

1 Einleitung

Das Norrie-Syndrom (OMIM # 310600; *NDP*; Norrie disease pseudoglioma) ist eine seltene angeborene, X-chromosomal rezessiv vererbte, neurologische Erkrankung, die zuerst 1927 von dem dänischen Ophthalmologen Gordon Norrie beschrieben wurde. Es handelt sich um eine Form der erblichen Blindheit, die zu einer bilateralen Atrophie der Augen führt (Norrie, 1927). In den 1960er Jahren charakterisierte Mette Warburg diese Erkrankung genauer und beschrieb sie als eine progressive okulo-akustisch-cerebrale Degeneration (Warburg, 1966). Sie identifizierte so die drei wesentlichen Merkmale dieser Erkrankung, die angeborene, beidseitige Blindheit, eine progressive sensorisch-neuronale Taubheit und die geistige Behinderung bei Betroffenen. Aufgrund dieser detaillierten Arbeiten wird das Syndrom auch häufig als Norrie-Warburg-Syndrom bezeichnet.

Die Blindheit ist in allen Patienten zu beobachten und ist das charakteristische Symptom dieser Erkrankung. Gleichzeitig ist somit das Auge das offensichtlich primär betroffene Organ. Daher ist die Kenntnis seiner Anatomie eine wesentliche Voraussetzung für das Verständnis der Pathogenese des Norrie-Syndroms.

1.1 Die Anatomie des menschlichen Auges

Das Auge (Abbildung 1) ist das zentrale Sinnesorgan für die Wahrnehmung von Licht. Das Licht tritt durch die Hornhaut (Cornea) in das Auge ein und wird durch die Linse (lentis) auf die Rückseite des Auges projiziert. Dabei passiert das Licht den Glaskörper (Corpus vitreum) und trifft dann auf die Netzhaut (Retina). In diesem spezialisierten, sensorischen Gewebe, welches ein Teil des Zentralnervensystems ist, wird der physikalische Reiz Licht in elektrische Signale umgewandelt, über den Sehnerv (Nervus opticus) an das Gehirn weitergeleitet und für die Wahrnehmung weiterverarbeitet. Durch die Retina hindurchtretendes Licht wird vom Pigmentepithel mit seinem Farbstoff Melanin aufgefangen und so der Lichtreiz ausgelöscht. Zum Schutz und zum Erhalt seiner Form ist der Augapfel von der festen Lederhaut (Sclera) umgeben. Zwischen dieser und der Retina befindet sich die Aderhaut (Chorioidea), die zusammen mit dem retinalen Blutgefäßsystem für die physiologische Funktion der Retina essentiell ist.

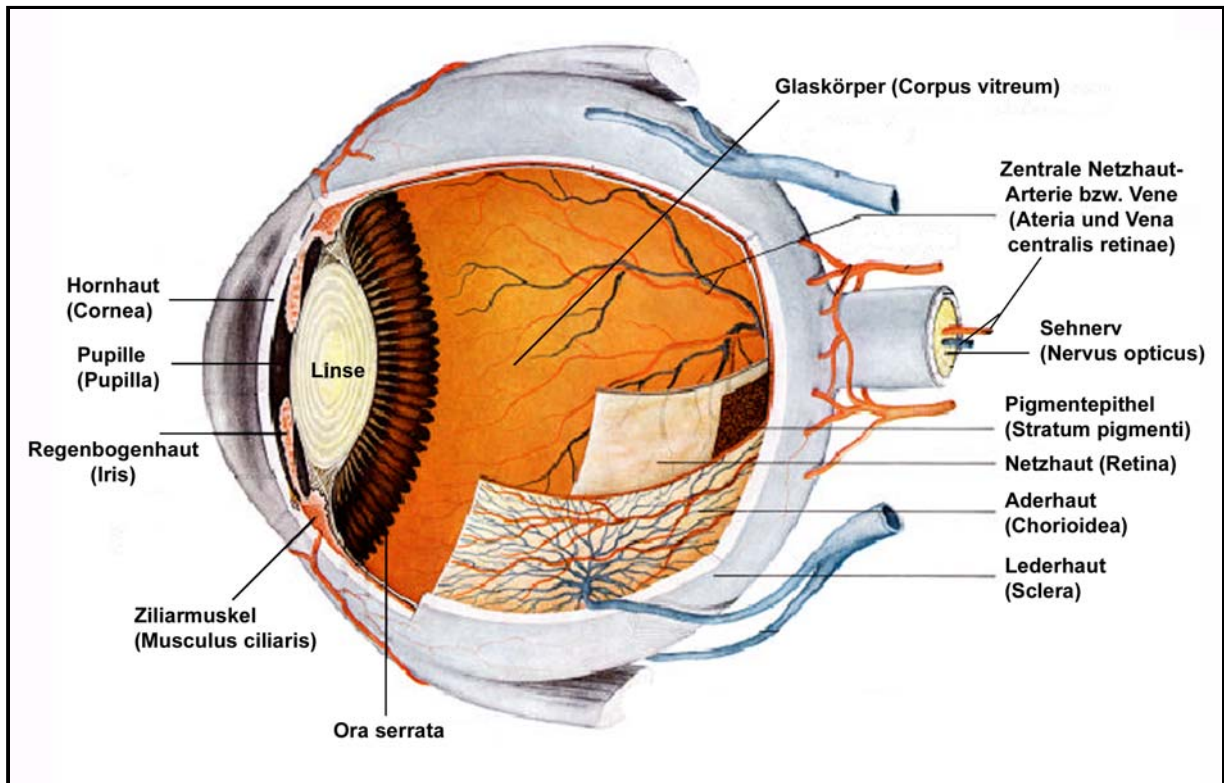


Abbildung 1: Schichtengliederung des Augapfels (Bulbus oculi). Das Auge ist von lateral gefenstert dargestellt (modifiziert nach Mikroskopische Anatomie der Organe - Auge und Retina; H.-J. Wagner; entnommen: <http://www.anatom.uni-tuebingen.de/docs/MolHistoSS2004/XXAugeRetina.pdf>) Arterielle Gefäße sind rot und venöse Gefäße blau eingefärbt. Mit ora serrata wird der gebogene Rand der Retina bezeichnet.

1.1.1 Der Aufbau der Retina und deren Blutgefäßversorgung

Die physiologische Funktion des sensorischen Organs Retina ist die Umwandlung des physikalischen Lichtreizes in ein elektrochemisches Signal. Diese Umwandlung und die nachfolgende Verarbeitung und Weiterleitung des Signals ins Gehirn wird durch den spezialisierten Schichtenaufbau der Retina ermöglicht.

Die eigentlichen Sinneszellen in der Retina sind die Photorezeptoren, die aber an der dem Licht abgewandten Seite liegen, so dass das Licht zunächst alle anderen Schichten der Retina durchdringen muss, bevor es auf die Photorezeptoren trifft (Abbildung 2). Daher spricht man auch von einer inversen Retina oder einem inversen Auge.

Die Photorezeptoren bestehen aus den lichtempfindlichen Außensegmenten, welche in engem Kontakt mit dem retinalen Pigmentepithel (RPE) stehen, den Innensegmenten und den Zellsomata mit den Axonen und den synaptischen Enden.

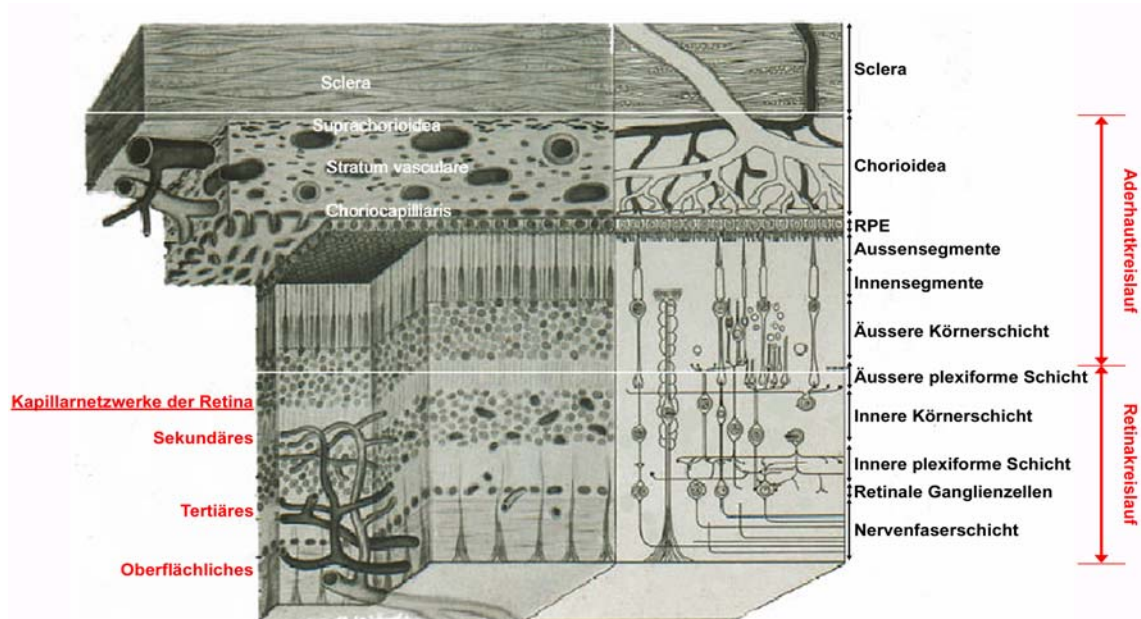


Abbildung 2: Schichtenaufbau und Blutversorgung der Retina durch die Aderhaut (Chorioidea) und retinale Blutgefäße. (modifiziert nach Mikroskopische Anatomie der Organe - Auge und Retina; H.-J. Wagner; entnommen: <http://www.anatom.uni-tuebingen.de/docs/MolHistoSS2004/XXAugeRetina.pdf>); Die schwarzen Bezeichnungen benennen die verschiedenen Schichten der Retina, wobei die Bezeichnung Außen- bzw. Innensegmente sich auf die Außen- bzw. Innensegmente der Photorezeptoren beziehen. Die roten Beschriftungen bezeichnen die verschiedenen Kapillarnetzwerke des retinalen Blutgefäßsystems bzw. kennzeichnen die Bereiche der Retina, die durch den Aderhaut - bzw. den Retinakreislauf versorgt werden. Die verschiedenen Schichten der Chorioidea sowie die Sclera, zur Abgrenzung von diesen, sind weiß beschriftet.

In den Außensegmenten, welche die Sehpigmente der Stäbchen (Rhodopsin) oder der Zapfen (rotes, grünes oder blaues Opsin) enthalten, wird durch den Lichteinfall die Phototransduktionskaskade initiiert. Diese dient der Signalamplifikation des Lichtreizes und führt zum Schließen von Natriumkanälen in der Plasmamembran der Zellen und somit zu einer Hyperpolarisation der Membran, wodurch die Umwandlung in ein elektrochemisches Signal abgeschlossen ist. Das dabei verbrauchte Chromophor Retinal wird im RPE durch den visuellen Zyklus regeneriert.

Das durch die Phototransduktionskaskade erzeugte elektrochemische Signal wird über die Innensegmente, die Zellsomata (äußere Körnerschicht) sowie über die Axone der Photorezeptoren zu den synaptischen Enden in der äußeren plexiformen Schicht weitergeleitet. In dieser Schicht treten die Synapsen der Photorezeptoren mit den Dendriten der nachgeschalteten Neurone, den Biopolarzellen und Horizontalzellen, in Kontakt. Die Zellsomata mit den Kernen der Horizontalzellen und der Bipolarzellen bilden zusammen mit den Zellsomata der neuronalen, amakrinen und der Müllerzellen die innere Körnerschicht, wobei die Bipolarzellen für die Weiterleitung des Signals von den Photorezeptoren auf die

retinalen Ganglienzellen verantwortlich sind. Horizontale sowie amakrine Zellen sind hingegen für die laterale Integration der Signale verantwortlich. Dabei sind die Horizontalzellen mit den Photorezeptoren verschaltet, während die amakrinen Zellen zwischen den Bipolarzellen und den retinalen Ganglienzellen liegen. Die Verschaltungen der sekundären Neurone, hier der Bipolarzellen und der amakrinen Zellen, mit den Ganglienzellen erfolgt in der inneren plexiformen Schicht. In den Ganglienzellen wird im Gegensatz zu den Photorezeptoren und den anderen erwähnten Neuronen, in denen nur graduierte Potentiale erzeugt werden, ein Aktionspotential erzeugt und so die Weiterleitung des Signals über die Axone der Ganglienzellen in der Nervenfaserschicht und über den daraus gebildeten Nervus opticus ins Gehirn ermöglicht. Für alle diese Prozesse der Signalerzeugung und Weiterleitung benötigt die Retina sehr viel Energie und eine sehr gut eingestellte Homeostase. Somit ist sie auf eine sehr gute Blutversorgung, die den benötigten Sauerstoff und die Nährstoffe heranbringt, angewiesen.

Diese Blutversorgung der Retina wird in allen Säugetieren durch zwei Blutgefäßsysteme, die retinalen Blutgefäße und die Aderhaut (Chorioidea), gewährleistet. Das retinale Blutgefäßsystem wird gespeist durch die Zentralarterie der Retina (Arteria centralis retinae), welche an der Position des Sehnervs (Nervus opticus) in das Auge eintritt und sich dann in radial angeordnete Arteriolen aufspaltet (Abbildung 1). Im adulten Stadium findet sich sowohl im Menschen als auch in der Maus ein aus drei Kapillarnetzwerken bestehendes retinales Blutgefäßsystem. Es besteht aus dem oberflächlichen Netzwerk, einem intermediären Netzwerk in der inneren Körnerschicht und einem tiefen Netzwerk in etwa an der Grenze zwischen der inneren Körnerschicht und der äußeren plexiformen Schicht (Abbildung 2). Dieser retinale Kreislauf vereinigt sich wieder und verlässt das Auge über die zentrale Vene der Retina (Vena centralis retinae; Abbildung 1).

Die retinalen Blutgefäße (Abbildung 2) versorgen die inneren Schichten der Retina und somit die Nervenfaserschicht, die retinale Ganglienzellschicht, die innere plexiforme Schicht und die innere Körnerschicht bis hin zur Grenze der äußeren plexiformen Schicht (Retinakreislauf), während die äußere Retina mit der äußeren Körnerschicht und den Innen- sowie den Außensegmenten der Photorezeptoren keine Blutgefäße enthält. Diese Schichten erhalten den Sauerstoff und die Nährstoffe durch Diffusion aus der Aderhaut (Chorioidea; Aderhautkreislauf). Um diese Diffusion zu erleichtern, sind die Kapillaren der Choriocapillaris fenestriert und in einem fein verzweigten Netzwerk direkt unter der Retina/RPE angeordnet. Dadurch tritt Plasma aus der Choriocapillaris aus und sammelt sich unter dem RPE, welches mit seinen „tight junctions“ und vielen Transportsystemen die

äußere Blut-Retina-Schranke bildet. Die innere Blut-Retina-Schranke wird dahingegen direkt durch die retinalen Endothelzellen gebildet.

Die Retina ist also ein sehr komplexes, sensorisches Organ, in dem die Organisation der Neurone in einer Schichtenstruktur zusammen mit einer koordinierten Entwicklung der Blutgefäßversorgung kritisch ist für die physiologische Funktion. Genetische Defekte, aber auch andere Störungen dieser Prozesse, können zu sehr schweren Erkrankungen des Sehsystems bis hin zur Erblindung führen. Mit einer dieser genetisch bedingten Blindheiten und ihren Pathogenesemechanismen, habe ich mich in dieser Doktorarbeit beschäftigt – dem Norrie-Syndrom.

1.2 Klinik und Genetik des Norrie-Syndroms

Nach dem grundsätzlichen Verständnis der Anatomie des Auges und der physiologischen Funktion der Retina befasst sich das folgende Kapitel genauer mit dem klinischen Bild des Norrie-Syndroms und den genetischen Grundlagen dieser Form einer erblichen Blindheit.

1.2.1 Das klinische Erscheinungsbild des Norrie-Syndroms

Fast alle Norrie-Patienten sind von Geburt an blind. Symptomatisch für diese Erkrankung ist eine beidseitig auftretende Leukokorie, d.h. ein weißlich-gelber, trüber Pupillenreflex (Abbildung 3, links), welcher durch retrodentale, vaskularisierte Membranen verursacht wird. Dabei handelt es sich um eine teilweise oder vollständig vom Augenhintergrund abgelöste Retina, aus der sich ein undifferenziert wachsendes und vaskularisiertes Gewebe gebildet hat, weshalb man auch häufig von einem Pseudogliom (Pseudotumor der Retina) spricht (Abbildung 3, Mitte). In seltenen Fällen kann für einige Jahre eine Lichtwahrnehmung erhalten bleiben, wobei dann meist eine verzögerte Ablösung der Retina vom Augenhintergrund zu beobachten ist (Bergen et al., 1994). Im späteren Verlauf der Erkrankung kommt es zur Atrophie bzw. Schrumpfung des gesamten Augapfels (phthisis bulbi, Abbildung 3, rechts), weshalb das Norrie-Syndrom auch als “Atrophia bulborum hereditaria“ bezeichnet wird. Weitere, nicht in allen Patienten im gleichen Maße zu beobachtende, okuläre Manifestationen umfassen die Entwicklung eines Glaukoms, die später eintretende Trübung der zunächst klaren Linse begleitet von einer Kataraktentwicklung und hämorrhagische Einblutungen in den Glaskörper und die Retina. Außerdem wurden Veränderungen im Glaskörper beschrieben, bei denen es sich um Reste des nicht vollständig zurück gebildeten, fötalen Blutgefäßsystems, der Hyaloidia, handelt (Warburg, 1975).

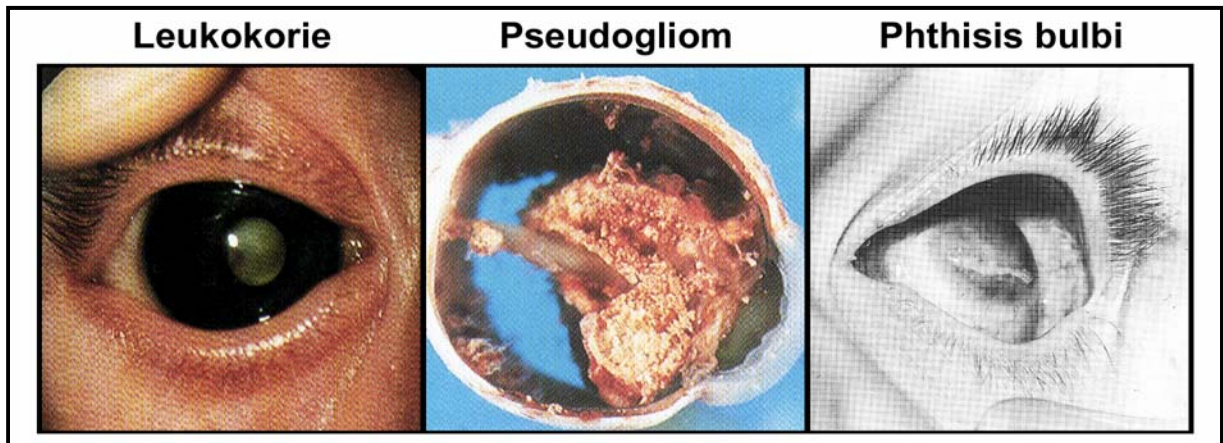


Abbildung 3: Der okuläre Phänotyp des Norrie-Syndroms. Das charakteristische Merkmal dieser angeborenen, beidseitigen Blindheit ist das Auftreten einer Leukokorie, eines weißlichen Pupillenreflexes (links; Alter: 1 Monat (Chynn et al., 1996)), der verursacht wird durch retrolentale, vaskularisierte Membranen, die ein undifferenziertes Zellwachstum zeigen (Mitte; Alter 2 Monate; nach Enukleation des Auges (Chynn et al., 1996)). Im späteren Verlauf der Erkrankung beobachtet man das Schrumpfen und die Atrophie des Augapfels (Phthisis bulbi; rechts; (Bergen et al., 1994)).

Zusätzlich zu der bilateralen Blindheit entwickelt mindestens ein Drittel der Patienten in der zweiten oder dritten Lebensdekade einen progressiven Hörverlust, der bis hin zur kompletten Taubheit führen kann (Warburg, 1966). Nach letzten Erkenntnissen, die mit Hilfe des Mausmodells (siehe unten) gesammelt wurden, scheint die Penetranz für den Hörverlust aber wesentlich höher zu liegen, was sich aufgrund der geringen Zahl an Patienten klinisch nur schlecht nachweisen lässt (Rehm et al., 2002). Weitere 30-50% der Patienten entwickeln, unabhängig von der Taubheit, mentale Dysfunktionen (geistige Behinderungen) unterschiedlichen Schweregrades, wobei im Gegensatz zu der Situation im Ohr und im Auge bisher keine spezifischen, morphologischen Veränderungen im Gehirn beschrieben wurden. Beide Phänotypen, der der geistigen Behinderung und der des sensorisch-neuronalen Hörverlustes, zeigen selbst innerhalb einer Familie ein sehr variables klinisches Erscheinungsbild. Beispielsweise wurde von 35 betroffenen Männern aus sechs Familien aus Schweden und Dänemark, die von Mette Warburg (Warburg, 1968) untersucht wurden, in 20 eine geistige Behinderung festgestellt. Unter diesen 20 befanden sich neun schwere Fälle geistiger Behinderung, während elf eher moderate Defizite aufwiesen. Bei 11 der 35 Patienten wurde ein progressiver Hörverlust festgestellt, dessen klinische Manifestation von geringeren Höreinschränkungen bis hin zur kompletten Taubheit reichte. Eine andere Studie beschrieb 10 weitere betroffene Männer aus drei Generationen einer ägyptischen Familie (Hafez et al., 1982), von denen zwei der erkrankten Männer eine weit fortgeschrittene Taubheit zeigten, während drei nur moderat betroffen waren. Auch für den okulären Phänotyp wurde eine solch hohe phänotypische Variabilität beschrieben, wobei in einer Familie 11 betroffene Männer

von Geburt an blind waren, während in einem 40-jährigen Mutationsträger derselben Familie ein partielles Sehen im linke Auge erhalten geblieben war (Zaremba et al., 1998). Insgesamt hat die detaillierte klinische Untersuchung von Norrie-Patienten somit ergeben, dass das Norrie-Syndrom eine hohe klinische Variabilität des Phänotyps sogar innerhalb einer Familie aufweisen kann.

1.2.2 Das *NDP*-Gen und sein Mutationsspektrum in Patienten

Das humane *NDP* (Norrie disease pseudoglioma)-Gen wurde durch positionelles Klonieren auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp11.3) identifiziert (Berger et al., 1992a; Chen et al., 1992). Die kodierende Sequenz des Gens besteht aus 3 Exons, die durch zwei Introns von 15 und 9 kbp Länge unterbrochen sind. Die drei Exons bestehen aus 209, 381 und 1245 bp, wobei der offene Leserahmen für das 133 Aminosäuren umfassende NDP-Protein („Norrin“) in Exon 2 beginnt, so dass Exon 1 untranslatiert bleibt.

Die Identifizierung von Punktmutationen in einer Vielzahl von Patienten in diesem Gen führte zu dem endgültigen Nachweis einer ursächlichen Rolle des *NDP*-Gens für das Norrie-Syndrom (Berger et al., 1992b; Meindl et al., 1992). Insgesamt sind bisher in mehr als 120 Patienten Mutationen beschrieben worden, wobei das Mutationsspektrum in etwa 15-20% der Fälle strukturelle Chromosomenaberrationen und mehr als 70 Punktmutationen umfasst (Berger, 1998). Die Mehrzahl der Punktmutationen sind Missense- (n = 62) und Stopp- (n = 11) Mutationen, während die verbleibenden Sequenzveränderungen entweder eine Verschiebung des offenen Leserahmens bewirken (Insertionen oder Deletionen) oder Spleiß-Stellen betreffen (Substitutionen). Die bisher bekannten Punktmutationen im *NDP*-Gen sind anhand ihrer Position im NDP-Protein in Abbildung 4 zusammengestellt.

Ein detaillierter Genotyp-Phänotyp-Vergleich in Patienten mit definierten Veränderungen im *NDP*-Gen bestätigte die klinisch beobachtete, phänotypische Variabilität des Norrie-Syndroms. Es konnte nicht nur bestätigt werden, dass die geistige Behinderung und die progressive sensorisch-neuronale Taubheit pleiotrope Effekte von Mutationen innerhalb des *NDP*-Gens mit variabler Ausprägung sind, sondern auch dass eine bemerkenswerte Variabilität des okulären Phänotyps vorhanden ist. Mehr noch, Missense-Mutationen wurden nicht nur bei Patienten mit klassischem Norrie-Syndrom sondern auch bei Patienten mit X-chromosomal rezessiv vererbter familiärer und sporadischer exsudativer Vitreoretinopathie (EVR) und fortgeschrittener Frühgeborenenretinopathie (retinopathy of prematurity, ROP, Stadien 4B and 5) identifiziert (Chen et al., 1993a; Shastry et al., 1997c; Shastry et al., 1997a). Kürzlich wurde sogar eine somatische Mutation im *NDP*-Gen in einem Patienten mit

Morbus Coats, einer segmentalen, einseitigen Form retinaler Telangiektasie, beschrieben [(Black et al., 1999), Abbildung 4].

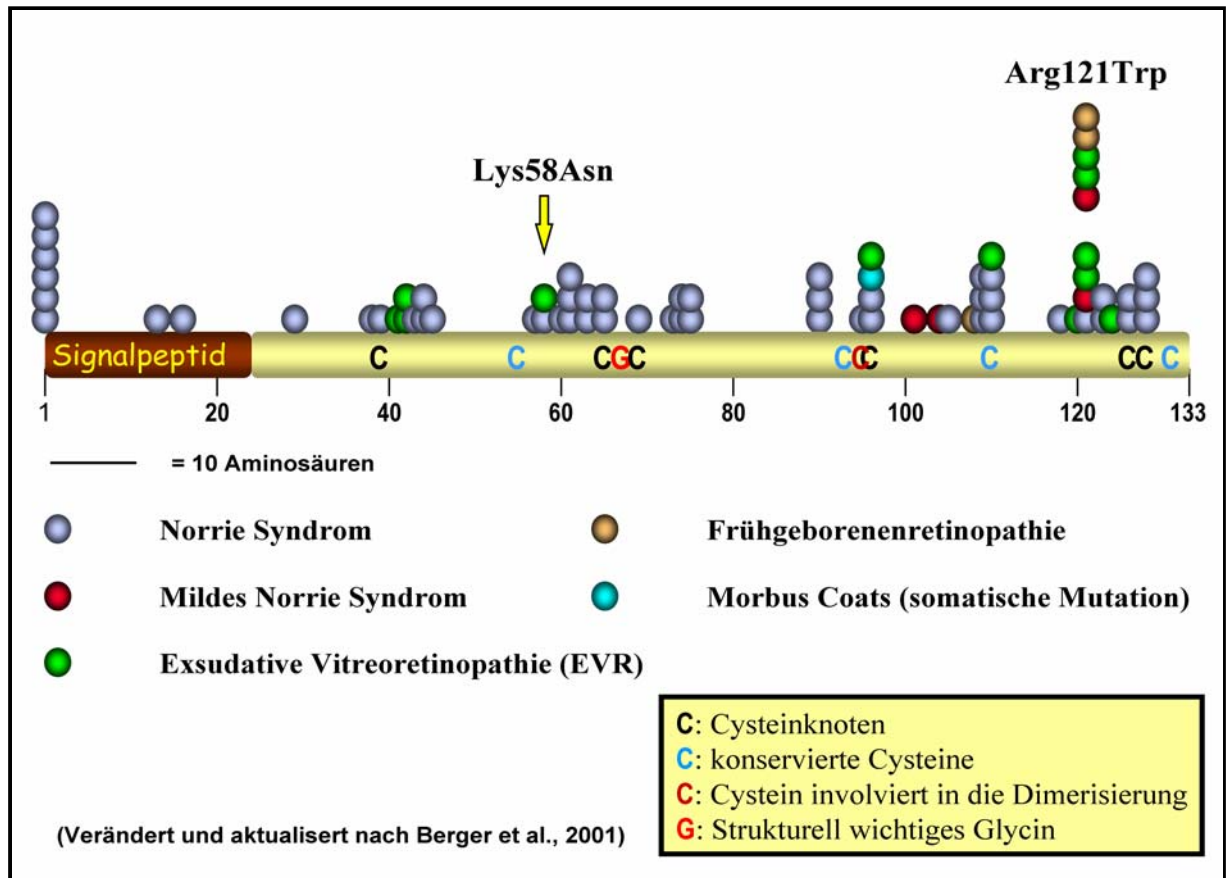


Abbildung 4: Phänotypische Variabilität von Punktmutationen im NDP-Gen. Mutationen im *NDP*-Gen können zum klassischen Norrie-Syndrom, einer familiären oder sporadischen exsudativen Vitreoretinopathie, zur Frühgeborenenretinopathie oder zu Morbus Coats führen. Die Ausprägung des Phänotyps innerhalb einer Familie kann sehr variabel sein. Da identische Mutationen in verschiedenen Familien zu unterschiedlichen Krankheitsbildern führen können, ist keine klare Korrelation des Genotyps mit dem Phänotyp zu erkennen. Die Publikationen der einzelnen klinischen Fälle und die zugehörigen Mutationen sind im Anhang 10.1 dieser Arbeit in einer Tabelle zusammengestellt. Der in der Tabelle aufgeführte Polymorphismus (c.189C>A; Ala63Ala), der mit ROP assoziiert zu sein scheint, ist hier nicht dargestellt. Die Abbildung wurde einer Publikation (Berger and Ropers H.-H., 2001) entnommen und ist hier in aktualisierter und veränderter Form dargestellt (Stand: 15.09.04).

Eine dieser Mutationen im *NDP*-Gen ist zum Beispiel eine Arg->Trp Mutation im Kodon 121 des *NDP*-Gens, die zu einem weniger schweren Phänotyp, wie entweder einer milderen Form des Norrie-Syndroms, zu exsudativer Vitreoretinopathie oder Frühgeborenenretinopathie führt (Bergen et al., 1994; Meindl et al., 1995; Shastry et al., 1997b; Shastry et al., 1997c). An derselben Position hat man aber auch eine Arg->Gln Mutation sowohl in Patienten mit mildem als auch mit klassischem Norrie-Syndrom gefunden, wie z.B. in einer spanischen Familie mit 11 betroffenen Männern, die blind geboren wurden und das voll ausgeprägte klinische Bild des Norrie-Syndroms zeigen (Fuentes et al., 1993). Vergleichbar zu der

Situation an dieser Position kann auch die Lys->Asn Mutation an Position 58 in einer Familie zum klassischen Norrie-Syndrom führen und in einer anderen Familie zur exsudativen Vitreoretinopathie (Fuentes et al., 1993; Shastry et al., 1997a). Neben diesen beiden Mutationen wurde kürzlich eine weitere Mutation im *NDP*-Gen (Leu61Phe) in einer großen costa-rikanische Familie identifiziert. Die von dieser Mutation betroffenen 15 Männer zeigen kongenitale Blindheit und progressiven Hörverlust sowie eine periphere Veneninsuffizienz. Neben den klassischen Symptomen des Norrie-Syndroms konnte gezeigt werden, dass auch die Veneninsuffizienz mit der Mutation im *NDP*-Gen innerhalb der Familie segregiert (Rehm et al., 1997). Obwohl alle diese Befunde nahe legen, dass die Genotyp-Phänotyp-Korrelation nicht stringent ist und die Mutationen im *NDP*-Gen pleiotrope Effekte haben, ist bisher noch nicht beobachtet worden, dass innerhalb einer Familie das klinische Erscheinungsbild vom z.B. dem Norrie-Syndrom sich hin zur EVR verändert hätte. Zusammenfassend legt dies die Beteiligung zusätzlicher modifizierender Gene und Umweltfaktoren in der Pathogenese des Norrie-Syndroms und seiner allelischen Erkrankungen nahe.

1.2.3 Klinische Gemeinsamkeiten der allelischen Erkrankungen und deren genetische Grundlagen

Alle vier Erkrankungen, die mit Mutationen im *NDP*-Gen assoziiert worden sind, das Norrie-Syndrom, die familiäre exsudative Vitreoretinopathie (FEVR), die Frühgeborenenretinopathie (retinopathy of prematurity; ROP) und Morbus Coats zeigen auch klinisch Gemeinsamkeiten. Ganz charakteristisch für diese Erkrankungen sind die Veränderungen im Blutgefäßsystem des Auges und in der Retina. Allerdings ist das Spektrum dieser Defekte sehr groß und erstreckt sich beim Norrie-Syndrom von einem vaskularisierten Pseudogliom mit einer gleichzeitigen Persistenz von fötalen, hyaloiden Blutgefäßen, assoziiert mit vitreoretinalen Einblutungen, bis hin zu einer komplett avaskulären Retina. Bei FEVR-Patienten ist das Spektrum der Veränderungen ebenfalls sehr variabel, wobei das charakteristische Merkmal eine beidseitige, unvollständige Vaskularisierung der peripheren Retina ist (Criswick and Schepens, 1969; van Nouhuys, 1991). Dies führt in einigen FEVR-Patienten nicht zur Beeinträchtigung des Sehens und kann dann nur mit Hilfe der Fluoreszenzangiographie diagnostiziert werden, während es bei anderen Patienten zu einer retinalen Ischämie mit sekundären Komplikationen kommt. Dabei können undichte Blutgefäße an der Grenze zu der nicht vaskularisierten Retina entstehen, die zu subretinalen Exsudaten führen können. Eine mögliche Rückbildung dieser pathologischen, durch Neovaskularisation entstandenen Blutgefäße führt zu Narbengewebe, durch das Zugkräfte auf die Retina entstehen, so dass es

in schweren Fällen (20%) zu einer teilweisen oder kompletten Ablösung der Retina mit nachfolgender Blindheit kommt (Benson, 1995; van Nouhuys, 1991). Ganz ähnliche Symptome mit einer hohen Variabilität im klinischen Bild, wie sie hier für das Norrie-Syndrom und die FEVR beschrieben worden sind, werden sowohl in Fällen von Frühgeborenenretinopathie als auch beim Morbus Coats, einer einseitigen Form (zu 80%) einer segmentalen Telangiektasie mit Blutgefäßdefekten und subretinalen sowie intraretinalen Exsudaten, beobachtet. Interessanterweise sind aber die hier neben dem Norrie-Syndrom beschriebenen anderen drei Krankheiten, die ebenfalls durch Mutationen im *NDP*-Gen hervorgerufen werden, nicht mit geistiger Behinderung oder progredienter Taubheit assoziiert, so dass diese exklusive Symptome des Norrie-Syndroms sind.

Der hier beschriebene retinale Phänotyp mit seiner hohen Variabilität in *NDP*-Mutationsträgern (Berger, 1998) wurde auch in einigen wenigen heterozygoten *NDP*-Mutationsträgerinnen beschrieben (Chen et al., 1993b; Shastry et al., 1999; Yamada et al., 2001). Zudem wurde ein transplazentaler Effekt eines mutierten Genprodukts beobachtet, wobei genotypisch gesunde, männliche Nachkommen von Konduktorinnen Defekte in der Blutgefäßentwicklung der Retina aufwiesen (Mintz-Hittner et al., 1996). Dieser transplazentale Effekt und die mit einer Mutation im *NDP*-Gen assoziierte, periphere Veneninsuffizienz in einer Familie könnten auf eine generellere Rolle des NDP-Proteins (Norrin) in der Blutgefäßentwicklung hinweisen.

Nimmt man alle diese Beobachtungen zusammen, so ist das Norrie-Syndrom als ein wertvolles und interessantes Modell für die Blutgefäßentwicklung insbesondere, aber nicht nur, in der Retina anzusehen. Insbesondere spielen für die Ausprägung des Phänotyps des monogenetischen Norrie-Syndroms weitere genetische oder Umweltfaktoren eine wesentliche Rolle und nehmen dabei Einfluss auf die Entwicklung des klinischen Phänotyps hin zu der einen oder der anderen Erkrankung. Die Identifizierung dieser Faktoren wird es ermöglichen, die gemeinsamen Grundlagen der vier allelischen Erkrankungen besser zu verstehen.

Die bisher bekannten genetischen Faktoren, die in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnten, sind die Gene, deren Mutation zu familiärer exsudativer Vitreoretinopathie führen. Diese Erkrankung ist genetisch heterogen und kann autosomal dominant, autosomal rezessiv und X-chromosomal rezessiv vererbt werden, wobei die autosomal dominanten Formen die häufigsten sind. Neben dem *NDP*-Gen auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (*Xp11.4*), das auch der Locus *EVR2* für die zum Norrie-Syndrom allelische Form der familiären X-chromosomal rezessiv vererbten exsudativen Vitreoretinopathie (*EVR2*) ist (Chen et al., 1993a), welcher für etwa 15% aller EVR-Fälle verantwortlich ist, gibt es zusätzlich noch zwei

autosomal, dominante Loci, die mit *EVR1* auf Chromosom 11q (q = lange Arm des Chromosoms) und mit *EVR3* auf Chromosom 11p (p = kurzer Arm des Chromosoms) kartieren. Für den Locus *EVR1* konnte *FZD4* als das defekte Gen identifiziert werden. Dieses Gen kodiert für *Frizzled-4*, einen sieben Transmembran-Domänen-Rezeptor, der Wnt-Proteine als Liganden bindet (Robitaille et al., 2002). Erst kürzlich wurde im selben Locus ein weiteres Gen identifiziert, welches ebenfalls Mutationen in Familien mit EVR zeigte (Toomes et al., 2004a). Dieser neue Locus wurde auch als *EVR4* bezeichnet, da eine feinere Kartierung das Gen *FZD4* als Ursache ausschloss (Toomes et al., 2004b). Bei dem dann identifiziertem Gen handelt es sich um den Ein-Transmembran-Domänen-Rezeptor *LRP5* (LDL related protein 5), der als Korezeptor für Rezeptoren der Frizzled-Familie fungiert. In beiden Genen zusammen wurden in etwa 35 % der FEVR-Fälle Mutationen gefunden (15% *LRP5* und 20% *FZD4*). Demnach müssen Mutationen in weiteren Genen an der Entwicklung von autosomal dominanter FEVR beteiligt sein (Toomes et al., 2004a). Diese sollten zumindest zum Teil im dritten autosomal dominanten Locus *EVR3* (neben *EVR1* und *EVR4*) liegen, der ein 14 cM Intervall zwischen den Markern GATA34E08 und D11S4102 umfasst und auf Chromosom 11p12-13 liegt (Downey et al., 2001). Außerdem wurden neben der zu Norrie allelischen X-chromosomalen Form (*EVR2*) und den autosomal dominanten (*EVR1*, *EVR3*, *EVR4*) Formen der FEVR durch Shastry und Trese in einer Familie ein weiterer X-chromosomal rezessiver Erbgang und durch De Crecchio in zwei weiteren Familien ein autosomal rezessiven Erbgang beschrieben, die beide mit einem früheren Beginn und einem schwereren Verlauf der Erkrankung assoziiert zu sein scheinen (de Crecchio et al., 1998; Shastry et al., 1997b). Dabei wurden für den X-chromosomal rezessiven Erbgang Mutationen in den Spleißstellen und den Exons des *NDP*-Gens ausgeschlossen, so dass dieses Gen in der Familie nur noch mit einer geringen Wahrscheinlichkeit als Kandidatengen in Frage kommt.

Die verschiedenen beschriebenen Erbgänge für die FEVR, zusammen mit den drei schon identifizierten Genen (*NDP*, *FZD4* und *LRP5*) sowie die zusätzlichen Loci, für die die Identifikation von Kandidatengen noch ausstehen, machen somit, zusammen mit der hohen phänotypischen Variabilität und dem allelischen Auftreten des Norrie-Syndroms, nochmals die genetischen Heterogenität der FEVR aber auch die phänotypische Variabilität von Mutationen im *NDP*-Gen deutlich. Diese genetisch bedingte Variabilität der klinischen Krankheitsbilder wird nochmals komplexer, wenn man bedenkt, dass auch 3% der Frühgeborenenretinopathie (retinopathy of prematurity; ROP) mit Mutationen im *NDP*-Gen assoziiert worden sind (Hiraoka et al., 2001; Shastry et al., 1997c). Dabei handelt es sich um eine vasoproliferative Erkrankung des Auges, die hauptsächlich Frühgeborene (< 33 Woche

der Schwangerschaft) mit einem niedrigen Geburtsgewicht (<1500 g) betrifft, bei denen die Blutgefäßentwicklung im Auge bei Geburt noch nicht abgeschlossen ist. Sie führt in schweren Formen zu starken Einschränkungen des Sehens bis hin zur Blindheit, wobei das phänotypische Erscheinungsbild, das unter retrolentale Fibroplasien (Leukokorie) zusammengefasst wird, dem von Norrie und FEVR sehr stark ähnelt. Die ROP entwickelt sich normalerweise in zwei Phasen, einer akuten Phase, in der nach der Frühgeburt zwischen der 32-34.ten Woche die normale Entwicklung der Blutgefäße durch eine relative Hyperoxie in der extrauterinen Umgebung gestört wird. Dadurch kommt es zur Vasoobliteration, was das Fehlen von Blutgefäßen und eine fehlende Vaskularisierung bestimmter Teile, insbesondere der Peripherie der Retina beschreibt. Die dadurch entstehende lokale Unterversorgung mit Sauerstoff der Retina verursacht dann die sekundäre, chronische Phase der ROP. Diese ist charakterisiert durch die Proliferation von Blutgefäßzellen und Gliazellen und der Entwicklung von neuen Blutgefäßen durch den Prozess der Neovaskularisation. Diese Blutgefäße können dann zu retinalen oder Glaskörper-Einblutungen und durch die Entwicklung von Narbengeweben bei einer möglichen Regression der Gefäße in schweren Formen auch zur teilweisen oder kompletten Ablösung der Retina und somit zur Blindheit führen (Mechoulam and Pierce, 2003). Somit entwickelt sich die ROP hauptsächlich aufgrund von umweltbedingten Einflüssen (Zeitpunkt der Geburt, Sauerstofftherapie), wobei eine genetische Prädisposition durch Mutationen im *NDP*-Gen für einen Teil der ROP-Patienten nahe zu liegen scheint. Eine ähnliche Rolle des *NDP*-Gens könnte auch für Morbus Coats zutreffen, so dass alle vier Erkrankungen und die Ausprägung ihrer variablen, klinischen Erscheinungsbilder (Norrie, FEVR, ROP und Morbus Coats) in unterschiedlichem Maße von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren, wie der Sauerstoffversorgung, während der Entwicklung, abhängen.

1.3 Eigenschaften des vorhergesagten NDP-Proteins (Norrin)

Um dieses Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren besser zu verstehen, sind zunächst Kenntnisse über die Struktur, Lokalisierung und Funktion der einzelnen beteiligten Proteine notwendig. Für das Norrie Disease Pseudoglioma-Protein (Norrin) und dessen mögliche Lokalisation und Funktion lieferte die experimentell nicht bewiesene Vorhersage der dreidimensionalen Struktur des Proteins erste Hinweise. Die aus der cDNA abgeleitete Proteinsequenz des humanen Norrins (NDP) von 133 Aminosäuren (Maus Ndph: 131 Aminosäuren) beinhaltet zwei charakteristische Domänen, ein aminotermiales Signalpeptid bestehend aus 24 Aminosäureresten und eine Cystein-reiche carboxyterminale Domäne

[(Meindl et al., 1992), Abbildung 5A]. Beide Proteindomänen sprechen dafür, dass es sich bei Norrin um einen sekretierten, extrazellulären Wachstumsfaktor der TGF β -Superfamilie handelt (Vitt et al., 2001). Einerseits spricht das Vorhandensein eines Signalpeptids für eine Sekretion von Norrin in den extrazellulären Raum. Andererseits weist die Ähnlichkeit der C-terminalen Domäne in Anzahl und Abstand der konservierten Cysteinreste (Abbildung 5B) als auch die Computermodell-Daten für die NDP-Struktur (Abbildung 5C) auf ein Cystinknoten-Motiv extrazellulärer Wachstumsfaktoren (Haider et al., 2001) der TGF β -Familie hin (Meitinger et al., 1993). Die Einordnung Norrins in diese Familie wird dadurch unterstützt, dass viele der pathogenen Mutationen konservierte Cysteinreste betreffen, so dass die dreidimensionale Struktur des Cystinknotens zerstört würde und damit der Funktionsverlust des Norrins erklärt werden könnte (Abbildung 4; Abbildung 5).

Die Homologie zu den Cystinknotenproteinen und die dadurch erfolgte Klassifizierung des Norrins in die Untergruppe der Muzin-ähnlichen Proteine (Vitt et al., 2001) sowie der Nachweis einer Assoziation mit der extrazellulären Matrix (Perez-Vilar and Hill, 1997) sind somit die ersten Hinweise auf eine mögliche Funktion des Norrins als extrazelluläres Signalmolekül. Alternativ oder zusätzlich könnte Norrin eine Rolle in der Organisation der extrazellulären Matrix spielen.

Die Ursache für den Mangel an Informationen über die Funktion des Norrins liegt insbesondere im Fehlen eines Antikörpers, der den Nachweis des Proteins und die Anwendung vieler experimenteller Techniken ermöglichen würde. Die rekombinante Expression und die Herstellung eines Antikörpers gegen das Protein würden also einen wichtigen Beitrag zur Erforschung der Funktion leisten und waren deshalb Ziel dieser Arbeit.

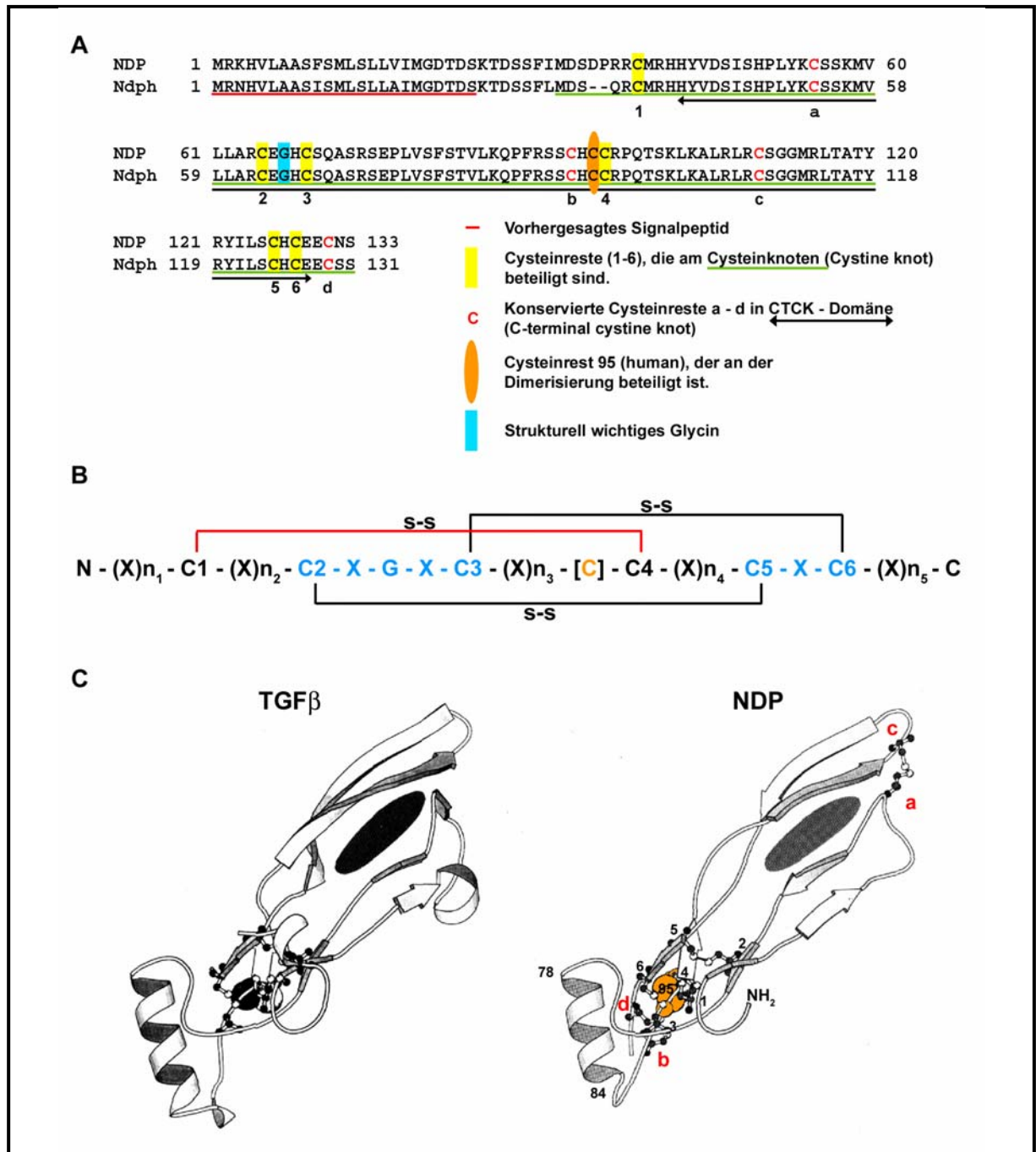


Abbildung 5: Proteinstrukturvorhersage für Norrin. **A:** Aus der cDNA-Sequenz abgeleitete Aminosäure(AS)sequenz für Norrin bei Mensch (NDP; 133 AS) und Maus (Ndph; 131 AS). Die orthologen Proteine zeigen eine Sequenzidentität von 93% und bestehen aus einem Signalpeptid und einem konservierten Cystinknoten mit einer CTCK-Domäne („C-terminal cystine knot“). **B:** Konsensussequenz für das 10 AS-Cystinknotenmotiv. Es besteht aus 8 AS (blau; inklusive 4 konservierten Cysteinen (C2,3,5,6) und einem konservierten Glycin), die über zwei Disulfidbrücken (schwarz) einen Ring bilden. Zwei weitere konservierte Cysteine (C1, C4) bilden die Cysteinbrücke (rot), die durch den Ring verläuft und den „Knoten“ formt. Der Cysteinrest 95 in NDP (orange) ist an der intermolekularen Dimerisierung beteiligt. **C:** „Ribbon“-Diagramm der experimentellen 3D-Struktur von TGFβ und des 3D-Modells von NDP (verändert nach Meitinger et al., 1993). Die Bezeichnung der Cysteinreste entspricht der in A. Die schwarze Fläche markiert die ungefähre Lage der hydrophoben AS auf einer Seite der β-Faltblätter. Die Zahlen bezeichnen die Position der AS im Norrin.

1.4 Das *Ndph*-knockout-Mausmodell

Die Phänotypen der vier allelischen Erkrankungen weisen darauf hin, dass die verschiedenen Mutationen im *NDP*-Gen eventuell zusammen mit Veränderungen in anderen Genen oder Umweltfaktoren primär einen wesentlichen Einfluss auf die Blutgefäßentwicklung im Auge haben. Daher handelt es sich bei dem Norrie-Syndrom um ein monogenetisches Modell für vasoproliferative Erkrankungen des Auges, welches die Chance bietet, ein grundlegendes Verständnis nicht nur der Rolle des Norrins in der Entwicklung und der Pathologie des Norrie-Syndroms zu erlangen, sondern auch grundsätzliche Pathogenesemechanismen von vasoproliferativen Erkrankungen des Auges zu identifizieren. Um diese Prozesse *in vivo* untersuchen zu können, wurde ein ND (Norrie disease)-Mausmodell hergestellt.

1.4.1 Die Herstellung eines Mausmodells für das Norrie-Syndrom und die Expression des Norrie-Gens in Mausgewebe

Das *Ndph* (Norrie disease pseudoglioma homolog)-Gen wurde dazu mit Hilfe gerichteter homologer Rekombination in Mäusen gezielt ausgeschaltet, indem das Startkodon sowie der folgende Teil von Exon 2, inklusive der Spleißdonorstelle, durch eine Neomycinkassette ersetzt wurde. Dadurch wurde die kodierende Sequenz für die ersten 56 AS entfernt und ein Knockout-Mausmodell für das Norrie-Syndrom etabliert (Berger et al., 1996). Das Maus-Ortholog *Ndph* besteht aus drei Exons und kodiert ein Polypeptid von 131 Aminosäuren. Der Sequenzvergleich zwischen dem Mausprotein *Ndph* und dem humanen Ortholog *NDP* (Norrin) ergab eine 93%ige Identität (Berger et al., 1996).

Die gewebespezifische Expression von *Ndph* wurde mittels RNA-*in situ* Hybridisierung untersucht. Eine Expression wurde in der inneren nukleären Schicht und der Ganglienzellschicht der Retina, in den Purkinjezellen des Kleinhirns (Cerebellum) und in den mitralen und sensorischen Zellschichten des olfaktorischen Epithels in 2 Wochen alten Tieren nachgewiesen (Berger et al., 1996). In der Cochlea von Mäusen ist die *Ndph*-Genexpression limitiert auf die Spiralganglionzellen und die Stria vascularis und ist zeitlich im Vergleich zur Retina stark verzögert (Chen et al., 1998).

1.4.2 Phänotypische Charakterisierung des Mausmodells

Die zu Beginn meiner Arbeit vorhandene, phänotypische Charakterisierung des Mausmodells zeigte, dass sich die Augen hemizygoter Mäuse der *Ndph*-knockout-Linie makroskopisch normal entwickeln und zumindest bis zu einem Alter von 2 Jahren und 3 Monaten keine

okuläre Atrophie zeigen. Initiale ophthalmologische Untersuchungen wurden mit der Spaltlampe (Bioophthalmoskopie) 3 Wochen nach der Geburt durchgeführt. Es wurden präzipitatahnliche Strukturen im Glaskörper beobachtet, die in den Wildtyp-Mäusen nicht vorhanden waren (Berger et al., 1996). Histologische Daten, gewonnen an Mauseugen, die zwischen der vierten und 26.ten Woche präpariert worden sind, zeigten in allen Augen, dass Blutgefäße in der hinteren Augenkammer vorhanden und von bindegewebigem Material umgeben sind (Berger et al., 1996; Richter et al., 1998).

Eine weitere Beobachtung war die generelle Desorganisation der retinalen Ganglienzellschicht in hemizygoten Mäusen, wobei einige der Kerne der Ganglienzellen in die innere plexiforme Schicht eingewandert zu sein scheinen. Zusätzlich ist eine Reduktion der Ganglienzellzahl ab dem Stadium P14 (postnataler Tag 14) beobachtet worden.

Während diese Veränderungen der Ganglienzellschicht sich über die ganze Retina erstrecken, zeigen die Veränderungen, die die äußere nukleäre Schicht, die äußere plexiforme Schicht und die Außensegmente der Photorezeptorzellen betreffen, eine eher lokale Verteilung. Generell ist die Retina aber normal differenziert und die Erkrankung zeigt einen klar progressiven Verlauf in älteren Tieren. Kürzlich wurde eine drastische Reduktion aller retinaler Schichten, besonders der Photorezeptoren, in zwei Jahre alten, männlichen Knockout-Mäusen (*Ndph*^{v/-}) beschrieben. Ebenso spiegelte die Abwesenheit vieler photorezeptorspezifischer Gentranskripte diesen Befund wider (Lenzner et al., 2002). Dies zeigt deutlich, dass auch in der *Ndph*-knockout-Maus, wie in Patienten, die Erkrankung einen progressiven Verlauf nimmt. Allerdings sind in den mutierten Mäusen die Veränderungen im Glaskörper generell milder als in Patienten mit dem Norrie-Syndrom, aber die retinale Histologie offenbart klare Ähnlichkeiten zwischen dem Phänotyp der Maus und dem klinischen Bild im Menschen, besonders die Fehlentwicklung der Ganglienzellschicht und die fokalen Veränderungen in der äußeren nukleären und in der Photorezeptor-Schicht ähneln diesem sehr. Elektroretinogramme (ERG's) hemizygoter *Ndph*^{v/-}-Mäuse zeigen einen schwerwiegenden Verlust der b-Welle, was zu einem negativen scotopischen ERG and einer deutlichen Reduktion des oszillatorischen Potentials führt (Ruether et al., 1997). Die a-Welle ist normal bei niedrigen Blitzlicht Intensitäten, während sich eine moderate Reduktion der Amplitude bei helleren Lichtblitzen zeigte.

Insgesamt legen diese Daten einen schweren Defekt in der inneren Retina mit ihren Neuronen und Gliazellen nahe, während die Photorezeptoren und das retinale Pigmentepithel eher sekundär betroffen zu sein scheinen. Zusätzlich zu diesen okulären Symptomen zeigen die

Ndph^{y/-}-Mäuse ebenso wie die Patienten einen progressiven Hörverlust (Chen et al., 1998; Rehm et al., 2002).

Detaillierte Untersuchungen der Retina und der Cochlea ergaben ein abnormales Blutgefäßsystem in beiden Geweben (Rehm et al., 2002; Richter et al., 1998). In der inneren Retina der *Ndph*^{y/-}-Mäuse sind weniger periphere Gefäße und ein abnormaler Gefäßdurchmesser bei Tieren des Stadiums p9 (postnataler Tag 9) zu beobachten. Ähnliche Veränderungen sind auch in der Cochlea beschrieben worden. Die primäre Läsion ist dort in der Stria vascularis lokalisiert, die für einen Großteil der Blutversorgung der Cochlea verantwortlich ist und die Endolymphe, eine kaliumreiche eher dem intrazellulären Milieu ähnelnde, wässrige Lymphe, die den Ductus cochlearis ausfüllt, produziert. Durch Perfusion mit FITC-markiertem Dextran konnte in der Stria vascularis eine generelle Desorganisation der Blutgefäße und ein Fehlen eines normal entwickelten Kapillarnetzes nachgewiesen werden (Rehm et al., 2002). Somit gilt für beide Organe, die Retina und die Cochlea, dass sowohl die Blutgefäße abnormale Durchmesser haben als auch, dass das Kapillarnetzwerk fehlt. Diese vaskulären Defekte treten in den *Ndph*^{y/-}-Tieren in beiden Organen genau dort auf, wo im Wildtyp das *Ndph*-Gen exprimiert wird (Berger et al., 1996; Chen et al., 1998).

Zusammenfassend implizieren die Veränderungen in der *Ndph*-knockout-Maus eine Rolle des Norrins in der Blutgefäßentwicklung und bestätigen so die Befunde bei Patienten mit ND, EVR, ROP und Morbus Coats.

1.5 Die retinale Blutgefäßentwicklung in Mensch und Maus

Somit scheint die gestörte Blutgefäßentwicklung in der Retina tatsächlich ein ganz zentraler Prozess in der Pathogenese des Norrie-Syndroms, aber auch in der der anderen vasoproliferativen Erkrankungen (F)EVR, ROP und Morbus Coats zu sein. Für ein besseres Verständnis soll hier die Entwicklung des retinalen Blutgefäßsystems in Mensch und Maus sowie deren molekulare Grundlagen kurz dargestellt werden.

1.5.1 Die Entwicklung der retinalen Blutgefäße in Mensch und Maus

Blutgefäße entstehen und entwickeln sich durch zwei Prozesse, die als Vaskulogenese und Angiogenese bezeichnet werden. Während der Vaskulogenese differenzieren sich Endothelzellen aus im Gewebe verteilten, pluripotenten Vorläuferzellen (Angioblasten) und verbinden sich zu Blutgefäßen. Dahingegen entstehen bei der Angiogenese durch die

Verzweigung („sprouting“) schon vorhandener Gefäße neue Blutgefäße, die dann in das zu versorgende Gewebe einwachsen.

Während der frühen, fötalen Entwicklung des menschlichen Auges (vierte bis fünfte Schwangerschaftswoche) bildet sich zunächst die hyaloide Arterie und daraus das hyaloide Blutgefäßnetzwerk, welche durch die zentrale Retinaarterie gespeist werden. Dieses hyaloide Blutgefäßnetzwerk liefert die notwendigen Nährstoffe und den Sauerstoff für die nachfolgende Entwicklung der Retina und der Linse und bildet sich dann durch einen graduellen Prozess zwischen der 18.ten und der 29.ten Schwangerschaftswoche zurück (Achiron et al., 2000). Diese Regression erfolgt parallel zur Entwicklung der retinalen Blutgefäßsysteme, die die Versorgung der vollständig ausdifferenzierten Retina übernehmen. Die normale Entwicklung der retinalen Blutgefäße beginnt in der 14.ten bis 15.ten Schwangerschaftswoche und scheint im Menschen durch eine Kombination von Vaskulogenese und Angiogenese zu erfolgen (Hughes et al., 2000; Provis, 2001). Allerdings ist die Beteiligung der Vaskulogenese umstritten, da keine Angioblasten in der sich entwickelnden Retina nachgewiesen wurden (Gariano, 2003). Zunächst beginnen sich die ersten Gefäße des oberflächlichen Netzes zwischen der Nervenfaserschicht und der retinalen Ganglienzellschicht um die Eintrittsstelle des optischen Nervens zu bilden, von wo sie dann, in derselben Schicht, in Richtung Peripherie der Retina auswachsen. Seine maximale Ausdehnung bis hin zu 1-2 mm innerhalb der ora serrata erreicht dieses oberflächliche oder auch primäre Netzwerk im Menschen zwischen der 37.ten und 40.ten Schwangerschaftswoche, also kurz vor der Geburt. Unbestrittener Maßen ist für die Zunahme der Gefäßdichte und das Auswachsen des primären Blutgefäßsystem in Richtung Peripherie der Retina der Prozess der Angiogenese verantwortlich (Chan-Ling et al., 2004; Hughes et al., 2000), der auch für die Bildung der beiden tiefen Netzwerke des retinalen Blutgefäßsystems, des intermediären und des tiefen Netzwerks, verantwortlich ist. Diese tiefen Netzwerke werden in zwei Schritten gebildet. Zuerst, in etwa von der 27.ten/28.ten Schwangerschaftswoche an, wachsen die Kapillaren vom primären Netzwerk aus, passieren die innere plexiforme Schicht und bilden ein neues Netzwerk zwischen der inneren plexiformen und der inneren nukleären Schicht (intermediäre Netzwerk). Mit weiterem Wachstum und dem Dickenwerden der Schichten und einem somit höheren Sauerstoffbedarf wachsen in einem zweiten Schritt von diesem intermediären Netzwerk aus Kapillaren durch die innere nukleäre Schicht hindurch und bilden an der Grenze zur äußeren plexiformen Schicht das tiefe Netzwerk, welches in der 34.ten Woche etwa 20% der Retina bedeckt. Beide Netzwerke bilden sich zunächst im Bereich des Sehnervs und in besonderer Form im Bereich der Fovea,

die aber selbst avaskulär bleibt, und entwickeln sich dann bis zur Geburt bis in die Peripherie der Retina (Provis, 2001).

Prinzipiell erfolgt die Entwicklung der retinalen Blutgefäßversorgung in der Maus (Abbildung 6) sehr ähnlich zu der des Menschen, auch wenn sie im Gegensatz zu dieser nicht bei Geburt abgeschlossen ist, sondern zwischen den postnatalen Stadien p0 und p20 erfolgt (Connolly et al., 1988; Fruttiger, 2002).

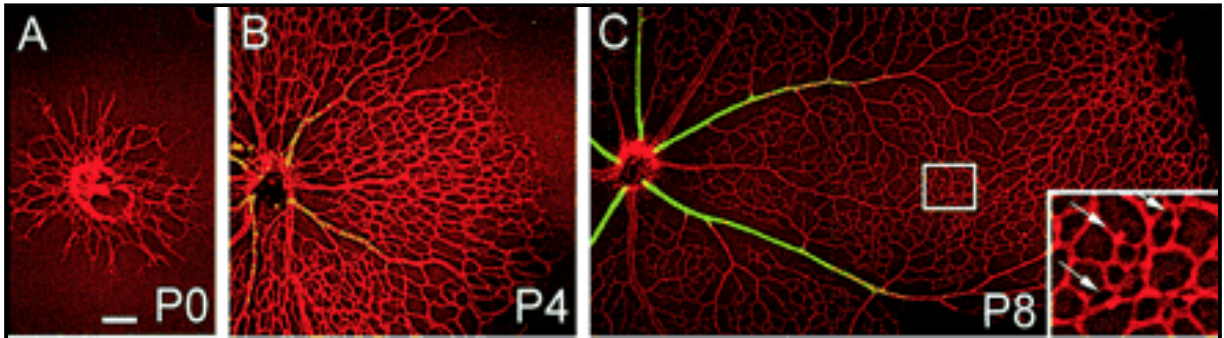


Abbildung 6: Entwicklung der retinalen Blutgefäße zwischen p0 und p8 visualisiert durch Fluoreszenzimmunhistochemie. Die Gefäße des oberflächlichen retinalen Blutgefäßsystems wachsen zwischen p0 und p8 in Richtung Peripherie aus (A-C). Dabei sind die Arterien (grün) alternierend zu den großen Venen angeordnet (p8; C). Die Ausbildung der tiefen Netzwerke (nach p7) lässt sich an den kleinen Verdickungen (weiße Pfeile; C) erkennen, die von in die Tiefe einwachsenden retinalen Kapillaren stammen und in den „Whole mount“-Präparaten nur so zu identifizieren sind (nach Fruttiger, 2002). Maßstab: 100 µm.

Dabei bilden sich die ersten Blutgefäße des primären Netzwerkes in der Retina ausgehend von einem ringförmigen Gefäß an der Eintrittsstelle des optischen Nerven am postnatalen Tag p0 (Abbildung 6A). Dieses primäre Netzwerk wächst Richtung Peripherie aus und bedeckt etwa die Hälfte der Retina an p4 (Abbildung 6B) und erreicht die Peripherie etwa nach einer Woche (p7 bis p10). Zu diesem Zeitpunkt (p8) ist die alternierende Anordnung der Arterien (grün) und Venen festgelegt (Abbildung 6C).

Nach p7 bilden sich feine Kapillaren aus, wachsen ausgehend vom oberflächlichen Netzwerk senkrecht in die tieferen Schichten der Retina ein und bilden das intermediäre Netzwerk in der inneren plexiformen Schicht (weiße Pfeile; Ausschnitt Abbildung 6C). Ebenso entwickelt sich dann auch das tiefe Netzwerk an der Grenze zwischen der inneren Körnerschicht und der äußeren plexiformen Schicht. Nach dem Entwicklungsstadium p12 reifen die drei retinalen Kapillarnetzwerke (oberflächliches, intermediäres und tiefes) durch den Prozess der Angiogenese und erreichen ein adultes Erscheinungsbild etwa an p20 (Connolly et al., 1988).

1.5.2 Die Rolle der an der retinalen Blutgefäßentwicklung beteiligten Zelltypen

Welche zellulären und molekularen Prozesse der im vorherigen Kapitel beschriebenen Entwicklung der retinalen Blutgefäßsysteme zugrunde liegen, soll in diesem Abschnitt kurz beschrieben werden.

Die wichtigsten Zelltypen, die bei der Blutgefäßentwicklung in der Retina eine Rolle spielen, sind die Endothelzellen, die Perizyten und zwei Typen Gliazellen, die Astrozyten und die Müllerzellen.

Retinale Endothelzellen bilden die Blutgefäße und sind im Gegensatz zu den Endothelzellen vieler anderer Gewebe besonders spezialisiert, so dass sie die Blut-Retina-Schranke bilden können. In reifen Blutgefäßen sind die Endothelzellen umgeben von Perizyten. Diese Zellen exprimieren in relativ hohem Maße „alpha-smooth muscle actin“ (α SMA), das Aktin der glatten Muskelzellen, was auf eine kontraktile Funktion der Zellen und eine regulatorische Funktion für die Kontrolle des Blutflusses hinweist. Gleichzeitig scheinen die Perizyten eine Funktion in der Kontrolle der Endothelzellproliferation zu haben und für die Stabilisierung retinaler Blutgefäße wichtig zu sein (Benjamin et al., 1998; Hirschi and D'Amore, 1996).

Eine besondere und wesentliche Funktion für die Entwicklung der retinalen Blutgefäßsysteme fällt den Gliazellen der Retina zu, den Astrozyten und den radial in der ganzen Retina angeordneten Müllerzellen (Abbildung 7). Beide Zelltypen exprimieren während der Entwicklung der Blutgefäßsysteme VEGF (vascular endothelial growth factor) unter den lokalen, hypoxischen (Sauerstoffmangel) Bedingungen und kontrollieren durch diesen angiogenen Faktor die Endothelzell-Migration, die Proliferation und das Überleben dieser Zellen. Sie induzieren so die Entwicklung des Endothelzellnetzwerkes, welches sich in der oberflächlichen Schicht in enger Assoziation mit dem Astrozytennetzwerk und in den tiefen Schichten in Assoziation mit den Müllerzellen entwickelt (Abbildung 7).

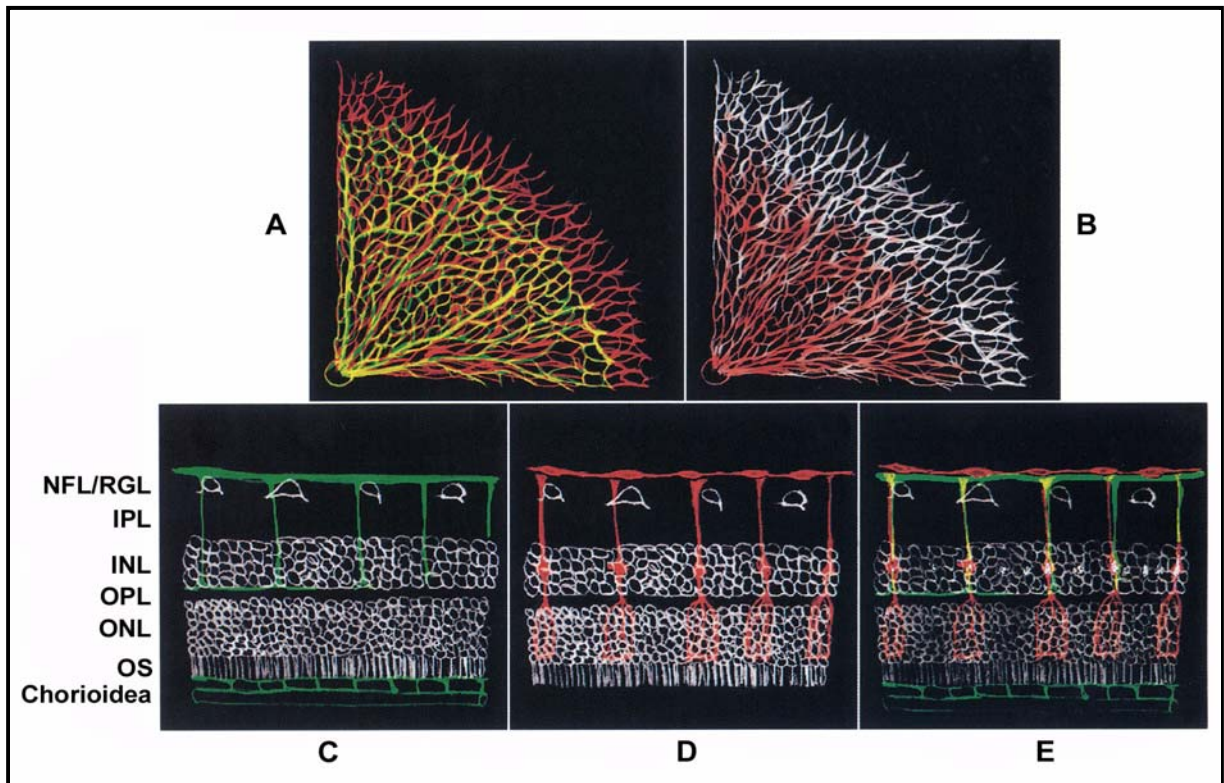


Abbildung 7: Blutgefäßentwicklung in der Retina induziert durch Astrozyten und Müllerzellen (VEGF-Modell). Modifizierte Darstellung (nach Stone and Maslim, 1997). **A** und **B**: Quadrant der Oberfläche einer Retina (Ratte). Astrozyten (rot) und Blutgefäße (grün) wandern in der Ganglienzellschicht von der Eintrittsstelle des optischen Nervis in Richtung Peripherie der Retina. (Übereinander liegende Astrozyten und Blutgefäße sind gelb dargestellt) **B**: Das Astrozytennetzwerk ist den Blutgefäßen im Wachstum immer ein wenig voraus und bildet aufgrund der lokalen Hypoxie (Mangel an Sauerstoff) in den nicht vaskularisierten Bereichen der Retina den Wachstumsfaktor VEGF (engl.: vascular endothelial growth factor; weiß). VEGF wiederum induziert das Wachstum der Blutgefäße, so dass sich das oberflächliche Netzwerk in enger Assoziation mit dem Astrozytennetzwerk entwickelt. **C** bis **E**: Schnitte durch die Retina, die so orientiert sind, dass sich die Nervenfaserschicht (NFL/RGL) oben und die zentrale Retina links befindet. **C**: Die Blutgefäße (grün) wachsen ausgehend vom primären Nerzwerk durch Angiogenese radial in die Retina ein. **D**: Dies erfolgt entlang der Fortsätze der radial orientierten Müllerzellen (rot). **E**: Sobald die Blutgefäße die innere Körnerschicht (engl.: inner nuclear layer, INL) erreicht haben, bilden sie, induziert durch VEGF (weiß, produziert von den Müllerzellen, rot), die tiefen Kapillarnetzwerke. In dieser Abbildung ist nur die Bildung des tiefen und nicht des intermediären Netzwerkes berücksichtigt. Man beachte, dass die VEGF-Produktion nur in Bereichen mit fehlenden Blutgefäßen, also unter Hypoxie-Bedingungen, erhöht ist und in den Bereichen, wo die Blutgefäße ausgebildet sind (eher zentral) die VEGF-Produktion gesenkt wird, wodurch die Neubildung von Blutgefäßen gestoppt wird.

1.5.3 Die koordinierte Wirkung molekularer Signalwege in der Angiogenese

Die Entwicklung und Reifung von Blutgefäßen wird im Allgemeinen und somit auch in der Retina durch ein Zusammenwirken einer Vielzahl angiogener Faktoren und deren Rezeptoren kontrolliert. Diese liefern die Signale für Zellmigration, Proliferation und Differenzierung von Zellen und steuern so die Neubildung von Blutgefäßen, die Ausbildung von Kapillaren und die Aufrechterhaltung eines funktionellen Blutgefäßnetzwerkes (Carmeliet, 2000a; Carmeliet and Jain, 2000; Ortega et al., 1999).

Wichtige molekulare Signalwege für die Kontrolle der Blutgefäßentwicklung insbesondere im Prozess der Angiogenese sind die Moleküle der VEGF-Familie (engl.: vascular endothelial growth factor) und deren Rezeptoren. Neben diesen spielen auch die Angiopoietin-1/Angiopoietin-2-Tie-Familie (Tie: engl.: „tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains“) sowie PDGF β (engl.: „platelet-derived growth factor beta“) und der zugehörige Rezeptor PDGFR β (engl.: „platelet-derived growth factor receptor beta“) eine wesentliche Rolle. Bestimmte Mitglieder der Wnt- und der Frizzled-Familien (Wnt: engl.: „wingless-type“) sowie Faktoren wie Igf1 (engl.: „insuline like growth factor“) modulieren diesen Prozess.

Das Zusammenwirken der VEGF-, Angiopoietin- und PDGF-Signalwege während der Blutgefäßentwicklung ist zumindest in den Grundzügen verstanden und in Abbildung 8 dargestellt.

Bei den beteiligten Rezeptoren, VEGFR1 (*Flt-1*, „fms-like tyrosine kinase“), VEGFR2 (*Flk-1*, „fetal liver kinase“) und *TIE2* (oder TEK: „endothelial-specific receptor tyrosine kinase“), die in Endothelzellen exprimiert werden, und bei *PDGFR β* , der vorwiegend auf Perizyten exprimiert wird, handelt es sich um Rezeptortyrosinkinasen (RTK's), die aber jeweils unterschiedliche zelluläre Antworten auslösen (Abbildung 8).

Neben dem Zusammenwirken der drei genannten RTK-Signalwege (VEGF, Angiopoietin-1/-2 und PDGF) in der normalen Blutgefäßentwicklung haben weitere Studien gezeigt, dass z.B. IGF1 einen wesentlichen Einfluss auf die Sensitivität von retinalen Endothelzellen gegenüber VEGFA und damit eine ganz wesentliche Funktion in der normalen Blutgefäßentwicklung in der Retina hat (Hellstrom et al., 2002). Genauso wird eine modulierende Funktion verschiedener Mitglieder der Wnt-Familie insbesondere auf das Gleichgewicht zwischen Regression und Angiogenese der Blutgefäße diskutiert (Goodwin and D'Amore, 2002).

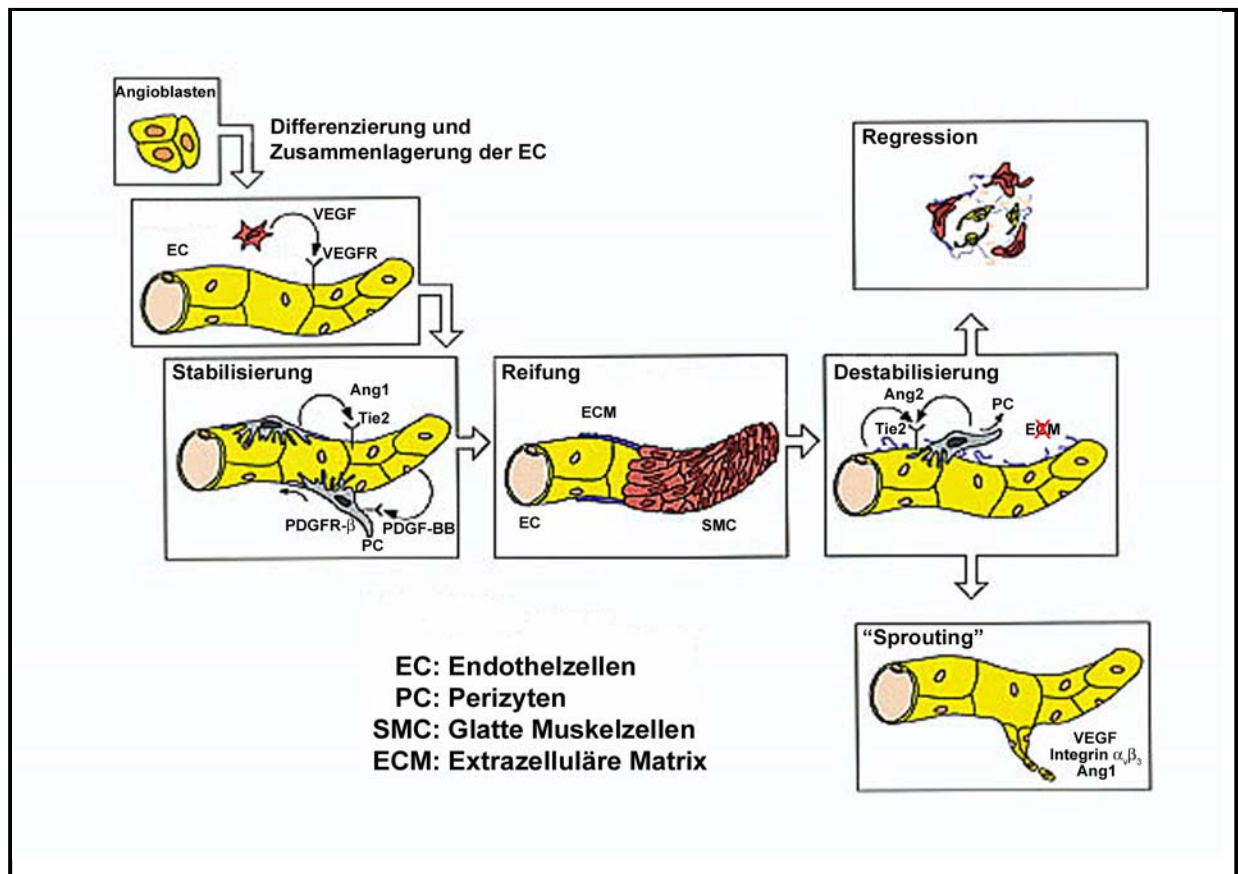


Abbildung 8: Modell für die Regulation der Blutgefäßentwicklung, die Reifung und Aufrechterhaltung sowie die Umgestaltung („Remodelling“) existierender Blutgefäßsysteme durch VEGF-, Angiopoietin (Agpt/Ang)- und PDGF-Signalwege. Modifizierte Darstellung (nach Carmeliet, 2000a). Während der frühen Entwicklung initiiert VEGF die Proliferation und die Differenzierung von Angioblasten und kontrolliert die Zusammenlagerung der Endothelzellen (EC). Die Endothelzellen sekretieren PDGF-BB (Homodimer von PDGF β) und rekrutieren Perizyten, was zu einer Stabilisierung der Blutgefäße führt. Besonders der Agonist Angiopoietin 1 führt über seinen Rezeptor Tie-2 zu einer Stabilisierung der unreifen Blutgefäße. Während dieses Reifeprozesses entsteht eine spezifische extrazelluläre Matrix (ECM), die ein optimales Umfeld für die Endothelzellen zur Adhäsion und die Aufrechterhaltung des Zellverbandes liefert. Außerdem werden die Blutgefäße durch glatte Muskelzellen umgeben, die besonders in Arterien die kontraktile Funktion der Blutgefäße ermöglichen. Angiopoietin 2, der Antagonist von Tie-2, destabilisiert die reifen Blutgefäße, d.h. die Zell-Zell-Kontakte der Endothelzellen zu den Perizyten und glatten Muskelzellen. Gleichzeitig werden die Kontakte zur extrazellulären Matrix gelockert und diese zum Teil abgebaut. Diese Destabilisierung der Blutgefäße ermöglicht erst den Prozess der Angiogenese, welcher zum „sprouting“, dem Verzweigen, von Blutgefäßen, und deren Einwachsen in das umliegende Gewebe führt. Dies kann aber nur erfolgen, wenn angiogene Stimuli, wie z.B. VEGFA und Angiopoietin 1 das Überleben der Endothelzellen ermöglichen. Bei diesem Prozess spielen auch Integrine, insbesondere das Integrin $\alpha_v\beta_3$, eine wichtige Rolle. Andernfalls kommt es zur Regression und zum Abbau der Blutgefäße, was ebenfalls ein wichtiger Prozess zum Umbau von Blutgefäßsystemen während der Entwicklung ist (siehe z.B. Regression der Hyaloidia).

Im Kontext der hier beschriebenen Defekte in der Retina von Norrie-Patienten ist natürlich die Rolle der Angiogenesefaktoren unter pathologischen Situationen interessant, die dem

Norrie-Syndrom ähneln. Sowohl VEGFA, dessen Expression durch Hypoxie (Sauerstoffmangel) in der Retina ansteigt (Aiello et al., 1994), als auch IGF1 spielen eine wesentliche Rolle in der Entwicklung von Frühgeborenenretinopathie (Hellstrom et al., 2001), in der auch Norrin (NDP-Protein) eine Rolle zu spielen scheint (siehe oben). Des Weiteren sind Mutationen im Wnt-Rezeptor Frizzled-4 bei Patienten mit FEVR gefunden worden (Robitaille et al., 2002), so dass neben dem *NDP/Ndph*-Gen besonders dieses Gen (*Fzd4*) für die Aufklärung der Pathogenesemechanismen des Norrie-Syndroms und der assoziierten, vasoproliferativen Erkrankungen der Retina interessant zu sein scheint.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit war es, durch die Analyse des ND-Mausmodells die Funktion von Norrin besser zu verstehen und molekulare Pathogenesemechanismen des Norrie-Syndroms sowie der allelischen Erkrankungen zu identifizieren. Um diese Ziele zu erreichen, wurden verschiedene molekularbiologische, histologische und proteinbiochemische Techniken angewendet. Dadurch sollte der Phänotyp der *Ndph*-knockout-Maus detaillierter beschrieben werden und parallel dazu insbesondere mit Hilfe von Genexpressionsstudien Einblicke in die der Pathogenese zu Grunde liegenden, molekularen Prozesse gewonnen werden.

Im Einzelnen sollten folgende Ziele verfolgt werden.

- 1.) Das Erstellen globaler Genexpressionsprofile mit Hilfe der cDNA-Mikroarray-Technologie für Auge und Gehirn von *Ndph*-knockout-Mäusen.
- 2.) Die Verifizierung der differentiellen Genexpression im Auge und Gehirn des ND-Mausmodells auf RNA-Ebene zur Identifizierung molekularer Signalwege, die an der frühen Pathogenese des Norrie-Syndroms beteiligt sind.
- 3.) Die rekombinante Proteinexpression von Norrin in *E. coli* sowie die Verwendung des rekombinanten Proteins für die Gewinnung eines Antikörpers und einen Cornea-Vaskularisations-Assay zum Nachweis einer möglichen angiogenen Wirkung des Proteins.
- 4.) Die Untersuchung der frühen postnatalen Blutgefäßentwicklung in der *Ndph*-knockout-Maus.
- 5.) Die Aufklärung der Ursachen der Sterilität von weiblichen, homozygoten *Ndph*^{-/-}-Mäusen.