Die Funktion des Sehnervs besteht darin, die Informationen von den Netzhautrezeptoren als elektrische Signale aufzunehmen und über die Glutamatausschüttung in ein chemisches Signal umzuwandeln. Dies führt zum Generieren von Nervenzellimpulsen, die transportiert werden, damit die Signale in ein visuelles Bild umgewandelt werden können.

Die Bipolar- und Horizontalzellen interagieren über ihre Dendriten mit den Photorezeptoren. Die Horizontalzellen übermitteln weiter die Signale seitwärts und beeinflussen somit die Aktivität der Bipolarzellen und der Photorezeptoren. Im Gegensatz dazu wird der laufende Signalfluss von den Bipolarzellen direkt an die Photorezeptoren übertragen. Die Amakrinzellen stehen sowohl mit den Axonen der Bipolarzellen als auch mit den Dendriten der retinalen Ganglienzellen in Verbindung und können so die Übermittlung des Signals von den Bipolarzellen zu den Ganglienzellen beeinflussen⁹.

Die Müllerzellen haben eine lichtleitende Funktion. Sie leiten das Licht durch die Retina – ohne sie würde das Licht vermehrt an den Neuronen gestreut werden und die Sehschärfe wäre somit reduziert. Die Müllerzellen übernehmen außerdem in der Netzhaut wichtige Stütz- und Schutzfunktionen. Aufgrund der Aufnahme und Rückgabe von Neurotransmittern, der Aufrechterhaltung der Homöostase sowie der Blut-Netzhaut-Schranke und der Bildung von Wachstumsfaktoren spielen sie eine zentrale Rolle in der Netzhaut^{8,9}.

Astrozyten gehören zu den Gliazellen des zentralen Nervensystems und dienen nicht nur als Stützzelle für die Neuronen, sondern übernehmen verschiedene essenzielle Funktionen. So sind sie z.B. an der Errichtung und Aufrechthaltung der Blut-Hirn-Schranke und am Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten zwischen Neuronen und Blut beteiligt. Über Neurotransmitter interagieren Astrozyten und Neuronen ständig miteinander. Eine andere Art der Gliazellen sind Mikrogliazellen. Sie sind Immunzellen, die sich normalerweise im Zentralnervensystem (ZNS) befinden. Die Mikrogliazellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Interaktion zwischen dem ZNS und dem Immunsystem. Durch Phagozytose, extrazelluläre Signalübertragung und andere Funktionen sind Mikroglia ein wichtiger Mediator der Immunantwort. Sie halten die Homöostase im ZNS aufrecht und haben wichtige Auswirkungen auf die synaptische Plastizität und Neurogenese⁹.

2.3 Degeneration der Retina

In den vergangenen Jahren wurden vermehrt Studien zur Untersuchung von Retinadegeneration und Zelltod am Auge durchgeführt, die bei zahlreichen Augenerkrankungen wie Glaukom, diabetischer Retinopathie, altersbedingter Makuladegeneration und *Retinitis pigmentosa* auftreten. Eine gemeinsame Eigenschaft

dieser Krankheiten ist in der Pathophysiologie zu finden, die jeweils eine bestimmte Form von metabolischem Stress mit sich bringt, was zu einer unzureichenden Versorgung des Sehnervs und der Netzhaut mit Nährstoffen und schlussendlich zur Zellapoptose führt¹⁰.

2.3.1 Glaukom

Beim Glaukom, auch Grüner Star genannt, handelt es sich um eine häufig auftretende Augenerkrankung, bei der es zu irreversiblen Schäden des Auges bis hin zur absoluten Erblindung kommen kann, sofern nicht unmittelbare Behandlungsschritte eingeleitet werden. Beachtlich ist, dass die Erkrankung die zweithäufigste Erblindungsursache in Industrieländern darstellt.

Charakteristisch ist eine schleichende Entwicklung über einen Zeitraum von mehreren Jahren. Die Erkrankung bleibt im Anfangsstadium aufgrund mangelnder Symptome häufig unerkannt. Ein erstes Anzeichen zeigt sich durch einen erhöhten intraokulären Druck (IOD) (in der Regel über 20-22 mmHg)¹¹. Dennoch kann in seltenen Fällen auch bei einem Normaldruck Glaukom diagnostiziert werden.

Das Kammerwasser wird im Ziliarkörper produziert. Vom Ziliarkörper fließt es zunächst in die hintere Kammer und anschließend durch die Pupille in die vordere Augenkammer. Von hier leitet das Trabekelwerk Kammerwasser über den skleralen *Venensinus* (Schlemm-Kanal), welcher sich im skleralen Anteil des Kammerwinkels befindet, und den Kammerwasserabfluss fördert, in die *Skleraplexus* (Netzwerk von Blutgefäßen in der Sklera) und den allgemeinen Blutkreislauf ab¹¹. Beim gesunden Auge erzeugt der Fluss von Kammerwasser gegen Widerstand einen durchschnittlichen IOD von etwa 15 mmHg. Die Beeinträchtigung des Kammerwasserabflusses führt zu einer Erhöhung des IOD, was der zentrale Grundsatz der Mehrheit der Glaukomformen und der Glaukombehandlung ist¹². Mit der Zeit kann der IOD auf den Sehnerv zu einer chronischen, progressiven Optikusneuropathie mit charakteristischer Veränderung des Sehnervs (glaukomatöse Exkavation) und fortschreitendem Verlust der Ganglienzellen der Retina bis zu einem dauerhaften Verlust des Sehvermögens führen.

Die wichtigsten Formen von Glaukomen sind:

Offenwinkelglaukom Hierbei handelt es sich um eine chronische Form von Glaukom, die in den häufigsten Fällen auftritt^{13,14,15}. Der Winkel zwischen der Hornhaut und der Iris ist offen. Es handelt sich zudem um die am schwierigsten nachzuweisende Form des Glaukoms, da sie völlig asymptomatisch verläuft. Bei dieser Glaukomform liegt das Problem am Trabekelwerk selbst, welches seine Aufgabe, den Abfluss, nicht mehr erfüllen kann. Die erhöhte Widerstandskraft im Trabekelwerk führt zu einer reduzierten Kammerwasserresorption und damit zu einem chronischen, oftmals schmerzlosen Druckaufbau im Auge, was zur Zerstörung des Sehnervs führt^{13,16,17}. Da am Auge keine Auffälligkeiten feststellbar sind und der Verlust des Sehvermögens völlig schmerzfrei verläuft, bemerken Patienten das Auftreten der Erkrankung nicht¹³.

Engwinkelglaukom: Hier ist der Winkel zwischen der distalen Hornhaut und der Iris verengt. Dies führt zu einem reduzierten Kammerwasserabfluss und zu einem akuten Druckanstieg¹⁸. Im Gegensatz zum Offenwinkelglaukom kann die Entwicklung des Engwinkelglaukoms plötzlich auftreten und führt innerhalb weniger Stunden zu einem raschen Anstieg des Druckes. Ein Glaukomanfall ist sehr schmerzhaft, es können möglicherweise schwere Symptome – wie verschwommenes Sehen, Rötung des Auges und Übelkeit – auftreten.

Angeborenes Glaukom: Hierbei handelt es sich um eine schwerwiegende Form des Glaukoms, die bereits in den ersten vier Lebensjahren, d. h. in der frühen Kindheit, auftritt. In den meisten Fällen ist der Kammerwinkel fehlentwickelt, sodass eine Abflussstörung des Kammerwassers vorliegt.

Normaldruckglaukom: Ein Normaldruckglaukom tritt bei Menschen mit einem sehr empfindlichen Sehnerv auf. Hier können die Augeninnendruckwerte im normalen Bereich liegen. Die gesamte Ätiologie der pathologischen Veränderungen, die beim Normaldruckglaukom auftreten, ist noch unklar. Zu den beitragenden Faktoren können systemische und lokale vaskuläre Dysregulation, hämatologische Anomalien, strukturelle Anomalien und strukturelle Schwäche der *Lamina cribrosa* (Durchtrittspunkt des Sehnervs durch die Sklera) sowie genetische Faktoren gehören¹³.

Das Glaukom ist eine neurodegenerative Erkrankung, die durch die langsam fortschreitende Degeneration der Ganglienzellen der Netzhaut gekennzeichnet ist¹⁹. Die Zelltodmechanismen – wie Autophagie oder Nekrose –, die zum Glaukom führen, sind noch nicht genau bekannt. Bei einer glaukomatösen Optikusneuropathie kommt es insbesondere im Bereich der *Lamina cribrosa* zu einer Schädigung des Sehnerves. Bei erhöhtem Augeninnendruck wird die *Lamina cribrosa* posterior verdrängt und verdünnt, was einerseits zum Einklemmen des Sehnervs und der Blutgefäße und möglicherweise zu Nervenschäden führt. Andererseits führen diese morphologischen Veränderungen der Retina zum Verlust der retinalen Ganglienzellen¹⁸. Die beobachteten Veränderungen beschränken sich nicht nur auf die Axone der Ganglienzellen, sondern auch auf die Zellkörper und die Dendriten²⁰. Parallel sind die Müllerzellen und die Astrozyten betroffen²¹. Die Astrozyten und die Müllerzellen werden während der Pathogenese des Glaukoms reaktiv und sind gekennzeichnet durch morphologische Veränderungen und Expressionsänderungen^{22,23,24}. Die erhöhte Reaktivität der Müllerzellen könnte auf eine Reaktion auf durch den Augeninnendruck induzierten RGZ-Verlust zurückzuführen sein und sowohl schützende als auch schädliche Wirkungen auf Netzhautneuronen vermitteln^{25,26}. Die – aufgrund des erhöhten IOD auftretende – lokale Ischämie, die bereits erwähnten Faktoren sowie eine Vielzahl anderer Faktoren tragen einzeln oder kumulativ zur Apoptose der RGZ bei.

Die Senkung des IODs ist die einzige wirksame Therapie des Glaukoms. Die aktuellen Behandlungsmethoden (Medikamente und chirurgische Therapie) erreichen zwar eine signifikante Senkung des IOD, dies impliziert leider nicht, dass ein weiterer Zellverlust gehemmt wird.

2.3.2 *Retinitis pigmentosa*

Unter der sogenannten *Retinitis pigmentosa* (RP) (korrekterweise: *Retinopathia Pigmentosa*) werden erbliche, degenerative Erkrankungen, welche die Netzhaut betreffen, zusammengefasst. Dabei handelt es sich um unterschiedliche Erkrankungen, die sich hinsichtlich der Chromosomenanomalien, Stoffwechselstörungen sowie im klinischen Erscheinungsbild unterscheiden und dennoch alle zur Schädigung der Netzhaut und daraus resultierenden Sehstörungen führen.

In Deutschland leiden etwa 30.000 bis 40.000 Menschen an der RP, während weltweit rund 3 Millionen Menschen betroffen sind²⁷. Eine von drei- bis viertausend Personen der Allgemeinbevölkerung erkranken daran. Die Schwere der Erkrankung hängt von der Art der Vererbung ab. Dabei spielt sowohl der rezessive und dominante autosomale Erbgang als auch die geschlechtsgebundene Art eine Rolle. In Fällen, die aufgrund des rezessiven Erbgangs auftreten, schreitet die Erkrankung schneller und in einem schwerwiegenderen Ausmaß voran.

Die ersten Symptome einer RP äußern sich durch Schwierigkeiten bei der Anpassung an Dunkelheit oder Nachtblindheit und können schon in früher Kindheit auftreten. Wahrgenommen werden sie jedoch oftmals erst im zweiten oder dritten Zehntel des Lebens²⁸.

Mit zunehmendem Alter geht eine Verschlechterung der Sehbehinderung einher, sodass Einschränkungen nicht nur nachts oder bei schlechten Lichtverhältnissen, sondern jederzeit auftreten. Betroffene leiden unter einem von außen zunehmend eingeschränkten Sichtfeld bis hin zum allmählich eintretenden Verlust der peripheren Sicht. Der verbleibende Sehrest wird als „Tunnelblick“ oder „Röhrengesichtsfeld“ bezeichnet. Dabei kann das zentrale Sehvermögen über viele Jahre hinweg bestehen bleiben, aber auch verloren gehen²⁸.

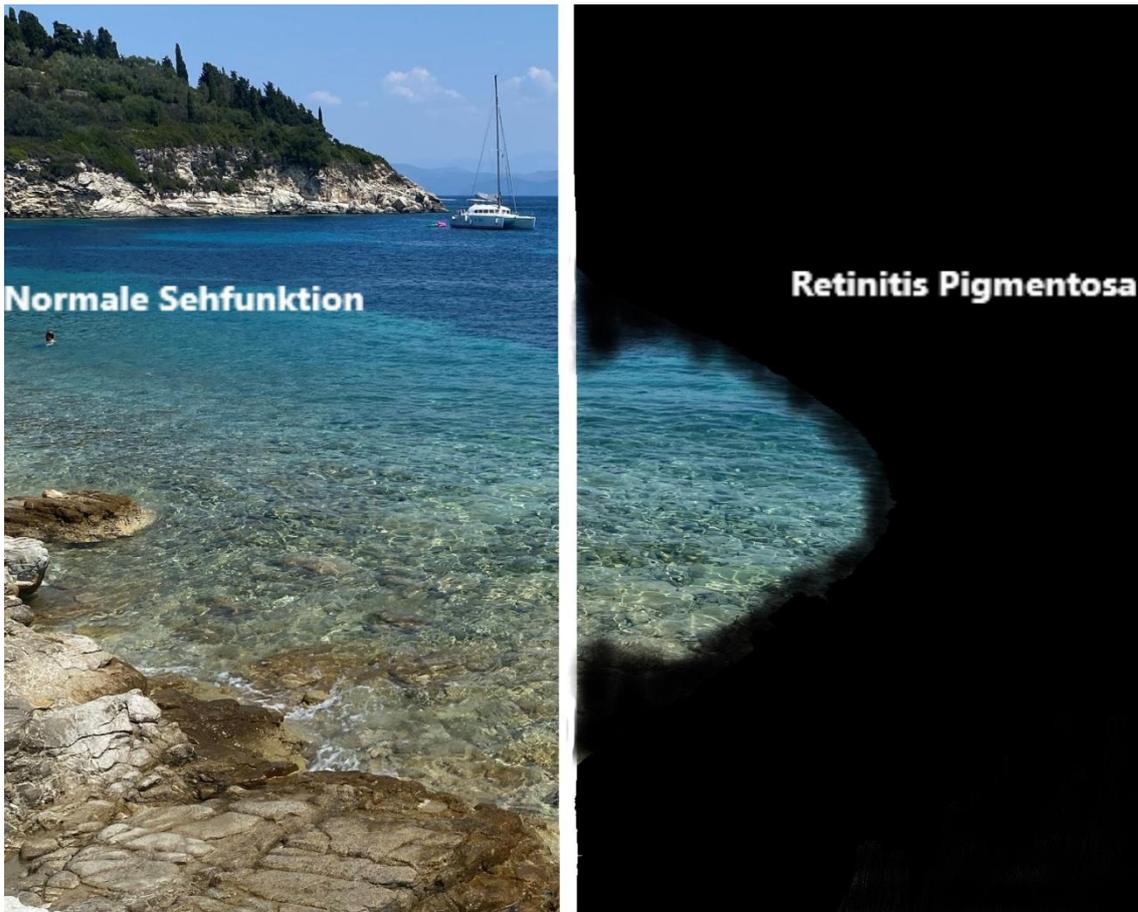


Abbildung 3: Symptome der Retinitis pigmentosa

(selbsterstellte Aufnahme) Eines der Symptome der RP Patienten ist ein peripherer Gesichtsfeldausfall. (links) Patient mit normaler Sehschärfe. (rechts) Patient mit RP.

Die Krankheit verursacht eine Degeneration und letztendlich die Zerstörung der Photorezeptoren. Der Prozess des Zelltods der Photorezeptoren bei RP wird durch noch nicht ganz bekannte Mechanismen ausgelöst. Eine Identifizierung gemeinsamer Mechanismen ist für die Entwicklung therapeutischer Strategien von entscheidender Bedeutung. Bei den Stäbchen wurden bereits 45 Gene identifiziert, die durch eine Mutation zu RP führen können²⁹. Wenn jedoch erkrankte Stäbchen degenerieren und absterben, führt dies zu einem sekundären Verlust von Zapfen, selbst wenn diese genetisch nicht betroffen sind³⁰. In einer Reihe bestehender Theorien werden Versuche unternommen, die Zapfendegeneration bei RP zu erklären. Ein Ansatz besagt, dass das Überleben der Zapfen von neutrophischen Faktoren abhängt, die von Stäbchen erzeugt werden. Léveillard et al. identifizierten den RdCVF (*rod-derived cone viability factor*) neutrophen Faktor, der von gesunden Stäbchen produziert wird und das Überleben von

Zapfen fördert³¹. Ein weiterer Ansatz basiert auf der Annahme, dass Zapfen nach dem Verlust von Stäbchen unter einem Nährstoffmangel leiden. Ein anderes Konzept ist, dass oxidativer Stress³² und eine entzündungsfördernde Mikroglia-Aktivierung eine Rolle beim Zapfentod spielen³³.

Therapeutisch existieren wenige Optionen für die Patienten mit RP. Seit 2017 gibt es die Möglichkeit hereditäre Netzhauterkrankungen mit Mutationen im RPE65-Gen mittels Gentherapie (Luxturna®) zu behandeln und dabei auch eine kleine Minderheit der Patienten mit RP mit einer biallelischen Mutation im RPE65-Gen³⁴. Allerdings ist die Gentherapie noch keine Option für die große Mehrheit der Patienten mit RP und ist mit hohen Kosten verbunden. Deshalb besteht großes Interesse von der Wissenschaftsgemeinschaft für die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten.

2.4 Neue Therapieansätze

In Anbetracht der Anzahl der Patienten, die an den oben aufgeführten Krankheiten leiden, ist der Behandlungsbedarf dringend erforderlich. Die bisher unternommenen experimentellen Anstrengungen sind zahlreich; dennoch konnten bisher keine erfolgreichen Therapien erarbeitet werden. Bei den bisher unternommenen Forschungen sind unterschiedliche Ansätze vertreten: Ein Großteil der Untersuchungen konzentriert sich auf den Ansatz der genetischen Mutationen (Gentherapie)^{34,35}, andere Forschungen zielen auf den Ersatz von verlorenen und geschädigten Zellen (Transplantation, Verwendung von Stammzellen)³⁶⁻³⁸, wieder andere fokussieren eine Verzögerung oder Blockade der Degenerationsprozesse (Wachstumsfaktoren oder Vitaminergänzung)³⁹⁻⁴².

2.4.1 Wachstumsfaktoren als Therapieoption

Trotz zahlreicher Innovationen ist die Therapie der degenerativen Retinaerkrankungen noch immer unzureichend. Der Einsatz sogenannter Wachstumsfaktoren gilt jedoch als vielversprechender Behandlungsversuch, der im Folgenden näher betrachtet werden soll.

Die ersten Forschungsanstrengungen mit basischen Fibroblastenwachstumsfaktoren (bFGF oder FGF-2) wurden Anfang der neunziger Jahre bei degenerierten

Photorezeptoren der erblichen Retinadystrophie in einem Rattenmodell experimentell durchgeführt⁴³. Die ersten Indikationen – nicht nur von bFGF/FGF-2, sondern auch von dem neurotrophen Wachstufaktor CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*) – erwiesen sich für eine neue Therapieoption als vielversprechend. Aufgrund enormer ungewünschter Wirkungen ist eine Anwendung im Bereich der Humanmedizin allerdings ausgeschlossen⁴⁴⁻⁴⁸. Bei der bFGF-Anwendung bei jungen Ratten trat bei 100% der Testaugen Kataraktbildung auf und die Augen, die die höchste bFGF-Dosis erhielten, zeigten in den ersten drei Monaten nach der Injektion eine erhöhte Netzhautvaskularisation⁴⁷. Die Anwendung von vektorbasierten, Adenovirus assoziierten CNTF Wachstumsfaktoren führte einerseits zu einer Veränderung des Phänotyps der Stäbchenzellkerne und andererseits zu paradox verringerten Elektroretinogramm (ERG) - Amplituden, die vermutlich mit Veränderungen in der Genexpression zusammenhängen⁴⁵.

Durch die zahlreichen Möglichkeiten im Bereich der Wachstumsfaktoren bedarf es nach wie vor einiger Anstrengungen zur Aufdeckung möglicher Therapiestrategien, die einerseits den apoptotischen Prozess der Retina unterbrechen und bei denen andererseits unerwünschte Wirkungen ausbleiben.

2.5 Der BDNF-TrkB-Signalweg

Ein Wachstumsfaktor mit viel Potential ist der sogenannte BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*). Der Wachstumsfaktor BDNF ist ein Protein, welches zur Gruppe der Neurotrophine gehört und das Nervenwachstum im zentralen und peripheren Nervensystem beeinflusst. BDNF lässt sich bei allen Wirbeltieren feststellen und wird sowohl während der Entwicklung als auch im Erwachsenenalter exprimiert. Seine Wirkung beruht nicht nur auf dem Schutz bereits bestehender, sondern auch auf der Wachstumsförderung neuer Neuronen und Synapsen⁴⁹⁻⁵⁰. Neurotrophine binden zwei Rezeptoren mit verschiedener Affinität, p75 Neurotrophin Rezeptor (NTR) und diverse Tyrosinkinase-Rezeptoren (Trk). BDNF bindet neben NTR, wesentlich affiner den Tyrosinkinaserzeptor B (TrkB). Durch die Aktivierung von TrkB werden Signalkaskaden ausgelöst. Die BDNF-TrkB-Signalkaskade ist an der Transkription, Translation und dem Transport von Proteinen in verschiedenen Phasen der synaptischen Entwicklung sowie an verschiedenen Formen der synaptischen Plastizität beteiligt. Diese Proteine aktivieren intrazelluläre Prozesse, die für das Überleben der Zellen, die Stressresistenz, die Neurogenese sowie die neuronale Plastizität entscheidend sind⁵¹⁻⁵⁴. Der TrkB-

Rezeptor wird von Ganglien-, Horizontal-, Amakrin-, sowie Müllerzellen und retinalem Pigmentepithel exprimiert⁵³.

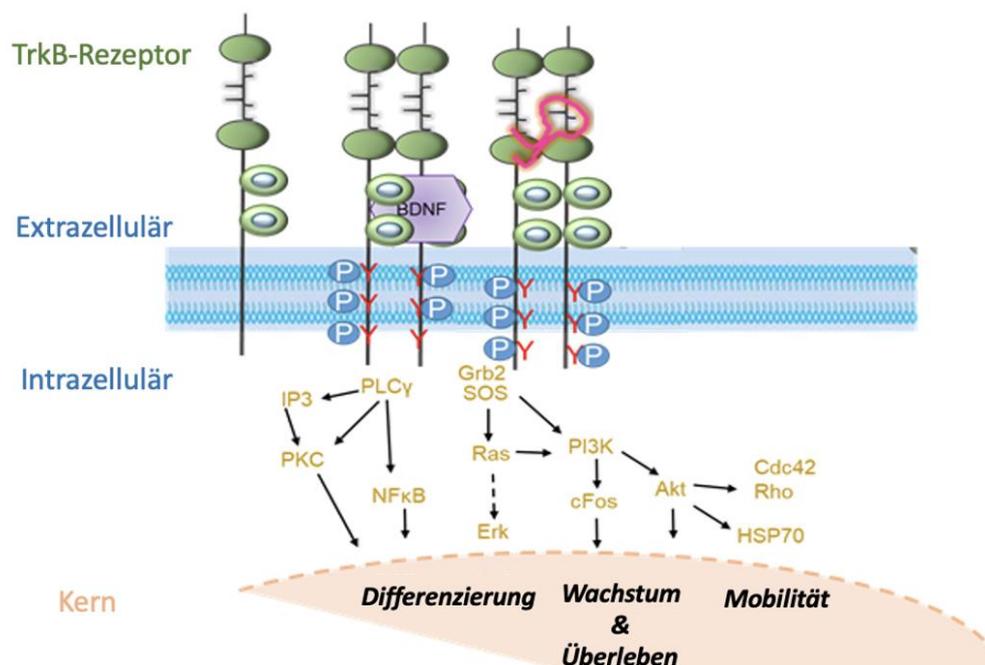


Abbildung 4: Schematische Darstellung der BDNF/TrkB-Rezeptor-Signalkaskade und ihrer nachgeschalteten zellulären Effekte

Die Bindung von BDNF an den TrkB-Rezeptor induziert die Dimerisierung des Rezeptors, was wiederum zur Autophosphorylierung der intrazellulären Membrandomänen führt. Dies hat die Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinen (MAP)-Kinase (MAPK), Phosphatidylinositol-3'-OH-Kinase (PI3K) und der Phospholipase Cy (PLCγ), die die drei Hauptsignalkaskade sind, zur Folge. (Quelle: Abschlussbericht für die ProRetina-Stiftung, Evaluation der neuroprotektiven Wirkung des Lipid-modifizierten BDNF/TrkB-Aptamers. Wird mit Einverständnis von Hurst J. eingefügt)

2.6 Therapeutische Versuche mit BDNF

Die neuroprotektive Wirkung von BDNF auf retinale Ganglienzellen ist – wie auch aus verschiedenen Publikationen hervorgeht – unbestreitbar. BDNF ist über die Müllerzellen⁵⁴⁻⁵⁵ und die Photorezeptoren⁵⁶⁻⁵⁷ nachweislich verantwortlich für eine indirekte Wirkung auf die Netzhaut sowie für deren Versorgung. Die Müllerzellen übernehmen in der Netzhaut wichtige Stütz- und Schutzfunktionen und spielen eine zentrale Rolle in der Netzhaut. Insbesondere die letztgenannte neuroprotektive Funktion ist im Rahmen der Forschungsarbeit von besonderem Interesse, da davon auszugehen ist, dass durch die Müllerzellen und deren TrkB-Aktivierung die Produktion von Wachstumsfaktoren (NGF, GDNF, BDNF, CNTF und bFGF) angeregt wird. Diese

Wachstumsfaktoren, insbesondere CNTF sowie bFGF, erweisen sich als äußerst relevant für das Überleben der Photorezeptoren.

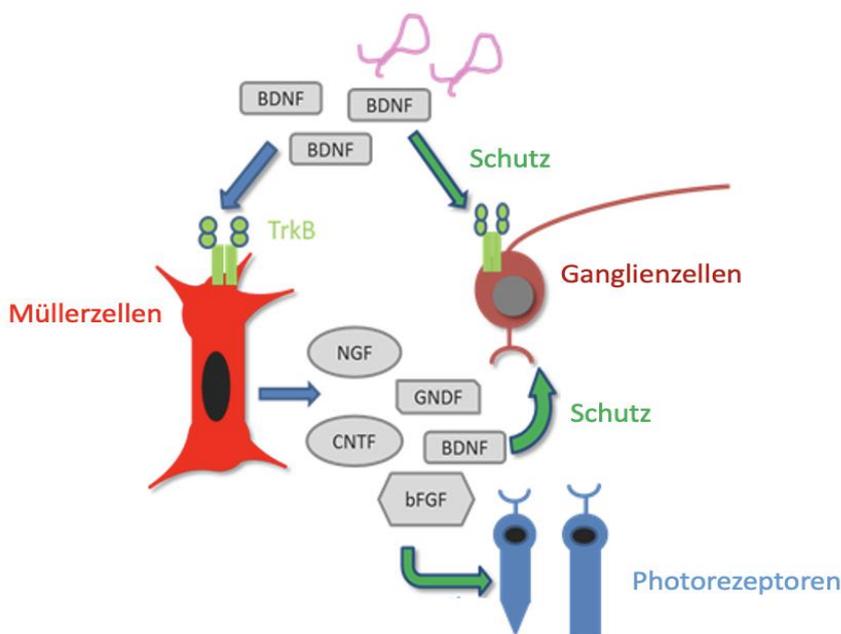


Abbildung 5: Neuroprotektiver Effekt von BDNF auf RGZ (direkter Effekt) sowie auf die Müller-Gliazellen (indirekter Effekt)

Der BDNF-Wachstumsfaktor induziert durch die Bindung des TrkB-Aptamers (grüner Pfeil) über eine direkte neuroprotektive Wirkung in den retinalen Ganglienzellen (RGZ). BDNF hingegen wirkt indirekt über die Müllerzellen auf RGZ. Dabei bindet BDNF an den TrkB-Rezeptor. TrkB wird daraufhin auf die Müllerzellen exprimiert (blauer Pfeil). Die Aktivierung des TrkB-Rezeptors auf die Müllerzellen durch BDNF führt zur Expression der Wachstumsfaktoren NGF, GDNF, BDNF, CNTF und bFGF, die eine neuroprotektive Wirkung besitzen (blauer Pfeil) (Quelle: Abschlussbericht für die ProRetina-Stiftung, Evaluation der neuroprotektiven Wirkung des Lipid-modifizierten BDNF/TrkB-Aptamers. Wird mit Einverständnis von Hurst J. eingefügt)

Bezüglich therapeutischer Ansätze mit diesen Faktoren sind unterschiedlichste Methoden bekannt, bei denen jedoch Schwächen deutlich werden. Zum einen wurden die Gensequenzen dieser neurotrophen Faktoren mithilfe von Adeno-assoziierten Viren unter einem entsprechenden Promotor eingebracht. Das Adeno-assoziierte Virus (AAV) ist aufgrund seiner anhaltenden Expression und seiner Sicherheit ein geeigneter viraler Vektor für die Gentherapie⁵⁸. Die intravitreale Injektion mit diesen Viren erfordert weitere Untersuchungen, da die Expressionseffizienz je nach Zelltyp und Promotor schwanken kann, um optimale Bedingungen für den möglichen Einsatz in klinischen Studien zu schaffen⁵⁸. Zum anderen führten die therapeutischen Versuche mit BDNF durch

verschiedene Differenzierungsprotokolle nicht zum erwünschten Erfolg. Durch eine Überaktivierung, die auf die Produktion von endogenen BDNF durch TrkB – zusätzlich zu den ohnehin vorhandenen exogenen BDNF in den nicht erkrankten Zellen⁵⁹ – zurückzuführen ist, kommt es zu weiteren problematischen Aspekten bei einer möglichen Therapie. Dabei wurden schädigende Begleiterscheinungen – einschließlich Epilepsie und neuropatische Schmerzen – deutlich, die auf die Überaktivierung der TrkB Signalkaskade zurückgeführt werden können^{60,61}.

Aufgrund der aufgeführten unerwünschten Wirkungen ist eine Optimierung des Verfahrens dringend erforderlich. Im Speziellen ist die Suche nach einer alternativen Aktivierung der BDNF-TrkB-Signalkaskade von höchster Bedeutung. Die Verwendung von TrkB-Agonisten, wie zum Beispiel von N-acetylserotonin oder Deoxygedunin, führen jedoch weiterhin zu unspezifischen Bindungen und dadurch zu ungewollten Wirkungen^{62,63}.

2.7 Aptamere

Die Verwendung von Aptameren und die dadurch direkte Stimulation des TrkBs stellt eine Lösung bezüglich der oben beschriebenen Problematik dar. Aptamere sind kurze einzelsträngige DNA- oder RNA-Moleküle, die ein spezifisches Molekül, einschließlich Proteinen, Peptiden, Kohlenhydraten, kleinen Molekülen, Toxinen und sogar lebende Zellen über ihre 3D-Struktur binden können. Aptamere binden ihre Liganden mit hoher Selektivität und Affinität, ähnlich wie bei einer Antikörper-Antigen-Wechselwirkung⁶⁴. Aptamere sind ausnahmslos die Alternative im Vergleich zu den üblicherweise verwendeten Antikörpern. Einer der entscheidenden Vorteile zeigt sich in den Kosten der Herstellung: Nachdem Aptamere identifiziert sind, können sie für nur 10% der Herstellungskosten von Antikörpern produziert werden⁶⁵. Weiter erweist sich ein weitaus niedrigeres Molekulargewicht der Aptamere im Vergleich zu Antikörpern als vorteilhaft, wodurch die Aptamere das Zielgewebe viel effizienter erreichen und zudem möglicherweise weniger toxisch sind⁶⁵.

Der rasche Abbau von Aptameren (insbesondere von RNA-Aptameren) durch RNasen im Organismus und insbesondere im Blut führt zu einer Limitation, die bei der praktischen Anwendung Grenzen aufweist. Die durchschnittliche Zeit des Oligonukleotidzerfalls im Blut liegt zwischen einigen und zehn Minuten und ist vor allem von der Oligonukleotidkonzentration und der Struktur abhängig. Da ein derart kurzes

Zeitfenster für die meisten therapeutischen Anwendungen nicht akzeptabel ist, wurden verschiedene Verfahren zum Schutz von Aptameren vor dem Abbau durch Nukleasen entwickelt⁶⁵. Eine Methode, die verwendet wird, um Nuklease-resistente Aptamere zu erzeugen ist SELEX (*Systemic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*). Die systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (SELEX) ist eine Chemietechnik in der Molekularbiologie zur Herstellung von Oligonukleotiden von entweder einzelsträngiger DNA oder RNA, die spezifisch an einen Zielliganden binden. Ein weiterer Ansatz zur Vermeidung des Aptamerabbaus ist die kürzlich entwickelte Methode, die als „Aptamer-Displacement-Screening“ bekannt ist. Diese Methode basiert auf dem Screening niedermolekularer Substanzen nach ihrer Fähigkeit, Aptamere von der Bindungsstelle eines Zielmoleküls zu verdrängen. Es wird davon ausgegangen, dass die ausgewählte Substanz eine ähnliche Spezifität und Affinität wie das verdrängte Aptamer aufweist. Die Hemmwirkung dieser niedermolekularen Verbindungen auf die Zielproteine ist oft identisch mit der Wirkung von Aptameren⁶⁵.

Aptamere sind im Vergleich zu Antikörpern klein, aber im Vergleich zu Nicht-Protein-Arzneimitteln relativ groß. Aufgrund ihrer Größe dringen sie nicht leicht in die Zellmembran ein. Dies ist insbesondere beim Erreichen intrazellulärer Ziele ein Problem. Trotzdem dringen Aptamere im Vergleich zu den Antikörpern leichter in Membranen ein. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass nicht alle Moleküle mit Aptameren gebunden werden können⁶⁶. Die Tatsache, dass die Applikationswege der Aptamere abhängig von ihrem Zielort sind, wird derzeit noch als eine Einschränkung gesehen⁶⁵.

Zwei Aptamere, die bei der Behandlung von der altersbedingten Makula Degeneration (AMD) Anwendung finden, sind das Medikament Fovista® (Anti PDGF-B Aptamer, Novartis) und das Medikament Macugen® (VEGF Aptamer, Pfister), welche als intraokuläre Injektionen appliziert werden.

2.8 Forschungsansatz

Die Arbeitsgruppe von Huang et al. hat sich mit Aptameren beschäftigt und dabei ein RNA-Aptamer entwickelt, welches spezifisch den TrkB-Rezeptor aktiviert⁶⁷. RNA-Aptamere stellen einen vielsprechenden Aspekt von Therapeutika dar, die einige Vorteile gegenüber niedermolekularen Wirkstoffen und auf Antikörpern basierenden Therapeutika aufweisen. Der Identifizierungsprozess von Aptameren ist erheblich

weniger komplex und weniger teuer als der für kleine Moleküle, da die kleinen Moleküle einzeln gescreent werden müssen⁶⁷. In der Arbeit von Huang et al. wurde gezeigt, dass das in den Hippocampus von Mäusen injizierte Aptamer zur Phosphorylierung von TrkB führt, was auf eine Aktivierung des Signalwegs hindeutet⁶⁷. Dieses Aptamer wurde bisher noch nicht an Netzhautgewebe getestet. Da RNA im Körper innerhalb von Minuten abgebaut wird und sehr instabil ist, wurden für dieses Aptamer 2'-fluormodifizierte Basen verwendet. Diese Modifikationen gewährleisteten eine höhere *in-vivo* Stabilität und können mithilfe einer spezifischen T7-RNA-Polymerase sogar in *in-vitro* transkribierte RNA eingebaut werden. Hauptsächlich aufgrund der Schwierigkeit sich dem Zielgewebe, d. h. dem ZNS (Zentralnervensystem), zu nähern, wurde bisher von der Verwendung der Aptamere bei der Behandlung von neurologischen Erkrankungen abgesehen. Bei den Retinopathien handelt es sich jedoch um eine andere Ausgangssituation, da der Wirkstoff mit Hilfe von intraokulären Injektionen viel einfacher in den Bereich des Zielgewebes appliziert werden kann.

2.9 Schweineauge für die Organkultur

In der ophthalmologischen Forschung werden Schweine für Testungen genutzt, da diese sich aufgrund der morphologischen und physiologischen Ähnlichkeit zum menschlichen Auge (im Vergleich zu Ratten, Kaninchen oder Mäusen) als am besten geeignet erweisen⁶⁸. In Forschungsstudien zu RGZ wurde ebenfalls gezeigt, dass Schweine-Retinaexplantate acht Tage lang lebensfähig bleiben^{68,69}. Obwohl die Schweine-Netzhaut in Bezug auf Größe, Anatomie und Gefäßsystem der menschlichen Netzhaut ähnelt, gibt es jedoch Unterschiede in der Dichte und im Anteil der Photorezeptoren. Beispielsweise hat die Netzhaut von Schweinen ein Verhältnis von Stäbchen zu Zapfen von 8:1, während es beim Menschen 20:1 beträgt⁷⁰. Ebenfalls ist bei Schweineaugen keine Makula ausgebildet. Auch die maximale Zapfendichte ist niedriger als bei Menschen⁷⁰. Organkulturen aus Retinaexplantaten zählen trotzdem zu den mehr verwendeten *in-vitro* Modellen in der Ophthalmologie. Aufgrund der Größe der Schweineaugen können mehrere Explantate von einem einzigen Auge gewonnen werden, was zu zuverlässigeren Daten führt⁷¹. Darüber hinaus werden keine Labortiere gezüchtet, die getötet werden müssen⁷¹.

Die verwendeten Augen für die Retinakultur stammen von Schlachttieren, da sich Augen bei der Verwertung der Tiere im Sinne der Nahrungsmittelgewinnung nicht eignen. Der

Schlachter entfernte sie innerhalb von Sekunden nach dem eintretenden Tod der Tiere, woraufhin sie bis zur weiteren Verarbeitung gekühlt gelagert werden. Die Augen konnten in regelmäßig Abständen mehrmals und unmittelbar nach der Schlachtung abgeholt werden.

Tabelle 1: Anatomische Unterschiede im hinteren Auge zwischen Schweine- und Menschaugen

	Schwein	Human
Größe	24mm	24 mm
Tapetum	abwesend	abwesend
Makula	abwesend	anwesend
Netzhautdicke	300µm	310µm
Mittlere RGZ-Dichte	6000 Zellen/mm ²	5700 Zellen/mm ²
Spitzenwert der Zapfendichte	3,9 x 10 ⁴ Zellen/mm ²	15 x 10 ⁴ Zellen/mm ²

(Quelle: Adaptiert von Murali et al. (modifiziert) ⁷¹)

2.10 CoCl₂ Degenerationsmodell

Die Degenerationsprozesse vieler Netzhauterkrankungen sind noch nicht vollständig bekannt. Um die pathologischen Veränderungen zu verstehen, werden zuverlässige Modelle benötigt, in denen Augenkrankheiten simuliert werden können. Hypoxie ist ein Hauptauslöser des Pathomechanismus bei Netzhauterkrankungen. Dabei handelt es sich um einen multifaktoriellen, dynamischen Prozess, der oxidativen Stress, Entzündung und Zelltod sowie die Aktivierung von Regenerationsmechanismen in Abhängigkeit von der Hypoxie umfasst⁷². Die Simulation hypoxischer Prozesse *in-vitro* kann durch Kobaltchlorid (CoCl₂) erreicht werden, da CoCl₂ eine starke Neurodegeneration induziert. Es konnte nachgewiesen werden, dass CoCl₂ Hypoxie induziert und nach vier und acht Tagen zu einem signifikanten Verlust von RGZ führt⁷². Auf diese Weise können neurodegenerative Prozesse bei retinalen Erkrankungen simuliert werden und neue Therapieansätze mithilfe des TrkB-Aptamers getestet werden.

3. Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterial für die Zell- und Organkultur

- Neurobasal A Medium, gibco, # 10 888-022, Irland
- B₂₇ Supplement, gibco, # 17504-044, Irland
- Penicillin/Streptomycin 100ml, gibco, # 15140-122, Irland
- 0,25% Trypsin-EDTA, gibco, # 25200-072, Irland
- PBS-Dulbeco, Biochrom, # L1825, Berlin, Deutschland
- HBSS, Roth, # 9117, Karlsruhe, Deutschland
- Papain, Thermo Fischer Scientific, # 88285, Deutschland
- DNase, AppliChem, # A3778, Darmstadt, Deutschland
- BDNF, Sigma-Aldrich, # B3795-10UG, Taufkirchen, Deutschland
- CoCl₂, Sigma-Aldrich, # 15862-1ML-F, Taufkirchen, Deutschland
- Platten: 24-Well Platte, Poly-D-Lysine, Corning, Kaiserslautern, Deutschland
 - 96-Well Platte, Poly-D-Lysine, Corning, Kaiserslautern, Deutschland
 - 6-Well Platte, Corning Incorporated- Costar mit zusätzlichen Inserts (24mm Diameter+0,4µm Pore Size), Kaiserslautern, Deutschland
 - 12-Well Platte, Corning Incorporated- Costar mit zusätzlichen Inserts (24mm Diameter+0,4µm Pore Size), Kaiserslautern, Deutschland
- Chamber Slides, Thermo Fischer Scientific, # 154534, Deutschland
- Atto 488 Carboxy, Sigma-Aldrich, # 41051-1MG-F, Taufkirchen, Deutschland
- DAPI, (4',6-Diamidin-2-phenylindol), AppliChem, # A4099, Darmstadt, Deutschland

- Präparierbesteck (Pinzette, Schere, Skalpell)

3.2 Assays & Kits

- Cell Titer 96® AQueousOne Solution Cell Proliferation Assay (MTS) Promega, # G3580, Mannheim, Deutschland
- MultiMACS™cDNA Synthesis Kit (12x8), MiltenyiBiotec, # 130-094-410, Bergisch Gladbach, Deutschland
- Multi-8 Columns, MiltenyiBiotec, # 130-092-444, Bergisch Gladbach, Deutschland
- Multi-8 Filter und Frame, MiltenyiBiotec, # 130-092-548, Bergisch Gladbach, Deutschland
- SYBR Green, Bio-Rad Laboratories, #172-5271, Feldkirchen, Deutschland
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, # 23227, Deutschland
- Mini-ProteanTGX Precast Gele 10% und 12%, Bio-Rad Laboratories, # 456-1044, Feldkirchen, Deutschland
- Western-Blot-Marker, Kaleidoskop, Bio-Rad Laboratories, # 161-0375, Feldkirchen, Deutschland
- PROTRAN Nitrocellulose Transfer Membrane, MiltenyiBiotec, # 130-092-546, Bergisch Gladbach, Deutschland
- Mini Trans Blot Filter Paper, Bio-Rad Laboratories, # 1703932, Feldkirchen, Deutschland
- Crystal Violet Solution, Sigma-Aldrich, #HT901-8FOZ, Taufkirchen, Deutschland

3.3 Geräte

- Zellkulturschrank/CO₂- Inkubator, Heracell™, Thermo Fischer Scientific, Deutschland

- Axio Observer Mikroskop, Zeiss, Deutschland
- ApoTome2 Mikroskop, Zeiss, Deutschland
- MultiMACS M96thermo Separator, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
- Tecan Infinite® m200 NanoQuant, Tecan, Männedorf, Schweiz
- NanoQuant Plate, Tecan, Männedorf, Schweiz
- Odyssey Fc, LICOR, Homburg, Deutschland
- Power Pac 300, Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland
- CFX Real-Time-System (C100 Touch), Cycler, Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland
- Cryostat CM1950, Leica, Wetzlar, Deutschland
- Sterilbank, Thermo Fischer, Deutschland
- Cooling Thermal Shake Touch, VWR, Darmstadt, Deutschland
- Vortex Mixer, neoLab, Heidelberg, Deutschland
- Cellcounter R1-SLI, Olympus, Hamburg, Deutschland
- Multipette plus, Eppendorf, Deutschland
- Pipette Eppendorf Xplorer® plus, Eppendorf, Deutschland
- Tischenzentrifuge, Megafuge 8R, Thermo Scientific, Deutschland
- Zentrifuge, MICRO STAR 17R, VWR, Darmstadt, Deutschland
- Mini-Protean® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland

3.4 Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Antikörper, die im Western Blot bei den Retinaexplantaten verwendet werden

Primärantikörper	Wirt	Hersteller, Nummer	Lot
TUBB3	Mouse	R&D, MAB1195	#HGQ0113011
pERK	Rabbit	Elabscience, T981	#AK0017JUN16092
IL-1beta	Rabbit	Santa Cruz, sc-7884	#B1115
β Actin	Mouse	Cell Signaling, 8H10D10	#3700S
GAPDH	Rabbit	Cell Signaling, 14C10	#8
HSP70	Rabitt	Santa Cruz,sc-33575	#D1913

Sekundärantikörper	Wirt	Hersteller,Nummer	Fluorophor	Lot
Anti-rabbit	Goat	LI-COR, 925-68071	IRDye 680 RD,rot	#C40820-01
Anti-rabbit	Goat	LI-COR, 926-32211	IRDye 800 CW, grün	#D00804-07
Anti-mouse	Goat	LI-COR, 925-68070	IRDye 680 RD,rot	#C90910-21
Anti-mouse	Donkey	LI-COR, 926-32212	IRDye 800 CW, grün	#C70502-02

Tabelle 3: Verwendete Antikörper, die in der Immunhistochemie bei den Retinaexplantaten verwendet werden

Primärantikörper	Wirt	Hersteller, Nummer	Lot
BDNF	Mouse	R&D, MAB248	#VH151802A
pERK	Rabbit	Elabscience, T981	#AK0017JUN16092
TrkB	Rabbit	Proteintech,13129-1-AP	#64465
GFAP	Mouse	BP Pharmigen, 556330	#3302661

Sekundärantikörper	Wirt	Hersteller,Nummer	Fluorophor	Lot
Anti-rabbit	Goat	Thermofischer, A-21428	Alexa Fluor 555, rot	#1858260
Anti-mouse	Goat	Thermofischer, A-21422	Alexa Fluor 555, rot	#1837985

3.5 Primer

Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Primer, die im PCR bei den Retinaexplantaten verwendet werden

Gen	Forward	Reverse
<i>Calbindin</i>	5' AGAATCCCACCTGCAATCAC 3'	3' TGCCCATACTGATCCACAAA 5'
<i>BDNF</i>	5' GCTGGCGGTTTCATAAGGATA 3'	3' GTTCCCTCTGGTCATGGAA 5'
<i>GDNF</i>	5' CCGCTAAAAGGTGTGGATGT 3'	3' CCTCCTCCTCTTCCAATTCC 5'
<i>CNTF</i>	5' AAATGGGCATGCAGGTTTAG 3'	3' AAATGGGCATGCAGGTTTAG 5'
<i>bFGF</i>	5' TCTGCCCTTCACACACTCTG 3'	3' TATACTGCCCCGTTTCGTTTC 5'
<i>p21</i>	5' GACCCTCAGAAGAGCCACAG 3'	3' GTCGAAGTTCATCGCTCTC 5'
<i>HSP70</i>	5' ATGTCCGCTGCAAGAGAAGT 3'	3' GGCGTCAAACACGGTATTCT 5'
<i>GFAP</i>	5' GGAGAAGCCTTTGCTACACG 3'	3' TCTTCACTCTGCCTGGGTCT 5'
<i>TUBB3</i>	5' CAGATGTTTCGATGCCAAGAA 3'	3' GGGATCCACTCCACGAAGTA 5'
<i>Rhodopsin</i>	5' TCCAGGTACATCCCAGAAGG 3'	3' GCTGCCCATAGCAGAAGAAG 5'
<i>Opsin</i>	5' GGGGAGCATCTTCACCTACA 3'	3' GATGATGGTCTCTGCCAGGT 5'
<i>IL-1beta</i>	5' CCAAAGAGGGACATGGAGAA 3'	3' TTATATCTTGGCGGCCTTTG 5'
<i>Math5</i>	5' TCGAGACCACTACCTTCCGT 3'	3' ACAAGACAGGAAGGCAGCTC 5'
<i>RPL4</i>	5' CAAGAGTAACTACAACCTTC 3'	3' GAACTCTACGATGAATCTTC 5'

3.6 Aptamer

Es handelt sich um ein RNA-basiertes Aptamer (Biomers, Deutschland), welches von der Arbeitsgruppe von Huang et al.⁶⁷ entwickelt wurde und speziell an den TrkB-Rezeptor bindet. (5'-GGGAGGACGAUGCGGUCGUAUUAUCCGCUGCACGCCAGACGACUCGCCCGA-3')

Das Kontroll-Aptamer (Co-Apt) (5'-AGAGGGGAGGACGAUGCGGUUUGGGUUU UCCCGUGCCCCAGACGACUCGCCCGA-3') (Biomers, Deutschland) weist die gleiche Länge und die gleichen chemischen Modifikationen auf, zeichnet sich jedoch durch eine andere Sequenz aus und kann dadurch nicht spezifisch binden.

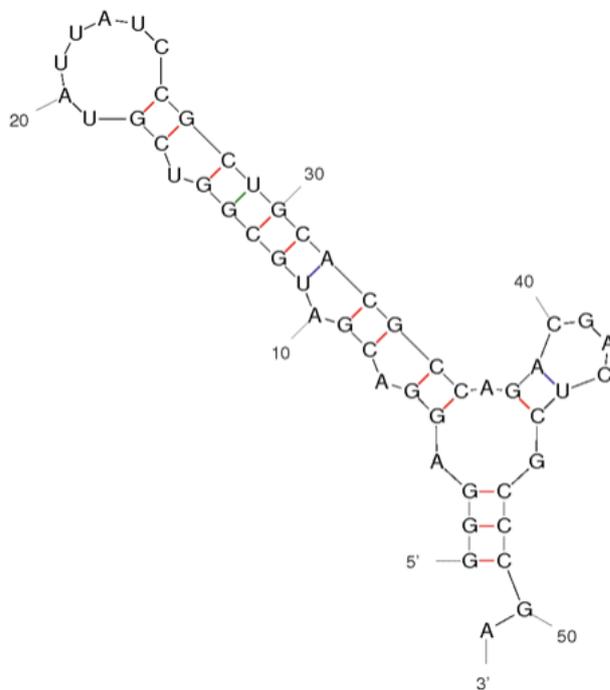


Abbildung 6: Schematische Darstellung des TrkB-Aptamers

(Quelle: adaptiert von Huang et al.⁶⁷)

3.7 Zelllinien

Die ARPE-19-Zelllinie wurde von American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA) käuflich erworben. Bei den ARPE19 Zellen handelt es sich um eine immortalisierte humane retinale Pigmentepithelzelllinie⁷⁴.

3.8 Kultivierung von ARPE-19-Zellen

Die ARPE-19-Zellen wurden in Zellkulturflaschen in Neurobasal-A Medium (Thermo Fischer Scientific, Deutschland) mit 1% P/S und 2% B27 Supplemental (Thermo Fischer Scientific, Deutschland) im Zellkulturschrank (Thermo Fischer Scientific, Deutschland) bei 37° C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Nachdem sich die Zellen in einem konfluenten Zustand befanden, erfolgte die Passagierung der Zellen. Das Medium wurde unter der Sterilbank mit einer Pasteurpipette abgesaugt, im Anschluss daran wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden 3ml 0,25% Trypsin-EDTA Lösung (gibco, Irland) dazugegeben und die Zellkulturflasche für 5 Minuten im Zellkulturschrank platziert. Unter vorsichtigem Klopfen an der Seite wurden die Zellen anschließend mechanisch abgelöst und für 5 Minuten bei 300g (MICRO STAR 17R, VWR, Darmstadt, Deutschland) und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen in frisches Medium resuspendiert. Mithilfe eines Cellcounters (Olympus, Deutschland) wurde die Zellzahl evaluiert und im Medium dementsprechend verdünnt.

3.9 Kultivierung von primären dissoziierten Retinazellen

Die primären Retinazellen wurden als dissoziierte Zellkultur durch enzymatischen Verdau aus frischer porciner Retina (*Abbildung 7*) gewonnen. Hierzu wurden die Retinae isoliert und zunächst mit HBSS (Roth, Deutschland) gewaschen und zerkleinert. Die Suspension wurde für 30 Minuten bei 37° C in Thermomixer (VWR, Deutschland) bei 1000rpm mit 1% Papain (Thermo Fischer Scientific, Deutschland) und 1% DNase (Applichem, Deutschland) verdaut. Nach der Inkubation erfolgte eine vierminütige Zentrifugation mit der Tischzentrifuge und das Zellpellet in 1ml HBSS resuspendiert. Die Retinazellen wurden ebenso in Neurobasal-A Medium (gibco, Irland) mit 1% P/S und 2% B27 Supplemental (gibco, Irland) im Zellkulturschrank bei 37° C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in 96-Well-Platten (Poly-D-Lysine, Corning, Deutschland) kultiviert.

Nachdem die Zellen ausgesät wurden und für 48 Stunden anwachsen konnten, wurde im Anschluss daran das Medium vorsichtig abgesaugt. Für weitere 24 Stunden folgte die Behandlung und Inkubation mit dem TrkB-Aptamer in einer Konzentration von 200nM, Atto488 20µM (Sigma-Aldrich, Deutschland), BDNF 10ng/mL (Sigma-Aldrich, Deutschland) oder CoCl₂ 300µM (Sigma-Aldrich, Deutschland). Dabei wird von einer

ungefähr ähnlichen Anzahl an Zellen je Well ausgegangen. 24 Stunden nach der Behandlung konnten weitere Tests in Form der MTS Viability Assay (Promega, Deutschland) sowie der Kristallviolett-Färbung durchgeführt werden.

3.10 Nachweis der Bindung des TrkB-Aptamers an primäre dissoziierte Zellen

Um die Adhärenz und die Verweildauer des TrkB-Aptamers zu prüfen, wurde ein Versuch in der Zellkultur durchgeführt. Primäre dissoziierte retinale Zellen wurden in 96-Wellplatten ausgesät und 24 Stunden später für 15 Minuten mit TrkB-Aptamer FAM (Fluoreszenzmarkiertes Aptamer) in einer Konzentration von 200nM, Kontroll-Aptamer FAM (Fluoreszenzmarkierter Aptamer) 200nM und Atto488 20µM (Sigma-Aldrich, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch PBS ersetzt. In einem ersten Ansatz wurden die dissoziierten Retinazellen (Gruppe A) für weitere 30 Minuten mit PBS inkubiert, um die Verweildauer der Aptamere bzw. des Farbstoffs (Atto488) zu überprüfen. Parallel dazu wurden die Zellen der zweiten Gruppe (Gruppe B) für zwei Stunden mit PBS inkubiert. Zum Schluss wurden Aufnahmen mittels eines Mikroskops (Axio Observer, Zeiss, Deutschland) gemacht.

3.11 Isolierung und Kultivierung von Retinaexplantate

Die Retinaexplantate wurden aus frischen Schweineaugen gewonnen, die von Schlachttieren stammten. Die Entfernung der Augen erfolgte 2 Stunden nach der Schlachtung. Sie wurden in einer Isolierbox mit Deckel aus Styropor sowie Eis darin transportiert. Gleich nach Eintreffen der Augen im Labor und bis zur Verwendung wurden sie bei 4° C gelagert. Zunächst wurden sie für 5 Minuten in 70%-igem Ethanol desinfiziert. Anschließend wurden sie unter eine Sterilbank überführt und die Netzhäute explantiert (*Abbildung 7*). Die Retinaexplantate wurden im Zellkulturschrank bei 37° C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Kultivierungsmedium bestand aus Neurobasal-A Medium 1% P/S und 2% B27 Supplemental.

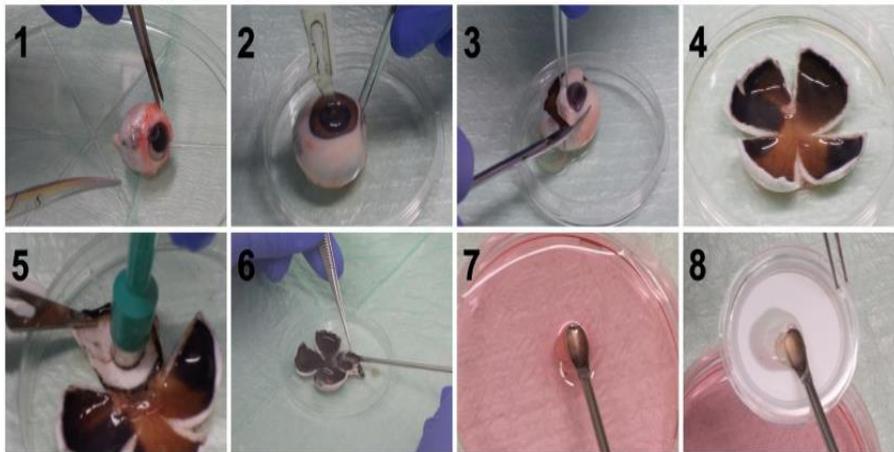


Abbildung 7: Vorbereitung der Retinaexplantate

Zunächst wurden die Augen von dem umgebenden Gewebe befreit und in 70% Ethanol desinfiziert (1, 2). Im Anschluss daran wurden Hornhaut, Linse und Glaskörper aus dem Bulbus (3) entfernt und der Augenbecher mit vier Schnitten (4) geöffnet. Die Retina wurde anschließend mit dem Medium befeuchtet und ein definiertes Stück mit einer Stanze (8mm) (5) explantiert. Zur Entfernung von Pigmentepithelresten wurden die Explantate mit einem Löffel in Medium gewaschen (6, 7). Die gewaschenen Explantate konnten auf Millicell-Inserts (8) platziert und anschließend in eine 6-, 12- oder 24-Well-Platte (Poly-D-Lysine, Corning, Deutschland) zur Kultivierung eingesetzt werden. (Quelle: Adaptiert von Kuehn et al. ⁶⁸)

Bei den Retinaexplantaten wurde das Medium nach 24 Stunden Kultivierung vorsichtig abgesaugt. Danach erfolgte für wiederum 24 Stunden die Behandlung und die Inkubation mit dem TrkB-Aptamer in einer Konzentration von 200nM, Kontroll-Aptamer 200nM, BDNF 10ng/mL oder CoCl_2 in einer Konzentration von 300 μM . Abschließend wurden die Retina-Proben für qRT-PCR-Analysen oder Western Blot bei -20°C ohne Medium eingefroren.

3.12 Kultivierung von Retinaexplantaten in Inserts

Um die Verweildauer des Aptamers mittels immunhistologischer Untersuchung zu prüfen, wurden die Retinaexplantate in 6-Well-Platten in Inserts (Corning, Deutschland) platziert und im Zellkulturschrank für 24 Stunden kultiviert. Das Kultivierungsmedium bestand aus Neurobasal-A Medium 1% P/S und 2% B27 Supplemental (1000 μl im Well und 200 μl im Insert). Am folgenden Tag erfolgten die Inkubation mit TrkB-Aptamer FAM

(Fluoreszenzmarkiertes Aptamer) in einer Konzentration von 200nM, Kontrol-Aptamer FAM (Fluoreszenz markierter Farbstoff) 200nM und Atto488 20µM für 15min (200µl im Insert) und gleichzeitig wurde das Medium vom Well gewechselt (1000µl). Dazu wurden die Retinae in Tissue Tek (Sakura, Deutschland) eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.13 Toxikologie

Zunächst erfolgte die Prüfung der potenziellen Zytotoxizität des TrkB-Aptamers *in-vitro*. Dazu wurden die Vitalität der Zellen mittels MTS Assay und die Zellzahl mittels Kristallviolett färbung bestimmt.

3.13.1 MTS-Assay

Der MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) Assay ermöglicht Rückschlüsse auf die Zellviabilität, wodurch die Toxizität einer Substanz auf die Zellpopulation festgestellt werden kann.

Der MTS-Assay basiert dabei auf der Reduktion der MTS-Tetrazoliumverbindung durch metabolisch aktive Zellen, so dass ein farbiger Formazan-Farbstoff entsteht, der im Medium löslich ist. Die Umwandlung erfolgt durch die NAD(P)H-abhängige Dehydrogenase in der Atmungskette an den Mitochondrien der Zellen. Der Formazan-Farbstoff kann durch die Absorptionsmessung bei 490nm quantifiziert werden und entspricht indirekt der Anzahl vitaler Zellen. Jedoch kann die metabolische Aktivität einzelner Zellen durch verschiedene Bedingungen oder Behandlungen den Farbumschlag des Assays beeinflussen und so zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Demnach spiegelt der MTS-Assay die durchschnittliche metabolische Aktivität aller Zellen wider und kann nur bedingt die Anzahl der viablen Zellen wiedergeben. Eine weiterführende Analyse der Zellzahl wird daher benötigt, um Rückschlüsse über die vorhandenen Zellen zu gewinnen. Durch das Dividieren dieser Assays ist es anschließend möglich, die metabolische Viabilität der vorhandenen Zellen zu bestimmen.

Zunächst wurden die primären dissoziierten Retinazellen und die ARPE-19 Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und konnten für 48 Stunden im Zellkulturschrank bei 37° C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit anwachsen. Für weitere 24 Stunden folgte die Behandlung und Inkubation mit dem TrkB-Aptamer in einer Konzentration von 200nM,

Atto488 20 μ M, BDNF 10ng/mL oder CoCl₂ 300 μ M. Danach erfolgte die Zugabe von 20 μ l/Well MTS-Reagenz. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation der Platten für 90 Minuten im Zellkulturschrank bei 37° C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Anschließend folgte eine Messung der Absorption bei 490nm und 690nm mithilfe des Tecan Readers (Tecan Infinite® m200 NanoQuant). Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt, und die Proben in Bezug zu jener gesetzt, um den Effekt der einzelnen Behandlungen zu verdeutlichen.

3.13.2 Kristallviolett färbung

Nach dem MTS-Assay erfolgte unmittelbar eine Fixierung aller anhaftender Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT).

Der Assay beruht dabei auf der Tatsache, dass tote Zellen sich vom Boden der Zellkulturplatte ablösen, da sie nicht mehr zur Adhäsion fähig sind und sich daher im Überstand befinden. Die noch anhaftenden Zellen stellen daher entweder lebende Zellen dar oder Zellen, die noch nicht komplett abgelöst bzw. abgestorben sind. Durch das Anfärben mit dem Triphenylmethanfarbstoff Kristallviolett und anschließender Absorptionsmessung bei der Wellenlänge von 595nm lassen sich jene, im Vergleich zur Kontrolle, quantifizieren. Zunächst wurden zwei Waschschriffe mit 200 μ l destilliertem H₂O durchgeführt, woraufhin die Zugabe von 100 μ l Crystal Violet Solution (Sigma Aldrich, Deutschland) pro Well und eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte. Weiterhin fanden erneut drei Waschschriffe mit 200 μ l destilliertem H₂O statt, welches im Anschluss mithilfe einer Pumpe abgesaugt wurde. Daraufhin wurden 100 μ l 1%igem Sodiumdodecylsulfat (SDS) pro Well hinzugegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur.

Durch die Messung der Absorption bei 595nm mithilfe des Tecan Readers (Tecan Infinite® m200 NanoQuant, Schweiz) konnte auf diese Weise abschließend der Gehalt an vorhandenen Zellen festgestellt werden.

3.14 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die Messung der Expression verschiedener Gene wurde mittels real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) durchgeführt. Alle gewählten Primer sind mit dem Housekeeping Gene GAPDH verglichen worden.

3.14.1 cDNA-Synthese

Zur Gewinnung der – für die rtPCR erforderliche – cDNA wurde das MultiMACS cDNA Synthese Kit (Miltenyi Biotech, Deutschland) sowie ein MultiMACS™ M96thermo Separator (Miltenyi Biotech, Deutschland) genutzt.

Bei den μ MACS Oligo (dT) MicroBeads handelt es sich um 50nm große magnetische Beads, die aus dem Kit verwendet werden, um mRNA mit Hilfe von magnetisch geladenen Multi-8-Säulen (Miltenyi Biotech, Deutschland) zu isolieren, bevor diese letztlich in cDNA umgewandelt werden. Der Oligo (dT) Strang von Microbeads ermöglicht die Hybridisierung mit dem Poly(A)Strang der mRNA.

Durch magnetische Kräfte wird die magnetisch markierte mRNA zurückgehalten, während die restliche Zellsuspension ausgewaschen wird. Nach der Umschreibung von mRNA in cRNA mittels reverser Transkription werden die reine cDNA eluieren. Dazu werden die Wasserstoffbrücken zwischen mRNA und cDNA getrennt und die Säulen abgespült.

Um das Gewebe zu lysieren, wurden 900 μ l Lysis Buffer zur Retina gegeben und das Lysat/die Probe mit Hilfe einer 25G Nadel weiter zerkleinert. In einem weiteren Schritt wurden die Eppendorf-Gefäße 3 Minuten bei 6000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Durch die Zugabe von 30 μ l μ MACS Oligo(dT) MicroBeads erfolgte die magnetische Markierung der mRNA. Mithilfe des Multi MACS™ M96thermo Separators (Miltenyi Biotech, Deutschland) konnten weitere Schritte eingeleitet werden. Es erfolgte eine Equilibrierung der Multi-8 Columns und Filter mit 100 μ l Lysis Binding Buffer, bevor die Proben in den Separator auf die Säulen pipettiert wurden und daraufhin zweimal mit je 200 μ l Lysis Binding Buffer gewaschen wurden. Im weiteren Verlauf wurden die Filter entfernt und viermal mit je 100 μ l Wash Buffer und zweimal mit 100 μ l Equilibration/Wash Buffer gewaschen. Weiter wurden 20 μ l des reversen Transkriptase Mixes hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation von einer Stunde bei 42°C, um auf diese Weise die Synthese der cDNA zu ermöglichen. Nach

zweimaligem Waschen mit 100µl Equilibration Buffer wurden 20µl cDNA Release Solution hinzugefügt und die Proben erneut für 10 Minuten bei 42°C inkubiert. Schließlich erfolgte die Zugabe von 60µl cDNA Elution Buffer. Die gewonnene cDNA wurde in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt und bei -20°C gelagert.

3.14.2 Quantifizierung

Nach der cDNA-Synthese wurde die gewonnene cDNA mit einer NanoQuant-Platte (Tecan, Schweiz) an dem Tecan Reader (Tecan Infinite® m200 NanoQuant, Schweiz) gemessen und so die cDNA-Menge bestimmt. Zunächst wurde dazu eine Leerwertmessung mit 2µl Elution Buffer durchgeführt und im Anschluss 2µl der Probe auf die NanoQuant-Platte (Tecan, Schweiz) aufgetragen. Die Absorption der Wellenlänge wurde bei 260 und 280nm gemessen und daraus basierend mit der Formel $C [\mu\text{g/mL}] = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Extinktionskoeffizient}$ (der spezifische Extinktionskoeffizient beträgt 50 für doppelsträngige DNA) und die DNA-Menge ermittelt⁷⁵.

3.14.3 qRT-PCR

Vor dem Beginn der qRT-PCR wurde die cDNA-Konzentration der Proben auf 1ng/µl und die Konzentration der Primer auf 1µM mit destilliertem Wasser verdünnt. Zunächst wurde ein Reaktionsmix für jeden Marker pro Primerpaar angesetzt.

Reaktionsmix (15µl)

- 1µl H₂O
- 2µl Primer forward
- 2µl Primer reverse
- 10µl SYBR® Green Master mix

Der SYBR® Green Master mix (Bior-Rad Laboratories, Deutschland) enthält einen Puffer, die notwendigen Desoxyribonucleosidtriphosphaten (dNTPs), MgCl₂, DNA-Polymerase und den Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green. Zu den 15µl Reaktionsmix wurden 5µl verdünnte cDNA hinzugefügt.

SYBR® Green ist ein fluoreszierender doppelsträngiger DNA (dsDNA) Bindungsfarbstoff und fluoresziert nur im gebundenen Zustand. Während der Interkalierung des SYBR® Green Farbstoffs erfolgt eine fortlaufende Polymerisierung. Dadurch kommt es zu einer proportionalen Erhöhung des Fluoreszenzniveaus äquivalent zum Gehalt an dsDNA nach jeder Amplifikationsrunde. Die qRT-PCR wird in drei Schritten durchgeführt, die nacheinander wiederholt werden:

1. *Denaturierung*: Doppelsträngige DNA (dsDNA) wird mit Hilfe der hohen Temperatur von 95°C nach ungefähr 30 Sekunden getrennt (denaturiert).
2. *Primer-Hybridisierung*: Primer hybridisieren, indem die Temperatur für etwa 30 Sekunden bis 60 Sekunden auf 60-65°C gesenkt wird.
3. *Verlängerung*: Für die Synthese der neuen Kette bleibt die Temperatur auf 60°C, welche eine optimale Wirkungstemperatur der hitzebeständigen DNA-Polymerase ist. Die Polymerase verlängert die Primer durch Einführung von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) unter Verwendung der komplementären DNA-Sequenz als Matrize.

Die Produkte vorheriger Zyklen stehen als Vorlage für den nächsten Zyklus zur Verfügung, wodurch eine exponentielle Vervielfältigung ermöglicht wird, vorausgesetzt die Primer binden. Abschließend erfolgt die Messung der Fluoreszenzintensität. Die obigen Schritte werden 40-mal wiederholt. Die PCR wird mit dem Thermocycler (CFX Real-Time-System, Cycler, Biorad) durchgeführt. Der Ct (Cycle threshold) Wert ist definiert als die Anzahl der Zyklen, die erforderlich sind, damit das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert überschreitet. Das heißt, der Wert gibt an, wie viele Zyklen benötigt wurden, um ein reales Signal zu erkennen. Die Ct-Werte sind umgekehrt proportional zu untersuchenden mRNA/cDNA in der Probe (d. h. je niedriger der Ct-Wert ist, desto größer ist die Menge der Zielnukleinsäure in der Probe). Der ursprüngliche Gehalt an DNA der Zielsequenz steht dabei im unmittelbaren Zusammenhang mit dem Zeitpunkt der Überschreitung des Schwellenwertes, sodass Rückschlüsse auf die mRNA-Expression gezogen werden können. Für die Auswertung der relative qRT-PCR wurde die Berechnung der relativen Quantifizierung nach Pfaffl genutzt⁷⁶. Die relative Quantifizierung von Genexpressionsniveaus nach Pfaffl ist eine wichtige Methode in der molekularen Biologie, um die Expression von Genen in verschiedenen Proben zu vergleichen. Diese Methode ermöglicht die Bestimmung von relativen Unterschieden in

der Genexpression zwischen verschiedenen Proben, während sie die Variationen aufgrund von Unterschieden in der RNA-Ausgangsmenge und der Effizienz der PCR-Amplifikation berücksichtigt. Die Formel nach Pfaffl, um die relative Genexpression zu berechnen:

$$\text{Relative Expression} = \frac{(\text{Effizienz Zielgen})^{(\Delta\text{Cq Zielgen Probe} - \Delta\text{Cq Zielgen Referenzprobe})}}{(\text{Effizienz Kontrollgen})^{(\Delta\text{Cq Kontrollgen Probe} - \Delta\text{Cq Kontrollgen Referenzprobe})}}$$

Hierbei sind $\Delta\text{Cq Zielgen Probe}$ und $\Delta\text{Cq Kontrollgen Probe}$ die Differenzen zwischen den Ct-Werten Ihrer Probe und der Referenzprobe für das Zielgen bzw. das Kontrollgen. Die Effizienzen werden aus den Standardkurven abgeleitet.

Das Ziel ist es, die Veränderungen in der Genexpression in den verschiedenen Proben relativ zur Referenzprobe zu quantifizieren. Aus diesem Grund wird die relative Expression in der Referenzprobe immer auf den Wert 1 gesetzt.

Hier ist der Grund dafür:

1. **Normierung auf die Referenzprobe:** In der Pfaffl-Methode wird die relative Genexpression relativ zur Referenzprobe berechnet. Die Referenzprobe wird als Baseline oder Kontrollprobe verwendet, und ihr relativer Ausdruckswert wird auf 1 festgelegt. Dies erleichtert den Vergleich der anderen Proben mit dieser Referenz, da ein Wert von 1 bedeutet, dass es keine Veränderung in der Genexpression im Vergleich zur Referenzprobe gibt.

2. **Vergleichbarkeit:** Die Methode ermöglicht es, die Genexpression in verschiedenen Proben auf eine einheitliche Skala zu bringen, wodurch der Vergleich zwischen den Proben vereinfacht wird. Dies ist besonders wichtig, wenn Sie mehrere Proben analysieren und die relative Veränderung in der Genexpression verstehen möchten.

In unserem Falle sind die Referenzproben die Kontrollen (unbehandelte Retina) und die wurden nicht per se 1 gesetzt, sondern auch in den Berechnungen berücksichtigt. Aufgrund der Natur der Pfaffl Formel ergeben sich logischerweise für die Kontrollen immer Werte um 1 „herum“ jedoch gibt es auch hier leichte Schwankungen da es sich um biologische Proben handelt, die nicht immer uniform reagieren. Alle Werte der

Referenzproben wurden für die Darstellung in den Graphen gemittelt. Daher ergeben sich teilweise Werte die etwas kleiner oder größer sind als 1.

3.15 Western Blot

Das Western-Blot-Verfahren eignet sich für den Nachweis von Proteinen durch Übertragung (Blotting) auf eine Trägermembran. Vor dem eigentlichen Western Blot wurde eine Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (*engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE*) durchgeführt, um auf diese Weise das Proteingemisch in die einzelnen Proteine aufspalten zu können.

SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung des Proteingemisches in einem elektrischen Feld. Die Proteine wandern durch ein Polyacrylamid-Gel – die Geschwindigkeit der Wanderung ist abhängig von ihrer jeweiligen Größe und Struktur. SDS (*sodiumdodecylsulfate; SDS*) ist ein anionisches Detergens, das verwendet wird, um Proteine (denaturierte Proteine) zu linearisieren und um linearisierten Proteinen proportional zu ihrer Molekülmasse zu einer negativen Ladung zu verhelfen. SDS lagert sich mithilfe seines hydrophoben Anteils an Proteine an. Denaturierte Proteine, die negativ geladen sind, wandern durch das Gel zum positiven Ende. Je nach Größe der Proteine unterscheiden sich die Wanderungsgeschwindigkeiten zwischen den Proteinen und es kommt zu einer Auftrennung. Die Proteine werden auf 95°C erhitzt und zusätzlich mittels β -Mercaptoethanol denaturiert. Zusammenfassend ermöglicht SDS Page demnach die einfache Auftrennung von vorbehandelten Proteinen auf einem Gel nach ihrem Molekulargewicht. Durch die Western-Blot-Analyse können das Vorhandensein sowie die Menge eines spezifischen Proteins durch Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Nach der Trennung des Proteingemischs erfolgt im Anschluss der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran. Die elektrische Spannung ermöglicht die Wanderung der Proteine aus dem Gel heraus. Die „geblotteten“ Proteine sind nun auf der Membran gebunden und können mithilfe bestimmter Antikörper nachgewiesen werden. Dazu wird ein spezifischer Primäantikörper eingesetzt, der an das gesuchte Protein bindet. Der Primäantikörper wird durch einen fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper nachgewiesen.

Auf die vorbehandelten Retinas wurden zur Probengewinnung 100 μ l Cell Extraction Buffer (Invitrogen, Deutschland) hinzugegeben und die Retinas wurden mit einem Stösel

zerkleinert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte im Anschluss eine Zentrifugation bei 13000rpm für 10 Minuten bei 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20°C eingefroren. In einem weiteren Schritt wurde der Proteingehalt des Lysats mittels BCA (Bicinchoninsäure), Protein Assay Kits (Thermo Fischer Scientific, Deutschland) und mithilfe einer BSA-Kalibriergerade bestimmt. Die Proben wurden auf eine Konzentration von 15µg/µL verdünnt, bei 95°C über 5 Minuten inkubiert und im Anschluss auf Eis abgekühlt.

Die verwendeten Gele (Mini-PROTEAN TGX Precast Gele, Biorad, Deutschland) wurden in die Blot-Kammer gestellt. Weiter wurden sowohl 125ml Running Buffer zwischen die Platten als auch 200ml in die äußere Kammer gegeben. Nachdem die Proben (15µl) und ein Größenstandardmarker (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™, Biorad, Deutschland) aufgetragen wurden, erfolgte eine 45-minütige Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 200V. Daraufhin konnte der Transfer der Proteinbanden auf die Nitrozellulosemembran in einem Wet/Tank Blotting System (Bio-Rad Laboratories, Deutschland) stattfinden. Die Apparatur wurde mit Towbin-Buffer aufgefüllt. Das Blotten fand unter Kühlung mithilfe eines Eisbehälters für eine Stunde bei konstanten 350mA statt. Nach dem Blotten erfolgte für eine Stunde das Blocken der Membranen mittels 5% BSA in TBS-T sowie die Inkubation mit den *TUBB3* (1:400), *pERK* (1:500), *IL-1β* (1:200), *β-Actin* (1:1000), *GAPDH* (1:1000) und *HSP70* (1:1000) Antikörpern bei 4°C über Nacht. Am folgenden Tag fanden drei 10-minütige Waschschrte in TBS-T statt, sodass schließlich die Inkubation mit den entsprechenden Zweitantikörpern bei Raumtemperatur für 60 Minuten stattfinden konnte.

Die Detektion, die Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Banden erfolgte mit dem OdysseyFc Gerät (LICOR, Deutschland) und dem entsprechenden Programm (Image Studio Ver 4.0). Die Messung wurde mit einer Wellenlänge von 700nm und 800nm durchgeführt.

Tabelle 5: Zielproteine der verwendeten Erstantikörper, die im Western Blot bei den Retinaexplantaten verwendet werden

Protein	Beschreibung	Molekülgröße
TUBB3	Marker für RGZ	55kDa
pERK	Phosphoryliertes ERK, welches bei der Aktivierung der TrkB-Signalkaskade eine Rolle spielt	100kDa
IL-1 β	proinflammatorisches Zytokin, welches bei dem frühen inflammatorischen Geschehen sowie oxidativen Stress eine Rolle spielt	50kDa
HSP70	Chaperon, welches an der Stabilisierung und Faltung von Proteinen beteiligt ist und unter schädlichen Bedingungen zum Schutz zellulärer Proteine vermehrt ausgeschüttet wird	70kDa
β -Actin	Haushaltsprotein	45kDa
GAPDH	Haushaltsprotein	37kDa

Tabelle 6: Verdünnungen von primären und sekundären Antikörpern, die im Western Blot bei den Retinaexplantaten verwendet werden

Antikörper	Firma Erantikörper	Verdünnung Erantikörper	Firma und Nummer Sekundäantikörper	Verdünnung Sekundäantikörper
TUBB3	Santa Cruz	1:400	LI-COR (926-68070)	1:10000
pERK	Elabscience	1:500	LI-COR (925-68071)	1:10000
IL-1β	Santa Cruz	1:200	LI-COR (926-32211)	1:10000
β-Actin	Cell Signaling	1:1000	LI-COR (926-32210)	1:20000
GAPDH	Cell Signaling	1:1000	LI-COR (926-32211)	1:10000
HSP70	Santa Cruz	1:1000	LI-COR (926-32211)	1:10000

3.16 Kryoschnitte

Die Kryoschnitte für die immunhistochemische Untersuchung wurden mithilfe eines Kryostats (Leica, Deutschland) angefertigt. Die Schnitte wurden mit einer Dicke von 12µm erstellt und vier Retinas pro Objektträger (Adhäsions-Objektträger SuperFrost® plus, R. Langenbrinck GmbH) aufgetragen. Die Objektträger wurden anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei -28°C aufbewahrt.

3.17 Immunfluoreszenz (IF)

Die immunhistochemische Untersuchung ist eine Methode zur Lokalisation von Proteinen mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Die Schnitte wurden mit eiskaltem Methanol für 10 Minuten fixiert, anschließend für 10 Minuten mit TBS-T (TBS 1:10 verdünnt und 0,1% Tween 20) gewaschen und für eine Stunde mit 5% BSA in PBS geblockt. Es folgte die Inkubation mit *BDNF* (1:100), *pERK* (1:200), *TrkB* (1:100) Erstantikörpern in 5% BSA in PBS über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag erfolgten drei 5-minütige Waschschrte in TBS-T und schließlich die Inkubation mit den entsprechenden Zweitantikörpern für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Daraufhin erfolgte die DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Applichem, Deutschland) Färbung für 5 Minuten bei Raumtemperatur und das zweimalige Waschen mit TBS-T sowie einmal mit destilliertem Wasser. Zur vollständigen Anfertigung der Schnitte folgte nach kurzem Lufttrocknen das Eindeckeln mit FluorSave (Merck Millipore, Deutschland).

3.18 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit GraphPad PRISM 9 durchgeführt. Die Normalverteilung der Daten wurde mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Die Nullhypothese besagte, dass die Daten normal verteilt sind. Der Test wurde auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Daten normal verteilt waren ($p > 0,05$). ANOVA wurde verwendet, um Gruppenunterschiede zu vergleichen. Die Daten wurden als Mittelwert +/- SEM dargestellt. Die Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Für alle statistischen Tests wird die Signifikanz mit den folgenden Signifikanzniveaus angegeben: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$.

4. Ergebnisse

4.1 Biokompatibilität des TrkB-Aptamers

Das TrkB-Aptamer ist bislang nie in retinalem Gewebe eingesetzt worden und deshalb erfolgte zunächst eine *in-vitro* Untersuchung möglicher toxischer Wirkungen auf die Zellen. ARPE-19-Zellen und primäre dissoziierte retinale Zellen wurden verwendet (*Abbildung 8*). Dazu wurde mit dem TrkB-Aptamer inkubiert und der Einfluss auf die Zellviabilität und die Zellzahl mittels MTS-Assay bzw. Kristallviolett-färbung untersucht. Mithilfe des MTS-Assay kann die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt werden und durch anschließende Kristallviolett-färbung die Zellzahl an verbleibenden, adhären Zellen. Die Zellen wurden für 48 Stunden kultiviert und anschließend für weitere 24 Stunden mit:

- 200nM TrkB Aptamer
- 10ng/mL BDNF (dem TrkB- Rezeptor Liganden; Induktion des Signalweges)
- 300µM CoCl₂ (Schädigungskontrolle)

inkubiert. Zudem wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt.

Das TrkB-Aptamer zeigte weder bei den ARPE-19-Zellen noch bei den primären dissoziierten retinalen Zellen einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität und die Zellzahl (*Abbildung 8*). Vielmehr führte die Inkubation mit dem TrkB-Aptamer bei den primären retinalen Zellen, im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle und den durch CoCl₂-geschädigten Zellen, zu einer signifikanten Zunahme der Zellzahl (*Abbildung 8*).

Aufgrund dessen konnte die potentielle Zytotoxizität des Aptamers ausgeschlossen werden und parallel sogar ein positiver Effekt auf die Zellen beobachtet werden.

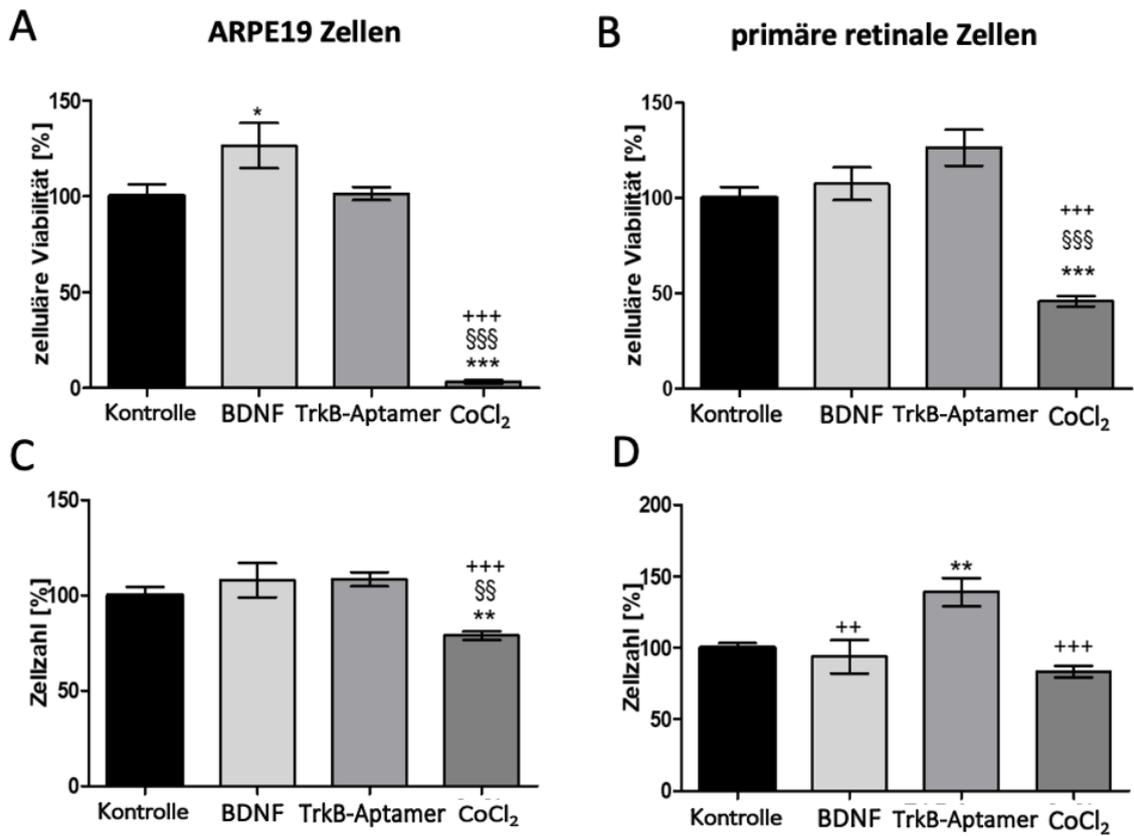


Abbildung 8: Das TrkB-Aptamer besitzt keine toxischen Effekte auf die ARPE-19-Zellen und die primären dissoziierten Retinazellen

A) Zelluläre Viabilität der ARPE-19-Zellen und B) primärer retinaler Zellen. C) Zellzahl der ARPE-19-Zellen und D) Zellzahl der primären retinalen Zellen. Nach Behandlung beider Zelltypen mit dem TrkB-Aptamer konnten keine toxischen Effekte nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Zellzahl der primären retinalen Zellen nach Inkubation mit dem TrkB-Aptamer. Unbehandelte Zellen dienten als Referenz, deren Werte auf 100 % gesetzt wurden. Als Stressfaktor wurde CoCl₂ genutzt, was zu einem Verlust der Viabilität und Zellzahl bei ARPE19 Zellen und der Viabilität bei primären retinalen Zellen führte. „*“ in Bezug auf die Kontrolle, „§“ in Bezug auf BDNF; „+“ in Bezug auf TrkB-Aptamer. (n=12-15, aus 3 verschiedenen unabhängigen Experimenten)

Außerdem wurde eine potentielle Schädigung des Aptamers bei den retinalen Explantaten ausgeschlossen. Nach der Isolierung wurden die Retinaexplantate für 24 Stunden kultiviert. Danach erfolgte für weitere 24 Stunden die Behandlung sowie die Inkubation mit dem TrkB-Aptamer in einer Konzentration von 200nM. Die weiteren Untersuchungen möglicher toxischer Wirkungen erfolgten durch Kontrolle verschiedener zelltyp-spezifischer Marker mittels PCR (Abbildung 9). Die Behandlung mit dem TrkB-

Aptamer führte zu einem Anstieg der mRNA-Expression der verwendeten Marker β -3-Tubulin (TUBB3) (Marker für neuronale Zellen)^{77,79}, *Calbindin* (Amakrinzell Marker)⁷⁹, *Rhodopsin* (Stäbchen-Marker)⁸⁰ und *Opsin* (Zapfen-Marker)⁸¹ im Vergleich zu der durchgeführten Kontrolle. Die Inkubation mit dem TrkB-Aptamer erhöhte die *TUBB3* mRNA-Expression um das 2,3-fache ($p < 0,05$), die *Calbindin* mRNA-Expression um das 1,4-fache ($p < 0,01$) sowie die *Rhodopsin* mRNA-Expression um das 2,9-fache ($p < 0,05$) und die *Opsin* mRNA-Expression um das 7,2-fache ($p < 0,001$) (Abbildung 9).

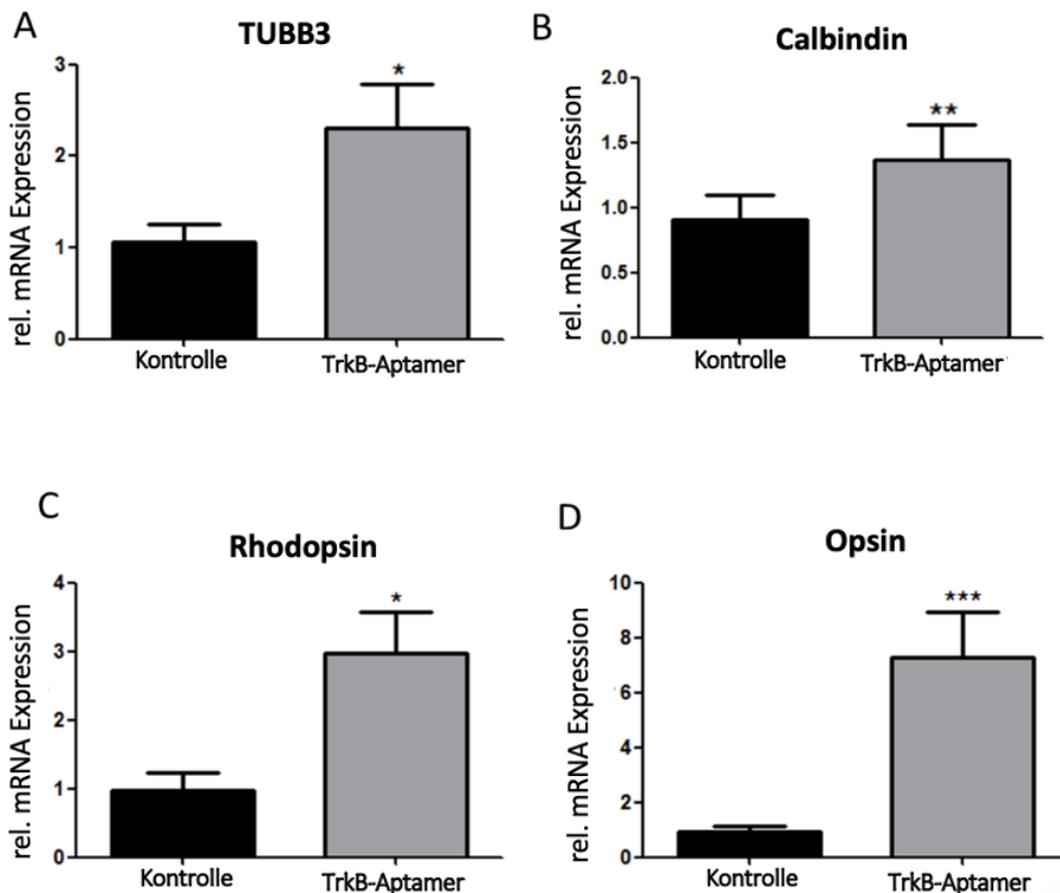


Abbildung 9: Die Behandlung von retinalen Explantaten mit 200nM TrkB-Aptamer führt zu einem signifikanten Anstieg mRNA-Expression der Zellmarker

A) Die Inkubation mit dem TrkB-Aptamer führte zu einer signifikant 2,3-fach erhöhten Expression der *TUBB3* mRNA im Vergleich zu der Kontrolle. B) Auch eine erhöhte Expression der *Calbindin* mRNA nach Behandlung mit dem TrkB-Aptamer wurde ermittelt. C) und D) die Inkubation mit TrkB-Aptamer resultierte ebenfalls in eine Erhöhung der *Rhodopsin* (2,9-fach) -und *Opsin* (7,2-fach) mRNA-Expression. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (n=9-12 aus 3 verschiedenen unabhängigen Experimenten)

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die mRNA-Expression des Stressmarkers *Interleukin 1 beta (IL-1 β)* analysiert. Bei *IL-1 β* handelt es sich um ein proinflammatorisches Zytokin, das von Mikrogliazellen ausgeschieden wird und als Marker für frühe inflammatorische Geschehen sowie oxidativen Stress gilt^{82,83}. Als Schädigungskontrolle wurden die retinalen Stanzen erneut mit 500 μ M CoCl₂ behandelt.

Die Inkubation mit CoCl₂ bei den zell-spezifischen Markern (*TUBB3* und *Rhodopsin*) führte zu einer 2-fach verminderten Expression der mRNA im Vergleich zu der durchgeführten Kontrolle (*Abbildung 10 A+B*). Die verminderte mRNA-Expression zeigt, dass die Retinazellen durch CoCl₂ nachweislich geschädigt sind. CoCl₂ induziert einen 2,5-fachen Anstieg der *IL-1 β* mRNA, was auf eine inflammatorische Reaktion hinweist. (*Abbildung 10 C*).

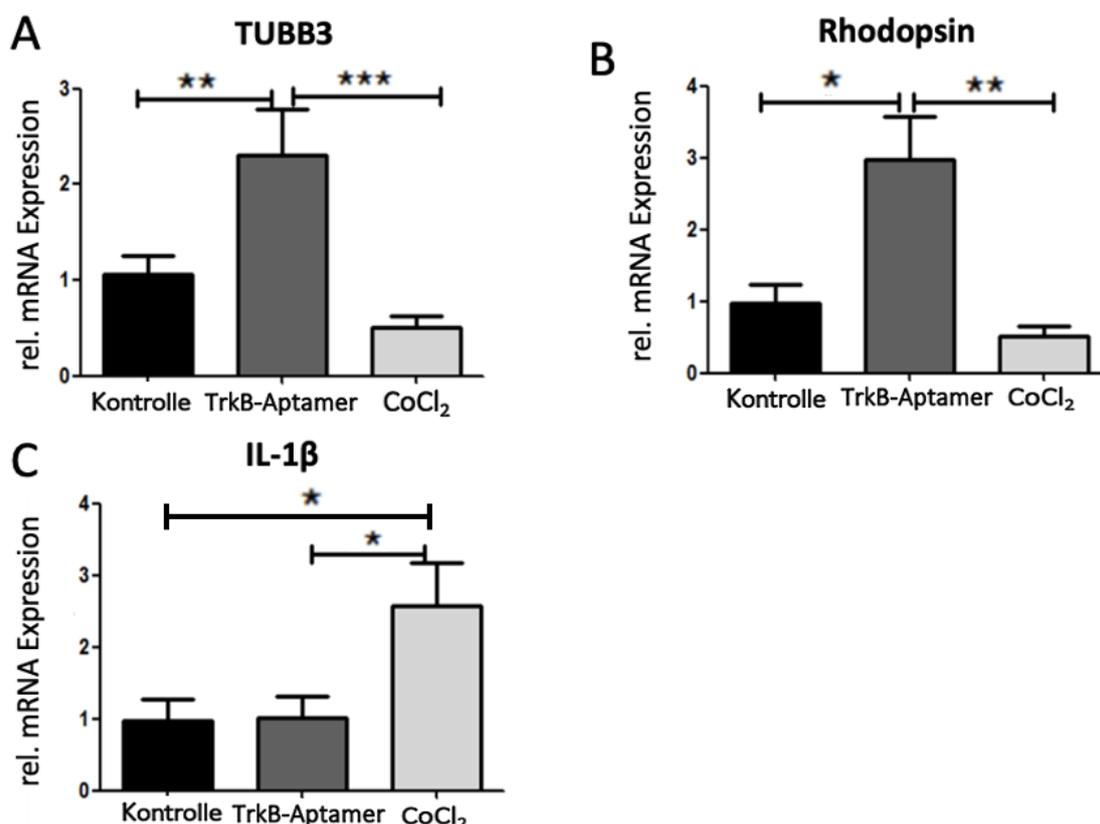


Abbildung 10: mRNA-Expression spezifischer Marker nach Behandlung mit TrkB-Aptamer oder CoCl₂ der retinalen Explantate

A) Nach 24 Stunden erhöhte die Inkubation mit dem TrkB-Aptamer die *TUBB3* mRNA-Expression 2-fach signifikant ($p < 0,01$) im Vergleich zur Kontrollgruppe, während CoCl₂ zu einer 2-fachen ($p < 0,001$) Abnahme der mRNA führte. B) qRT-PCR-Analysen zeigten, dass die Behandlung mit dem TrkB-Aptamer – im Vergleich zu der Kontrolle, zu einer 3-

fachen ($p < 0,05$) Erhöhung der *Rhodopsin* mRNA-Expression führte, während CoCl_2 wieder zu einem 2-fachen ($p < 0,01$) Abfall der mRNA führte, C) Es konnte kein Einfluss des TrkB-Aptamers auf die *IL-1 β* mRNA-Expression gefunden werden. Im Gegenteil dazu zeigte die CoCl_2 -Behandlung einen 2,5-fachen ($p < 0,05$) Anstieg der mRNA-Expression. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (n=9-12 aus 3 verschiedenen unabhängigen Experimenten)

Im Anschluss erfolgte die Untersuchung möglicher toxischer Wirkungen auf retinale Ganglienzellen der retinalen Explantate durch die Behandlung mit dem TrkB-Aptamer auf Proteinebene. Mittels Western-Blot-Analyse zeigte sich eine signifikante Induktion ($p < 0,01$) der *TUBB3*-Expression (Abbildung 11), was auch in diesem Fall auf einen neuroprotektiven Effekt des TrkB-Aptames hindeutet.

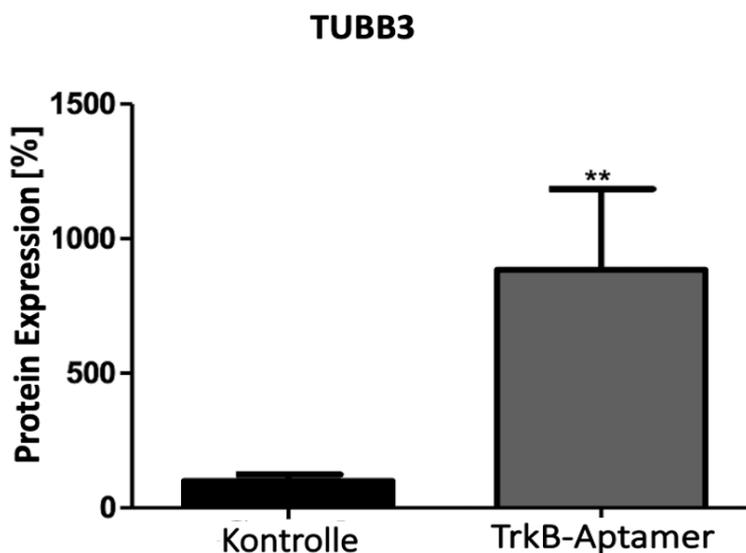


Abbildung 11: TrkB Behandlung induzierte einen Anstieg der TUBB3-Expression in Retinaexplantaten

Die Quantitative Auswertung der *TUBB3*-Expression mittels Western-Blot-Analyse zeigte eine Steigerung der *TUBB3*-Expression ($p < 0,01$) – im Vergleich zu unbehandelten Retinas – nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit dem TrkB-Aptamer im Vergleich zu unbehandelter Retinas. Die mit TrkB-Aptamer behandelten Retinas reagierten mit einer deutlich gesteigerten Expression des RGZ Markers *TUBB3*. (n= 4) ** $p < 0,01$.

4.2 Verweildauer des TrkB-Aptamers

Nachdem eine toxische Wirkung des TrkB-Aptamers auf retinale Zellen und Explantate ausgeschlossen werden konnte, galt es in einem weiteren Schritt die Verweildauer – sowohl in der Zellkultur an primären retinalen Zellen als auch im retinalen Organmodell – zu überprüfen.

Primäre dissoziierte retinale Zellen sowie Retinaexplantate wurden dazu sowohl für 15 Minuten mit 200nM fluoreszenzmarkiertem TrkB-Aptamer (TrkB-Apt FAM), als auch mit einem markierten Kontroll-Aptamer (Ko-Apt FAM) inkubiert und das Medium anschließend durch PBS ersetzt. Sowohl nach 30 Minuten als auch nach 2 Stunden wurden die Zellen fixiert und histologisch auf die Fluoreszenz des Aptamers hin analysiert. Das Kontroll-Aptamer besitzt die gleiche Länge und die gleichen chemischen Modifikationen wie das TrkB-Aptamer, weist aber im Kontrast zu jenem eine andere Struktur auf, was eine spezifische Bindung an den Rezeptor verhindert.

Nach beiden Zeitpunkten zeigte das TrkB-Aptamer FAM eine sehr gute Adhäsion an die primären dissoziierten retinalen Zellen und daher eine lange Bindungsdauer (*Abbildung 12*). Im Kontrast zum TrkB-Aptamer FAM konnte das Kontroll-Aptamer FAM schon nach 30 Minuten nicht mehr nachgewiesen werden. Damit konnte die spezifische Adhärenz des TrkB-Aptamers an retinale Zellen, als auch eine lange Bindungsdauer bestätigt werden.

Bei den Retinaexplantaten konnte die spezifische Bindung des TrkB-Aptamers noch stärker – d. h. selbst nach 48 Stunden – detektiert werden (*Abbildung 13*). Zur Kontrolle wurden die Explantate mit freiem Atto488 Farbstoff inkubiert, der bereits nach 15 Minuten nicht mehr nachweisbar war (*Abbildung 13*).

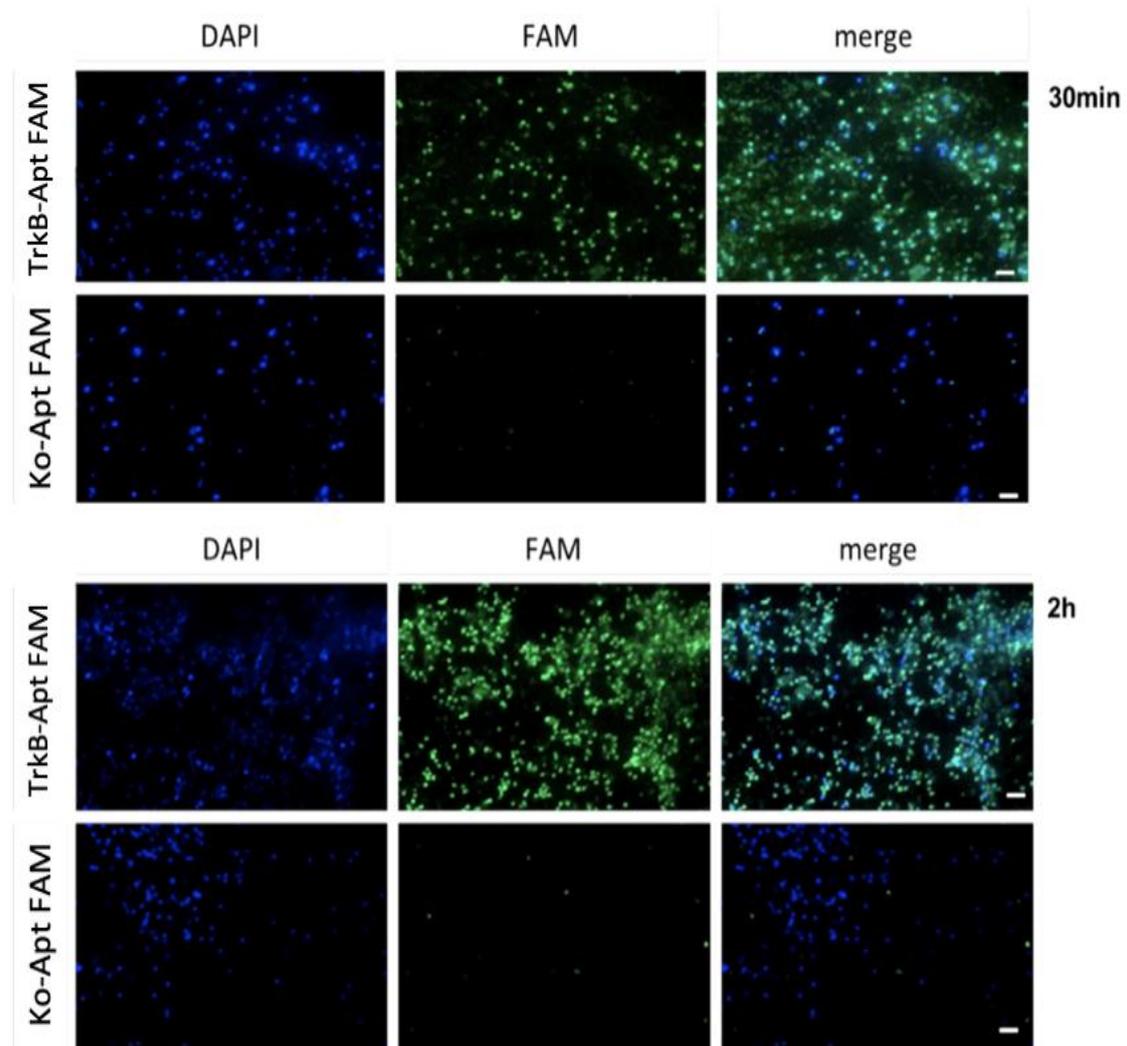


Abbildung 12: Adhärenz des TrkB-Aptamers an primären dissoziierten retinalen Zellen

Primäre Netzhautzellen (blau) wurden für 15 Minuten mit dem fluoreszenzmarkierten TrkB-Aptamer FAM (TrkB-Apt FAM) (grün) oder mit dem Kontroll-Aptamer FAM (Ko-Apt FAM) (grün) inkubiert und anschließend für die angegebene Zeit in PBS inkubiert. Das TrkB-Aptamer FAM zeigte noch nach zwei Stunden eine ausgezeichnete Adhärenz an

die primären Retinazellen, während das Kontroll-Aptamer FAM bereits nach 30 Minuten nicht mehr zu detektieren war. Maßstabsbalken= 50 µm

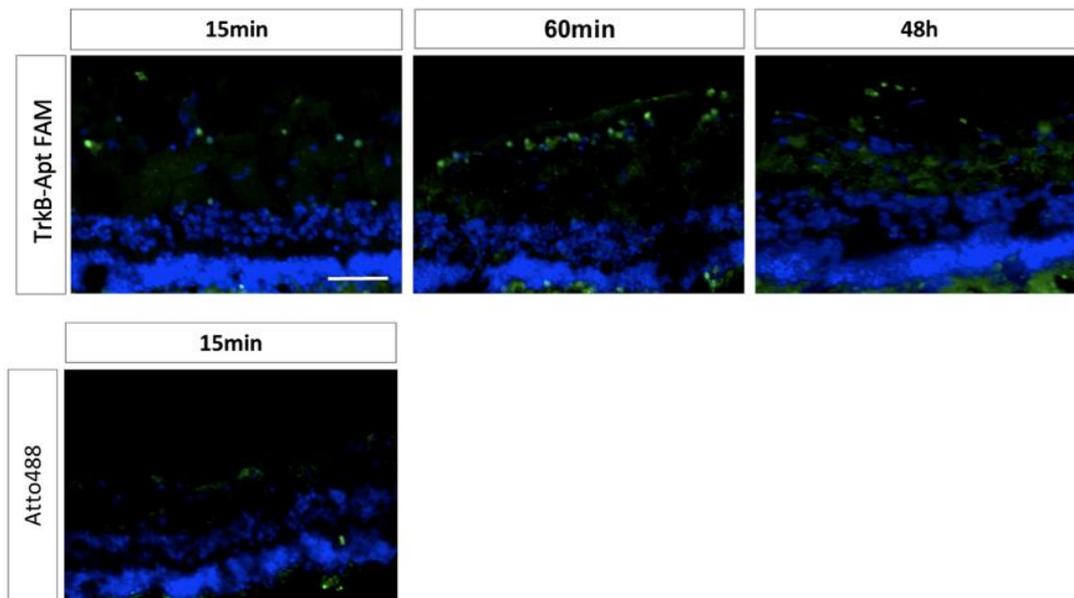


Abbildung 13: Adhärenz des TrkB-Aptamers auf Retinaexplantaten

Die repräsentativen Fluoreszenzbilder zeigen retinale Explantate (blau), die für 15 Minuten mit dem fluoreszenzmarkierten TrkB-Aptamer (TrkB-Apt FAM) (grün) oder mit Atto488 Fluorophor (grün) inkubiert und dann für die angegebenen Zeiten gewaschen wurden. Erneut zeigte das Aptamer eine langanhaltende und spezifische Haftung sowie eine spezifische Adhärenz bis zu 48 Stunden, während der Atto488 bereits nach 15 Minuten Waschen abgelöst wurde. Maßstabsbalken = 100 µm

4.3 Aktivierung des TrkB-Signalwegs bei Retinaexplantaten

Hinzukommend wurde das Ziel verfolgt, eine geeignete Konzentration von TrkB-Aptamer zur Aktivierung des BDNF-TrkB-Signalwegs zu ermitteln. Als Richtwert für die Ausgangskonzentration wurden die bereits publiziert 200nM verwendet⁶⁷. Zudem wurden drei weitere Konzentrationen getestet, die allerdings aufgrund mangelnder Erfolge wieder verworfen wurden.

Ein Nachweis für die Aktivierung des BDNF/TrkB-Signalweges durch die Bindung des TrkB-Aptamers an seinen Rezeptor erfolgte über die induzierte Expression von den entsprechenden nachgeschalteten Zielgenen des Signalweges (*HSP70*, *CNTF*, *bFGF*, *GDNF*).

Retinale Explantate wurden für 24 Stunden mit 200nM TrkB-Aptamer inkubiert und anschließend die mRNA-Expression der Zielgene mittels PCR analysiert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe führte die Behandlung mit dem TrkB-Aptamer zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Expression von *HSP70* (27-fach Anstieg, $p < 0,01$), *BDNF* (4-fach Anstieg, $p < 0,05$), *GDNF* (1,9-fach Anstieg, $p < 0,05$) und *bFGF* (4,9-fach Anstieg, $p < 0,01$) (Abbildung 14).

Die p21 (Waf1 / CIP1) mRNA-Expression war signifikant erhöht (6-fach Anstieg, $p < 0,001$). Eine Induktion von p21 führt zu einem Zellzyklusarrest^{84,85}. Die Expression von p21 wird ähnlich wie bei *HSP70* über den PI3K / Akt-Signalweg reguliert⁸⁶.

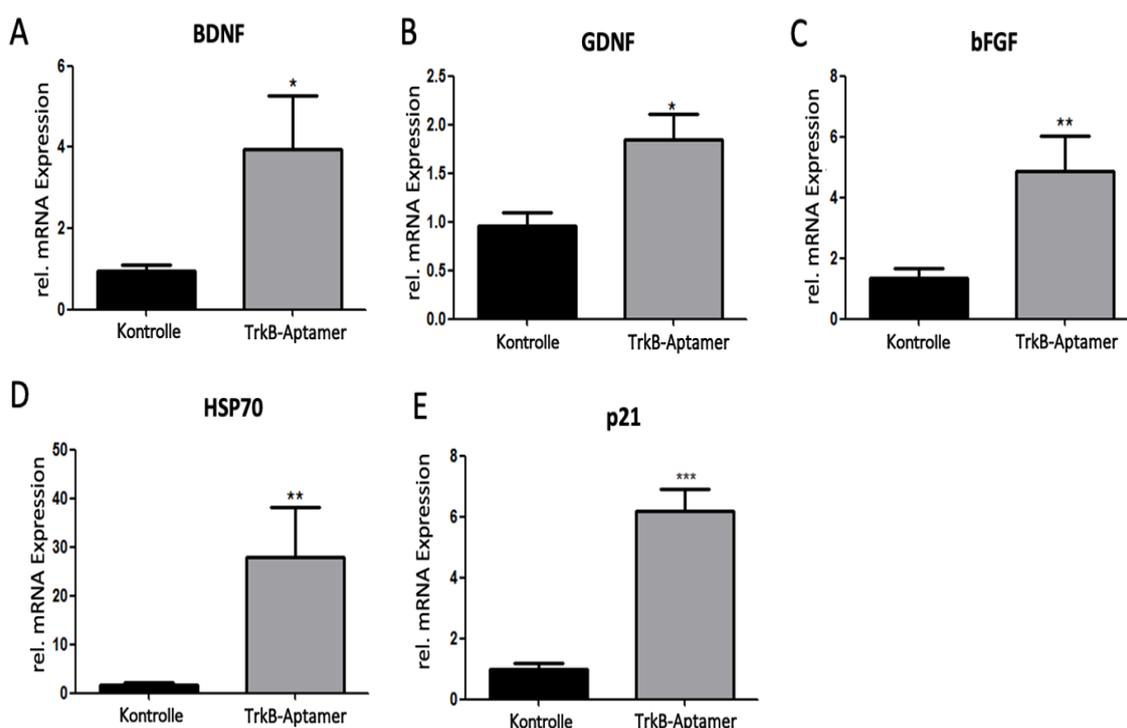


Abbildung 14: Behandlung mit dem TrkB-Aptamer führt zur Aktivierung des TrkB-Signalweges bei Retinaexplantaten

Nach 24 Stunden Inkubation mit 200nM TrkB-Aptamer war A) die *BDNF* mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe 4-fach ($p < 0,05$) erhöht. Auch die Zielgene B) *GDNF* und C) *bFGF* des TrkB-Signalweges waren durch die TrkB-Aptamer Inkubation signifikant erhöht. D) Ebenso war die mRNA des Hitzeschockproteins *HSP70* stark hochreguliert (27-facher Anstieg, $p < 0,01$). E) Die mRNA des Zellzyklus hemmenden *p21* Proteins wurde durch das TrkB-Aptamer induziert, was auf einen Zellzyklusarrest der retinalen Zellen hindeutet. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (n=8-12 aus 3 verschiedenen unabhängigen Experimenten)

4.4 Spezifität des TrkB-Aptamers

Basierend auf der gezeigten Spezifität des TrkB-Aptamers an dissoziierten retinalen Zellen, sollte nun auch anhand *ex-vivo* retinaler Explantate die spezifische Bindung des Aptamers im Vergleich zum Kontroll-Aptamer evaluiert werden.

Dazu wurden retinale Explantate für 24 Stunden entweder mit dem TrkB-Aptamer (200nM), dem Kontroll-Aptamer (200nM) oder als Positivkontrolle mit BDNF (10ng/mL) inkubiert. Als negative Kontrolle wurden unbehandelte retinale Explantate mitgeführt.

Die Inkubation mit dem TrkB-Aptamer führte zu einem erhöhten Anstieg der mRNA-Expression von zellspezifischen Markern, wie *Math5* (2,4-fach, $p > 0,05$), *Opsin* (10-fach, $p < 0,01$) und *Rhodopsin* (3-fach, $p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle. (Abbildung 15). Die Inkubation mit BDNF induzierte einen Anstieg der mRNA-Expression des neurotrophen Faktors *BDNF* (2,2-fach) wie auch die Inkubation mit dem Aptamer (2-fach). Beide Änderungen waren auch nicht signifikant. Es konnte beobachtet werden, dass die Inkubation mit BDNF zu einem nicht signifikanten ($p > 0,05$) Anstieg (1,5-fach) der mRNA-Expression von *Math* führte. Parallel konnte es nachgewiesen werden, dass BDNF einen 13-fachen ($p < 0,05$) Anstieg der Opsin-mRNA und 2,5-fachen ($p < 0,05$) Anstieg der Rhodopsin mRNA-Expression auslöst. Die Behandlung mit dem Kontroll-Aptamer (Ko-Apt) führte zu keiner Veränderung der Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Daraus lässt sich schließen, dass die beobachtete Wirkung des TrkB-Aptamers spezifisch auf die Aktivierung des TrkB-Rezeptors zurückzuführen ist (Abbildung 15).

In einem weiteren Schritt erfolgte die Untersuchung der Spezifität des Aptamers auf Proteinebene mittels Western Blot. Phosphoryliertes *ERK*, welches bei der Aktivierung der TrkB-Signalkaskade eine Rolle spielt⁸⁶, wurde untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Retinaexplantate auf die Inkubation mit TrkB-Aptamer mit einer signifikanten Steigerung der pERK Level reagierten (2,4-fach Anstieg, $p < 0,05$) (Abbildung 16).

Anschließend wurde bei den behandelten Retinaexplantaten mit dem fluoreszenzmarkierten TrkB-Aptamer (TrkB-Apt FAM), verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, eine erhöhte Expression von BDNF und dem TrkB-Rezeptor detektiert. Dies deutet auf eine Aktivierung des TrkB-Signalweges durch das TrkB-Aptamer hin und belegt weiterhin die Bindung des TrkB-Aptamers an den Rezeptor (Abbildung 17).

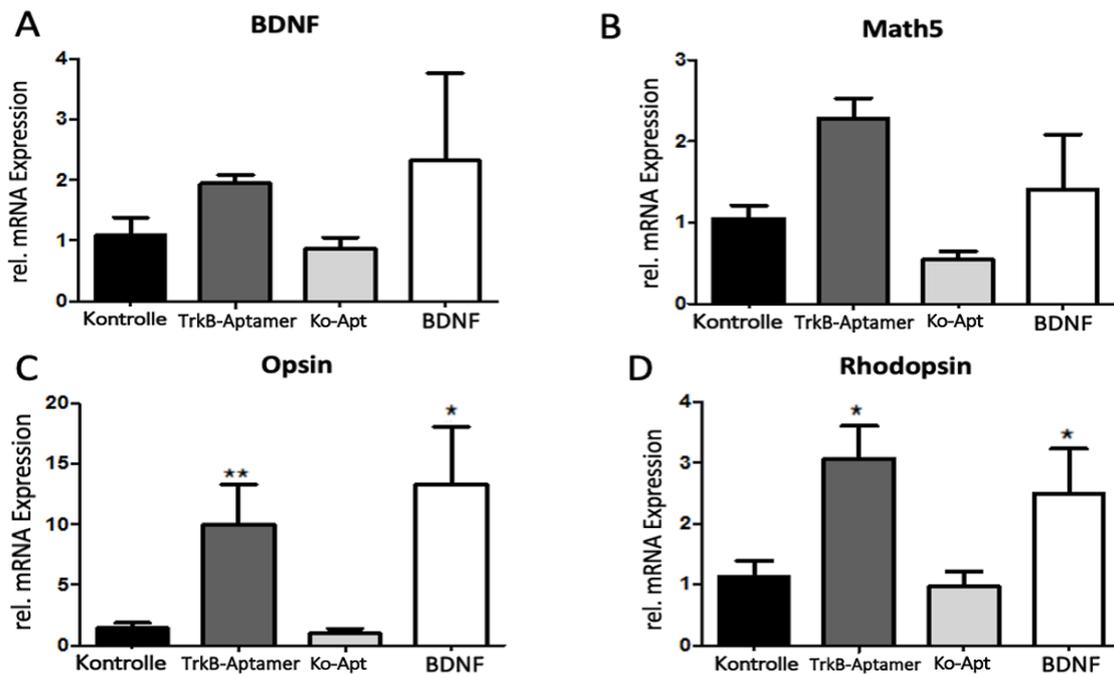


Abbildung 15: Nachweis der spezifischen Bindung des TrkB-Aptamers mittels PCR

A) TrkB-Aptamer und BDNF erhöhten jeweils 2- und 2,2-fach die mRNA-Expression des neurotrophen Faktors *BDNF* B) Im Gegensatz zu dem Kontroll-Aptamer (Ko-Apt) führte das TrkB-Aptamer zu einem 2,4-fachen Anstieg der mRNA-Expression des Ganglienzellmarkers *Math5* C) Es konnte nachgewiesen werden, dass TrkB-Aptamer und BDNF einen 10-fachen ($p < 0,01$) bzw. 13-fachen ($p < 0,05$) Anstieg der *Opsin*-mRNA auslöst, während $CoCl_2$ zu einer Reduktion der selben führte D) TrkB-Aptamer und BDNF induzierten jeweils einen 3-fachen ($p < 0,05$) und 2,5-fachen ($p < 0,05$) Anstieg der *Rhodopsin* mRNA-Expression. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (n=8-12 aus 3 verschiedenen unabhängigen Experimenten)

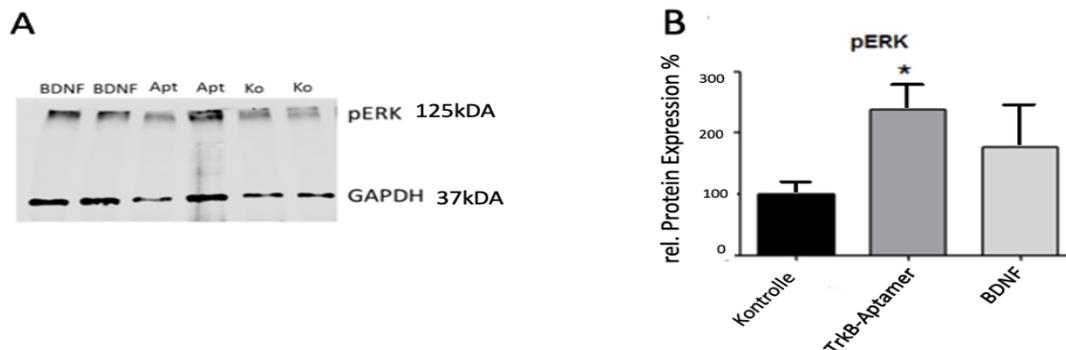
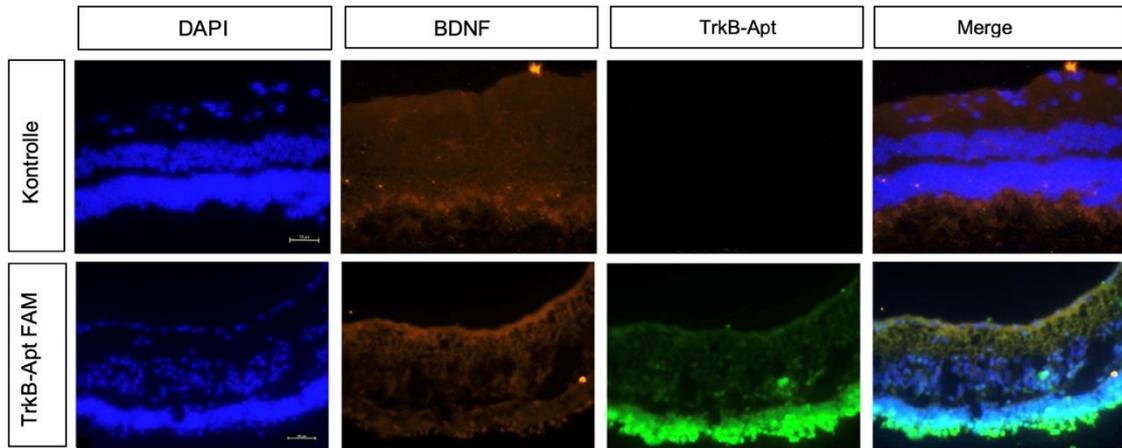


Abbildung 16: Im Gegensatz zur Inkubation mit BDNF erhöht das TrkB-Aptamer die Menge an phosphoryliertem ERK (pERK)

A) Nachweis *pERK* und *GAPDH*-Expression an Retinaexplantaten durch Western Blot B) *pERK* ist ein Bestandteil des TrkB-Signalweges⁸⁸. Die *pERK*-Expression ist nach

TrkB-Aptamer und BDNF-Exposition erhöht. Die Inkubation mit dem Aptamer bzw. BDNF induzierte eine Erhöhung der phosphorylierte Version des Proteins. (n=4)

A



B

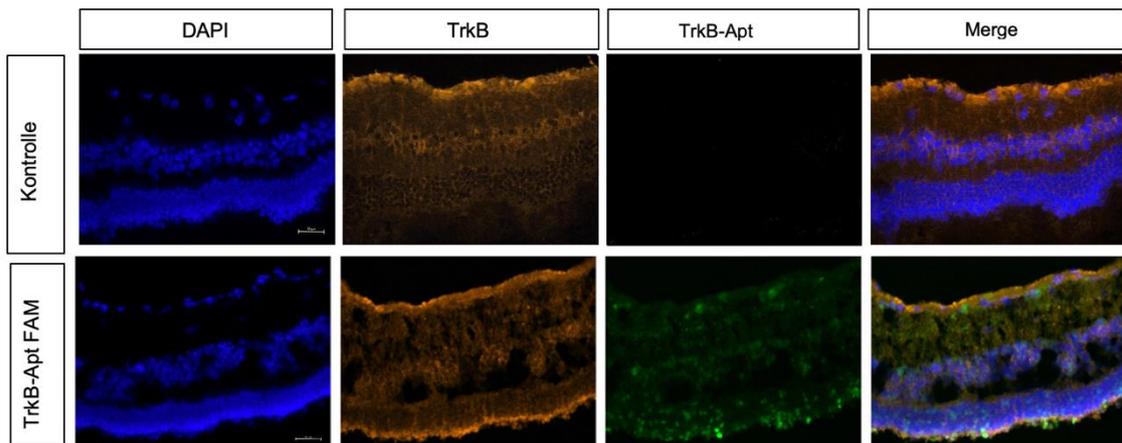


Abbildung 17: Nachweis der spezifischen Bindung des TrkB-Aptamers in Retina mittels Immunfluoreszenz

A) BDNF ist ein Bestandteil der TrkB-Signalkaskade. Der fluoreszenzmarkierte BDNF-Antikörper konnte bei den mit TrkB-Apt FAM behandelten Retinaexplantaten deutlich detektiert werden, während das Signal des gleichen Antikörpers bei den Kontrollen niedriger war. B) Mit dem TrkB-Aptamer FAM behandelte retinale Explantate zeigten eine erhöhte Expression des TrkB-Rezeptors, was das spezifische Binden des TrkB-Aptamers an den Rezeptor verdeutlicht. Maßstabsbalken= 50µm

4.5 TrkB-Aptamer hat einen neuroprotektiven Effekt nach längerer Inkubationszeit

Nachdem die Spezifität des TrkB-Aptamers bestätigt wurde, erfolgte eine Inkubation über mehrere Tage hinweg. Auf diese Weise konnte überprüft werden, über welchen Zeitraum der gewünschte neuroprotektive Effekt anhält. Statt einer Inkubationszeit von einem Tag wurden die Retinaexplantate mit dem TrkB-Aptamer, mit dem Kontroll-Aptamer, mit dem BDNF-Substrat und mit CoCl_2 für drei Tage inkubiert. Die Expression der mRNA der verschiedenen Marker (*Rhodopsin*, *Opsin*, *GFAP*, *TUBB3*, *bFGF*) (Abbildung 18) wies nach der Behandlung mit dem Kontroll-Aptamer keine Veränderung bzw. keinen positiven Effekt auf. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation der Retinaexplantate mit dem TrkB-Aptamer zu einer signifikanten, erhöhten Expression der mRNA von *Rhodopsin* (22-facher Anstieg, $p < 0,001$), *Opsin* (3,7-facher Anstieg, $p < 0,01$) und *GFAP* (2,9-facher Anstieg). Gleichermäßen wurde eine Zunahme der mRNA-Expression von *bFGF* (3,5-fach) und *TUBB3* (7-fach) nach TrkB-Inkubation aufgezeichnet, während die Wirkung von BDNF bei allen Markern nach drei Tagen deutlich weniger ausgeprägt war. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass aus der Langzeitinkubation mit dem TrkB-Aptamer ein neuroprotektiver Effekt resultiert, der darüber hinaus eine stärkere Ausprägung als der Effekt von BDNF-Substrat aufweist. (Abbildung 18)

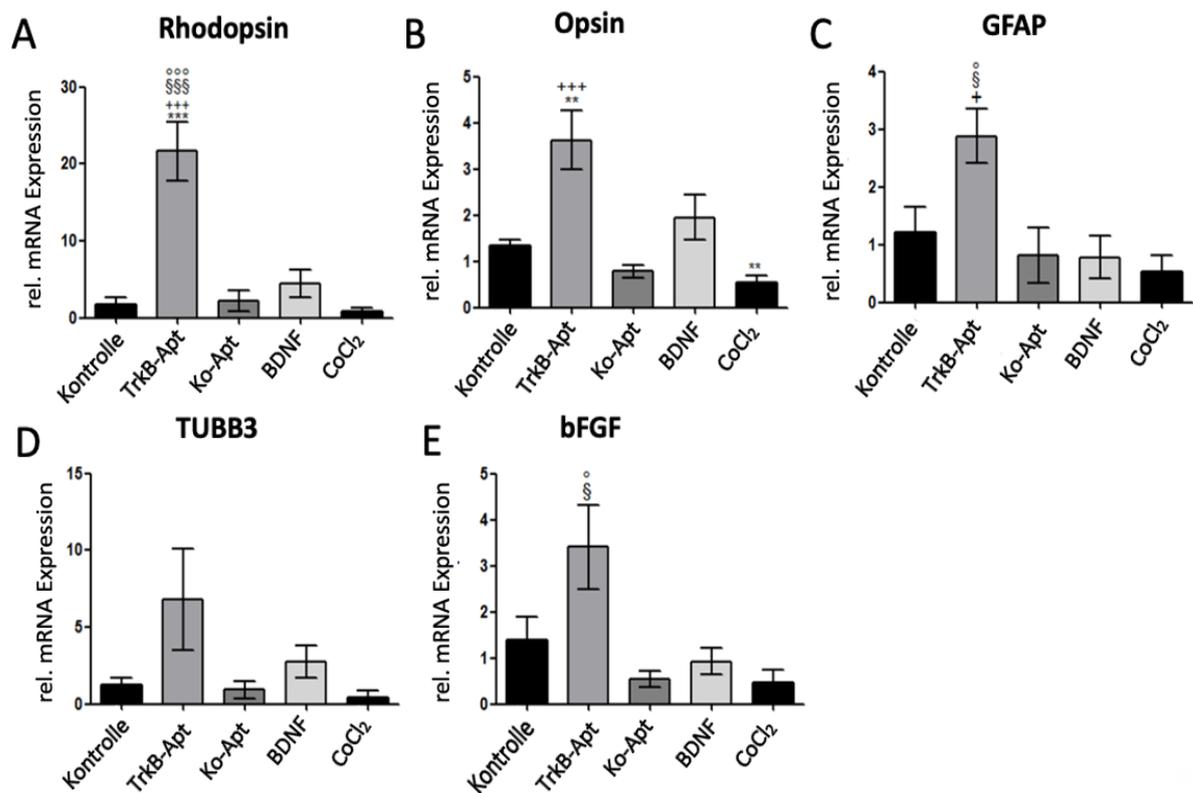


Abbildung 18: Die Langzeitinkubation retinaler Explantate mit dem TrkB-Aptamer resultierte in einem stärkerem neuroprotektiven Effekt als die Inkubation mit BDNF

A), B), C) Aus der Inkubation mit dem TrkB-Aptamer resultierte ein signifikanter Anstieg der *Rhodopsin* ($p < 0,001$), *Opsin* ($p < 0,01$) und *GFAP* ($p < 0,05$) mRNA-Expression, während das Kontroll-Aptamer (Ko-Apt) auch nach drei Tagen Inkubation keinen sichtbaren Effekt zeigte D) und E) Parallel konnte ein Anstieg der mRNA-Expression von *TUBB3* und *bFGF* nach der TrkB-Inkubation ermittelt werden, im Vergleich zu den Effekten von BDNF, die nach drei Tagen weniger ausgeprägt waren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. "*" im Vergleich zur Kontrolle, "§" im Vergleich zu BDNF; "+" im Vergleich zu CoCl₂; "°" im Vergleich zu Ko-Apt. (n=9-12 aus 3 verschiedenen unabhängigen Experimenten)

4.6 Das TrkB-Aptamer hat eine neuroprotektive Wirkung auf CoCl₂-geschädigte retinale Explantate

Nachdem sowohl die erfolgreiche Bindung des TrkB-Aptamers an dem Rezeptor bestätigt als auch seine Spezifität nachgewiesen wurde, galt es, den neuroprotektiven Effekt genauer zu überprüfen. Dazu wurden die Retinaexplantate durch CoCl₂ gestresst und auf diese Weise degeneriert. Der Versuch setzte sich – neben der Kontrollgruppe – aus fünf Vergleichsgruppen zusammen. Die ersten drei Vergleichsgruppen (I+II+III)

wurden für 48 Stunden ohne anschließende „Behandlung“ inkubiert und enthielten nur das Medium. Die Vergleichsgruppe I wurde mit CoCl_2 inkubiert, während die Vergleichsgruppe II nur mit dem TrkB-Aptamer sowie die Vergleichsgruppe III nur mit BDNF inkubiert wurde (Abbildung 19).

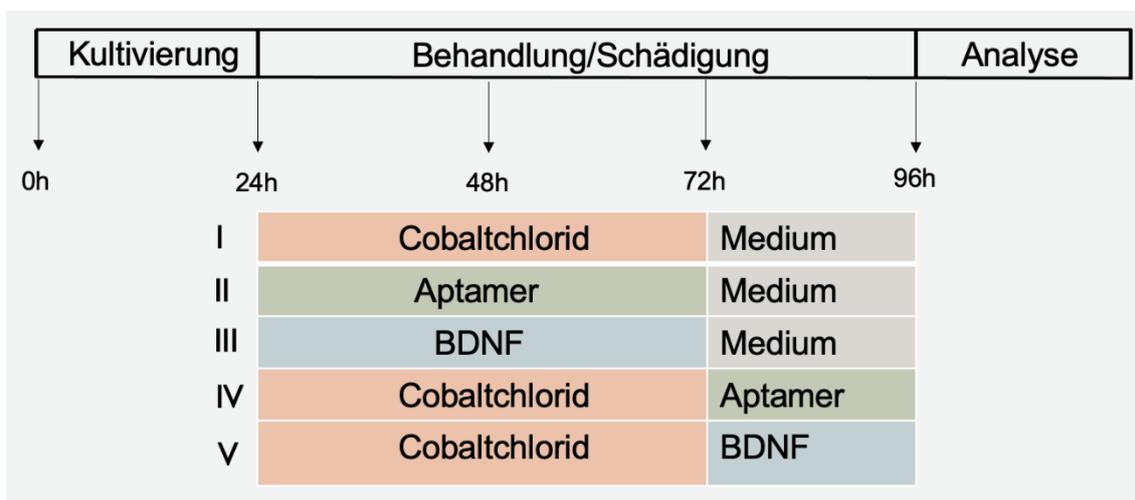


Abbildung 19: Versuchsaufbau

Die Explantate wurden nach 24 Stunden Kultivierung im Medium entweder behandelt (mit TrkB-Aptamer oder BDNF) oder geschädigt (mit CoCl_2). Nach 48 Stunden Inkubation wurde bei den Explantaten der Gruppe I-III, die jeweils lediglich eine Behandlung erhalten hatten, das Medium gewechselt. Bei den übrigen Gruppen (IV+V) erfolgte eine weitere Behandlung mit Aptamer oder BDNF. Alle Explantate wurden nach weiteren 24 Stunden eingefroren und standen somit bereit für die weitere Analyse.

Im Anschluss wurden verschiedene zelltypspezifische und neurotrophe Marker untersucht. Die Inkubation und Schädigung mit CoCl_2 über 48 Stunden führte bei den zellspezifischen Markern (*Rhodopsin*, *TUBB3* und *GFAP*) zu einer 2,5-fachen Reduktion der *Rhodopsin* mRNA-Expression, 2-fachen Reduktion der *TUBB3* mRNA-Expression und 4-fachen Reduktion der *GFAP* mRNA-Expression, was wiederum erneut das Schädigungsmodell bestätigt. Die mRNA-Expression der Zelltypmarker stieg – ähnlich wie bei der Behandlung mit dem BDNF – nach der Behandlung mit dem TrkB-Aptamer deutlich an, wobei die Wirkung des Aptamers stärker war oder länger andauerte als die von BDNF. Die Behandlung mit dem TrkB-Aptamer nach der CoCl_2 Schädigung führte zu einer 3,6-fachen *Rhodopsin* Induktion, bei *TUBB3* zu einer 1,4-fachen Induktion und bei *GFAP* zu einer 1,8-fachen Induktion der mRNA-Expression, was die neuroprotektive Wirkung des Aptamers auf Ganglien-, Müller- und Photorezeptorzellen beweist. Die

mRNA-Expression von *Rhodopsin* und *TUBB3* Markern war bei Schädigung durch CoCl_2 und anschließender Behandlung mittels BDNF im Vergleich zur Kontrolle 3-fach bzw. 3,1-fach erhöht, während die mRNA-Expression von *GFAP* reduziert blieb.

Bei den neurotrophen Faktoren *CNTF*, *GDNF* und *bFGF* erzielte ebenfalls die Behandlung mit CoCl_2 eine Abnahme der mRNA-Expression. Im Gegensatz führte die Behandlung mit dem TrkB-Aptamer zu einem 1,9-fachen Anstieg der *CNTF* mRNA-Expression, 7,1-fachen ($p < 0,05$) Anstieg der *GDNF* mRNA-Expression und 6-fachen Anstieg der *bFGF* mRNA-Expression. Bei den CoCl_2 -geschädigten Proben wurde nochmals die neuroprotektive Wirkung des TrkB-Aptamers mit einem 1,8-fachen Anstieg der *CNTF*, 4,9-fachen Anstieg der *GDNF* und 1,1-fachen *bFGF* der mRNA-Expression bestätigt. Ähnliche Ergebnisse ergeben sich auch nach der BDNF-Behandlung bei den CoCl_2 -geschädigten Proben. (*Abbildung 20*).

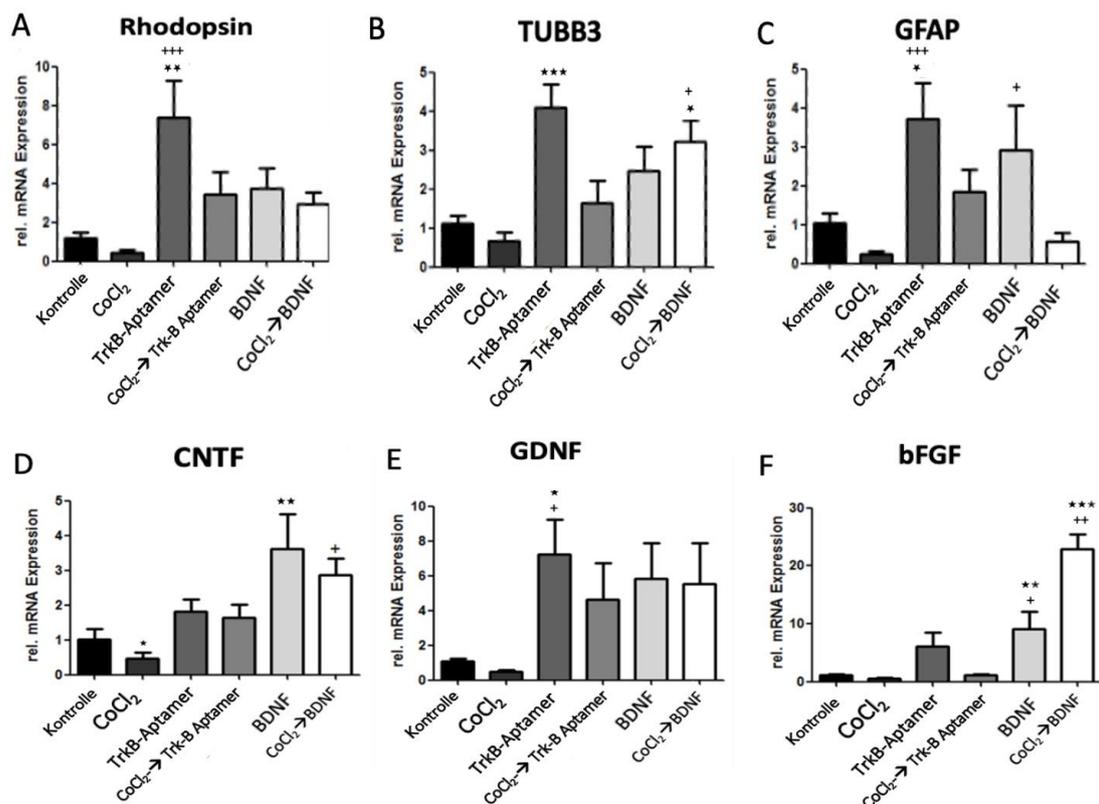


Abbildung 20: Bei mit CoCl₂-geschädigten retinalen Explantaten hatte die anschließende Inkubation mit dem TrkB-Aptamer den stärksten neuroprotektiven Effekt

A) Aus der Behandlung mit dem TrkB-Aptamer resultierte ein 7,5-facher ($p < 0,01$) Anstieg der *Rhodopsin*- mRNA-Expression, ähnlich wie bei der Behandlung mit BDNF (3,8-facher Anstieg). Die Inkubation mit CoCl₂ führte im Gegensatz dazu zu einer 2,5-fachen Reduktion der mRNA. Bei den CoCl₂-geschädigten Proben erhöhte die Behandlung mit dem TrkB-Aptamer und mit BDNF die mRNA-Expression im Vergleich zu der Kontrolle (3,6-facher Anstieg der mRNA-Expression bei dem TrkB-Aptamer und 3-facher Anstieg der mRNA-Expression bei dem BDNF).

B) Die Behandlung mit dem TrkB-Aptamer induzierte 4-fach ($p < 0,001$) die *TUBB3* mRNA-Expression, während die Behandlung mit BDNF zu einer 2,8-fachen Induktion der mRNA- Expression führte. Die Schädigung mit CoCl₂ über 48 Stunden führte zu einer 2-fachen Abnahme der mRNA-Expression. Bei den CoCl₂-geschädigten Proben wurde nochmals die neuroprotektive Wirkung des TrkB-Aptamers mit einem 1,4-fachen Anstieg der mRNA-Expression bestätigt. Ähnliche Ergebnisse ergeben sich auch nach der BDNF-Behandlung bei den CoCl₂ geschädigten Proben (3-facher Anstieg der mRNA-Expression, $p < 0,05$).

C) Die mRNA-Expression des Müllerzellmarkers *GFAP* stieg 3,8-fach ($p < 0,05$) nach der TrkB-Behandlung. Die CoCl₂-Behandlung reduzierte im Gegensatz 4-fach die mRNA-Expression. Auch für die *GFAP*-mRNA wurde der neuroprotektive Effekt des TrkB-Aptamers bei den CoCl₂-geschädigten Proben bestätigt (1,8-facher Anstieg der mRNA-

Expression). Die Schädigung durch CoCl_2 sowie die anschließende Behandlung mittels BDNF reduzierte die mRNA-Expression leicht (2-fache Abnahme der mRNA-Expression)

D), E) und F) Bei den neurotrophen Faktoren *CNTF*, *GDNF* und *bFGF* stieg die mRNA-Expression nach der Behandlung mit dem TrkB-Aptamer und mit BDNF. Die entgegengesetzten Ergebnisse erzielte die CoCl_2 -Behandlung, bei der ein Abfall der mRNA-Expression zu beobachten war. Bei den CoCl_2 -geschädigten Proben erhöhte die Inkubation mit dem TrkB-Aptamer und BDNF die mRNA-Expression im Vergleich zu der Kontrolle. Bezüglich *bFGF* konnte bei der Kombination aus CoCl_2 und BDNF ein sehr ausgeprägter Effekt beobachtet werden.

„+“ in Bezug auf CoCl_2 , „*“ in Bezug auf die Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (n=8-12 aus 3 verschiedenen unabhängigen Experimenten)

Weitere Untersuchungen erfolgten mittels Immunfluoreszenz, um den neuroprotektiven Effekt des TrkB-Aptamers zu überprüfen. Dabei wurde der Müllerzellmarker *GFAP* evaluiert, da dieser nicht nur ein Marker für die Müllerzellen ist, sondern auch für die Reaktivität der Müllerzellen steht. Während bei der Kontrolle *GFAP*-Expression nachgewiesen werden konnte, führte die Inkubation mit CoCl_2 zu einem Verlust des Markers, was die Schädigung belegt. Die Schädigung durch CoCl_2 sowie die anschließende Behandlung mittels fluoreszenzmarkierten TrkB-Aptamer erhöhte deutlich die *GFAP*-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung mit BDNF hat keinen Effekt auf die *GFAP*-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung CoCl_2 -geschädigter retinaler Explantate mit BDNF resultierte zwar, verglichen mit den CoCl_2 -geschädigten retinalen Explantaten, eine deutlich verstärkte *GFAP*-Expression, jedoch war jene diffuser und abgeschwächer als bei den geschädigten und mit TrkB-Aptamer behandelten retinalen Explantaten. Diese histologische Untersuchung unterstreicht daher die bisherigen Daten, welche vor allem der Behandlung mit dem TrkB-Aptamer einen starken neuroprotektiven Effekt zuschreiben. (Abbildung 21)

Die Expression vom *GFAP*-Marker konnte besser mittels Mosaikaufnahmen der ganzen Retina festgestellt werden. Mit überlappenden Aufnahmen (Kachel-Bilder) konnte daraus ein Mosaik erstellt und somit die ganze Retina dargestellt werden. (Abbildung 22)

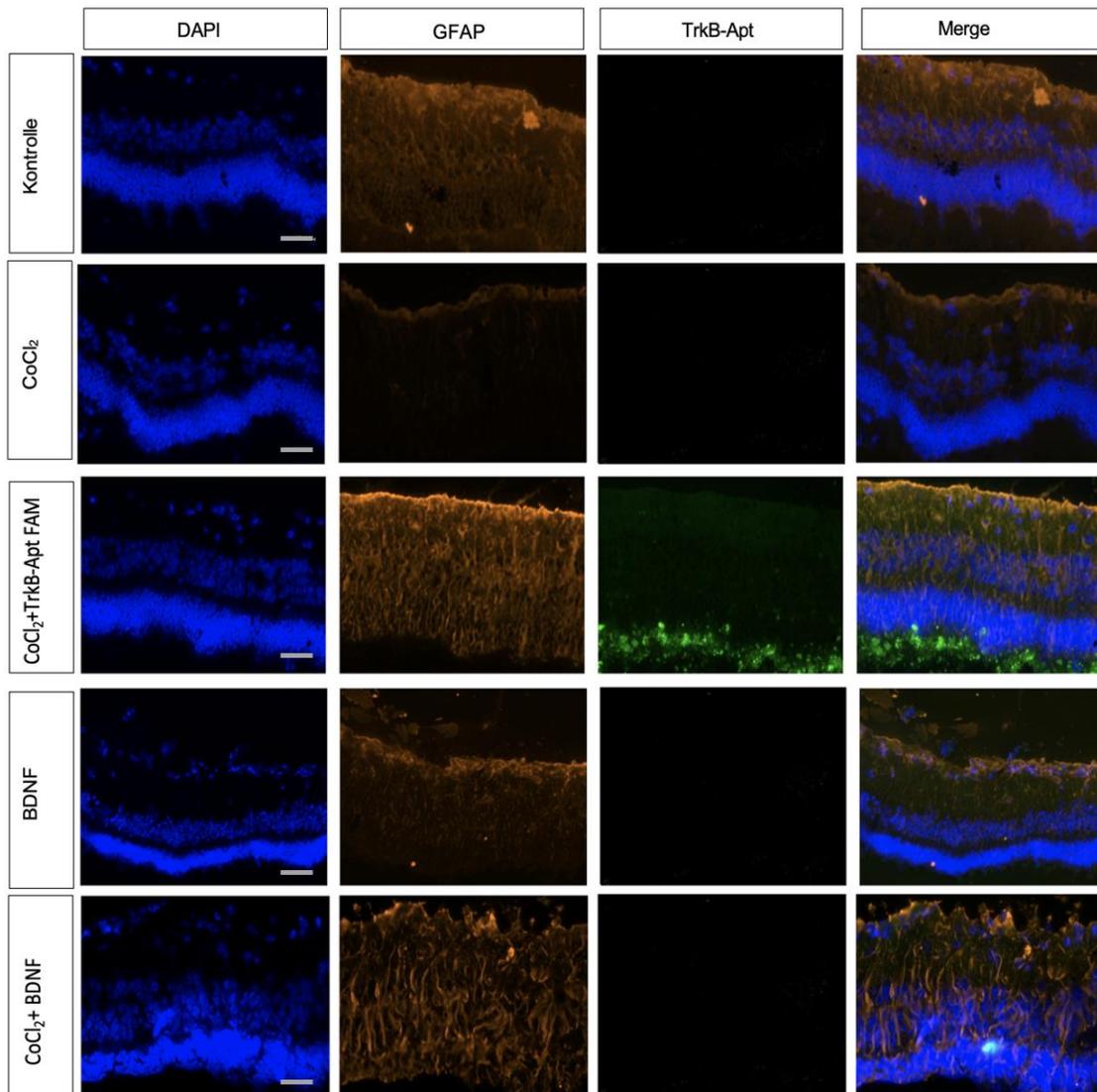
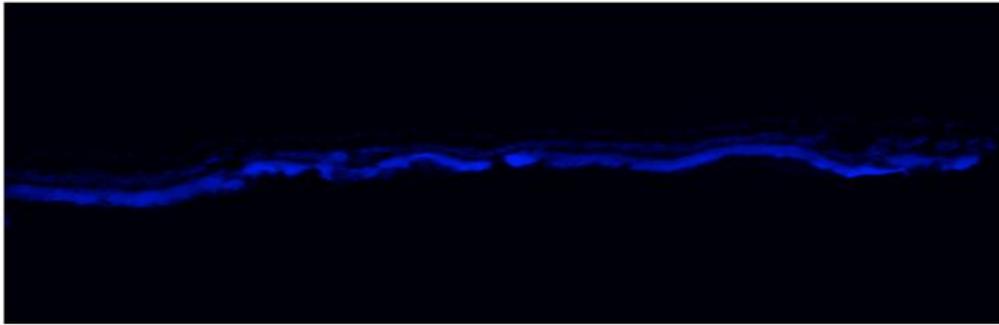


Abbildung 21: Die Behandlung mit TrkB-Aptamer an CoCl₂-geschädigten retinalen Explantaten zeigte einen stärkeren neuroprotektiven Effekt des TrkB-Aptamers auf Müllerzellen im Vergleich zur Behandlung mit BDNF

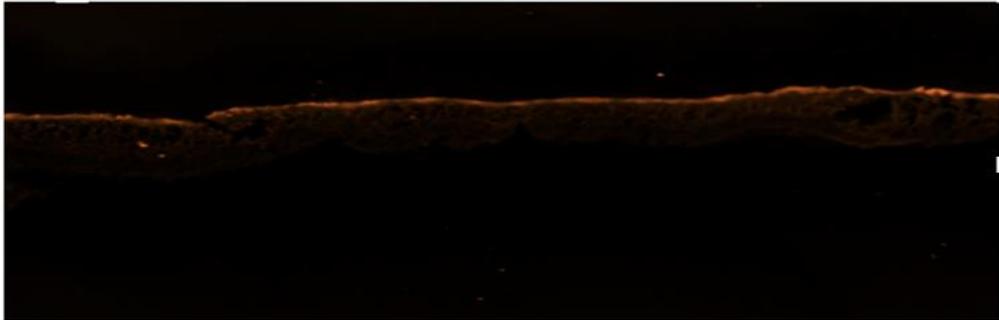
Repräsentative Fluoreszenzbilder von Retinaexplantaten, die nach dem in Abbildung 19 beschriebenen Schema behandelt wurden. Die Schnitte wurden mit DAPI (blau) und GFAP (rot) gefärbt. Der *GFAP*-Müllerzellmarker konnte bei den mit TrkB-Apt FAM behandelten Retinaexplantaten deutlich detektiert werden, während das Signal des gleichen Antikörpers bei den Kontrollen niedriger war. Die CoCl₂ führte im Gegensatz zu einer verminderten *GFAP*-Expression an Retinaexplantaten. Bei den CoCl₂-geschädigten Proben erhöhte die Behandlung mit dem TrkB-Aptamer die *GFAP*-Expression im Vergleich zu der Kontrolle, was nicht der Fall war, bei der BDNF-Behandlung. Maßstabsbalken= 50µm

Kontrolle

DAPI



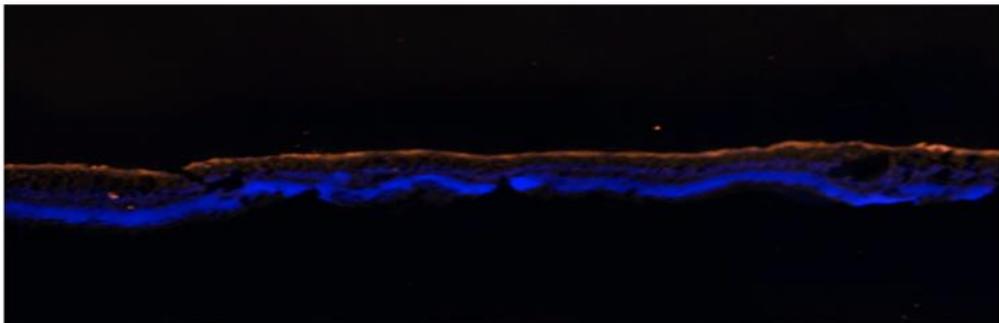
GFAP



TrkB-Apt FAM

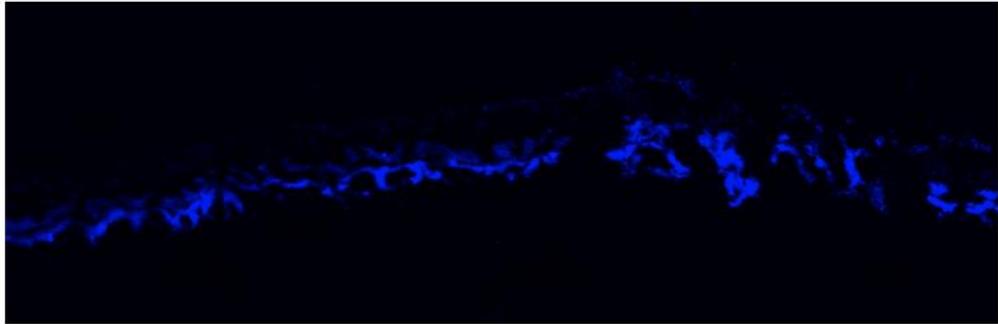


Merge



CoCl₂

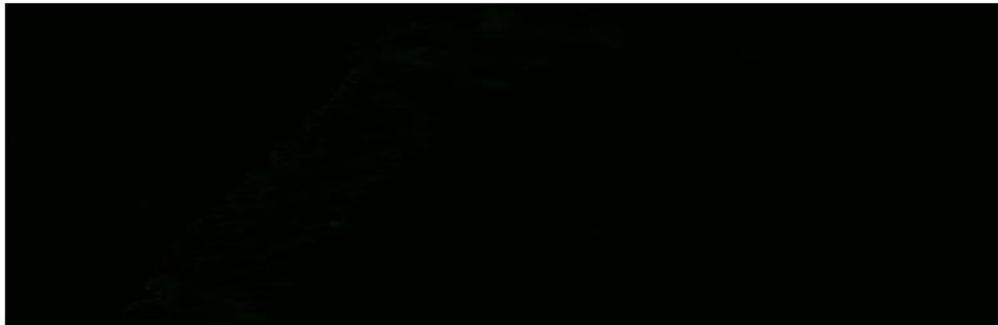
DAPI



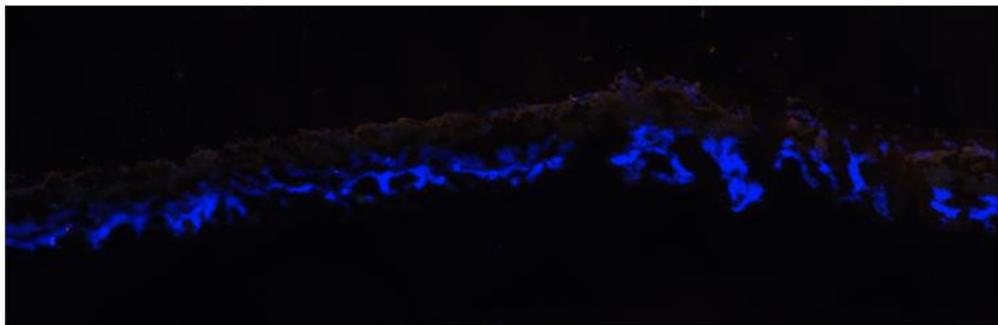
GFAP



TrkB-Apt FAM



Merge



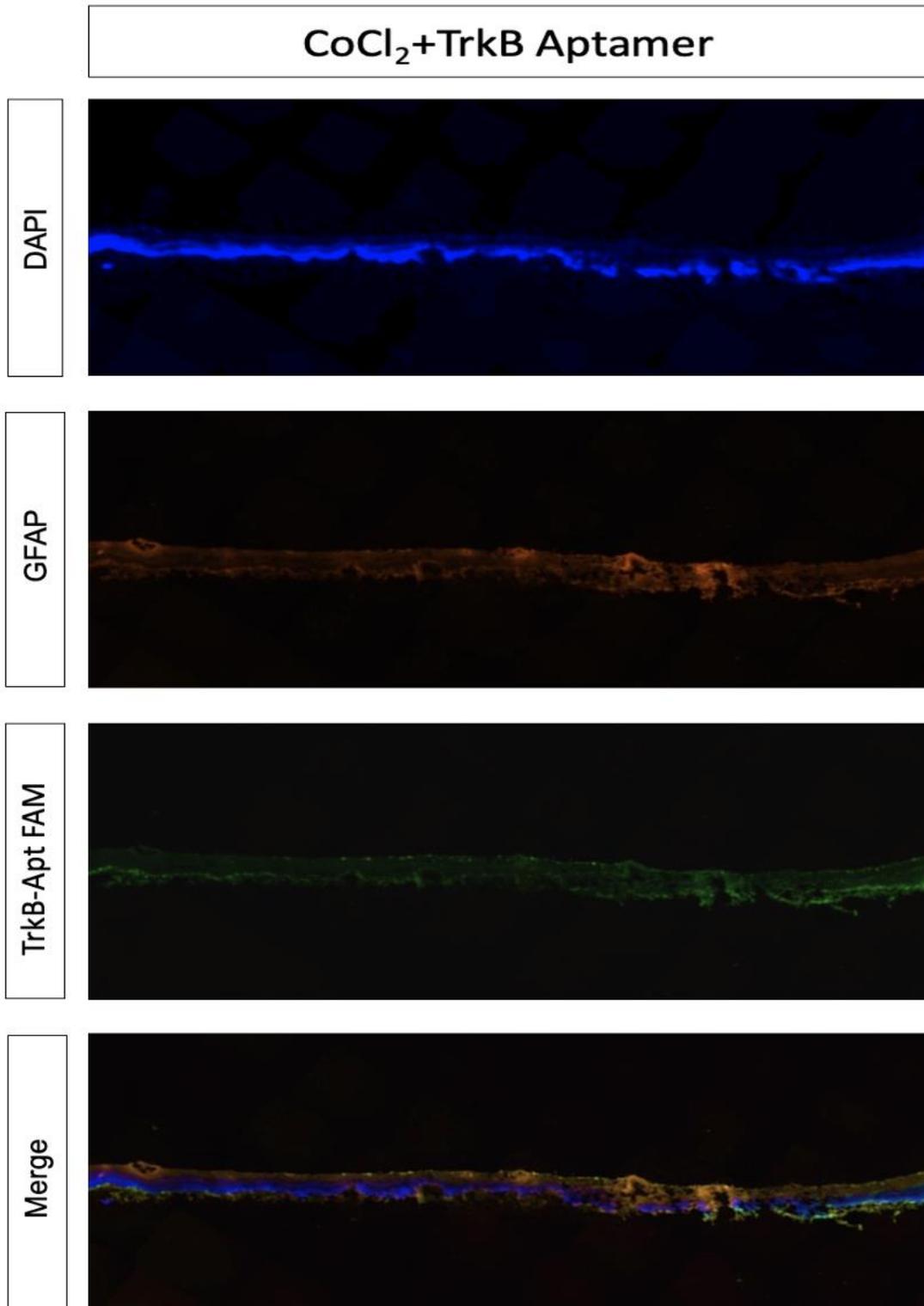


Abbildung 22: Neuroprotektiver Effekt des TrkB-Aptamers nach CoCl₂ induzierter Schädigung mittels Immunfluoreszenz-Mosaik-Aufnahmen

Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die Schädigung durch CoCl₂ deutlich zur verminderten *GFAP*-Expression führte. Außerdem konnte beobachtet werden, wie stark geschädigt die Retinae sind, nach der COCl₂-Exposition. Bei den CoCl₂-geschädigten

Proben wurde nochmals die neuroprotektive Wirkung des TrkB-Aptamers mit einem Anstieg der *GFAP*-Expression bestätigt.

Zum Abschluss folgte die Untersuchung des neuroprotektiven Effekts des TrkB-Aptamers an ungeschädigten und geschädigten retinalen Explantaten auf Proteinebene mittels Western Blot. Das Hitzeschockprotein *HSP70*, ein Marker für die TrkB-Signalkaskade, wurde untersucht. Zusätzlich wurde β -3-Tubulin (*TUBB3*) und *IL-1 β* (*IL-1beta*) untersucht. *IL-1 β* , welches auf ein inflammatorisches Geschehen hinweist, diente als Stressmarker⁸⁴. Die Inkubation mit TrkB-Aptamer führte zu einer Steigerung der relativen Expression von *HSP70* um das 2,8-fache im Vergleich zu Kontrollen ($p < 0,01$). Bei den CoCl_2 -geschädigten Proben führte die Behandlung mit dem TrkB-Aptamer zu einer Steigerung der relativen Expression von *HSP70* um das 2,9-fache gegenüber den Kontrollen ($p < 0,001$). Die Inkubation mit CoCl_2 führte zu keiner Veränderung der Proteinexpression (*Abbildung 23 A+B*). Die Untersuchung der *TUBB3*-Expression an Retinaexplantaten zeigte einen 1,2-fachen Anstieg nach TrkB-Aptamer-Exposition, während die CoCl_2 -Behandlung die gegenteilige Wirkung hatte. Bei den CoCl_2 -geschädigten Proben wurde nochmals die neuroprotektive Wirkung des TrkB-Aptamers mit einem 1,4-fachen Anstieg der *TUBB3*-Expression bestätigt (*Abbildung 23 C+D*). Bei der CoCl_2 -Behandlung konnte ein signifikanter Einfluss auf die *IL-1beta* Expression (6-fach) gefunden werden, was erneut die schädigende Wirkung von CoCl_2 an Retinaexplantaten bestätigt. Die *IL-1beta* Expression war nach TrkB-Aptamer-Exposition und doppelter Behandlung (CoCl_2 und dann Aptamer) auch erhöht im Vergleich zur Kontrolle (*Abbildung 24*).

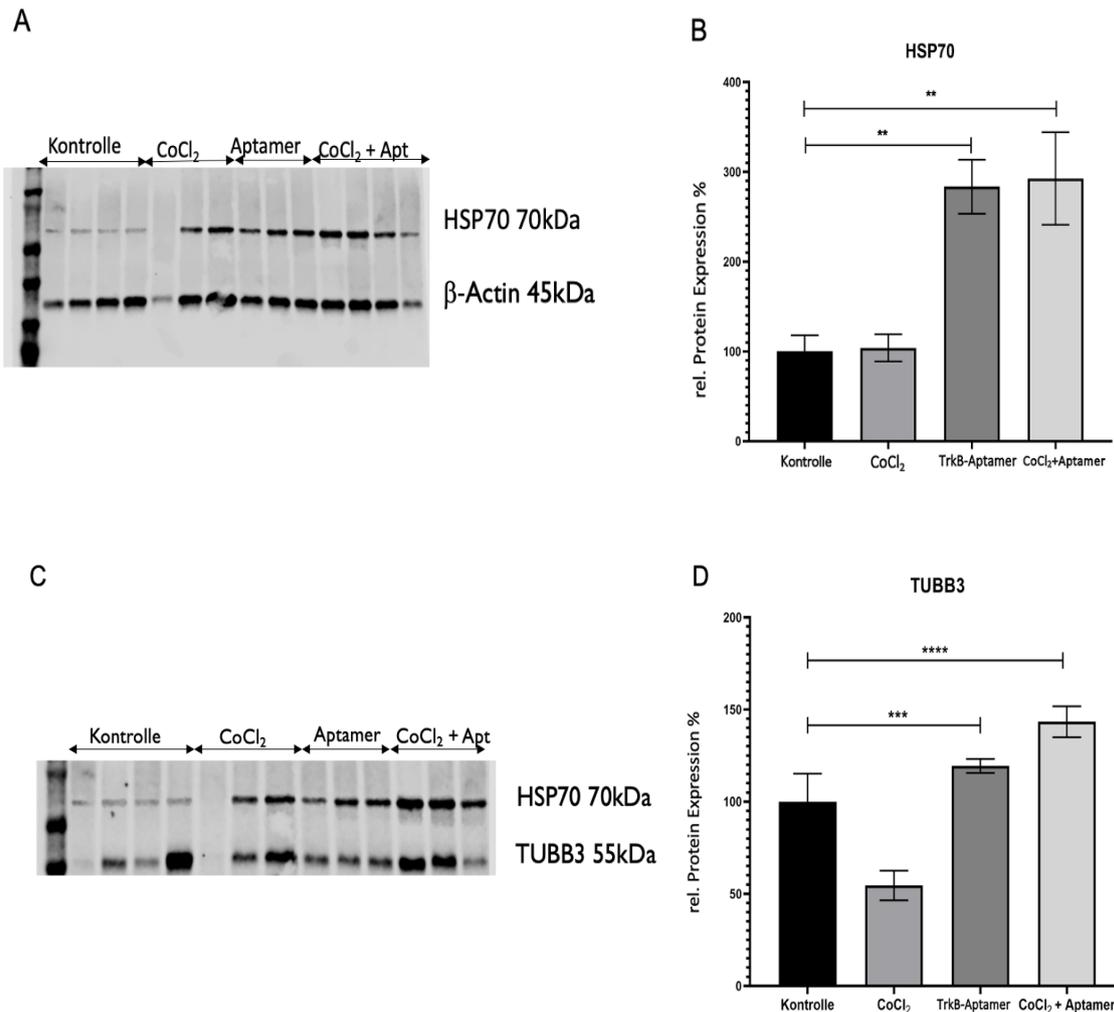


Abbildung 23: Neuroprotektiver Effekt des TrkB-Aptamers nach CoCl₂ induzierter Schädigung mittels Western Blot

A) Nachweis *HSP70* und β -Actin Expression an Retinaexplantaten durch Western Blot. Proteine wurden mit spezifischen Primärantikörpern und fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern nachgewiesen. B) Sowohl die Behandlung mit dem TrkB-Aptamer als auch die doppelte Behandlung (CoCl₂ und dann Aptamer) verursachten einen Anstieg der *HSP70* Expression. Für die COCl₂-Inkubation konnte kein Effekt gezeigt werden.

C) Nachweis *HSP70* und *TUBB3*-Expression an Retinaexplantaten durch Western Blot. Proteine wurden mit spezifischen Primärantikörpern und fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern nachgewiesen. D) Aus der Behandlung mit dem TrkB-Aptamer resultierte einen signifikanten Anstieg der *TUBB3*- Expression im Vergleich zur Kontrolle. Ähnliche Ergebnisse ergeben sich auch nach der TrkB-Aptamer Behandlung bei den CoCl₂-geschädigten Proben mit einem 1,4-fachen Anstieg der *TUBB3*-Expression. Im Gegensatz zeigte die Untersuchung der *TUBB3*-Expression bei COCl₂-geschädigten Proben eine Reduktion.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (n=6).

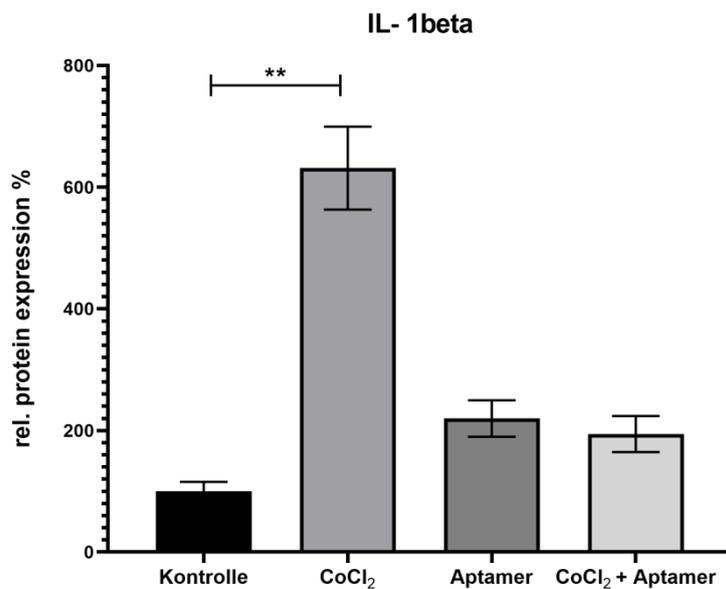


Abbildung 24: Kompensation des CoCl₂ induzierten Schadens durch die TrkB-Aptamer Behandlung nach dem Nachweis von Interleukin (*IL-1beta*).

Eine deutlich erhöhte *IL-1beta* Expression (6-fach, $p < 0,01$) nach Behandlung mit CoCl₂ konnte ermittelt werden. Sowohl Die Schädigung durch CoCl₂ mit der anschließenden Behandlung mittels TrkB als auch allein die TrkB-Behandlung führten zu einer Erhöhung der *IL-1beta* Protein Expression im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ** $p < 0.01$ (n=6).

5. Diskussion

5.1 Überblick der Ergebnisse

Aptamere finden in unterschiedlichsten Forschungsfeldern Anwendung. Aufgrund ihrer Spezifität, Stabilität und Vielseitigkeit spielen sie zukünftig als klinische Diagnostika und Therapeutika eine wesentliche Rolle⁸⁷. Es lässt sich generell sagen, dass Aptamere eine geringe Toxizität zeigen⁸⁸. Trotzdem waren, bevor das TrkB-Aptamer zur Anwendung kommen konnte, zunächst umfangreiche toxikologische Untersuchungen *in-vitro* nötig, um so mögliche schädliche Wirkungen des Aptamers auf retinale Zellen auszuschließen. An dieser Stelle muss nochmals betont werden, dass das TrkB-Aptamer noch nie in der Retina getestet wurde. Als ideale Konzentration für das TrkB-Aptamer konnte eine Konzentration von 200nM von Huang et al. ermittelt werden⁶⁷, was auch durch unsere Vorversuche weiterhin belegt wurde. Sowohl mittels MTS-Assay und

Kristallviolett färbung als auch mittels PCR und Western Blot konnten für das TrkB-Aptamer keine Anhaltspunkte auf mögliche schädliche Wirkungen erbracht werden (*Abbildung 8,9 und 10*). Entgegen dessen stieg die Expression der untersuchten Zellmarker *TUBB3, Calbindin, Opsin und Rhodospin* unter Behandlung mit dem TrkB-Aptamer im Vergleich zu den unbehandelten Retinas an (*Abbildung 9*).

Die neuroprotektive Wirkung des TrkB-Aptamers wurde nochmal mithilfe eines CoCl_2 -Degenerationsmodells, dass eine Schädigung an den retinalen Explantaten verursacht, bestätigt. Hypoxie ist ein Hauptauslöser des Pathomechanismus bei den untersuchten Netzhauterkrankungen. Um ein Degenerationsmodell für Hypoxie zu erstellen und damit eine Netzhautdegeneration in der Organkultur zu simulieren, wurde Kobaltchlorid (CoCl_2) verwendet⁷³. Als grundlegend galt, dass CoCl_2 in der Konzentration von $300\mu\text{M}$ eine starke Degeneration der Schweine-Retina induziert⁷³, weshalb genau diese Konzentration gewählt wurde. Mittels PCR konnte davon ausgegangen werden, dass die Inkubation mit dem CoCl_2 zur Schädigung geführt hat (*Abbildung 10,18 und 20*). Es konnte außerdem belegt werden, dass die Behandlung mit dem TrkB-Aptamer eine deutlich neuroprotektive Wirkung erzielt (*Abbildung 9,10,11,14,15,16,18 und 20*).

Neben der in den Versuchen nachgewiesenen neuroprotektiven Wirkung mittels des CoCl_2 -Degenerationsmodells, besteht darüber hinaus ein zukünftiger Forschungsbedarf bezüglich der Wirksamkeit des TrkB-Aptamers an einem zweiten Degenerationsmodell, welches oxidativen Stress und Licht-induzierte Schädigung *ex-vivo* und *in-vivo* verursacht.

In den angestellten Experimenten konnte der Erfolg der Bindung bzw. Aktivierung des BDNF/TrkB-Signalweges *in-vitro* nach der Behandlung mit dem TrkB-Aptamer über den Nachweis von Genen (*HSP70, CNTF, bFGF, GDNF* usw.) der Signalkaskade beobachten werden (*Abbildung 14*). Dieser Nachweis gelang nach bisherigem Kenntnisstand zuvor noch nie. Unter Verwendung des Kontroll-Aptamers (Ko-Apt) konnte im Anschluss die Spezifität des TrkB-Aptamers sowohl mittels PCR und Western Blot (*Abbildung 15 und 16*) als auch mit Immunfluoreszenz überprüft werden (*Abbildung 17*). Gleichzeitig wurde als Positivkontrolle die Behandlung mit BDNF durchgeführt⁸⁹(*Abbildung 15*). Huang et al. konnten ebenfalls *in-vivo* nachweisen, dass das TrkB-Aptamer an die Ektodomäne von TrkB bindet sowie potenziell und selektiv die TrkB-Signalübertragung in kortikalen Neuronen aktiviert⁶⁷. Die Testung erfolgte an erwachsenen Mäusen. Biochemische und elektrophysiologische Messungen sowie

Verhaltensmessungen haben gezeigt, dass das Aptamer das TrkB im Gehirn von Mäusen *in-vivo* aktivieren kann. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass das Aptamer ein potenziell wesentliches therapeutisches Reagenz zur Modulation der Aktivierung von TrkB bei verschiedenen ZNS-Erkrankungen sein kann⁶⁷.

Ein zentraler begrenzender Faktor für den erfolgreichen Einsatz von BDNF und seinen Mimetika bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen ist der Langzeiteffekt. Obwohl eine intravitreale Injektion von BDNF als geeigneter Ansatz vorgeschlagen wird, wurden einige wichtige Nachteile beobachtet. In der vorübergehenden Wirkung einer einzelnen intravitrealen Injektion von BDNF zeigt sich die größte Limitation⁹⁰. Um langanhaltende Wirkungen von BDNF zu erzielen, ist der Gentransfer auf Ziel-Netzhautzellen eine effektive Methode. Das rekombinante Adeno-assoziierte Virus (AAV), welches BDNF-cDNA enthält, wurde eingesetzt, um das BDNF-Gen effizient auf Müller- und Ganglienzellen in der Netzhaut zu übertragen. Trotzdem kann die Expressionseffizienz je nach Zelltyp und Promotor schwanken⁹¹. Aufgrund dessen zeigt sich die Verwendung von Aptameren und die dadurch direkte Stimulation des TrkBs als eine Lösung bezüglich der oben beschriebenen Problematik. In einem ersten Schritt erfolgte demnach in der vorliegenden Arbeit die Überprüfung der Verweildauer des TrkB-Aptamers innerhalb von 48 Stunden. Das TrkB-Aptamer zeigte nach 30 Minuten eine ausgezeichnete und langhaltende Adhärenz, ebenso nach 2 Stunden an primären dissoziierten retinalen Zellen sowie nach bis zu 48 Stunden an den Retinaexplantaten. Die obigen Ergebnisse bestätigen die langhaltende Wirkung von TrkB-Aptamer, damit ebenso, dass eine langanhaltende Wirkung von BDNF erzielt werden kann. Das Kontroll-Aptamer (Ko-Apt) oder der Atto488 Farbstoff hingegen waren bereits nach wenigen Minuten nicht mehr detektierbar (*Abbildung 12 und 13*).

In einem weiteren Schritt konnte mittels qRT-PCR-Analyse nachgewiesen werden, dass eine längere Inkubation von drei Tagen mit einem TrkB-Aptamer zu einem neuroprotektiven Effekt führt. Die TrkB-Aptamer-Behandlung hat einen induzierenden Effekt auf die mRNA-Expression der getesteten Photorezeptor-, retinalen Ganglien- und Müllerzellenmarker (*Abbildung 18*). Obwohl der TrkB-Rezeptor von den Photorezeptoren nicht exprimiert wird, führte die TrkB-Behandlung zu einem Anstieg der mRNA-Expression der Photorezeptorenmarker (*Rhodospin* und *Opsin*). Ein möglicher Grund dafür liegt in dem aktivierten BDNF-TrkB Signalweg. Das TrkB-Aptamer bindet an den TrkB-Rezeptor. Hierdurch wird der neuroprotektive Effekt von BDNF imitiert. Die neuroprotektive Wirkung von BDNF auf retinale Ganglienzellen ist mehrfach publiziert,

selbst bei einer indirekten Versorgung über die Müllerzellen⁵⁴⁻⁵⁵(*Abbildung 5*). Die Aktivierung des TrkB-Aptamers auf die Müllerzellen führt zur Produktion von Wachstumsfaktoren (*NGF, GDNF, BDNF, CNTF und bFGF*), die sich als äußerst relevant für das Überleben der Photorezeptoren erweisen und eine neuroprotektive Wirkung besitzen. So kann das TrkB-Aptamer als eine neue Therapieoption für neurodegenerative Retinaerkrankungen wie Glaukom und Retinitis pigmentosa entwickelt werden.

Abschließend erfolgte die Überprüfung des neuroprotektiven Effektes des TrkB-Aptamers nach CoCl₂-induzierter Schädigung. Verschiedene zelltypspezifische und neurotrophe Marker wurden untersucht und es konnte beobachtet werden, dass die induzierte Schädigung durch CoCl₂ nach der Behandlung mit dem TrkB-Aptamer oder mit BDNF umgekehrt wird (*Abbildung 20, 21, 23 und 24*), was der erste Schritt für eine potenzielle, zukünftige therapeutische Anwendung des Aptamers *in-vivo* darstellt.

5.2 Wachstumsfaktoren als Therapeutika

Wachstumsfaktoren stehen aufgrund der multiplen Anwendungsgebiete seit Jahren im Fokus der Forschung und bieten eine vielversprechende Gelegenheit, neue Therapien zu entwickeln oder die Wirksamkeit verfügbarer medizinischer Behandlungen zu verbessern. Der BDNF gehört zur Gruppe der Neurotrophine. Zur gleichen Gruppe gehören unter anderem der Nervenwachstumsfaktor (NGF), Neurotrophin 3, 4 und 5 (NT-3, NT-4, NT-5). Die Neurotrophine spielen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität und Funktion der cholinergen Neuronen, nicht nur während der Entwicklung, sondern auch im Erwachsenenalter. Im reifen Nervensystem fördern sie das neuronale Überleben, induzieren synaptische Plastizität und modulieren die Bildung von Langzeitgedächtnissen⁹².

Der NGF ist ein besonders bedeutsamer neurotropher Faktor, der aufgrund seiner vielen wichtigen Funktionen für das Überleben, das Wachstum und die Differenzierung von Nervenzellen im peripheren und zentralen Nervensystem im Fokus der Forschung steht. Veränderungen der neurotrophen Signalwege sind am Alterungsprozess beteiligt und tragen zum cholinergen und kognitiven Verfall bei, wie er bei Alzheimer beobachtet wird. Einige Studien zeigten, dass NGF nach Verabreichung wichtige therapeutische Eigenschaften bei Alzheimer besitzt^{93,94}.

Der NT-3 sollte bei den neurobiologischen Prozessen, die bei Stimmungs- und Angststörungen vorliegen, eine Rolle spielen. NT-3 ist aufgrund seiner Wirkungen auf die Regulierung der synaptischen Plastizität und Neurogenese und die Verstärkung der Signalübertragung durch den BDNF ein potenzielles pharmakologisches Ziel für affektive Störungen. Die Mechanismen, die den anxiolytischen Eigenschaften von NT-3 zugrunde liegen, sind weniger klar und bedürfen weiterer Untersuchung und Definition⁹⁵.

Der BDNF-Wachstumsfaktor hat sich zwischen anderen Wachstumsfaktoren als vielversprechendes Therapeutikum für eine Vielzahl von Krankheiten (einschließlich neurodegenerativer Erkrankungen) herauskristallisiert. Die Zahl der Menschen, die an Alzheimer leiden, wird mit zunehmendem Alter der Weltbevölkerung weiter steigen, was unter anderem eine enorme sozialökonomische Belastung darstellt. Die Untersuchung von Wachstumsfaktoren zeigt, dass der BDNF-Spiegel im entorhinalen Cortex und Hippocampus von Patienten mit Alzheimer-Krankheit reduziert ist. Der verminderte BDNF-Spiegel könnte mit einer fehlenden trophischen Unterstützung zusammenhängen und zur Degeneration spezifischer neuronaler Subpopulationen im von Alzheimer-Krankheit betroffenen Gehirn, einschließlich des cholinergen Systems im basalen Vorderhirn, beitragen⁹⁶. Es wird ebenfalls angenommen, dass eine verringerte Expression von BDNF zur Degeneration von Neuronen bei der Huntington-Krankheit beiträgt⁹⁷. Der BDNF-Wachstumsfaktor dient ebenfalls als Wandler und als Verbindung zwischen Antidepressiva und den neuroplastischen Veränderungen, die zu einer Verbesserung von depressiven Symptomen führen. Es wurde gezeigt, dass Antidepressiva und Ketamin ihre antidepressivumartigen Wirkungen erbringen, indem sie BDNF in Vorderhirnregionen, insbesondere im Hippocampus, erhöhen⁹⁸.

5.3 BDNF-Wachstumsfaktor in der Ophthalmologie

Der BDNF-Wachstumsfaktor spielt in der Ophthalmologie ebenso eine wichtige Rolle. Beispielsweise sollte der BDNF-Wachstumsfaktor in Kombination mit dem VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) Wachstumsfaktor bei der Behandlung von Diabetischer Retinopathie (DR) berücksichtigt werden. Beide zeigen neuroprotektive Wirkungen in der Netzhaut, können Apoptose verhindern und die Regeneration von RGZ in der Netzhaut herstellen. Bei der DR sind die Hauptgründe für das Fortschreiten der Krankheit die progressive Neurodegeneration und die Vaskulopathie⁹⁹. Es gibt jedoch kontroverse Ergebnisse zur Wechselwirkung zwischen diesen beiden Faktoren. Jüngste

Erkenntnisse deuten darauf hin, dass BDNF die VEGF-vermittelte Angiogenese verstärkt. Bei DR-Patienten ist ein verringerter BDNF-Spiegel jedoch auch mit einer hohen VEGF-Sekretion und einer Netzhautneovaskularisation verbunden¹⁰⁰. Ein verringerter Serum-BDNF-Spiegel stimuliert die neurale Degeneration und Freisetzung von Zytokinen, was letztendlich zu einer Überproduktion von VEGF führt. Die neuen Gefäße, die durch VEGF-Sekretion hergestellt werden, bilden die Grundlage für die Rekrutierung von BDNF in die Netzhaut und die Regeneration der neuralen Netzhaut¹⁰⁰. Das führt dazu, dass eine BDNF-Therapie nur in den frühen Stadien der DR wirksam ist. Ebenfalls besteht Grund zur Annahme, dass BDNF eine dosisabhängige Art der Neuroprotektion aufweist. Im Frühstadium der Krankheit kann der BDNF die neuroretinale Degeneration verzögern und den VEGF herunterregulieren. Im Gegensatz dazu können höhere Konzentrationen von BDNF in den späten Stadien der DR-Entzündungsreaktionen auslösen. Im Spätstadium der Krankheit führt eine schwere Schädigung der Netzhautzellen zu einer Überproduktion von VEGF und Zytokinen in der Mikroumgebung der Netzhaut, was eine weitere Entzündungsreaktion auslöst und zu einer Veränderung der Expression von BDNF- und VEGF-Rezeptoren führen kann¹⁰⁰. Diesbezüglich sind weitere Forschungen unabdingbar, um die Dosis und den Zeitraum der BDNF-Applikation hinsichtlich des Ausmaßes der Netzhautdegeneration bei diabetischer Retinopathie zu klären.

Das Glaukom ist die weltweit häufigste Ursache für irreversible Blindheit. In einer klinischen Studie wurde der Serumspiegel von BDNF und NGF-Wachstumsfaktoren untersucht. Die Untersuchung erfolgte bei 45 Patienten mit primärem Offenwinkelglaukom mit einem breiten Spektrum der Schwere der Erkrankung im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Es wurde festgestellt, dass sowohl der BDNF-, als auch der NGF-Spiegel in glaukomatösen Seren und insbesondere bei Patienten mit frühem und mäßigem Glaukom im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant verringert waren¹⁰¹. Anhand der Ergebnisse der durchgeführten Studie kann davon ausgegangen werden, dass die Serumspiegel von NGF und BDNF in verschiedenen Stadien des Glaukoms variieren, was darauf hindeutet, dass die Serumspiegel ein Indiz für die fortschreitende neurodegenerative Schädigung – die im Verlauf der Krankheit auftritt – sein könnten. Da NGF und BDNF jedoch auch von einer Vielzahl nicht-neuronaler Zelltypen als Reaktion auf verschiedene Stimuli produziert werden können, sind weitere Untersuchungen erforderlich, um ihre Rolle als potenzielle Biomarker des Glaukoms zu bewerten¹⁰¹.

Der BDNF-Serumspiegel wurde auch bei der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) untersucht. 36 mit AMD und 36 altersentsprechende Kontrollen wurden in diese Studie eingeschlossen¹⁰². Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass der BDNF-Serumspiegel bei AMD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen signifikant höher war. Angesichts des degenerativen und entzündlichen Prozesses in der Netzhaut während der AMD wurde zunächst von einem geringen Serumspiegel von BDNF bei AMD ausgegangen, die Ergebnisse deuteten jedoch auf das Gegenteil hin¹⁰². Die Ergebnisse könnten insofern begründet werden, dass der erhöhte BDNF-Serumspiegel bei AMD ein kompensatorisches Phänomen als Reaktion auf den degenerativen Prozess in der Netzhaut sein könnte. Dadurch produziert das ZNS möglicherweise mehr BDNF. Eine weitere Erklärung der Ergebnisse wäre, dass der Serum-BDNF-Spiegel durch viele Störfaktoren (wie Stress) beeinflusst werden kann. Einige Studien berichten jedoch von einem erhöhten BDNF-Spiegel, der mit einem entzündlichen Phänomen und einer Redoxmodifikation im Plasma von Patienten, die einer körperlichen Belastung wie einer größeren Operation ausgesetzt sind, verbunden ist¹⁰⁵. Zukünftig sind weitere Studien erforderlich, um BDNF in der Netzhaut und RPE bei AMD-Patienten im Vergleich zu altersentsprechenden Kontrollpersonen zu messen. Die Ergebnisse könnten möglicherweise die Auswirkungen von BDNF auf die Pathogenese von AMD in der Netzhaut erklären.

5.4 Aptamer als Therapeutikum

Das Risiko von unerwünschten Wirkungen bei der Verwendung von BDNF als Therapeutikum bleibt jedoch ein Problem, das hauptsächlich auf eine unzureichende Kontrolle des Freisetzungsprofils zurückzuführen ist, sodass es zu weiteren problematischen Aspekten bei einer möglichen Therapiestrategie kommen kann. Die übermäßige Aktivierung der TrkB-Signalübertragung in ZNS-Neuronen zeigt schädliche Folgen, einschließlich Epilepsie und neuropathischer Schmerzen^{60,61}. Die Verwendung von Aptameren stellt eine Lösung bezüglich der oben beschriebenen Problematik dar. Aptamere sind kurze einzelsträngige DNA- oder RNA-Oligonukleotide beziehungsweise Peptide, die sich durch spezifische molekulare Bindung mit hoher Affinität auszeichnen. Trotz ihrer funktionellen Ähnlichkeit mit Proteinantikörpern weisen Aptamere viele einzigartige Eigenschaften auf, die sich für klinische Anwendungen eignen. Ihr niedrigeres Molekulargewicht ermöglicht, dass das Zielgewebe viel effizienter erreicht

werden kann. Außerdem besitzen sie eine niedrige Toxizität⁶⁵. Huang et al. hat ein Aptamer (C4-3) entwickelt, das eine submaximale TrkB-Rezeptoraktivierung hervorruft und gleichzeitig eine extreme Aktivierung (durch Bindung des Rezeptors) verhindert⁶⁷. Es konnte gezeigt werden, dass das Aptamer mit hoher Affinität ($KD \sim 2nM$) an die Ektodomäne von TrkB bindet und die TrkB-Signalübertragung in kortikalen Neuronen stimuliert⁶⁷. Angesichts dieser Erkenntnisse scheint die Idee, BDNF-Mimetika bei Netzhauterkrankungen zu untersuchen, von klinischem Interesse zu sein. Eine *in-vivo* Testung des TrkB-Aptamers wäre im nächsten Schritt von großer Bedeutung und in naher Zukunft sinnvoll.

Die Vorteile der Aptamere werden bei der Verwendung von intraokulären Injektionen genutzt, da der Wirkstoff viel einfacher in das Auge appliziert werden kann. Bei der AMD-Behandlung mit Fovista® (Anti PDGF-B Aptamer, Novartis) wird der Wachstumsfaktor PDGF (Platelet Derived Growth Factor) gehemmt, der die Wundheilung, die Zellproliferation und die Zellmigration beeinflusst¹⁰⁴. Im Fall von Macugen® (VEGF aptamer, Pfister) wird der VEGF (Anti-Vascular Endothelial Growth Factor) gehemmt, der hauptsächlich für die pathologische Neovaskularisation des Auges und die Gefäßpermeabilität verantwortlich ist¹⁰⁵. Nach fast einem Jahrzehnt präklinischer Entwicklung zur Optimierung und Charakterisierung der biologischen Wirkungen wurde in klinischen Studien gezeigt, dass Macugen® (Pegaptanib) bei der Behandlung der mit altersbedingter Makuladegeneration verbundenen, choroidalen Neovaskularisation wirksam ist. Pegaptanib hat daher die bemerkenswerte Auszeichnung, das erste Aptamer-Therapeutikum zu sein, das für die Anwendung in der Humanmedizin zugelassen ist und hat dadurch den Weg für zukünftige Aptamer-Anwendungen geebnet¹⁰⁶.

Fortschritte für die Aptamer-Anwendung in der Ophthalmologie wurden ebenfalls bei dem Retinoblastom (RB) gemacht. Das Retinoblastom (RB) ist ein intraokularer Kindheitstumor, der unbehandelt zur Blindheit und zum Tod führt. Das Nucleolin (NCL)-Protein, das auf der Tumorzelloberfläche unterschiedlich exprimiert wird, spielt eine entscheidende Rolle bei RB, da es Liganden bindet und dadurch die Karzinogenese und Angiogenese reguliert. Die Exprimierung des NCL-Proteins in RB-Tumorgewebe und -Zelllinien ist im Vergleich zur normalen Netzhaut erhöht. Die Verwendung von Nucleolin-Aptamer bei der RB-Zelllinien (Y79 und WERI-Rb1) führt zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation in RB-Tumorzellen¹⁰⁷.

Grundlegend lässt sich feststellen, dass die Wachstumsfaktoren in der Medizin erfolgsversprechend sind und somit immer häufiger in klinischen Studien untersucht werden. Inwieweit die Vor- oder Nachteile überwiegen, hängt von vielen Faktoren ab und lässt sich im Einzelfall nicht vorhersagen. Dennoch sind die gewonnenen Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit gewinnbringend. So können die aptamer-basierten Therapeutika in der Augenheilkunde evaluiert und mögliche neue Therapieoptionen durch *in-vivo* Testung für neurodegenerative Retinaerkrankungen wie Glaukom, diabetischer Retinopathie, altersbedingter Makuladegeneration und Retinitis pigmentosa, auf den Weg gebracht werden.

5.5 Limitationen des Verfahrens

Die wesentliche Limitation dieses Projekts ergibt sich aus der Notwendigkeit der Verwendung von frischer porciner Organkultur. Obwohl diese als äußerst geeignetes Forschungsmodell dient, gibt es Faktoren, welche die Ergebnisse limitieren können. Die Axotomie ist ein bekannter Einflussfaktor, der nicht nur die Traumatisierung von Retina, insbesondere bei den Ganglienzellen, sondern auch Apoptose und Nekrose¹⁰⁸ verursacht. Der Zeitraum zwischen der E nukleation und der Präparation des Auges scheint zudem ein entscheidender Faktor für die Qualität der Retina zu sein. Zur Minimierung dieser Limitation sind die Transportzeiten bestmöglich minimiert worden, sodass eine unmittelbare Präparation erfolgen konnte.

Eine weitere Limitation der Verwendung des Aptamers ist die Applikationsmethode. Obwohl einerseits eine intravitreale Injektion als eine optimale Applikation vorgeschlagen wird, zeigen sich andererseits wesentliche Nachteile. Darüber hinaus – und das, obwohl eine intravitreale Injektion relativ sicher ist – handelt es sich noch immer um eine invasive Methode, die mit Komplikationen (Endophthalmitis, Netzhautablösung, Linsenverletzung bzw. traumatischer Katarakt, Druckanstieg, allergische Reaktion) verbunden sein kann. Diese Probleme könnten nur dadurch umgegangen werden, dass die intravitreale Applikation optimiert wird oder neue Applikationsmethoden entwickelt werden. Die intranasale Verabreichung bietet beispielweise eine praktische, nicht-invasive Methode zur Umgehung der Blut-Hirn-Schranke (BHS), um Therapeutika an das Gehirn und das Rückenmark abzugeben. Mit dieser Technologie können Medikamente, die die BHS nicht überschreiten, innerhalb von Minuten an das

Zentralnervensystem abgegeben werden. Auf diese Weise werden auch Medikamente, die die BHS überschreiten, direkt an das Gehirn geleitet, wodurch die Notwendigkeit einer systemischen Verabreichung und die möglichen unerwünschten Wirkungen entfallen¹⁰⁹.

Eine weitere Limitation der Aptamere zeigt sich in der Wirkdauer. Die Wirkdauer hängt, wie bei allen Arzneimitteln, von mehreren Faktoren ab (einschließlich Abbau, Beteiligung an Stoffwechselprozessen, Nierenausscheidung usw.) Alle diese Faktoren sollten vor der Anwendung der Aptamere berücksichtigt werden.

6. Zusammenfassung

Potentielle Therapie neurodegenerativer Retinopathien über die Aktivierung des BDNF-TrkB-Signalweges mittels modifizierten Aptamers

Die degenerativen Augenerkrankungen, wie die diabetische Retinopathie, das Glaukom oder die Retinitis pigmentosa sind Gegenstand der Forschung, sodass immer mehr Studien zu möglichen Therapien vorliegen. Der neurotrophe Faktor BDNF ist ein vielversprechender Wachstumsfaktor, der seine Wirkung über den Tyrosinkinase-Rezeptor B (TrkB) entfaltet und der viele kritische Funktionen im Zentralnervensystem (ZNS) erfüllt. Die vorliegende Arbeit beabsichtigt einerseits durch den Einsatz eines bereits publizierten Aptamers den neuroprotektiven Effekt von BDNF zu imitieren sowie andererseits die unerwünschten Nebeneffekte zu vermeiden.

Zunächst erfolgte dazu Ausschließung der Bedenklichkeit des Aptamers sowohl an retinalen Zellen als auch in Retinaexplantaten. In einem weiteren Schritt wurde die Verweildauer sowie die Bindungseffizienz des TrkB-Aptamers an primären dissoziierten retinalen Zellen sowie an Retinaexplantaten bestätigt. Ebenfalls wurde nicht nur nachgewiesen, dass das TrkB-Aptamer den BDNF-Signalweg aktiviert, sondern auch, dass es spezifisch bindet. Nachdem die Spezifität des TrkB-Aptamers bestätigt wurde, erfolgte eine Langzeitinkubation über mehrere Tage. Daraus resultierte, dass bei der langen Kultivierung mit dem TrkB-Aptamer ein neuroprotektiver Effekt entsteht. Anschließend wurde der neuroprotektive Effekt des TrkB-Aptamers in einem retinalen bereits etablierten Kobaltchlorid (CoCl₂) Schädigungsmodell bestätigt.

Mit der Gewinnung der neuen Forschungsergebnisse besteht die Hoffnung, einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung neuer therapeutischen Möglichkeiten bei den degenerativen Retinaerkrankungen geleistet zu haben.

7. Summary

Potential therapy for neurodegenerative retinopathies via activation of the BDNF-TrkB signaling pathway by an aptamer

Degenerative eye diseases such as diabetic retinopathy, glaucoma or retinitis pigmentosa have been the subject of research in recent years, so that more and more studies are available on possible therapies. The BDNF neurotrophic factor is a promising growth factor, which unfolds its effects via the membrane receptor tyrosine kinases B (TrkB) and which fulfills many critical functions in the central nervous system (CNS). The present work intends on the one hand to imitate the neuroprotective effect of BDNF by using an already published aptamer, and on the other hand to avoid the undesired side effects.

First of all, the the aptamer showed no impairment in retinal cells and in retinal explants. In a further step, both retention time and binding efficiency of the TrkB aptamer to retinal cells and to retinal explants were confirmed. It was also demonstrated not only that the TrkB aptamer activates the BDNF signaling pathway, but also that it binds specifically. After the specificity of the TrkB aptamer was confirmed, a long-term incubation was carried out for several days. As a result, the long cultivation with the TrkB aptamer had a neuroprotective effect. Subsequently, the neuroprotective effect of the TrkB aptamer was confirmed in an already established retinal cobalt chloride (CoCl₂) damage model. With the acquisition of the new research results, it is hoped that they will make a significant contribution to the development of new therapeutic options for degenerative retinal diseases.

8. Literaturverzeichnis

1. Kanski J J, Bowling B, Nischal K K, Pearson A (2006): *Klinische Ophthalmologie*. Elsevier/Saunders. 2012; 8: 257.
2. DelMonte D W, Kim T (2011): Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg*. 2011; 37: 588–9. doi: 10.1016/j.jcrs.2010.12.037.
3. Guyer D R, Schachat A P, Green W R (2006): The choroid: structural considerations. In: Ryan SJ, ed. *Retina*, 4.Auflage, 33-42.
4. Aiello A L, Tran V T, Rao N A (1992): Postnatal development of the ciliary body and pars plana. A morphometric study in childhood. *Arch Ophthalmol*. 1992; 110: 802–5. doi:10.1001/archophth.1992.01080180074031.
5. Gipson I K, Stepp M A (2008): Anatomy and cell biology of the cornea, superficial limbus and conjunctiva. In: Albert & Jakobiec's principles and practice of ophthalmology, Saunders/Elsevier. 2008; 423–40.
6. Behar-Cohen F, Gelizé E, Jonet L, Lassiaz P (2020): Anatomy of the retina. *Med Sci*. 2020; 36: 594-99. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020094>.
7. Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong R O (2014): Functional architecture of the retina: development and disease. *Prog Retin Eye Res*. 2014; 42: 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.06.003>.
8. Masland R H (2012): The neuronal organization of the retina. *Neuron*. 2012; 76: 266-80. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.002>.
9. Kolb H (2003): How the retina works. *Am. Sci*. 2003; 91: 28–35.
10. Schmidt K G, Bergert H, Funk R H (2008): Neurodegenerative diseases of the retina and potential for protection and recovery. *Curr Neuropharmacol* 2008; 6: 164-78. <https://doi.org/10.2174/157015908784533851>.
11. Weinreb R N, Khaw P T (2004): Primary open-angle glaucoma. *Lancet*, 2004; 363: 1711-20. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16257-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16257-0).
12. Weinreb R N, Aung T, Medeiros F A (2014): The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *JAMA*. 2014; 311: 1901-11. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3192>.
13. Gesellschaft, B.d.A.D.D.O. (2006): Leitlinie Nr. 15 a: Primäres chronisches Offenwinkelglaukom, Normaldruckglaukom und okuläre Hypertension Leitlinien der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft und des Bundesverbands für Augenärzte Deutschland.
14. Quigley H A, Vitale S (1997): Models of open-angle glaucoma prevalence and incidence in the United States. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997; 38: 83-91.
15. Garg A, Gazzard G (2020): Treatment choices for newly diagnosed primary open angle and ocular hypertension patients. *Eye*. 2020; 34: 60-71. <https://doi.org/10.1038/s41433-019-0633-6>.
16. Shields M B (2008): Normal-tension glaucoma is it different from primary open-angle glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol*. 2008; 19: 85-88. <https://doi.org/10.1097/ICU.0b013e3282f3919b>.

17. Fechtner R D, Weinreb R N (1994): Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma. *SurvOphthalmol.* 1994; 39: 23-42.
[https://doi.org/10.1016/s0039-6257\(05\)80042-6](https://doi.org/10.1016/s0039-6257(05)80042-6).
18. Paton D, Craig J A (1976): Glaucomas. *Diagnosis and management.* 1976; 28: 1–47.
19. Kastner A, King A J (2020): Advanced glaucoma at diagnosis: current perspectives. *Eye.* 2020; 34: 116-128.
<https://doi.org/10.1038/s41433-019-0637-2>.
20. Weber A J, Chen H, Hubbard W C, Kaufman P L (2000): Experimental glaucoma and cell size, density, and number in the primate lateral geniculate nucleus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41:1370-9.
21. Pena J D, Agapova O, Gabelt B T, Levin L A, Lucarelli M J, Kaufman P L, Hernandez M R (2001): Increased elastin expression in astrocytes of the Lamina cribrosa in response to elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42: 2303-14.
22. Hernandez M R (2000): The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling. *Prog Retin Eye Res.* 2000; 19: 297 - 321.
[https://doi.org/10.1016/s1350-9462\(99\)00017-8](https://doi.org/10.1016/s1350-9462(99)00017-8)
23. Pena J D, Varela H J, Ricard C S, Hernandez M R (1999): Enhanced tenascin expression associated with reactive astrocytes in human optic nerve heads with primary open angle glaucoma. *Exp Eye Res.* 1999; 68: 29 - 40.
doi: 10.1006/exer.1998.0577. PMID: 9986739.
24. Wang X, Tay S S, Ng Y K (2000): An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinae of rats with experimental glaucoma. *Exp Brain Res.* 2000; 132: 476-484. doi: 10.1007/s002210000360. PMID: 10912828.
25. Seitz R, Ohlmann A, Tamm E R (2013): The role of Muller glia and microglia in glaucoma. *Cell Tissue Res.* 2013; 353: 339 - 345.
doi: 10.1007/s00441-013-1666-y. PMID: 23779255.
26. Reinehr S, Buschhorn V, Mueller-Buehl A M, Goldmann T, Grus F H, Wolfrum U, Dick H B, Joachim S C (2020): Occurrence of Retinal Ganglion Cell Loss via Autophagy and Apoptotic Pathways in an Autoimmune Glaucoma Model. *Current eye Research.* 2020; 45:1124-1135.
<https://doi.org/10.1080/02713683.2020.1716987>
27. Daiger S P, Bowne S J, Sullivan L S (2007): Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125:151–158.
doi: 10.1001/archopht.125.2.151.
28. Gregory-Evans K, Pennesi M E, Weleber R (2012): Retinitis pigmentosa and allied disorders. *Medical Retina.* 2012; 761-835
<https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0737-9.00040-0>
29. Hamel C (2006): Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis.* 2006; 1: 40.
<https://doi.org/10.1186/1750-1172-1-40>.

30. Kennan A, Aherne A, Humphries P (2005): Light in retinitis pigmentosa. *Trends Genet.* 2005; 21:103–110.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.12.001>.
31. Léveillard T, Mohand-Saïd S, Lorentz O, Hicks D, Fintz A C, Clérin E, Simonutti M, Forster V, Cavusoglu N, Chalmel F, Dollé P, Poch O, Lambrou G, Sahel J A (2004): Identification and characterization of rod - derived cone viability factor. *Nat Genet.* 2004; 36: 755– 759.
<https://doi.org/10.1038/ng1386>.
32. Shen J, Yang X, Dong A, Petters R, Peng Y, Wong F, Campochiaro P A (2005): Oxidative damage is a potential cause of cone cell death in retinitis pigmentosa. *J Cell Physiol.* 2005; 203: 457-464.
<https://doi.org/10.1002/jcp.20346>.
33. Gupta N, Brown K E, Milam A H (2003): Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late - onset retinal degeneration, and age - related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 2003; 76: 463– 471.
[https://doi.org/10.1016/s0014-4835\(02\)00332-9](https://doi.org/10.1016/s0014-4835(02)00332-9).
34. Dias M F, Joo K, Kemp J A, Fialho S L, da Silva Cunha A Jr, Woo S J, Kwon Y J (2018): Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: Basic research and clinical perspectives. *Prog Retin Eye Res.* 2018; 63:107-131. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.10.004>.
35. Dejneka N S, Auricchio A, Maguire A M, Ye X, Gao G P, Wilson J M, Bennett J (2001): Pharmacologically regulated gene expression in the retina following transduction with viral vectors. *Gene Ther.* 2001; 8: 442-446.
<https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301413>.
36. Delyfer M N, Léveillard T, Mohand-Saïd S, Hicks D, Picaud S, Sahel J A (2004): Inherited retinal degenerations: therapeutic prospects. *Biol Cell.* 2004; 96: 261- 269. <https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2004.01.006>.
37. Lund R D, Ono S J, Keegan D J, Lawrence J M (2003): Retinal transplantation: progress and problems in clinical application. *J Leukoc Biol.* 2003; 74: 151-160.
<https://doi.org/10.1189/jlb.0103041>.
38. Ahmad I (2001): Stem cells: new opportunities to treat eye diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42: 2743-2748.
39. Chaum E (2003): Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective. *J Cell Biochem.* 2003; 88: 57-75.
<https://doi.org/10.1002/jcb.10354>.
40. Frasson M, Picaud S, Léveillard T, Simonutti M, Mohand-Saïd S, Dreyfus H, Hicks D, Sabel J (1999): Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. *Invest Ophth Vis Sci.* 1999; 40: 2724-2734.
41. Berson E L, Rosner B, Sandberg M A, Hayes K C, Nicholson B W, Weigel-DiFrano C, Willett W (1993): Vitamin A supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol.* 1993; 111: 1456-1459.
<https://doi.org/10.1001/archopht.1993.01090110014001>.

42. Schmidt K G, Bergert H, Funk R H (2008): Neurodegenerative diseases of the retina and potential for protection and recovery. *Curr Neuropharmacol*, 2008. 6:164–78. <https://doi.org/10.2174/157015908784533851>.
43. Faktorovich E G, Steinberg R H, Yasumura D, Matthes M T, LaVail M M (1990): Photoreceptor Degeneration in Inherited Retinal Dystrophy Delayed by Basic Fibroblast Growth Factor. *Nature*. 1990; 347:83-86. <https://doi.org/10.1038/347083a0>.
44. Lau D, McGee L H, Zhou S, Rendahl K G, Manning W C, Escobedo J A, Flannery J G (2000): Retinal degeneration is slowed in transgenic rats by AAV-mediated delivery of FGF-2. *Invest Ophth Vis Sci*, 2000; 41: 3622-3633.
45. Bok D, Yasumura D, Matthes M T, Ruiz A, Duncan J L, Chappelow A V, Zolotukhin S, Hauswirth W, LaVail M M (2002): Effects of adeno-associated virus-vectored ciliary neurotrophic factor on retinal structure and function in mice a P216L rds/peripherin mutation. *Exp Eye Res*. 2002; 74:719-735. <https://doi.org/10.1006/exer.2002.1176>.
46. Cayouette M, Gravel C (1997): Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor survival in hereditary retinal degeneration (rd) mouse. *Hum Gene Ther*. 1997; 8:423-430. <https://doi.org/10.1089/hum.1997.8.4-423>.
47. Perry J, Du J, Kjeldbye H, Gouras P (1995): The effects of bFGF on RCS rat eyes. *Curr Eye Res*. 1995; 14: 585-592. <https://doi.org/10.3109/02713689508998406>.
48. Ali R R, Sarra G M, Stephens C, Alwis M D, Bainbridge J W, Munro P M, Fauser S, Reichel M B, Kinnon C, Hunt D M, Bhattacharya S S, Thrasher A J (2000): Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet*. 2000; 25: 306-310. <https://doi.org/10.1038/77068>.
49. Acheson A, Conover J C, Fandl J P, DeChiara T M, Russell M, Thadani A, Squinto S P, Yancopoulos G D, Lindsay R M (1995): A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature*. 1995; 374:450-453. <https://doi.org/10.1038/374450a0>.
50. Huang E J, Reichardt L F (2001): Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci*. 2001; 24: 677–736. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>.
51. Afarid M, Torabi-Nami M, Zare B (2016): Neuroprotective and restorative effects of the brain-derived neurotrophic factor in retinal diseases. *J Neurol Sci*. 2016. 363:43-50. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.02.024>.
52. Kimura A, Namekata K, Guo X, Harada C, Harada T (2016): Neuroprotection, Growth Factors and BDNF-TrkB Signalling in Retinal Degeneration. *Int J Mol Sci*. 2016; 17: 1584. <https://doi.org/10.3390/ijms17091584>.
53. Rickman D W, Brecha N C (1995): Expression of the proto-oncogene, *trk*, receptors in the developing rat retina. *Vis Neurosci*. 1995; 12:215-222. <https://doi.org/10.1017/s0952523800007896>.
54. Martin K R, Quigley H A, Zack D J, Levkovitch-Verbin H, Kielczewski J, Valenta D, Baumrind L, Pease M E, Klein R L, Hauswirth W W (2003): Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal

- ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44: 4357-4365.
<https://doi.org/10.1167/iovs.02-1332>.
55. Ren R, Li Y, Liu Z, Liu K, He S (2012): Long-term rescue of rat retinal ganglion cells and visual function by AAV-mediated BDNF expression after acute elevation of intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53:1003-1011. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-848>.
 56. Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada L F, Wada K (2002): Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci.* 2002; 22: 9228-9236.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-21-09228.2002>.
 57. Gauthier R, Joly S, Pernet V, Lachapelle P, Di Polo A (2005): Brain-derived neurotrophic factor gene delivery to muller glia preserves structure and function of light-damaged photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46: 3383-3392. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0362>.
 58. Ren R, Li Y, Liu Z, Liu K, He S (2012): Long-term rescue of rat retinal ganglion cells and visual function by AAV-mediated BDNF expression after acute elevation of intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53:1003-1011. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8484>.
 59. Kano T, Abe T, Tomita H, Sakata T, Ishiguro S, Tamai M (2002): Protective effect against ischemia and light damage of iris pigment epithelial cells transfected with the BDNF gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 3744-3753.
 60. He X P, Pan E, Sciarretta C, Minichiello L, McNamara J O (2010): Disruption of TrkB-mediated phospholipase Cgamma signaling inhibits limbic epileptogenesis. *J Neurosci.* 2010; 30: 6188-6196.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5821-09.2010>.
 61. Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter M W, De Koninck Y (2005): BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature.* 2005; 438:1017-1021.
<https://doi.org/10.1038/nature04223>.
 62. Jang S W, Liu X, Chan C B, France S A, Sayeed I, Tang W, Lin X, Xiao G, Andero R, Chang Q, Ressler K J, Ye K (2010): Deoxygedunin, a natural product with potent neurotrophic activity in mice. *PLoS One.* 2010; 5:11528.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011528>.
 63. Jang S W, Liu X, Pradoldej S, Tosini G, Chang Q, Iuvone P M, Ye K (2010): N-acetylserotonin activates TrkB receptor in a circadian rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 3876-3881.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0912531107>.
 64. Dieckmann T, Fujikawa E, Xhao X, Szostak J, Feigon J (1995): Structural Investigations of RNA and DNA aptamers in Solution. *Journal of Cellular Biochemistry.* 1995; 59:13-81. doi:10.1002/jcb.240590703.
 65. Lakhin A V, Tarantul V Z, Gening L V (2013): Aptamers: problems, solutions and prospects, *Acta Naturae.* 2013; 5: 34-43.

66. Mascini M (2009): Aptamers in bioanalysis. 1. Auflage April 2009, John Wiley & Sons, ISBN: 978-0-470-14830-3.
67. Huang Y Z, Hernandez F J, Gu B, Stockdale K R, Nanapaneni K, Scheetz T E, Behlke M A, Peek A S, Bair T, Giangrande P H, McNamara J O (2012): RNA aptamer-based functional ligands of the neurotrophin receptor, TrkB. *Mol Pharmacol.* 2012; 82: 623-635. <https://doi.org/10.1124/mol.112.078220>.
68. Kuehn S, Hurst J, Jashari A, Ahrens K, Tsai T, Wunderlich I M, Dick H B, Joachim S C, Schnichels S (2016): The novel induction of retinal ganglion cell apoptosis in porcine organ culture by NMDA – an opportunity for the replacement of animals in experiments. *Altern. Lab. Anim.* 2016; 44: 557-568.
<https://doi.org/10.1177/026119291604400608>.
69. Hurst J, Kuehn S, Jashari A, Tsai T, Bartz-Schmidt K U, Schnichels S, Joachim S C (2017): A novel porcine ex vivo retina culture model for oxidative stress induced by H₂O₂. *Altern. Lab. Anim.* 2017; 45: 11-25.
<https://doi.org/10.1177/026119291704500105>.
70. Murali A, Ramlogan-Steel C A, Andrzejewski S, Steel J C, Layton C J (2019): Retinal explant culture: A platform to investigate human neuro-retina, *Clin Exp Ophthalmol.* 2019; 47: 274-85. <https://doi.org/10.1111/ceo.13434>
71. Hurst J, Fietz A, Tsai T, Joachim S C, Schnichels S (2020): Organ Cultures for Retinal Diseases. *Front Neurosci.* 2020. 14:583392.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.583392>.
72. Hurst J, Mueller-Buehl A M, Hofmann L, Kuehn S, Herms F, Schnichels S, Joachim S C (2020): iNOS-inhibitor driven neuroprotection in a porcine retina organ culture model. *J Cell Mol Med.* 2020; 24: 4312-4323.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.15091>.
73. Kuehn S, Hurst J, Rensinghoff F, Tsai T, Grauthoff S, Satgunarajah Y, Dick H B, Schnichels S, Joachim S C (2017): Degenerative effects of cobalt-chloride treatment on neurons and microglia in a porcine retina organ culture model. *Exp Eye Res.* 2017; 155: 107–120.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.01.003>.
74. Dunn K C, Aotaki-Keen A E, Putkey F R, Hjelmeland L M (1996): ARPE-19, A human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp. Eye Res.* 1996; 62: 155-169. <https://doi.org/10.1006/exer.1996.0020>.
75. Hauk A (2003): Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. *Biologie in unserer Zeit.* 2003; 43: 278–280.
<https://doi.org/10.1002/biuz.201390093>.
76. Pfaffl M W (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: 45.
<https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
77. Ludueña R F (2013): A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. *Int. Rev. Cell Mol. Bio.* 2013; 302: 41-185.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407699-0.00002-9>.
78. Karki R, Mariani M, Andreoli M, He S, Scambia G, Shahabi S, Ferlini C (2013): β III-Tubulin: biomarker of taxane resistance or drug target? *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 2013; 17: 461-72.

- <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.766170>.
79. Pasteels B, Rogers J, Blachier F, Pochet R (1990): Calbindin and calretinin localization in retina from different species. *Vis Neurosci.* 1990; 5:1-16. <https://doi.org/10.1017/s0952523800000031>.
 80. Kennedy M J, Lee K A, Niemi G A, Craven K B, Garwin G G , Saari J C, Hurley J B (2001): Multiple phosphorylation of rhodopsin and the in vivo chemistry underlying rod photoreceptor dark adaptation. *Neuron.* 2001; 31: 87–101. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00340-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00340-3).
 81. Berry M H, Holt A, Salari A, Veit J, Visel M, Levitz J, Aghi K, Gaub B M, Sivyer B, Flannery J G, Isacoff E Y (2019): Restoration of high-sensitivity and adapting vision with a cone opsin, *Nat Commun.* 2019; 10: 1221. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09124-x>.
 82. Pinteaux E, Parker L C, Rothwell N J, Luheshi GN (2002): Expression of interleukin-1 receptors and their role in interleukin-1 actions in murine microglial cells, *J Neurochem.* 2002; 83: 754-63. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01184.x>.
 83. Lopez-Castejon G, Brough D (2011): Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & growth factor reviews.*2011; 22: 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
 84. Gartel A L, Radhakrishnan S K (2005): Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Research.* 2005; 65:3980–3985. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3995>.
 85. Lu S, Ren C, Liu Y, Epner D E (2006): PI3K-Akt signaling is involved in the regulation of p21 (WAF/CIP) expression and androgen-independent growth in prostate cancer cells. *Int J Oncol.* 2006; 28: 245-251.
 86. Jin W (2020): Regulation of BDNF-TrkB Signaling and Potential Therapeutic Strategies for Parkinson's Disease. *J Clin Med.* 2020; 9: 257. <https://doi.org/10.3390/jcm9010257>.
 87. Zhang Y, Lai B S, Juhas M (2019): Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Molecules.* 2019; 24: 941. <https://doi.org/10.3390/molecules24050941>.
 88. Odeh F, Nsairat H, Alshaer W, Ismail M A, Esawi E, Qaqish B, Bawab A A, Ismail S I (2019): Aptamers Chemistry: Chemical Modifications and Conjugation Strategies. *Molecules.* 2019; 25: 3. <https://doi.org/10.3390/molecules25010003>.
 89. Suzuki S, Numakawa T, Shimazu K, Koshimizu H, Hara T, Hatanaka H, Mei L, Lu B, Kojima M (2004): BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts: roles in synaptic modulation. *J Cell Biol.* 2004; 167: 1205–1215. <https://doi.org/10.1083/jcb.200404106>.
 90. Afarid M, Torabi-Nami M, Zare B (2016): Neuroprotective and restorative effects of the brain-derived neurotrophic factor in retinal diseases. *J Neurol Sci.* 2016. 363: 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.02.024>.
 91. Schuettauf F, Vorwerk C, Naskar R, Orlin A, Quinto K, Zurakowski D, Dejneka N S, Klein R L, Meyer E M, Bennett J (2004): Adeno-associated viruses

- containing bFGF or BDNF are neuroprotective against excitotoxicity. *Curr. Eye Re.* 2004; 29: 379-386. <https://doi.org/10.1080/02713680490517872>.
92. Malenka R C, Nestler E J, Hyman S E (2014): Atypical Neurotransmitters. In: *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience* McGraw-Hill Medical. 3e. McGraw Hill. 2014 8: 199, 211–221
 93. Cuello A C, Pentz R, Hall H (2019): The Brain NGF Metabolic Pathway in Health and in Alzheimer's Pathology. *Frontiers in neuroscience.* 2019; 13: 62. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00062>.
 94. Mitra S, Behbahani H, Eriksson M (2019): Innovative Therapy for Alzheimer's Disease- With Focus on Bidelivery of NGF. *Frontiers in neuroscience.* 2019; 13: 38. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00038>
 95. de Miranda A S, de Barros J L V M, Teixeira A L (2020): Is neurotrophin-3 (NT-3): a potential therapeutic target for depression and anxiety? *Expert Opin Ther Targets.* 2020; 24: 1225-38. <https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1846720>.
 96. Hock C, Heese K, Hulette C, Rosenberg C, Otten U (2000): Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch Neurol.* 2000; 57: 846–851. <https://doi.org/10.1001/archneur.57.6.846>.
 97. Zuccato C, Cattaneo E (2009): Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol.* 2009; 5: 311-22. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2009.54>.
 98. Björkholm C, Monteggia L M (2016): BDNF - a key transducer of antidepressant effects. *Neuropharmacology.* 2016; 102: 72-9. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.034>
 99. Kollias A N, Ulbig M W (2010): Diabetische Retinopathie: Frühzeitige Diagnostik und effiziente Therapie. *Deutsches Ärzteblatt.* 2010; 107: 75–84. [doi:10.3238/arztebl.2010.0075](https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0075).
 100. Afarid M, Namvar E, Sanie-Jahromi F (2020): Diabetic Retinopathy and BDNF: A Review on Its Molecular Basis and Clinical Applications. *J Ophthalmol.* 2020; 1602739. <https://doi.org/10.1155/2020/1602739>.
 101. Oddone F, Roberti G, Micera A, Busanello A, Bonini S, Quaranta L, Agnifili L, Manni G (2017): Exploring Serum Levels of Brain Derived Neurotrophic Factor and Nerve Growth Factor Across Glaucoma Stages. *PLoS One.* 2017; 12: e0168565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168565>.
 102. Afarid M, Torabi-Nami M, Nemati A, Khosravi A, Malekzadeh M (2015): Brain-derived neurotrophic factor in patients with advanced age-related macular degeneration. *Int J Ophthalmol.* 2015; 8: 991-995. <https://doi.org/10.3980/j.issn.2222-3959.2015.05.25>.
 103. Drolet D W, Green L S, Gold L, Janjic N (2016): Fit for the Eye: Aptamers in Ocular Disorders. *Nucleic Acid Ther.* 2016; 26: 127-146. <https://doi.org/10.1089/nat.2015.0573>.

104. Pozarowska D, Pozarowski P (2016): The era of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs in ophthalmology, VEGF and anti-VEGF therapy. *Cent Eur J Immunol.* 2016; 41: 311-316.
<https://doi.org/10.5114/ceji.2016.63132>.
105. Ng E W, Shima D T, Calias P, Cunningham E T, Guyer D R, Adamis A P (2006): Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease, *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5: 123-32.
<https://doi.org/10.1038/nrd1955>.
106. Amoureux S, Sicard P, Korandji C, Borey A, Benkhadra S, Sequeira-Le Grand A, Vergely C, Girard C, Rochette L (2008): Increase in Levels of BDNF is Associated with Inflammation and Oxidative Stress during Cardiopulmonary Bypass. *Int J Biomed Sci.* 2008; 4: 204–111.
107. Schnichels S, Kiebler T, Hurst J, Maliha A M, Löscher M, Dick H B, Bartz-Schmidt K U, Joachim S C (2019): Retinal Organ Cultures as Alternative Research Models, *Altern Lab Anim.* 2019; 47: 19-29.
<https://doi.org/10.1177/0261192919840092>.
108. Hanson L R, Frey W H 2nd (2008): Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci.* 2008; 9 Suppl3:5.
<https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-S3-S5>.

9. Publikationverzeichnis

DOG 2018 (Poster)

Lilou E, M. Löscher, KU Bartz-Schmidt, S. Schnichels & J. Hurst

„Potentielle Therapie neurodegenerativer Retinopathien über die Aktivierung des BDNF-TrkB Signalweges mittels eines Aptamers“

116. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), Bonn, Germany, 27 – 30. September 2018

Potsdam Meeting 2018 (Vortrag)

J. Hurst, E. Lilou, M. Löscher, K.-U. Bartz-Schmidt, S. Schnichels

„Potential therapy of neurodegenerative retinopathies via activation of the BDNF-TrkB signaling pathway by an Aptamer“

13th Pro Retina Research Colloquium Potsdam, 13. April 2018

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. rer. nat. J. Hurst für die ausgezeichnete Betreuung und die Ermöglichung der praktischen Durchführung der Versuche sowie die Zurverfügungstellung von Laborräumen, Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien in der Universitätsaugenklinik Tübingen.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. C. Eule für die Ermöglichung der Erlangung des Doktorgrades „Dr.med.vet“.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich der Pro-Retina Stiftung danken.

Zum Schluss möchte ich mich noch ganz herzlich bei meinen lieben Eltern bedanken, die mich immer unterstützen und bei meinem Mann für seine Geduld und Unterstützung. Ich möchte mich auch bei meiner Freundin Sophia Groesschen für ihr Korrekturlesen und für ihre Unterstützung bedanken.

11. Finanzierungsquellen

Die Arbeiten wurden finanziell durch die Pro Retina Stiftung und die Augenklinik-Universitätsklinikum Tübingen unterstützt

12. Interessenkonflikte

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenkonflikte durch Zuwendung Dritter.

13. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Tübingen, den 15.02.2024

Evangelia Lilou

