

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der molekularen Pathogeneseprozesse der Norrie-Erkrankung anhand eines Mausmodells. Dieses Ziel sollte insbesondere durch histologische Untersuchungen und Genexpressionsanalysen in den betroffenen Organen, Auge und Gehirn, erreicht werden. Zusätzlich sollte auch die Ursache für die in Kreuzungsexperimenten beobachtete Infertilität von homozygoten, weiblichen *Ndph*-knockout-Mäusen aufgeklärt werden. Die rekombinante Expression des Norrins in *Escherichia coli* zur Antikörperherstellung und die funktionelle Charakterisierung des Proteins ergänzten diese Arbeiten.

Die Genexpressionsstudien im Auge und Gehirn führten zur näheren Aufklärung zweier molekularer Prozesse der Norrie-Erkrankung, die den Pathogeneseverlauf in diesen Organen erklären können. Ebenso konnte durch histologische Studien der Nachweis einer neuen Funktion des *NDP/Ndph*-Gens in der weiblichen Reproduktion und Fertilität erbracht werden.

### 4.1 Untersuchungen zur Funktion des *Ndph*-Gens im Auge

#### 4.1.1 Herstellung von cDNA-Subtraktionsbanken und deren Charakterisierung mit Hilfe der Mikroarray-Technik.

Ein wesentlicher und experimentell aufwendiger Teil dieser Arbeit bestand in der Durchführung einer cDNA-Subtraktion zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene in Augen von *Ndph*-knockout-Mäusen des Entwicklungsstadiums p21 (postnataler Tag 21). Die cDNA-Subtraktion wurde in beiden Orientierungen durchgeführt, so dass sowohl unter- als auch überexprimierte Transkripte identifiziert werden mussten. Dies wurde durch die mitgeführten Subtraktionskontrollen bestätigt und somit die cDNA-Subtraktion erfolgreich durchgeführt. Die erhaltenen Subtraktionsprodukte wurden kloniert und eine repräsentative Subtraktionsbank mit 2112 Klonen angelegt. Die Hälfte dieser Klone stammte aus der Forward-Subtraktionsbank und sollte somit Gene repräsentieren, die im Wildtyp-Auge höher exprimiert waren, während die andere Hälfte der Klone Gene repräsentierte, die im Auge von *Ndph*-knockout-Mäusen höher exprimiert waren. Warum aber neben den in den Kontrollen nachgewiesenen differentiell exprimierten Genen, *Ndph* und K405, keine weiteren differentiellen Gene in den Subtraktionsbanken zu identifizieren waren, kann mehrere Ursachen haben.

Eine nahe liegende Erklärung ist die, dass die Expressionsunterschiede in dem hier anhand des Mausmodells untersuchten, relativ frühen Stadium der Norrie-Erkrankung noch nicht ausreichend groß sind, um sie mit der verwendeten Technik identifizieren zu können. Diese Sichtweise wird durch die Mikroarray-Hybridisierungsexperimente mit RNA-Proben aus Augen unterstützt. Bei keinem der drei unabhängigen Experimente konnten konsistente und deutliche Expressionsunterschiede zwischen den Augen der Wildtyp- und der *Ndph*-knockout-Mäuse des Stadiums p21 nachgewiesen werden. Solche geringen Expressionsunterschiede sollten zwar durch die Verwendung der PCR-basierten subtraktiven Hybridisierung angereichert werden (Diatchenko et al., 1996), es besteht dabei aber auch die Gefahr einer zufälligen Anreicherung von cDNA-Fragmenten, die nicht differentiell exprimierte Gene repräsentieren und so einen hohen Hintergrund in den cDNA-Subtraktionsbanken generieren können (Diatchenko et al., 1999; Wang and Brown, 1991). Diese vielen, nicht differentiellen Fragmente führen dann dazu, dass die wenigen cDNAs, die von wirklich differentiell exprimierten Transkripten stammen, obwohl diese durch die subtraktive Hybridisierung gut angereichert wurden, in der Subtraktionsbank unterrepräsentiert und so sehr schwer zu identifizieren sind. Dies scheint hier der Fall gewesen zu sein.

Auch die nachfolgenden Analyse mit Hilfe von *virtuellen* Northern Blots, in der sich keiner der ca. 200 untersuchten cDNA-Fragmente aus der Bank (10% aller Klone) als differentiell herausgestellt hat, spricht für die geringe Repräsentanz von differentiellen Klonen in den Banken. Dies würde auch erklären, warum der eigentlich durch die Verwendung der Mikroarray-Technologie erhoffte Vorteil der gleichzeitigen Analyse aller Klone aus den Subtraktionsbanken auf eine differentielle Expression hin nicht zum Tragen kam und mit ihr keine differentiell exprimierten Transkripte isoliert werden konnten.

Ein weiterer Punkt, der diese Schlussfolgerung unterstützt ist auch, dass die Technik der cDNA-Subtraktion in Kombination mit der Mikroarray-Technologie bei zwei Jahre alte *Ndph*-knockout-Mäusen, in denen die Erkrankung sehr weit fortgeschritten ist, erfolgreich für die Identifizierung differentiell exprimierter Gene verwendet wurde (Lenzner et al., 2002), so dass es tatsächlich die geringen biologischen Unterschiede in dem frühen Stadium zu sein scheinen, die den hohen Hintergrund in den Subtraktionsbanken an p21 verursachen.

In zwei Jahre alten *Ndph*-knockout-Mäusen sind die äußeren Schichten der Retina nahezu komplett degeneriert, so dass in der Hauptsache photorezeptorspezifische Transkripte als differentiell exprimierte Gene mit Hilfe der Mikroarrays identifiziert und zu 80% auch durch *virtuelle* Northern Blot Analysen bestätigt werden konnten (Lenzner et al., 2002). Diese

Befunde zeigen, dass die cDNA-Subtraktion dann besonders gut funktioniert, wenn die Unterschiede zwischen den für die Subtraktion verwendeten RNA-Populationen qualitativ sind, d.h. wenn Transkripte in einer der beiden Populationen vollständig fehlen.

An p21 sind zwar auch deutliche morphologische Veränderungen in den Retinaschichten und im Glaskörper der *Ndph*-knockout-Tiere zu beobachten, allerdings nicht der komplette Verlust eines bestimmten Zelltyps. Daher sind an p21 eher graduelle Unterschiede in der Expression zu erwarten. Dies konnten wir durch die späteren quantitativen RT-PCR-Studien in Retinae desselben Stadiums bestätigen (3.3.2).

Eine weitere Erklärung für die nicht erfolgte Anreicherung differentiell exprimierter Transkripte ist, dass für die cDNA-Subtraktion RNA aus dem gesamten Auge und nicht nur aus den besonders durch die Erkrankung betroffenen okulären Strukturen, wie der Retina, verwendet wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die cDNA-Subtraktion gut geeignet ist für die Identifizierung von qualitativen Unterschieden in der Genexpression, während graduelle Veränderungen im Expressionsniveau nicht oder nur ungenügend detektiert werden können.

So kann man festhalten, dass die Hauptursache für die nicht gelungene Identifizierung differentiell exprimierter Transkripte in diesem Versuchsansatz in den geringen biologischen Unterschieden zwischen den mRNA-Populationen der verwendeten Wildtyp- und *Ndph*-knockout-Augen liegt. Im Nachhinein und zusammen mit dem Wissen, welches durch die quantitativen RT-PCR-Untersuchungen in der Retina gewonnen wurde, wäre die Retina als Ausgangsmaterial und auch die Verwendung von PolyA<sup>+</sup>-RNA im Gegensatz zu der hier verwendeten Total-RNA die bessere Wahl gewesen. Ein dabei allerdings entscheidendes Problem ist die sehr geringe Menge an Total-RNA (ca.10-15 µg pro Auge) und damit auch an PolyA<sup>+</sup>-RNA (in etwa 1-3% der Total-RNA Menge), die aus Mausaugen gewonnen werden kann, was aber durch eine höhere Tierzahl umgangen werden kann.

#### **4.1.2 Die postnatale Retinaentwicklung in Wildtyp und in *Ndph*-knockout-Mäusen und die Hypoxie als wesentlicher Pathogenesemechanismus des Norrie-Syndroms.**

Durch die Daten aus den histologischen Studien (HE-Färbungen) und durch deren Vergleich mit den Expressionsdaten für die Angiogenesefaktoren in den vier Entwicklungsstadien der postnatalen Retinaentwicklung (p5, p10, p15, p21) konnten wichtige Hinweise für den Pathogeneseverlauf des Norrie-Syndroms gewonnen werden. Die in dieser Arbeit von mir vorgestellten Daten zur postnatalen Blutgefäßentwicklung in der Retina der *Ndph*-knockout-

Mäuse wurden in einem Kooperationsprojekt gewonnen. An diesem waren neben unserer Arbeitsgruppe die Arbeitsgruppen von Professor Hans-Peter Hammes (V. Medizinische Klinik, Medizinische Fakultät der Universität Heidelberg, Mannheim, Deutschland), von Mathias W. Seeliger (Forschungsgruppe für retinale Elektrodiagnostik, Universität Tübingen, Deutschland) und Christian Grimm (Labor für Zellbiologie der Retina, Universitätsspital Zürich, Schweiz) beteiligt. In diesen drei Gruppen wurden die *Ndph*-knockout-Mäuse, jeweils im Vergleich zum Wildtyp, mit weiteren morphologischen, physiologischen und proteinbiochemischen Techniken untersucht.

Da sich nur in der Gesamtheit der Daten ein detailliertes Bild der frühen postnatalen Blutgefäßentwicklung in der Retina von *Ndph*-knockout-Mäuse bzw. von den auftretenden Defekten ergab, habe ich mich entschieden, die von mir hier vorgestellten Ergebnisse zusammen mit den anderen in diesem Projekt gewonnenen Daten zu diskutieren.

Die histologischen Schnitte der *Ndph*-knockout-Retinae (3.3.1) zeigen im Vergleich zum Wildtyp erste auffällige Veränderungen im Entwicklungsstadium p15, an dem die Ganglienzellschicht deutlich desorganisiert war und sich Zellhaufen gebildet haben, die von Blutgefäßen zu stammen schienen. Auch im Stadium p21 wurde diese Desorganisation sowie Defekte in den Blutgefäßen beobachtet. Die beiden frühen Stadien (p5 und p10) zeigten hingegen keine auffälligen Unterschiede zwischen den *Ndph*-knockout- und den Wildtyp-Retinae. Diese Befunde passen gut zu den zuvor publizierten Defekten, wobei eine Abnahme der Ganglienzellzahl und die Desorganisation dieser Zellschicht in *Ndph*-knockout-Mäusen nach p9 beschrieben wurde (Richter et al., 1998). Betrachtet man diese histologischen Daten für sich, so muss ein entscheidender Schritt in der Pathogenese des Norrie-Syndroms zwischen den Entwicklungsstadien p9/p10 und p15 erfolgen.

Nimmt man jetzt die Expressionsdaten für die Angiogenesefaktoren hinzu (3.3.2), so fällt auf, dass in den beiden frühen Stadien p5 und p10 nur wenige der untersuchten Faktoren Unterschiede zwischen der Expression in Wildtyp- und in *Ndph*-knockout-Tieren aufwiesen, während in späteren Stadien sehr viele der untersuchten Angiogenesefaktoren in den *Ndph*-knockout-Tieren in ihrer Expression erhöht sind. Somit korreliert der Expressionsverlauf der Angiogenesefaktoren zeitlich sehr gut mit den beobachteten morphologischen Veränderungen.

Allerdings zeigten der Angiopoietin-Tie2-Signalweg, der *Tie-1*-Rezeptor und der *Pdgfrβ*-Signalweg sogar schon eine signifikante Reduktion ihrer Expression in den *Ndph*-knockout-Retinae während der frühern Stadien p5 und p10. Diese Gene sind in Endothelzellen und

Perizyten exprimiert (Yancopoulos et al., 2000), so dass diese frühen Transkriptionsveränderungen die Beteiligung dieser beiden Zelltypen in der frühen Pathogenese des Norrie-Syndroms nahe legen.

Die beiden Angiopoietine-1 und -2 und ihr Rezeptor Tie2 kontrollieren das Gleichgewicht zwischen der Destabilisierung und Stabilisierung von Blutgefäßen während der postnatalen Reifung der Blutgefäßnetzwerke in der Retina durch Angiogeneseprozesse (Maisonpierre et al., 1997; Thurston et al., 2000), was auf molekularer Ebene auf Auswirkungen des Fehlens von Norrin auf die Endothelzellen hinweist. Auch die frühe transkriptionelle Reduktion der Expression des endothelzellspezifischen Tie-1-Rezeptors spricht für einen Effekt auf Endothelzellen und Blutgefäße, da Tie1 scheinbar eine Rolle für die Etablierung der Integrität von Blutgefäßen hat (Sato et al., 1995). Der dritte betroffene Signalweg, welcher durch die beiden Faktoren *Pdgfβ* and *PdgfRβ* repräsentiert wurde, ermöglicht es auswachsenden Endothelzellen durch die Ausschüttung von *Pdgfβ* aus ihren Zellfortsätzen Perizyten und glatte Muskelzellen zu rekrutieren (Mudhar et al., 1993), so dass dieser Signalweg auch betroffen zu sein schien. Es sind wohl aber eher die Endothelzellen, die primär durch das Fehlen von Norrin beeinflusst werden, da die Veränderungen im *Pdgfβ*, als dem in Endothelzellen exprimierten Molekül, größer sind. Somit sind auf molekularer Ebene schon während des frühesten hier untersuchten Entwicklungsstadiums p5 erste Effekte des fehlenden, extrazellulären Norrins auf Endothelzellen zu beobachten, während diese in den HE-Färbungen noch nicht zu beobachten waren.

Dieser frühe Effekt der Abwesenheit von Norrin auf Endothelzellen wurde von der Gruppe von Professor Hammes bestätigt, deren Befunde an lektinfärbten Blutgefäßen des oberflächlichen, retinalen Blutgefäßnetzwerkes belegten, dass schon zu diesem frühen Zeitpunkt der Entwicklung das Auswachsen der Blutgefäße innerhalb der Nervenfaserschicht bzw. der retinalen Ganglienzellschicht verzögert ist. Zudem konnten sie aufgrund von immunhistochemischen Färbungen zeigen, dass die Perizytenrekrutierung durch die Endothelzellen normal verläuft, da die Perizyten den Endothelzellen, während des Wachstums der Blutgefäße normal folgen. Bemerkenswerterweise führte das Fehlen des extrazellulären Norrins im oberflächlichen retinalen Blutgefäßnetzwerk zu der beschriebenen Verzögerung des Auswachsens in Richtung Peripherie, aber der viel kritischere Befund konnte mit Hilfe dieser Lektinfärbungen an Tag p10 und den späteren Stadien gemacht werden, an denen sich die tiefen Kapillarnetzwerke der Retina nicht ausbildeten, obwohl sie dies normalerweise nach p7 tun. Dabei ist besonders auffällig, dass die Blutgefäße sich zwar verzweigen und

anfangen in Richtung der tiefen Schichten der Retina zu wandern, aber dann das Auswachsen noch in der Nervenfaserschicht oder kurz danach blockiert wird. Somit ist Norrin für das Auswachsen und die Entwicklung der tiefen Kapillarnetzwerke absolut notwendig und seine Abwesenheit führt dazu, dass zwar die Angiogenese in den Blutgefäßen, die die tiefen Schichten bilden sollen, initiiert wird, aber nicht beendet werden kann, wodurch sich die tiefen Kapillarnetzwerke der Retina nicht bilden.

Zum Zeitpunkt p15 wurden auch von Professor Hammes und seiner Gruppe an den Spitzen der in ihrem Wachstum blockierten Blutgefäße Mikroaneurismen-ähnliche Strukturen beobachtet, die auch in den hier gezeigten HE-Färbungen als Zellklumpen zu sehen sind. Diese bestehen aus Endothelzellen und sind, genau wie andere Teile der in ihrem Erscheinungsbild nicht normalen Gefäße, undicht und leck, wie sich in *in vivo*-Scanning-Laser-Ophthalmoskopie (SLO)-Angiographie-Experimenten in der Gruppe von Mathias W. Seeliger an den Zeitpunkten p15 und p21 zeigte.

Wie schon erwähnt, nimmt die von mir beobachtete Expressionsaktivität der Angiogenesefaktoren in *Ndph*-knockout-Mäusen in diesen Stadien (p15 und p21) sehr deutlich zu. Insbesondere die bis zu 4-5fach angestiegene *Vegfa*-Expression in den *Ndph*-knockout-Retinae zwischen p10 und p15 war auffällig und legte die Entwicklung einer Hypoxie in der inneren Retina aufgrund der fehlenden Entwicklung des tiefen Blutgefäßnetzwerkes nahe, da die *Vegfa*-Transkription durch Hypoxie aktiviert wird (Shweiki et al., 1992; Stone et al., 1995). Diese Aktivierung der *Vegfa*-Transkription unter Hypoxiebedingungen wird durch einen auf Proteinebene erhöhten Transkriptionsfaktor Hif1 $\alpha$  (engl.: hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ ) vermittelt (Ozaki et al., 1999). Die Entwicklung einer Hypoxie in der inneren Retina wurde durch die Verifikation der erhöhten Proteinexpression von Hif1 $\alpha$  und *Vegfa* durch Christian Grimm und durch neue ERG-Daten von 6-7 Wochen alten Tieren (Mathias W. Seeliger) und zusätzlich durch publizierte Elektroretinographie (ERG)-Daten aus adulten *Ndph*-knockout- und Kontrollmäusen (älter als sieben Monate) unterstützt, wobei die beschriebenen negativen ERGs mit ihren reduzierten b-Wellen und reduzierten oszillatorischen Potentialen zunächst als eine Konsequenz einer Retinoschisis-ähnlichen Veränderung der Retina interpretiert wurden (Ruether et al., 1997). Zusammen mit den jetzigen molekularen Daten zur *Vegfa*- und Hif1 $\alpha$ -Expression muss man diese negativen ERGs, in Übereinstimmung mit den durch Tazawa und Seaman beschriebenen Schlüsselmerkmalen von ERGs unter hypoxischen Bedingungen (Tazawa and Seaman, 1972), als Folge der Hypoxie in der inneren Retina der *Ndph*-knockout-Mäuse interpretieren, die

aufgrund der fehlenden Entwicklung des tiefen retinalen Kapillarnetwerkes während der frühen postnatalen Retinaentwicklung zwischen p10 und p15 entsteht und bis ins Erwachsenenalter anhält.

Diese sich entwickelnde Hypoxie und erhöhte Vegfa-Spiegel sind starke Regulatoren der Genexpression vieler der hier untersuchten Angiogenesefaktoren, unter anderem von PDGFR $\beta$ , VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/FLK-1) und Integrin  $\alpha_v\beta_3$  (Witmer et al., 2004). Daher kann man sehr viele der hier beobachteten, transkriptionellen Veränderungen in der Retina von *Ndph*-knockout-Mäusen an und nach p15 wahrscheinlich als sekundäre, regulatorische Effekte der Hypoxie in der inneren Retina von *Ndph*-knockout-Tieren betrachten. Auch die Transkription von *Pdgfr $\beta$*  wird durch Hypoxie aktiviert (Kourembanas et al., 1990), wie es hier an den Zeitpunkten p15 und p21 beobachtet wurde, nachdem zunächst an p10 die Expression reduziert war. Aus dieser kompensatorischen Hochregulation vieler endothelzellspezifischer Faktoren durch die Hypoxie und Vegfa kann man zudem schließen, dass die Endothelzellen einen Defekt durch das fehlende Norrin nicht in sich selbst tragen, sondern eher auf die jeweilige pathologische Situation in ihrer extrazellulären Umgebung reagieren, da sie ihre zellspezifischen Eigenschaften über den gesamten untersuchten Zeitraum zu behalten schienen. Dies lässt auf eine Funktion des Norrins für die Organisation einer normalen Umgebung von Endothelzellen schließen.

Neben den hier beschriebenen Auswirkungen des Fehlens von Norrin in der retinalen Blutgefäßentwicklung, wird auch eine Rolle des Norrins in der Regression der hyaloiden Blutgefäße postuliert. Dabei scheint die Abwesenheit von Norrin zu einer Persistenz der hyaloiden Blutgefäße bis in adulte Stadien zu führen (Ohlmann et al., 2004; Richter et al., 1998). Die hier in den histologischen Schnitten des Glaskörpers der *Ndph*-knockout-Tiere beobachteten Einlagerungen über den Entwicklungszeitraum p5 bis p21 hinweg scheinen diese Persistenz oder eine verzögerte Regression des hyaloiden Gefäßsystems in den *Ndph*-knockout-Mäusen zu repräsentieren. Allerdings widerspricht die funktionelle Persistenz der hyaloiden Gefäße bis ins Erwachsenenalter den von uns mit Mathias W. Seeliger mit Hilfe der Scanning-Laser-Ophthalmoskopie gemachten Beobachtungen *in vivo*. Dabei konnten wir die Obliteration und die Regression der hyaloiden Gefäße nachweisen, die deutlich verzögert und nicht vollständig war, aber dennoch stattfand. Dabei blieben Reste der Blutgefäße als Einlagerungen bis in die adulten Stadien vorhanden und erklären so auch meine histologischen Befunde. Zudem könnte dies auf eine Bedeutung des Norrins in Makrophagen

hinweisen, die während der Regression für das vollständige Entfernen der durch Apoptose absterbenden Endothelzellen verantwortlich sind (Lang and Bishop, 1993).

Alternativ zu einer primären Rolle des Norrins in der Regression der hyaloiden Gefäße, könnte dies aber auch eine Folge der Defekte in der Entwicklung des primären retinalen Blutgefäßsystems sein, wie es auch für andere genetisch modifizierte Mausmodelle, wie die Angiopietin-2-lacZ-Maus (Gale et al., 2002) oder für eine Vegf-Isoform-defiziente Maus (Stalmans et al., 2002) beschrieben wurde. Diese kompensatorische Verzögerung der Regression könnte auf molekularer Ebene durch die erhöhten Vegfa-Spiegel in der Retina von *Ndph*-knockout-Mäusen vermittelt werden, indem Vegfa ein antiapoptotisches Signal für die Endothelzellen der hyaloiden Gefäße liefert (Mitchell et al., 1998). Da der Regressionsprozess parallel zu der Entwicklung des retinalen Blutgefäßsystems einsetzt, kann diese Hypothese nur dann gültig sein, wenn die schon leicht, aber nicht signifikant erhöhten Vegfa-Spiegel an p5 ausreichen, um die Regression der Hyaloidia so stark zu verlangsamen (Ito and Yoshioka, 1999), dass die Gefäße noch vorhanden sind, wenn die Hypoxie sich entwickelt und die höheren Vegfa-Spiegel diese Erklärung plausibel erscheinen lassen.

Die hier gefundenen, erhöhten Vegfa-Mengen in der Retina könnten ebenfalls eine Erklärung für einige der beobachteten Symptome in den *Ndph*-knockout-Mäusen und Patienten liefern. Insbesondere die unreife Struktur und fehlende Integrität, die zu Leckagen in den retinalen Blutgefäßen nach p10 führte und auch, wie eben beschrieben, die verzögerte Regression der hyaloiden Gefäße könnte durch die erhöhten Spiegel an Vegfa erklärt werden. Vegfa wurde zunächst als VPF (vascular permeability factor) identifiziert, der zur Hyperpermeabilität von Blutgefäßen führt (Senger et al., 1983), wie wir es auch hier in den Mäusen beobachtet haben. Die Folge ist ein vermehrter Flüssigkeitsaustritt aus den oberflächlichen, undichten retinalen Gefäßen, der zu einer Verschiebung der Gefäße und zu einer zerstörten Struktur der inneren retinalen Schichten führen könnte, wie es für die *Ndph*-knockout-Mäuse beschrieben wurde (Richter et al., 1998). Somit könnten diese charakteristischen Defekte in der Retina von *Ndph*-knockout-Mäusen eine Konsequenz der erhöhten Vegfa-Spiegel sein und wären somit eine Folge der Hypoxie in den tiefen Schichten der inneren Retina.

In Anbetracht dieser Befunde kann man die Hypothese vertreten, dass die Abwesenheit von Norrin auch in Patienten zu einer fehlerhaften Entwicklung der Blutgefäße führt und es dann sekundär zu einer retinalen Hypoxie mit erhöhten Vegfa-Spiegeln kommt. Dies könnte einige der klinischen Merkmale, wie die geringere Zahl an Blutgefäßen, die Desorganisation der

retinalen Ganglienzellen und der Zellen der inneren, nukleären Schicht erklären (Schroeder et al., 1997). Zusätzlich könnten die erhöhten, aber variablen Vegfa-Spiegel die Ursache für die hohe phänotypische Variabilität des Norrie-Phänotyps sein, da die Wirkung von Vegfa stark dosisabhängig ist (Carmeliet, 2000b) und zusätzlich durch den genetischen Hintergrund beeinflusst werden könnte.

#### **4.1.3 Die molekulare Wirkung des *Ndph*-Gens im Auge**

Wie wir mit Hilfe der detaillierten histologischen, morphologischen und physiologischen sowie insbesondere auch durch die molekularen Daten gesehen haben, liegt die Bedeutung des Norrins primär in der extrazellulären Umgebung der Endothelzellen. Sein Fehlen führt zu einer verlangsamten Entwicklung des oberflächlichen, retinalen Kapillarnetzwerkes und zu einem kompletten Block der Entwicklung der tiefen, retinalen Kapillaren. Diese Befunde im Mausmodell machen auf molekularer Ebene den Unterschied in den Steuerungsmechanismen des Auswachsens des oberflächlichen und des tiefen Blutgefäßsystems deutlich, welche einerseits durch Astrozyten und andererseits durch Müllerzellen und extrazelluläre Matrix Moleküle organisiert werden (Connolly et al., 1988; Dorrell et al., 2002; Gariano, 2003). Die gestörte und fehlende Entwicklung besonders der tiefen Blutgefäße führt zu der sekundären Entwicklung einer retinalen Hypoxie mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Hif1 $\alpha$  und in Folge dessen von Vegfa. Die erhöhten Vegfa-Spiegel scheinen dann die Hauptursache für die in diesem genetisch bedingten Syndrom zu beobachtenden Veränderungen in der Maus und in den Patienten zu sein. Mit dem Nachweis der Entwicklung einer retinalen Hypoxie und ihren Folgen für den Phänotyp konnte in dieser Arbeit somit ein wesentlicher Teil des Pathogenesemechanismus des Norrie-Syndroms aufgeklärt werden.

Allerdings blieb die Frage noch offen, wie das extrazelluläre Molekül Norrin *in vivo* seine Wirkung im Auge und in der Retina auf molekularer Ebene entfalten kann. Dies soll in dem folgenden Abschnitt diskutiert werden.

Norrin ist ein sekretiertes, eng mit der extrazellulären Matrix assoziiertes Molekül (Meitinger et al., 1993; Perez-Vilar and Hill, 1997) und zeigt eine hohe Homologie zur TGF $\beta$ -Superfamilie mit ihrem charakteristischen und konservierten Cystinknoten-Motiv (Vitt et al., 2001). Dieses Motiv befindet sich in einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren und ebenso in vielen Makromolekülen der extrazellulären Matrix (Vitt et al., 2001).

Man könnte sich verschiedene Wirkmechanismen des Proteins vorstellen. In Analogie zu Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF $\beta$ , könnte Norrin als Homodimer an

Zelloberflächenmoleküle oder Rezeptoren für Signalwege binden und so intrazelluläre Signalwege aktivieren. Alternativ könnte es als Antagonist von Signalwegen wirken, indem es die andere Liganden mit Cystinknoten-ähnlicher Struktur bindet und so deren Bindung an deren Rezeptoren verhindert, wie dies für den zu NDP strukturell ähnlichen BMP Antagonisten Cerberus gezeigt werden konnte (Piccolo et al., 1999). Auch vorstellbar wäre eine Bindung des Norrin-Monomers an extrazelluläre Matrix Moleküle mit einem Cystinknoten-Motiv, wodurch eine Modulation im Sinne eines Lösens oder Verstärkens von Interaktionen in der extrazellulären Matrix erfolgen könnte. Des weiteren könnte eine Kombination einer Bindung an Zelloberflächenmoleküle oder die Moleküle der extrazellulären Matrix und der Wirkung als Ligand zusammenkommen, indem das Norrin-Homodimer erst an bestimmte Moleküle binden muss, bevor es in der dann richtigen sterischen Konformation von seinem eigentlichen Rezeptor erkannt werden und den zugehörigen Signalweg auslösen kann, wie dies z.B. für bFGF gezeigt werden konnte (Yayon et al., 1991).

Zur Beantwortung der molekularen Wirkung von Norrin ist vor kurzem ein wesentlicher Beitrag geleistet worden. Es war bekannt, dass Frizzled-4 (*Fzd4*) und *Ndph* in Fällen der familiären exsudativen Vitreoretinopathie (FEVR) mutiert sind (Chen et al., 1993a; Robitaille et al., 2002). Jetzt konnte *in vitro* gezeigt werden, dass *Fzd4* ein hoch affiner Rezeptor für Norrin ist und es durch die Bindung von Norrin in Gegenwart des Korezeptors, Lrp5, zu einer Aktivierung des klassischen Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalwegs kommt (Xu et al., 2004). Diese Befunde zeigten, dass den sehr ähnlichen klinischen Erscheinungsbildern des Norrie-Syndroms und der FEVR Veränderungen in ein und demselben molekularen Signalweg zu Grunde liegen und das offensichtlich zumindest eine Funktion des Norrins, wie die vieler anderer Cystinknoten-Proteine (Vitt et al., 2001), die eines extrazellulären Liganden ist. Zusammen mit dem Befund, dass Lrp5 als Korezeptor dient, sind nun also 3 Gene aus einem molekularen Signalweg bekannt, die zu FEVR führen können. Dabei ist interessant, dass die Mutationen im *NDP*-Gen, das für den Liganden kodiert, zu weiteren klinischen Entitäten führen können, während die Mutationen in den beiden Rezeptoren, Lrp5 und *Fzd4*, bisher nur in FEVR, und zwar in ca. 35% der Fälle, beschrieben worden sind (Toomes et al., 2004a). Für zwei dieser Gene, *Fzd4* und *Ndph* können wir nun mit unseren Transkriptionsstudien erstmals *in vivo* den Expressionsverlauf während der frühen postnatalen Entwicklung in der normalen und in der *Ndph*-knockout-Retina, also in Abwesenheit des Liganden, beschreiben.

*Fzd4* wird während der normalen Retinaentwicklung zwischen p5 und p21 hochreguliert, wobei dieser Anstieg in der Retina der *Ndph*-knockout-Maus noch auffälliger war. Diese gesteigerte transkriptionelle Aktivität von *Fzd4* legt einen kompensatorischen Rückkopplungsmechanismus als Reaktion auf die Abwesenheit des Liganden, Norrin, nahe.

Auch die Phänotypen der *Fzd4*- und der *Ndph*-knockout-Mäuse sind sehr ähnlich und weisen so auf einen gemeinsamen molekularen Signalweg als Ursache hin. Beide zeigen eine verzögerte Regression der hyaloiden Gefäße und ein komplettes Fehlen der tiefen Kapillarnetzwerke in der Retina (Xu et al., 2004). Allerdings sind einige spezifische Unterschiede zu beobachten, wie z.B. die schwereren intraretinalen Hämorrhagien in den Augen der *Fzd4*-knockout-Mäuse und die Ausbildung der senkrecht in die Retina einwachsenden Blutgefäße, die bei den *Fzd4*-knockout-Mäusen, ausgehend vom oberflächlichen Kapillarnetzwerk, bis in die tiefen Schichten vordringen, aber die Netzwerke nicht ausbilden. Auch sind die degenerativen Veränderungen im Innenohr und insbesondere im Kleinhirn (Cerebellum) der *Fzd4*-knockout-Mäuse, welche schon in der dritten postnatalen Woche auftreten (Wang et al., 2001), wesentlich schwerer als in den *Ndph*-knockout-Mäusen, wo solche bisher nicht beschrieben und auch nicht durch die hier präsentierten, morphologischen Studien nachgewiesen wurden. Im Allgemeinen scheinen die Defekte in der *Fzd4*-knockout-Maus also schwerer zu sein als die in der *Ndph*-knockout-Maus, was weitere Faktoren, z.B. zusätzliche Liganden für *Fzd4* nahe legt. Dabei könnte es sich um Moleküle der Wnt-Familie handeln, die normalerweise über Frizzled-Rezeptoren wirken, wie z.B. Wnt1, das direkt über Frizzled-4 wirkt, ohne, dass der Korezeptor für Norrin, Lrp5, für die Signalweiterleitung nötig wäre (Xu et al., 2004). Umgekehrt könnte das Norrin auch mit anderen Molekülen interagieren, beispielsweise mit anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Auch die nur zum Teil in gleichen Geweben vorhandene Expression der beiden Gene *Fzd4* (Wang et al., 2001) und *Ndph* (Berger et al., 1996) im Gehirn, in der Retina sowie im Innenohr adulter Mäuse und die Tatsache, dass bisher keine mentale Retardierung oder Taubheit in FEVR-Patienten mit *Fzd4*- oder *Lrp5*-Mutationen beschrieben worden sind, spricht dafür, dass noch weitere Moleküle mit Frizzled-4 und Norrin interagieren.

Norrin scheint also eine wichtige Rolle in der extrazellulären Matrix von Endothelzellen in der Retina zu spielen, wo es dafür sorgt, dass diese die tiefen Kapillarnetzwerke ausbilden können, wobei aber der Verlust des Norrins nicht zu einem intrinsischen Defekt in den Endothelzellen führt, sondern verhindert, dass diese normal auswandern können. Weitere Studien müssen noch zeigen, ob Norrin *in vivo* nur als Lrp5-abhängiger Ligand des Rezeptors

Frizzled-4 wirkt, oder ob es mit weiteren Molekülen interagiert und so zusätzlich die extrazelluläre Matrix moduliert und dadurch den Weg für das astrozytenunabhängige Einwachsen der Endothelzellen in die tiefen Retinaschichten bahnt.

## **4.2 Die Untersuchungen zur Funktion des *Ndph*-Gens im Gehirn - Die Dysregulation des Wachstumshormons im Gehirn könnte dem Phänotyp der mentalen Retardierung zu Grunde liegen**

Zusätzlich zur kongenitalen Blindheit und dem fortschreitenden Hörverlust zeigen 30% bis 50% der Norrie-Patienten mentale Dysfunktionen oder Retardierungen mit variablem Schweregrad (Hafez et al., 1982; Warburg, 1966; Warburg, 1968). Bisher sind weder morphologische Veränderungen im Gehirn von Norrie-Patienten noch ein molekularer Pathogenesemechanismus beschrieben worden, der die Entstehung dieses Symptoms bei Abwesenheit des funktionellen Norrins erklären könnte.

### **4.2.1 Histologische Untersuchung des Gehirns**

Auch mit den hier durchgeführten morphologisch-histologischen Untersuchungen der Gehirne von *Ndph*-knockout-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen konnten keine auffälligen strukturellen Veränderungen detektiert werden, die Hinweise auf spezifische Defekte in bestimmten Hirnarealen gegeben hätten. Eine detaillierte morphologische Analyse mit z.B. Endothelzellmarkern oder neuronalen Zellmarkern in den Hirnregionen, wo eine *Ndph*-Expression im Wildtyp nachgewiesen worden ist, wie z.B. in den Purkinjezellen des Cerebellums oder dem olfaktorischen Bulbus (Berger et al., 1996), könnte in Zukunft weiteren Aufschluss über die Verteilung und Funktion von Norrin im Gehirn bringen. Insbesondere wäre hier die Lokalisierung des Proteins mit Hilfe eines Norrin-Antikörpers von großem Vorteil, der während dieser Doktorarbeit nicht zur Verfügung stand (siehe unten).

### **4.2.2 Globale Genexpressionsstudien im Gehirn von Wildtyp- und *Ndph*-knockout-Mäusen**

Die Erstellung globaler Genexpressionsprofile der Gehirne von *Ndph*-knockout-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen mit Hilfe der cDNA-Mikroarrays hat zur Identifizierung von 18 Genen geführt, die auf Transkriptionsebene in den *Ndph*-knockout-Mäusen eine geringere Expression als im Wildtyp aufwiesen. Dabei handelt es sich um das Wachstumshormon (*Gh*), verschiedene Transkriptionsfaktoren und Enzyme, wobei aber eine generelle Klassifizierung der identifizierten Gene nicht als sinnvoll erschien. Um die differentielle Genexpression der

18 Gene zu verifizieren, wurden RT-PCR-Experimente durchgeführt, in denen für das Wachstumshormon im Gehirn von 12 Monate alten *Ndph*-knockout-Mäusen kein *Gh*-Transkript detektiert werden konnte, so dass für *Gh* die Reduktion der Transkriptmenge im Gehirn von *Ndph*-knockout-Mäusen bestätigt werden konnte. Allerdings konnten mit Hilfe dieser experimentellen Technik keines der anderen Gene als differentiell exprimiert bestätigt werden, da alle Transkripte sowohl im Wildtyp als auch im *Ndph*-Knockout nachzuweisen waren. Die Unterschiede in der mRNA-Menge sind offensichtlich nicht so groß, dass man sie mit der konventionellen RT-PCR detektieren kann. Eine sensitivere Technik, wie z.B. die quantitative RT-PCR, wäre wohl in der Lage, auch für die anderen Gene einen geringeren Expressionsunterschied nachzuweisen, so dass die endgültige Verifikation der differentiellen Expression für die 17 verbliebenen Gene weiterhin aussteht. Ein möglicher Nachweis der geringeren Transkription weiterer Gene, neben dem Wachstumshormon, würde zur Identifizierung weiterer molekularer Signalwege in der Maus führen, die durch das fehlende *Ndph* beeinflusst würden. Zum Beispiel ist für die Expression des Transkriptionsfaktors „CCAAT/enhancer binding protein C/EBP delta“, welches eines der anderen Kandidatengene aus den Mikroarrayexperimenten ist, bekannt, dass es in Zellkultur durch das Wachstumshormon reguliert wird. Dabei führt ein erhöhter Wachstumshormonspiegel zu einem Anstieg sowohl der C/EBPdelta-mRNA als auch des Proteins und ist assoziiert mit einer schnellen Bindung von C/EBPdelta an den c-fos-Promotor (Liao et al., 1999). In Folge dieser Regulation könnte das Fehlen des Wachstumshormons im Gehirn der *Ndph*-knockout-Mäuse für die mit dem Mikroarray identifizierte, verringerte Transkription des „C/EBP delta enhancer binding proteins“ auf mRNA-Ebene verantwortlich sein. Dieser und andere identifizierten Signalwege in der Maus wären Kandidaten für weiterführende Studien und könnten eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Norrie-Syndroms spielen, insbesondere wenn sie auch in früheren Stadien verändert sind. Insgesamt lieferten die Mikroarrayexperimente wichtige Hinweise auf zu untersuchende Gene, deren Deregulierung dem Phänotyp der geistigen Behinderung in Norrie-Patienten zu Grunde liegen könnte.

### 4.2.3 Differentielle Genexpression in verschiedenen Hirnregionen als mögliche Ursache der geistigen Behinderung in Norrie-Patienten.

Aufgrund der cDNA-Mikroarray- und RT-PCR-Ergebnisse wurde das Wachstumshormon (*Gh*) als differentiell exprimiert identifiziert und in weiteren Studien näher untersucht. In diesen konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Deregulierung der Wachstumshormontranskription um einen gehirnspezifischen Effekt der *Ndph*-knockout-Mutation handelt. Dies war ersichtlich anhand der nicht veränderten mRNA- und Protein-Expression des Wachstumshormons in der Hypophyse, während im Gehirn der *Ndph*-knockout-Mäuse die Wachstumshormonexpression auf RNA-Ebene von p21 bis 12 Monate stark reduziert war. Die Hypophyse ist die Hauptquelle für das endokrinologisch wirksame Wachstumshormon im Organismus, welches eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des postnatalen Wachstums in Mäusen (Lupu et al., 2001), aber auch im Menschen spielt, so dass eine unveränderte Transkription des Wachstumshormons in der Hypophyse auch mit der Beobachtung übereinstimmt, dass in den *Ndph*-knockout-Mäusen bisher keine Hinweise auf eine Wachstumshormondefizienz gefunden wurden. Außerdem sprachen die in *Ndph*-knockout-Mäusen unveränderten *Igfl*- und *Igfals*-Transkriptmengen in der Leber, welche direkt vom Wachstumshormonspiegel im Serum kontrolliert werden (Boisclair et al., 1996; Boisclair et al., 2000), für einen konstanten Serum-*Gh*-Spiegel in *Ndph*-knockout-Mäusen.

Aus den Transkriptionsstudien für *Ndph* und *Gh* ergab sich außerdem, dass *Ndph* über den untersuchten Zeitraum von p14 bis 12 Monate im Gehirn eine konstante Expression im Wildtyp zeigte, während für *Gh* im Wildtyp im Verlauf des Wachstums bis p28 höhere Spiegel nachzuweisen waren, die dann über die Zeit auf ein niedrigeres Niveau abzunehmen schienen. Bei dem detektierten *Gh*-Transkript handelt es sich um die bekannte einzelne Spleißvariante des Gens der Maus (Linzer and Talamantes, 1985), die hier nur im Gehirn aber nicht im Auge oder in der Retina der Wildtyp oder der *Ndph*-knockout-Mäuse nachzuweisen war. Diese Variante entspricht einer der fünf humanen Spleißvarianten des orthologen Gens, die im Menschen in der Hypophyse und im Gehirn exprimiert wird (Palmetshofer et al., 1995).

Die Expression beider Gene, *Ndph* und *Gh*, war in allen untersuchten Hirnregionen von Wildtyp-Mäusen nachzuweisen, so dass diese Daten die bisher publizierten ergänzten, in denen die Expression für *Ndph* nur im Cerebellum und im olfaktorischen Bulbus ((Berger et al., 1996) und für *Gh* nur im Cerebellum nachgewiesen wurde (Gene Expression Database (GXD), Mouse Genome Informatics Web Site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine; World Wide Web URL: <http://www.informatics.jax.org>; [10, 2004]). Frühere RNA-*in situ*

Hybridisierungsstudien in Ratten detektierten die *Gh*-mRNA im basalen Cortex, dem äußeren Hippokampus, dem Striatum, dem Thalamus (Gossard et al., 1987) und dem Hypothalamus (Yoshizato et al., 1998) und lieferten somit Hinweise auf eine weit verteilte Expression des Wachstumshormons im Gehirn, ähnlich wie wir sie in der Maus beobachtet haben.

Es zeigte sich auch, dass die Transkription von *Ndph* in den verschiedenen Hirnregionen in unterschiedlichen Tieren konstant war, während die *Gh*-Expression sehr variierte und somit keine direkte Korrelation mit der *Ndph*-Expression aufwies. Ein Trend lies sich aber dennoch ableiten, nämlich, dass die Wachstumshormonexpression in den Hirnregionen am stärksten reduziert war, in denen im Wildtyp auch signifikante *Ndph*-Spiegel vorhanden sind. In Übereinstimmung mit den publizierten *in situ* Hybridisierungsdaten für *Ndph* (Berger et al., 1996) wurden die höchsten *Ndph*-Spiegel im Cerebellum nachgewiesen gefolgt vom Hirnstamm und dem olfaktorischen Bulbus, drei Hirnregionen, in denen auch die Reduktion der Wachstumshormonexpression zu beobachten war. In der Hypophyse hingegen wurden nur Spuren von *Ndph* nachgewiesen, was nahe legt, dass die Abwesenheit von Norrin in den *Ndph*-knockout-Tieren keine Auswirkungen auf die Wachstumshormontranskription hat. Ein molekularer Zusammenhang zwischen einem Fehlen der Norrin-Expression und der Reduktion der *Gh*-Transkription in verschiedenen Hirnregionen blieb aber offen.

Die Beobachtung der gehirnspezifischen Dysregulation der Wachstumshormonexpression im Mausmodell für das Norrie-Syndrom könnte für die geistige Behinderung von Norrie-Patienten relevant sein.

Generell sind Wirkungen des Wachstumshormons auf das Zentralnervensystem auf verschiedenen Ebenen bekannt. Es wirkt in der Entwicklung von Neuronen, hat einen neuroprotektiven Effekt, beeinflusst kognitive Funktionen und die Stimmung sowie das Schlafverhalten (Lobie et al., 2000; Nyberg, 2000; Schneider et al., 2003). Zum Beispiel zeigen wachstumshormondefiziente Mäuse eine Mikrozephalie mit einer Hypomyelinisierung der Neurone, ein verzögertes Wachstum von Neuronen und Defekte in der Synaptogenese, wobei diese Effekte während der ersten 20 postnatalen Entwicklungstage durch die Gabe von Wachstumshormon reversibel sind (Noguchi, 1996). Zudem wurde kürzlich auch *in vitro* eine direkte Wirkung des Wachstumshormons auf die Neurogenese und neuronale Differenzierungsprozesse während der Embryonalentwicklung in Ratten nachgewiesen (Ajo et al., 2003), so dass eine wichtige Rolle des Wachstumshormons in der Entwicklung des Zentralnervensystems klar ist.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Wachstumshormon ein Faktor ist, der Neurone während der Erholungsphase nach einer Verletzung des Gehirns vor dem Zelltod bewahrt (Scheepens et al., 2001) und dass die Wachstumshormonspiegel nach einer Gehirnverletzung ansteigen. Auch durch die intraventrikuläre Gabe von Wachstumshormon nach einer Verletzung durch eine Ischämie kann das Ausmaß des Verlustes von Neuronen in bestimmten Hirnregionen reduziert werden. Diese Hirnregionen stimmen sehr gut mit der Verteilung der Wachstumshormonrezeptoren überein (Lobie et al., 1993), was die Hypothese unterstützt, dass das Wachstumshormon einen direkten neuroprotektiven Effekt besitzt. Interessanterweise sind einige dieser Hirnregionen, wie z.B. der Hippokampus, auch in kognitive Funktionen, wie Lernen und Gedächtnis, involviert (Fries et al., 2003; Knierim, 2003; Wittenberg and Tsien, 2002) und es konnte gezeigt werden, dass Wachstumshormondefizienzen spezifische Auswirkungen auf das Gedächtnis haben (Deijen et al., 1998; Schneider et al., 2003). Zum Beispiel führt im Liquor die Gh-Substitution in wachstumshormondefizienten Erwachsenen (Johansson et al., 1995) und die intraventrikuläre Gabe von Wachstumshormon in Ratten (Nyberg, 2000) zu einem Anstieg des beta-Endorphins, eines Moleküls, das die Stimmung beeinflusst. Somit ist klar, dass das Wachstumshormon verschiedene Hirnareale und Neurotransmittersysteme beeinflusst, die die Stimmung und das Wohlbefinden beeinflussen und die Hypothese scheint daher berechtigt zu sein, dass die identifizierten lokalen Veränderungen der Wachstumshormonexpression in *Ndph*-knockout-Mäusen ein molekularer Signalweg sein könnte, der dem Phänotyp der geistigen Behinderung in Norrie-Patienten zu Grunde liegt.

Durch den Mangel an Wachstumshormon im Gehirn während der neuronalen Entwicklung und Differenzierung und im Verlaufe des Erwachsenenalters könnte die Homeostase des Gehirns durch die Abwesenheit der trophischen und neuroprotektiven Funktionen des Wachstumshormons im Zentralnervensystem gestört sein. Die hohe Variabilität der Wachstumshormonexpression in verschiedenen Hirnregionen, wie wir sie in den Mäusen beobachtet haben, könnte auch beim Menschen eine Erklärung sein für die hohe phänotypische Variabilität der Symptome der geistigen Behinderung in Norrie-Patienten (Berger, 1998; Warburg, 1966; Warburg, 1968).

Wie das Fehlen der *Ndph*-Expression aber zu der veränderten Expression von *Gh* führt, blieb ungeklärt. Eine Hypothese wäre, dass Norrin, ähnlich wie in der Retina für Endothelzellen, im Gehirn die extrazelluläre Umgebung für Neurone organisiert. Somit könnte es eine trophische Funktion für Neurone besitzen, eventuell insbesondere für solche, die *Gh* exprimieren. Sollte

Norrin in der extrazellulären Matrix fehlen, könnte es zu Defekten in den Nervenzellen kommen, die dann durch in einer kompensatorischen Reaktion in Analogie zu den nach einer Hirnverletzung beobachteten (Scheepens et al., 1999), die *Gh*-Transkription erhöhen. Dies könnte in einer kritischen Phase vor p21 ablaufen und nach diesem Zeitpunkt, in Abhängigkeit des Fortschreitens der Defekte in den Nervenzellen, zu einer Reduktion des *Gh*-Transkripts im gesamten Hirn führen.

Da keine direkte Korrelation der Expressionsspiegel beider Gene, *Ndph* und *Gh*, zu beobachten war, erscheint ein direkter molekularer Signalweg, z.B. über den Norrin-Rezeptor Frizzled-4, als eine eher unwahrscheinliche Erklärung für die beobachteten Veränderungen in der Wachstumshormonexpression im Gehirn, obwohl dieser Rezeptor zum Teil in den selben Zelltypen des Gehirns, z.B. in den Purkinjezellen des Kleinhirns, exprimiert wird, wie das Wachstumshormon (Wang et al., 2001).

Beide Alternativen, die eher indirekte Wirkung des Norrins auf *Gh*-exprimierende Neurone durch die Organisation der extrazellulären Matrix oder die direkte Wirkung über einen Signalweg, sind konsistent mit einer möglichen, trophischen Funktion von Norrin für Neurone bzw. andere Zelltypen im Gehirn.

#### **4.2.4 Die Detektion eines artifiziellen *Ndph*-Fusionstranskripts in *Ndph*-knockout-Mäusen und die Konsequenzen für das Mausmodell.**

Die Identifizierung eines artifiziellen *Ndph*-knockout-Transkripts mit einer Länge von 2803 bp im Gehirn der *Ndph*-knockout-Mäuse war sehr überraschend, da aufgrund der bisherigen Daten davon ausgegangen wurde, dass keine Transkription von dem *Ndph*-knockout-Allel erfolgt. Nur mit Hilfe des hier verwendeten PolyA<sup>+</sup>-Northern Blots konnte ein artifizielles *Ndph*-Transkript nachgewiesen werden. Das Expressionsniveau dieses Transkripts in Knockout-Mäusen ist somit deutlich geringer als das des normalen *Ndph*-Transkripts im Wildtyp. Während der homologen Rekombination des *Ndph*-knockout-Konstruktes wurde das ATG und die Spleißdonorstelle am 3'-Ende von Exon 2 des *Ndph*-Gens entfernt, so dass das normale Spleißen nicht erfolgen konnte. Die Sequenzierung der cDNA des *Ndph*-knockout-Transkripts hat gezeigt, dass eine alternative Spleißdonorstelle etwas weiter 3' im Intron 2 verwendet werden kann, so dass die Transkription vom *Ndph*-knockout-Allel eine aberrante RNA erzeugt. Die Verwendung einer alternativen Spleißdonorstelle unter Einschluss eines Teils der 3'-gelegenen Intronsequenz in der *Ndph*-knockout-Maus und die dadurch erfolgte Expression eines artifiziellen Transkripts ist nicht nur in dieser Maus beobachtet worden, sondern ist auch als Mutationsmechanismus im Menschen, wie z.B., in der Hypoxanthin-

Guanin-Phosphoribosyltransferase (*HPRT*) bekannt (O'Neill et al., 1998). Diese alternativen Transkripte enthalten oft ein verfrühtes Stoppkodon in ihrer Sequenz und unterliegen häufig dem NMD („nonsense mediated decay“), einem Prozess der mRNA-Qualitätskontrolle, in dem aufgrund des verfrühten Stoppkodons und somit dem vorzeitigen Beenden der Translation die mRNA abgebaut wird (Maquat and Carmichael, 2001). Allerdings enthält das aberrante *Ndph*-knockout-Transkript kein neu eingeführtes Stoppkodon, so dass NMD unwahrscheinlich ist, obwohl das Transkript in wesentlich geringeren Mengen vorhanden ist als die mRNA vom Wildtyp-Allel. Eine mögliche Erklärung für dieses deutlich geringere Expressionsniveau wäre eine gleichzeitige antiparallele Transkription der Neomycin-Kassette vom DNA-Gegenstrang, die mit der Transkription des *Ndph*-knockout-Allels interferiert.

Ebenso wirft die geringe Expression des aberranten *Ndph*-knockout-Transkripts die Frage auf, ob man bei der ND-Maus weiterhin von einem *Ndph*-knockout-Mausmodell sprechen kann und welche Auswirkungen die Transkription des identifizierten *Ndph*-knockout-Transkripts für die weiteren Untersuchungen hatte. Die Sequenz der *Ndph*-knockout-cDNA ergab, dass von ihr kein funktionelles *Ndph*-Protein abgelesen werden kann. Das Startkodon sowie die ersten 56 Aminosäuren des Wildtyp-Proteins fehlen, unter denen sich auch zwei der konservierten Cysteinreste befinden, die für die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur eines Cystinknotens essentiell sind (Vitt et al., 2001). Die theoretische Möglichkeit einer Translation beginnend mit Aminosäure 57, bei der es sich um ein Methionin handelt, ist nicht auszuschließen, aber, wie oben diskutiert, würde dieses trunkierte *Ndph*-Protein nicht funktionell sein. Somit kann man weiterhin von einem funktionellen Knockout sprechen, auch wenn ein artifizielles Transkript nachgewiesen werden konnte. Zudem weist die Ähnlichkeit des Phänotyps der Maus mit der humanen Erkrankung darauf hin, dass das Mausmodell für die Untersuchung der Pathogenesemechanismen der Norrie-Erkrankung gut geeignet ist.

### **4.3 Untersuchungen zur Rolle des Norrins für die Fertilität**

In diesem Abschnitt der Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass die weiblichen ND-Mäuse, die homozygot für die *Ndph*-knockout-Mutation sind, infertil sind. Im Gegensatz dazu wurde eine Infertilität bei hemizygoten Männchen nicht beobachtet. Durch eine nähere Charakterisierung dieses Phänotyps konnte hier nachgewiesen werden, dass die Fortpflanzungsorgane der homozygoten *Ndph*-knockout-Weibchen nicht in der Lage sind, die fötale Entwicklung über die mittleren Schwangerschaftsstadien hinaus zu unterstützen.

### 4.3.1 Genotypenverteilung

Aus den Studien zur Transmission des *Ndph*-knockout-Allels in der ND-Mauslinie ergaben sich die ersten Hinweise auf einen Reproduktionsdefekt in den Muttertieren aufgrund des homozygoten *Ndph*<sup>-/-</sup>-Genotyps. Zudem wurde aus den Verpaarungen mit normal fertilen heterozygoten Muttertieren mit dem Genotyp *Ndph*<sup>+/-</sup> etwa ein Drittel mehr männliche Wildtyp- als hemizygoten Nachkommen erhalten, während eine solche Genotypenverschiebung für die weibliche Nachkommenschaft, im Gegensatz zu dem zuvor publizierten Trend (Berger et al., 1996) nicht beobachtet wurde. Diese jetzt identifizierte Genotypenverschiebung lässt sich wahrscheinlich mit einem höheren Anteil des genetischen C57BL/6-Hintergrundes erklären, der möglicherweise im Vergleich zum 129/O1a-Hintergrund für die *Ndph*<sup>+/-</sup>-Nachkommen von Nachteil ist.

Die eigentliche Fertilitätsstörung tritt aber nur beim mütterlichen *Ndph*<sup>-/-</sup>-Genotyp auf, was insgesamt darauf schließen ließ, dass *Ndph* auf mütterlicher Seite eine entscheidende Rolle für die Fertilität spielt, während der Genotyp der Embryonen von sehr untergeordneter Bedeutung ist und nur im Falle der hemizygoten Männchen einen Einfluss auf die Überlebensrate der Embryonen hat.

### 4.3.2 Die Rolle des Norrins während der Dezidua-Bildung

Die Histologie belegte, dass sich nur in homozygoten Muttertieren Einblutungen in die Deziduae bzw. die Implantationsstellen der Embryonen zeigten und so die Embryonalentwicklung verhindert wird. Dieser Defekt in den mütterlichen Fortpflanzungsorganen führt zum Absterben der Embryonen, da das sie umgebene Blut eine Entwicklung unmöglich macht. Einige weitere solcher Fälle mütterlicher Infertilität sind bisher beschrieben worden, in denen die Ursache der Infertilität darin lag, dass die Fortpflanzungsorgane die Entwicklung der Embryonen nicht unterstützen können. Beispiele sind die Homeobox-Gene *Hoxa10* (Benson et al., 1996) und *Hmx3* (Wang et al., 1998), das Gen *Lif* (leukaemia inhibitory factor) (Cai et al., 2000; Stewart et al., 1992) und die Fibrinogene  $\gamma$  (*Fgg*; (Iwaki et al., 2002)) und  $\alpha$  (*Fga*; (Suh et al., 1995)). Die Deletionen der Gene *Lif*, *Hmx3* und *Hoxa10* führen zu einer gestörten Einnistung der Embryonen und wirken somit früher während der Schwangerschaft als die *Ndph*-Mutation. Für die *Hoxa10*-knockout-Maus ist gezeigt worden, dass in den mutierten Uteri keine Anheftung der Blastozyste erfolgt. Im Gegensatz zu diesen Befunden findet die Anheftung der Blastozyste in den *Ndph*<sup>-/-</sup>-Weibchen statt und auch die Bildung der Dezidua wird initiiert. Interessanterweise zeigen die Mäuse mit den *Fgg* und *Fga* Deletionen, die beide zur Abwesenheit des Fibrinogens führen

und letal sind, einige Ähnlichkeiten mit dem Phänotyp in der *Ndph*-knockout-Maus. So führt das Fehlen von Fibrinogen in der Implantationsstelle zu Einblutungen und zum Verlust des Fötusses in etwa der Mitte der Schwangerschaft. Zusätzlich zeigen die E10-Konzeptus der *Fgg*<sup>-/-</sup>-Mütter einen sehr ähnlichen Phänotyp, wie die der *Ndph*<sup>-/-</sup>-Mütter, was nahe legt, dass in beiden Fällen die schweren Einblutungen für den Verlust der Embryonen verantwortlich sind. Diese Einblutungen scheinen aber in den früheren Stadien von E7 bis E9 in den *Ndph*<sup>-/-</sup>-Müttern wesentlich schwerer zu sein als in den fibrinogen Mutanten. Diese Unterschiede für die beiden Gene sind wahrscheinlich in ihrer unterschiedlichen molekularen Funktion zu suchen.

Die beobachteten Einblutungen waren ein guter Hinweis darauf, dass auch im Reproduktionstrakt der homozygoten *Ndph*<sup>-/-</sup>-knockout-Weibchen, während der Bildung der Dezidua, Defekte in der Blutgefäßentwicklung auftreten. Somit scheint Norrin auch eine wesentliche Funktion für die Entwicklung der Blutgefäße während und nach der Implantation zu spielen. Es ist bekannt, dass die Bildung und das Auswachsen der mütterlichen Blutgefäße während dieser Phase von der Gegenwart zweier Zinkfingertranskriptionsfaktoren, *Gata2* and *Gata3* abhängig ist, die in den Riesenzellen des Trophoblasten exprimiert werden und die angiogene Aktivität dieser Zellen steuern (Ma et al., 1997). Außerdem weist die Expression von Genen, wie *Vegf*, in den Riesenzellen des Trophoblasten darauf hin, dass diese an der Induktion der Angiogenese der mütterlichen Blutgefäße beteiligt sind (Hemberger et al., 2003). Da sich die *Ndph*<sup>-/-</sup>-Embryonen in *Ndph*<sup>+/-</sup>-Müttern normal entwickeln können, müssen die Trophoblasten dieser Embryonen prinzipiell in der Lage sein, die Angiogenese zu induzieren, so dass auch hier ein Defekt auf der embryonalen Seite nicht zu erkennen ist. Aber es scheint so zu sein, dass in *Ndph*<sup>-/-</sup>-Müttern die Angiogenese in den Deziduae entweder, analog zu den Befunden im Auge, nicht korrekt stattfinden kann und dass es so zu den Einblutungen von mütterlichem Blut in die Dezidua kommt, die sekundär alle weiteren Entwicklungsschritte des Embryos und einer normalen Plazenta verhindern.

Es ist schwierig einzuschätzen, ob diese Befunde auch auf den Menschen zu übertragen sind. Das Norrie-Syndrom ist eine seltene X-chromosomal vererbte Erkrankung und es gibt bis heute nur einen Bericht, in dem wahrscheinlich betroffene, homozygote Norrie-Patientinnen beschrieben wurden (Clarke, 1898), wobei die Diagnose nicht molekulargenetisch abgesichert ist und nur die Augensymptomatik beschrieben wurde. Zusätzlich gibt es wenige Berichte über Fälle heterozygoter *NDP*-Mutationsträgerinnen, die einen Norrie-Phänotyp aufwiesen (Chen et al., 1993b; Shastry et al., 1999). Die einzige Auffälligkeit, die bezüglich

einer Rolle des *NDP*-Gens in oder während der Reproduktion der heterozygoten Mutationsträgerinnen beschrieben wurde, ist ein transplazentaler Effekt der *NDP*-Mutation, wobei sieben, genotypisch gesunde Nachkommen in der Peripherie der Retina Blutgefäßveränderungen aufwiesen (Mintz-Hittner et al., 1996). Wie dieser Effekt vermittelt wird, ob direkt durch das defekte Norrin-Protein oder durch eine mangelnde Versorgung des embryonalen Auges mit Sauerstoff aufgrund einer eventuell verringerten mütterlichen Versorgung des Embryo durch die Plazenta, ist unbekannt. Der Nachweis der Expression von *NDP* in der humanen Plazenta spricht für eine wichtige Rolle des *NDP*-Gens in der humanen Reproduktion und unterstützt so die letzte Hypothese. Ob allerdings Frauen mit pathogenen Sequenzveränderungen in beiden Allelen des *NDP*-Gens infertil sind, oder ob es andere Auswirkungen eines solchen Genotyps auf die menschliche Reproduktion gibt, bleibt offen.

#### **4.4 Rekombinante Expression des Norrins und die Herstellung von Antikörper**

Dieser Abschnitt befasst sich mit den proteinbiochemischen Arbeiten, die im Verlaufe dieser Doktorarbeit durchgeführt worden sind. Dabei ist es gelungen, zwei der drei verschiedenen, N-terminal mit einer RGS-His-Erkennungssequenz versehenen, rekombinanten Proteine in *Escherichia coli* zu exprimieren und beide affinitätschromatographisch über Ni-NTA-Agarose so weit aufzureinigen, dass sie für die Immunisierung von Kaninchen in ausreichenden Mengen und in reiner Form zur Verfügung standen. Es handelte sich dabei um das vollständige Norrin (WND) ohne Signalpeptid (AS:25-131) aus der Maus sowie um das N-terminale Teilprotein (NND) ohne Signalpeptid (AS: 25-75). Das dritte C-terminale Teilprotein (CND; AS 76-131) konnte nicht isoliert werden.

Scheinbar bildet das N-terminale Teilprotein (NND) Oligomere mit sich selbst, die im Western Blot als leiterförmig angeordnete Signale sichtbar sind und selbst unter den verwendeten denaturierenden und reduzierenden Bedingungen nicht aufgebrochen werden können. Somit scheiden Disulfidbrücken als mögliche kovalente Bindung innerhalb dieser Oligomere aus und es handelt sich wahrscheinlich um hydrophobe Wechselwirkungen der Aminosäuren, die normalerweise die hydrophobe Seite des ersten Beta-Faltblattes im Norrin bilden (Meitinger et al., 1993), die in diesem rekombinanten Protein miteinander interagieren. Das WND-Protein war hingegen als Monomer nachzuweisen.

Drei der polyklonalen Antiseren erkannten spezifisch ihre Antigene, wenn auch mit einer recht geringen Affinität. In Gewebehomogenaten von Wildtyp-Mäusen konnte allerdings kein Norrin nachgewiesen werden. Entweder wird Norrin in den Wildtyp-Tieren in nur sehr

geringen Mengen im Gehirn bzw. in der Retina translatiert oder die Antiseren weisen eine zu geringe Affinität für das Antigen auf, was die wahrscheinlichere Erklärung ist.

Es bleibt festzuhalten, dass mit den hier durchgeführten Immunisierungen keine ausreichend affinen Seren gegen das Protein Norrin erhalten wurden, um es in Gewebehomogenaten nachzuweisen. Einerseits könnte man versuchen durch eine Affinitätsaufreinigung gegen die rekombinanten Proteine (Antigene) die Seren aufzureinigen und dadurch für die höher affinen Antikörper anzureichern oder alternativ, die Immunisierung mit Peptiden versuchen, obwohl die Immunisierung mit dem gesamten Protein alle potentiellen Epitope für die Antikörper und somit alle möglichen Peptide umfasst. Eine andere Alternative wäre auch, die Immunisierung mit einer erhöhten Proteinmenge pro Injektion zu wiederholen, da es sich bei den hier verwendeten Antigenen um Proteine sehr geringen Molekulargewichts (kleiner 20 kDa) handelte, die generell schwieriger eine Antikörperreaktion auslösen.

#### **4.5 Cornea-Vaskularisations-Assay**

Zur Untersuchung einer möglichen angiogenen Wirkung von Norrin wurde das aufgereinigte, rekombinante Protein voller Länge (WND) in einem Cornea-Vaskularisations-Assay eingesetzt. Es zeigte allerdings im Gegensatz zu VEGF oder bFGF keine angiogene Aktivität, die als Positivkontrollen mitgeführt wurden. Für diesen Befund gibt es zwei mögliche Erklärungen. Einerseits könnte Norrin keine angiogene Aktivität besitzen oder aber das rekombinante Protein ist nicht funktionell. Dies könnte man auf die rekombinante Expression in *E.coli* zurückführen, da das Protein für eine korrekte Faltung wahrscheinlich die in eukaryotischen Zellen vorhandenen Chaperone benötigt, die in den Bakterienzellen fehlen. Außerdem konnte bisher kein Cystinknotenprotein in einzelligen Organismen, auch nicht in der Hefe, identifiziert werden (Vitt et al., 2001), so dass man für die native Expression höchstwahrscheinlich andere Expressionssysteme wählen muss. Allerdings hat sich auch die sonst sehr erfolgreiche Expression mit Hilfe des Baculovirussystems für dieses Protein als schwierig erwiesen (Shastry and Trese, 2003), so dass wahrscheinlich nur Säugerzellen ein natives und somit funktionelles Protein produzieren können. Das Gen wurde bisher auch nur in Mensch, Maus und Ratte auf genomischer Ebene beschrieben und für das Huhn vorhergesagt, was diese Sichtweise unterstützt. Neben der Wahl des Expressionssystems, war natürlich die denaturierende Aufreinigung von entscheidender Bedeutung für den geringen Anteil an funktionellem Norrin am Gesamtprotein. Diesen Anteil an nativem Protein könnte man versuchen mit Hilfe eines ausgefeilteren Renaturierungsprotokolls, z.B. mit dem von Wingfield und Koautoren beschriebenen (Wingfield et al., 1999), zu erhöhen.

#### **4.6 Die Pathogenese des Norrie-Syndroms und die molekulare Wirkung des Norrie disease pseudoglioma-Gens/Proteins („Norrins“) - Ein Ausblick**

In dieser Arbeit wurden wesentliche Befunde zur Pathogenese des X-chromosomal rezessiv vererbten Norrie-Syndroms im Auge und im Gehirn gemacht, die helfen, die molekularen Ursachen für die klinischen Merkmale Blindheit, Taubheit und geistige Behinderung besser zu verstehen. Zusätzlich zu diesen Erkenntnissen, konnte eine bisher unbekannte Funktion des *NDP/Ndph*-Gens bzw. des Norrins in der weiblichen Reproduktion nachgewiesen werden.

Wie gezeigt wurde, ist die Gegenwart von Norrin in der Retina für die normale Entwicklung des oberflächlichen Blutgefäßnetzwerks förderlich, während es für die Entwicklung der tiefen Kapillarnetze absolut essentiell ist. Dieser differentielle Effekt des Fehlens von Norrin spricht für die unterschiedliche Abhängigkeit der Endothelzellen von Norrin in beiden Kapillarsystemen, was durch die Untersuchungen zur molekularen Wirkung des Norrins in Zukunft näher aufgeklärt werden soll (siehe unten).

Die Hypoxie in der inneren Retina ist eine der Hauptursachen für den Phänotyp der monogenetisch verursachten, bilateralen Blindheit im Norrie-Syndroms und der variablen Blutgefäßdefekte in der familiären exsudativen Vitreoretinopathie sowie in Morbus Coats. Außerdem ist sie auch der entscheidende Pathogenesemechanismus in der hauptsächlich durch den Umweltfaktor Sauerstoff ausgelösten Frühgeborenenretinopathie (ROP), womit einerseits die genetisch verursachte und andererseits die durch Umwelteinflüsse verursachte Hypoxie zu jeweils sehr ähnlichen Phänotypen in diesen vier Erkrankungen führt.

In Anbetracht dieses Erklärungsansatzes, ist die Frage interessant, ob die ROP-Patienten mit Mutationen im *NDP*-Gen wirklich ROP-Patienten sind oder nicht doch zu früh geborene Norrie- oder FEVR-Patienten, insbesondere da es sich bei allen Fällen, in denen eine Assoziation auftrat um schwere ROP-Fälle handelte (Haider et al., 2002; Shastry et al., 1997c) und in anderen Studien keine Assoziation einer ROP mit *NDP*-Mutationen nachgewiesen werden konnte (Haider et al., 2000; Haider et al., 2001). Allerdings ist nur einer der von Shastry und Koautoren publizierten Fälle (Shastry et al., 1997c) ein Junge, für den ein solcher Erklärungsansatz plausibel erscheinen könnte. Die anderen drei Patienten sind weiblichen Geschlechts und nur heterozygote Trägerinnen der Mutation im *NDP*-Gen. Zwei von ihnen sind eineiige Zwillinge und die Dritte hat einen nicht betroffenen Zwillingsbruder. Es könnte sich bei diesen drei entweder um manifeste Trägerinnen der Norrie-Erkrankung handeln oder *NDP*-Mutationen im Embryo führen tatsächlich zu einer erhöhten

Empfindlichkeit gegenüber der Entwicklung einer ROP. Interessant wäre aber auch, in Anbetracht der in dieser Arbeit identifizierten Rolle des Norrins in der Fortpflanzung, zu untersuchen, ob es eventuell in heterozygoten Trägerinnen der *NDP*-Mutation, unabhängig vom Genotyp der Kinder, zu einer erhöhten Rate an Frühgeborenen kommt und so die erhöhte Inzidenz von ROP-Fällen unter deren Nachkommen zu erklären wäre.

In der Zukunft wird auch interessant zu verfolgen sein, ob sich auf molekularer Ebene Frizzled-4 *in vivo* als der Rezeptor für Norrin bestätigt und ob sich die Diskrepanz zwischen der Frizzled-4-Expression in Photorezeptoren mit einem vereinzelt Vorkommen in der inneren Retina (Wang et al., 2001) und der Lokalisierung der Haupteffekte des *Ndph*-Knockouts in der inneren Retina auflösen lassen. Außerdem könnte eine Kollokalisierung von Norrin mit diesem Rezeptor auch auf Proteinebene mit Hilfe eines zu erzeugenden, neuen Norrin-Antikörpers und des Nachweises der Aktivierung von Signalmolekülen aus dem Frizzled-4-Signalweg, wie des  $\beta$ -Catenins (Goodwin and D'Amore, 2002), auch *in vivo* die Wirkung von Norrin über den Frizzled-4-Rezeptor in der Retina und möglicherweise auch in den anderen Geweben, Gehirn, Ohr und Deiziduae bestätigen.

Die hier präsentierten Befunde in Retina und in den weiblichen Reproduktionsorganen legen eine generelle Wirkung des Norrins auf Blutgefäße nahe. Dies wäre dann mit einer Wirkung über den Frizzled-4-Signalweg vereinbar, wenn dieser Rezeptor auf Endothelzellen in der Retina und in den Deiziduagefäßen exprimiert wäre. Gleichzeitig spricht die Wirkungsweise von Norrin auf die retinalen Blutgefäße für eine Expression dieses Moleküls in Astrozyten und/oder Müllerzellen, da diese Zellen den Prozess der Blutgefäßentwicklung steuern (Gariano, 2003). Um diese Fragen bezüglich der Lokalisation von Norrin und *Fzd4* zu beantworten, müsste deren Expression in der Retina mit RNA-*in situ* Hybridisierungsstudien auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden und gleichzeitig der Zelltyp der exprimierenden Zelle mit Markern, wie z.B. Antikörpern gegen GFAP für Astrozyten, immunhistochemisch identifiziert werden. Die bisherigen RNA-*in situ* Hybridisierungsdaten lassen eine so differenzierte Aussage über die zelluläre Herkunft des Norrins nicht zu, so dass neben den Astrozyten und Müllerzellen auch die Neurone (retinale Ganglienzellen, Bipolarzellen und Purkinjezelle des Cerebellums) als Expressionsort für Norrin in Frage kommen (Berger et al., 1996). Damit könnte das Norrin auch an der Kommunikation von Nervenzellen mit dem Blutgefäßsystem beteiligt sein. Gleichzeitig würden diese Studien auch nähere Informationen

über den beobachteten differentiellen Effekt auf Endothelzellen in der Ganglienzellschicht und den tieferen Schichten der Retina geben können.

Eine Rolle des Proteins auf die Blutgefäße müsste nicht ausschließlich über einen molekularen Signalweg mit Fzd4 und Lrp5 als Rezeptoren laufen, sondern könnte auch durch die Wirkung des Norrins auf die Organisation der extrazellulären Matrix erklärt werden. Insbesondere eine trophische Funktion auf Neurone im Gehirn und eine eher strukturelle Funktion als Substrat, auf dem Endothelzellen und Nervenzellen wachsen könnten, würde die beobachteten Phänotypen, sowohl in der Retina und im Gehirn, als auch in den Deziduae erklären, wo das extrazelluläre Matrixmolekül für die Stabilität der extrazellulären Matrix verantwortlich sein könnte und so die Einblutungen verhindern würde. Um eine Rolle des Norrins in der extrazellulären Matrix nachzuweisen, wäre seine Lokalisierung als Protein und die Identifizierung von Interaktionspartnern aus den betroffenen Geweben durch proteinbiochemische Experimente wichtig.

Eine weitere ganz wesentliche Frage für die Zukunft ergab sich auch aus der Beobachtung, dass während der Entwicklung der Retina trotz der hypoxischen Bedingungen, die wir nachgewiesen haben, keine Neovaskularisation auftrat. Dies legte eine wichtige Funktion des Norrins in diesem pathologischen Prozess nahe. Diese Hypothese zur Rolle des Norrin könnte man mit Hilfe des OIR (oxygen-induced retinopathy)-Mausmodells (Smith et al., 1994) gut experimentell überprüfen, indem man die *Ndph*-knockout-Tiere diesem Protokoll unterzieht und dann analog zu den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten untersucht, ob unter den induzierten relativen hypoxischen Bedingungen, die zusätzlich zu der hier beschriebenen entwicklungsbedingten Hypoxie auftreten, ebenfalls keine Neovaskularisation auftritt.

Auch könnten vergleichbare Untersuchungen am Gehirn und im Ohr darüber Aufschluss geben, warum Mutationen im *NDP*-Gen in den Fällen der X-chromosomalen FEVR genauso wie die Mutationen im *FZD4*-Gen, falls dies der Rezeptor aus dem ursächlichen Signalweg ist, nicht zu einer Entwicklung von Taubheit und mentaler Retardierung führen, wie es in klassischen Norrie-Patienten zu beobachten ist und ob in diesen Organen die Hypoxie auch eine so wesentliche Rolle spielt, wie im Auge.

Im Ohr scheint jedenfalls die Entstehung einer Hypoxie aufgrund der fehlenden Kapillaren (Rehm et al., 2002) eine plausible Erklärung für die Veränderungen in den Blutgefäßen und die Degeneration der Haarzellen zu sein, obwohl dieser Prozess im Ohr mit Verzögerung

ablaufen muss, da die Taubheit sich langsam entwickelt und es erst spät zu einem vollständigen Hörverlust kommt (Rehm et al., 2002). Um auch für das Gehirn besser beurteilen zu können, ob die Hypoxie auch dort eine wichtige Rolle spielt, wären zunächst Studien zur Charakterisierung der cerebralen Blutgefäße notwendig. Sollten sich dort ähnliche Defekte, wie im Auge und im Ohr zeigen, würde das eine wichtige Rolle des Norrins in der Entwicklung und Aufrechterhaltung des Blutgefäßnetzwerks nahe legen und die Hypothese, dass die Hypoxie ein grundlegender Pathogenesemechanismus der Norrie-Erkrankung ist, weiter unterstützen.

Neben der indirekten Folge einer solchen Hypoxie im Gehirn, die zum Zugrundegehen von Neuronen führen würde, wäre es auch denkbar, den Phänotyp der geistigen Behinderung in Norrie-Patienten, wie oben diskutiert, durch eine direkte Wirkung von Norrin oder eben der durch dessen Fehlen verursachten Hypoxie auf die Wachstumshormonexpression zu erklären, was zu zellulären Defekten in Gehirnarealen führen könnte, die in Lernen und Gedächtnis involviert sind.

Wie aber die Beziehung zwischen der Wirkung von Norrin und Gh im Gehirn wirklich ist und was für Konsequenzen die Expressionsunterschiede im Wachstumshormon auf molekularer Ebene haben, wird genauso in weiteren Studien zu klären sein, wie die Frage, ob die molekulare Wirkungsweise des Norrins *in vivo* in allen vier betroffenen Organen Auge, Ohr, Gehirn und im weiblichen Reproduktionstrakt die gleiche ist, oder ob Norrin ein pleiotroper Faktor ist, der neben den beschriebenen Wirkungen verschiedene, weitere Wirkmechanismen und Wirkorte besitzt. Neben der Wirkung im Reproduktionstrakt könnte die Expression von Norrin im olfaktorischen Epithel und im olfaktorischen Bulbus (Berger et al., 1996) zusätzlich zu der in Retina und im Innenohr ein Hinweis sein, dass Norrin eine generelle Rolle für die Entwicklung bzw. die Blutgefäßversorgung von sensorischen Geweben im Allgemeinen hat.