

Aus dem Institut für Experimentelle Ophthalmologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Elektrophysiologische Untersuchung der Ionenkanäle an Zellen des
retinalen Pigmentepithels von transgenen Mäusen mit
Norrie-Gendefekt**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Guido Wollmann

aus Ludwigsfelde

Datum der Promotion:

26.02.2016

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation wurde von Frühjahr 1998 bis Frühjahr 2002 in der Abteilung für Klinische Physiologie des Fachbereiches Medizin der Freien Universität Berlin unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. Olaf Strauß durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1. Das Norrie Syndrom	9
1.2. Die Norrie-Maus – ein transgenes Tiermodell	11
1.3. Das Retinale Pigmentepithel (RPE)	13
1.3.1. Allgemeiner Aufbau des RPE	13
1.3.2. Funktion des RPE	15
1.3.3. Das RPE und Erkrankungen des Auges	17
1.4. Ionenkanäle des RPE	18
1.4.1. K ⁺ -Kanäle	18
1.4.2. Delayed Rectifier K ⁺ -Kanäle am RPE	21
1.4.3. Inward Rectifier K ⁺ -Kanäle am RPE	22
1.4.4. Ca ²⁺ -Kanäle	23
1.4.5. Cl ⁻ Kanäle am RPE	26
1.5. Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	27
2. Methoden	28
2.1. Gewebspräparation und Zellkultur	28
2.2. Patch-Clamp-Technik	28
2.2.1. Elektrophysiologische Grundlagen	28
2.2.2. Prinzip der Patch-Clamp-Technik	31
2.2.3. Messplatzaufbau	36
2.2.4. Versuchsdurchführung	38
2.2.5. Aufnahme und Auswertung der Daten	40
2.3. Immunzytochemie	43
2.3.1. Praktische Durchführung	43
2.3.2. Antikörper	44
2.3.3. Auswertung der Daten	44
3. Ergebnisse	45
3.1. Charakterisierung kultivierter Maus RPE Zellen	45
3.2. Kaliumströme am RPE	45

3.2.1.	Auswärtsrektifizierende Kaliumströme am RPE von Wildtyp- und Norrie-Mäusen	47
3.2.2.	Effekt der Tyrosinkinase-Hemmung mit Genistein auf den Delayed Rectifier-artigen Strom von Norrie- und Kontrollmäusen.....	49
3.2.3.	Einwärtsrektifizierende Kaliumströme am RPE von Wildtyp- und Norrie-Mäusen	51
3.3.	Kalziumströme am RPE	53
3.3.1.	L-Typ Ca ²⁺ -Kanäle am RPE von Wildtyp- und Norrie-Mäusen.....	54
3.3.2.	Nachweis der Dihydropyridinsensitivität der L-Typ Ca ²⁺ -Ströme von Wildtyp- und Norrie-Mäusen.....	56
3.3.3.	Effekt der Tyrosinkinase-Hemmung mit Genistein auf den L-Typ Ca ²⁺ -Strom an Norrie- und Kontrollmäusen.....	58
3.4.	Chloridströme am RPE.....	60
4.	<u>Diskussion</u>	<u>63</u>
4.1.	Beurteilung der Primärkultur von Maus-RPE-Zellen	63
4.2.	K ⁺ -Kanäle.....	64
4.2.1.	Auswärtsrektifizierende K ⁺ -Kanäle am RPE von Norrie- und Kontrollmäusen.	64
4.2.2.	Vergleich der auswärtsrektifizierenden K ⁺ -Kanäle mit der Literatur	65
4.2.3.	Einwärtsrektifizierende K ⁺ -Kanäle am RPE von Norrie- und Kontrollmäusen..	68
4.2.4.	Vergleich der einwärtsrektifizierenden K ⁺ -Kanäle mit der Literatur.....	69
4.3.	Ca ²⁺ -Kanäle	69
4.3.1.	L-Typ Ca ²⁺ -Kanäle am RPE von Norrie- und Kontrollmäusen	69
4.3.2.	Vergleich der L-Typ Ca ²⁺ -Kanäle mit der Literatur.....	70
4.4.	Cl ⁻ -Kanäle	71
4.4.1.	Cl ⁻ -Kanäle am RPE von Norrie- und Kontrollmäusen	71
4.5.	Beurteilung des Vergleiches Norrie- zu Kontrollmaus.....	72
4.6.	Bedeutung der Datenerfassung am Maus RPE.....	75
5.	<u>Zusammenfassung</u>	<u>77</u>
6.	<u>Referenzen</u>	<u>78</u>
7.	<u>Anhang.....</u>	<u>90</u>
7.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	90

7.2. Eidesstattliche Versicherung.....	92
7.3. Lebenslauf.....	94
7.4. Publikationsliste.....	97
7.5. Danksagung.....	100

Abstrakt

Einleitung: Das Norrie-Syndrom ist eine X-chromosomal vererbte Erkrankung mit angeborener Blindheit, oftmals assoziierter Taubheit und geistiger Retardierung. Aus Elektroretinogramm (ERG) Ableitungen lässt sich eine Beteiligung des retinalen Pigmentepithels (RPE) an der Pathogenese nicht ausschließen. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik Kalzium- und Kaliumkanäle an kultivierten RPE Zellen von Wildtyp- und transgenen Mäusen mit Norrie-Gendefekt gemessen und verglichen. Ziel war, eine potentielle Dysfunktion des RPE bei Norrie-Mäusen zu erfassen und damit eine mögliche ätiologische Beteiligung an der retinalen Degeneration zu beschreiben.

Methoden: Kulturen von RPE-Zellen von Wildtyp-Mäusen und transgenen Mäusen mit Norrie-Gendefekt wurden angelegt 12-14 Tage nach Geburt. Zellen wurden elektrophysiologisch analysiert mittels Patch-Clamp-Technik in der Whole-Cell-Konfiguration. Immunocytochemie wurde zum weiteren Nachweis der Ionenkanalidentität angewandt.

Ergebnisse: Die durchschnittliche Membrankapazität aller gemessenen Zellen betrug 120.9 ± 6.5 pF (n=103). Ca^{2+} Ströme wurden gemessen und konnten anhand ihrer Spannungsabhängigkeit, Stromkinetik, Nifedipine-Sensitivität und immunocytochemischem Nachweis der α_{1D} -Untereinheit als L-type Ca^{2+} Kanäle identifiziert werden. Der L-type Ca^{2+} Kanal konnte durch den Tyrosinkinase-Hemmer Genistein sowohl bei Wildtyp- als auch bei Norrie-Mäusen gehemmt werden. Bei Untersuchungen zu Kaliumkanälen zeigten die meisten Zellen einen auswärtsrektifizierenden Strom mit typischer Charakteristik von Delayed-Rectifier K^+ Kanälen, deren Identität mittels immunocytochemischen Nachweis der Kv1.3-Untereinheit bestätigt werden konnte. Das Ruhemembranpotential am RPE von Norrie-Mäusen betrug -40.0 ± 6.9 mV (n=7), was ohne signifikanten Unterschied zu den Werten von Kontrollmäusen war (-37.6 ± 3.5 mV (n=7)). Der Delayed-Rectifier artige K^+ Kanal ließ sich an RPE-Zellen sowohl von Norrie- als auch von Wildtyp-Mäusen durch Genistein reversibel hemmen, wodurch seine Regulation durch Tyrosinkinasen nachgewiesen werden konnte.

Schlussfolgerung: Im Vergleich der elektrophysiologischen Charakteristik der L-type Ca^{2+} Kanäle und der Delayed-Rectifier artigen K^+ Kanäle zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen RPE-Zellen von Norrie-Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Jedoch repräsentieren die Ergebnisse eine Erstbeschreibung von elektrophysiologischen Untersuchungen zur Ionenkanalcharakterisierung von RPE-Zellen von Mäusen. In Anbetracht der Möglichkeiten der Transgenese bei Mäusen und der generell weit verbreiteten Nutzung als Tiermodell kommt

dieser Charakterisierung von Maus RPE-Zellen eine besondere Bedeutung zu. Die hier charakterisierten Ionenkanäle sind mit denen in der Literatur an RPE-Zellen von Ratte, Rind und Mensch beschriebenen vergleichbar.

Abstract

Introduction: Norrie disease is an X-linked recessive disorder characterized by congenital blindness often coupled with deafness and mental retardation. Electroretinogram (ERG) studies indicate that the retinal pigment epithelium (RPE) might be involved in ocular pathogenesis. We compared calcium and potassium channels of cultured RPE cells of wild-type and transgenic mice with Norrie disease to find out whether altered channel characteristics are involved in RPE-dysfunction and the etiology of retinal degeneration.

Methods: RPE cells from wild-type mice and Norrie mutant mice were analyzed using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. We compared basic properties of calcium and potassium conductances. In addition, ion channels were characterized by subunit-directed immunocytochemistry.

Results: Membrane capacitance of investigated RPE cells was 120.9 ± 6.5 pF (n=103). Ca^{2+} currents could be identified as currents through L-type Ca^{2+} channels by means of voltage-dependence, current kinetics, nifedipine sensitivity and detection of the α_{1D} -subunit by immunocytochemistry. Application of the tyrosine kinase inhibitor genistein caused a decrease in L-type current amplitudes in both cell populations. Examining K^+ channels, most cells showed outwardly rectifying whole-cell currents with characteristics typical for delayed rectifier K^+ channels, which was verified by Kv1.3-subunit-directed immunostaining. Resting membrane potential was -40.0 ± 6.9 mV (n=7) in RPE from Norrie mice and did not differ significantly from control cells with -37.6 ± 3.5 mV (n=7). The delayed-rectifier current amplitude could be reversibly reduced by genistein in Norrie cells as well as in wild type controls.

Conclusions: Comparing general features of L-type Ca^{2+} channels and delayed rectifier K^+ channels, no significant difference could be observed between RPE cells from Norrie mice and wild type mice. However, this study presents for the first time the culture of murine RPE cells and presents electrophysiological data on these cells. Using mice as a new animal model for investigating RPE function can break new ground for future experiments, especially by means of transgenic or knock out mice. In addition, this study revealed that the electrophysiological characteristics for L-type Ca^{2+} channels and delayed rectifier K^+ channels are comparable with data from human RPE cells and cells from established animal models like rat and cow.

1. Einleitung

1.1. Das Norrie Syndrom

Das Norrie Syndrom gehört in die Gruppe der hereditären Augenerkrankungen mit Erblindungsfolge (Gilmour, 2015). Es folgt einem x-chromosomal rezessiven Vererbungsmodus, d.h. praktisch alle Betroffenen sind männlichen Geschlechts. Heterozygote weibliche Träger des Gendefekts sind in der überwiegenden Mehrheit symptomlos (Berger, 1998), mit wenigen publizierten Ausnahmen (Sims *et al.*, 1997). Neben der im Mittelpunkt stehenden kongenitalen bzw. frühkindlichen bilateralen Amaurose kommt es bei etwa einem Drittel (Rehm *et al.*, 1997) bis zur Hälfte (Berger *et al.*, 1992) der Erkrankten zu progredienter Innenohrschwerhörigkeit sowie geistiger Retardierung. Zusätzlich, wenn auch seltener, werden Wachstumsstörungen, epileptiforme Krampfanfälle und Hypogonadismus beschrieben (Gal *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 2012). Zu den typischen pathologischen Organbefunden am Auge gehören primäre retinale Dysplasie und Gliose, Leukokorie, Cataracta complicata, Phthisis bulbi, Gefäßhyalinose, prolongierte Ziliarfortsätze, persistierender hyperplastischer primärer Glaskörper sowie hämorrhagische Retinaablösungen (Gal *et al.*, 1986; Donnai *et al.*, 1988; Dresner *et al.*, 2007). Der deutsche Augenarzt Leopold Heine (1870-1940) beschrieb 1925 erstmals phänomenologisch die Pathologie des Pseudoglioma congenitum (Parmalee *et al.*, 2008). Gordon Norrie, dänischer Ophthalmologe (1855-1941), veröffentlichte zwei Jahre später den Stammbaum von zwei betroffenen Familien (Berger *et al.*, 1992; Gilmour, 2015). Es folgten weitere umfangreiche Analysen zur Klinik und zum Vererbungsmodus durch Mette Warburg (ebenfalls dänische Ophthalmologin) seit 1961 (Warburg, 1966).

Der Durchbruch zum Verständnis der Erkrankung auf molekulargenetischer Ebene gelang 1992 mit der genauen Genidentifizierung des Norrie-Allels (Berger *et al.*, 1992). Das Norrie Disease Gen (ND-Gen, 28 kbp) codiert für 133 Aminosäuren (Chen *et al.*, 1992) und ist am kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp11.3 - 11.4) centromernah lokalisiert (Black *et al.*, 1994) (siehe Abb. 1.1). Es beinhaltet 3 Exone (209, 381 und 1245 bp), die das 1,9 kbp lange Transkript bilden. Allerdings verschlüsseln nur Exon 2 und 3 die Information (Open reading frame 399 bp) für das Norrie disease Protein (NDP) (Berger, 1998), dessen alternative Bezeichnung Norrin sich in den Jahren nach der Erstbeschreibung durchgesetzt hat (Perez-Vilar *et al.*, 1997; Clevers, 2004; Zuercher *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2013). Die Funktionen von Norrin und seine Interaktionen mit anderen Proteinen waren lange Zeit unbekannt. Zum Zeitpunkt der dieser

Dissertation hier zugrundeliegenden experimentellen Studien (durchgeführt zwischen 1998-2001) waren lediglich das Gen, das Gentranskript, die Tertiärstruktur des Norrie disease Proteins und die Verteilung im Auge von Mensch und Maus mittels in-situ Hybridisation und Immunhistochemie bekannt (Berger *et al.*, 1996; Schroeder *et al.*, 1997; Berger, 1998; Hartzer *et al.*, 1999; Lenzner *et al.*, 2002; Rehm *et al.*, 2002). Auffällig war die deutliche Ähnlichkeit der Tertiärstruktur mit Wachstumsfaktoren (TGF- β , NGF, PDGF), dem extrazellulären Mucin oder dem von-Willebrand-Faktor (Meitinger *et al.*, 1993; Perez-Vilar *et al.*, 1997). Eine Beteiligung an der Regulation der neuro-ektodermalen Zell-Zell-Interaktion und Differenzierung wurde diskutiert (Chen *et al.*, 1993).

Zahlreiche Studien in den Folgejahren brachten neue Erkenntnisse zur genauen Funktion von Norrin, dem Norrie disease Protein. Unter anderem führten Untersuchungen zur Entwicklung und Reifung der retinalen Vaskulatur zu einer ätiologischen Verknüpfung von Norrin Defekten und Angiogenesestörungen (Ohlmann *et al.*, 2005; Schafer *et al.*, 2009). Als Wirkmechanismus zeigte sich, dass Norrin als aktivierender Ligand in der WTN Signaltransduktionskaskade fungiert (Parmalee *et al.*, 2008). Der Begriff WNT setzt sich aus den beiden Genbezeichnungen *Wg* und *Int1* zusammen, wobei erstgenanntes Gen bei der Fruchtfliege als ein entscheidendes Embryonalentwicklungsgen beschrieben wurde und letzteres bei Mäusen als Protooncogen (Nusse *et al.*, 2012). Ein Vergleich zeigte jedoch, dass es sich um Genhomologe zweier Spezies handelte. WNT umfasst eine Gruppe von sezernierten Glycoproteinen, die parakrin an G-Protein Rezeptoren der Frizzled Familie binden und eine Transduktionskaskade aktivieren, die über β -Catenin vermittelt die Expression von Zielgenen stimulieren, darunter zum Beispiel vascular endothelial growth factor (VEGF) (Parmalee *et al.*, 2008). Frizzled Rezeptor Fz4 knock-out Mäuse zeigen einen dem Norrie-Syndrom ähnlichen Phänotyp. Dies führte zu umfangreichen Studien, in deren Verlauf Norrin als weiterer Aktivator des WNT Systemes beschrieben wurde (Xu *et al.*, 2004). Der WNT Signalweg ist erforderlich für die normale Entwicklung der retinalen Blutgefäße und Norrin wird als ein zentraler Regulationsfaktor dieses Prozesses via WNT Aktivierung gesehen (Ye *et al.*, 2011). So ließ sich die Retina-Entwicklung bei Norrie-Protein Knockout-Mäusen durch ektope Gabe von Norrin normalisieren (Ohlmann *et al.*, 2005).

Die klinische Ausprägung der Norrie'schen Erkrankung variiert in Abhängigkeit von der Lokalisation und Art der Mutation (siehe exemplarisch Tab. 1.1.). In der wissenschaftlichen Literatur wurden bisher 116 kleinere (z.B. Punktmutationen) und 14 größere (mit Codon Verschiebung) beschrieben (Smith *et al.*, 2012). Führt ein Defekt zu einem Frameshift über das Norrie-Allel hinaus, können Nachbargene mitbetroffen sein. Insbesondere die gestörte

Expression der benachbarten MAO-A und -B Gene bei einigen Norrie-Fällen kann darauf zurückgeführt werden (Chen *et al.*, 1995) (Abb. 1.1.).

Amino acid position	Phenotype	Exchange	Reference	Amino acid position	Phenotype	Exchange	Reference
1	ND	Met, Arg	Schuback et al., 1995	101	mild ND	Ser, Phe	Walker et al., 1997
1	ND	Met, Val	Isashiki et al., 1995a	104	mild ND	Lys, Gln	Meindl et al., 1995
1	ND	Met, Val	Isashiki et al., 1995a	105	ND	Ala, Thr	Torrente et al., 1997
1	ND	Met, Val	Gar et al., 1996	108	ROP	Leu, Pro	Shastry et al., 1997b
13	ND	Leu, Arg	Fuchs et al., 1994	109	ND	Arg, stop	Schuback et al., 1995
29	ND	Ser, stop	Meindl et al., 1992	109	ND	Arg, stop	Schuback et al., 1995
39	ND	Cys, Arg	Joos et al., 1994	109	ND	Arg, stop	Mintz-Hittner et al., 1996
41	EVR, sporadic	Arg, Lys	Shastry et al., 1997a	110	ND	Cys, stop	Berger et al., 1992b
42	FEVR	His, Arg	Shastry et al., 1997a	110	ND	Cys, stop	Berger et al., 1992b
44	ND	Tyr, Cys	Meindl et al., 1992	110	ND	Cys, Arg	Fuchs et al., 1996
57	ND	Ser, stop	Berger et al., 1992b	110	FEVR	Cys, Gly	Torrente et al., 1997
58	ND	Lys, Asn	Fuentes et al., 1993	120	EVR, sporadic	Tyr, Cys	Shastry et al., 1997a
58	EVR, sporadic	Lys, Asn	Shastry et al., 1997a	121	ND	Arg, Gln	Fuentes et al., 1993
60	ND	Val, Glu	Meindl et al., 1992	121	mild ND	Arg, Gln	Meindl et al., 1995
61	ND	Leu, Phe	Berger et al., 1992b	121	FEVR	Arg, Leu	Johnson et al., 1996
61	ND	Leu, Phe	Rehm et al., 1997	121	FEVR	Arg, Leu	Mintz-Hittner et al., 1996
	(and venous insufficiency)			121	mild ND	Arg, Trp	Meindl et al., 1995
61	ND	Leu, Pro	Schuback et al., 1995	121	FEVR, mild ND	Arg, Trp	Kellner et al., 1996
63	ND	Ala, Asp.	Schuback et al., 1995	121	FEVR	Arg, Trp	Shastry et al., 1995
65	ND	Cys, Tyr	Strasberg et al., 1995	121	ROP	Arg, Trp	Shastry et al., 1997b
65	ND	Cys, Trp	Schuback et al., 1995	121	ROP	Arg, Trp	Shastry et al., 1997b
69	ND	Cys, Ser	Chen et al., 1993c	121	ROP	Arg, Trp	Shastry et al., 1995
73	ND	Ser, stop	Walker et al., 1997	123	ND	Ile, Asn	Schuback et al., 1995
74	ND	Arg, Cys	Berger et al., 1992b	123	ND	Ile, Asn	Schuback et al., 1995
74	ND	Arg, Cys	Fuchs et al., 1996	124	FEVR	Leu, Phe	Chen et al., 1993a
75	ND	Ser, Cys	Berger et al., 1992b	126	ND	Cys, stop	Fuchs et al., 1996
90	ND	Arg, Pro	Berger et al., 1992b	126	ND	Cys, stop	Kellner et al., 1996
95	ND	Cys, Arg	Isashiki et al., 1995b	126	ND	Cys, Ser	Gal et al., 1996
96	ND	Cys, Tyr	Berger et al., 1992b	128	ND	Cys, stop	Wong et al., 1993
96	ND	Cys, Tyr	Meindl et al., 1992	128	ND	Cys, stop	Schuback et al., 1995

Tab. 1.1. Übersicht der verschiedenen Mutationen im Norrie-Gen (Berger, 1998)

Dargestellt sind die Lokalisation des Gendefekts in Bezug auf die Aminosäuresequenz des Norrie-proteins, der daraus resultierende Phänotyp, die zugrundeliegende Basenveränderung und die Referenz.

ND - Norrie Disease

EVR - Exudative vitreoretinopathy

FEVR - Familial exudative vitreoretinopathy

ROP - Retinopathy of prematurity

1.2. Die Norrie-Maus – ein transgenes Tiermodell

Das murine Norrie-Protein zeigt eine hohe Homologie (94%) zum humanen und besteht aus 131 Aminosäuren im Vergleich zu 133 beim Menschen (Battinelli *et al.*, 1996). Beim Mausembryo wird das Norrie-Gen in nahezu allen Geweben einheitlich schwach exprimiert (Hartzer *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2011). Postnatal ist bei Jungtieren hingegen eine Genexpression nur noch am Auge, am Innenohr und in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns zu detektieren (Berger *et al.*, 1996; Rehm *et al.*, 2002). Mit der 1996 beschriebenen transgenen Maus gelang es,

ein „Knock-out“-Tiermodell für die Norriesche Erkrankung zu etablieren. Berger et al. (1996) ersetzten das Wildtyp Norrie-Gen durch eine inaktive um 56 Aminosäuren verkürzte Genkopie (Berger *et al.*, 1996). Embryonalen Stammzellen wurde mittels Elektroporation ein spezielles Genkonstrukt eingefügt, welches durch homologe Rekombination in das Exon 2 des Norrie-Gens integriert wurde und zum Verlust von 283 Basenpaaren führte. Nach Injektion der Stammzellen in Blastozysten und deren Einpflanzung in Ammentiere erhielt man eine männliche Maus, die das defekte Gen ins Keimbahn genom aufgenommen hatte. Heterozygote weibliche Nachkommen dienten nach Verpaarung mit Wildtyp-Männchen dem Aufbau der im Rahmen dieser Arbeit benutzten Norrie-Maus-Zucht.

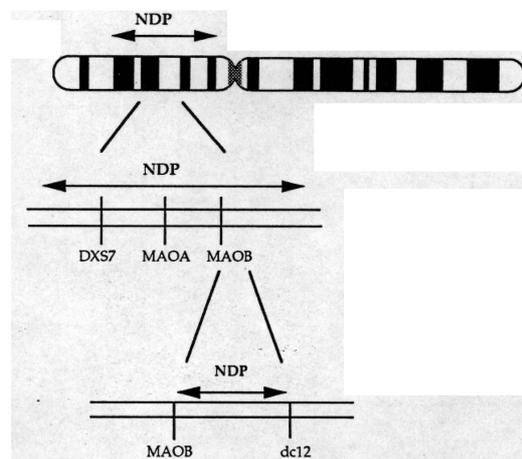


Abb. 1.1. Lokalisation des Norrie-Gens auf dem X-Chromosom (Black *et al.*, 1994)

- NDP - Gen für das Norrie Disease Protein
- MAOB - Gen für die Mono Amino Oxidase B

Bisherige Untersuchungen an diesem Tiermodell zeigten bei hemizygoten Männchen ähnliche morphologische Veränderungen wie am menschlichen Auge, jedoch in etwas milderer Ausprägung (Berger, 1998). *In situ* Hybridisierung Studien zeigten den Beginn der Expression des Ndp Genes bei Mäusen im Embryonalstadium ab dem 18. Gestationstag an (Rehm *et al.*, 2002). Gefäßveränderungen im Bereich der Mausretina wurden bei Ndp-Knockout-Mäusen ab dem 9. Tag postnatal beschrieben (Richter *et al.*, 1998). Bei Untersuchungen mit dem Elektretinogramm (ERG) wurden signifikante Veränderungen beschrieben (Ruether *et al.*, 1997). Die umfangreichste Geneexpressionsstudie an Mäusen mit Ndp-Gendefekt von Lenzner et al. zeigte jedoch 2002, dass sich viele der Retina-assoziierten Genveränderungen erst bei älteren Mäusen (Alter >2 Jahre) nachweisen lassen (Lenzner *et al.*, 2002), was die Möglichkeit indirekter Beteiligung nicht-retinaler Prozesse an der frühen Ausprägung des Norrie Phänotyps

offenlässt. Obwohl morphologisch und elektrophysiologisch die Befunde der inneren Retinaschichten allgemein als schwerwiegender erschienen, wurden auch an den Außensegmenten der Retina und dem Pigmentepithelium vereinzelte pathologische Veränderungen beschrieben. Im Bereich des Innenohres hingegen wird das Norrie-Gen bei der Maus nur gering exprimiert (Berger, 1998), jedoch finden sich ähnliche Beeinträchtigungen des Hörvermögens bei Mäusen wie bei der Norrie'schen Erkrankung beim Menschen (Rehm *et al.*, 2002). Der bei Norrie-Mäusen beschriebene Hörverlust startet etwa 3 Monate nach der Geburt. In Analogie zum Menschen waren heterozygote Weibchen ohne signifikante Alterationen.

1.3. Das Retinale Pigmentepithel (RPE)

1.3.1. Allgemeiner Aufbau des RPE

Das auch als Stratum pigmentosum bezeichnete einschichtige, dicht pigmentierte Epithel liegt zwischen Retina (Stratum nervosum) und Chorioidea und erstreckt sich von der Einmündung des Sehnervs bis zur Ora Serrata. Basolateral fußt es auf der Bruch'schen Membran, während apikal lange Mikrovilli die Außensegmente der Photorezeptoren erfassen (Bok, 1993; Strauss, 2005; Bonilha, 2014) (Abb. 1.2.). Etwa 3-5 Millionen Zellen (beim Menschen) bilden

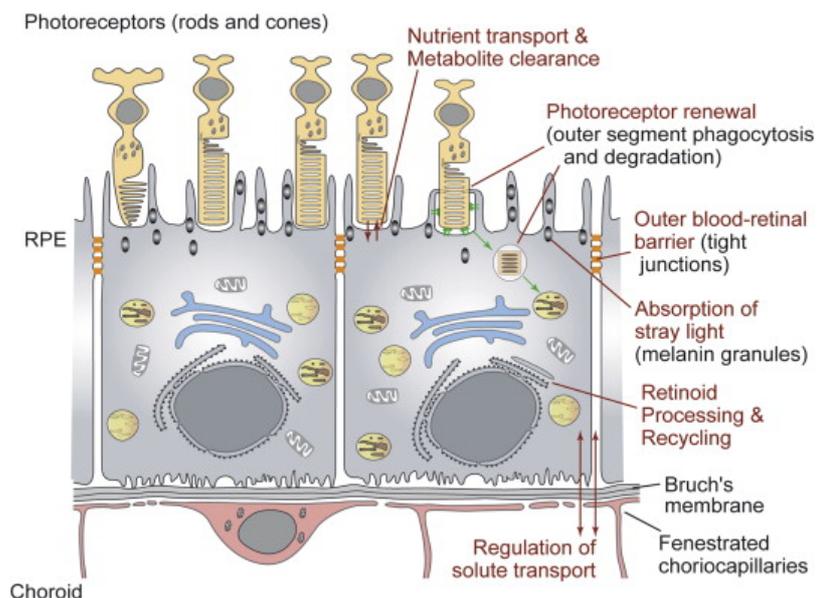


Abb. 1.2. Schematische Darstellung des Retinalen Pigmentepitheliums (Lehmann *et al.*, 2014)

eine geschlossene Epithelschicht, wobei die einzelnen Zellen eine charakteristische hexagonale Form annehmen (Sparrow *et al.*, 2010) (Abb. 1.3.). Die Pigmentierung ist in der Macula-Region stärker ausgeprägt als an der Ora serrata.

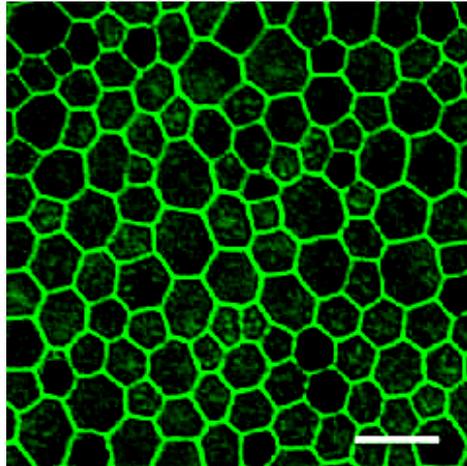


Abb. 1.3. Konfokal Mikroskopie-Aufnahme einer frisch-präparierten RPE-Resektion von einer 7 Tage alten Maus.

Färbung mit Alexa Fluor 488-phalloidin (Defoe *et al.*, 2007). Markierungsbalken 40 μm .

Auch die Form der Zellen variiert abhängig von der Lokalisation. Zentral messen sie etwa 12-18 μm im Durchmesser bei einer Höhe von etwa 10-14 μm . Zur Peripherie hin werden die Zellen flacher und können bis zu 60 μm breit werden (Snodderly *et al.*, 2002). Sowohl Pigmentations- als auch Größenmuster verändern sich mit dem Alter. In vivo ist differenziertes RPE-Gewebe nicht mehr in der Lage, sich durch Zellteilung zu erneuern. Kultivierte RPE-Zellen erlangen hingegen bei geeigneten Kulturbedingungen ihre Teilungsfähigkeit zurück (Bonilha, 2014). Als polares Epithel hat die RPE-Zelle einen charakteristischen Aufbau (Marmorstein *et al.*, 1998). Die basolaterale Begrenzung unterscheidet sich stark von der apikalen. Basale Einfaltungen der Membran sowie Ansammlungen von Mitochondrien deuten auf umfangreiche Transportprozesse sowie Proteinsynthese hin. Die apikale Membran trägt einen dichten Rasen von Mikrovilli (Lehmann *et al.*, 2014). Dabei werden bis zu 7 μm lange Fortsätze, die sich zwischen die Photorezeptoraußensegmente ausstrecken, und kürzere, 3 μm lange, die die Enden der Außensegmente einfassen, unterschieden. Ein weiteres Charakteristikum ist die apikale Na^+/K^+ -ATPase, die mit Ausnahme des Plexus Choroideus bei allen anderen Epithelien basolateral lokalisiert ist. Ein großer Teil des Zytoplasmas wird vom Zellkern ausgefüllt, der häufig von

Melaningranula überdeckt wird. Im lichtadaptierten Auge befindet sich der Hauptanteil des Melanins im apikalen Bereich der Zelle.

1.3.2. Funktion des RPE

Die Funktionen des RPE sind sehr vielgestaltig und lassen sich zum Teil von seinem Aufbau und seiner Lokalisation ableiten (Steinberg, 1985; Bok, 1993; Marmorstein *et al.*, 1998; Strauss, 2005) (siehe Schema in Abb. 1.4.):

1. Schranken- und Transportfunktion

Das RPE ist Hauptbestandteil der Blut-Retina-Schranke. Die fenestrierten Gefäße der Chorioidea auf der einen Seite, der subretinale Raum auf der anderen, dient es mit seinen dichten Schlussleisten und seiner umfangreichen Transportproteinausstattung als effektives Filter- und Steuerelement. Unter anderem wurde der gerichtete Transport von Glukose (Sugasawa *et al.*, 1994), Vitamin A (Bok, 1985) und Docosahexansäure (Bazan *et al.*, 1992) durch das RPE beschrieben. Neben dem Nährstofftransport sind Wasser- und Elektrolytverschiebungen zwischen den beiden Kompartimenten subretinaler Raum und Blutgefäße elementarer Bestandteil der Funktionen des RPE. Neben aktiven Transportern (z.B. Na^+/K^+ -ATPase) und Kotransportern bzw. Austauschern treten hierbei eine Vielzahl von Ionenkanälen in Erscheinung (Reichhart *et al.*, 2014). Auf letztere wird in einem gesonderten Kapitel eingegangen. Der kontinuierliche Nettofluss von Ionen und Flüssigkeit vom subretinalen Raum in Richtung Chorioidea ist neben der extrazellulären Interphotorezeptormatrix maßgeblich für die Adhäsion der Retina an das RPE (Frambach *et al.*, 1989).

2. Gliafunktion

Im Rahmen der Phototransduktion entstehen an der Photorezeptormembran schnelle und kurzfristige Ionenverschiebungen, die Auswirkungen auf das Ionenmilieu im gesamten subretinalen Raum haben. So sinkt z.B. die K^+ -Konzentration von 5 auf 2 mmol/l (Steinberg, 1985), was wiederum die Erregbarkeit der Photorezeptoren nachteilig beeinflusst. Das RPE ist durch adaptive Transportprozesse von K^+ -Ionen in der Lage, Veränderungen zu kompensieren und zu einer konstanten Erregbarkeit der Photorezeptoren (la Cour, 1985). Das RPE ähnelt darin funktionell sehr den Gliazellen des Nervensystems, die neben Ernährungs-, Schutz- und

Isolierungsfunktion für die Homeostase des Ionenmilieus an der Membran erregbarer Zellen verantwortlich sind.

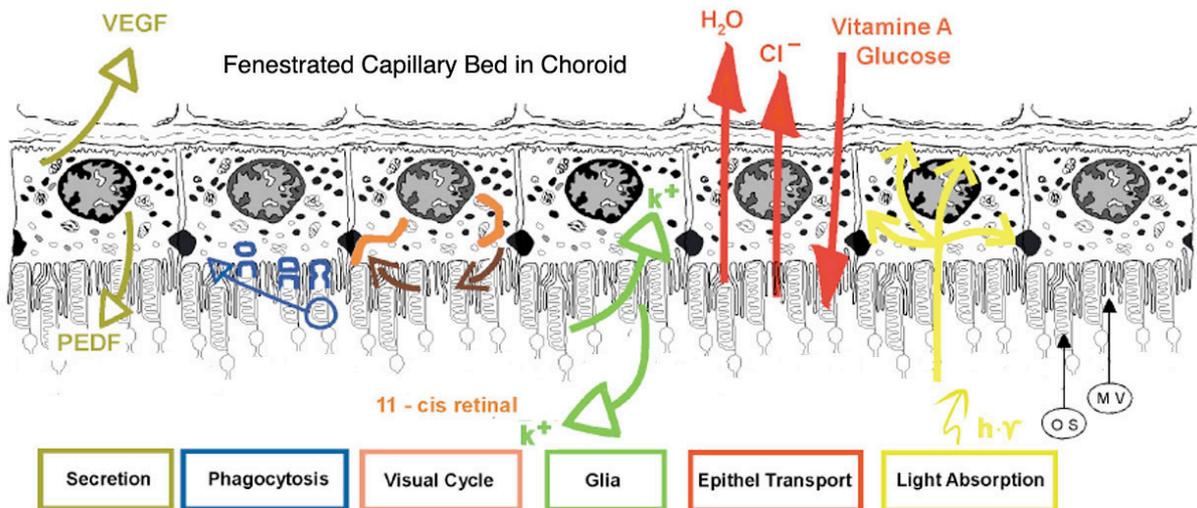


Abb. 1.4. Schema zur zusammenfassenden Darstellung der Funktionen des RPE (Strauss, 2005)

3. Phagozytosefunktion

Eine der kritischsten Funktionen des RPE umfasst seine Rolle im sog. „visual cycle“, nämlich die Regenerierung des beim Sehprozess gebleichten Sehfärbstoffs 11-*cis*-retinal (Young *et al.*, 1969; Edwards *et al.*, 2000; Finnemann, 2003; Thompson *et al.*, 2003). Die Photorezeptoraußensegmente bestehen aus eng anliegenden Membranscheiben, die vom Basalkörper der Rezeptorzellen ständig neu gebildet werden und mit reaktivem Rhodopsin bestückt sind. Beim Lichteinfall kommt es zur Photoisomerisation, d.h. 11-*cis*-Retinal, als Lichtsensor des aktiven Rhodopsins, wird zu *trans*-Retinal. Rhodopsin wird in diesem Prozess „gebleicht“ und die erforderliche Reisoomerisierung von *trans*-Retinal zu 11-*cis*-Retinal erfolgt am RPE. An den Spitzen der Photorezeptoraußensegmente werden die „gebleichten“ Membranscheiben abgestoßen und von der apikalen Membran des RPE phagozytiert. Die Membranfraktion wird recycelt und *trans*-Retinal durch eine mehrstufige Enzymkaskade in 11-*cis*-Retinal überführt, welches abschließend mittels spezieller Transportproteine den Photorezeptoren wieder zugeführt wird (Bok, 1993). Die Aktivität der Phagozytose und der „visual cycle“ folgen einem zirkadianen Rhythmus (Bosch *et al.*, 1993).

4. Sekretionsfunktion

Das RPE ist in der Lage, eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren zu sezernieren. PDGF, bFGF, VEGF, PEDF, TGF-β und HGF wurden am RPE beschrieben (Tanihara *et al.*, 1997). Ziel dieser

Faktoren ist vor allem die Retina, allerdings wurden für einige Faktoren auch die korrespondierenden Rezeptoren an der RPE-Membran nachgewiesen, was für eine autokrine Regulation spricht (Strauss, 2009).

5. weitere Funktionen

Das RPE trägt zur Optimierung des optischen Apparates bei, indem es die Streustrahlung innerhalb des Auges mittels seiner Melaningranula absorbiert (Strauss, 2009). Des Weiteren produziert es eine aus Sialinsäure (25%), Proteoglycanen (15%) und Chondroitinsulfat (60%) bestehende Extrazellulärmatrix (Varner *et al.*, 1987), der als Funktion mithilfe bei der Retinaadhäsion sowie der Phagozytose zugesprochen werden.

1.3.3. Das RPE und Erkrankungen des Auges

Die am ausführlichsten untersuchte Erkrankung des Auges mit Involvierung des RPE ist die Retinitis pigmentosa (Voaden, 1988; Luty *et al.*, 1999; Sparrow *et al.*, 2010). Die Retinitis pigmentosa (RP) ist weltweit eine der führenden vererbten Erblindungsursachen mit einer jährlichen Prävalenz von etwa 1:4000 (Kellner, 1997) und als häufigste hereditäre retinale Dystrophie beim Menschen verantwortlich für etwa 50% aller vererbter Netzhauterkrankungen (Daiger *et al.*, 2013). Die Erkrankung variiert in klinischer Ausprägung und Vererbungsmodi (Zrenner *et al.*, 1992). Über 3.000 Mutationen sind im Zusammenhang mit RP beschrieben worden (Daiger *et al.*, 2013). Klinisch steht initial progressive Nachtblindheit (Nyctalopia) im Fokus, welche sich in den meisten Fällen in der Adoleszenz manifestiert. Die Einschränkung des peripheren Gesichtsfeldes ist ein weiteres charakteristisches Anfangssymptom von RP. Die Behandlungsmöglichkeiten sind auf symptomatische Therapie beschränkt und auf Versuche, die Krankheitsprogression zu verlangsamen. Entwicklungen im Bereich der Gentherapie und der Stammzellentherapie sind vielversprechende Ansätze für eine zukünftige kausale Therapie (He *et al.*, 2014; Petrs-Silva *et al.*, 2014). Zur Erforschung der Retinitis pigmentosa zugrundeliegenden pathophysiologischen Zusammenhänge spielten Tiermodelle eine zentrale Rolle. Insbesondere die Royal College of Surgeons (RCS) Ratte ist ein intensiv untersuchtes Tiermodell für eine hereditäre Netzhautdystrophie, die der Retinitis pigmentosa beim Menschen vergleichbar ist (Bourne *et al.*, 1938; Voaden, 1988; Strauss *et al.*, 1998b). Elektrophysiologische Untersuchungen konnten dabei eine erhöhte Leitfähigkeit der Ca^{2+} -Kanäle

bei RPE-Zellen der RCS-Ratte nachweisen, welche zum Teil auf eine gestörte Regulation der Kanalaktivität zurückgeführt wurde (Strauss *et al.*, 1993; Mergler, 1998).

1.4. Ionenkanäle des RPE

Dass das RPE zur Ausübung all seiner Funktionen als hochdifferenziertes Gewebe anzusehen ist, spiegelt sich unter anderem in seiner reichhaltigen Ausstattung an unterschiedlichsten Ionenkanälen wieder (Reichhart *et al.*, 2014). Neben der direkten Beteiligung am epithelialen Transport sind sie an Signal- und Steuerungsprozessen an der Membran beteiligt. Elektrophysiologisch konnten sowohl an frisch isolierten RPE-Zellen als auch in Primärkulturen unter anderem K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- und unspezifische Kationenkanäle nachgewiesen werden (Hughes *et al.*, 1990; Fox *et al.*, 1992b; Hughes *et al.*, 1993; Strauss *et al.*, 1993; Ueda *et al.*, 1993; Ueda *et al.*, 1994; Ueda *et al.*, 1995; Hughes *et al.*, 1996; Mergler *et al.*, 1998; Rosenthal *et al.*, 2002; Wollmann *et al.*, 2006; Rosenthal *et al.*, 2007; Wimmers *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2014) Auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Ionenkanäle wird im Folgenden eingegangen.

1.4.1. K^+ -Kanäle

Kaliumkanäle besitzen die bei weitem größte Vielfalt aller Ionenkanäle (Perney *et al.*, 1991; Christie, 1995; Gonzalez *et al.*, 2012). Erschwert wird eine Übersicht sämtlicher bekannter Kanalfamilien dadurch, dass unterschiedliche Klassifizierungen eingeführt wurden, die sich zurzeit noch nicht vollständig zur Deckung bringen lassen. Die erste Gliederung basiert auf den elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanäle (Mathie *et al.*, 1998). Der überwiegende Teil der Kanäle zeigt eine spannungsabhängige Charakteristik, während einige andere den Ligandengesteuerten Kanälen zugeordnet werden. Patch-Clamp Untersuchungen ließen eine grundlegende Unterscheidung in zwei verschiedene Familien zu: die der auswärtsrektifizierenden und die der einwärtsrektifizierenden Kanäle. Der Begriff Rektifikation beschreibt dabei die Spannungsabhängigkeit der Kanalleitfähigkeiten, die es ermöglicht, das Aktionspotential auf das Ruhepotential zurück zu führen, zu rektifizieren. Auswärtsrektifizierende Ströme zeigen wachsende auswärtsgerichtete Stromamplituden bei zunehmender Depolarisation, einwärtsrektifizierende vergrößern ihre Einwärtsströme bei steigender Hyperpolarisation (Hille,

1992). Zur ersten Gruppe werden der Delayed-Rectifier K^+ -Strom (K_{DLR}), der schnelle „A-Typ“- K^+ -Strom (K_A), der „M-Typ“- K^+ -Strom (K_M) sowie die beiden Ca^{2+} -abhängigen Kaliumströme mit großer (BK_{Ca} , auch „Maxi-K“) bzw. kleiner (SK_{Ca}) Leitfähigkeit gezählt. Demgegenüber steht der klassische Inward Rectifier (K_{IR}), der bei Spannungen negativer als das Ruhemembranpotential aktiviert und damit Kalium gegen seinen Konzentrationsgradienten in die Zelle bewegen kann.

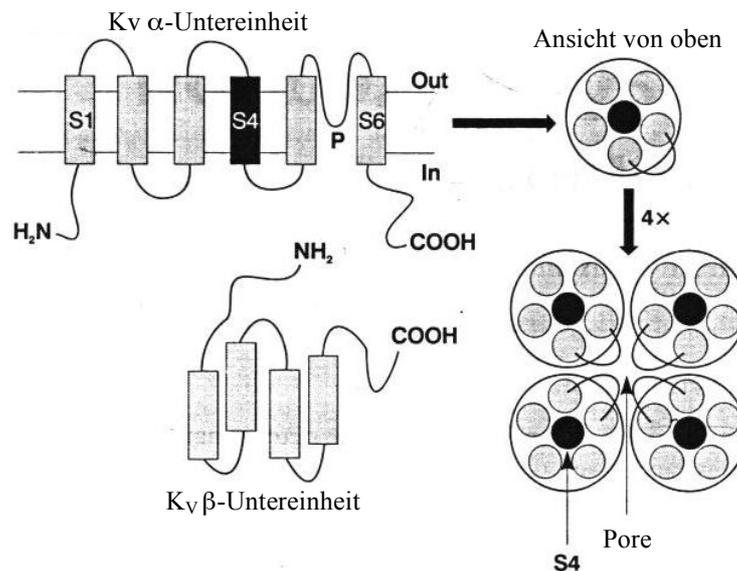


Abb. 1.5. Schematische Darstellung eines auswärtsrektifizierenden K^+ -Kanals (Edwards *et al.*, 1997)

Die α -Untereinheit setzt sich aus 6 membrandurchspannenden Segmenten (S1-S6) zusammen. S4 dient als Spannungssensor. Jeweils 4 solcher Untereinheiten bilden das Kanalgrundgerüst, die P-Schleifen zwischen S5 und S6 bilden dabei die Kanalpore. Jeder α -Untereinheit lagert sich jeweils eine regulatorische β -Untereinheit an.

Erstaunliche Übereinstimmung ergibt sich zwischen der beschriebenen funktionellen Einteilung und der molekularen Struktur der Kanäle. Diese lässt sich ebenfalls in zwei Hauptfamilien unterteilen. Ionenkanäle sind generell aus mehreren Proteinuntereinheiten zusammengesetzt, sogenannten „subunits“. Dabei kommt der α -subunit als Poren-formende Untereinheit die größte Bedeutung zu. Molekulare und genetische Klassifizierungen richten sich von daher vor allem nach der α -subunit-Komposition eines Kanals. Der β -subunit (und weiteren subunits bei anderen Ionenkanälen) werden regulatorische Funktionen und die Feinabstimmung des Stromverlaufs durch einen Kanal zugeschrieben (Edwards *et al.*, 1997). Die Hauptfamilie der auswärtsrektifizierenden Kaliumströme bildet aus 4 α -subunits das Kanalgerüst zur Bildung einer Pore. Dabei setzt sich jede α -Untereinheit aus 6 membrandurchspannenden Aminosäure-

ketten in α -Helixstruktur zusammen (S1-S6; siehe Abb.1.5.), welche durch alternierend intra- und extrazellulär gelegene Schleifen verbunden sind. Funktionell besonders wichtig scheint die Verbindung zwischen S5 und S6 zu sein, die in die Pore hinein ragt und deren Größe bestimmt, weshalb sie auch als „p-loop“ bezeichnet wird. In Segment S4 ist etwa jede dritte Aminosäure positiv geladen (Lysin und Arginin), was die Vermutung nahelegt, dass es die Funktion des Spannungssensors übernimmt (Catterall, 1995). Den 4 α -subunits lagern sich 4 β -subunits an.

Die Gruppe der einwärtsrektifizierenden Kanäle besitzt ebenfalls 4 α -Untereinheiten, die sich jedoch grundlegend von denen der anderen Gruppe unterscheiden. Lediglich 2 membrandurchspannende Segmente (M1 und M2) bilden das Grundgerüst einer α -subunit (siehe Abb. 1.6.). Interessanterweise zeigen beide Segmente erstaunliche Ähnlichkeit mit S5 und S6 der anderen Gruppe. Der Poren-formende „p-loop“ befindet sich auch hier als Segmentverbindung zwischen M1 und M2. Hingegen fehlt ein als Spannungssensor fungierendes S4-Äquivalent.

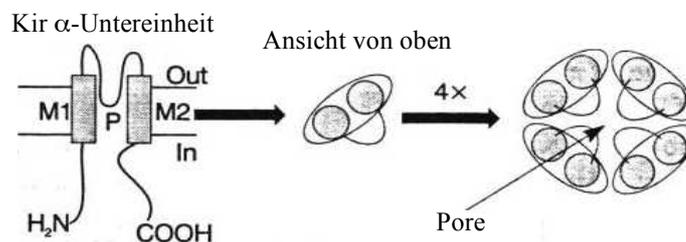


Abb. 1.6. Schematische Darstellung eines einwärtsrektifizierenden K^+ -Kanals (Edwards *et al.*, 1997)

Die α -Untereinheit setzt sich aus lediglich 2 membrandurchspannenden Segmenten (M1 und M2) zusammen. Jeweils 4 solcher Untereinheiten bilden das Kanalgrundgerüst, die P-Schleifen zwischen den beiden M-Segmenten formen die Kanalpore.

Die dritte Klassifikation beruht auf genetischen Aspekten. 1987 gelang es erstmals, einen Kaliumkanal zu klonieren, dessen Mutation bei *Drosophila melanogaster* das *Shaker*-Syndrom auslöst (Kamb *et al.*, 1987). Neben der *Shaker*-Kaliumkanalfamilie wurden weitere Kanäle der Fruchtfliege molekulargenetisch charakterisiert und als *Shab*, *Shaw* und *Shal* bezeichnet. Diese Klassifizierung konnte jedoch der später dann offensichtlichen Vielfalt der Kaliumkanäle nicht mehr gerecht werden, zumal in Vertebraten noch weitaus mehr Kaliumkanäle exprimiert werden als in *Drosophila*. 1993 wurde eine neue systematische Nomenklatur eingeführt, die mittlerweile weithin als Standardeinteilung gilt (Chandy *et al.*, 1993). Sie richtet sich nach den α -subunits und folgt der Grobeinteilung in auswärts- und einwärtsrektifizierende Kanäle. Erstere werden als

Kv letztere als *Kir* bezeichnet. *Shaker*-ähnliche Kanäle werden *Kv1.x* bezeichnet, *Shab* *Kv2.x*, *Shaw* *Kv3.x* und *Shal*-ähnliche *Kv4.x*. *Kv5.x* und *Kv6.x* haben kein Drosophilaäquivalent. Das „x“ in dieser Einteilung steht für verschiedenste Untergruppen, die bei jeder Kanalfamilie bekannt sind. Die Gruppe der einwärtsrektifizierenden Kanäle umfasst zurzeit mindestens 7 Kanaltypen: *Kir1.x*-*Kir7.x*.

Am RPE von Vertebraten wurden elektrophysiologisch folgende Kanäle beschrieben: Der „A-Typ“-K⁺-Strom an frisch isolierten fetalen humanen RPE-Zellen, der „M-typ“-K⁺-Strom an frisch isolierten RPE-Zellen vom Rind, der Ca²⁺-abhängige-K⁺-Strom an humanen RPE-Zellen und an kultivierten Kaninchen-RPE-Zellen sowie der Delayed-Rectifier-artige-K⁺-Strom an frisch isolierten Zellen von Frosch, Schildkröte, Affe und Mensch und an kultivierten RPE-Zellen von Kaninchen, Mensch und Ratte. Inward Rectifier-artige-K⁺-Ströme wurden an frisch isolierten RPE-Zellen von Mensch, Frosch, Kröte, Schildkröte und Affe sowie an kultivierten Zellen von Kaninchen, Affe, Mensch und Ratte nachgewiesen (Hughes *et al.*, 1990; Fox *et al.*, 1992a; Strauß *et al.*, 1993; Wen *et al.*, 1993; Strauss *et al.*, 1994b; Tao *et al.*, 1994; Tao *et al.*, 1995; Takahira *et al.*, 1997; Strauss *et al.*, 2002).

1.4.2. Delayed Rectifier K⁺-Kanäle am RPE

Delayed Rectifier-artige K⁺-Ströme ließen sich an RPE-Zellen sowohl in Kultur als auch bei Frischzellpräparationen von diversen Spezies nachweisen. Elektrophysiologisch werden diese Ströme durch ein typisches Aktivierungs-/Inaktivierungsmuster charakterisiert. K_{DLR}-Kanäle zeigen eine langsam ansteigende zeitabhängige Aktivierung, die im Verhältnis zur schnellen Aktivierung der neuronalen Na⁺ Kanäle beim Aktionspotential somit verzögert und prägend für den Namen ist. Sie aktivieren bei Depolarisationsschritten vom Ruhemembranpotential der RPE-Zelle (-40 mV – -50 mV) aus bei Erreichen einer Aktivierungsschwelle von etwa -30 mV (Strauß *et al.*, 1993; Strauss *et al.*, 1994b; Strauss *et al.*, 2002). Dabei ist die Aktivierungskinetik generell langsamer als bei dem schnellen „A-Typ“- K⁺-Kanal. Die Inaktivierung erfolgt, wenn überhaupt, sehr langsam nach einem Zeitfenster, das im Sekundenbereich liegt (Strauß *et al.*, 1993; Edwards *et al.*, 1997). Die Einzelkanalleitfähigkeit ist verhältnismäßig klein (10-20pS). Die Ströme lassen sich allgemein durch Ba²⁺-Ionen und TEA blockieren sowie einer Reihe spezifischer Skorpiongifte (z.B. Noxiustoxin, Margatoxin, Dendrotoxin, Agitoxin), die unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen *Kv*-Untereinheiten besitzen. Im Gesamtorganismus von Vertebraten wurden folgende α -Subunits Delayed-Rectifier-artigen Kanälen zugeschrieben:

Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, 1.6, 2.1, 2.2, 3.1 und *Kv3.2* (Edwards *et al.*, 1997). Davon konnten bisher am RPE *Kv 1.2, 1.3* und *Kv2.1* mittels Immunocytochemie und PCR (Pinto *et al.*, 1998) und *Kv1.3* mittels Westernblot (Strauss *et al.*, 2002) nachgewiesen werden.

Die Funktion der K_{DLR} -Kanäle am RPE ist weitgehend ungeklärt. Da die Stromamplitude der auswärts gerichteten Kaliumströme mit steigender Depolarisation zunimmt, kommt diesen Kanälen eine entscheidende Bedeutung bei der Rückführung des Membranpotentials nach Depolarisation zu. Unter physiologischen Bedingungen kommt es jedoch zu Depolarisierungen jenseits der Kanalaktivierungsschwelle von -30 mV nur bei erregbaren Zellen des Nerven- und Muskelsystems sowie des Herzens. Strauß *et al.* (2002) stellte die Hypothese auf, dass K_{DLR} -Kanäle am RPE funktionelle Gegenspieler der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle bei der Regulation der Ca^{2+} -Homeostase seien (Strauss *et al.*, 2002). Ähnliche Regulationsmuster der Kanäle durch Tyrosin- und Proteinkinasen (PKC) unterstützen diese Annahme. Des Weiteren scheint eine gewisse Unterstützung des Ruhemembranpotentials durch die repolarisierende Richtung des Stromes wahrscheinlich. Insgesamt wird der Anteil des K_{DLR} -Stromes an der Kaliumgesamtleitfähigkeit der RPE-Membran unter Ruhebedingungen von mehreren Autoren als eher gering eingeschätzt.

1.4.3. Inward Rectifier K^+ -Kanäle am RPE

Elektrophysiologisch zeichnen sich diese Kanäle durch den Einstrom von Kalium in die Zelle entgegen seinem Konzentrationsgradienten aus. Zur Aktivierung bedarf es jedoch einer Hyperpolarisierung auf Werte negativer als -70 mV. Die Stromamplitude nimmt mit steigender Negativierung des Membranpotentials bis zu einem gewissen Punkt zu. Als Blocker sind TEA und Ba^{2+} -Ionen bekannt. Für die ungewöhnliche Stromflusscharakteristik werden intrazelluläre blockierende Partikel, wie z.B. Mg^{2+} -Ionen und Polyamine, verantwortlich gemacht (Kubo, 1994). Der molekulargenetische Nachweis für K_{IR} gelang für Kir4.1 am Ratten-RPE (Kusaka *et al.*, 1999) und für Kir7.1 am RPE von Ratten (Kusaka *et al.*, 2001) und Rindern (Shimura *et al.*, 2001).

Entgegen seinem Namen besitzt der Kanal jedoch auch eine auswärts gerichtete Kaliumleitfähigkeit bei Membranspannungen, die positiver als das Ruhepotential sind. Hille (1992) sieht darin sogar die Hauptfunktion unter normalen physiologischen Bedingungen, wo Hyperpolarisationen auf Werte weit negativer als -70 mV wohl eher selten vorkommen dürften (Hille, 1992). Am intakten und präparierten RPE-Gewebe wurde hingegen nachgewiesen, dass die Gesamtkaliumleitfähigkeit an der apikalen Membran vor allem durch den K_{IR} -Strom bedingt

ist (Hughes *et al.*, 2008). Wichtig erscheint dabei die enge Interaktion mit der apikalen $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase zu sein (Arrindell *et al.*, 1992). Es wurde postuliert, dass der K_{IR} -Kanal eine entscheidende Rolle spielt bei der Kompensation von Veränderungen der Kaliumkonzentration im subretinalen Spalt, die durch die Licht-induzierte Hyperpolarisation an der Photorezeptormembran bedingt sind. Er ist damit in großem Maße am Nettokaliumtransport durch das RPE beteiligt. Da der Kanal sowohl in hyperpolarisierender Richtung durch einen positiven Einwärtsstrom als auch in depolarisierender Richtung durch einen positiven Auswärtsstrom jeweils den Spannungsvektoren entgegenwirkt, wird dem K_{IR} auch maßgebliche Beteiligung an der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials zugesprochen (Reichhart *et al.*, 2014).

1.4.4. Ca^{2+} -Kanäle

Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vermitteln den Einstrom von Kalziumionen in die Zelle nach Aktivierung durch depolarisierende Impulse an der Membran. Sie sind elementar bei der Signalübertragung zwischen Zellen bzw. in die Zelle. Sie generieren Ca^{2+} -Aktionspotentiale, steuern Sekretions- und Genexpressionsprozesse, sorgen für die elektromechanische Kopplung an Muskelzellen und modulieren den Zellstoffwechsel durch das $\text{IP}_3\text{-Ca}^{2+}$ -second messenger System (Bean, 1989; Hille, 1992).

Ca^{2+} -Kanäle wurden ähnlich wie Kaliumkanäle lange Zeit anhand ihrer elektrophysiologischen und pharmakologischen Merkmale eingeteilt. Diese Gliederung wird wohl auch weiterhin Bestand haben (Edwards *et al.*, 1997). Die 6 Kanalfamilien der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle lassen sich in 2 Hauptgruppen unterteilen: die der „high-voltage-activated“ (HVA) und die der „low-voltage-activated“ (LVA) Kanäle. Erstere Gruppe umfasst die „L-Typ“- Ca^{2+} -Kanäle („L“ für „long-lasting“ und „large conductance“), die „N-Typ“- Ca^{2+} -Kanäle („N“ für „neither L- nor T-type“ bzw. „neuronal“), die „P-Typ“- Ca^{2+} -Kanäle („P“ für „Purkinje Neuronen Typ“), die „Q-Typ“- Ca^{2+} -Kanäle und die „R-Typ“- Ca^{2+} -Kanäle („R“ für „resistant“ in Bezug auf Blocker). Der „T-Typ“-Kalziumstrom („T“ für „tiny conductance“ und „transient current“) aktiviert bereits bei -60 mV und bildet die Gruppe der LVA-Kanäle. Die phylogenetische Verwandtschaft zu Kaliumkanälen wird auf struktureller Ebene deutlich. Die für die Porenbildung verantwortliche α_1 -subunit zeigt einen ähnlichen Grundaufbau wie bei spannungsabhängigen Kaliumkanälen. Allerdings bildet nur eine α_1 -subunit das Kanalgerüst. Sie besteht aus 4 homologen Domänen, die wiederum jeweils 6

membrandurchspannende α -Helices S1-S6 umfassen. Segment S4 fungiert als Spannungssensor, die Schleife zwischen S5 und S6 ist an der Porenbildung beteiligt. 10 verschiedene α_1 -subunits sind bisher bekannt und werden den 6 verschiedenen Ca^{2+} -Kanalfamilien zugeordnet (Catterall, 1995). Neben der α_1 -subunit sind noch 3-4 weitere subunits an der Kanalformation beteiligt (siehe Abb.1.7.). Je nach Kanaltyp setzt sich ein Kanal aus α_1 -, α_2 -, β -, δ -, γ -subunit zusammen.

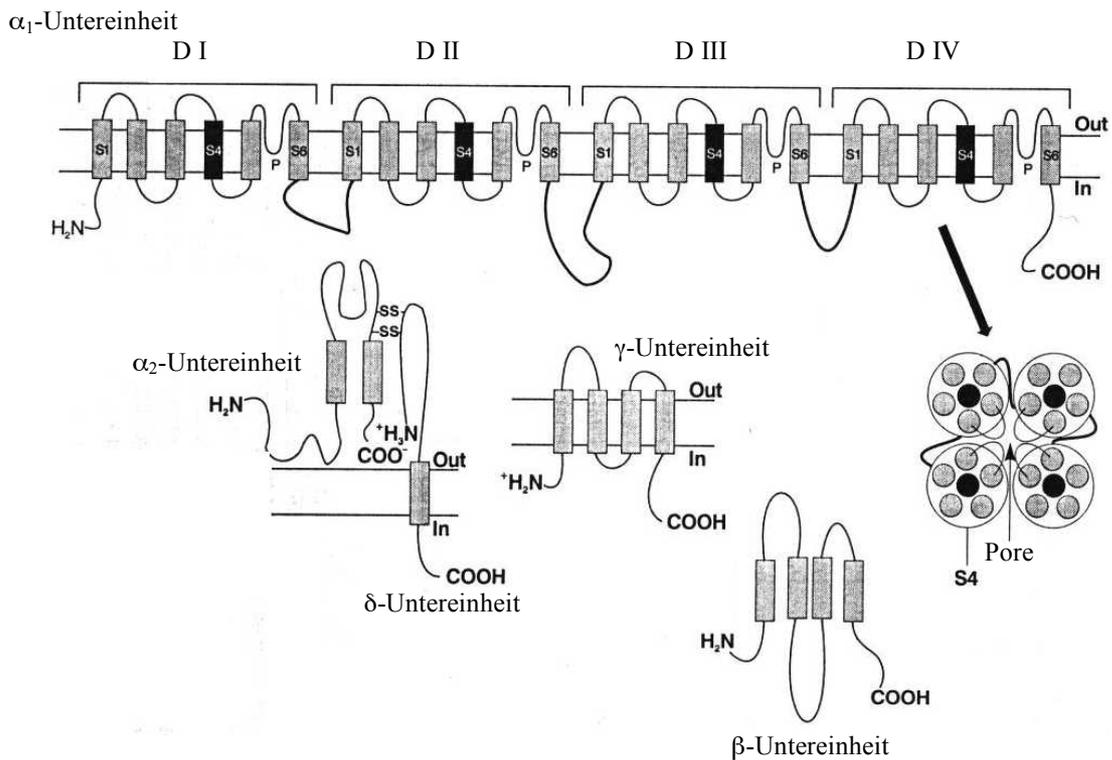


Abb. 1.7. Schematische Darstellung eines Ca^{2+} -Kanals (Edwards *et al.*, 1997)

Die α_1 -Untereinheit mit ihren homologen Domänen D I bis D IV bildet das Kanalgerüst, wobei Segment S4 jeweils als Spannungssensor fungiert und die P-Schleife zwischen S5 und S6 die Pore formt. Zwischen den ersten beiden Domänen lagert sich von intrazellulär die β -subunit an. Die γ - und δ -subunit sind membrandurchspannende Komponenten. Letztere steht über Disulfidbrücken mit der α_2 -Untereinheit in Verbindung und wird stets gemeinsam mit dieser exprimiert.

Ertel *et al.* veröffentlichten im Jahre 2000 eine neue Nomenklatur für spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, die die funktionellen und strukturellen Gesichtspunkte zu vereinen versucht (siehe Tab.1.2.) (Ertel *et al.*, 2000). Am RPE von Vertebraten wurden bisher von mehreren Arbeitsgruppen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle beschrieben (Strauss *et al.*, 1993; Ueda *et al.*, 1993; Ueda *et al.*, 1995; Strauss *et al.*, 2000; Rosenthal *et al.*, 2007). Bei älteren Primärkulturen von Ratten-RPE wurde zusätzlich ein Ca^{2+} -Strom beschrieben, der von seiner elektrophysio-

logischen und pharmakologischen Charakteristik keinem der bekannten Kanaltypen zugeordnet werden konnte und der „FT-Typ“ (für „*fast transient*“) genannt wurde (Wimmers *et al.*, 2008).

Ca ²⁺ -Kanal	Ca ²⁺ -Stromtyp	Vorkommen	α ₁ -subunit	Funktion
Ca _v 1.1	L-Typ	Skelettmuskel	α _{1S}	Kontraktion
Ca _v 1.2	L-Typ	Herzmuskel, Neurone, endokrine Zellen	α _{1C}	Kontraktion Sekretion
Ca _v 1.3	L-Typ	endokrine Zellen, Neurone	α _{1D}	Sekretion Genregulation
Ca _v 1.4	L-Typ	Retina	α _{1F}	Transmitterfrei- setzung
Ca _v 2.1	P- & Q-Typ	Nervenendigungen, Dendriten	α _{1A}	Transmitterfrei- setzung
Ca _v 2.2	N-Typ	Nervenendigungen, Dendriten	α _{1B}	Transmitterfrei- setzung
Ca _v 2.3	R-Typ	Nervenendigungen, Dendriten	α _{1E}	Aktionspotential Transmitterfrei- setzung
Ca _v 3.1	T-Typ	Herzmuskel, Neurone, Skelettmuskel	α _{1G}	
Ca _v 3.2	T-Typ	Herzmuskel, Neurone	α _{1H}	
Ca _v 3.3	T-Typ	Neurone	α _{1I}	

Tab. 1.2. Übersicht der neuen Nomenklatur der Ca²⁺-Kanäle, modifiziert (Catterall, 2000)

Ca²⁺-Kanäle des L-Typs gehören zu den high voltage activated (HVA) Kanälen. Sie können sowohl an Neuronen, Skelett- und Herzmuskelzellen als auch bei sezernierenden Epithelien nachgewiesen werden und sind jeweils an den zentralen Funktionen dieser Gewebe beteiligt, wie

der Modulation synaptischer Aktivität zwischen Neuronen, der elektromechanischen Kopplung an Muskelzellen und der Regulation von zellulärer Sekretion (Bean, 1989; Murphy *et al.*, 1991; Catterall, 2000). L-Typ Ca^{2+} -Kanäle am RPE zeichnen sich durch ihre Dihydropyridin Sensitivität aus (Ueda *et al.*, 1995), wobei Nifedipin, Nitrendipin oder Nimodipin als pharmakologische Blocker fungieren. Elektrophysiologisch ist eine höhere Leitfähigkeit für Ba^{2+} als für Ca^{2+} charakteristisch, so dass Ba^{2+} Ionen in Experimenten als Ladungsträger anstelle von Ca^{2+} zum Einsatz kommt. Molekular setzt sich der L-Typ Ca^{2+} -Kanal aus fünf Untereinheiten zusammen: α_1 -, α_2 -, β -, γ - und δ -Untereinheit (Perez-Reyes *et al.*, 1995; Catterall, 2000). Der α_1 -Untereinheit kommt als Poreinheit besondere Bedeutung zu, da sie die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals bestimmt. Anhand molekularer und physiologischer Charakterisierung lassen sich die α_1 -Untereinheiten in vier Kategorien einteilen: die Skelettmuskel-Untereinheit (α_{1S} oder CaV1.1), die Herzmuskel-Untereinheit (α_{1C} oder CaV1.2), die neuroendokrine Untereinheit (α_{1D} oder CaV1.3) und die Retina-Untereinheit (α_{1F} oder CaV1.4). An kultivierten RPE-Zellen konnten α_{1D} -Untereinheiten nachgewiesen werden (Rosenthal *et al.*, 2007; Wimmers *et al.*, 2008).

1.4.5. Cl Kanäle am RPE

Eine intakte Chloridleitfähigkeit ist essentiell zur Aufrechterhaltung der Funktion der Retina (Edwards *et al.*, 2010). So gehen Mutationen im *Clcn2* Gen mit Photorezeptor-Degenerationen einher (Bosl *et al.*, 2001) und *Clcn3*-Knockout-Mäuse zeigen einen kompletten Verlust von Photorezeptoren (Stobrawa *et al.*, 2001). 9 Gene, die für die Mitglieder der Chloridkanalfamilie kodieren, sind bei Säugetieren bekannt (Stobrawa *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2010). Strukturell bestehen diese Chloridkanäle der ClC-Familie aus einem Dimer (Dutzler *et al.*, 2002), d.h. zwei Untereinheiten formen eine funktionelle Einheit. Mehrere funktionell unterschiedliche Chloridkanäle konnten am RPE von verschiedenen Spezies nachgewiesen werden: ClC-2 Chloridkanäle (Hartzell *et al.*, 2003), Ca^{2+} -aktivierte Chloridkanäle (Joseph *et al.*, 1992; Ueda *et al.*, 1994; Strauss *et al.*, 1999; Hartzell *et al.*, 2003), cAMP-aktivierte Chloridkanäle (Hughes *et al.*, 1993; Hartzell *et al.*, 2003). Auf molekularer Ebene wurde die Expression von ClC-2, ClC-3 und ClC-5 in RPE-Zellen nachgewiesen (Wills *et al.*, 2000; Weng *et al.*, 2002). Der Chloridleitfähigkeit am RPE kommen eine Anzahl von Funktionen zu, z.B. epithelialer Ionentransport, Regulierung des zellulären Volumens, und die Ionenhomeostase-Regulierung im subretinalen Raum (Gallemore *et al.*, 1989; Lacour *et al.*, 1992; Botchkina *et al.*, 1993; Ueda *et*

al., 1994). Allerdings zeigten Patch-Clamp Studien, dass Chloridkanäle an ruhenden RPE-Zellen nur selten abgeleitet werden können (Strauss *et al.*, 1998a). Intrazelluläre Faktoren, die potentiell inhibierend auf Chloridkanäle wirken, wurden in diesem Zusammenhang beschrieben (Krick *et al.*, 1991).

1.5. Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Zum Zeitpunkt dieser experimentellen Studie waren funktionelle in vitro-Untersuchungen an RPE-Kulturen von Ratte, Rind, und Mensch bekannt. Im Vergleich dazu gab es zu jenem Zeitpunkt jedoch keine wissenschaftlichen Veröffentlichungen von kultivierten RPE-Zellen der Maus. In Anbetracht der Bedeutung der Maus als eines der transgenen Modifikation zugänglichen Tiermodell kommt der Erstcharakterisierung von Maus -RPE -Zellen eine erhöhte Priorität zu. Die hier vorgestellten Untersuchungen an der Norrie-Maus dienen demzufolge nicht nur zur Beleuchtung etwaiger funktioneller Störungen des RPE bei Norrie-Gendefekt, sondern zur Etablierung der elektrophysiologischen Grundcharakteristik von Maus-RPE im Allgemeinen. Folgende Aspekte werden dazu untersucht:

1. Lassen sich die bei anderen Spezies etablierten Protokolle zur Anlage von RPE-Kulturen auf die Maus übertragen?
2. Welche Ionenkanäle lassen sich von kultivierten Maus-RPE-Zellen ableiten?
3. Lassen sich bei etwaigen Ionenkanälen Regulationsmuster finden, die von anderen Spezies bekannt sind?
4. Lassen sich im Direktvergleich zwischen Wildtyp-Maus und Norrie-Maus mittels Patch-Clamp-Technik mögliche Beteiligungen von Ionenkanälen an der Pathogenese der Norrie'schen Erkrankung nachweisen?

2. Methoden

2.1. Gewebspräparation und Zellkultur

Die Zucht und die Genotypisierung von Mäusen mit Norrie-Gendefekt und Wildtyp-Vergleichsmäusen oblag unserem Kollaborationspartner, der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Berger am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin. Augen von 12 bis 14 Tage alten Mäusen wurden von Herrn Dr. Steffen Lenzner vom Max-Planck-Institut entnommen und eisgekühlt innerhalb von 60 Minuten zur Weiterbearbeitung zur Abteilung für Klinische Physiologie der Freien Universität Berlin übertragen. Zucht und Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Gesetzen für Tierexperimente der Bundesrepublik Deutschland durchgeführt. Die Anlage von RPE-Primärkulturen erfolgte mit Modifikationen nach der von Edwards beschriebenen Methode zur Präparation von RPE-Kulturen der Ratte (Edwards, 1977). Dabei wurden die Augen über Nacht in steriler mit Gentamycin (50 µg/ml) und Kanamycin (100 µg/ml) versetzter Puck'scher Lösung (Puck *et al.*, 1958) inkubiert. Es folgte eine Trypsin-Anverdauung für 20 min bei 37 °C in 0,1 % Trypsin-Lösung ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, welches die Abtrennung des RPE erleichtert. Die Trypsinreaktion wurde durch Übertragung in serumhaltiges (20 %) Ham's-F10-Medium (Ham, 1963) gestoppt, welches ebenfalls Antibiotika Gentamycin (50 µg/ml) und Kanamycin (100 µg/ml) enthielt. Mit Hilfe eines Binokularmikroskopes wurden die Augen mit einem ringförmigen Schnitt entlang der Ora serrata geöffnet und der vordere Teil mitsamt Cornea, Linse und Corpus vitreum sowie die Retina entfernt. Die dann freiliegende RPE-Schicht wurde vorsichtig von der Bruch'schen Membran abgezogen und in oben definiertes Ham's-F10-Medium übertragen und durch wiederholtes Pipettieren in Zellsuspension gebracht. Diese wurde auf runde Deckgläschen (12 mm Durchmesser) verteilt, welche in Petrischalen ausgelegt waren. Diese Kulturen wurden bei 37 °C und in 5%-iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Das Alter der für die elektrophysiologischen Untersuchungen benutzten Kulturen lag zwischen 4 und 12 Kulturtagen.

2.2. Patch-Clamp-Technik

2.2.1. Elektrophysiologische Grundlagen

Die Zellmembran sämtlicher eukaryonter Zellen hat einen charakteristischen Aufbau. In der ca. 6 nm dicken Lipiddoppelschicht weisen die hydrophoben, also unpolaren Ketten der C-14 bis C-

20-Verbindungen aufeinander zu, während die hydrophoben, also polaren Kopfgruppen dem Extrazellulärraum bzw. dem Zellinneren zugewandt sind. Neben den Phospholipiden sind Kohlenhydrate und Proteine elementare Bestandteile biologischer Membranen. Den Proteinen kommt neben Stützfunktion und Rezeptor-vermitteltem Informationsaustausch unter anderem die Aufgabe des Stoffaustausches und Ionenflusses durch die Membran zu (Nicholls *et al.*, 2002). Drei Gruppen von Membranproteinen können unterschieden werden: Kanäle, Carrier und Pumpen.

Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts wurden elektrische Phänomene über der Membran von Muskelzellen gemessen (Numberger *et al.*, 1996). 1902 äußerte Julius Bernstein die Vorstellung, dass eine Ungleichverteilung von Ionen des Intra- und Extrazellulärraumes eine Potentialdifferenz über der Membran bedingt (Nicholls *et al.*, 2002). Das moderne Konzept von Ionenkanälen geht auf die frühen 50er Jahre zurück. Damals gelangten die englischen Physiologen A. Hodgkin und A. Huxley zu der Ansicht, dass die Größe der Flüsse der Na⁺- und K⁺-Ionen zu groß seien – bis zu 10⁶ Ionen pro Sekunde – , um auf Carrier-Moleküle zurückgeführt werden zu können. Ionenkanäle können als wasserhaltige, Membran durchspannende Poren betrachtet werden, wobei – vereinfacht gesagt – eine Region als Selektionsfilter, eine weitere als Tor (gate) fungiert. Sowohl Größe als auch molekulare Struktur der Teilchen dienen als Selektionskriterien. Der potentielle Öffnungszustand eines Kanals findet in der Offenwahrscheinlichkeit seinen Ausdruck. Eine Aktivierung oder Inaktivierung eines Ionenkanals führt zu einer Zu- oder Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit, nicht jedoch zu einem konstanten „Offen“- oder „Geschlossen“-Zustand. Bekannte Mechanismen zur Kanalaktivierung umfassen Spannungsaktivierung, Ligandenaktivierung (extrazellulär), Messengeraktivierung (intrazellulär) sowie Dehnungsaktivierung, z.B. bei osmotisch bedingter Zellschwellung (Nicholls *et al.*, 2002). Um Ionenflüsse durch Membranen zu beschreiben, bedarf es der Einführung grundlegender Begriffe (Ypey, 1998). Die Permeabilität gibt die Leichtigkeit an, mit der ein Ion die Membran durchqueren kann, sie hängt im großen Maße von der Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle eines bestimmten Ions ab. Die Leitfähigkeit G eines Kanals wird durch die Permeabilität und den Konzentrationsgradienten eines Ions bestimmt. Sie ist elektrisch als der Kehrwert des Widerstandes R definiert. In Anlehnung an das Ohm'sche Gesetz lässt sich daraus schließen, dass die Leitfähigkeit und eine Potentialdifferenz U über der Membran den Stromfluss I durch die Membran determinieren.

$$R = U/I$$

$$G = I/U$$

$$I = G \cdot U$$

Der Strom I findet auch Ausdruck in der Anzahl an elektrischer Ladung Q , die pro Zeiteinheit gerichtet fließt. Dabei entspricht die Basiseinheit Coulomb der Ladung von $6,24 \cdot 10^{18}$ Elektronen.

$$I=Q/t$$

Der oben bereits erwähnte Membranaufbau erklärt ein weiteres elektrisches Phänomen. Bei der Betrachtung des Stromflusses über Membranen hält ein Zeitelement Einzug in die physikalische Beschreibung. Schnelle Spannungsänderungen führen erst verzögert zu proportionalen Stromänderungen. Die Lipiddoppelschicht einer Zelle stellt einen elektrischen Kondensator dar. Per definitionem sind bei einem Kondensator zwei leitende Platten durch einen Isolator getrennt. Die polaren Kopfgruppen der Phospholipide bilden beiderseits der Membran eine leitende Schicht, während im Inneren der Membran die unpolaren Lipidschwänze angeordnet sind. Die Kapazität C eines Kondensators ist dadurch definiert, wieviel Ladung Q er pro angelegter Spannung U speichern kann.

$$C=Q/V$$

Je größer die Fläche und je kleiner der Abstand, desto höher ist die Kapazität. In der Elektrophysiologie macht man sich diese Regel zunutze. Da der Abstand der beiden Lipiddoppelschichten bei fast allen biologischen Membranen als nahezu konstant anzusehen ist, lässt sich von der rechnerisch ermittelbaren Membrankapazität auf die Größe der Zelle schließen. Für die Kapazitäts-Flächen-Relation ergibt sich ein praktischer Näherungswert von etwa $1 \text{ pF}/\mu\text{m}^2$. Die Kapazität verursacht jedoch auch Störungen in der Elektrophysiologie, indem sie den Zeitverlauf von elektrischen Signalen verzerrt. Daher müssen sowohl die Membrankapazität der Zelle und die Kapazitäten im elektrischen Messsystem (z.B. Pipettenkapazität) durch geeignete Mechanismen gegenreguliert werden.

Der zeitliche Ablauf von Umladungsprozessen an Membranen wird durch die Membranzeitkonstante τ_M als Produkt von Membranwiderstand und Membrankapazität beschrieben.

$$\tau_M=R_M \cdot C_M$$

Bei der Betrachtung von Ionenkanälen, also von lokalen Leitfähigkeiten, kann man durch die Kapazität den zeitlichen Ablauf von elektrischen Signalen nicht mehr schlüssig erklären. Jeder Kanal hat ein charakteristisches Verhalten beim Öffnen bzw. Schließen und damit beim Bestimmen des Stromflusses. Diese Eigenschaft findet in der Aktivierungs- bzw.

Inaktivierungszeitkonstante Ausdruck. Der Stromfluss durch einen Kanal und damit der Spannungsverlauf über der Membran erhält somit einen exponentiellen Verlauf.

$$U=U_0(1-e^{-t/\tau})$$

Wie bereits oben erwähnt, bedingen unterschiedliche Ionenverteilungen über der Membran Potentialdifferenzen zwischen Intra- und Extrazellulärraum.

2.2.2. Prinzip der Patch-Clamp-Technik

Die Darstellung des Stromflusses durch die Zellmembran mittels der Patch-Clamp-Technik beruht auf dem Prinzip der Spannungsklemme oder „Voltage-Clamp“. Als während der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts die Pioniere der Elektrophysiologie die Prozesse an Membranen erregbarer Zellen analysierten, standen sie u.a. einem zentralen Problem gegenüber, nämlich dass sich bei den meisten bioelektrischen Ereignissen sowohl die Membranspannung als auch der Stromfluss durch die Membran zur selben Zeit änderten. Die Lösung dieses Problems gelang Ende der dreißiger Jahre K.S. Cole und H.J. Curtis mit der Entwicklung der Spannungsklemme (voltage clamp). Die späteren Nobelpreisträger A. Hodgkin und A. Huxley nutzten diese Technik für ihre bahnbrechenden Beschreibungen der Grundlage des Aktionspotentials. Das Grundprinzip der Spannungsklemme besteht darin, mittels elektronischer Rückkopplungsmechanismen die Spannung über der Membran konstant zu halten und den dazu notwendigen Kompensationsstrom zu messen (Aidley, 1998). Dieser Kompensationsstrom ist ein Maß für den bei diesem Potential tatsächlich durch die Membran geflossene Strom. Abb. 2.1. gibt ein vereinfachtes Schaltbild der Spannungsklemme wieder. Es ist anzumerken, dass bei früheren Experimentieranordnungen noch zwei intrazelluläre Elektroden, eine für die Spannungsmessung und eine für den Kompensationsstrom, zum Einsatz kamen. Die Spannungsklemme erlaubte die Aufzeichnung von größeren Strömen und Potentialveränderungen, wie sie beispielsweise bei Aktionspotentialen an erregbaren Zellen auftreten. Die genauen Mechanismen, die den Ionenverschiebungen zugrunde lagen, blieben jedoch ungeklärt und die „Ionenkanaltheorie“ war lange Zeit eine, wenn auch höchst plausible, Hypothese.

Das Grundproblem der Spannungsklemme bei der Messung von Ionenströmen stellt das sogenannte elektrische Hintergrundrauschen dar, welches etwa hundertmal größer ist als der Strom durch einen einzelnen Ionenkanal und vor allem durch die Zellmembran mit ihrer

Globalaktivität der Kanäle und Transporter, die Pipette und die elektronischen Messgeräte hervorgerufen wird.

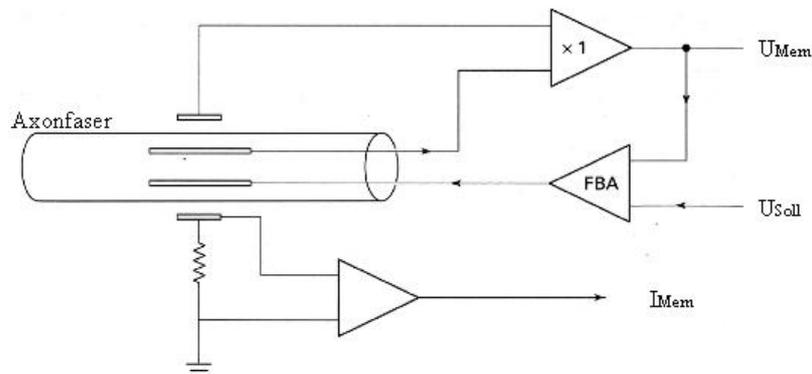


Abb. 2.1. Grundprinzip der Spannungsklemme am Beispiel einer Axonfaser (Aidley, 1998)

Die Membranspannung U_{Mem} wird über einen Messverstärker ($\times 1$) gemessen, zum „feedback amplifier“ (FBA) geleitet und dort mit der Sollspannung U_{Soll} verglichen. Am Ausgang fließt dann bei jeder Differenz zwischen U_{Soll} und U_{Mem} ein Kompensationsstrom zurück in die Zelle, der als Membranstrom I_{Mem} gemessen werden kann.

Die späteren Nobelpreisträger Bert Sakmann und Erwin Neher lösten dieses Problem mit der Entwicklung der Patch-Clamp-Technik, einer Abwandlung der Spannungsklemme (Neher *et al.*, 1976). Dabei wird ein kleiner Membranfleck (engl. *patch*) durch Aufsetzen einer dünnen Glaspipettenspitze elektrisch von seiner Umgebung isoliert (siehe Abb. 2.2.).

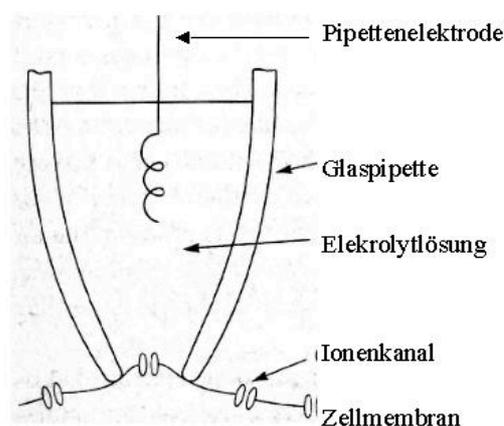


Abb. 2.2. Pipette und Zellmembran bei der Patch-Clamp-Technik (Aidley, 1998).

Die Öffnung der Pipettenspitze misst nur wenige μm im Durchmesser. Vorsichtiges Aufsetzen auf die Zellmembran führt zu Abdichtwiderständen zwischen Pipetten- und Badlösung von 10-50 $\text{M}\Omega$. Sakmann und Neher entdeckten, dass sich durch enzymatisches Reinigen der Zellmembran und vor allem durch Anlegen eines leichten Unterdruckes an die Pipettenspitze der Abdichtwiderstand (engl. *seal*) stark erhöhte. Widerstände von bis zu hundert $\text{G}\Omega$ (Gigaseal) waren möglich und damit erstmals Aufzeichnungen von Einzelkanalströmen von wenigen pA (Picoampere, 10^{-12}A).

Wie bereits im vorangestellten Grundlagenkapitel erklärt, stehen Spannung, Stromstärke und Widerstand bzw. die Leitfähigkeit über das Ohm'sche Gesetz in Beziehung. Bei konstanter Spannung ist jede messbare Veränderung im Stromfluss durch eine Leitfähigkeitsänderung über der Membran bedingt, welche wiederum ein direktes Maß für die Ionenkanalaktivität darstellt. Ionenflüsse würden aber die Spannung über der Membran beeinflussen und demzufolge auch das Membranpotential, welches aber eigentlich konstant (=“geklemmt“) gehalten werden soll. Um dem entgegenzuwirken, muss jede Abweichung der *Ist*-spannung von der vorgegebenen *Soll*-spannung automatisch mit einem entgegengesetzten Kompensationsstrom beantwortet werden. Die Lösung dieses Problems übernimmt ein Strom-Spannungs-Wandler-Schaltkreis, der im Vorverstärker nahe der Patchpipette untergebracht ist. Er ermöglicht mit nur einer Elektrode das Klemmen der Sollspannung und das gleichzeitige Messen und Applizieren eines Kompensationsstromes. Dieser entspricht genau jenem Strom, der zu einem bestimmten Zeitpunkt bei einer vorgegebenen Spannung durch die geöffneten Ionenkanäle in der Membran fließt, diesem aber entgegengesetzt ist. Abb. 2.3. gibt ein vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers wieder.

Zentrales Bauteil ist der Operationsverstärker OPA (engl. *operational amplifier*), an dessen zwei Eingängen zum einen das Pipettenpotential U_{Pip} und zum anderen die Sollspannung U_{Soll} anliegen. U_{Pip} entspricht der *Ist*-Spannung an der Zellmembran und wird durch die Pipettenelektrode zum OPA geleitet. U_{Soll} wird vom Experimentator vorgegeben und von der Steuereinheit an den OPA angelegt. Jede Abweichung von U_{Pip} (Punkt 1 in Abb. 2.3.) von U_{Soll} führt am Ausgang vom OPA (Punkt 2) zu einer Spannung, die proportional zu dieser Differenz, aber extrem verstärkt ist. Potentialdifferenzen zwischen Punkt 1 und 2 lassen nun durch den in Serie mit dem OPA geschalteten Rückkopplungswiderstand R_{F} (engl. *feedback*) einen Strom fließen. Da der Operationsverstärker definitionsgemäß einen theoretisch unendlich hohen Eingangswiderstand hat, kann jeder Stromfluss über R_{F} nur über die Pipettenelektrode abgeleitet werden. Je größer die Abweichung von U_{Pip} zu U_{Soll} , desto größer ist der Kompensationsstrom durch R_{F} in die Pipette. Kommt es zur Angleichung beider Spannungen, sistiert der

Rückkopplungsstrom. Die den Kompensationsstrom bedingende Potentialdifferenz über den OPA wird an die Steuereinheit weitergeleitet und mit Kenntnis eines von R_F abhängigen Kalibrierungsfaktors in einen Wert für Strom umgerechnet. Damit sind die Anforderungen an einen Voltage- bzw. Patch-Clamp-Verstärker erfüllt: Angleichung der Membranspannung an U_{Soll} und Messung des dafür notwendigen Kompensationsstromes als Maß für die Kanalaktivität (Numberger *et al.*, 1996; Aidley, 1998).

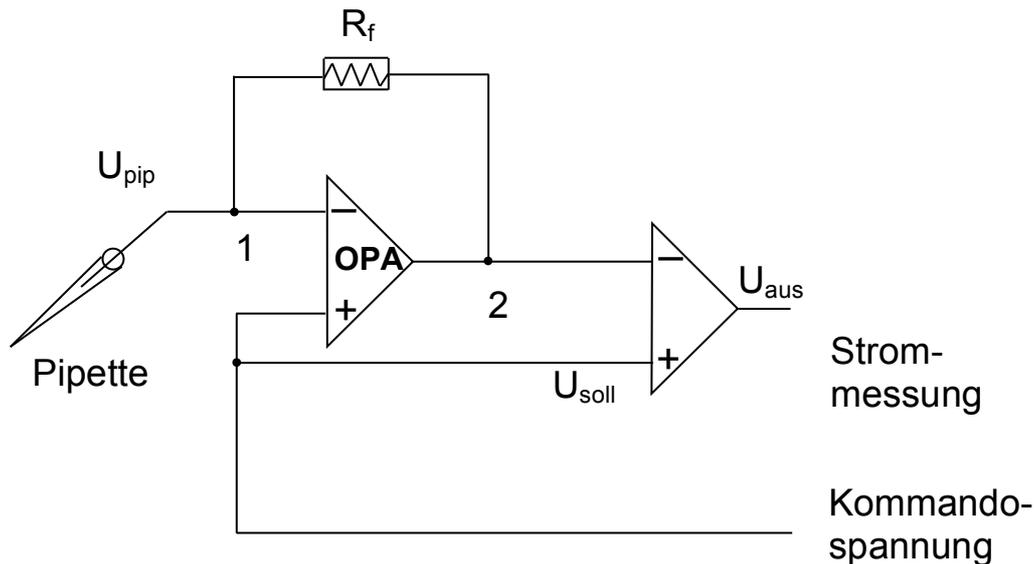


Abb. 2.3. Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers mit der Strom-Spannungswandler-Schaltung (Numberger *et al.*, 1996).

OPA – Operationsverstärker; R_f – Rückkopplungswiderstand; U_{soll} – Kommando- oder Soll-spannung; U_{pip} – Pipettenpotential; U_{aus} – Ausgangsspannung proportional zum Strom

Wie bereits im Grundlagenkapitel 2.2.1. erwähnt, unterliegen Spannungssprünge an der Pipette und Zellmembran dem Faktor Zeit, was durch die Kapazität ausdrückt wird. Um diese „Zeitartefakte“ so klein wie möglich zu halten, werden durch weitere Rückkopplungsschaltkreise im Patch-Clamp-Verstärker die Pipetten- und Membrankapazität kompensiert. Weitere die Qualität der Messungen einschränkende Artefaktquellen, die einer Gegenregulierung bedürfen, sind das sog. Offsetpotential und bei Ganzzelleableitungen der Serienwiderstand R_S , der unkompensiert zu einem Spannungsverlust zwischen Pipettenspitze und Zellinnerem führen kann. Auch hierfür halten Patch-Clamp-Verstärker Kompensationsschaltungen bereit. Auf deren Anwendung wird in Kapitel 2.2.4. näher eingegangen.

Die Patch-Clamp-Technik bietet je nach Fragestellung des Experiments verschiedene Messkonfigurationen (Numberger *et al.*, 1996)(Abb. 2.4.). Der erste Modus, die „cell-attached“-

Konfiguration, ist gleichsam Ausgangspunkt für alle Patch-Clamp-Experimente und auch die einzige Kondition, bei der das Zellinnere völlig intakt verbleibt. Sie erlaubt Einzelkanalanalysen, kann jedoch nicht zur Beurteilung der gesamten Zellmembran herangezogen werden. Dies wird durch den „whole-cell“-Modus möglich. Durch einen kurzen Unterdruckpuls öffnet sich der Membranfleck unter der Pipettenspitze und die Pipettenelektrode steht über die Pipettenflüssigkeit mit dem Zellinneren in direkter Verbindung. Durch geeignete Wahl der Pipettenflüssigkeit

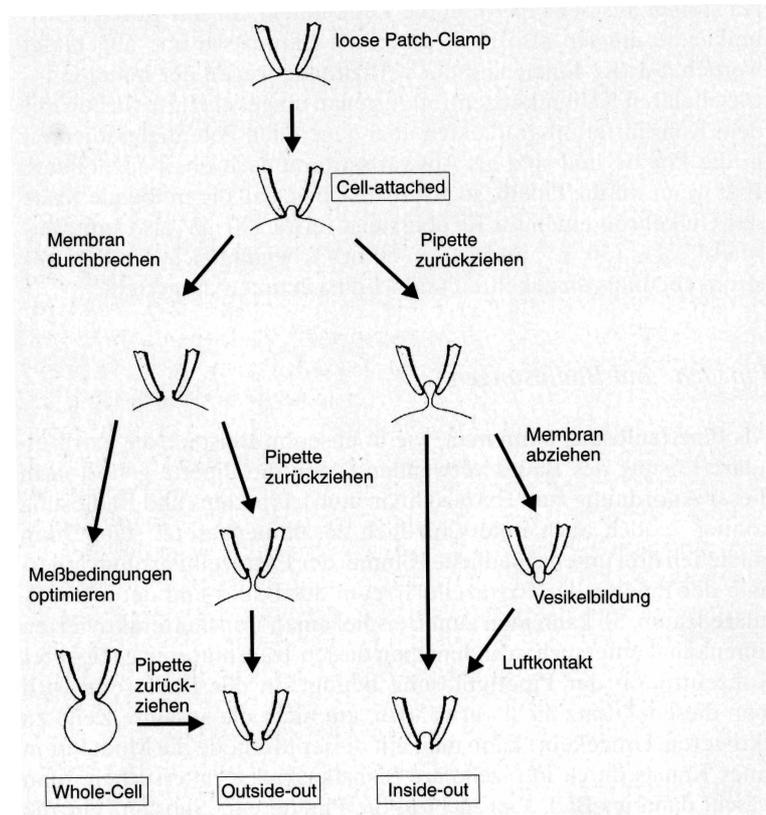


Abb. 2.4. Die vier wichtigsten Messkonfigurationen und ihre prinzipielle Herstellung. (Numberger *et al.*, 1996)

kann man das intrazelluläre Milieu bestimmen, muss jedoch bedenken, dass das Zytoplasma innerhalb kurzer Zeit wichtige Substanzen, wie z.B. ATP und kleine Proteine, verliert, was Einfluss auf manche Kanäle haben kann. Diese verringern unabhängig von ihrer Aktivierung ihre Ströme, ein Vorgang, der als „run-down“ bezeichnet wird. Eine Abwandlung der „Whole-Cell“-Konfiguration, der „Perforated-Patch“, ermöglicht nahezu Ganzzellbedingungen bei „nahezu intakter“ Zellmembran und damit die Untersuchung „run-down“-anfälliger Kanäle. Verschiedene Antibiotika haben die Eigenschaft, biologische Membranen durch winzige Poren zu permeabilisieren. Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Ströme wurden entweder im „Whole-Cell“-modus (Kaliumströme) oder im „Perforated-Patch“ (Kalziumströme) abgeleitet. Bei letzterer Konfiguration wurde als Porenbildner das polyene Antibiotikum Nystatin der

Pipettenlösung zugegeben (Rosenthal, 2000). Die 40-80 nm offenen Poren lassen lediglich die Passage einwertiger Kationen (K^+ , Na^+) und in geringem Maße einwertiger Anionen (Cl^-), nicht jedoch höherwertiger Ionen oder größerer Moleküle zu.

Zur genauen Analyse von Einzelkanalströmen, insbesondere deren pharmakologischen Regulation, stehen noch die „inside-out“- und „outside-out“-Konfiguration zur Verfügung, die jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung kamen.

2.2.3. Messplatzaufbau

Dem eigentlichen Experiment war die Herstellung der Messpipetten unmittelbar vorangestellt. Für Messungen von Kaliumströmen kamen Weichglaspipetten zum Einsatz (Hämatokritröhrchen; Hirschmann Laborgeräte; mittlere Wandstärke 0,25 mm, Innendurchmesser 1,1 mm). Kalziumströme wurden mit Pipetten aus Borsilikat-Glas (Clark Electromedical Instruments, Reading, GB) abgeleitet. Gezogen wurden die Pipetten mit einem horizontalen DMZ Universal Microelectrode Puller (Zeitz Instrumente, Augsburg, D). Vergütet wurden die Pipettenspitzen durch eine anschließende Hitzepolierung an einer Microforge mit coating/polishing Einheit (Luigs und Neumann, Ratingen, D). Unmittelbar vor Eintauchen in die Badlösung wurde die Elektrodenspitze mit Dichlordimethylsilan hydrophob beschichtet.

Der Messplatz für die Patch-Clamp-Untersuchung kann prinzipiell in zwei Sektoren unterteilt werden, zum einen die interne Messeinheit und zum anderen der externe Bediensektor. Erstere Gruppe befindet sich isoliert von störenden elektromagnetischen Einflüssen der Umgebung in einem Faraday-Käfig (Eigenbau AG Strauß) sowie befestigt auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Stabilisatoren von Physik Instrumente, Darmstadt, D). Im Zentrum der Messeinheit steht die Flusskammer (AG Kettenmann), die als Mikroskoptisch in ein inverses Mikroskop (Olympus CK 2) eingebaut ist. Inverse Mikroskope befinden sich definitionsgemäß unter dem Objektträger und bieten den Vorteil der größeren Bewegungsfreiheit oberhalb der Flusskammer (u.a. ist ein steilerer Winkel der Messelektrode möglich). Eine angeschlossene CCD-Videokamera (Sony) überträgt das Bild auf einen Monitor der externen Bedieneinheit. Die Badlösung gelangt aus einem externen Vorratsgefäß mittels Rollerpumpe in die Flusskammer, welche die mit Zellkultur besetzten Deckgläschen aufnimmt. Durch Austauschen der Badlösung wurde eine Veränderung des extrazellulären Milieus erreicht, etwa zur Applikation von gelösten pharmakologisch wirksamen Substanzen. Ebenfalls auf dem schwingungsgedämpften Tisch ist ein Mikromanipulator (Sonnhof, Oppenheim, D) auf einer

Führungsschiene arretiert. Er trägt den empfindlichen Vorverstärker des Patch-Clamp-Verstärkers (EPC-7, HEKA, Lamprecht, D) und dient dem sanften Heranführen der Pipette an die Zelle. Der Vorverstärker nimmt den Silberchloriddraht der Pipettenelektrode auf und ist gleichzeitig mit der ebenfalls chlorierten Referenzelektrode verbunden. Letztere taucht mit einer stehenden Flüssigkeitssäule in die Flusskammer ein.

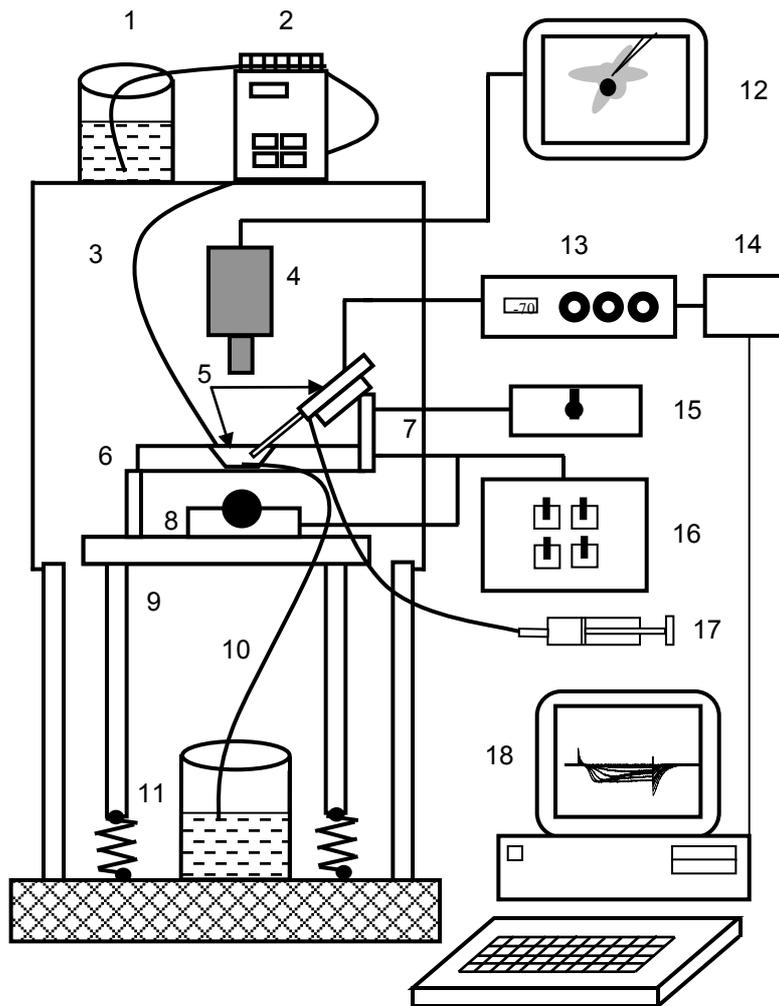


Abb. 2.5. Schematischer Versuchsaufbau (Rosenthal, 2000)
 (1) Gefäß mit extrazellulärer Badlösung, (2) Rollerpumpe, (3) Schlauch zur Flusskammer, (4) CCD Kamera, (5) Referenzelektrode im Bad, (6) Mikroskopisch mit Flusskammer, (7) Mikromanipulator mit Vorverstärker und Patch-Pipette, (8) Mikroskop, (9) schwingungsgedämpfter Tisch, (10) Ablaufschlauch, (11) Ablaufgefäß, (12) Monitor zur Beobachtung der Zellen, (13) Patch-Clamp-Verstärker EPC-7, (14) AD/DA-Wandler, (15) Mikromanipulator Steuereinheit zur Bewegung der Patch-Pipette, (16) Steuereinheit zur Bewegung des Kreuztisches und des Objektivs, (17) Kolben zur Erzeugung von Unter- oder Überdruck in der Patch-Pipette, (18) Computer zur Datenerfassung.

Zur außerhalb des Faraday-Käfigs angeordneten Bedien- und Steuereinheit gehören die Fernbedienung für den Mikroskoptisch zur Positionierung und Fokussierung der Zelle, die Steuerung für den Mikromanipulator, ein Videomonitor, ein Transformator für die Mikroskopbeleuchtung, der Messverstärker (EPC-7, HEKA, Lamprecht, D), der Analog-Digital-Wandler (Batelle, Frankfurt/M.,D) und ein Computer samt Monitor (siehe Abb. 2.5.). Das System wurde entstört, indem alle Komponenten sternförmig über die Messerde des Verstärkers geerdet wurden.

2.2.4. Versuchsdurchführung

Unmittelbar vor dem Experiment wurde ein zelltragendes Deckglas aus den Kulturschälchen in die Flusskammer des Messtandes übertragen. Die Zellen wurden alle 1 bis 2 Stunden ausgetauscht. Es wurden nur einzelstehende Zellen ohne sichtbare Verbindungen zu benachbarten Zellen sowie mit möglichst rundflächiger Erscheinung gepatcht. Zum Füllen der Pipetten wurden diese zuerst mit der Spitze für etwa 1 Sekunde in ein Gefäß mit Pipettenlösung getaucht und anschließend von hinten mittels einer Spritze befüllt (sog. „backfilling“). Dieses Verfahren minimiert die Luftblasenbildung an der Pipettenspitze und außerdem verhindert es beim Perforated Patch ein Ausströmen der Nystatin-haltigen Lösung in das extrazelluläre Milieu. Letzteres würde die Sealbildung erheblich erschweren, die Kontrolle eines „Giga-Ohm-Seals“ überdecken und im schlimmsten Fall bei generalisierter Porenbildung zum Zelltod führen (Verheijck, 1998). Die Pipette wurde am Pipettenhalter des Vorverstärkers arretiert und mittels eines Schlauchsystems einem leichten Überdruck ausgesetzt, der die Verschmutzung der Pipettenspitze beim Eintauchen in die Flusskammer vermindern sollte. Zum videokontrollierten Heranführen der Patchpipette an die Zelle wurde ein ferngesteuerter Mikromanipulator genutzt. Mit Eintauchen der Pipette in die Badlösung schloss sich der Stromkreis zwischen Mess- und Referenzelektrode. Wurde nun kurz in den Current-Clamp-Modus des EPC-7-Verstärkers geschaltet, konnten Abweichungen des Pipettenpotentials gemessen und kompensiert werden. Diese Spannungsveränderung bei auf „0“ geklemmten Steuerstrom des Verstärkers setzt sich aus dem Offsetpotential der Silber-/Silberchloridelektrode und dem Übergangspotential (sog. „liquid junction potential“) an Grenzflächen zweier unterschiedlich zusammengesetzter Lösungen zusammen und wird durch ein gleich großes, aber entgegengesetztes Potential kompensiert. Im Voltage-Clamp-Modus wurde vom Verstärker aus ein repetitiver Spannungspuls von 10 mV und 30 ms Dauer auf die Messelektrode gegeben. Der gemessene Strom ließ unmittelbar auf den Pipettenwiderstand R_{PIP} schließen. Der Pipettenwiderstand und der Eingangswiderstand des

Verstärkers R_{AMP} sind vereinfacht gesehen in Serie geschaltet. Da letzterer aber vernachlässigbar klein im Vergleich zum Pipettenwiderstand ist, lässt sich mittels des Ohm'schen Gesetzes aus Spannungspuls und gemessenem Strom der Widerstand berechnen. Er lag bei Weichglaspipetten bei 4-6 $M\Omega$ und bei Borsilikatglaspipetten bei 3-5 $M\Omega$. Vorsichtig wurde die Pipettenspitze unter visueller Kontrolle der Zelloberfläche angenähert, wobei der Überdruck an der Pipette durch das externe Schlauchsystem gelöst wurde. Das vorsichtige Berühren der Zelle erzeugte eine geringe Abnahme des durch den fortlaufenden 10 mV Spannungspuls hervorgerufenen Stroms. Bei Verwendung von Nystatin-haltiger Pipettenlösung wurde in diesem Moment die Beleuchtung des Mikroskoptisches ausgeschaltet, um die Wirksamkeit des lichtempfindlichen Porenbildners nicht zu vermindern. Behutsames Anlegen eines Unterdruckes an der Pipette sowie die Einstellung der Klemmspannung auf -45 mV, entsprechend der geschätzten Ruhemembranspannung einer RPE-Zelle, führte zu einer starken Abnahme des durch die Pipette fließenden Stromes, bedingt durch den sog. Seal-Widerstand R_{SEAL} . In Analogie zu R_{PIP} lässt sich auch R_{SEAL} laut Ohm'schen Gesetz aus dem 10 mV- Testpuls und der gemessenen Stromstärke berechnen. Verringerte sich dabei die Stromstärke bis auf wenige pA, so betrug R_{SEAL} mehrere $G\Omega$, ein „Giga-Ohm-Seal“ und damit die „Cell-attached“-Konfiguration war etabliert. Sowohl am Beginn als auch am Ende des 10 mV- Testpulses waren spitze kapazitive Artefakte zu beobachten, die durch die Pipettenkapazität C_{PIP} erklärt und mit Hilfe des „C-FAST“-Modus des EPC-7-Verstärkers kompensiert wurden. Bei konventionellen Experimenten wurde durch behutsames Saugen am Schlauchsystem der Unterdruck an der Patchpipette so weit verstärkt, bis der Membranfleck unter der Pipettenspitze aufgerissen wurde. Die Messelektrode stand nun über die Pipettenflüssigkeit mit dem Zellinneren in Verbindung, die „Whole-cell“-Konfiguration war erreicht. Beim Nystatin-Patch entfiel das Saugen. Etwa 30 s bis 1 min nach Erreichen des „Giga-Ohm-Seals“ begann der Porenbildner zu wirken und nach etwa 2-5 min war die elektrische Verbindung zwischen Messelektrode und Zellinnerem stabil, die „Perforated-Patch“-Konfiguration als Sonderform der Ganzzelleableitung war etabliert. Beide Vorgänge wurden jeweils durch die Zunahme der Membrankapazität, sichtbar am exponentiellen Abfall der zunehmenden Stromamplitude, kontrolliert. Bei Messungen von Kaliumkanälen wurde unmittelbar nach Erreichen des „Whole-cells“- kurz in den „Current-clamp“-Modus des Verstärkers geschaltet und das Membranpotential der Zelle abgelesen. Die Membrankapazität C_M wurde bei beiden Versuchsanordnungen mit Hilfe der „G-SERIES“ und „C-SLOW“-Schaltung am Verstärker ebenso kompensiert wie der Serienwiderstand R_S durch die „ R_S -COMP“-Funktion. Letztere wurde auf einen Wert von etwa 50 % eingestellt. Nach diesen Kompensations- und Korrekturschritten von Potential- und Kapazitätsartefakten konnte mit den

Stimulationsprotokollen begonnen werden. Sämtliche Messungen fanden bei Raumtemperatur statt.

2.2.5. Aufnahme und Auswertung der Daten

Zur Steuerung des Patch-Clamp-Prozesses, zur elektrischen Stimulation der Zellmembrane sowie zur Auswertung der Messdaten wurde die Software TIDA for Windows (HEKA; Lamprecht, D) benutzt. Die zur Anwendung gekommenen Stimulationsprotokolle (r50 Protokoll) sind den jeweiligen Stromkurvenabbildungen im Ergebnisteil vorangestellt. Vor der Digitalisierung des eingehenden – zu messenden – Stromsignales wurde dieses durch einen integrierten 3 kHz Low-Pass-Filter gereinigt. Die Frequenz der anschließenden Digitalisierung lag hingegen höher bei 10 kHz. Zur Analyse der aufgenommenen Stromantworten wurde die sogenannte „Connect Routine“ angewandt. Da Leckströme die zu messenden Stromantworten auf die vom Stimulationsprotokoll ausgesendeten Spannungspulse verzerren, müssen diese „passiven“ Komponenten, die durch eine lineare Strom/Spannungsbeziehung charakterisiert sind, in der Analyse neutralisiert werden. Dazu werden vom Haltepotential ausgehend kurze Spannungspulse von jeweils 10 mV zunehmend in 9 Stufen jeweils in depolarisierender und hyperpolarisierender Richtung appliziert und die Beträge der resultierenden Stromantworten subtrahiert. Da die passiven Leckströme der Polarität des Spannungspulses folgen, gleichen sie sich dahingehend aus, dass netto nur spannungsabhängige Membranströme dargestellt werden und diese analysiert werden können. Mit diesem Protokoll lässt sich dann die Strom/Spannung-Kennlinie eines bestimmten Membrankanaltypen generieren. Aus der resultierenden Kurve lässt sich die Spannung ablesen, bei der die jeweils gemessenen Kanäle aktivieren. Der Mittelwert dieser Potentiale wird als Aktivierungsschwelle bezeichnet. Werden die maximalen Ströme zur Membrankapazität in Beziehung gesetzt, lässt sich die Stromdichte bestimmen. Die Stromdichte dient dazu, die Varianz der Zellgröße auszugleichen. Eine weitere Komponente für die Charakterisierung von Kanälen ist die Beschreibung von Aktivierungs- bzw. Inaktivierungskinetiken. Die Bestimmung der Aktivierungs- und Inaktivierungszeitkonstante τ erfolgte gemäß dem Hodgkin-Huxley n^2 Modell (Hodgkin *et al.*, 1990):

$$I = I_{\max} (1 - e^{-t/\tau_{\text{act}}})^2$$

Zur Beschreibung der Kinetik des L-Typ-Kalziumkanals werden zusätzlich die folgenden Parameter bestimmt:

- time-to-peak: Zeit zwischen Stimulation und Erreichen des Stromamplitudenmaximums
- $V_{1/2}$: die Spannung, bei der die Hälfte des maximalen Stromes gemessen wird.

2.2.4. Statistische Analyse

Experimente wurden statistisch analysiert, wenn Daten von mindestens 3 Einzelexperimenten pro Versuchsgruppe gesammelt wurden. Die Darstellung in den Säulendiagrammen erfolgt als Mittelwert mit Standardfehler (\pm SEM – Standard Error of the Mean). Zur Bestimmung der Signifikanzen bei Vergleichen zwischen zwei unabhängigen Gruppen wurde der ungepaarte Student's t-Test angewandt. Bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen wurden Signifikanzen mit Hilfe des ANOVA-Testes bestimmt. Die Schwelle für die Zufallswahrscheinlichkeit eines signifikanten Unterschiedes der Stichproben wurde auf 5 % gesetzt ($p < 0,05$).

2.2.5. Lösungen

Zur Präparation der Augen:

Puck'sche Lösung F (Puck *et al.*, 1958)

8,0	pH	
130	mM	NaCl
0,1	mM	Na ₂ HPO ₄
14,3	mM	NaHCO ₃
0,6	mM	MgSO ₄
0,1	mM	CaCl ₂
3,8	mM	KCl
0,6	mM	KHPO ₄
5,6	mM	Glucose

Zur Messung von K⁺-Kanälen

Extrazelluläre Lösung (Badlösung)

7,2	pH	
130	mM	NaCl
3	mM	KCl
0,3	mM	CaCl ₂
0,6	mM	MgCl ₂
1	mM	Na ₂ HPO ₄
14	mM	NaHCO ₃
33	mM	HEPES
5,5	mM	Glukose

Intrazelluläre Lösung (Pipettenlösung)

7,2	pH	
10	mM	NaCl
100	mM	KCl
0,5	mM	CaCl ₂
2	mM	MgSO ₄
10	mM	HEPES

Zur Messung von Ca²⁺ und Cl⁻ Kanälen

Extrazelluläre Lösung (Badlösung)

7,2	pH	
130	mM	NaCl
3	mM	TEACl
0,2	mM	CaCl ₂
10	mM	BaCl ₂
0,6	mM	MgCl ₂
1	mM	Na ₂ HPO ₄
14	mM	NaHCO ₃
33	mM	HEPES
5,5	mM	Glukose

Intrazelluläre Lösung (Pipettenlösung)

7,2	pH	
10	mM	NaCl
100	mM	CsCl
0,5	mM	CaCl ₂
2	mM	MgSO ₄
5,5	mM	EGTA
10	mM	HEPES

Zur Messung von Ca²⁺ und Cl⁻ Kanälen wurde für die Whole-Cell-Konfiguration die „Perforated-Patch“-Technik angewandt. Dabei wurde als Porenbildner Nystatin benutzt mit einer Endkonzentration von 150 µg/ml in der Pipettenlösung.

2.3. Immunzytochemie

2.3.1. Praktische Durchführung

Der immunzytochemische Nachweis zytoskeletaler (β-Tubulin Isotyp III) und membranständiger (α_{1D}-Untereinheit des L-Typ Ca²⁺-Kanals und Kv1.3-Untereinheit des Delayed Rectifier-K⁺-Kanals) Strukturen erfolgte an 15-20 Tage alten semikonfluenten Primärkulturen von murinen RPE-Zellen. Wenn nicht anders erwähnt, fanden sämtliche Arbeitsschritte bei Raumtemperatur statt. Zelltragende Deckgläschen (Ø 13 mm) wurden den Kulturschalen entnommen und zweimalig mittels Eintauchen in eine Ca²⁺/Mg²⁺-haltige PBS Spüllösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten bei -20 °C in Methanol fixiert. Nach einem zweimaligen Waschen mit der Spüllösung folgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,5 % Triton X-100 in PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ für 5 Minuten. Anschließend wurden die Deckgläschen erneut gewaschen und zur Minimierung unspezifischer Antikörperbindungen für 10 Minuten in eine Blockierlösung (0,5 % Goat-Serum in PBS + Ca²⁺/Mg²⁺) übertragen.

Zum Nachweis der Antigene wurden die Zellen für eine Stunde mit dem jeweiligen ersten Antikörper mit einer Verdünnung von 1:50 inkubiert. Etwa 50-60 µl AK-Lösung wurden auf eine glatte Oberfläche (Parafilm) getropft und benetzten die mit der Zellseite nach unten zeigenden Deckgläschen. Es folgte nach zweimaligem Waschen mit Blockierlösung die Inkubation mit dem jeweiligen 2. (fluoreszenzmarkierten) AK für 30 min in Dunkelheit. Die

Verdünnung betrug 1:500. Vier Waschschritte schlossen sich an: 2 x mit Blockierlösung, 1 x mit Aqua dest. und 1 x mit Ethanol 100 %. Abschließend wurden die fluoreszenzmarkierten Zellkulturen durch etwa 30-40 μ l Eindeckelmedium (Dako, Hamburg, D) konserviert und auf Objektträger fixiert. Nach 30-minütigem Aushärten im Dunkeln konnten die Zellen im Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

2.3.2. Antikörper

In Mäusen generierte monoklonale Anti- β -Tubulin class III Primärantikörper zur Bestätigung der Entität des RPE wurden von Sigma-Aldrich bezogen (Sigma, München, D, Kat.# T8660). Delayed-Rectifier K^+ -Kanäle wurden mittels polyklonaler Anti-Kv1.3-Antikörper vom Kaninchen (Alomone labs, München, D, Kat.# APC-002) nachgewiesen. Der Nachweis von α_{1D} Untereinheiten des L-Typ-Kalziumkanals erfolgte ebenfalls durch Kaninchen-generierte polyklonale Antikörper (Alomone labs, Kat.# APC-005).

2.3.3. Auswertung der Daten

Zur Betrachtung der fluoreszenzmarkierten Zellkulturen kam ein Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 60, Hamburg, D) zum Einsatz, welches über eine Kamera (Fuji ColorView) mit einem Computer verbunden war. Zur digitalen Aufnahme der Bilder diente das Programm "analySIS" (Soft-Imaging-Systems GmbH, Münster, D). Farb- und Helligkeitskontrast wurde mittels Adobe Photoshop optimiert.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung kultivierter Maus RPE Zellen

Das Anlegen von RPE-Primärkulturen der Maus folgte dem Protokoll zum Kultivieren von Ratten RPE-Zellen (Edwards, 1977). Allerdings gelang eine erfolgreiche Kultivierung nur bei etwa der Hälfte der Ansätze, unabhängig davon, ob die Gewebe von Norrie- oder Kontrollmäusen stammten. Erfolgreich angelegte Maus-RPE-Zellkulturen stimmten in ihrer typischen Kopfsteinpflaster-ähnlichen Morphologie mit den bereits umfangreich beschriebenen RPE-Kulturen von Ratte, Rind, und Mensch überein. Die Möglichkeit einer Kontamination durch Fibroblasten oder Endothelzellen wurde mit Immunzytochemie getestet. Dabei kam ein Antikörper mit hoher Spezifität für RPE-Zellen zum Einsatz, welcher gegen ein Protein des Zytoskeletts, das class III β -Tubulin, reagiert (Vinores *et al.*, 1995). Abbildung 3.1. zeigt eine exemplarische Zellfärbung von kultivierten Maus-RPE-Zellen. Das im Fluoreszenzsignal zu sehende Aussparen des Nukleus ist mit dem Nachweis eines zytosolischen Proteins vereinbar.

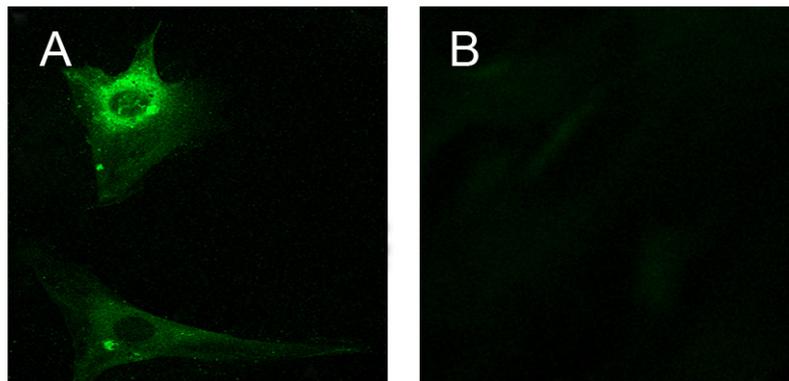


Abb. 3.1. Immunocytochemische Färbung zum Nachweis der RPE Entität.

- A. Repräsentatives Fluoreszenz-Mikroskopie-Foto nach Färbung mittels class III β -Tubulin-Antikörper.
- B. Negativkontrolle durch Auslassen des Primärantikörpers.

3.2. Kaliumströme am RPE

Zur Untersuchung der Ganzzell-Kaliumleitfähigkeiten an RPE-Kulturen von Kontroll- und Norrie-Mäusen wurden K^+ -haltige Bad- und Pipettenlösung verwendet, womit ein nahezu

physiologisches Ionenmilieu an der Zelle gewährleistet war. Es wurde ein einheitliches Stimulationsprotokoll angewandt, bei dem von einem Haltepotential von -45 mV ausgehend die Zellmembran mit 9 depolarisierenden und 9 hyperpolarisierenden Spannungssprüngen stimuliert wurde, wobei deren Amplitude um jeweils 10 mV zunahm. Die Stromantwort der Zelle auf diese 50 ms dauernden Spannungsimpulse wurde aufgezeichnet und bei korrekten Messbedingungen einer Nettostromkorrektur mittels der connect routine unterzogen. Abbildung 3.2. zeigt exemplarisch die direkte Stromantwort und die nach der connect routine ermittelten Nettostrome.

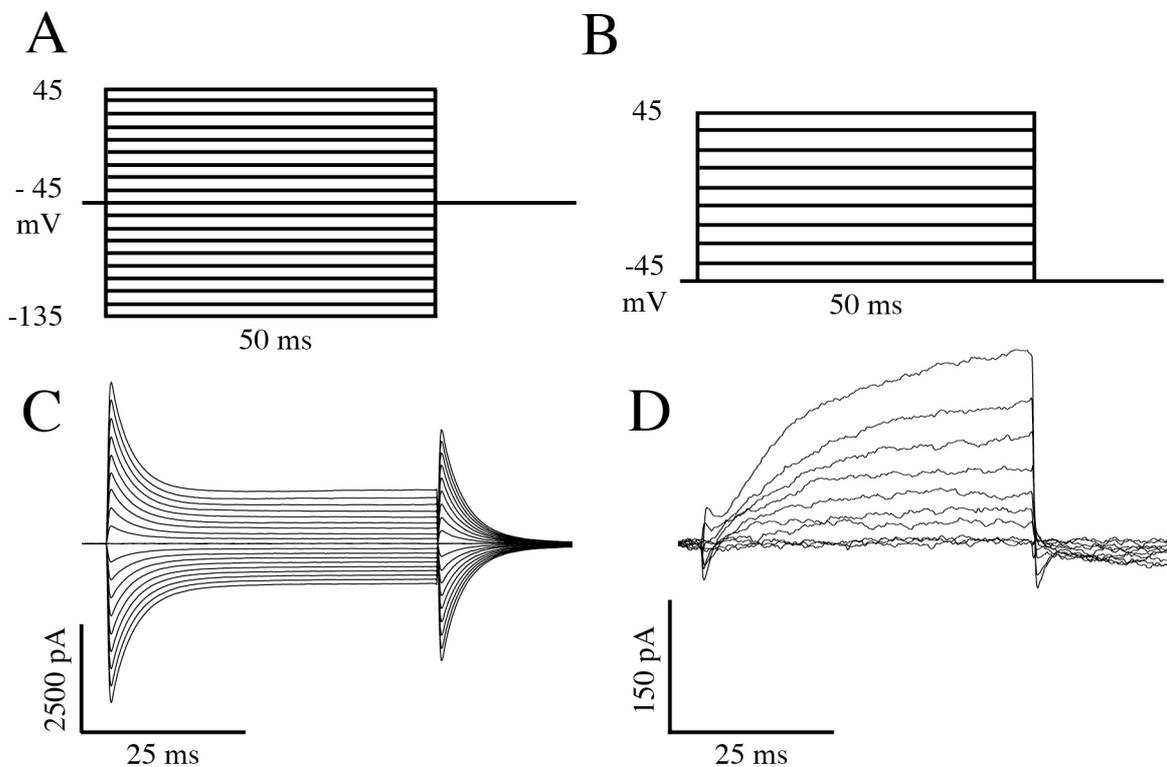


Abb. 3.2. Stimulationsprotokoll und Stromantwort.

- A. Stimulationsprotokoll: Vom Haltepotential -45 mV ausgehend wurden die Zellen zunächst mit 9 Spannungssprüngen mit jeweils um 10 mV zunehmender Amplitude depolarisiert und anschließend vom gleichen Haltepotential aus mit 9 korrespondierenden Spannungssprüngen hyperpolarisiert.
- B. Nach der connect routine des r50-Protokolls zur Isolierung der aktiven Ströme heben sich die passiven Stromkomponenten bei De- und Hyperpolarisation auf und es bleiben die aktiven Anteile bei von -45 mV ausgehender neunstufiger Depolarisation.
- C. Originalableitung der Stromantwort entsprechend der Stimulation in Abb. A.
- D. Nach der connect routine wird der Nettostrom mit Kinetik eines K_{DLR} -artigen Stromes sichtbar.

Wenn nicht anderweitig erwähnt, werden in den weiteren Abbildungen dieser Arbeit zur Darstellung der untersuchten Ionenkanäle nur die Nettoströme nach der connect routine aufgeführt. Als Haltepotential wurde -45 mV gewählt, da in diesem Bereich das Ruhemembranpotential des RPE unter experimentellen Bedingungen anhand der Literatur erwartet wurde. Im Vergleich zu den beschriebenen -48 mV an Ratten RPE-Zellen und den -45 mV an humanen RPE-Zellen (Strauß *et al.*, 1993; Strauss *et al.*, 1994b) wurden im Rahmen dieser Arbeit Ruhemembranpotentiale von $-37,6 \pm 3,5$ mV (n=7) bei Kontrollmäusen und $-40,0 \pm 6,9$ mV (n=7) bei Norriemäusen gemessen. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Ruhemembranpotentialen der beiden Gruppen ($p > 0.05$). Unter diesen Messbedingungen ließen sich zwei Arten von Kaliumströmen nachweisen: verzögerte auswärtsrektifizierende K^+ -Ströme bei Depolarisation auf Werte positiver als -30 mV und einwärtsrektifizierende Ströme bei Hyperpolarisation auf Werte negativer als -70 mV. Letztere zeigten eine Zunahme der maximalen Stromamplitude, wenn von einem Haltepotential von -70 mV ausgegangen wurde. Die Auswärtsströme konnten aufgrund ihrer Kinetik und mit Hilfe des immunzytochemischen Nachweises der Kv1.3 Untereinheit wie folgt als Delayed Rectifier-artige K^+ -Ströme identifiziert werden.

3.2.1. Auswärtsrektifizierende Kaliumströme am RPE von Wildtyp- und Norrie-Mäusen

An kultivierten RPE-Zellen von Kontrollmäusen konnten Delayed Rectifier-artige Kaliumströme nachgewiesen werden (B in Abb. 3.3.) Die Stromdichte betrug $1,9 \pm 0,3$ pA/pF (n=22) bei einer durchschnittlichen Membrankapazität von $112,0 \pm 12,5$ pF (n=22). Die Aktivierungsschwelle wurde anhand der Strom-Spannungskennlinie ermittelt (C in Abb. 3.3.) und lag bei einem gemittelten Wert von $-24,0 \pm 2,9$ mV (n=21). Für die Berechnung der Aktivierungszeitkonstante τ wurde das Hodgkin-Huxley n^2 -Modell herangezogen (D in Abb. 3.3.). Dabei betrug τ bei den gemessenen Strömen $7,7 \pm 1,1$ ms (n=17).

Die auswärtsrektifizierenden K^+ -Ströme an kultivierten RPE Zellen von Norrie-Mäusen konnten ebenfalls als Delayed Rectifier-artige Ströme identifiziert werden und zeigten eine ähnliche Charakteristik wie bei den Kontrolltieren (E in Abb. 3.3.). Die Stromdichte betrug $2,0 \pm 0,4$ pA/pF (n=14) bei einer Membrankapazität von $114,5 \pm 16,4$ pF (n=14). Die Kanäle aktivierten bei $-26,0 \pm 3,5$ mV (n=10) (F in Abb. 3.3.). Als Aktivierungszeitkonstante ergab sich nach dem Hodgkin-Huxley n^2 -Modell für τ ein Wert von $6,8 \pm 1,1$ ms (n=11). Sämtliche

gemessenen und berechneten Werte für Delayed Rectifier-artige K^+ -Kanäle waren im Vergleich Norrie- zu Wildtyp-Maus ohne statistisch signifikanten Unterschied ($p > 0.05$).

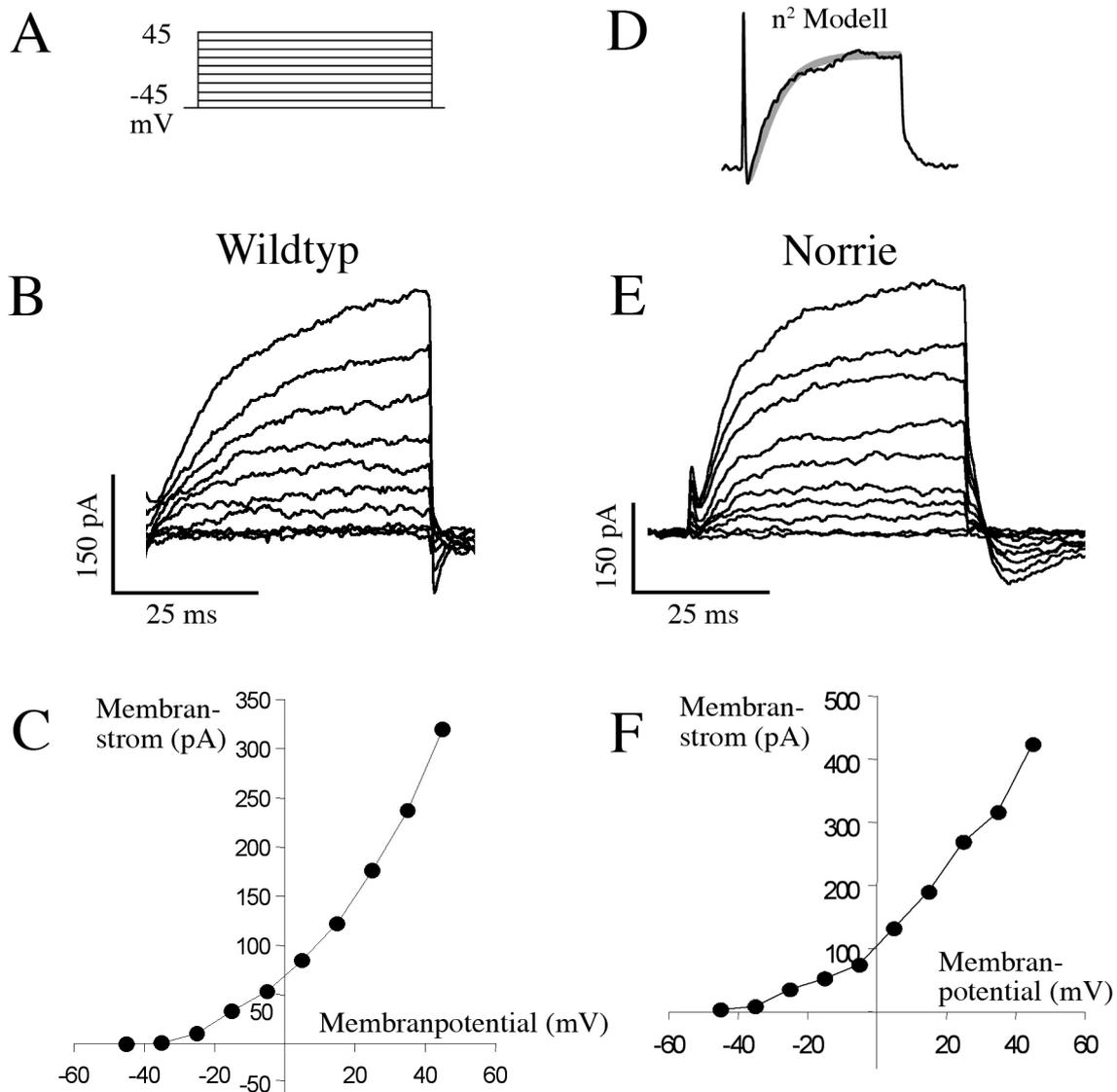


Abb. 3.3. Delayed Rectifier-artige K^+ -Ströme am RPE von Wildtyp- und Norrie-Mäusen

- A. Nettostimulationsprotokoll
- B. Repräsentative Abbildung eines K^+ -Stromes mit Delayed Rectifier-Charakteristik einer RPE-Zelle von Wildtyp-Mäusen.
- C. Strom/Spannungskennlinie des in Abb. B dargestellten Stromes. Aktivierung des Kanals bei Depolarisation auf Werte positiver als -35 mV.

- D. Exemplarische Darstellung der Kurve zur Berechnung der Aktivierungszeitkonstante nach dem Hodgkin-Huxley n^2 -Modell anhand der Stromantwort auf einen Spannungssprung von -45 auf $+45$ mV.
- E. Repräsentative Abbildung eines K^+ -Stromes mit Delayed Rectifier-Charakteristik einer RPE-Zelle von Norrie-Mäusen.
- F. Strom/Spannungskennlinie des in Abb. E dargestellten Stromes. Aktivierung des Kanals bei Depolarisation auf Werte positiver als -35 mV.

Zur weiteren Bestätigung, dass die gemessenen K^+ -Ströme auf Delayed-Rectifier- K^+ -Kanäle zurückzuführen sind, wurde Immunozytochemie angewandt zum Nachweis der Kv1.3-Untereinheit. Der dazu verwendete polyklonale Antikörper wurde in vorherigen Studien mittels Western Blot-Analyse zum Nachweis für Delayed Rectifier-artige Ströme benutzt (Strauss *et al.*, 2002). Abbildung 3.4.A zeigt eine exemplarische Zellfärbung von kultivierten RPE Zellen der Wildtyp-Maus.

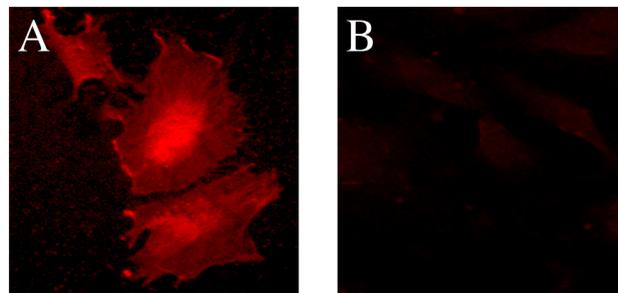


Abb. 3.4. Immunozytochemische Färbung zum Nachweis der Kv1.3-Untereinheit.

- A. Repräsentatives Fluoreszenz-Mikroskopie-Foto nach Färbung mittels Antikörper gegen die Kv1.3-Untereinheit.
- B. Negativkontrolle durch Auslassen des Primärantikörpers.

3.2.2. Effekt der Tyrosinkinase-Hemmung mit Genistein auf den Delayed Rectifier-artigen Strom von Norrie- und Kontrollmäusen

Tyrosinkinasen sind maßgeblich an der Regulation von Delayed Rectifier-artigen K^+ -Kanälen am RPE beteiligt (Strauss *et al.*, 2002). Um die K_{DLR} -Kanäle an beiden Zelltypen auch bezüglich ihrer Regulation zu vergleichen, wurden die intrazellulären Tyrosinkinasen mittels des membrangängigen Blockers Genistein gehemmt. Die Applikation erfolgte über einen fließenden Wechsel der Badlösung, wobei nach der Kontrollmessung mit etwa 3-5 min. Äquilibrierungszeit

bis zum Wirkeintritt gerechnet werden musste. Genistein (50 μM) hemmte den Auswärtsstrom bei Wildtyp-Mäusen (WT) auf $44,5 \pm 3,7 \%$ ($n=4$). Reversibilität des Effektes war beim Auswaschen durch ein recovery (Nachkontrolle) auf $82,8 \pm 21,0 \%$ ($n=3$) gegeben (Abb. 3.5.C). Bei Norrie-Maus-RPE-Zellen wurden die maximalen Strommaxima auf $20,1 \pm 10,0 \%$ gehemmt ($n=5$) ($61,5 \pm 20,0 \%$ recovery nach Auswaschen, $n=4$; Abb. 3.5.F).

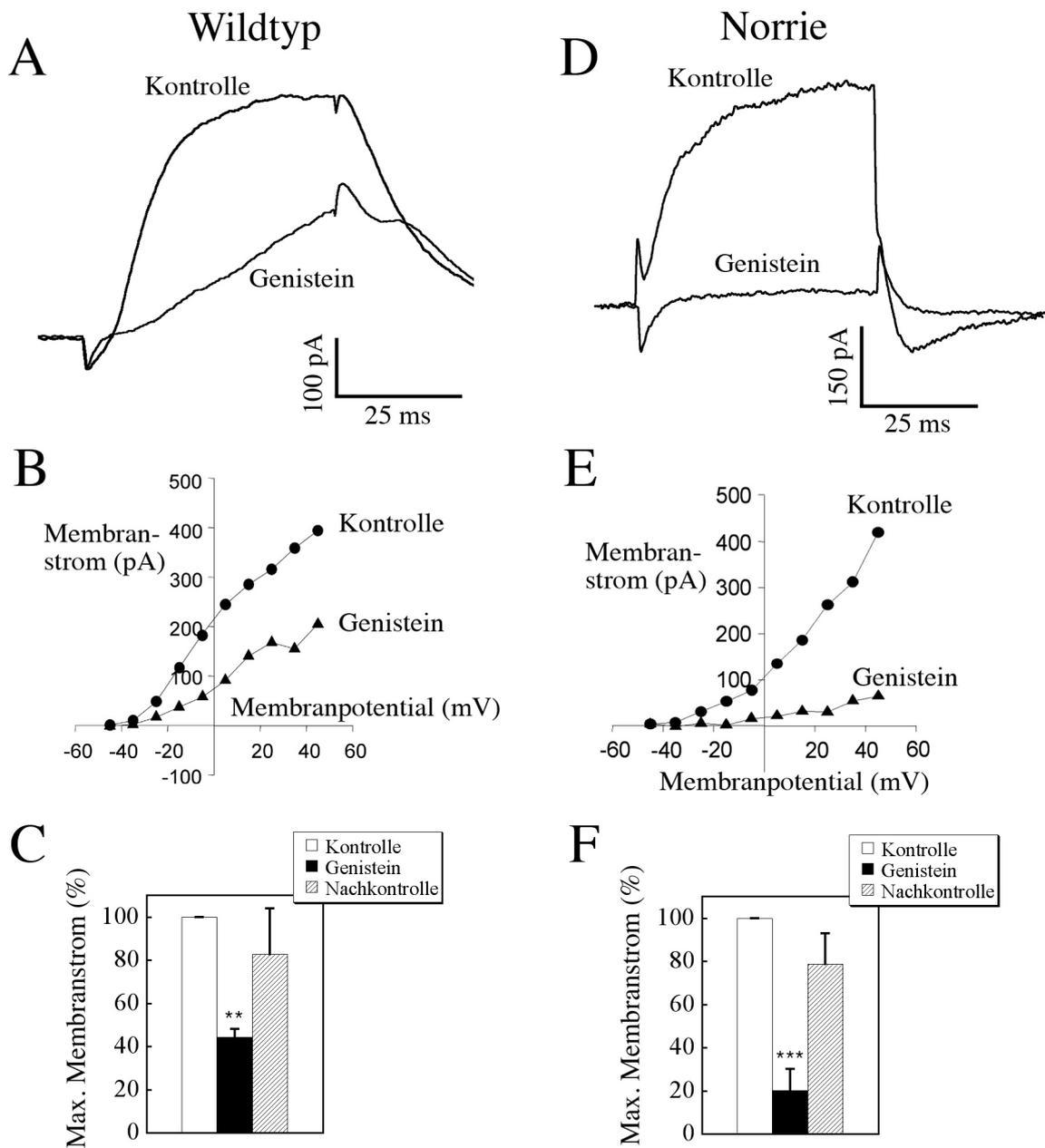


Abb. 3.5. Reaktion der K_{DLR} -Kanäle auf Tyrosinkinaseblockade durch Genistein
Exemplarische Gegenüberstellung von Wildtyp- und Norrie-Mausdaten.

- A. Stromantwort auf ein Standardstimulationsprotokoll (r50) unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 50 μM Genistein in der Badlösung. Anzeige der jeweiligen Maximalströme.
- B. Strom/Spannungskennlinie der Abb. A zugrundeliegenden Messung.
- C. Balkendiagramm zur zusammenfassenden Darstellung der Hemmung des Delayed Rectifier-artigen K^+ -Kanalstromes durch Genistein ($n = 4$; $p < 0.01$; ANOVA).
- D. Repräsentative Stromantwort bei Norrie-Mäusen in Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 50 μM Genistein in der Badlösung. Anzeige der jeweiligen Maximalströme.
- E. Strom/Spannungskennlinie der Abb. D zugrundeliegenden Messung.
- F. Balkendiagramm zur zusammenfassenden Darstellung der Genistein-Hemmung bei Norrie-Mäusen ($n = 4$; $p < 0.01$; ANOVA).

3.2.3. Einwärtsrektifizierende Kaliumströme am RPE von Wildtyp- und Norrie-Mäusen

Durch Hyperpolarisation ausgelöste Einwärtsströme wurden in Anwesenheit von K^+ -Ionen in Bad- und Pipettenlösung durch ihre elektrophysiologische Charakteristik als Inward Rectifier-Kanäle identifiziert. Wurden die Zellen vor dem Stimulationsprotokoll auf ein Haltepotential von -70 mV geklemmt, so erhöhten sich die max. Stromamplituden auf $184,6 \pm 37,9$ % im Vergleich zum Ausgangshaltepotential von -45 mV ($n=4$) (siehe Abb. 3.7.). Die Stromdichte bei von -70 mV ausgehender Depolarisation betrug $0,95 \pm 0,2$ pA/pF ($n=6$) bei einer Kapazität von $114 \pm 24,5$ pF ($n=6$). Die Aktivierungsschwelle lag bei -75 - 80 mV (siehe Abb. 3.6.C), als Aktivierungszeitkonstante ergab sich ein Wert für τ von $8,5 \pm 2,6$ ms ($n=5$).

Im Rahmen der Untersuchung der K^+ -Leitfähigkeiten am RPE von Norrie-Mäusen waren durch Hyperpolarisation ausgelöste Einwärtsströme ausgesprochen selten zu messen. Bei drei Zellen ließen sich Inward Rectifier-artige Ströme ableiten, eine Zelle zeigte eine kombinierte Einwärts- und Auswärtsrektifikation (siehe Abb. 3.6.D). Die Stromdichte zeigte eine hohe Streuung: $1,6 \pm 1,1$ pA/pF ($n=3$). Die Einwärtsströme aktivierten bei Potentialen negativer als -70 mV (siehe Abb. 3.6.E). Die Aktivierungszeitkonstante τ betrug $8,1 \pm 2,1$ ms ($n=3$).

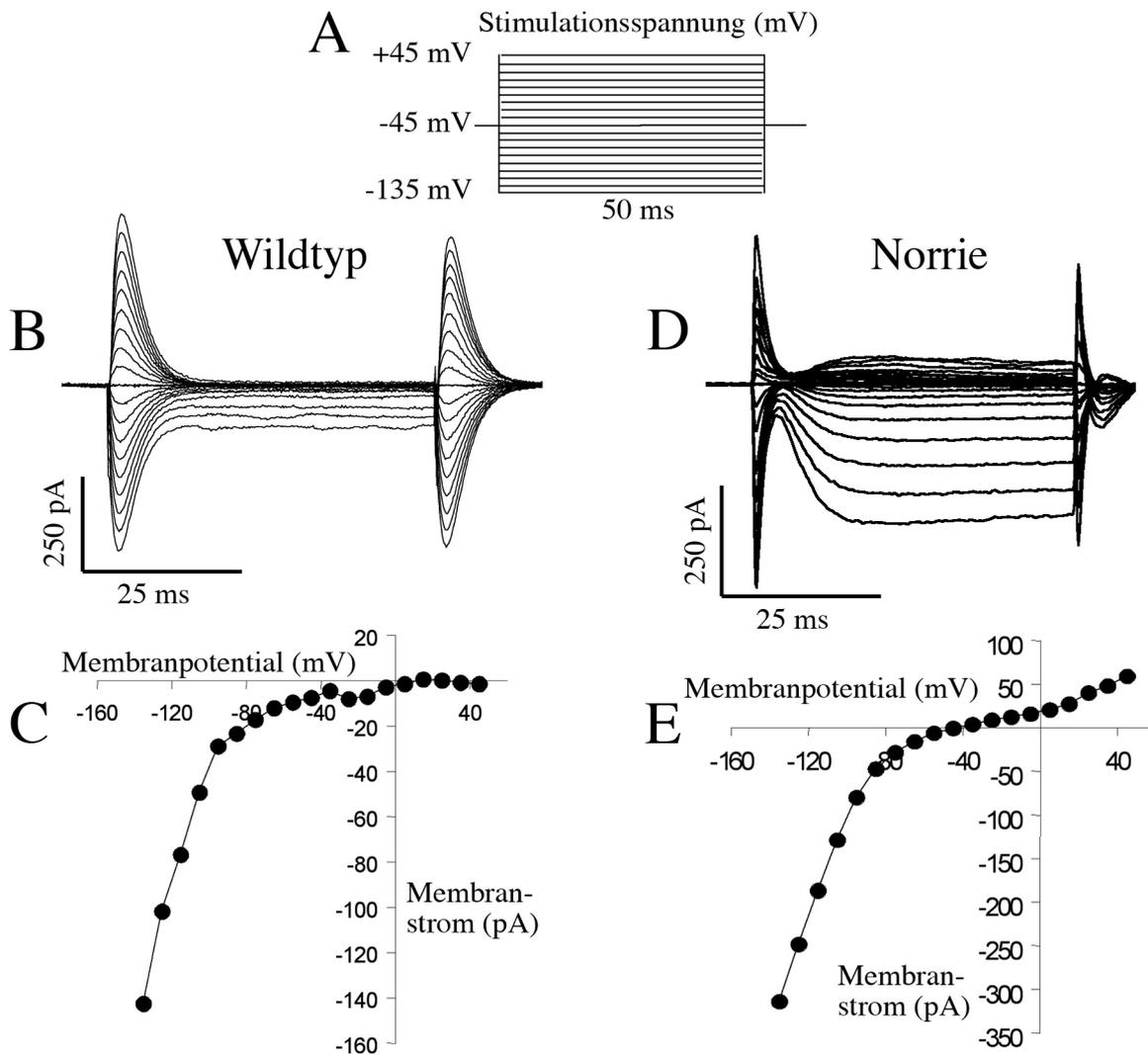


Abb. 3.6. Durch Hyperpolarisation ausgelöste Inward Rectifier K^+ -Ströme am RPE von Wildtyp- und Norrie-Mäusen.

- A. Stimulation mit 9 hyperpolarisierenden Spannungssprüngen mit jeweils um 10 mV zunehmender Amplitude von einem Haltepotential von -45 mV aus.
- B. Stromantwort an RPE-Zellen von Wildtyp-Mäusen entsprechend der Stimulation in Abb. A.
- C. Strom/Spannungskennlinie der in Abb. B dargestellten Ströme. Deutliche Stromzunahme bei Spannungen negativer als -70 mV.
- D. Beispielstromkurve einer Ableitung von Norrie-Maus RPE. Deutlich ist die verzögerte Aktivierung des Auswärtsstromes mit geringerer Amplitude zu erkennen. Der Einwärtsstrom aktivierte schneller und erreicht größere Strommaxima. Um sowohl den Einwärts- als auch den Auswärtsstrom zu erfassen, konnte die connect routine nicht angewendet werden.
- E. Strom/Spannungskennlinie der Ströme aus Abb. D: Aktivierungsschwelle für den Auswärtsstrom bei etwa -30 mV, für den Einwärtsstrom bei etwa -70 mV. Sigmoidaler Kurvenverlauf als Ausdruck der Ein- und Auswärtsrektifikation.

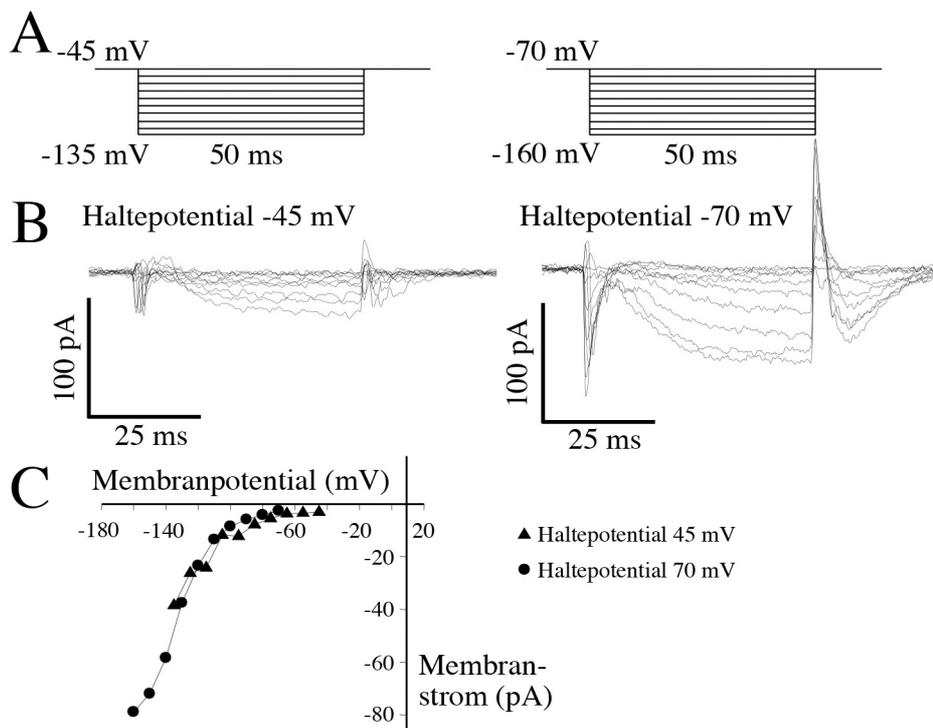


Abb. 3.7. Potentialabhängigkeit der Inward Rectifier K^+ -Ströme am Beispiel von RPE-Zellen von Wildtypmäusen.

- Stimulation mit 9 hyperpolarisierenden Spannungssprüngen mit jeweils um 10 mV zunehmender Amplitude von einem Haltepotential von -45 mV (links) bzw. -70 mV (rechts) ausgehend.
- Stromantwort entsprechend der Stimulation in Abb. A. Vergleich der Stromamplituden in Abhängigkeit vom Haltepotential -45 mV bzw. -70 mV .
- Strom/Spannungskennlinie der in Abb. B dargestellten Ströme. Nahezu deckungsgleicher Kurvenverlauf bis -130 mV . Der stark hyperpolarisierende Bereich von $130\text{--}160\text{ mV}$ zeichnet für die starke Amplitudenzunahme des von -70 mV ausgehenden Stromes verantwortlich.

3.3. Kalziumströme am RPE

Zur Messung von Ca^{2+} -Strömen wurde die Badlösung K^+ -frei gehalten und K^+ in der Pipettenlösung durch Cs^+ ersetzt. Es wurde generell die Nystatin Perforated-Patch-Konfiguration angewendet, da die Aktivität der Ca^{2+} -Kanäle stark von einer intakten Komposition intrazellulärer Substanzen wie ATP und Enzymsystemen abhängt. Der „run-down“ Tendenz der Kalziumkanäle in der offenen Whole-cell-Konfiguration, also dem Auswasch-bedingten

Aktivitätsverlust nach kurzer Zeit, konnte somit entgegengewirkt werden. Als Ladungsträger für Ströme durch L-Typ Kanäle wurde 10 mM BaCl₂ der Badlösung zugesetzt. Die gemessenen Ströme entsprechen demzufolge genaugenommen nicht Kalziumströmen, sondern Bariumströmen durch Kalziumkanäle. Die Kanäle werden in ihrer Grundcharakteristik nur geringfügig beeinflusst, die Ströme hingegen verstärkt und dadurch leichter detektierbar. Bariumströme gelten als legitimes Mittel zur Untersuchung von Ca²⁺-Kanälen und lassen sich in der Literatur als Referenz finden (Strauss *et al.*, 1994a; Ueda *et al.*, 1995; Rosenthal *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wird vereinfachend der Term „Ca²⁺-Strom“ benutzt. In Analogie zur Untersuchung der K⁺-Kanäle wurde ein einheitliches Stimulationsprotokoll angewandt, bei dem von einem Haltepotential von -70 mV ausgehend die Zellmembran mit 9 depolarisierenden und 9 hyperpolarisierenden Spannungssprüngen stimuliert wurde, wobei deren Amplitude um jeweils 10 mV zunahm. Die Stromantwort der Zelle auf diese 50 ms dauernden Spannungsimpulse wurde aufgezeichnet und bei korrekten Messbedingungen einer Nettostromkorrektur mittels der connect routine (r50 Protokoll) unterzogen. Damit wurden passive Elemente der Ableitung eliminiert und die Kanal-bedingte aktive Leitfähigkeitsänderung erfasst.

Unter diesen Messbedingungen ließen sich sowohl an Norrie- als auch an Kontrolltieren zwei Arten von Strömen nachweisen: Auswärtsströme und Einwärtsströme. Erstere konnten als durch DIDS reversibel hemmbare Cl⁻-Ströme identifiziert werden (siehe Kap. 3.4.). Die Einwärtsströme ließen sich anhand ihrer Kinetik, ihrer Dihydropyridinsensitivität sowie des immunzytochemischen Nachweises der α_{1D} -subunit eindeutig den L-Typ Ca²⁺-Kanälen zuordnen.

3.3.1. L-Typ Ca²⁺-Kanäle am RPE von Wildtyp- und Norrie-Mäusen

An kultivierten RPE-Zellen von Kontrollmäusen konnten Ba²⁺-Ströme durch L-Typ Ca²⁺-Kanäle nachgewiesen werden (Abb. 3.8.). Die Stromdichte betrug $1,2 \pm 0,1$ pA/pF (n=35) bei einer Membrankapazität von $129,3 \pm 12,5$ pF (n=35). Als Aktivierungsschwelle ergab sich ein Wert von $-31,1 \pm 1,9$ mV. Die Kanäle zeigten eine schnelle Aktivierung mit einem durchschnittlichen time-to-peak Wert von $6,4 \pm 0,8$ ms (n = 35) und einem Halbaktivierungspotential von $21,3 \pm 1,4$ mV. Die Kanal-typische langsame Inaktivierung zeigte eine initiale schnellere Komponente und einen sehr langsamen exponentiellen Abfall (siehe Abb. 3.8.D). Die Inaktivierungszeitkonstante τ betrug $8,4 \pm 1,5$ ms (n = 35).

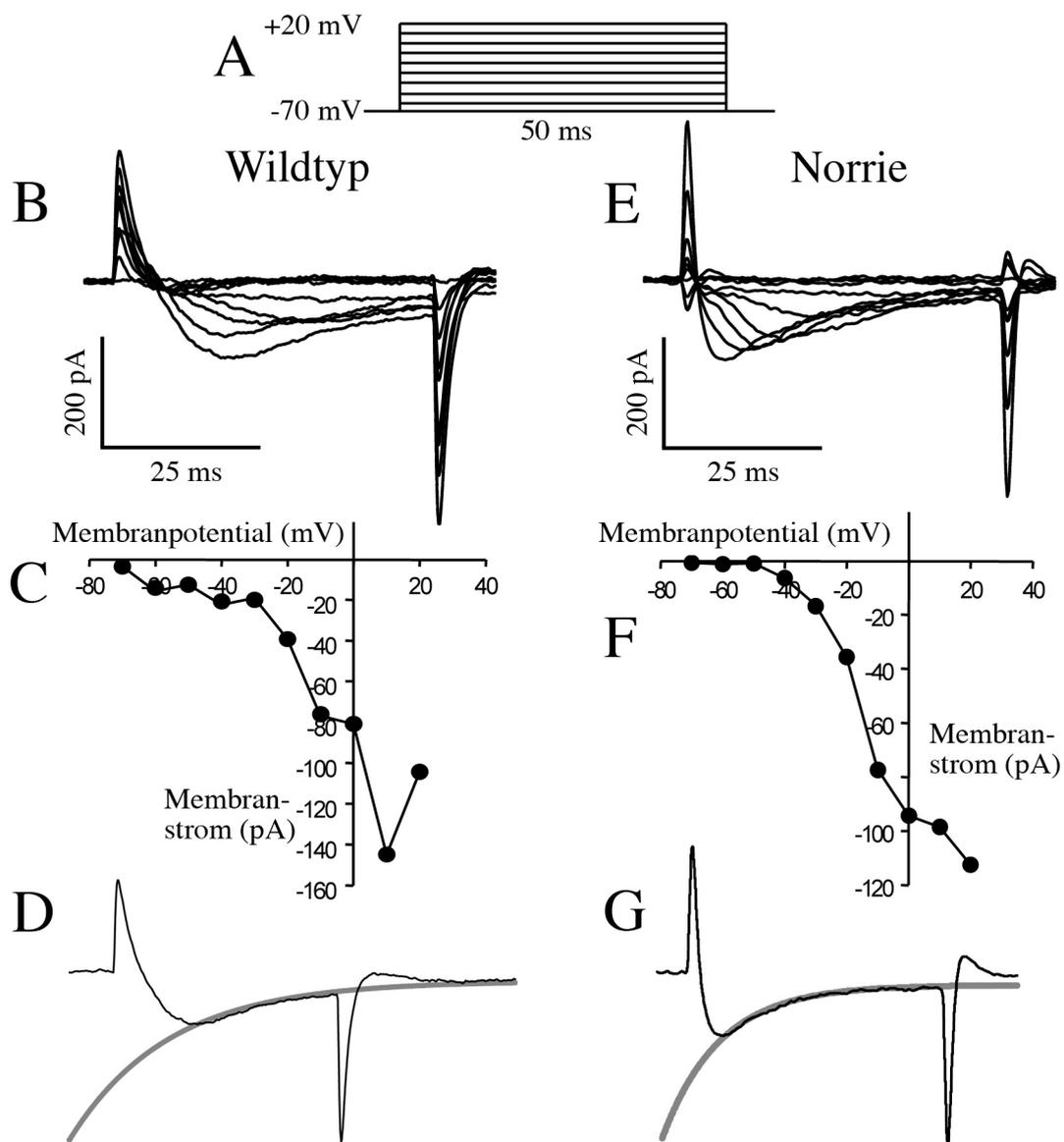


Abb. 3.8. Gegenüberstellung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen am RPE von Wildtyp- und Norrie-Mäusen

- A. Nettostimulationsprotokoll nach der Connect Routine
- B. Stromantwort entsprechend der Stimulation in Abb. A. Darstellung eines Stromes charakteristisch für L-Typ Ca^{2+} -Kanäle.
- C. Strom/Spannungskennlinie des in Abb. B dargestellten Stromes. Aktivierung des Kanals bei Depolarisation auf Werte positiver als -30 mV.
- D. Darstellung der Kurve zur Berechnung der Inaktivierungszeitkonstante anhand der Stromantwort auf einen Spannungssprung von -70 auf $+20$ mV. Extrapolierte Kurve grau unterlegt.
- E. Repräsentative Stromantwort von RPE-Zellen von Norrie-Mäusen charakteristisch für L-Typ Ca^{2+} -Kanäle.

- F. Strom/Spannungskennlinie des in Abb. E dargestellten Stromes. Aktivierung des Kanals bei Depolarisation auf Werte positiver als -40 mV.
- G. Kurve zur Berechnung der Inaktivierungszeitkonstante an Norrie-Mauszellen und der dazu gehörige Stromverlauf nach einen Spannungssprung von -70 auf $+20$ mV.

Die Einwärtsströme an kultivierten RPE-Zellen von Norrie-Mäusen konnten ebenfalls als durch L-Typ Ca^{2+} -Kanäle bedingte Ba^{2+} -Ströme identifiziert werden und zeigten eine ähnliche Charakteristik wie bei den Kontrolltieren. Die Stromdichte beträgt $1,1 \pm 0,1$ pA/pF ($n=23$) bei einer mittleren Membrankapazität von $119,4 \pm 13,6$ pF ($n=23$). Die Kanäle aktivieren bei einer mittleren Aktivierungsschwelle von $-32,6 \pm 2,5$ mV. Für die Inaktivierungszeitkonstante τ ergibt sich ein Wert von $8,3 \pm 1,5$ ms ($n = 23$). Die durchschnittliche time-to-peak lag bei $6,8 \pm 0,8$ ms ($n = 23$) und die Spannung der Halbmaximalaktivierung ($V_{1/2}$) bei $20,5 \pm 1,5$ mV. Die gemessenen und berechneten Werte für die Beschreibung der Kinetik der Ba^{2+} -Ströme durch L-Typ Ca^{2+} Kanäle waren im Vergleich von Norrie zu Wildtyp-Maus ohne statistisch signifikanten Unterschied ($p > 0.05$). Die gemessenen und berechneten Werte zur elektrophysiologischen Charakterisierung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle waren im Vergleich Norrie- zu Wildtyp-Maus ohne statistisch signifikanten Unterschied ($p > 0.05$).

3.3.2. Nachweis der Dihydropyridinsensitivität der L-Typ Ca^{2+} -Ströme von Wildtyp- und Norrie-Mäusen

Das Dihydropyridinderivat Nifedipine gilt als spezifischer Blocker für L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (Hirano *et al.*, 1992). In einer Konzentration von 10 μM kam es zu einer reversiblen Hemmung des Ausgangsstromes auf $65,6 \pm 12,8$ % ($p < 0.05$, Students *t* test, $n = 4$) mit $109,3 \pm 7$ % des Ausgangswertes als recovery nach Auswaschen ($n=3$) bei Kontrolltieren (Abb. 3.9.A-C). Bei Norrie-Mäusen ließ sich der Ca^{2+} -Strom auf $52,5 \pm 8,6$ % ($p < 0.01$, Students *t* test, $n = 5$) hemmen ($64,8 \pm 20,9$ % recovery nach Auswaschen, $n=2$; Abb. 3.9.D-F). Der Nifedipin-Hemmeffekt auf den L-Typ Ca^{2+} -Kanal zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Norrie- und Wildtyp-Mäusen ($p > 0.05$). Zusätzlich zur elektrophysiologischen und pharmakologischen Identifizierung des L-Typ Ca^{2+} -Kanals wurde Immunocytochemie angewandt zum Nachweis der α_{1D} -Untereinheit. Der dazu verwendete polyklonale Antikörper wurde in vorherigen Studien zum Nachweis für L-Typ Ca^{2+} -Kanäle benutzt (Strauss *et al.*,

2000). Abbildung 3.10.A zeigt eine exemplarische Zellfärbung von kultivierten RPE-Zellen der Wildtyp-Maus.

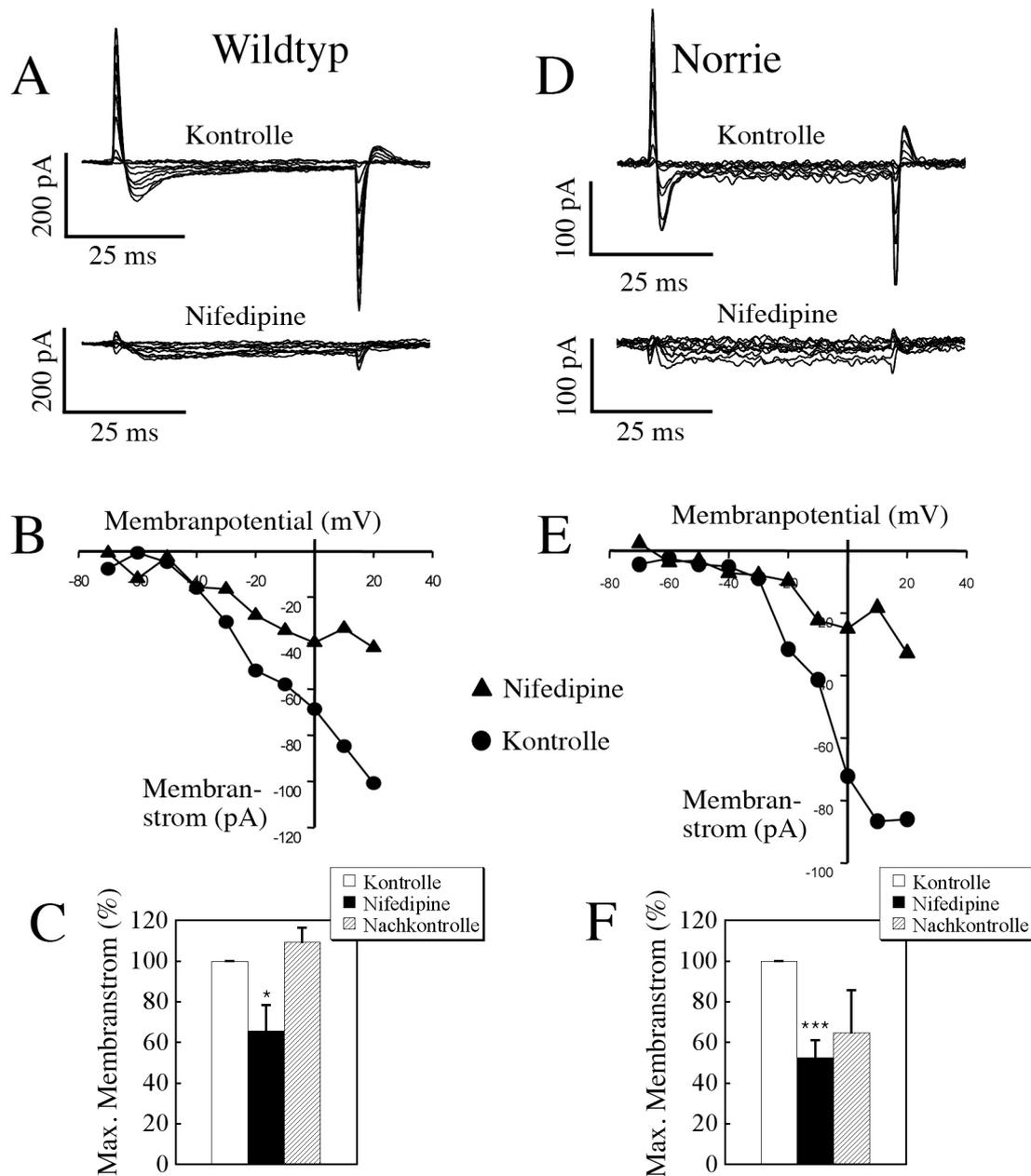


Abb. 3.9. Nachweis der Nifedipin-Sensitivität der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle

Exemplarische Gegenüberstellung von Wildtyp- und Norrie-Mausdaten

- A. Stromantwort auf ein Standardstimulationsprotokoll (r50) unter Kontrollbedingungen und nach Badapplikation von 10 μ M Nifedipine.
- B. Vergleich der Strom/Spannungskennlinien der in Abb. A zugrundeliegenden Messungen.
- C. Balkendiagramm zur zusammenfassenden Darstellung der Hemmung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle durch Nifedipine (n = 4; p < 0.05; Student's *t* test).

- D. Stromantwort einer RPE-Zelle von Norrie-Mäusen unter Kontrollbedingungen und nach Badapplikation von 10 μM Nifedipine.
- E. Strom/Spaltungskennlinien der Ableitung in D mit und ohne Nifedipine (10 μM).
- F. Balkendiagramm zur Hemmung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle an Norrie-Mäusen durch Nifedipine ($n = 5$; $p < 0.01$; Students t test).

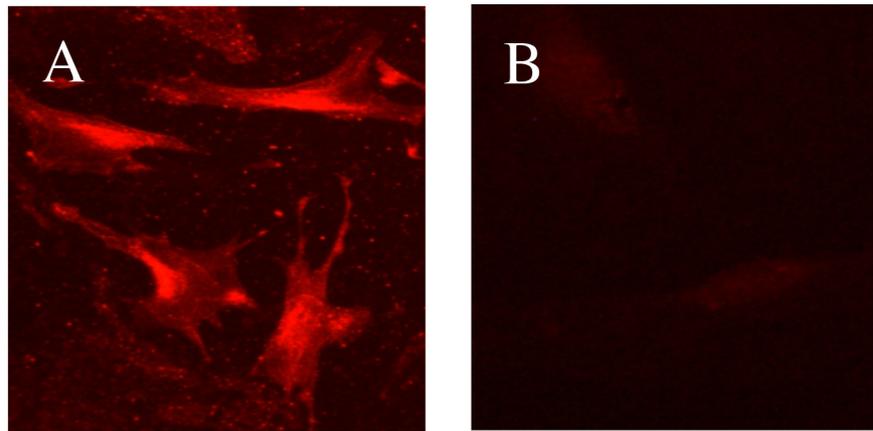


Abb. 3.10. Immunocytochemische Färbung zum Nachweis der α_{1D} Untereinheit.

- A. Repräsentatives Fluoreszenz-Mikroskopie-Foto nach Färbung mittels Antikörper gegen die α_{1D} -Untereinheit.
- B. Negativkontrolle durch Auslassen des Primärantikörpers.

3.3.3. Effekt der Tyrosinkinase-Hemmung mit Genistein auf den L-Typ Ca^{2+} -Strom an Norrie- und Kontrollmäusen

Tyrosinkinasen haben sich als maßgeblicher Regulationsfaktor bei der Aktivierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen am RPE erwiesen (Strauß *et al.*, 1997). Um diese Regulation an von RPE-Zellen von Norrie- und Kontrollmäusen abgeleiteten Strömen der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle zu testen und zu vergleichen, wurden die intrazellulären Tyrosinkinasen mittels dem membrangängigen Blocker Genistein gehemmt. Die Applikation erfolgte über einen fließenden Wechsel der Badlösung, wobei nach der Kontrollmessung mit etwa 3-5 min Äquilibrierungszeit bis zum Wirkeintritt gerechnet werden musste. Genistein (50 μM) vermochte den Ausgangsstrom bei Wildtyp-Mäusen auf $28,0 \pm 4,0$ % zu hemmen ($p < 0.001$, Students t test, $n=13$). Reversibilität des Effektes war beim Auswaschen durch ein recovery auf $72,4 \pm 12,5$ % ($n=6$) gegeben. Bei Norrie-Maus-RPE-Zellen wurden die maximalen Stromantworten auf $37,2 \pm 3,7$ % gehemmt (p

< 0.001, Students *t* test, n = 11) und zeigten ein recovery von $79,2 \pm 12,1$ % nach Auswaschen (n = 4).

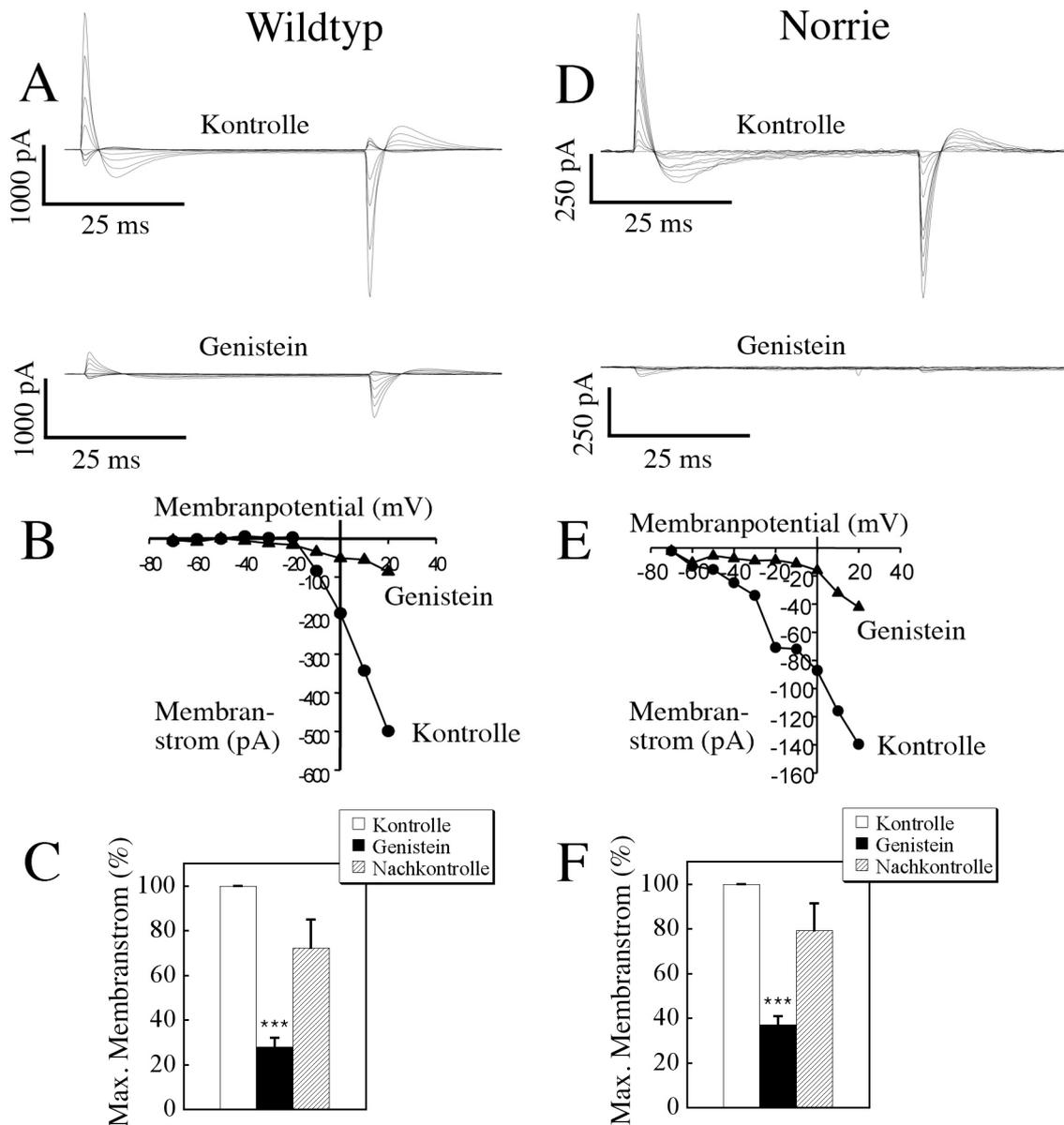


Abb. 3.11. Reaktion der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle auf Tyrosinkinaseblockade durch Genistein

Exemplarische Gegenüberstellung von Wildtyp- und Norrie-Mausdaten

- A. Stromableitung nach Standardstimulationsprotokoll (r50) in Kontroll- und Nifedipine (50 μ M) Lösung.
- B. Vergleich der Strom/Spannungskennlinien der Abb. A zugrundeliegenden Messungen.
- C. Balkendiagramm zur zusammenfassenden Darstellung der Hemmung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle durch Genistein (n = 13; $p < 0.001$; Students *t* test).

- D. Stromableitung in Norrie-Maus RPE Zellen in Kontroll- und Nifedipin (50 μM) Lösung mit nahezu vollständiger Hemmung des L-Typ Ca^{2+} -Kanalstromes.
- E. Strom/Spannungskennlinien der Abb. D zugrundeliegenden Messungen.
- F. Balkendiagramm zur Hemmung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle durch Genistein ($n = 11$; $p < 0.001$; Students t test) an Norrie-Maus RPE.

3.4. Chloridströme am RPE

Im Rahmen der Untersuchung der RPE-Zellen hinsichtlich ihrer Ca^{2+} -Leitfähigkeit (siehe Kapitel 3.2.6.) wurden unter K^+ -freien Bedingungen bei etwa 10% der Zellen Auswärtsströme registriert, die aufgrund ihrer reversiblen Blockierbarkeit durch 1 mM 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid (DIDS) (Strauss *et al.*, 1996; Wills *et al.*, 2000) (siehe Abb. 3.13.) und ihrer Kinetik (siehe Abb. 3.12.B, D) als Ströme durch Chloridkanäle identifiziert wurden. Die Stromdichte bei RPE Zellen von Wildtyp-Mäusen betrug $4,3 \pm 0,9$ pA/pF ($n=8$) bei einer mittleren Membran-Kapazität von $112,3 \pm 13,8$ pF ($n=8$). Von einem Haltepotential von -70 mV ausgehend, ergibt sich als Aktivierungsschwelle ein Wert von $-48,8 \pm 3,5$ mV ($n=8$) (siehe Abb. 3.12.C). DIDS blockierte die max. Stromamplituden reversibel auf $25,8 \pm 4,7$ % ($62,1 \pm 13,5$ % Nachkontrolle nach Auswaschen, $n=3$) (siehe Abb. 3.13.B). Chloridkanäle, die am RPE von Norrie-Mäusen gemessen wurden, glichen denen von Kontrollmäusen. Die mittlere Stromdichte betrug $4,1 \pm 1,2$ pA/pF ($n=7$) bei einem Kapazitätswert von $123,0 \pm 16,0$ pF ($n=7$). Die Aktivierungsschwelle lag bei $-47,1 \pm 4,7$ mV ($n=7$), von einem Haltepotential von -70 mV ausgehend. Der Unterschied dieser Werte war statistisch nicht signifikant ($p > 0.05$).

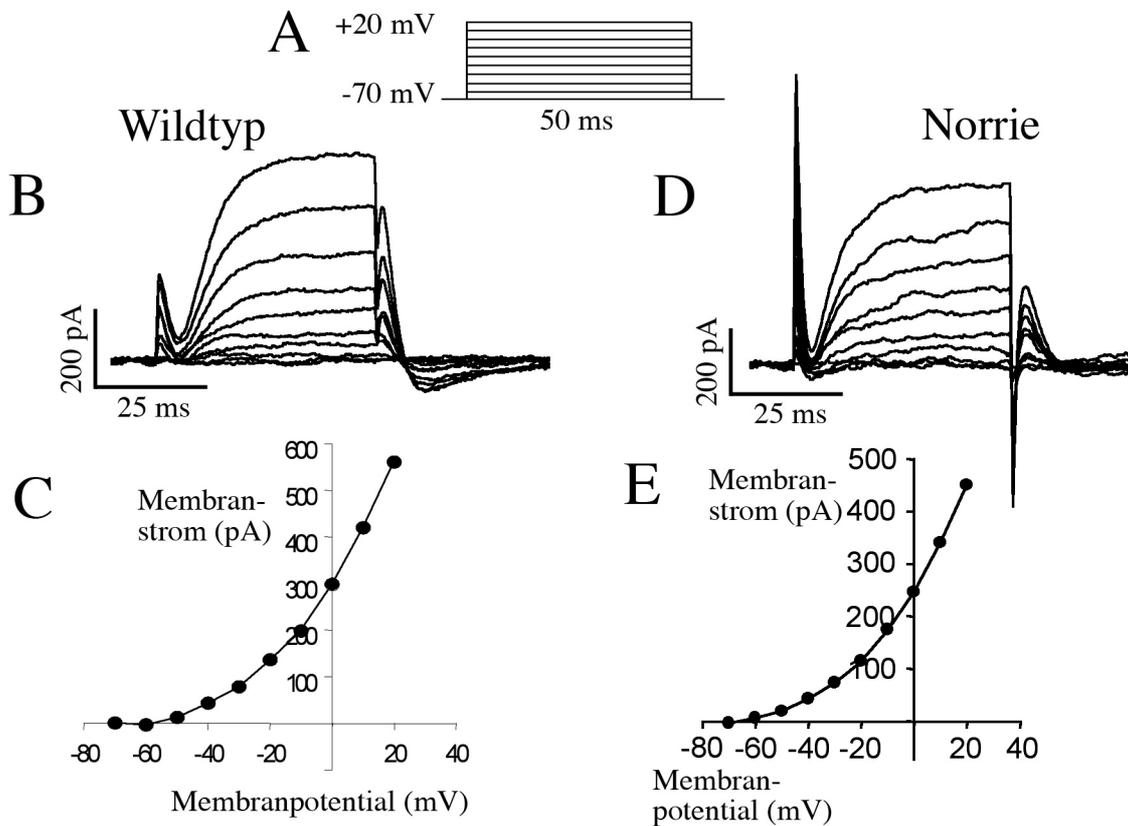


Abb. 3.12. Messung von Cl⁻-Strömen am RPE von Kontroll- und Norrie-Mäusen

- A. Nettostimulationsprotokoll: vom Haltepotential von -70 mV ausgehend werden die Zellen für 50 ms durch 9 Spannungssprünge mit um jeweils 10 mV steigender Amplitude depolarisiert.
- B. Stromantwort auf die elektrische Stimulation unter K^+ -freien Bedingungen mit einem deutlichen Auswärtsstrom bei Kontrollmäusen.
- C. Strom/Spannungsbeziehung der Abb. B zugrundeliegenden Messung.
- D. Auswärtsstrom bei Norrie-Mäusen unter K^+ -freien Bedingungen. Amplitude vergleichbar mit Stromantworten von Kontrollmäusen.
- E. Strom/Spannungskennlinie der Abb. D zugrundeliegenden Messung.

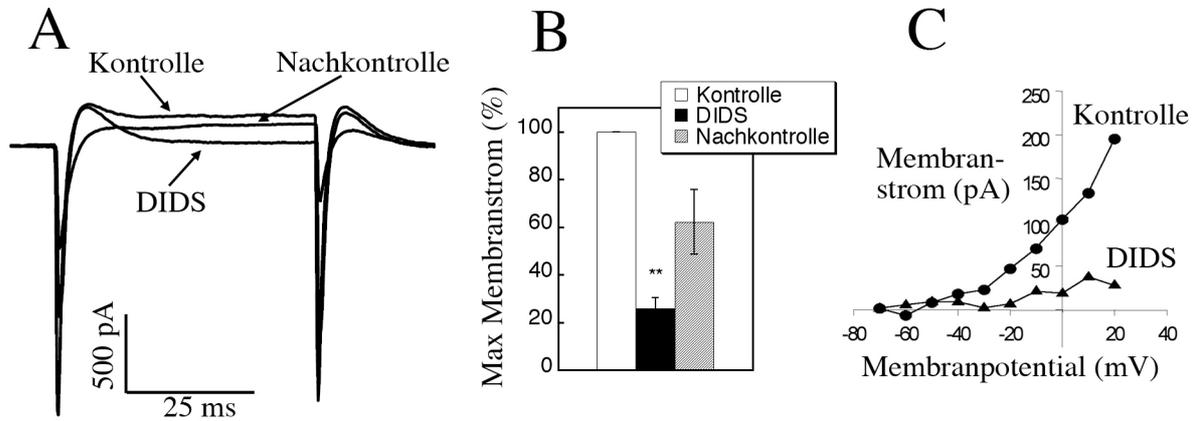


Abb. 3.13. Hemmbarkeit von Cl⁻-Strömen am Wildtyp-RPE durch DIDS

- Effekt der Cl⁻-Kanal-Blockade durch 1 mM DIDS auf die maximale Stromamplitude bei Depolarisation von -70 mV auf +20 mV. Reversibilität des Effektes durch Auswaschen in der Nachkontrolle bestätigt.
- Balkendiagramm zur zusammenfassenden Darstellung der Hemmung der Chlorid-Kanäle durch DIDS (n = 3; p < 0.01; Students *t* test).
- Strom/Spannungskennlinie der in Abb. A dargestellten Ableitung.

4. Diskussion

4.1. Beurteilung der Primärkultur von Maus-RPE-Zellen

Das Alter der Versuchstiere betrug einheitlich 14 Tage. Die Festlegung dieses Zeitpunktes erfolgte unter zweierlei Gesichtspunkten. Zum einen handelt es sich bei der Norrie'schen Erkrankung um einen angeborenen Defekt, das heißt, Mechanismen, die entweder in der Fetal- oder Perinatalzeit wirken, müssen in Betracht gezogen werden. In diesem Falle wäre also eine möglichst frühzeitige Untersuchung angebracht. Diese Prämisse erfährt jedoch beim RPE eine Einschränkung. Die Augenentwicklung ist bei Mäusen zur Geburt noch nicht abgeschlossen. Die Öffnung der Augenlider erfolgt erst um den 12. Tag und kann als Reifezeichen angesehen werden. Die Funktion des RPE ist eng verzahnt mit den Sehprozessen der Photorezeptoren (siehe Kap.1.3.2.) und scheint daher erst im lichtexponierten Auge ihre volle Entfaltung zu erlangen. Das gewählte Alter stellt daher den frühestmöglichen Zeitpunkt für eine Untersuchung reifer RPE-Zellen dar.

Obwohl bei der Anlage der Zellkulturen nach etablierten und bei anderen Spezies erfolgreichen Protokollen verfahren wurde, ergaben sich bei den Maus-RPE-Zellen unvorhersehbare Variationen der Qualität der Primärkulturen. Erschienen sie im Vergleich zu RPE-Primärkulturen von Ratte und Mensch in der Zelldichte vermindert und im Zellwachstum verlangsamt (Strauß *et al.*, 1997; Strauß, 1998; Strauss *et al.*, 2002), so ergaben sich jedoch keine fassbaren Unterschiede zwischen Kontrollmaus und Norrie-Maus bezüglich Zellmorphologie oder -wachstum. Die Schwierigkeiten mit der Anlage einer Primärkultur des Maus-RPE stellen wahrscheinlich auch den Hauptgrund dar, dass bei einer Vielzahl veröffentlichter Originalarbeiten mit Ratten- und Mensch-RPE zum Zeitpunkt dieser experimentellen Studie noch keine Abhandlung über kultivierte Maus-RPE-Zellen vorgestellt wurden (Pfeffer *et al.*, 2014). Die vorliegende Arbeit stellt deshalb nicht nur erstmals elektrophysiologische Daten des RPE der Maus vor, sondern präsentiert auch ein adaptiertes Präparationsprotokoll zur Optimierung der Anlage einer Primärkultur.

Die Spezifität der RPE-Kultur konnte mittels immunzytochemischem Nachweis von β -Tubulin Isotyp III bestätigt werden. Dieses intrazelluläre Protein lässt sich in-situ normalerweise nur in Neuronen der Retina nachweisen. Im Rahmen der Dedifferenzierung unter Kulturbedingungen exprimieren jedoch auch RPE-Zellen β -Tubulin III und lassen sich somit von den morphologisch ähnlich erscheinenden Fibroblasten abgrenzen (Strauss *et al.*, 2002). Die im

Rahmen dieser Arbeit untersuchten kultivierten RPE-Zellen zeigten sowohl einzelstehend als auch im semikonfluenten Zellverbund eine deutliche Anfärbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes β -Tubulin III. Der Hersteller beschreibt eine Kreuzreaktivität zum gleichen Antigen bei Ratte und Rind. Die phylogenetische Verwandtschaft zwischen Ratte und Maus legt eine Übertragung der Antigenspezifität dieses Antikörpers auf die Maus nahe. Ähnlichkeiten des Immunfluoreszenzmusters bei Maus-RPE im Vergleich zu Ratten-RPE (unveröffentlichte Daten, Labor Strauss) unterstützen diese Annahme. Es ist daher mit einer hohen Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zellen wirklich um RPE-Zellen handelte.

4.2. K⁺-Kanäle

Zur Analyse der Kaliumleitfähigkeiten von kultivierten Pigmentepithelzellen wurde eine Badlösung gewählt, deren Elektrolytzusammensetzung in etwa dem physiologischen Milieu entsprach. Unter diesen Bedingungen ließen sich zwei spannungsabhängige Ströme messen, verzögerte auswärtsrektifizierende K⁺-Ströme bei Depolarisation auf Werte positiver als -30 mV und einwärtsrektifizierende Ströme bei Hyperpolarisation auf Werte negativer als -70 mV. Die Anwesenheit sämtlicher elektrisch relevanter Ionen in physiologischen Konzentrationen ermöglichte im current-clamp-Modus der Patch-Clamp-Technik die Erfassung des Ruhemembranpotentials. Dieses betrug $-37,6 \pm 3,5$ mV (n=7) bei Kontrollmäusen und $-40,0 \pm 6,9$ mV (n=7) bei Norrie-Mäusen. Diese Werte sind ohne statistisch signifikanten Unterschied. Im Vergleich zur Literatur sind die an Mäusen gemessenen Ruhemembranpotentiale vergleichbar mit denen am RPE von Ratten, Affen und Menschen (Wen *et al.*, 1993; Strauss *et al.*, 2002).

4.2.1. Auswärtsrektifizierende K⁺-Kanäle am RPE von Norrie- und Kontrollmäusen

Bei etwa 30% der kultivierten Zellen ließ sich sowohl bei Norrie- als auch bei Kontrollmäusen als Antwort auf ein r50 Stimulationsprotokoll ein Auswärtsstrom registrieren. Dieser zeigt bei beiden Gruppen eine ähnliche Charakteristik. Von einem Haltepotential von -45 mV ausgehend, führt eine Depolarisation auf Potentiale positiver als -30 mV zur verzögerten Aktivierung von Auswärtsströmen, die bei einem Ausgangspotential von $+45$ mV eine maximale

Amplitude zeigen. Dabei folgt auf den linearen Anstieg der Stimulationspotentiale eine exponentielle Zunahme des Auswärtsstroms, dieser zeigt also eine Auswärtsrektifikation. Ein zweites Charakteristikum dieser Ströme ist, dass zumindest für den Zeitraum der Stimulation (50 ms) keine Inaktivierung auftritt. Beide genannten Eigenschaften sind typisch für Ströme, die durch Kaliumkanäle der Delayed-Rectifier-Familie hervorgerufen werden. Da beim RPE der Ratte der Delayed-Rectifier-artige Strom eindeutig mit der Kv1.3.-Untereinheit assoziiert werden konnte (Strauss *et al.*, 2002), wurden zur Klärung der genauen Identität des Kanaltyps immunzytochemische Nachweismethoden für diese Untereinheit angewandt. Zusammenfassend konnten die Auswärtsströme aufgrund ihrer Kinetik und mit Hilfe des Nachweises der Kv1.3 Untereinheit eindeutig als Delayed-Rectifier-artige K⁺-Ströme identifiziert werden. Die verwendeten RPE-Kulturen von Kontroll- und Norrie-Mäusen waren dabei hinsichtlich aller untersuchten Parameter ohne statistisch signifikanten Unterschied.

4.2.2. Vergleich der auswärtsrektifizierenden K⁺-Kanäle mit der Literatur

Im Vergleich zu anderen Arbeiten (Strauß *et al.*, 1993; Strauss *et al.*, 1994b; Strauß, 1998; Dey, 1999), die unter vergleichbaren Messbedingungen die K⁺-Leitfähigkeiten an kultivierten RPE-Zellen von Ratte und Mensch analysierten, ließen sich Kaliumströme bei der Untersuchung des Maus-RPE deutlich seltener messen. Wird unter physiologischen Bedingungen die Gesamtmembranleitfähigkeit bei kultiviertem Ratten- und Mensch-RPE im Wesentlichen durch die K⁺-Leitfähigkeit bestimmt, so zeigen jedoch nur 30 % der kultivierten Pigmentepithelzellen der Maus einen entsprechenden Stromfluss. Dies deckt sich mit der in Kap. 4.1. beschriebenen Beobachtung über eine erschwerte Anlage einer Primärkultur bei Maus-RPE Zellen. Zudem lassen Ableitungen am ERG der Maus auf eine volle RPE Ausreifung erst nach etwa 4 Wochen schließen. Es ließe sich somit der hohe Anteil an elektrisch „stummen“ Zellen (etwa 2/3) mit kulturbedingten Reifungsschwierigkeiten erklären. Dafür spricht weiterhin, dass das von o.g. Autoren angewandte Zeitfenster, in dem die Primärkulturen des Ratten-RPE zur elektrophysiologischen Datenerfassung genutzt werden konnten, zwischen dem 5. und 11. Kulturtag lag, während es bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mauskulturen um 1-2 Tage nach hinten verschoben war. Werden nun die gemessenen Parameter der untersuchten Delayed-Rectifier-artigen K⁺-Ströme mit den Daten bei Mensch und Ratte verglichen, so zeigen sich einige Unterschiede, jedoch überwiegend Gemeinsamkeiten in der Stromcharakteristik. Dies könnte dahingehend interpretiert werden, dass die Zellen, die Kaliumströme aufwiesen, letztlich

zu den Zellen gehörten, die sich unter den Kulturbedingungen normal entwickelten. Eine kulturbedingte Reifungsstörung betrifft unter dieser Annahme also nicht die gesamte Kultur im Sinne einer homogenen Verzögerung, sondern bewirkt vielmehr eine Desynchronisation der Zellreifung. Neben einer Mehrheit elektrophysiologisch unreifer RPE-Zellen wachsen solche mit normaler Entwicklung. Dabei sei darauf hingewiesen, dass es morphologisch keine fassbaren Unterschiede zwischen elektrisch reifen und unreifen Zellen gab. Die Anfärbung mit dem intrazellulären β -Tubulin III (siehe Kap. 3.1. und 4.1.) zeigte bei konfluenter Primärkultur ein homogenes Muster, ebenso der immunzytochemische Nachweis der Kv1.3 Untereinheit (siehe Abb. 3.4.). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Unterschiede zwischen Zellen mit und ohne messbaren Strömen nicht auf struktureller Ebene zu suchen sind, sondern wahrscheinlich auf eine gestörte Komposition und Interaktion der einzelnen α - und β -Untereinheiten des Delayed-Rectifier-artigen K^+ -Kanals zurückzuführen sind.

Zur Beschreibung und zum Vergleich von Membranleitfähigkeiten bietet sich die Einheit Stromdichte an. Die gemessene absolute Stromamplitude einer Zelle wird dabei auf die Größe der Zellmembran, die ihren Ausdruck in der Membrankapazität findet, relativiert. Bei Kontrollmäusen beträgt die Stromdichte $1,9 \pm 0,3$ pA/pF ($n=22$), bei Norrie-Mäusen $2,0 \pm 0,4$ pA/pF ($n=14$). In der Literatur findet sich allerdings nur ein Vergleichswert, gemessen am RPE der Ratte (Strauss *et al.*, 2002). Der dort beschriebene Wert von $3,6 \pm 0,3$ pA/pF ($n=4$) ist nahezu doppelt so hoch. Ob dies Spezies-bedingt oder den Kulturbedingungen zuzuschreiben ist, kann ohne weitere Vergleichsdaten mit anderen Spezies nicht endgültig geklärt werden. Ein hypothetischer Erklärungsansatz findet sich jedoch auch beim Vergleich der Membrankapazitäten. Werten von $112,0 \pm 12,5$ pF ($n=22$) bei Norrie- bzw. $114,5 \pm 16,4$ pF ($n=14$) bei Kontrollmäusen steht eine nur etwa halb so große Membrankapazität von $65,6 \pm 6,6$ ($n=62$) beim Ratten-RPE gegenüber. Auch bei RPE-Zellen von Affen und vom Menschen wurden Werte beschrieben, die mit 79 bzw. 75 pF deutlich unter denen bei Mäusen gemessenen liegen (Wen *et al.*, 1993). Beruht dieser Unterschied nun auf eventuell abweichende Verfahren der Membrankapazitätsbestimmung, so könnte man trotz der um den Faktor 2 differenten Stromdichten von ähnlichen Stromamplituden ausgehen. Diese Annahme wird gestützt durch erstaunliche Ähnlichkeiten weiterer gemessener Stromcharakteristika, was für eine normale Reifung der Kaliumkanal-positiven Maus RPE-Zellen-sprechen würde.

Die Aktivierungsschwelle von $-24,0 \pm 2,9$ mV ($n=21$) bei Kontrollmäusen bzw. $-26,0 \pm 3,5$ mV ($n=10$) bei Norrie-Mäusen ist vergleichbar mit dem von Strauss beschriebenen Wert für Ratten-RPE von $-28,8 \pm 1,5$ mV ($n=11$) (Strauß, 1998). Das benutzte Stimulationsprotokoll r50

der Patch-Clamp-Technik lässt allerdings nur eine grobe Angabe der Aktivierungsschwelle zu, da die Zellen in Sprüngen von 10 mV stimuliert werden. Andere Arbeiten beschränken sich von daher bei der Beschreibung des Delayed Rectifiers bei RPE Zellen des Menschen und der Ratte mit der Aussage, dass der Kanal bei Depolarisation auf Werte positiver als -30 mV aktiviert (Strauß *et al.*, 1993; Strauss *et al.*, 1994b; Dey, 1999; Strauss *et al.*, 2002).

Ein weiteres sensitives Stromcharakteristikum bei der Beschreibung von Kanaleigenschaften ist das Aktivierungs- / Inaktivierungsverhalten, welches durch die Zeitkonstante τ Ausdruck findet. K^+ -Kanäle der Delayed-Rectifier-Familie aktivieren verzögert und langsam. Die nach dem Hodgkin-Huxley n^2 Model berechneten τ -Werte betragen $7,7 \pm 1,1$ ms ($n=15$) für Kontrolltiere und $6,8 \pm 1,1$ ms ($n=11$) für Norriemäuse und sind vergleichbar mit dem τ -Wert für Ratten-RPE von $8,0 \pm 0,8$ ms ($n=5$). Eine typische Eigenschaft von Delayed-Rectifier-Kanälen am Säugetier-RPE ist die fehlende Inaktivierung. Für den Zeitraum der Stimulation (50 ms) und darüber hinaus (bis zu 1 s) (Strauss *et al.*, 1994b) lässt sich am RPE von Mensch, Ratte, Rhesusaffe und Kaninchen keine Inaktivierung nachweisen (Strauß *et al.*, 1993; Wen *et al.*, 1993; Strauss *et al.*, 1994b; Tao *et al.*, 1994; Strauß, 1998; Dey, 1999; Strauss *et al.*, 2002). Alle im Rahmen dieser Arbeit gemessenen auswärtsrektifizierenden K^+ -Ströme am RPE der Maus teilen diese Eigenschaft.

Strauss *et al.* (Strauss *et al.*, 2002), Dey (Dey, 1999) und Beninde (Beninde, 2002) haben intensiv die Regulation des Delayed-Rectifiers am RPE der Ratte untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass den Tyrosinkinasen bei der Aktivitätssteuerung der Kanäle eine zentrale Bedeutung beikommt (Wimmers *et al.*, 2007). Extrazelluläre Applikation verschiedener Tyrosinkinasenblocker wie Herbimycin A, Lavendustin A und Genistein führte zu einer Inhibition des Delayed-Rectifier-Stromes. Letztere Substanz zeigte dabei die höchste Potenz. Der Effekt der Tyrosinkinasehemmung steht unter dem Einfluss der Aktivität der Serin/Threoninkinase PKC, wie von Strauss (Strauss *et al.*, 2002) und Beninde (Beninde, 2002) gezeigt werden konnte. Eine isolierte pharmakologische Beeinflussung der PKC scheint ohne Auswirkung auf den Delayed-Rectifier-artigen Strom zu sein. Hingegen kehrt sich unter PKC-Stimulation mittels Phorbolster-Vorinkubation der Hemmeffekt von Genistein auf den Delayed-Rectifier in eine Aktivitätszunahme des Kanals um. Hemmung der PKC durch Chelerythrin führte indes bei nachfolgender Genistein-Applikation zu der erwarteten Abnahme der Stromamplitude. Im Rahmen der in dieser Arbeit eher breit angelegten vergleichenden Analyse von Knockout- und Kontrollmäusen beschränkte sich die Untersuchung der Kanalregulation auf die Tyrosinkinaseblockade durch Genistein. Genistein ($50 \mu\text{M}$) hemmte den Ausgangsstrom bei

Wildtyp-Mäusen (WT) auf $44,5 \pm 3,7$ % (n=4). Reversibilität des Effektes war beim Auswaschen durch ein recovery auf $82,8 \pm 21,0$ % (n=3) gegeben. Bei Norrie-Maus RPE Zellen wurden die maximalen Strommaxima auf $20,1 \pm 10,0$ % gehemmt (n=5) ($61,5 \pm 20,0$ % recovery nach Auswaschen, n=4). Damit konnte gezeigt werden, dass Delayed-Rectifier-artige K^+ -Ströme am RPE von Mäusen analog zum RPE von Ratten durch Tyrosinkinasen reguliert werden.

4.2.3. Einwärtsrektifizierende K^+ -Kanäle am RPE von Norrie- und Kontrollmäusen

Im Vergleich zu den im vorangegangenen Kapitel beschriebenen auswärtsrektifizierenden K^+ -Kanälen waren einwärtsrektifizierende Kanäle deutlich seltener, d.h. bei nur etwa 5% der Zellen, abzuleiten. Unter diesen Umständen war eine systematische Erfassung und Beschreibung des Inward-Rectifiers an Kontrollmäusen nicht in vollem Umfang möglich. Am RPE von Norrie-Mäusen waren durch Hyperpolarisation ausgelöste Einwärtsströme noch seltener zu messen. Dadurch erfährt der direkte Vergleich dieser K^+ -Kanäle zwischen Norrie- und Kontrollmäusen eine geringe Gewichtung.

Die Einwärtsströme wurden unter physiologischen Ionenverhältnissen in Bad- und Pipettenlösung durch Hyperpolarisationsprünge des r50 Stimulationsprotokolls ausgelöst und anhand ihrer Charakteristik als Inward Rectifier-Kanäle identifiziert. Wird normalerweise bei der Messung von Kaliumkanälen das Stimulationsprotokoll vom geschätzten Ruhepotential aus gestartet, so zeigten diese Kanäle eine Zunahme ihrer Leitfähigkeit bei einer hyperpolarisierenden Versetzung des Haltepotentials. Wurden die Zellen vor dem Stimulationsprotokoll auf ein Haltepotential von -70 mV geklemmt, so zeigte sich annähernd eine Verdoppelung der maximalen Stromamplituden im Vergleich zum Ausgangshaltepotential von -45 mV. Den einwärtsrektifizierenden K^+ -Strömen wird eine entscheidende Bedeutung bei der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials beigemessen (Strauß, 1998). Die beim Maus RPE gemessenen Werte von $-37,6 \pm 3,5$ mV (n=7) bei Kontroll- und $-40,0 \pm 6,9$ mV (n=7) bei Norrie-Mäusen sind jedoch weit positiver als das zu errechnende Nernst-Potential für K^+ unter physiologischen Bedingungen, welches bei -88 mV liegt, eine Beobachtung, die auch von anderen Autoren beschrieben wurde und ursprünglich durch Leckströme unspezifischer Kationenkanäle erklärt wurde (Kusaka *et al.*, 2001). Des Weiteren sind Inward-Rectifier-Kanäle an der Volumenregulation des subretinalen Raumes beteiligt (Strauss, 2005; Wimmers *et al.*, 2007). An der apikalen Membranseite des RPE kommt es zu einem konstanten Influx von K^+ -

Ionen via Na^+/K^+ ATPase und $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ Co-Transporter aus dem subretinalen Spalt in die RPE-Zellen, dieses K^+ wird wiederum mittels der Inward-Rectifier Kanäle recycelt (la Cour *et al.*, 1986; Wimmers *et al.*, 2007). Funktionell gekoppelt mit diesem Recycling- K^+ -Fluss sind Chloridströme (Bialek *et al.*, 1994), die Wasservolumenverschiebungen bewirken (Huang *et al.*, 1992). Diese Kalium- und Chloridströme verschieben ihre Richtung in Bezug auf Retina und Choroidea in einem Licht-/Dunkel-Rhythmus (Bialek *et al.*, 1994; Wimmers *et al.*, 2007).

4.2.4. Vergleich der einwärtsrektifizierenden K^+ -Kanäle mit der Literatur

Waren Inward-Rectifier K^+ -Kanäle im Rahmen dieser Arbeit an kultivierten Maus-RPE-Zellen nur sehr selten zu erfassen (<5%), so beschrieben diverse Autoren an RPE-Zellen von anderen Spezies wesentlich häufigere Präsentationen. Bei den von Strauss *et al.* (Strauss *et al.*, 1994b) untersuchten kultivierten Ratten-RPE-Zellen waren diese Ströme bei etwa 30% , bei Tao *et al.* (Tao *et al.*, 1994) an kultivierten Kaninchen-RPE-Zellen bei etwa 40% der Zellen zu messen. Hughes und Takahira (Hughes *et al.*, 1998) konnten bei dem von ihnen untersuchten Rinder-RPE sogar bei allen Zellen Inward-Rectifier-Kanäle nachweisen. Allerdings wurden für diese Experimente ausschließlich frisch isolierte Zellen und keine Primärkultur verwendet.

4.3. Ca^{2+} -Kanäle

4.3.1. L-Typ Ca^{2+} -Kanäle am RPE von Norrie- und Kontrollmäusen

Unter K^+ -freien Bedingungen konnten an kultivierten RPE-Zellen in Gegenwart von 10 mM BaCl Einwärtsströme gemessen werden, die sich aufgrund ihrer Kinetik und Dihydropiridinsensitivität als Ströme durch L-Typ Ca^{2+} -Kanäle identifizieren ließen. Der immunzytochemische Nachweis der α_{1D} -subunit (Kap. 3.3.2.) bestätigte die Identität des Ca^{2+} -Kanals. Um die für eine uneingeschränkte Funktion der Kanäle nötige intakte Zusammensetzung intrazellulärer Substanzen wie Enzymen und ATP zu gewährleisten, wurde die Nystatin Perforated-Patch-Konfiguration angewandt (Verheijck, 1998; Rosenthal *et al.*, 2001). Interessanterweise war die Hemmung des L-Typ Ca^{2+} -Kanals durch Nifedipin nicht komplett. Dieses Phänomen der verringerten Nifedipin-Sensitivität wurde als charakteristisch für L-Typ Ca^{2+} -Kanäle des $\text{Ca}_v1.3$ am RPE der Ratte beschrieben (Rosenthal *et al.*, 2002). Auch entspricht

der in dieser Arbeit gezeigte Zusammenhang zwischen Tyrosinkinaseaktivität und Leitfähigkeit des L-Typ Ca^{2+} -Kanals einer typischen Charakteristik dieses Kanals sowohl am RPE als auch an den Haarzellen des Innenohres (Mergler *et al.*, 1998; Michna *et al.*, 2003). Die Identität des L-Typ Ca^{2+} -Kanals an den hier gemessenen RPE-Zellen der Maus konnte daher mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit bewiesen werden. Die Funktion des L-Typ-Kalziumkanals am RPE ist eng verwoben mit der Regulation von Sekretion von Wachstumsfaktoren am RPE (Rosenthal *et al.*, 2007) sowie der Kontrolle der Phagozytosefunktion des RPE in vivo (Muller *et al.*, 2014) als auch in vitro (Karl *et al.*, 2008). Im mit elektrophysiologischen Methoden erhobenen Vergleich zwischen RPE-Zellen von Kontroll- und Norrie-Mäusen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Dies stellt einen deutlichen Kontrast dar zu den bei RPE-Zellen von RCS-Ratten als Modell für Retinitis pigmentosa gezeigten Unterschieden sowohl in der Leitfähigkeit von Ca^{2+} -Kanälen als auch in deren Regulation (Strauß *et al.*, 1997; Mergler, 1998; Mergler *et al.*, 1998).

4.3.2. Vergleich der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle mit der Literatur

Kalziumkanäle am RPE haben in den letzten Jahren eine besonders umfassende elektrophysiologische Charakterisierung erfahren, insbesondere nach der Beschreibung von erhöhten Kalzium-Leitfähigkeiten am RPE von RCS-Ratten, einem Retinitis pigmentosa-Modell (Ueda *et al.*, 1993; Mergler *et al.*, 1998). In folgenden Studien konnte eine ähnliche Leitfähigkeitszunahme auch an menschlichen RPE-Zellen detektiert werden, die von Operationsmaterial von Patienten mit altersabhängiger Makula-Degeneration stammten (Rosenthal *et al.*, 2007). Spannungsabhängige Kalziumkanäle wurden am RPE zuerst an frisch isolierten Zellen von Mensch, Affe, und Ratte nachgewiesen (Ueda *et al.*, 1993; Ueda *et al.*, 1995), es folgten zahlreiche Studien an kultivierten RPE-Zellen vor allem der Ratte (Mergler *et al.*, 2002; Rosenthal *et al.*, 2002; Reichhart *et al.*, 2014). Die Grundcharakteristik der durch L-Typ Ca^{2+} -Kanal vermittelten Leitfähigkeiten erscheint dabei vergleichbar mit den in dieser Arbeit beschriebenen Daten und publizierten Werten. Die Stromdichte betrug bei Kontrollmäusen und Norrie-Mäusen $1,2 \pm 0,1$ pA/pF bzw. $1,1 \pm 0,1$ pA/pF. Bei frisch isolierten humanen RPE-Zellen wurden $1,9 \pm 0,6$ pA/pF beschrieben (Rosenthal *et al.*, 2007), bei kultivierten Ratten-RPE-Zellen $1,4 \pm 0,1$ pA/pF (N = 20) (Rosenthal, 2000). Die Leitfähigkeiten des L-Typ Ca^{2+} -Kanals bei Mäusen ähnelten demzufolge den an RPE-Zellen von anderen Spezies beschriebenen Werten. Einen deutlichen Unterschied zeigte allerdings der Vergleich der

Inaktivierungskinetik der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle von Maus RPE mit RPE von anderen Spezies. Die Inaktivierungszeitkonstante τ bei Kontroll- und Norrie-Mäusen lag bei $8,4 \pm 1,5$ ms bzw. $8,3 \pm 1,5$ ms. Bei Ratten-RPE wurden jedoch wesentlich langsamere Inaktivierungen um 160 ms beschrieben (Rosenthal, 2000), beim Menschen RPE-Werte um 54 ms (Rosenthal *et al.*, 2007). Einen möglichen Erklärungsansatz bieten beschriebene Splicing-Varianten des $\text{Ca}_v1.3$ am RPE (Michna *et al.*, 2003; Wimmers *et al.*, 2008).

4.4. Cl-Kanäle

4.4.1. Cl-Kanäle am RPE von Norrie- und Kontrollmäusen

Bisher sind an ruhenden RPE-Zellen kaum Cl^- -Leitfähigkeiten nachgewiesen worden (Strauss *et al.*, 1996). Das in der Literatur beschriebene Ableiten von Chloridkanälen ist normalerweise an eine Aktivierung bestimmter intrazellulärer Mechanismen und Signaltransduktionskaskaden gebunden. So lassen sich Cl^- -Ströme aktivieren durch Zellschwellung in hypotoner Badlösung (Botchkin *et al.*, 1993; Hughes *et al.*, 1993), durch Aktivierung des Ca^{2+} /Inositol-1,4,5-Triphosphat Second-Messenger-Systems oder durch Ca^{2+} -unabhängige PKC-vermittelte Phosphorylierung (Strauss *et al.*, 1996).

Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit in erster Linie bei der Analyse von Kalium- und Kalziumströmen sowie dem Vergleich dieser Leitfähigkeiten zwischen Kontroll- und Knockout-Mäusen lag, wurden bei der Planung der Experimente o.g. Aktivierungsmechanismen nicht mit aufgenommen. Um so bemerkenswerter erscheint vor diesem Hintergrund, dass im Rahmen der Untersuchung der Ca^{2+} -Leitfähigkeit unter K^+ -freien Bedingungen bei etwa 10% der Zellen Auswärtsströme registriert wurden, die aufgrund ihrer reversiblen Blockierbarkeit durch 1 mM DIDS und ihrer Kinetik als Chloridkanäle identifiziert wurden. Wie bei den in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Ionenkanälen ergaben sich auch bei den Cl^- -Strömen beim Vergleich Kontroll- zu Norrie-Maus keine statistisch signifikanten Unterschiede der gemessenen Parameter.

Wie in Kapitel 4.2.3. im Rahmen der Funktion der Inward-Rectifier-Kanäle beschrieben, sind Chloridkanäle essentiell für die Volumenregulation und den Wassertransport (Strauss, 2005; Wimmers *et al.*, 2007). Am intakten RPE sind Chloridkanäle überwiegend an der basolateralen Membran zu lokalisieren (Joseph *et al.*, 1991). Chloridkanäle wurden elektrophysiologisch am RPE von mehreren Spezies beschrieben, unter anderem von Ratte (Ueda *et al.*, 1994; Strauss *et*

al., 1996), Rind (Miller *et al.*, 1990; Bialek *et al.*, 1994), Frosch (Hughes *et al.*, 1993; Edelman *et al.*, 1994) und Mensch (Weng *et al.*, 2002). Obwohl der Chloridleitfähigkeit eine essentielle Funktion beim Elektrolyt- und Flüssigkeitstransport am RPE zukommt, zeigten bisherige Patch-Clamp-Studien, dass Chloridkanäle an ruhenden RPE-Zellen im Vergleich zu frisch isolierten Zellen nur selten abgeleitet werden können (Strauss *et al.*, 1998a). Dies entspricht der Situation an den in dieser Arbeit verwendeten Maus-RPE-Zellen.

4.5. Beurteilung des Vergleiches Norrie- zu Kontrollmaus

Zentraler Gegenstand dieser Arbeit war neben der Erstbeschreibung der elektrophysiologischen Grundeigenschaften kultivierter RPE-Zellen der Maus die vergleichende Analyse dieser Parameter zwischen Kontrollmaus und einem Knockout-Mausmodell mit Norrie Disease. Ziel dabei war es, mögliche Veränderungen der Leitfähigkeiten oder Kanalcharakteristika des RPE bei der Erkrankung zu erfassen. Der Experimentieransatz entstand unter Berücksichtigung von 2 Punkten:

1. Die Beschreibung von pathologisch-morphologischen Veränderungen des RPE bei der Norrie-Maus.
2. Die Veränderungen der elektrischen Eigenschaften des RPE bei der RCS-Ratte, einem Tiermodell für die hereditäre Augenerkrankung Retinitis pigmentosa.

Zu Punkt 1:

Unter den 6 bis zur Durchführung oder während dieser Arbeit veröffentlichten Publikationen, die sich mit der Knockout-Maus mit Norrie Disease befassten (Berger *et al.*, 1996; Ruether *et al.*, 1997; Berger, 1998; Richter *et al.*, 1998; Lenzner *et al.*, 2002; Rehm *et al.*, 2002) waren zwei Abhandlungen für die Planung der Experimente von besonderer Wichtigkeit. Berger und Mitarbeiter stellten 1996 die erfolgreiche Ausschaltung des Norrie-Genproduktes mittels Knockout-Technik an der Maus vor und analysierten die ophthalmo-pathologischen Befunde der erkrankten Tiere (Berger *et al.*, 1996). Obwohl die Veränderungen in der Retina dominierten (v.a. gestörte Anlage der gesamten Ganglienzellschicht und Regionen mit geschädigter innerer und äußerer Körnerschicht) wurden auch Anomalitäten im Bereich des RPE beschrieben. Insbesondere in den stark betroffenen Bereichen kam es zum Verlust der

Photorezeptoraußenglieder und einer Hyperpigmentierung der Pigmentepithelschicht. Ruether et al. verglichen Norrie- und Kontrollmäuse mit Hilfe des Ganzfeld-Elektroretinogramms (ERG) und der Laser Scan Ophthalmoskopie (Ruether *et al.*, 1997). Männliche Mäuse mit defektem Norrie-Gen zeigten dabei deutliche Veränderungen des ERGs im Vergleich zu Kontrollmäusen. Unter den Befunden sticht eine starke Abnahme der Amplitude der B-Welle besonders hervor. Diese wird normalerweise durch Erregungen der Müller- und Horizontalzellen als Antwort auf einen Lichtreiz hervorgerufen. Die ERG-Befunde sprechen demzufolge eher für eine Schädigung der inneren Retinaschichten. Demgegenüber beschrieben die Autoren durch Ophthalmoskopie erfasste Veränderungen der retinalen Gefäße und des RPE. Zusammengefasst rechtfertigten die zum damaligen Zeitpunkt veröffentlichten Untersuchungen zur Norrie-Maus durchaus einen Vergleich kultivierter retinaler Pigmentepithelzellen.

Zu Punkt 2:

Die RCS-Ratte ist ein intensiv untersuchtes Tiermodell für eine hereditäre Netzhautdystrophie, die der Retinitis pigmentosa beim Menschen vergleichbar ist (Bourne *et al.*, 1938; Voaden, 1988). Obwohl der wahrscheinlich zugrundeliegende Gendefekt über lange Zeit unbekannt war, konnte durch wachsendes Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge die Auswahl an möglichen Kandidatengenomen immer weiter eingeschränkt werden. D'Cruz et al. beschrieben 2000 einen Gendefekt im Bereich des „retinal dystrophy locus“, eine Deletion im Gen für die Rezeptortyrosinkinase *Mertk*, als die möglicherweise den RCS-Phänotyp bedingende Mutation (D' Cruz *et al.*, 2000). Der Untergang der Photorezeptoren wird durch eine gestörte Funktion des RPE hervorgerufen. Dieses ist durch eine defekte Regulation der Photorezeptor-spezifischen Phagozytose nicht mehr in der Lage, Rezeptor-gebundene Außensegmente aufzunehmen und zu verwerten (Chaitin *et al.*, 1983). Maßgeblich beteiligt an der Regulation der Phagozytose sind das IP_3/Ca^{2+} - und das cAMP-„second messenger“-System. Ein IP_3 -Anstieg in den RPE Zellen führt zum Einsetzen der Phagozytose der gebundenen Außensegmente, hingegen bewirken ein Ca^{2+} -Anstieg und die konsekutive Aktivierung der Proteinkinase C einen Stopp dieses Vorganges. In RCS-Ratten ist dieses Zusammenspiel gestört (Heth *et al.*, 1992; Heth *et al.*, 1994). Auch der hemmende Einfluss von cAMP auf die Phagozytose ist bei der RCS-Ratte verändert (Hall *et al.*, 1993; Nash *et al.*, 1995). Strauß und Wienrich beschrieben 1993 eine vermutlich durch L-Typ Ca^{2+} -Kanäle bedingte deutlich erhöhte Ca^{2+} -Leitfähigkeit in kultivierten RPE-Zellen der RCS-Ratte, was zu einer verstärkten Hemmung der Phagozytose führt (Strauss *et al.*, 1993). Die Regulation der Ca^{2+} -Kanäle durch Proteinkinasen scheint dabei ebenfalls gestört zu sein (Mergler, 1998). Diese pathophysiologischen Zusammenhänge spielten bei der Planung

dieser Arbeit keine geringe Rolle, obwohl sich Norrie-Maus und RCS-Ratte bezüglich Gendefekt und Pathologie deutlich voneinander unterscheiden. Dabei war insbesondere die Beobachtung von Bedeutung, dass eine Retinadegeneration auf eine gestörte Retina-RPE-Interaktion zurückgeführt werden kann, die mit elektrophysiologischen Veränderungen des RPE einhergeht.

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln ausführlich beschrieben, konnte im Rahmen dieser Studie bei keinem der erfassten Parameter ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Zwei grundlegende Erklärungsansätze sind dabei zu diskutieren. Erstens, das Gen für das Norrie Disease-Protein NDP wird in RPE-Zellen nicht exprimiert und/oder zweitens, die gewählten Methoden erwiesen sich für eine Erfassung der Folgen des Gendefekts als ungeeignet. Die zum Zeitpunkt der experimentellen Durchführung dieser Arbeit veröffentlichten Arbeiten zum Expressionsmuster des Norrie Disease-Gens beschränkten sich auf die Darstellung der mRNA-Verteilung (Berger *et al.*, 1996; Berger, 1998; Bernstein *et al.*, 1998; Hartzler *et al.*, 1999). In Ermangelung eines geeigneten spezifischen Antikörpers blieb die Frage nach der Verteilung des Norrie-Proteins damals unbeantwortet. Bezüglich des RPE kamen die Autoren zu unterschiedlichen Ergebnissen: Während Hartzler *et al.* (1999) bei der Vorstellung ihrer durch *in situ* Hybridisierung gewonnenen Daten das RPE nicht erwähnen und den Bereich der Photorezeptor-Außensegmente als nicht markiert beschreiben, schlossen Bernstein und Wong (1998) in der Diskussion ihrer Northern-Blot-Analyse das RPE als Norrie-Gen-exprimierendes Gewebe mit ein. Die Frage, ob das Norrie-Gen im RPE exprimiert wird und damit möglicherweise die Funktion der Zellen beeinflusst, blieb damals offen. Konsistent zeigten jedoch alle Arbeiten, dass sowohl die Genexpression als auch die pathologischen Veränderungen am stärksten in den inneren Schichten der Retina ausgeprägt sind. Eine mögliche Funktionsstörung des RPE schloss dies jedoch nicht aus. So ist als Folge der beschriebenen Retina-Ablösungen die symbiontische Interaktion der Retina-RPE-Verzahnung unterbrochen und damit u.a. die trophische Funktion des RPE gestört (Berger *et al.*, 1996). Es wurden bei der vorliegenden Arbeit RPE-Zellen von Kontroll- und Norrie-Maus untersucht und verglichen. Die dabei angewandte Methode war die Patch-Clamp-Technik. Die Daten, die mittels Immunzytochemie gewonnen wurden, dienten vor allem der Identifizierung der K⁺- und Ca²⁺-Kanäle und entzogen sich durch ihren nicht-quantitativen Charakter einer vergleichenden Fragestellung. Die Patch-Clamp-Technik ermöglicht durch vielfältige Variationen der Messbedingungen die umfassende Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften einer Zelle. Diese hängen wiederum von der Komposition und dem Funktionszustand der jeweiligen Ionenkanäle, Rezeptoren und „second messenger“-Systeme im speziellen und der Intaktheit der Zellmembran im Allgemeinen ab. Das Experimentdesign war so angelegt, dass ein möglichst

breites Spektrum an Basisparametern zur Leitfähigkeitscharakterisierung der RPE-Zelle erfasst werden konnte. Aufgrund der sich gleichenden Daten von Norrie- und Kontrollmaus lässt sich daher annehmen, dass die Ausschaltung des Norrie Disease-Proteins auf die generellen elektrischen Eigenschaften von kultivierten retinalen Pigmentepithelzellen zumindest in dem frühen Alter der Versuchstiere keine Auswirkungen hat. Diese negativen Ergebnisse wurden durch spätere Studien unterstützt, zum Beispiel zeigte sich in einer Langzeitstudie zum Expressionsmuster bei Norrie-Mäusen, dass Veränderungen in einer Vielzahl Photorezeptor-assoziiierter Gene erst bei 2 Jahre alten Mäusen voll zur Ausprägung kommen (Lenzner *et al.*, 2002). Außer der Ansammlung von Photorezeptor-assoziierten Genveränderungen wurde in einer weiteren späteren Studie eine deutliche Zunahme von bestimmten endothelialen Proteinen (Plvap) beschrieben, mit einhergehenden funktionellen Störungen der Gefäßpermeabilität retinaler Blutgefäße (Schafer *et al.*, 2009).

4.6. Bedeutung der Datenerfassung am Maus RPE

Mit dieser Arbeit werden erstmalig Patch-Clamp-Daten vorgestellt, die vom retinalen Pigmentepithel der Maus gemessen wurden. Dabei kommt der Maus als Versuchstier eine größere Bedeutung zu als nur eine Erweiterung des Speziespektrums. Das Etablieren der Transgenesis und der Knockout-Technik ließ die Maus zu dem wichtigsten Tiermodell des Säugetierspektrums der Gegenwart werden. Das RPE einer Vielzahl von Spezies wurde in unterschiedlichem Ausmaß elektrophysiologisch untersucht. Die meisten Abhandlungen dienten dabei der Beschreibung physiologischer Kanaleigenschaften und Membranleitfähigkeiten *in vitro* bei frisch isolierten oder kultivierten Zellen. Einige Arbeiten versuchten jedoch auch, die Rolle des RPE bei pathologischen Prozessen des Sehapparates zu beleuchten. Ein weiterer Schwerpunkt der letzten Jahre war die Untersuchung zur Regulation der Kanalaktivitäten und die mögliche kausale Verknüpfung mit krankhaften Prozessen am RPE/Retina-System. Beides trat in den Fokus bei der Untersuchung der in Kapitel 4.5. diskutierten RCS-Ratte als Tiermodell für Retinitis pigmentosa. Die Einführung der Maus als weitere Gattung in den Kreis der bisher benutzten Spezies eröffnet für die Erforschung der Funktion des RPE und der möglichen Beteiligung an pathologischen Prozessen bedeutende Perspektiven. Bisher bestehenden Unklarheiten physiologischer Sachverhalte könnten intensiv nachgegangen werden. So gibt es beispielsweise bei den Delayed-Rectifier-artigen K^+ -Kanälen bisher lediglich hypothetische Erklärungsansätze für die beobachtete Diskrepanz zwischen den Eigenschaften der reinen porenbildenden Subunits im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyte und den in

natürlichen Systemen vorkommenden Kanälen. Ob, wie vermutet, dies durch den modulierenden Einfluss der β -subunit bedingt ist, könnte zum Beispiel am Modell einer Knockout-Maus beleuchtet werden. Auch werden zukünftige elektrophysiologische Studien am Maus RPE zur Bestätigung oder Korrektur der in dieser Arbeit vorgestellten Grundcharakterisierung beitragen. Insbesondere die Beschreibung der Inward-Rectifier-Kanäle und der Chloridkanäle bedürfen in Anbetracht der geringen Fallzahl einer Validierung.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Erstbeschreibung der elektrophysiologischen Charakteristik von kultivierten RPE-Zellen der Maus und der vergleichenden Untersuchung dieses Epithels bei Wildtyp-Mäusen und Mäusen mit Norrie-Gendefekt. Die zentralen Ergebnisse daraus lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Das RPE-Gewebe der Maus ist grundsätzlich kultivierbar für in vitro Versuche und zeigte eine ähnliche Morphologie wie RPE-Kulturen von Augen von der Ratte, vom Rind und vom Menschen.
2. Die RPE-Zellen zeigten ein positives Signal für das class III β -Tubulin in immunzytochemischer Färbung.
3. Die elektrophysiologischen Experimente ergaben eine funktionelle Expression von K^+ -Kanälen, Cl^- -Kanälen, und Ca^{2+} -Kanälen.
4. Das Ruhemembranpotential im Bereich von 37 - 40 mV lag in einem dem Ratten-RPE vergleichbaren Bereich.
5. Der dominante K^+ -Kanal zeigte eine Charakteristik, die dem des zuvor bei RPE Zellen von anderen Spezies beschriebenen auswärtsgerichteten Delayed-Rectifier-artigen K^+ -Kanal entsprach.
6. Der Delayed-Rectifier-artige Kanal zeigte sich durch Tyrosinkinasen reguliert.
7. Etwa 5% der Zellen zeigten einen K^+ -Einwärtsstrom, der von seiner elektrophysiologischen Charakteristik dem an RPE von anderen Spezies beschriebenen Inward-Rectifier K^+ -Kanal entsprach.
8. Unter K^+ -freien Bedingungen ließen sich Ca^{2+} -Kanäle ableiten, die sich Dihydropyridin-sensitiv erwiesen und im Gesamtbild mit Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik und Nachweis der α_{1D} -Untereinheit als L-Typ Ca^{2+} -Kanäle identifiziert werden konnten.
9. Analog zum Delayed-Rectifier-artigen K^+ -Kanal zeigte sich auch der L-Typ Ca^{2+} -Kanal unter Regulationskontrolle von Tyrosinkinasen, die durch Genistein gehemmt werden konnten.
10. Auswärtsströme unter K^+ -freien Bedingungen konnten durch ihre DIDS-Sensitivität als Cl^- -Ströme identifiziert werden.
11. Im Vergleich zwischen elektrophysiologischen Messungen an RPE Zellen von Wildtyp- und Norrie-Mäusen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied erfasst werden.

6. Referenzen

Aidley DJ (1998). *The Physiology of Excitable Cells*. 4 edn. Cambridge University Press.

Arrindell EL, McKay BS, Jaffe GJ, Burke JM (1992). Modulation of potassium transport in cultured retinal pigment epithelium and retinal glial cells by serum and epidermal growth factor. *Exp Cell Res* 203: 192-197.

Battinelli EM, Boyd Y, Craig IW, Breakefield XO, Chen ZY (1996). Characterization and mapping of the mouse NDP (Norrie disease) locus (Ndp). *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 7: 93-97.

Bazan NG, Gordon WC, Rodriguez de Turco EB (1992). Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process. *Advances in experimental medicine and biology* 318: 295-306.

Bean BP (1989). Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 51: 367-384.

Beninde J (2002). *Einfluss der Proteinkinase C auf die Tyrosinkinase-abhängige Aktivierung des Delayed Rectifier Kaliumkanals am retinalen Pigmentepithel der Ratte*. edn. Medizinische Dissertation, Fachbereich Humanmedizin, Freie Universität Berlin.

Berger W (1998). Molecular dissection of Norrie disease. *Acta Anat (Basel)* 162: 95-100.

Berger W, van de Pol D, Bachner D, Oerlemans F, Winkens H, Hameister H, *et al.* (1996). An animal model for Norrie disease (ND): gene targeting of the mouse ND gene. *Human molecular genetics* 5: 51-59.

Berger W, Meindl A, van de Pol TJ, Cremers FP, Ropers HH, Doerner C, *et al.* (1992). Isolation of a candidate gene for Norrie disease by positional cloning. *Nat Genet* 2: 84.

Bernstein SL, Wong P (1998). Regional expression of disease-related genes in human and monkey retina. *Molecular vision* 4: 24.

Bialek S, Miller SS (1994). K⁺ and Cl⁻ transport mechanisms in bovine pigment epithelium that could modulate subretinal space volume and composition. *The Journal of physiology* 475: 401-417.

Black G, Redmond RM (1994). The molecular biology of Norrie's disease. *Eye* 8: 491-496.

Bok D (1985). Retinal photoreceptor-pigment epithelium interactions. Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1659-1694.

Bok D (1993). The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl* 17: 189-195.

Bonilha VL (2014). Retinal pigment epithelium (RPE) cytoskeleton in vivo and in vitro. *Experimental eye research* 126: 38-45.

- Bosch E, Horwitz J, Bok D (1993). Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: phagosome-lysosome interaction. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 41: 253-263.
- Bosl MR, Stein V, Hubner C, Zdebik AA, Jordt SE, Mukhopadhyay AK, *et al.* (2001). Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl(-) channel disruption. *The EMBO journal* 20: 1289-1299.
- Botchkin LM, Matthews G (1993). Chloride current activated by swelling in retinal pigment epithelium cells. *Am J Physiol* 265: C1037-1045.
- Bourne MC, Campbell DA, Tansley K (1938). Hereditary degeneration of rat retina. *Br J Ophthalmol* 22: 613-623.
- Catterall WA (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annual review of biochemistry* 64: 493-531.
- Catterall WA (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annual review of cell and developmental biology* 16: 521-555.
- Chaitin MH, Hall MO (1983). Defective ingestion of rod outer segments by cultured dystrophic rat pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 812-820.
- Chandy KG, Gutman GA (1993). Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends in pharmacological sciences* 14: 434.
- Chen ZY, Denney RM, Breakefield XO (1995). Norrie disease and MAO genes: nearest neighbors. *Human molecular genetics* 4 Spec No: 1729-1737.
- Chen ZY, Hendriks RW, Jobling MA, Powell JF, Breakefield XO, Sims KB, *et al.* (1992). Isolation and characterization of a candidate gene for Norrie disease. *Nat Genet* 1: 204-208.
- Chen ZY, Battinelli EM, Hendriks RW, Powell JF, Middleton-Price H, Sims KB, *et al.* (1993). Norrie disease gene: characterization of deletions and possible function. *Genomics* 16: 533-535.
- Christie MJ (1995). Molecular and functional diversity of K⁺ channels. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 22: 944-951.
- Clevers H (2004). Wnt signaling: Ig-norrin the dogma. *Current biology : CB* 14: R436-437.
- D' Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, *et al.* (2000). Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Mol Genet* 9: 645-651.
- Daiger SP, Sullivan LS, Bowne SJ (2013). Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clinical genetics* 84: 132-141.
- Defoe DM, Adams LB, Sun J, Wisecarver SN, Levine EM (2007). Defects in retinal pigment epithelium cell proliferation and retinal attachment in mutant mice with p27(Kip1) gene ablation. *Molecular vision* 13: 273-286.

- Deng C, Reddy P, Cheng Y, Luo CW, Hsiao CL, Hsueh AJ (2013). Multi-functional norrin is a ligand for the LGR4 receptor. *Journal of cell science* 126: 2060-2068.
- Dey D (1999). *Auswirkung der Blockade von Tyrosinkinase auf K⁺- und Kationen-Ströme am retinalen Pigmentepithel der Ratte*. edn. Medizinische Dissertation, Fachbereich Humanmedizin, Freie Universität Berlin.
- Donnai D, Mountford RC, Read AP (1988). Norrie disease resulting from a gene deletion: clinical features and DNA studies. *Journal of medical genetics* 25: 73-78.
- Drenser KA, Fecko A, Dailey W, Trese MT (2007). A characteristic phenotypic retinal appearance in Norrie disease. *Retina* 27: 243-246.
- Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2002). X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415: 287-294.
- Edelman JL, Lin H, Miller SS (1994). Acidification stimulates chloride and fluid absorption across frog retinal pigment epithelium. *Am J Physiol* 266: C946-956.
- Edwards G, Weston AH (1997). Voltage-gated ion channels. In: Davis RW, Morris BJ (eds). *Molecular Biology of the Neuron*, edn. p^{pp}.
- Edwards MM, Marin de Evsikova C, Collin GB, Gifford E, Wu J, Hicks WL, *et al.* (2010). Photoreceptor degeneration, azoospermia, leukoencephalopathy, and abnormal RPE cell function in mice expressing an early stop mutation in CLCN2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 3264-3272.
- Edwards RB (1977). Culture of rat retinal pigment epithelium. *In Vitro* 13: 301-304.
- Edwards RB, Adler AJ (2000). IRBP enhances removal of 11- cis -retinaldehyde from isolated RPE membranes. *Experimental eye research* 70: 235-245.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, *et al.* (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25: 533-535.
- Finnemann SC (2003). Role of alpha5 beta1 integrin in regulating phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *Advances in experimental medicine and biology* 533: 337-342.
- Fox JA, Steinberg RH (1992a). Voltage-dependent currents in isolated cells of the turtle retinal pigment epithelium. *Pflüger's Archives* 402: 451-460.
- Fox JA, Steinberg RH (1992b). Voltage-dependent currents in isolated cells of the turtle retinal pigment epithelium. *Pflüger's Archiv : European journal of physiology* 420: 451-460.
- Frambach DA, Roy CE, Valentine JL, Weiter JJ (1989). Precocious retinal adhesion is affected by furosemide and ouabain. *Curr Eye Res* 8: 553-556.
- Gal A, Wieringa B, Smeets DF, Bleeker-Wagemakers L, Ropers HH (1986). Submicroscopic interstitial deletion of the X chromosome explains a complex genetic syndrome dominated by Norrie disease. *Cytogenetics and cell genetics* 42: 219-224.

- Gallemore RP, Steinberg RH (1989). Effects of DIDS on the chick retinal pigment epithelium. II. Mechanism of the light peak and other responses originating at the basal membrane. *J Neurosci* 9: 1977-1984.
- Gilmour DF (2015). Familial exudative vitreoretinopathy and related retinopathies. *Eye* 29: 1-14.
- Gonzalez C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzun I, Rojas P, Naranjo D, *et al.* (2012). K(+) channels: function-structural overview. *Comprehensive Physiology* 2: 2087-2149.
- Hall MO, Abrams TA, Mittag TW (1993). The phagocytosis of rod outer segments is inhibited by drugs linked to cyclic adenosine monophosphate production. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2392-2401.
- Ham RG (1963). An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. *Exp Cell Res* 29: 515-526.
- Hartzell HC, Qu Z (2003). Chloride currents in acutely isolated *Xenopus* retinal pigment epithelial cells. *The Journal of physiology* 549: 453-469.
- Hartzer MK, Cheng M, Liu X, Shastry BS (1999). Localization of the Norrie disease gene mRNA by in situ hybridization. *Brain Res Bull* 49: 355-358.
- He Y, Zhang Y, Liu X, Ghazaryan E, Li Y, Xie J, *et al.* (2014). Recent advances of stem cell therapy for retinitis pigmentosa. *International journal of molecular sciences* 15: 14456-14474.
- Heth CA, Schmidt SY (1992). Protein phosphorylation in retinal pigment epithelium of Long-Evans and Royal College of Surgeon rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2839-2847.
- Heth CA, Marescalchi PA (1994). Inositol triphosphate generation in cultured rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 409-416.
- Hille B (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. edn. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Hirano Y, Moscucci A, January CT (1992). Direct measurement of L-type Ca²⁺ window current in heart cells. *Circ Res* 70: 445-455.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1990). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. 1952. *Bulletin of mathematical biology* 52: 25-71; discussion 25-23.
- Huang B, Karwoski CJ (1992). Light-evoked expansion of subretinal space volume in the retina of the frog. *J Neurosci* 12: 4243-4252.
- Hughes BA, Steinberg RH (1990). Voltage-dependent currents in isolated cells of the frog retinal pigment epithelium. *The Journal of physiology* 428: 273-297.
- Hughes BA, Segawa Y (1993). cAMP-activated chloride currents in amphibian retinal pigment epithelial cells. *The Journal of physiology* 466: 749-766.

Hughes BA, Takahira M (1996). Inwardly rectifying K⁺ currents in isolated human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 1125-1139.

Hughes BA, Takahira M (1998). ATP-dependent regulation of inwardly rectifying K⁺ current in bovine retinal pigment epithelial cells. *Am J Physiol* 275: C1372-1383.

Hughes BA, Swaminathan A (2008). Modulation of the Kir7.1 potassium channel by extracellular and intracellular pH. *American journal of physiology. Cell physiology* 294: C423-431.

Joseph DP, Miller SS (1991). Apical and basal membrane ion transport mechanisms in bovine retinal pigment epithelium. *The Journal of physiology* 435: 439-463.

Joseph DP, Miller SS (1992). Alpha-1-adrenergic modulation of K and Cl transport in bovine retinal pigment epithelium. *The Journal of general physiology* 99: 263-290.

Kamb A, Iverson LE, Tanouye MA (1987). Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel. *Cell* 50: 405-413.

Karl MO, Kroeger W, Wimmers S, Milenkovic VM, Valtink M, Engelmann K, *et al.* (2008). Endogenous Gas6 and Ca²⁺ -channel activation modulate phagocytosis by retinal pigment epithelium. *Cellular signalling* 20: 1159-1168.

Kellner U (1997). [Hereditary retinal dystrophies]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 94: 164-183.

Krick W, Disser J, Hazama A, Burckhardt G, Fromter E (1991). Evidence for a cytosolic inhibitor of epithelial chloride channels. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 418: 491-499.

Kubo Y (1994). Towards the elucidation of the structural-functional relationship of inward rectifying K⁺ channel family. *Neuroscience research* 21: 109-117.

Kusaka S, Inanobe A, Fujita A, Makino Y, Tanemoto M, Matsushita K, *et al.* (2001). Functional Kir7.1 channels localized at the root of apical processes in rat retinal pigment epithelium. *The Journal of physiology* 531: 27-36.

Kusaka S, Horio Y, Fujita A, Matsushita K, Inanobe A, Gotow T, *et al.* (1999). Expression and polarized distribution of an inwardly rectifying K⁺ channel, Kir4.1, in rat retinal pigment epithelium. *The Journal of physiology* 520 Pt 2: 373-381.

la Cour M (1985). The retinal pigment epithelium controls the potassium activity in the subretinal space. *Acta ophthalmologica. Supplement* 173: 9-10.

la Cour M, Lund-Andersen H, Zeuthen T (1986). Potassium transport of the frog retinal pigment epithelium: autoregulation of potassium activity in the subretinal space. *The Journal of physiology* 375: 461-479.

- Lacour JP, Gordon PR, Eller M, Bhawan J, Gilchrest BA (1992). Cytoskeletal events underlying dendrite formation by cultured pigment cells. *Journal of cellular physiology* 151: 287-299.
- Lehmann GL, Benedicto I, Philp NJ, Rodriguez-Boulan E (2014). Plasma membrane protein polarity and trafficking in RPE cells: past, present and future. *Experimental eye research* 126: 5-15.
- Lenzner S, Prietz S, Feil S, Nuber UA, Ropers HH, Berger W (2002). Global gene expression analysis in a mouse model for Norrie disease: late involvement of photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 2825-2833.
- Lutty G, Grunwald J, Majji AB, Uyama M, Yoneya S (1999). Changes in choriocapillaris and retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Molecular vision* 5: 35.
- Marmorstein AD, Finnemann SC, Bonilha VL, Rodriguez-Boulan E (1998). Morphogenesis of the retinal pigment epithelium: toward understanding retinal degenerative diseases. *Ann N Y Acad Sci* 857: 1-12.
- Mathie A, Woollorton JR, Watkins CS (1998). Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *General pharmacology* 30: 13-24.
- Meitinger T, Meindl A, Bork P, Rost B, Sander C, Haasemann M, *et al.* (1993). Molecular modelling of the Norrie disease protein predicts a cystine knot growth factor tertiary structure. *Nat Genet* 5: 376-380.
- Mergler S (1998). *Patch-Clamp Untersuchungen zur Regulation von Calcium-Kanälen an kultivierten retinalen Pigmentepithelzellen von Kontrollratten und Ratten mit degenerativer Netzhauterkrankung.* edn. Dissertation, Fachbereich Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main.
- Mergler S, Strauss O (2002). Stimulation of L-type Ca(2+) channels by increase of intracellular InsP3 in rat retinal pigment epithelial cells. *Experimental eye research* 74: 29-40.
- Mergler S, Steinhausen K, Wiederholt M, Strauss O (1998). Altered regulation of L-type channels by protein kinase C and protein tyrosine kinases as a pathophysiologic effect in retinal degeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12: 1125-1134.
- Michna M, Knirsch M, Hoda JC, Muenkner S, Langer P, Platzer J, *et al.* (2003). Cav1.3 (alpha1D) Ca2+ currents in neonatal outer hair cells of mice. *The Journal of physiology* 553: 747-758.
- Miller SS, Edelman JL (1990). Active ion transport pathways in the bovine retinal pigment epithelium. *The Journal of physiology* 424: 283-300.
- Muller C, Mas Gomez N, Ruth P, Strauss O (2014). CaV1.3 L-type channels, maxiK Ca(2+)-dependent K(+) channels and bestrophin-1 regulate rhythmic photoreceptor outer segment phagocytosis by retinal pigment epithelial cells. *Cellular signalling* 26: 968-978.

- Murphy TH, Worley PF, Baraban JM (1991). L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron* 7: 625-635.
- Nash MS, Osborne NN (1995). Agonist-induced effects on cyclic AMP metabolism are affected in pigment epithelial cells of the Royal College of Surgeons rat. *Neurochem Int* 27: 253-262.
- Neher E, Sakmann B (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.
- Nicholls JG, Martin R, Wallace BG (2002). *Vom Neuron zum Gehirn*. edn. Spektrum Akademischer Verlag.
- Numberger M, Draguhn A (1996). *Patch-Clamp-Technik*. edn. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Nusse R, Varmus H (2012). Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *The EMBO journal* 31: 2670-2684.
- Ohlmann A, Scholz M, Goldwisch A, Chauhan BK, Hudl K, Ohlmann AV, et al. (2005). Ectopic norrin induces growth of ocular capillaries and restores normal retinal angiogenesis in Norrie disease mutant mice. *J Neurosci* 25: 1701-1710.
- Parmalee NL, Kitajewski J (2008). Wnt signaling in angiogenesis. *Current drug targets* 9: 558-564.
- Perez-Reyes E, Schneider T (1995). Molecular biology of calcium channels. *Kidney Int* 48: 1111-1124.
- Perez-Vilar J, Hill RL (1997). Norrie disease protein (norrin) forms disulfide-linked oligomers associated with the extracellular matrix. *The Journal of biological chemistry* 272: 33410-33415.
- Perney TM, Kaczmarek LK (1991). The molecular biology of K⁺ channels. *Current opinion in cell biology* 3: 663-670.
- Petrs-Silva H, Linden R (2014). Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa. *Clinical ophthalmology* 8: 127-136.
- Pfeffer BA, Philp NJ (2014). Cell culture of retinal pigment epithelium: Special Issue. *Experimental eye research* 126: 1-4.
- Pinto LH, Klumpp DJ (1998). Localization of potassium channels in the retina. *Prog Retin Eye Res* 17: 207-230.
- Puck TT, Cieciora SJ, Robinson A (1958). Genetics of somalian cells. 3. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *Journal of Experimental Medicine* 108: 945-956.
- Rehm HL, Gutierrez-Espeleta GA, Garcia R, Jimenez G, Khetarpal U, Priest JM, et al. (1997). Norrie disease gene mutation in a large Costa Rican kindred with a novel phenotype including venous insufficiency. *Human mutation* 9: 402-408.

- Rehm HL, Zhang DS, Brown MC, Burgess B, Halpin C, Berger W, *et al.* (2002). Vascular defects and sensorineural deafness in a mouse model of Norrie disease. *J Neurosci* 22: 4286-4292.
- Reichhart N, Strauss O (2014). Ion channels and transporters of the retinal pigment epithelium. *Experimental eye research* 126: 27-37.
- Richter M, Gottanka J, May CA, Welge-Lussen U, Berger W, Lutjen-Drecoll E (1998). Retinal vasculature changes in Norrie disease mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 2450-2457.
- Rosenthal R (2000). *L-Typ Ca²⁺-Kanal, FGF-Rezeptor 2 und Pathomechanismen der retinalen Dystrophie*. edn. Naturwissenschaftliche Dissertation, Fachbereich Humanmedizin, Freie Universität Berlin.
- Rosenthal R, Strauss O (2002). Ca²⁺-channels in the RPE. *Advances in experimental medicine and biology* 514: 225-235.
- Rosenthal R, Thieme H, Strauss O (2001). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in brain neurons and retinal pigment epithelial cells act via stimulation of neuroendocrine L-type channels (Ca(v)1.3). *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15: 970-977.
- Rosenthal R, Heimann H, Agostini H, Martin G, Hansen LL, Strauss O (2007). Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease. *Molecular vision* 13: 443-456.
- Ruether K, van de Pol D, Jaissle G, Berger W, Tornow RP, Zrenner E (1997). Retinoschisislike alterations in the mouse eye caused by gene targeting of the Norrie disease gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 710-718.
- Schafer NF, Luhmann UF, Feil S, Berger W (2009). Differential gene expression in Ndpk-knockout mice in retinal development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 906-916.
- Schroeder B, Hesse L, Bruck W, Gal A (1997). Histopathological and immunohistochemical findings associated with a null mutation in the Norrie disease gene. *Ophthalmic genetics* 18: 71-77.
- Shimura M, Yuan Y, Chang JT, Zhang S, Campochiaro PA, Zack DJ, *et al.* (2001). Expression and permeation properties of the K(+) channel Kir7.1 in the retinal pigment epithelium. *The Journal of physiology* 531: 329-346.
- Sims KB, Irvine AR, Good WV (1997). Norrie disease in a family with a manifesting female carrier. *Archives of ophthalmology* 115: 517-519.
- Smith SE, Mullen TE, Graham D, Sims KB, Rehm HL (2012). Norrie disease: extraocular clinical manifestations in 56 patients. *American journal of medical genetics. Part A* 158A: 1909-1917.

- Snodderly DM, Sandstrom MM, Leung IY, Zucker CL, Neuringer M (2002). Retinal pigment epithelial cell distribution in central retina of rhesus monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 2815-2818.
- Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP (2010). The retinal pigment epithelium in health and disease. *Current molecular medicine* 10: 802-823.
- Steinberg RH (1985). Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc Ophthalmol* 60: 327-346.
- Stobrawa SM, Breiderhoff T, Takamori S, Engel D, Schweizer M, Zdebik AA, *et al.* (2001). Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* 29: 185-196.
- Strauß O (1998). *Regulation von Ionenkanälen im retinalen Pigmentepithel des Auges: Vergleich zwischen Zellen normaler Ratten und Ratten mit hereditärer Netzhautdystrophie.* edn. Habilitationsschrift für das Fach Physiologie, Fachbereich Humanmedizin der Freien Universität Berlin.
- Strauss O (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews* 85: 845-881.
- Strauss O (2009). [The role of retinal pigment epithelium in visual functions]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 106: 299-304.
- Strauss O, Wienrich M (1993). Cultured retinal pigment epithelial cells from RCS rats express an increased calcium conductance compared with cells from non-dystrophic rats. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 425: 68-76.
- Strauss O, Wienrich M (1994a). Extracellular matrix proteins as substrate modulate the pattern of calcium channel expression in cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 429: 137-139.
- Strauß O, Richard G, Wienrich M (1993). Voltage-dependent potassium currents in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 191: 775-781.
- Strauss O, Weiser T, Wienrich M (1994b). Potassium currents in cultured cells of the rat retinal pigment epithelium. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Physiology* 109: 975-983.
- Strauss O, Wiederholt M, Wienrich M (1996). Activation of Cl⁻ currents in cultured rat retinal pigment epithelial cells by intracellular applications of inositol-1,4,5-triphosphate: differences between rats with retinal dystrophy (RCS) and normal rats. *J Membr Biol* 151: 189-200.
- Strauß O, Mergler S, Wiederholt M (1997). Regulation of L-type calcium channels by tyrosine kinase and protein kinase C in cultured rat and human retinal pigment epithelial cells. *FASEB Journal* 11: 859-867.

- Strauss O, Steinhausen K, Wienrich M, Wiederholt M (1998a). Activation of a Cl⁻-conductance by protein kinase-dependent phosphorylation in cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Experimental eye research* 66: 35-42.
- Strauss O, Stumpff F, Mergler S, Wienrich M, Wiederholt M (1998b). The Royal College of Surgeons rat: an animal model for inherited retinal degeneration with a still unknown genetic defect. *Acta Anat (Basel)* 162: 101-111.
- Strauss O, Steinhausen K, Mergler S, Stumpff F, Wiederholt M (1999). Involvement of protein tyrosine kinase in the InsP₃-induced activation of Ca²⁺-dependent Cl⁻ currents in cultured cells of the rat retinal pigment epithelium. *J Membr Biol* 169: 141-153.
- Strauss O, Buss F, Rosenthal R, Fischer D, Mergler S, Stumpff F, *et al.* (2000). Activation of neuroendocrine L-type channels (alpha1D subunits) in retinal pigment epithelial cells and brain neurons by pp60(c-src). *Biochemical and biophysical research communications* 270: 806-810.
- Strauss O, Rosenthal R, Dey D, Beninde J, Wollmann G, Thieme H, *et al.* (2002). Effects of protein kinase C on delayed rectifier K⁺ channel regulation by tyrosine kinase in rat retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 1645-1654.
- Sugasawa K, Deguchi J, Okami T, Yamamoto A, Omori K, Uyama M, *et al.* (1994). Immunocytochemical analyses of distributions of Na, K-ATPase and GLUT1, insulin and transferrin receptors in the developing retinal pigment epithelial cells. *Cell Struct Funct* 19: 21-28.
- Takahira M, Hughes BA (1997). Isolated bovine retinal pigment epithelial cells express delayed rectifier type and M-type K⁺ currents. *American Journal of Physiology* 273: C790-C803.
- Tanihara H, Inatani M, Honda Y (1997). Growth factors and their receptors in the retina and pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res* 16: 271-301.
- Tao Q, Kelly MEM (1995). Calcium-activated potassium current in cultured rabbit retinal pigment epithelial cells. *Current Eye Research* 15: 237-246.
- Tao Q, Rafuse PE, Kelly MEM (1994). Potassium currents in cultured rabbit retinal pigment epithelial cells. *Journal of Membrane Biology* 141: 123-138.
- Thompson DA, Gal A (2003). Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. *Prog Retin Eye Res* 22: 683-703.
- Ueda Y, Steinberg RH (1993). Voltage-operated calcium channels in fresh and cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 3408-3418.
- Ueda Y, Steinberg RH (1994). Chloride currents in freshly isolated rat retinal pigment epithelial cells. *Experimental eye research* 58: 331-342.
- Ueda Y, Steinberg RH (1995). Dihydropyridine-sensitive calcium currents in freshly isolated human and monkey retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 373-380.

- Varner HH, Rayborn ME, Osterfeld AM, Hollyfield JG (1987). Localization of proteoglycan within the extracellular matrix sheath of cone photoreceptors. *Experimental eye research* 44: 633-642.
- Verheijck EE (1998). Perforated Patch-Clamp Technique in Heart Cells. In: Van Duijn B, Wiltink A (eds). *Signal Transduction - Single Cell Techniques*, edn: Springer. p[^]pp.
- Vinores SA, Derevjaniuk NL, Mahlow J, Hackett SF, Haller JA, deJuan E, *et al.* (1995). Class III beta-tubulin in human retinal pigment epithelial cells in culture and in epiretinal membranes. *Experimental eye research* 60: 385-400.
- Voaden MJ (1988). *Retinitis Pigmentosa and its Models*. edn, vol. 7. Pergamon Press: Oxford.
- Warburg M (1966). Norrie's disease: a congenital progressive oculo-acustico-cerebral degeneration. *Acta Ophthalmol Scand Suppl* 89: 1-47.
- Wen R, Lui GM, Steinberg RH (1993). Whole-Cell K⁺ currents in fresh and cultured cells of the human and the monkey retinal pigment epithelium. *Journal of Physiology* 465: 121-147.
- Weng TX, Godley BF, Jin GF, Mangini NJ, Kennedy BG, Yu AS, *et al.* (2002). Oxidant and antioxidant modulation of chloride channels expressed in human retinal pigment epithelium. *American journal of physiology. Cell physiology* 283: C839-849.
- Wills NK, Weng T, Mo L, Hellmich HL, Yu A, Wang T, *et al.* (2000). Chloride channel expression in cultured human fetal RPE cells: response to oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 4247-4255.
- Wimmers S, Karl MO, Strauss O (2007). Ion channels in the RPE. *Prog Retin Eye Res* 26: 263-301.
- Wimmers S, Coeppicus L, Rosenthal R, Strauss O (2008). Expression profile of voltage-dependent Ca²⁺ channel subunits in the human retinal pigment epithelium. *Graefes' archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 246: 685-692.
- Wollmann G, Lenzner S, Berger W, Rosenthal R, Karl MO, Strauss O (2006). Voltage-dependent ion channels in the mouse RPE: comparison with Norrie disease mice. *Vision research* 46: 688-698.
- Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, Woods C, *et al.* (2004). Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 116: 883-895.
- Ye X, Smallwood P, Nathans J (2011). Expression of the Norrie disease gene (Ndp) in developing and adult mouse eye, ear, and brain. *Gene expression patterns : GEP* 11: 151-155.
- Young RW, Bok D (1969). Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *Journal of Cellular Biochemistry* 42: 392-403.

Ypey DL (1998). Practical Introduction to Patch Clamping by Simulation Experiments with Simple Electrical Circuits. In: Van Duijn B, Wiltink A (eds). *Signal Transduction - Single Cell Techniques*, edn: Springer. p[^]pp.

Zrenner E, Ruther K, Apfelstedt-Sylla E (1992). [Retinitis pigmentosa. Clinical findings, results of molecular genetic techniques and research perspectives]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 89: 5-21.

Zuercher J, Fritzsche M, Feil S, Mohn L, Berger W (2012). Norrin stimulates cell proliferation in the superficial retinal vascular plexus and is pivotal for the recruitment of mural cells. *Human molecular genetics* 21: 2619-2630.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
Ba ²⁺	Bariumion
bFGF	bovine fibroblast growth factor
Ca ²⁺	Kalziumion
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cl ⁻	Chloridion
Cs ²⁺	Cäsiumion
DIDS	4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid
DLR	Delayed Rectifier (Kaliumkanal)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERG	Elektroretinogramm
GΩ	Gigaohm
h	Stunde
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HGF	Hepatocyte growth factor
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IR	Inward Rectifier (Kaliumkanal)
K ⁺	Kaliumion
kHz	Kilohertz
M	mol/l
Max.	Maximum
MΩ	Megaohm
Mg ²⁺	Magnesiumion
min	Minute

mM	Millimol
ms	Minisekunde
mV	Millivolt
Na ⁺	Natriumion
ND	Norrie disease
NDP	Norrie disease protein
pA	Picoampere
pF	Picofarrad
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PKC	Proteinkinase C
r50	Stimulationsprotokoll
RP	Retinitis pigmentosa
RPE	Retinales Pigmentepithel
RCS	Royal College of Surgeons
s	Sekunde
SEM	Standard error of the mean
TEA	Tetraethylammonium
TGF-β	Transforming growth factor β
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wildtyp
WTN	Signaltransduktionskaskade

7.2. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Guido Wollmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „**Elektrophysiologische Untersuchung der Ionenkanäle an Zellen des retinalen Pigmentepithels von transgenen Mäusen mit Norrie Gendefekt**“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Guido Wollmann hatte Anteil an den folgenden Publikationen:

1)

Wollmann G, Lenzner S, Berger W, Rosenthal R, Karl MO, Strauß O. 2006. Voltage-dependent ion channels in the mouse RPE: comparison with Norrie disease mice. Vision Res. 46:688-698.

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Experimentelle Durchführung, Datenanalyse, Abbildungen, Manuskript

2)

Strauss O, Rosenthal R, Dey D, Beninde J, **Wollmann G**, Thieme H, Wiederholt M. 2002. Effects of protein kinase C on delayed rectifier K⁺ channel regulation by tyrosine kinase in rat retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 43:1645-1654.

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Mitarbeit bei experimenteller Durchführung

Unterschrift des Doktoranden

Unterschrift, Datum und Stempel des
betreuenden Hochschullehrers

7.3. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.4. Publikationsliste

Peer-Reviewed Originalartikel

1. **Wollmann G**, Drokhlyansky E, Davis JN, Cepko C, van den Pol AN. 2015. Lassa-vesicular stomatitis chimeric virus safely destroys brain tumors. *J Virol.* 89:6711-24.
2. **Wollmann G**, Paglino JC, Maloney PR, Ahmadi SA, van den Pol AN. 2015. Attenuation of vesicular stomatitis virus infection of brain using antiviral drugs and an adeno-associated virus-interferon vector. *Virology.* 475:1-14.
3. **Wollmann G**, Davis JN, Bosenberg MW, van den Pol AN. 2013. Vesicular stomatitis virus variants selectively infect and kill human melanomas but not normal melanocytes. *J Virology.* 87:6644-59.
4. **Wollmann G**, Ozduman K, van den Pol AN. 2012. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. *Cancer J.* 18:69-81.
5. **Wollmann G**, Rogulin V, Simon I, Rose JK, van den Pol AN. 2010. Some attenuated variants of vesicular stomatitis virus show enhanced oncolytic activity against human glioblastoma cells relative to normal brain cells. *J Virology.* 84:1563-1573.
6. Ozduman K, **Wollmann G**, Ahmadi SA, van den Pol AN. 2009. Peripheral immunization blocks lethal actions of vesicular stomatitis virus within the brain. *JVirology.* 83:11540-11549.
7. van den Pol AN, Ozduman K, **Wollmann G**, Ho WS, Simon I, Yao Y, Rose JK, Ghosh P. 2009. Viral strategies for studying the brain, including a replication-restricted self-amplifying delta-G vesicular stomatitis virus that rapidly expresses transgenes in brain and can generate a multicolor golgi-like expression. *J Comp Neurol.* 516:456-481.
8. Ozduman K, **Wollmann G**, Piepmeier JM, van den Pol AN. 2008. Systemic vesicular stomatitis virus selectively destroys multifocal glioma and metastatic carcinoma in brain. *J Neurosci.* 28:1882-1893.
9. Baehring JM, Phipps M, **Wollmann G**. 2008. Rostral midbrain infarction producing isolated lateropulsion. *Neurology.* 70:655-656.
10. **Wollmann G**, Robek MD, van den Pol AN. 2007. Variable deficiencies in the interferon response enhance susceptibility to VSV oncolytic actions in glioblastoma but not in normal human glia. *J. Virology.* 81:1479-1491.
11. van den Pol AN, Robek MD, Ghosh PK, Ozduman K, Bandi P, Whim MD, **Wollmann G**. 2007. Cytomegalovirus induces interferon-stimulated gene expression and is attenuated by interferon in the developing brain. *J. Virology.* 81:332-348.
12. **Wollmann G**, Lenzner S, Berger W, Rosenthal R, Karl MO, Strauß O. 2006. Voltage-dependent ion channels in the mouse RPE: comparison with Norrie disease mice. *Vision*

Res. 46:688-698.

13. **Wollmann G**, Acuna-Goycolea C, van den Pol AN. 2005. Direct excitation of hypocretin/orexin cells by extracellular ATP at P2X receptors. *J Neurophysiol.* 94:2195-2206.
14. **Wollmann G**, Tattersall P, van den Pol AN. 2005. Targeting human glioblastoma cells: comparison of nine viruses with oncolytic potential. *J. Virology.* 79: 6005-6022.
15. Ortego J, **Wollmann G**, Coca-Prados M. 2002. Differential regulation of gene expression of neurotensin and prohormone convertases PC1 and PC2 in the bovine ocular ciliary epithelium: possible implications on neurotensin processing. *Neurosci Lett.* 333:49-53.
16. Strauss O, Rosenthal R, Dey D, Beninde J, **Wollmann G**, Thieme H, Wiederholt M. 2002. Effects of protein kinase C on delayed rectifier K⁺ channel regulation by tyrosine kinase in rat retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:1645-1654.
17. Bertazolli-Filho R, Ghosh S, Huang W, **Wollmann G**, Coca-Prados M. 2001. Molecular evidence that human ocular ciliary epithelium expresses components involved in phototransduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 284:317-325.

Buchkapitel:

1. Ozduman K, **Wollmann G**, Piepmeier. 2010. Gene Therapy for Meningiomas. In: Pamir MN, Black PM, Fahlbusch R, editors. *Meningiomas.* Philadelphia, Saunders Elsevier. P681-690.
2. Baehring JM, **Wollmann G**. 2008. Neurologic Sequelae of Cancer Therapy. In: Miller K., editor. *Medical and Psychosocial Care of the Cancer Survivor.* Boston: Jones and Bartlett Publishers. P323-340.

Abstracts, Posters:

1. **Wollmann G**, Drokhlyansky E, Cepko C, van den Pol AN. 2015. Chimeric VSV for safe intracranial application. XXI Annual Meeting of the German Society for Gene Therapy. Vienna, AT
2. **Wollmann G**, Drokhlyansky E, Cepko C, van den Pol AN. 2014. Safe intracranial application of chimeric VSV. 8th International Conference on Oncolytic Virus Therapeutics, Oxford, UK
3. Ozduman K, **Wollmann G**, Piepmeier J, van den Pol A. 2007. Systemic Vesicular Stomatitis Virus Targets Different Types of Carcinoma In Brain. *Oncolytic Virus*

Conference, Scottsdale, AZ

4. **Wollmann G** and van den Pol AN. 2005. Interferon enhances the glioblastoma selectivity of oncolytic vesicular stomatitis virus. Neuroscience Meeting, Washington DC
5. **Wollmann G** and van den Pol AN. 2004. Recombinant replication-competent viruses that target glioblastoma cells – a comparative study. 2004. Neuroscience Meeting, San Diego, CA
6. **Wollmann G**, Lenzner S, Rosenthal R, Berger W, Strauss O. 2002. Ion channels in retinal pigment epithelium cells in transgenic mice with Norrie disease. Faculty yearbook 99th the Faculty of Medicine (UKBF), Freie Universität Berlin, Pre-selected for Faculty Research Award

7.5. Danksagung

Ich danke in besonderem Maße Herrn Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß für die langjährige Betreuung und die fachliche und menschliche Unterstützung, die sich insbesondere in den Jahren des Medizinstudiums und den damit verbundenen zeitlichen Herausforderungen als besonders wertvoll erwies.

Ein großer Dank gilt den Kollegen der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Michael Wiederholt. PD Dr. rer. med. Rita Rosenthal gebührt besondere Erwähnung. Sie stand jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und war eine zuverlässige Mentorin sowohl anfangs bei der Methodeneinweisung als auch in späteren Zeiten bei der Datenanalyse. Die daraus erwachsene Freundschaft war ein beständiger Fels in der Zeit im „Ecklabor“. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. med. Dennis Dey und Dr. med. Julia Beninde für die Hilfe bei der initialen Einarbeitung in die Patch-Clamp-Technik.

Dank gilt auch Dr. rer. nat. Steffen Lenzner und Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Berger vom Max Planck Institut für Molekulare Genetik für die Bereitstellung und Genotypisierung des der Arbeit zugrunde liegenden Gewebematerials des Norrie Maus Tiermodells. Diese sehr angenehme und produktive Zusammenarbeit war fundamental für die Durchführung der experimentellen Studie. Der tägliche Ablauf im Labor wäre ohne die tatkräftige Unterstützung von Marianne Boxberger und Astrid Krolik wesentlich schwieriger gewesen. Die akademisch fruchtbare Umgebung wurde durch anregende Besprechungen mit Prof. Dr. med. Hagen Thieme, Prof. Dr. Kirsten Steinhausen, PD Dr. Friederike Stumpff, und Dr. phil. nat. Stefan Mergler gepflegt.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Michael Wiederholt möchte ich mich in besonderem Maße für das Einfühlungsvermögen und die wertvollen Diskussionen bezüglich Weiterbildungsoptionen bedanken. Die 12 Jahre in der experimentellen Wissenschaft in den USA hatten ihren Ursprung in seinem Büro.

Familie Egerer danke ich für das gründliche Korrekturlesen und die Hilfe beim Erstellen der Endfassung der Promotionsschrift.

Mein abschließender Dank gilt meiner Mutter Sabine Wollmann und Schwester Beate Wollmann, die mich durch Schulausbildung und Studium hindurch mit voller Kraft unterstützten, meinem Vater Franz Wollmann, der mich stets zum Nachdenken animierte und meinem engsten Studienfreund Lars Mantey, der einen großen Teil des mich durch das Studium begleitenden Wissensdurstes entfachte und mich stets zu harter Arbeit in der akademischen Welt anspornte.