

**Aus dem Institut für Klinische Neurobiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Michael Sendtner**

**Der Einfluss des Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)
auf die mikroskopische Anatomie des Sehnervs und
der Retina im Mausmodell**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Erich-Engelbert Müller
aus Ulm**

Würzburg, Oktober 2022



Referent: Prof. Dr. med. Michael Sendtner

Koreferentin: Prof. Dr. med. Esther Asan

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2023

Der Promovend ist Arzt.

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Neurotrophe Faktoren.....	1
1.2	Die Wirkung von CNTF und anderen neurotrophen Faktoren auf die Regeneration nach Nervenläsion.....	3
1.3	Expression von CNTF in der Retina.....	5
1.4	Ausgangslage und Zielsetzung der Arbeit.....	8
2	Material und Methoden	10
2.1	Material.....	10
2.1.1	Versuchstiere	10
2.1.2	Puffer und Lösungen	10
2.1.3	Verwendete Chemikalien.....	14
2.1.4	Antikörper und Detektionssysteme	16
2.1.5	Verbrauchsmaterial	18
2.1.6	Laboraausstattung.....	19
2.1.7	Software	20
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Tierhaltung	21
2.2.2	Immunhistochemie	21
2.2.3	Elektronenmikroskopie	25
2.2.4	Genotypisierung	28
3	Ergebnisse	32
3.1	CNTF-Detektion und Lokalisation	32
3.1.1	CNTF im N. trigeminus (PNS)	32
3.1.2	CNTF im Sehnerv (ZNS)	33
3.1.3	CNTF in der Retina.....	37
3.2	Charakterisierung der CNTF-Reporter-Maus	39
3.2.1	GFP-Detektion im N. trigeminus	40
3.2.2	GFP-Detektion im N. opticus	43
3.3	CNTF-Einfluss auf Alterungsprozesse im Sehnerv	52

Inhaltsverzeichnis

3.3.1	Gewebeübersicht in Semidünnschnitten des Sehnervs	52
3.3.2	Axonale Myelinisierung in elektronenmikroskopischer Darstellung	55
3.3.3	Axonumfang in Ultradünnschnitten des Sehnervs	60
3.3.4	Mitochondriendichte in Ultradünnschnitten des Sehnervs.....	64
3.4	CNTF-Einfluss auf Alterungsprozesse in der Retina	70
3.4.1	Gewebeübersicht in Kryoschnitten der Retina	70
3.4.2	Schichtung der Retina	73
3.5	CNTF-Einfluss auf Differenzierungsprozesse des jungen Sehnervs ..	79
3.5.1	Marker	79
4	Diskussion	81
5	Zusammenfassung.....	87
6	Anhang.....	89
6.1	Literaturverzeichnis.....	89
6.2	Abbildungsverzeichnis	97
6.3	Tabellenverzeichnis	99

Abkürzungsverzeichnis

#	Nummer
%	Prozent
♀	weiblich
♂	männlich
(d)dH ₂ O	(zweifach) destilliertes Wasser
.OIB	Olympus Image Binary, Dateiformat
.TIF	Tagged Image File, Dateiformat
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
A2B5	A2B5, Zellmembran-Gangliosid
AAV	Adeno-assoziierte Viren
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Alexa488	Alexa Flour 488 Dye
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
Apo-H ₂ O	Apothekenwasser
Aqua	Wasser
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
bds.	beidseits
bidest.	2-fach destilliert
bp	Basenpaar(e)
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin
CaCO ₃	Calciumcarbonat (CaCO ₃)
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
CNPase	2',3'-Cyclic-Nucleotide 3'- Phosphodiesterase
CNTF K10	CNTF Antiserum K10
CNTF	Ciliary neurotrophic factor

Abkürzungsverzeichnis

CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT-1	Cardiotrophin-1
Cy	Cyanine
Cy3 /5	Cyanine Dyes 3 /5
d	Tag(e)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	destilliert
dist.	distal
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELMI	Elektronenmikroskop(ie)
Epon	aliphatisches Epoxidharz
EtOH	Ethanol
GCL	Ganglion cell layer
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLA	Glutaraldehyd
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
GluSyn	Glutamin-Synthetase
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAc	Essigsäure
HCL	Salzsäure
I.E.	Internationale Einheiten
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like growth factor
IHC	Immunhistochemie
INL	Inner Nuclear Layer

Abkürzungsverzeichnis

intermed.	intermediär
IPL	Inner Plexiform Layer
IS	Inner Segment
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	Knockout
lat.	lateral
LIF	Leukemia inhibitory factor
m	Meter
M	Molar
max.	maximal
med.	medial
Merge	Fusion
min, '	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Multiple Sklerose
N	Normalität
N.	Nervus
Ncl.	Nucleus
Na	Natrium
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAION	Non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy
NaOH	Natriumhydroxid
Nestin	Neuroepithelial stem cell protein
NfH	Neurofilament Heavy
NG2	Neuron/ Glia-Typ 2 Antigen
NGF	Nerve growth factor

Abkürzungsverzeichnis

NGS	Normal Goat Serum
nm	Nanometer
o.n.	over night
O4	Oligodendrozyten Marker
Olig2	Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor
ONL	Outer Nuclear Layer
OPL	Outer Plexiform Layer
OS	Outer Segment
OsO ₄	Osmium(VIII)-oxid
OT	Overall Thickness
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
pmn	Progressive motor neuropathy
pmol	Pikomol
PNS	Peripheres Nervensystem
PO	Propylenoxid
prox.	proximal
Px	Postnataler Tag x
RCS	Royal College of Surgeons
rds	Retinal degeneration slow
RPGR	Retinitis pigmentosa GTPase regulator
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S100 β	S100 calcium-binding protein B
SDS	Natriumdodecylsulfat
s, “	Sekunde(n)
SOD1	Superoxid-Dismutase 1
Sox10	SRY-box transcription factor 10
Sox2	SRY-Box Transcription Factor 2

Abkürzungsverzeichnis

SRY	Sex Determining Region Y
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBCE	Tubulin-specific chaperone E
TBS	Tris-buffered saline
TE	Tris-EDTA-Puffer
tg	transgen
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Neurotrophe Faktoren

Viele Vertebraten-Zellen benötigen Signale von anderen Zellen, um nicht durch programmierte Zelltodmechanismen eliminiert zu werden (Cohen, 1991; Martin et al., 1988). Zu diesen Zellen gehören insbesondere Neurone und Gliazellen des Nervensystems (Lichtman & Purves, 1980). Die Bedeutung solcher Signale wurde erstmals durch Arbeiten von Viktor Hamburger (Hamburger, 1934; Hamburger & Yip, 1984; Pu et al., 1999) und später von Rita Levi-Montalcini (Levi-Montalcini, 1953) belegt durch ihre Untersuchungen des natürlichen Zelltods von sensorischen, sympathischen und motorischen Nervenzellen in frühen Hühnchenembryonen. Sie beobachteten, dass diese Zellen im Überschuss angelegt werden und dass bereits während der Entwicklung ca. 50% dieser postmitotischen Neurone verloren gehen. Sobald das Zielgewebe dieser Nervenzellen experimentell entfernt wurde, erhöhte sich der Zelltod auf nahezu 100%. Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurde ein erster neurotropher Faktor, Nerve growth factor (NGF), identifiziert und gereinigt (Levi-Montalcini & Angeletti, 1968). Dieser Faktor kann sympathische Nervenzellen des Sympaticus-Grenzstrangs, aber auch eine Subpopulation von sensorischen Nervenzellen der Hinterwurzelganglien am Leben erhalten. 1989 wurde mit Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ein weiterer neurotropher Faktor identifiziert, der sowohl sensorische Neurone, als auch Motoneurone am Leben erhält (Leibrock et al., 1989). Dieser Faktor wird vor allem im zentralen Nervensystem exprimiert und moduliert neben dem Überleben von Nervenzellen auch synaptische Plastizität und ist so an wichtigen Funktionen des Nervensystems wie Lernen und Gedächtnisbildung maßgeblich beteiligt (Bibel & Barde, 2000). Weitere Faktoren dieser Genfamilie sind Neurotrophin-3 und Neurotrophin-4, die ebenfalls verschiedene Zellpopulationen am Leben erhalten (Ernfors et al., 1994). Darüber hinaus ist Neurotrophin-3 ein wichtiger Überlebensfaktor für frühe Oligodendrozyten (Barres et al., 1994). Diese 4 neurotrophen Faktoren werden als Neurotrophin-Genfamilie bezeichnet.

Neben den Neurotrophinen existieren weitere Familien neurotropher Faktoren, wie die Ciliary neurotrophic factor/Leukemia inhibitory factor/Cardiotrophin-1-Familie (Sendtner et al., 1991; Sendtner, Carroll, et al., 1994; Taga & Kishimoto, 1992). Allen diesen

Einleitung

Faktoren ist gemein, dass sie keine maßgebliche physiologische Funktion beim physiologischen Nervenzelltod während der Entwicklung spielen. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) wird postnatal in Schwann'schen Zellen exprimiert (Sendtner, Stöckli, et al., 1992) und im zentralen Nervensystem von einer Subpopulation von Astrozyten (Stöckli et al., 1991). Die Expression beginnt erst am Ende der ersten postnatalen Woche bei Ratten und Mäusen, also in einem Zeitfenster, in welchem der physiologische Nervenzelltod von peripheren motorischen Nervenzellen und zentralen Neuronen, sowie den retinalen Ganglienzellen bereits abgeschlossen ist. Allerdings konnte gezeigt werden, dass CNTF auch das Überleben und die Differenzierung von Oligodendrozyten beeinflusst (Barres et al., 1996; Barres, Jacobson, et al., 1993; Hughes et al., 1988).

Weitere pluripotente Wachstumsfaktoren haben ebenfalls wichtige Funktionen für das Überleben und die Differenzierung von Nerven- und Gliazellen im zentralen Nervensystem. Dazu gehört vor allem Platelet-derived growth factor (PDGF) und Insulin-like growth factor (IGF) (Barres et al., 1992), die beide das Überleben von Oligodendrozytenvorläuferzellen in Zellkultur stimulieren. Die Wirkung von PDGF scheint begrenzt zu sein auf das Überleben von Vorläuferzellen, während IGF auch bei postmitotischen Oligodendrozyten das Überleben stimuliert. Aus diesen Beobachtungen wurden eine Reihe von Fragen abgeleitet, die bis heute nicht vollständig beantwortet sind. Dazu gehört die Frage, ob solche neurotrophen Faktoren langfristig während des ganzen Lebens für die Aufrechterhaltung von Oligodendrozyten und Nervenzellen notwendig sind. Es ist auch unklar, weshalb verschiedene Gruppen von neurotrophen Faktoren gleichartige Effekte auf das Überleben von Neuronen wie z.B. den retinalen Ganglienzellen oder auf Gliazellen wie den Oligodendrozyten des optischen Nervs haben. Zu den offenen Fragen gehört insbesondere, ob diese Faktoren ihre Wirkung redundant ausüben, oder ob jeder dieser Faktoren eine eigene spezifische Funktion für die Langzeitfunktionalität, die Plastizität, aber auch die Regeneration nach verschiedenen Läsionen ausübt. Es ist auch immer noch nicht vollständig verstanden, welche der in Zellkultur beobachteten Effekte auf das Überleben und die Differenzierung von Neuronen und Gliazellen auch in vivo auftreten (Barres, Schmid, et al., 1993).

1.2 Die Wirkung von CNTF und anderen neurotrophen Faktoren auf die Regeneration nach Nervenläsion

CNTF wird in Gliazellen erst relativ spät während der Entwicklung exprimiert (Sendtner, Stöckli, et al., 1992). Im Gegensatz zu NGF und BDNF sind die Konzentrationen von CNTF in Gliazellen ca. 100 – 1.000-fach höher als die von NGF und BDNF in entsprechenden Zielgeweben von sensorischen und motorischen Neuronen, oder auch in retinalen Ganglienzellen des Auges, die zum Ncl. dorsalis corporis geniculati lateralis, einem Bereich des Thalamus bzw. zum Colliculus superior des Mittelhirn projizieren. Daraus folgend wurde die Hypothese aufgestellt, dass CNTF für die Regeneration dieser Nervenzellen im Falle einer Läsion eine wichtige Rolle spielen könnte (Sendtner, Dittrich, et al., 1994). Wenn bei neugeborenen Ratten oder Mäusen, bei denen CNTF in Schwann'schen Zellen noch nicht exprimiert wird, ein motorischer Nerv wie der Nervus facialis durchtrennt wird, führt das zu massivem Zellverlust durch programmierten Zelltod in den korrespondierenden Fazialiskernen (Sendtner et al., 1990). Wenn jedoch lokal an der Nervenläsionsstelle CNTF appliziert wird, kann ein Großteil der Fazialismotoneurone gerettet werden. Im Gegensatz zu vielen sekretorischen Proteinen, zu denen auch die neurotrophen Faktoren der Neurotrophin-Familie gehören, besitzt CNTF keine N-terminale Signalsequenz für die konventionelle Freisetzung aus Schwann'schen Zellen oder Astrozyten (Stöckli et al., 1989). Selbst in Zellkultur bei kultivierten Astrozyten finden sich nur geringe Mengen von CNTF im Zellkulturüberstand, die auch von absterbenden Zellen in dieser Zellkultur stammen könnten (Lillien et al., 1988). So ist unklar, ob CNTF aus diesen Gliazellen tatsächlich in größeren Mengen freigesetzt wird, solange keine Läsion zu einer mechanischen Zerstörung der zellulären Integrität führt. Dies wurde bei einem Mausmodell für eine Motoneuronenerkrankung untersucht, der pmn (progressive motoneuropathy)-Maus (Sendtner, Schmalbruch, et al., 1992). Bei dieser Maus kommt es aufgrund einer Mutation im Gen für Tubulin-specific chaperone E (TBCE) (Bommel et al., 2002) zu einer Instabilität von Mikrotubuli, in deren Folge Axone von langen, projizierenden Nervenzellen, insbesondere Motoneuronen, degenerieren. Mutationen in diesem Gen beim Menschen sind für eine Multisystemerkrankung verantwortlich (Sferra et al., 2016), bei der Defekte im Nervensystem besonders im Vordergrund stehen. Bei der pmn-Maus kommt es zu einer retrograden Degeneration von Motoneuronen, die ihren Ausgang an neuromuskulären Endplatten hat und dann zum progressiven Verlust von Axonen führt (Selvaraj et al., 2012).

Einleitung

Bei diesem Mausmodell beginnt die Erkrankung in der dritten postnatalen Woche und schreitet innerhalb von drei Wochen schnell fort (Sendtner, Schmalbruch, et al., 1992). Wenn nun bei diesem Mausmodell in der dritten Woche ein peripherer Nerv lädiert wird, können die Degeneration und der Zelltod der lädierten Motoneurone ohne die Zugabe weiterer neurotropher Faktoren signifikant erhöht werden. Wird jedoch das pmn-Mausmodell mit CNTF-Knockout-Mäusen verkreuzt, sodass bei diesem Mausmodell endogenes CNTF fehlt, können die Motoneurone durch die Läsion nicht gerettet werden, sondern setzen den degenerativen Prozess, der ohnehin bei diesem Mausmodell stattfindet, weiter fort (Sendtner et al., 1997). Aus diesen Untersuchungen wurde geschlossen, dass CNTF tatsächlich eine wichtige Funktion nach Axotomie im adulten Nervensystem besitzt.

Mäuse mit Knockout des CNTF-Gens zeigen nur einen relativ milden Phänotyp (Masu et al., 1993). Die Muskelkraft ist bei diesen Mäusen um ca. 10-20 % reduziert und es kommt zu einem Verlust von ca. 20% der Motoneurone im Hirnstamm und Rückenmark, der sich jedoch funktionell nicht massiv auswirkt. Dies ist dadurch bedingt, dass andere mit CNTF verwandte Faktoren wie Leukemia-inhibitory-factor (LIF) und Cardiotrophin (CT-1) den Ausfall dieses Faktors partiell kompensieren können. Der Nervenzellverlust bei adulten Tieren und der Verlust durch Axotomie ist bei CNTF/ LIF-Doppel-Knockout-Mäusen erhöht (Sendtner et al., 1996), und er erhöht sich weiter bei CNTF/LIF/CT-1-Triple-Knockout-Mäusen (Holtmann et al., 2005). Allerdings sind selbst diese CNTF/LIF/CT-1-Triple-Knockout-Mäuse lebensfähig und zeigen zumindest in der Laborumgebung keine massiven motorischen Ausfälle, solange das Nervensystem dieser Mäuse keinen Läsionen ausgesetzt ist.

Es ist noch wenig bekannt, ob CNTF im zentralen Nervensystem, z.B. nach Läsion des optischen Nerven, eine ähnliche Rolle als Läsionsfaktor spielt wie im peripheren Nervensystem (Naumann et al., 2003). Interessanterweise sind nach einer Quetschläsion des optischen Nerven die CNTF mRNA-Level an der Läsionsstelle deutlich reduziert (Fudalej et al., 2021; Kirsch et al., 1998). Dies korreliert jedoch mit dem Verlust von GFAP und CNTF-immunpositiven Astrozyten. In anderen läsionsfernen Bereichen des Sehnerven bleiben die CNTF-Expressionslevel unverändert.

Nach Läsion des Sehnerven bei CNTF-Knock-Out-Mäusen ist die Gliareaktion verändert. Bei CNTF-defizienten Mäusen kommt es zu einer robusten Aktivierung von Astrozyten,

was durch eine erhöhte Expression von GFAP gezeigt werden konnte (Martin et al., 2003). Ob diese überschießende Astrozytenreaktion im Weiteren die Regeneration verhindert, die ohnehin nach Läsion des Sehnervens nur sehr geringfügig ausfällt, ist jedoch nicht bekannt.

Die Injektion von CNTF ins Auge hat einen starken neuroprotektiven Effekt sowohl auf Fotorezeptoren, als auch retinale Ganglienzellen (Wen, Tao, Li, et al., 2012). Dieser protektive Effekt auf retinale Ganglienzellen wurde auch in einem chemischen Läsionsmodell mit H_2O_2 gezeigt (Wang et al., 2018). Auch in anderen Degenerationsmodellen für retinale Ganglienzellen wie der non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy (NAION) hat CNTF einen sehr starken neuroprotektiven Effekt (Mathews et al., 2015). Dies hat dazu geführt, dass viraler Gentransfer mittels Adeno-assoziiierter Viren derzeit in Richtung einer klinischen Anwendung weiterentwickelt wird. Mit solchen CNTF-transferierenden Viren konnte ein positiver Effekt auf die Regeneration von retinalen Ganglienzellen nach Quetschung des Sehnervs gezeigt werden (Cen et al., 2017; Yungher et al., 2017).

1.3 Expression von CNTF in der Retina

Da CNTF in verschiedenen Hirnregionen wie beispielsweise dem Hippocampus und dem Sehnerv in Astrozyten exprimiert wird, stellte sich die Frage, ob dieser neurotrophe Faktor auch in der Retina in Astrozyten exprimiert wird, insbesondere in den spezialisierten Müller-Gliazellen. Untersuchungen an Ratten während der Entwicklung zeigten eine niedrige Expression bereits während der Embryonalentwicklung zum Stadium Embryonaltag 15-18, bevor diese Werte dann wieder abfallen (Kirsch et al., 1997). Am Ende der ersten postnatalen Woche steigt die CNTF-Expression wieder an, um dann erst im Erwachsenenalter maximale Werte zu erreichen (Kirsch et al., 1997). Diese Untersuchungen zeigten auch, dass CNTF in radialen Strukturen der äußeren nukleären Schicht (ONL, äußere Körnerschicht) und noch prominenter auch in der inneren nukleären Schicht (INL, innere Körnerschicht), sowie der Ganglienzellschicht (GCL) exprimiert wird. Die Färbung ist größtenteils mit einem Marker für Müller-Gliazellen assoziiert. Sie ist besonders intensiv in den Fortsätzen dieser Zellen und weniger in den Somata zu finden. Darüber hinaus fand sich eine Immunreaktivität im Bereich des Pigmentepithels, konnte dort aber nicht individuellen Zellen zugeordnet

werden. Im Gegensatz zu CNTF, das vor allem in Gliazellen exprimiert wird, wird der CNTF-Rezeptor α vor allem in Neuronen der Retina exprimiert. Eine starke Färbung ist nicht nur in den Ganglienzellen, sondern vor allem in den Fotorezeptoren zu finden (Kirsch et al., 1997). Auf der Basis solcher Untersuchungen wurde daraufhin untersucht, ob CNTF auch neuroprotektiv für Photorezeptoren sein kann (LaVail et al., 1992). Da die Degeneration von Photorezeptoren ein zentrales Phänomen bei klinisch weit verbreiteten degenerativen Erkrankungen der Retina ist, wurden die Effekte von CNTF auf die Protektion von Photorezeptoren bei verschiedenen Tiermodellen für Retinitis pigmentosa untersucht (Beltran, 2008). Schwierigkeiten bereitete vor allem die Applikation. Hier wurden sowohl eingekapselte Zelltherapien, als auch die Injektion von größeren Mengen von CNTF getestet. Allerdings zeigte die Injektion solch hoher Konzentrationen von CNTF auch Nebenwirkungen wie Uveitis, Katarakt und Veränderungen an der Cornea (Beltran et al., 2007). Die besten Ergebnisse zeigten sich mit kontinuierlicher Applikation von CNTF mit gentherapeutischen Ansätzen, z.B. mit Adenoviren. In diesem Fall konnte durch den intraokularen Gentransfer bei der retinal degeneration slow (rds) Maus ein signifikanter Effekt nicht nur auf das Überleben und die Struktur der Photorezeptoren, sondern auch die Funktionalität nachgewiesen werden (Cayouette et al., 1998). Ähnliche Effekte wurden beobachtet nach mittels Adeno-assoziiertem-Viren-Vektor (AAV-Vektor) vermittelter Gentherapie mit CNTF bei einem Mausmodell für Retinitis pigmentosa mit P216LRDS/Peripherin-Mutation (Bok et al., 2002) und im RCS Rattenmodell für Retinitis pigmentosa (Huang et al., 2004). Wie wichtig die kontinuierliche Expression von CNTF bei solchen Therapieansätzen ist, zeigten Untersuchungen nach intravitrealer Injektion von CNTF in hoher Dosis bei einem Kaninchenmodell für Retinitis pigmentosa mit RPGR-Mutation (Beltran et al., 2007). Hier konnte ein Effekt auf den Verlust von Photorezeptoren nicht nachgewiesen werden. Nebenwirkungen standen im Vordergrund. Diese positiven Effekte nach viralem Gentransfer wurden bestätigt durch Untersuchungen an Rhodopsin-Knockout-Mäusen (Liang et al., 2001). Auch erste klinische Studien bei Patienten mit retinaler Degeneration zeigten ermutigende Effekte, wenn CNTF kontinuierlich durch eingekapselte Zellen, die implantiert wurden, freigesetzt wird (Sieving et al., 2006; Wen, Tao, Li, et al., 2012). Aufgrund der Schwierigkeiten, eine richtige Dosierung für CNTF nach intraokularer Injektion zu finden, wurden solche klinischen Studien jedoch nur in geringem Umfang weitergeführt und aktuelle Strategien zielen eher darauf ab, Möglichkeiten zu identifizieren, um die endogene Expression von CNTF aus Müller-Zellen und evtl. auch aus Pigmentepithelzellen bei solchen Erkrankungen zu stimulieren (Fudalej et al., 2021).

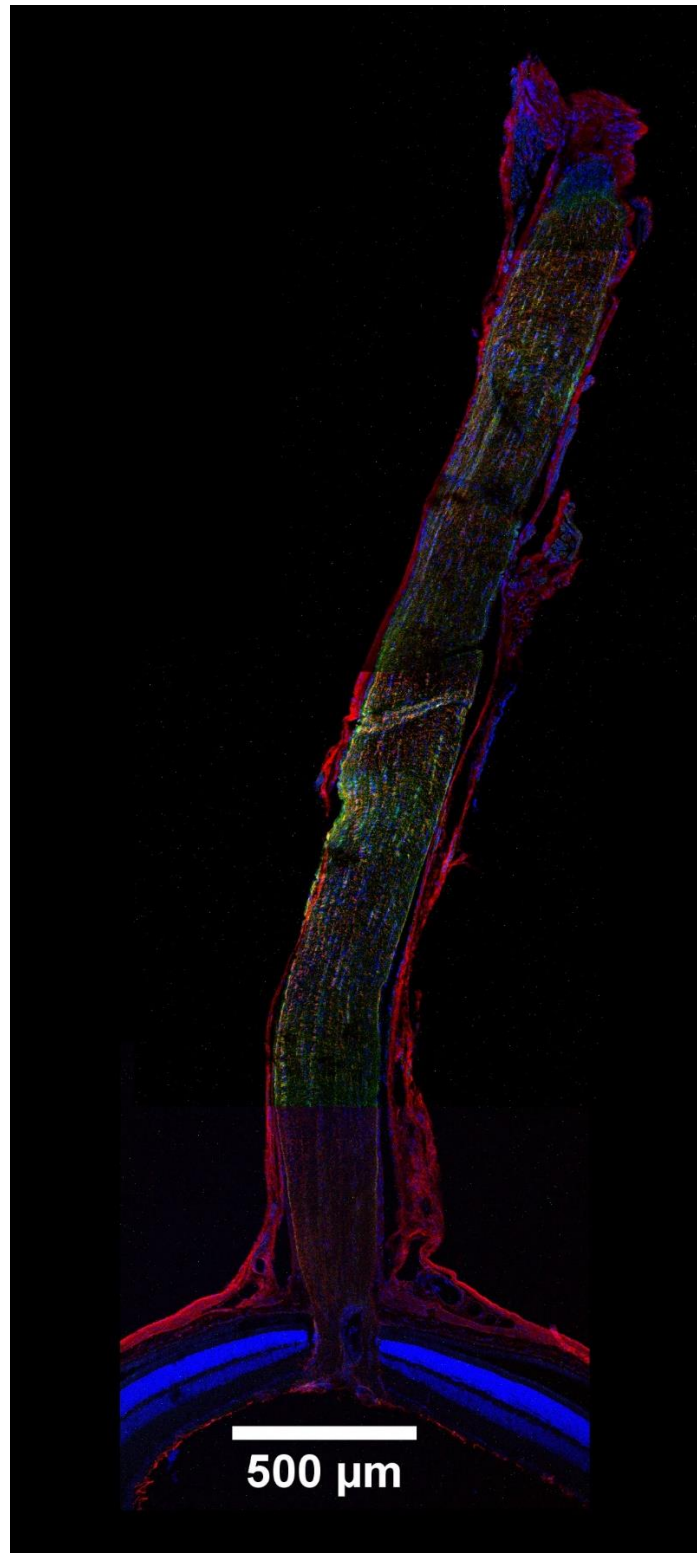


Abb. 1: Mosaik-Aufnahme des adulten Sehnervs mit Netzhaut

Aus vier Einzelbildern zusammengesetzte IHC-Mosaik-Aufnahme des adulten Sehnervs mit Netzhaut im Längsschnitt bei einem heterozygot transgenen, 3 Monate alten CNTF Cre Tier. Blau: DAPI. Grün: CNTF. Rot: GFAP. Konfokale Aufnahme, 10x Vergrößerung. Das CNTF-Signal ist nach mehrfachem Imaging in Netzhautnähe verblasst. Der verwendete Esel-anti-Maus Sekundärantikörper sorgt im umgebenden Bindegewebe für ein deutliches Hintergrundrauschen.

1.4 Ausgangslage und Zielsetzung der Arbeit

Während die Rolle von CNTF im peripheren Nerven für das Überleben von Nervenzellen nach Läsion im Detail untersucht ist, ist die Rolle von CNTF im visuellen System noch nicht vollständig verstanden. Viele Untersuchungen zur Expression von CNTF fokussierten sich vor allem auf embryonale und frühe postnatale Stadien (Kirsch et al., 1997), aber die Frage nach Veränderungen der CNTF-Expression während des Alterns wurde bisher kaum untersucht. Da jedoch degenerative Erkrankungen der Retina wie Retinitis pigmentosa vor allem Erkrankungen des höheren Alters sind, sollte die Expression von CNTF auch in diesen Altersstadien untersucht werden. Eine weitere zentrale Frage ist die Expression von CNTF sowohl in Astrozyten des Sehnervs, als auch in der Retina. Bisherige Untersuchungen wiesen zwar darauf hin, dass CNTF vor allem von Astrozyten exprimiert wird (Kirsch et al., 1997; Stöckli et al., 1991), aber es blieb unklar, ob alle Astrozyten oder nur eine Subpopulation dieser Zellen CNTF exprimieren und ob diese Expression sich während der Entwicklung und im Alter verändert.

Auch die Expression von CNTF in Pigmentepithelzellen ist bisher kaum untersucht, und es stellt sich die Frage, welche Zelltypen für die Expression von CNTF in dieser Region der Retina verantwortlich sind. Daraus sollten Rückschlüsse gezogen werden, wie die Expression von CNTF auf Erkrankungen der Retina wie der Degeneration von Photorezeptoren bei der Retinitis pigmentosa einwirken und des Weiteren wie eine veränderte Regulation von CNTF bei zukünftigen klinischen Anwendungen beeinflusst werden könnte.

Etwa 2-3% aller Menschen sind durch einen Polymorphismus im Exon 2 des CNTF-Gens CNTF-defizient (Takahashi et al., 1994). Klinisch scheinen sie gesund zu sein, doch legen Versuche im Mausmodell und auch genetische Untersuchungen an Patienten mit neurologischen Erkrankungen nahe, dass sie durch die CNTF-Defizienz für eine Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen vulnerabler sein könnten. So zeigt sich sowohl in einem Mausmodell für Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), als auch bei Patienten mit familiärer ALS aufgrund einer Mutation im Gen für Superoxid-Dismutase 1 (SOD1), dass eine zusätzliche Nullmutation im CNTF Gen zu einem früheren Beginn der Erkrankung führt und den Krankheitsverlauf beschleunigt (Giess et al., 1998; Giess,

Einleitung

Holtmann, et al., 2002). Ähnliche Effekte wurden auch bei Patienten mit Multipler Sklerose (MS) beobachtet (Giess, Mäurer, et al., 2002).

Die Relevanz dieser Untersuchungen wurden in einem Mausmodell für Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) weiter untersucht und bestätigt (Linker et al., 2002). Daraus entstand die Hypothese, dass eine Nullmutation im CNTF-Gen auch den Sehnerv und die Retina betreffen und ein Faktor für die Entstehung degenerativer Erkrankungen in diesen Bereichen sein könnte. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit in Sehnerv und Retina von adulten, CNTF-defizienten Mäusen mit elektronenmikroskopischen und immunhistochemischen Methoden nach Degenerationserscheinungen gesucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Alle Tiere wurden in der Tierhaltung des Instituts für Klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Würzburg, gezüchtet. Folgende Tiere kamen zum Einsatz:

Mausstamm:

Mus musculus CD-1	lokale Zucht
Mus musculus C57Bl/6J	lokale Zucht
Mus musculus CNTF -/-	C57BL/6-CNTF ^{tmMsd} (Masu et al., 1993)
Mus musculus CNTF-Cre	C57BL/6-Tg(CNTF-Cre) ^{tmMsd} (unveröffentlicht)
Mus musculus RosaYFP	C57BL/6-Tg(Thy1-YFP) ^{HJrs/J} (Feng et al., 2000)
Mus Musculus CAGeGFP	C57BL/6-Tg(CAG-CAT-eGFP) (Nakamura et al., 2006)

2.1.2 Puffer und Lösungen

1. Agarose 2% Gel
100 ml TAE
2 g Agarose
2,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)
2. Blocking Solution mit BSA
In 1x TBS oder 1x PBS:
10% BSA
0,5% Triton X-100
0,1% Teen 20

3. Blocking Solution mit BSA und NGS

In 1x TBS:

5% NGS (Normal Goat Serum)

0,25% Triton X-100

2% BSA

4. Blocking Solution mit 50% NGS und Lysin

5 ml NGS

1 ml 10x PBS

1 ml 1M L-Lysin

1 ml 10% BSA in 1x PBS

Mit H₂O auf 10ml auffüllen

5. BrdU-Lösung

Stock: 5 mg/ml in 0,9% NaCl.

Applikation: intraperitoneal 50 µg/g Körpergewicht

6. Bleicitratlösung ELMI

1,33 g Bleinitrat

1,76 g Tri-Natriumcitrat

100 ml Aqua dest.

7. DAPI-Lösung

2 mg DAPI in 1 ml (bidest.) H₂O = 2 mg/ml

Einsatz auf Gewebeschnitten: 1:5.000 – 1: 10.000, Inkubation für 5 - 15 min

8. EtOH Dehydrationsreihe

30%/ 50%/ 70%/ 80%/ 90%/ 96% EtOH in Aqua dest.,

schließlich 100% EtOH

9. L-Lysin 1M Lösung

9,1 g L-Lysin

35 ml H₂O

pH mit NaOH auf 7,4 einstellen

mit H₂O auf 50 ml auffüllen

10. Lysispuffer (Genotypisierung)

10 mM Tris-HCl pH 7,5
100 mM EDTA pH 8.0
150 mM NaCl
0,5% SDS

11. OsO₄ 1% in 1x PBS (ELMI)

10 ml 4% OsO₄
+ 30 ml 1x PBS

12. PBS/ Phosphatpuffer 10x

400 g NaCl
10 g KCl
10 g KH₂PO₄
58,75 g Na₂HPO₄
auf 5 l mit autoklaviertem Aqua bidest. auffüllen

13. PFA 4% Perfusionslösung IHC

40 g Paraformaldehyd
ad 500 ml Aqua dest.
3-4 Tropfen 5M NaOH
+ 410 ml 0,2M Na₂HPO₄ x 2 H₂O
+ 90 ml NaH₂PO₄ x 2 H₂O
2/3 des Aqua dest. in Kolben vorlegen und PFA-Pulver begeben.
Lösung erwärmen und dabei unter 60°C Temperatur halten.
NaOH zugeben, bis die Lösung aufklart. Phosphat-Puffer in einem zweiten Zylinder mischen und die PFA-Lösung filtrieren. Bei Raumtemperatur pH-Wert auf 7,4 einstellen. Mit Aqua dest. auffüllen.

14. PFA 4% in 1x PBS – Perfusions- und Nachfixierlösung ELMI

4 g PFA in 0,001M PBS

Material und Methoden

15. PFA 4%/ GLA 2% in 1M CaCO₃ pH 7,35 – Perfusions- und Nachfixierlösung (ELMI)

126 ml 8% PFA in Aqua dest.
+ 24 ml 25% GLA in Aqua dest.
+150 ml 0,2M CaCO₃

16. 4% PFA in 0,1M CaCO₃ Nachfixierlösung (ELMI)

150 ml 8% PFA in Aqua dest.
+ 150 ml 0,2M CaCO₃

17. Proteinkinase K (20 mg/ ml)

In sterilem H₂O gelöst, Aliquots bei -20° gelagert

18. SDS 20%

10 g SDS ad 50 ml Apo-H₂O
Im Wasserbad bei 65°C lösen

19. Sucrose 10%/ 20%/ 30%

5 g/ 10 g/ 15 g D(+) Saccharose abwiegen,
mit 1x TBS oder 1x PBS auf 50 ml auffüllen

20. TAE 50x

100 ml Ansatz:
Masse TRIS-base 242,2 g in ~600 ml H₂O
Masse EDTA 29,2 g (M = 292,25 g/mol)
TRIS-base lösen, EDTA zugeben, mit Eis-Essig auf pH 8,0
einstellen und autoklavieren.

21. TBS/ Trispuffer 10x

12,1 g Tris-base
87,8 g NaCl
pH 8,0
ad 1 l ddH₂O

22. TE-Puffer (Genotypisierung CNTF-KO)

10 mM Tris pH 8,0/ 1 mM EDTA pH 8,0

23. Vorspüllösung Perfusion (ELMI)

0,66 ml Heparin-Natrium 25.000 IE

0,9 g NaCl

Mit Aqua bidest. auf 100ml auffüllen

24. Washing Solution

In 1x TBS oder 1x PBS:

0,1% Triton X-100

0,1% Tween-20

2.1.3 Verwendete Chemikalien

Agarose	Sigma-Aldrich
Albumin Fraktion V (BSA)	AppliChem
Apothekenwasser	Apotheke UK Würzburg
Aqua bidest.	Braun-Melsungen
Aqua dest.	Braun-Melsungen
Aqua Poly/Mount	Polysciences
Betaine	Sigma-Aldrich
Bleinitrat	Agar Scientific
Borsäure	AppliChem
BrdU	Sigma (B9285)
BSA	Sigma-Aldrich
CaCO	AppliChem
Chloroform	Roth
D(+)-Saccharose	Roth
DAPI	Sigma-Aldrich, D9564
dNTP 2mM	Pharmacia
EDTA	Sigma-Aldrich
Epon	Electron Microscopy Sc.
Ethanol	Pharmco - Aaper

Material und Methoden

Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
EtOH 100%	Sigma-Aldrich
Flüssigstickstoff	Linde Gas
Glutaraldehyd	Electron Microscopy Sc.
Glycin	Sigma-Aldrich
HCl	Sigma-Aldrich
Heparin-Natrium 25.000 I.E.	Ratiopharm
Ketanest	Pfizer
L-Lysine	Sigma-Aldrich
Methylbutanol	Sigma-Aldrich
NaCl 3M	Sigma-Aldrich
NaOH-Plätzchen	AppliChem
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem
Natriumcitrat (tri-basisch)	Sigma-Aldrich
Normal Goat Serum (NGS)	Invitrogen
OsO ₄	Electron Microscopy Sc.
Paraformaldehyd	Merck
PBS	PAA Laboratories
Primer 5' NEO	Metabion
Primer AG-2	Metabion
Primer CAT-2	Metabion
Primer CNTF E1S	Metabion
Primer CNTF/1A	Metabion
Propylenoxid	Electron Microscopy Sc.
Proteinkinase K	Roche
SDS	Biorad
Taq Uni 5'Prime Polymerase	Eppendorf
TissueTek O.C.T Compound	Sakura
TrisBase	Merck
Triton X-100	Roth
Trockeneis	Linde Gas
Tween-20	Sigma-Aldrich
Uranylacetat	Serva

2.1.4 Antikörper und Detektionssysteme

Primärantikörper

Antikörper	Wirtsorganismus	Applikation	Hersteller
A2B5, clone A2B5-105	Maus	1:1.000	Millipore, MAB312
BrdU	Ratte	1:250	Abcam, Ab6326
ChAT	Maus	1:1.000	Synaptic Systems, 297111
CNTF K10	Kaninchen	1:10.000 – 1:12.500	Prof. Dr. M. Sendtner
CNPase, clone 11-5B	Maus	1:100	Millipore, MAB326
Fibronectin	Maus	1:1.000	Biomol. A117
GFAP	Maus	1:100 - 1:400	Sigma-Aldrich, G3893
GFAP	Kaninchen	1:100 – 1:2.000	Acris, DP014
GFP	Huhn	1:1.000 – 1:2.000	Abcam, Ab13970
GFP (FL)	Kaninchen	1:2.000	Santa Cruz, sc- 8334
GLAST	Meerschweinchen	1:1.000	Millipore, AB1782
GluSyn	Maus	1:100 – 1:250	BD Biosciences, 610517

Material und Methoden

Nestin	Maus	1:200	Millipore, MAB353
NfH	Huhn	1:1.000 – 1:100.000	Millipore, AB5539
NG2	Kaninchen	1:200 - 1:400	Millipore, AB5320
O4	Maus	44 ng/μl, still 1:100	Sigma-Aldrich, O7139
Olig2	Kaninchen	1:500 – 1:1.000	Chemicon, AB9610
S100β	Maus	1:400	Sigma-Aldrich, S2532
Sox10	Kaninchen	1:500	Prof. Dr. M. Wegner, Erlangen
Sox2 (Y-17)	Ziege	1:500 – 1:1.000	Santa Cruz, sc- 17320

Tabelle 1: Liste der verwendeten Primärantikörper

Sekundärantikörper

Alle Sekundärantikörper wurden von Thermo-Fisher (ehem. Invitrogen) oder Jackson ImmunoResearch bezogen und bei einer Konzentration von 0,5 - 1 μg/ml eingesetzt.

Alle Sekundärantikörper waren affinitätsgereinigte anti-IgG (H+L).

Antikörper Zielspezies und Konjugat	Wirtsorganismus	Applikation
Anregungswellenbereich: 470 – 510 nm		
Huhn Alexa 488	Ziege	1:400 – 1:800
Maus Alexa 488	Ziege	1:400 – 1:800
Meerschweinchen Alexa 488	Ziege	1:800

Material und Methoden

Kaninchen Alexa 488	Ziege	1:800
Ziege Alexa 488	Esel	1:800
Anregungswellenbereich: 545 – 570 nm		
Kaninchen Cy3	Ziege	1:400
Kaninchen Cy3	Esel	1:400 – 1:800
Huhn Cy3	Ziege	1:400
Maus Cy3	Ziege	1:400 – 1:800
Maus Dye light 549	Esel	1:800
Meerschweinchen Cy3	Ziege	1:400
Meerschweinchen Cy3	Esel	1:800
Ratte Cy3	Esel	1:800
Ratte Cy3	Ziege	1:800
Anregungswellenbereich: 635 – 650 nm		
Huhn Dye light 649	Esel	1:800
Meerschweinchen Cy5	Ziege	1:400 – 1:800
Kaninchen Cy5	Ziege	1:600
Kaninchen Dye light 649	Esel	1:800
Maus Cy5	Ziege	1:400
Maus Cy5	Esel	1:800

Tabelle 2: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Detektionssystem für Zellkerne

DAPI (2 mg/ml)	1:5.000	Sigma-Aldrich
----------------	---------	---------------

Tabelle 3: Verwendeter DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) Fluoreszenzfarbstoff

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Cryomold Biopsy, Standard & Intermediate	Sakura
Deckgläser 10 mm	Marienfeld
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf
Falcon-Röhrchen 10 ml & 50 ml	Greiner
Nagellack	Drogerieartikel

Material und Methoden

Objekträger Standard	R. Langenbrinck
Objekträger SuperFrost Plus	R. Langenbrinck
PAP Pen	Sigma-Aldrich
Pipettenspitzen	Biosphere
Rasierklingen	Wilkinson
Venofix Safety Punktionsbesteck	Braun

2.1.6 Laborausstattung

Analysewaage ALS 120-4	Kern
Binokular, MZ75	Leica
Ultramikrotom-Glas-Trimmklingen	AG Prof. Dr. Asan
DiaTOME-Diamant-Trimmklingen	Reichert-Jung
Elektrische Saugpumpe	Hartenstein
LEO-Elektronentransmissionsmikroskop	Zeiss
Elektrophoresekammer	PEQLAB
Präparierbesteck	Dumont & Stoelting
Gelkammern	Biometra
Gel-Reader Kamera	PQLAB
Glasflaschen & -kolben	Schott
Inverses Labormikroskop DM IL LED	Leica
KL 1500LCD Lichtquelle Binokular	Leica
Kryostat CM1950	Leica
Kühlschränke	Liebherr
Magnetrührer L-81	VWR Hartenstein
Metallnetze	Electron Microscopy Sc.
Konfokales Mikroskop Fluoview1000	Olympus
pH-Meter pH 211	Hanna
Pipetten	Eppendorf
Reglo Analog Schlauchpumpe	Ismatec
Ultramikrotom	Reichert-Jung

Material und Methoden

Sterican Einmal-Kanülen 26G	Braun
Thermocycler	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultramikrotom Model Ultracut E	Reichert-Jung
Vortex Mixer	neo-Lab
Wasserbad	Lauda, Memmert
Zentrifugen	Eppendorf

2.1.7 Software

Adobe Photoshop CS5 & CC

GraphPad Prism

ImageJ 1.42I (Institutsversion, Priv.-Doz. Dr. R. Blum)

Microsoft Office 365

Olympus Software (FV-10 und Fluo-View 3.1)

Vision Capt. V14.2

2.2 Methoden

2.2.1 Tierhaltung

Aufzucht, Haltung und Behandlung der Versuchstiere erfolgte in den Tierställen des Instituts für Klinische Neurobiologie, sowie des Instituts für Anatomie und Zellbiologie in Würzburg gemäß geltender tierschutzrechtlicher Richtlinien bei 21 ± 1 °C Raumtemperatur, 45 - 60% relativer Luftfeuchtigkeit, freiem Zugang zu Wasser und Futter, sowie im 12 h / 12 h Tag-Nacht-Rhythmus. Die Versuche mit BrdU-Injektion zur Untersuchung von Effekten neurotropher Faktoren auf die Zellteilung neuraler Vorläuferzellen erfolgten gemäß der Genehmigungsnummer 55.2-2531.01-83/09.

2.2.2 Immunhistochemie

Für die fluoreszenzmikroskopischen Versuche wurden Standardprotokolle des Instituts für Klinische Neurobiologie Würzburg befolgt. Die adäquate Präparation von Sehnerv und Retina wurde diesen Protokollen angepasst. Um das Protokoll weiter zu verbessern, wurden einzelne Arbeitsschritte in u.g. Weise variiert, ohne dass dies jedoch letztlich erkennbaren Einfluss auf die finale Gewebequalität gehabt hätte. Von allen Arbeitsschritten hatten die optimale Perfusion und Präparation unter Lupenbrillensicht den mit Abstand größten Einfluss auf die Qualität der späteren Schnittpräparate. Mittels CO₂-Exposition der Versuchstiere wurde ein Atemstillstand herbeigeführt, in dessen Anschluss beidseits parasternal in Rückenlage eine Thorakotomie erfolgte, welche das Herz freilegte. Über eine Punktion des linken Ventrikels erfolgte für 10-15 min die Perfusion mit 4%-iger PFA-Lösung bei einer Laufrate von 0,7 ml/min. Nach Dekapitierung wurde die Schädelkalotte ausgehend vom Foramen magnum in Richtung der Saggitalnaht eröffnet und die Kalotte anschließend schrittweise von Groß- und Kleinhirn abgehoben. Mittels scharfem Löffel wurde das Hirn nach allen Seiten hin von der Dura mater gelöst. Das Großhirn wurde vorsichtig frontal angehoben, um den N. opticus bds. nahe des Chiasma Opticum zu durchtrennen, und anschließend Groß-, Klein- und Stammhirn als Ganzes aus der Schädelgrube zu entfernen. Lateral des Sehnervs lag nun bds. der N. trigeminus frei, welcher nahe seines Durchtritts durch die Schädelbasis durchtrennt und in 4%-iger PFA-Lösung asserviert wurde. Der Canalis

opticus wurde sorgfältig von der Schädelgrube aus eröffnet und dadurch der Blick auf den Sehnerv in Gänze freigegeben. Vorsichtig wurden Sehnerv und Bulbus aus dem umgebenden Binde- und Fettgewebe gelöst, als Ganzes aus Orbita und Canalis opticus herausgehoben und ebenfalls in 4%-iger PFA-Lösung asserviert. Um Beschädigungen der empfindlichen Netzhaut zu vermeiden, sollte das Gewebe hierbei keinem Druck, keinem Zug und keinen nennenswerten Erschütterungen ausgesetzt werden. Das asservierte Gewebe wurde über Nacht in 4%-iger PFA-Lösung nachfixiert. Am Tag darauf erfolgte die schrittweise Dehydratation in 10%-iger, 20%-iger und schließlich 30%-iger Sucrose-Lösung, in welcher das Gewebe bei 4 °C für eine weitere Nacht belassen wurde.

Einbettung

Alle Arbeitsschritte waren mit dem gleichen Puffer durchzuführen. Auf die Gewebequalität hatte die Wahl des Puffers (PBS oder TBS) keinen erkennbaren Einfluss. Entsprechend können alle im Folgenden unter Verwendung von TBS geschilderten Arbeitsschritte auch mit PBS erfolgen, sofern dieses auch bereits bei der Perfusion verwendet wurde. Das über Nacht in 30%-iger Sucrose-Lösung dehydrierte Gewebe wurde vorsichtig aus der Lösung gehoben und in weichem Zellstoff trocken getupft. Anschließend wurde das Gewebe in mit TissueTec befüllten Plastikbechern passender Größe mit einer feinen Pinzette blasenfrei eingebettet. Die Ausrichtung des Gewebes orientierte sich an der später gewünschten Schnitfführung und wurde in allen drei Ebenen am Becherrand markiert. Das so eingebettete Gewebe wurde wahlweise durch Absenkung in mit flüssigem Stickstoff herabgekühltes Methylbutanol, auf Trockeneis oder direkt im Gefrierfach bei -20 °C eingefroren. Bezüglich der späteren Gewebequalität ergaben sich aus der Wahl des Gefrierprozesses heraus keine erkennbaren Unterschiede. Direkter Kontakt von Methylbutanol mit dem TissueTec war zu vermeiden. Die anschließende Lagerung erfolgte in Gefrierboxen bei -20 °C.

Kryoschnitte

Zur Anfertigung der Gefrierschnitte wurde die Kammer des verwendeten Kryostats auf etwa -20 °C, sowie deren Objektträger auf etwa -18 °C heruntergekühlt. Die bei -20°C gelagerten TissueTec-Blöcke mit den darin eingebetteten Gewebeproben wurden entsprechend der die Ausrichtung des Gewebes kennzeichnenden Markierung mittels

Rasierklingen auf den Geweberand hin zurechtgetrimmt und mittels einiger Tropfen TissueTec in der gewünschten Ausrichtung auf dem Objektträger festgefroren. Manuell wurden anschließend 5 – 40 µm dicke Kryoschnitte gewonnen und auf Superfrost-Objektträgern aufgezogen. Hinsichtlich der quantitativen Ausbeute, sowie der Gewebequalität und -integrität, erwiesen sich Schnittdicken von 10 – 20 µm als optimal. Die aufgezogenen Kryoschnitte wurden entweder direkt angefärbt oder erneut bei -20 °C in Objektträgerboxen gelagert. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren beeinträchtigte die Gewebequalität negativ.

Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen

Die bei -20 °C gelagerten Kryoschnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach Verdunsten des Kondenswassers wurden die Gewebeproben mit einem Wachsstift geschlossen umrandet, um die nachfolgend applizierten Lösungen über dem Gewebe zu halten. Alle Waschschriffe waren gewebeschonend ohne große Zug- oder Druckkräfte durchzuführen, um die Integrität des Bulbus und der Netzhaut zu gewährleisten.

Die noch in TissueTec eingebetteten Gewebeproben wurden 3-malig gewaschen, um das TissueTec herauszulösen: das erste Mal entweder mit 1x TBS für 10-15 min oder mit 0,1M Glycin in 1x TBS für 30 min, sowie anschließend 2-malig für 5 min in 1x TBS. Ob beim ersten Waschschriff eine Glycin-haltige Lösung zur Absättigung freier Aldehydgruppen oder nur 1x TBS verwendet wurde, hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Gewebequalität.

Für die BrdU-Färbungen wurden die Gewebeschnitte für 15 min in 4%-iger PFA-Lösung belassen und 2-malig für jeweils 10 min in 1x TBS gewaschen. Dann folgte für 30 min die Inkubation in 2N HCl bei 37°C, sowie anschließend für nochmals 10 min in 0,1M Borsäure.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit einer Blocking-Solution für 2 - 4 h bei Raumtemperatur. Dabei wurden v.a. Blocking-Solutions mit 10% BSA, oder aber vereinzelt mit 5% NGS und 2% BSA, oder aber mit 50% NGS mit Zusatz von 1M Lysin verwendet, welche sich bezüglich der späteren Gewebequalität nicht erkennbar unterschieden. Die Blocking-Solution mit Ziegenserum (NGS) wurde nicht zusammen mit Primär-Antikörpern aus der Ziege verwendet. Das BSA oder NGS war in 1xTBS gelöst, als Detergenzien wurden Triton X-100 und Tween 20 verwendet. Anschließend wurden die Gewebeproben mit den ebenfalls in Blocking-Solution gelösten

Primärantikörpern bei 4 °C über Nacht in einer Feuchtkammer inkubiert. Diese bestand aus Objektträgerboxen, die mit feuchtem Zellstoff ausgelegt waren.

Am nächsten Tag wurden die Gewebeproben 3-malig für jeweils 10min bei Raumtemperatur mit einer Washing-Solution (1x TBS, 0,1% Triton X100, 0,1% Tween 20) gewaschen, bevor für 2 – 4 h bei Raumtemperatur die Inkubation mit den in Blocking Solution gelösten Sekundärantikörpern in der Feuchtkammer erfolgte. Die Gewebeproben wurden erneut 3-malig für 10 min bei Raumtemperatur mit der Washing Solution gewaschen, bevor für 15 min die Inkubation mit 1:5.000 in 1x TBS gelöstem DAPI (2 mg/ml) erfolgte.

Wurde nur mit DAPI und ohne Antikörper gefärbt, so wurde das Gewebe vor der Inkubation mit DAPI ebenfalls mindestens 3-malig mit der Washing-Solution umspült. Nach Inkubation mit DAPI wurde das Gewebe 1-3 weitere Male mit 1x TBS gewaschen und im Anschluss blasenfrei in Aquapolymount-Lösung eingedeckelt. Die Deckgläser wurden an den Rändern mit handelsüblichem Nagellack fixiert.

Imaging

Die Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie erfolgte im konfokalen Modus bei einem Blendendurchmesser (pinhole) von airy-disc mit 1 mit Olympus-Mikroskopaufbauten.

Je nach Färbung wurden die Kanäle für DAPI, Alexa 488, Cy3 bzw. Dye light 549, sowie Cy5 bzw. Dye light 649 verwendet. Die Laseranregung erfolgte mit den Laserlinien 405 / 488 / 546 / 635 nm oder 405 / 470 / 561 / 635 nm. Die Emissionsbänder wurden über Spektraldetektoren oder Filter-basiert eingegrenzt.

Je nach Dicke der Schnittpräparate wurden Bildstapel von überwiegend 6 - 12 Bildern in Schritten von 0,5 µm im 12-bit Bereich aufgenommen und mit Metadaten im Olympus-Dateiformat .OIB gespeichert.

Mittels der frei verfügbaren und durch Plugins in der am Institut für Klinische Neurobiologie Würzburg üblichen Art angepassten Bildbearbeitungssoftware ImageJ Version 1.42i wurden aus den Stapeln unter Beibehaltung der einzelnen Kanäle Projektionsbilder erzeugt (maximum intensity projection).

Um Überbelichtungen zu verringern und Hintergrundrauschen zu minimieren, wurden das obere und untere Ende des angezeigten Spektrums (Maximum und Minimum) manuell angepasst. Hierdurch änderten sich indirekt auch Helligkeit und Kontrast. Die Regler hierfür wurden jedoch nicht direkt verändert. Auch die mittleren Grauwerte der 12-bit-Bilder (Gamma-Korrektur) wurden nicht asymmetrisch verändert.

Anschließend wurden alle 3 Graukanäle zu einem RGB (Rot-Grün-Gelb)-Farbbild verschmolzen (Merge). Die Größenskalierung erfolgte anhand der Metainformationen zur Bildgröße manuell. Prozessierte Bilder wurden im .TIF-Format gespeichert.

Mittels Adobe Photoshop der Versionen 5.0 und CC wurden diese Dateien final zusammengefügt und so die in dieser Arbeit verwendeten Abbildungen erstellt.

Analysis

Mittels der ImageJ-Version 1.42I erfolgten nach Festlegung des korrekten Maßstabs sowohl die Längsmessungen der Retina, als auch die Umfangsmessungen der Myelinisierungen des Sehnerven. Ebenfalls ließen sich orientierende Helligkeitsmessungen (pixel intensity) in festgelegten Arealen (Region-of-interest, ROI) durchführen, um die Signalintensitäten verschiedener Bilder vergleichen zu können. Mittels der manuellen Zählfunktion von Adobe Photoshop der Versionen 5 und CC ließen sich die Zellkerne und Axone in den Gewebeschnitten des Sehnervs quantifizieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel 365 in der aktuellsten Version.

2.2.3 Elektronenmikroskopie

Präparation und Fixation

Die Versuchstiere wurden mit Isofluran betäubt. Die Eröffnung des Thorax und die Punktion des linken Herzventrikels erfolgte in der gleichen Weise, wie bei der Immunhistochemie geschildert. Die Perfusion erfolgte zuerst für 1 min mit einer Vorspüllösung, bestehend aus 0,9% NaCl und mit darin gelöstem Na-Heparin, und anschließend für 10 min wahlweise mit einer Fixierlösung bestehend aus 4% PFA und 2% GLA in 0,1 M CaCO₃ mit pH 7,35, oder nur 4% PFA in 1x PBS gelöst.

Die Präparation des Sehnervs erfolgte ebenfalls analog zur Präparation für die Immunhistochemie. Das asservierte Gewebe wurde über Nacht in 4% PFA und 2% GLA in 0,1M CaCO₃ und über 3 Tage in 4% PFA in 0,1M CaCO₃ bei 4°C nachfixiert. Wurde zur Perfusion 4% PFA in 1x PBS verwendet, so reichte eine Nachfixation für 2,5 h in 4% PFA in 0,01 M PBS. Es kamen beide Fixierlösungen zum Einsatz, da erstere für anderweitige Versuche am Großhirn notwendig war. Auf die Gewebequalität der untersuchten Sehnerven hatte die Wahl der Fixierlösung keinen erkennbaren Einfluss.

Einbettung

Nach Fixation wurden die Gewebeproben mehrfach für je 15 min in 1x PBS und auf dem Schüttler gewaschen. Es folgte die Inkubation in 1% OsO₄ in 1x PBS gelöst für 1 h. Anschließend wurde 3-malig für jeweils 15 min mit Aqua bidest. gespült, bevor die schonende schrittweise Dehydratation des Gewebes für jeweils 15 min in 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% und 2-malig in 100% EtOH erfolgte. Anschließend wurde 2-malig für 30 min in Propylenoxid inkubiert, sowie über Nacht in einem 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und Epon. Am nächsten Tag erfolgte für 2 h die Inkubation in Epon, danach die flache Einbettung zwischen Aclar-Folien, sowie anschließend die Auspolymerisation bei 60 °C für 24 h.

Semidünnschnitte

Die Epon-Blöcke wurden entsprechend der Ausrichtung der eingeschlossenen Gewebeproben mittels einer Rasierklinge unter dem Binokular gekürzt, um das eingeschlossene Gewebe freizulegen, sowie anschließend quer in einem Ultramikrotom eingespannt. Mittels DiaTOME-Diamant-Trimmklingen konnten Semidünnschnitte der Dicke 100 - 500 µm angefertigt werden. Mit initial verwendeten Glasklingen konnte keine ausreichende Gewebequalität erreicht werden. Die so gewonnenen Schnitte wurden mittels feinem Pinsel vorsichtig aus dem an die Klingen angrenzenden Wasserbad herausgehoben, auf einem Objektträger aufgezogen und eingedeckelt.

Ultradünnschnitte

Die Ultradünnschnitte der Dicke von etwa 70 nm wurden analog zu den Semi-Dünnschnitten am gleichen Gerät mit der gleichen Diamantklinge angefertigt und auf Metallnetze für die Elektronenmikroskopie aufgezogen. Anschließend wurden die Netze zur Kontrastierung, insbesondere des Myelins, für 20 min in 2% Uranylacetat in 70% Ethanol gelegt und anschließend 5-malig in 70% EtOH und abgekochtem Aqua dest. gewaschen. Der Arbeitsplatz wurde mit NaOH-Plättchen ausgelegt, um eine lokal CO₂-arme Umgebung zu schaffen, bevor die Semi-Dünnschnitte für 7 min in einer Bleicitratlösung eingelegt wurden. Anschließend erfolgte erneut das 5-malige Waschen in Aqua dest. und die Lufttrocknung für 30 min, bevor die Proben in das Elektronenmikroskop eingesetzt werden konnten.

Imaging

Für das Imaging unter dem Transmissionselektronenmikroskop wurden die bezüglich der Gewebequalität besten Ultradünnschnitte verwendet. Die bei etwa 10.000-facher Vergrößerung aufgenommenen Bilder wurden im .TIF-Dateiformat gespeichert.

Analysis

Die Auswertung erfolgte analog zur Auswertung der immunhistochemischen Bilder mittels ImageJ, Adobe Photoshop und Microsoft Excel.

2.2.4 Genotypisierung

CNTF-Knockout

Die Genotypisierung folgte dem Standard-Protokoll am Institut für Klinische Neurobiologie in Würzburg. Die bei Präparation gewonnenen und in 1,5 ml fassenden Mikroreaktionsgefäßen gelagerten Schwanzspitzen wurden in 500 µl Lysispuffer und 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) o.n. bei 60 °C und 600 rpm im Thermoschüttler lysiert.

Zur DNA-Isolierung wurden 430 µl 5% SDS und 170 µl 3M NaCl dazugegeben. Nach 10 - 15 s Vortexen wurden 750 µl Chloroform hinzugegeben und anschließend nochmals gemischt für 20 - 30 s bis zum Erhalt einer weißen Suspension. Es folgte die Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 14.000 rpm. Die obere Phase wurde in ein zweites, 2 ml fassendes Mikroreaktionsgefäß abgekippt. Es wurden 750 µl Chloroform hinzugegeben. Es folgten 20 s Vortexen und nochmaliges Zentrifugieren für 10 min bei 4 °C bei 14.000 rpm. Anschließend wurde die obere Phase, welche etwa 650 µl umfasste, in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß abpipettiert und das Mikroreaktionsgefäß mit ca. 750 µl 100% EtOH aufgefüllt. Erneut wurde für 10 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt. Es wurden 500 µl 70% EtOH hinzugegeben, bevor erneut für 5 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde wieder vorsichtig abgekippt und das verbliebene Pellet für maximal 5 min luftgetrocknet, bevor es in 100 µl TE gelöst wurde.

PCR Primer:

CNTF E1S	5' - GAG CAA TCA CCT CTG ACC CTT – 3'
CNTF/1A	5' - CAG GCT GGA TGA AGA CAG TAA G – 3'
5'NEO	5' – AGC CGA TTG TCT GTT GTG CCC – 3'

Reaktionsbedingungen:

Wildtyp:	CNTF E1S + CNTF/1A
Knockout:	CNTF E1S + 5'NEO

Ansatz:

- 1 µl DNA
- 3 µl 10x PCR Buffer
- 6 µl Betaine (5M)

Material und Methoden

3 μ l dNTP (2 mM)
0,3 μ l primer 1 (20 μ mol/ μ l)
0,3 μ l primer 2 (20 μ mol/ μ l)
0,3 μ l Taq-polymerase (Eppendorf)
16,1 μ l H₂O

Zyklus:

5' bei 94°C
34 Zyklen: 30" bei 94°C
30" bei 64°C
60" bei 72°C
7' bei 72°C
 ∞ bei 15°C

Produkte:

Wildtyp: 321 bp
Knockout: 450 bp

Die Gelelektrophorese wurde in einem 2%-igem Agarose-Gel bei 120 Volt durchgeführt. Abb. 2 zeigt beispielhaft eine mit CNTF-KO-Samples durchgeführte Gelelektrophorese.



Abb. 2: Repräsentative Gelelektrophorese bei Genotypisierung von CNTF-Knockout-Tieren

Exemplarisch der PCR-Nachweis des Knockout-Allels. Proben 1-9 stammen von CNTF-Knockout-Tieren. Entsprechend befinden sich deren Banden, wie zu erwarten, bei 450bp. Probe 10 ist eine Kontrolle mit H₂O. Der verwendete DNA-Größenstandard markiert 100bp-Schritte.

GFP-Reporter

Gewebeasservation und DNA-Isolierung erfolgten in der gleichen Weise wie zuvor für die CNTF-Knockout-Tiere geschildert.

Die Genotypisierung der Allele konnte auf 2 Arten erfolgen:

Möglichkeit 1 weist das GFP nach:

Primer 1 JAXegfp3: TCCTTGAAGAAGATGGTGCG

Primer 2 JAXegfp5: AAGTTCATCTGCACCACCG

Möglichkeit 2 weist spezifische genetische Elemente der Reportermaus nach:

Primer 1 AG-2: CTGCTAACCATGTTCATGCC

Primer 2 CAT-2: GGACATTGAGCAACTGACTG

Ansatz:

H₂O 18,2 µl

Buffer Uni Blau 10x 2,5 µl

Primer 1 0,25 µl

Primer 2 0,25 µl

dNTPs 2 mM 2,5 µl

Taq Uni 5' Prime 0,3 µl

DNA 1 µl

Gesamt 25 µl

GFP - Zyklus :

1. 95 °C für 5 min
2. 95 °C für 30 s
3. 58 °C (56 °C) Annealing für 30 s
4. 72 °C für 1 min
5. Schritt 2 - 4 wird 30x wiederholt
6. 22 °C Endtemperatur

Produkt: 170 bp

Reporter - Zyklus:

1. 95 °C Pause (hot start PCR)
2. 95 °C für 5 min
3. 95 °C für 30 s
4. 55 °C Annealing für 30 s
5. 72 °C für 1 min
6. Schritt 2 - 4 wird 30x wiederholt
7. 72 °C für 10min
8. 22 °C oder 4 °C Endtemperatur

Produkt: ~300 bp

Die Gelelektrophorese wurde in einem 2%-Agarose-Gel bei 120 Volt durchgeführt. Abb. 3 zeigt beispielhaft eine Gelelektrophorese von Transgenen und Wildtyp-Samples.

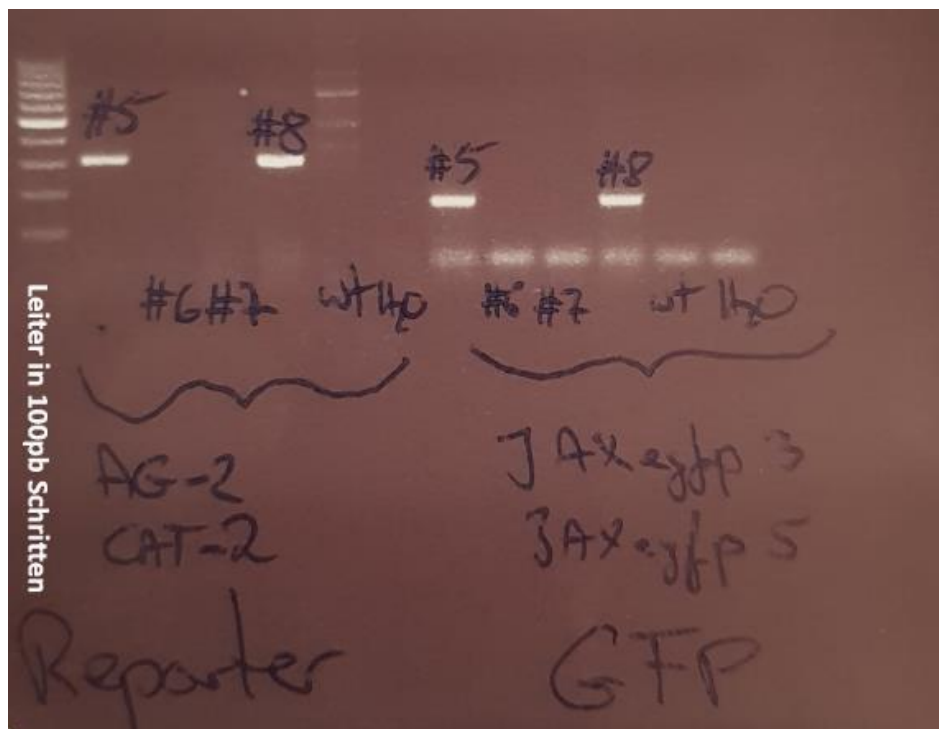


Abb. 3: Repräsentative Gelelektrophorese bei Genotypisierung einer GFP-Reporter-Maus
Nachweis genetischer Elemente sowohl des Reporterkonstrukts, als auch des GFP-Gens. Kontrollen: Wildtyp-DNA und H₂O. In Tieren #5 und #8 können sowohl Reporterelemente, als auch das GFP-Gen nachgewiesen werden. Proben #6 und #7 stammen von Wildtyp-Tieren. Der verwendete DNA-Größenstandard markiert 100 bp-Schritte.

3 Ergebnisse

3.1 CNTF-Detektion und Lokalisation

Bei der Untersuchung möglicher phänotypischer Folgen einer CNTF-Defizienz auf Sehnerv und Netzhaut und der Arbeit mit CNTF-Wildtyp und CNTF-Knockout-Tieren kommt dem hierbei verwendeten CNTF-Antikörper eine zentrale Rolle zu. Er visualisiert Expressionsmuster und -ausmaß, sowie bestätigt die Abwesenheit von CNTF in den Knockout-Samples. Hierbei kam der CNTF-K10-Antikörper (Prof. Sendtner, Institut für Klinische Neurobiologie Würzburg (Sendtner, Stöckli, et al., 1992; Stöckli et al., 1991)), zum Einsatz, welcher auch in hohen Verdünnungen von 1:10.000 bis 1:12.500 noch einen hochsensitiven und -spezifischen CNTF-Nachweis erlaubte und in vielen vorangegangenen immunhistochemischen Studien (Barres, Jacobson, et al., 1993; Barres, Schmid, et al., 1993) zum Einsatz kam. Im Folgenden werden für den Trigeminus- und Sehnerv, sowie die Netzhaut entsprechende CNTF-Färbungen gezeigt, welche das CNTF-Expressionsmuster für das jeweilige Gewebe exemplarisch aufzeigen.

3.1.1 CNTF im N. trigeminus (PNS)

Der N. trigeminus verläuft auf seinem Weg vom Stammhirn zum Gesichtsschädel bds. markant über die mittlere Schädelgrube und fällt bei Präparation nach Bergung des Großhirns als dickste auf dem Knochen aufliegende Leitungsstruktur sofort ins Auge. Der Hirnnerv wird trotz der intrakraniellen Lage zu den peripheren Nerven gezählt.

In Abb. 4 ist das CNTF-Signal nach immunhistochemischer Färbung und konfokalem Imaging im Längsschnitt des Trigeminusnervs einer 14 Tage alten Wildtyp-Maus in zwei verschiedenen Vergrößerungsstufen gezeigt. Die entsprechend ebenfalls längs getroffenen und immunhistochemisch markierten Neurofilamente NfH als Marker für Axone kommen entsprechend zur Darstellung. Das CNTF-Signal entspricht der zu erwartenden zytosolischen Darstellung in myelinisierenden Schwann'schen Zellen und zeigte sich sowohl im jungen N. trigeminus, wie in Abb. 4 gezeigt, ebenso wie in adulten Tieren, wie in Kapitel 3.1.2 gezeigt, robust und einfach zu reproduzieren.

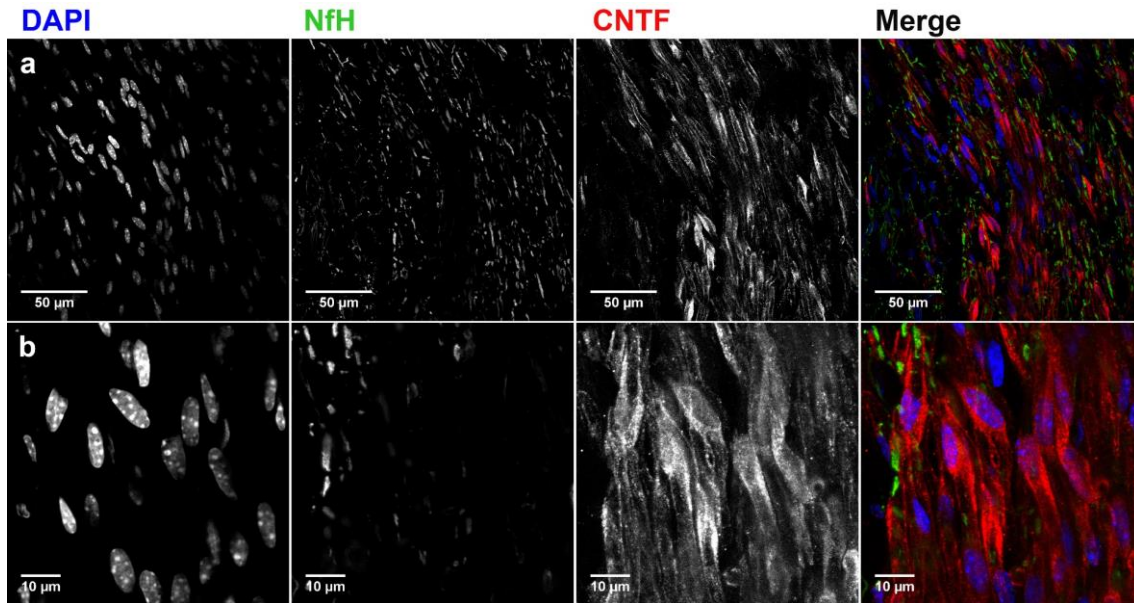


Abb. 4: Längsschnitt durch den N. trigeminus einer 14 Tage alten Wildtyp-Maus
 Konfokale Aufnahme durch den Längsschnitt des Trigeminiervs eines 14 Tage alten Wildtyp-Tieres mit DAPI-, NfH- und CNTF-Färbung. a: 60x-Objektiv, b: 60x-Objektiv mit zusätzlich 3x digitaler Vergrößerung.

3.1.2 CNTF im Sehnerv (ZNS)

Im Gegensatz zum Trigeminierv ist der Sehnerv als zweiter Hirnnerv dem Zentralnervensystem zuzurechnen und zeigt sowohl in jungen, als auch adulten Tieren eine ausgeprägte CNTF-Expression. Im Gegensatz zum Trigeminierv werden Axone durch Oligodendrozyten myelinisiert und zusätzlich findet man in diesem Nerv auch Astrozyten (Raff, 1989; Raff et al., 1984). Der verwendete Antikörper K10 der Wirtsspezies Kaninchen zeigte sich äußerst sensitiv und spezifisch. Hauptquelle der CNTF-Expression sind bekanntermaßen Zellen der astrozytären Linie (Barres et al., 1996). Die extrem hohe Deckung des CNTF-Signals mit dem GFAP-Signal entspricht dieser Tatsache. In Abb. 5 und Abb. 6 wird die CNTF- und GFAP-Expression im Sehnerv exemplarisch für sowohl adulte, als auch junge Tiere gezeigt.

In Abb. 5 sind CNTF- und GFAP-Expression in Längs- und Querschnitten bei verschiedenen Vergrößerungsstufen aus dem Sehnerv eines adulten, heterozygot transgenen Tieres (tg/+, s. Kapitel 3.2) dargestellt. Das Netzwerk aus GFAP-positiven Zellausläufern zeigt sich scharf begrenzt, weitgehend intakt und in Deckung mit dem CNTF-Signal. Bei gutem Fixationsergebnis zeigen sich weiterhin sowohl die retinale Schichtung, als auch die Oligodendrozytenstraßen, welche von der Invagination des Sehnervs in Richtung ZNS ziehen, erhalten.

Ergebnisse

Das Signal des perineuralen Bindegewebes in den GFAP-Färbungen beider Abbildungen wird durch den verwendeten sekundären Anti-Maus-Antikörper verursacht, welcher neben dem GFAP-Antikörper der Wirtspezies Maus zum Teil auch das umliegende Bindegewebe markiert, sofern dieses bei Präparation zur Vermeidung einer mit vermehrter Manipulation einhergehender Gewebedissoziation nicht vollständig entfernt wurde.

In Abb. 6 sind Querschnitte durch den Sehnerv je einer 5 und einer 7 Tage alten Wild-Typ-Maus gezeigt. Die am konfokalen Mikroskop aufgenommenen Bilder bestehen aus Stacks (= Stapeln) von 6 Einzelbildern mit einem Abstand von etwa 0,5 μm zueinander. Bei hoher Gewebequalität und -integrität zeigt sich ein punktgenauer Overlap des CNTF- und GFAP Signals. Die starke CNTF-Expression in den ersten postnatalen Wochen passt zu der Schlüsselrolle, die CNTF bei der Zelldifferenzierung des Sehnervs insbesondere in diesem Zeitraum spielt.

Eine weitere tiefere Charakterisierung der CNTF-exprimierenden Zellen wurde mit mehreren Zellmarkern wie beispielsweise NG2, GLAST oder GluSyn zwar in multiplen Versuchsreihen adressiert, scheiterte jedoch an der eindeutigen und untersucherunabhängigen Zuordnung der Marker zu CNTF- oder GFAP-positiven Zellen. Diese grundlegende Problematik ist exemplarisch in Abb. 7 veranschaulicht. Als weiteres Problem zeigte sich, dass in vielen Färbungen nur ein Teil der Marker in zufriedenstellender Qualität dargestellt werden konnte. Zeigten die Signale zytosolischer Marker eine hohe Qualität, konnte dies in der gleichen Färbung beispielsweise bei fibrillären Markern komplett gegensätzlich sein.

Ergebnisse

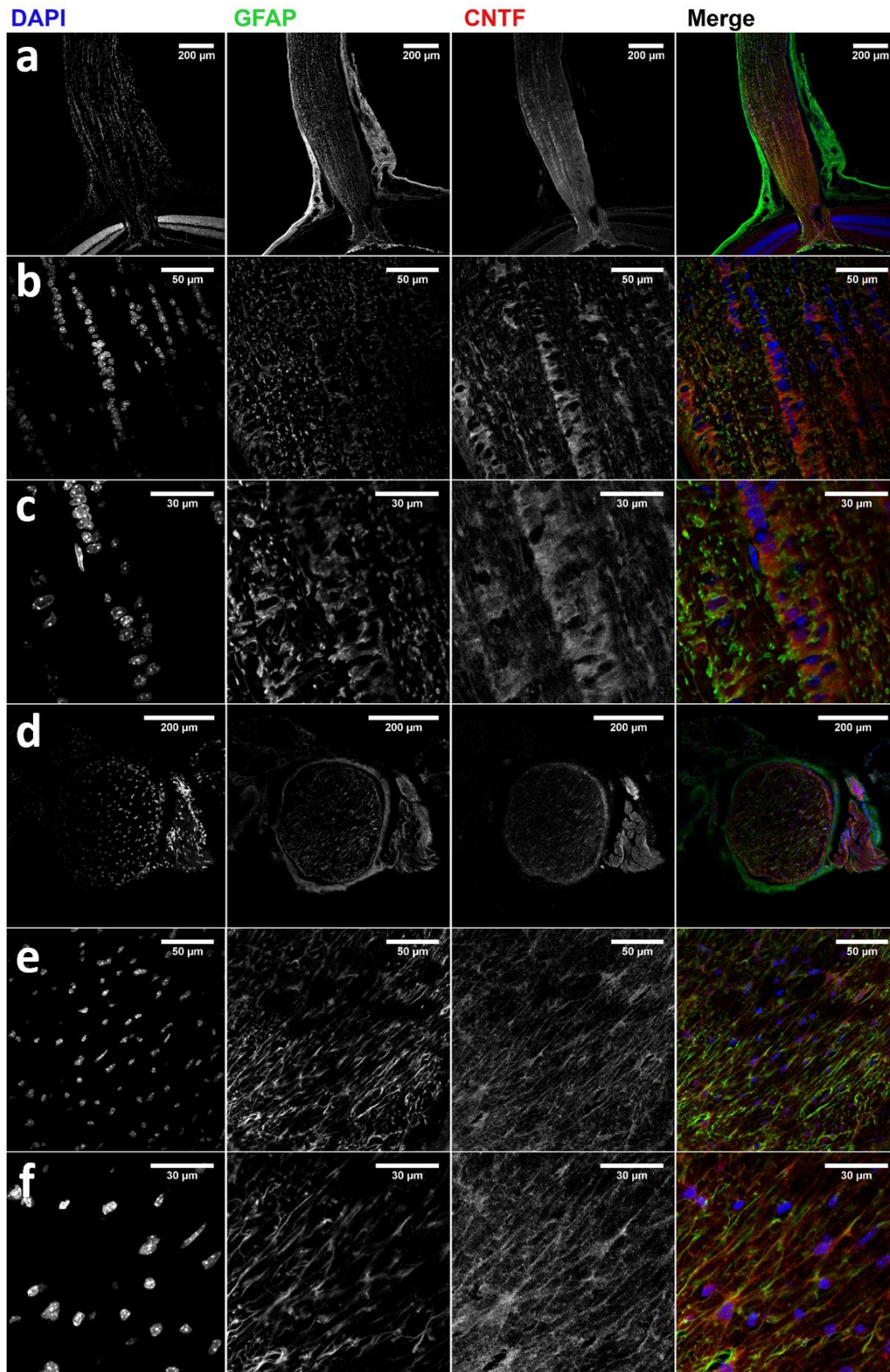


Abb. 5: Längs- und Querschnitte durch Sehnerv und Retina eines adulten Tieres
Konfokale Aufnahmen von Längs- (a - c) und Querschnitten (d - f) des Sehnerven eines adulten, heterozygot transgenen (CNTF Cre tg/+) Tieres in verschiedenen Vergrößerungsstufen.

Ergebnisse

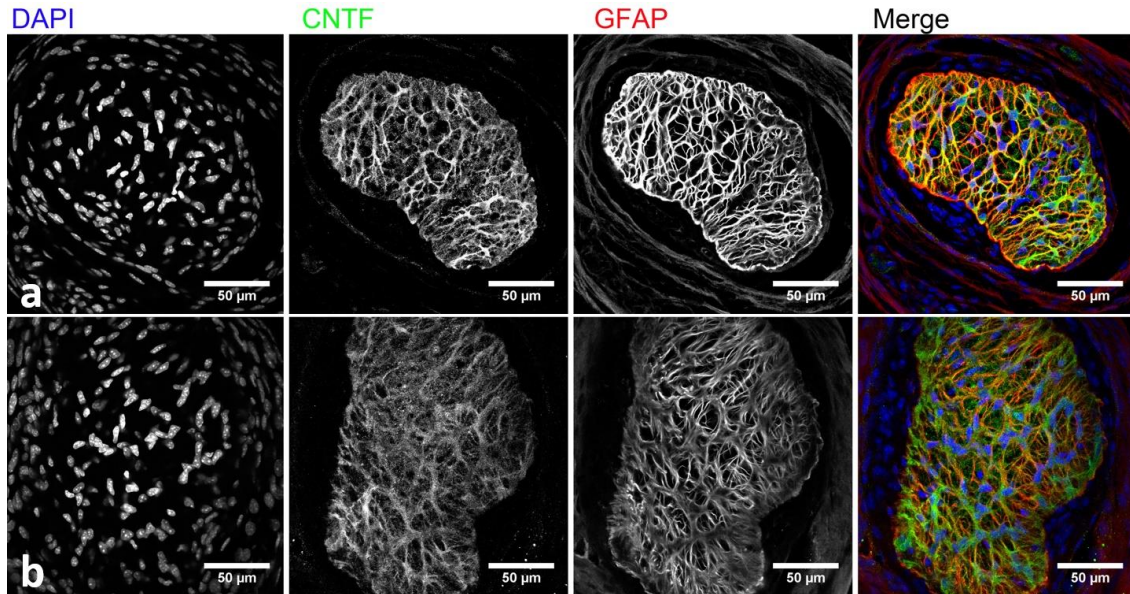


Abb. 6: Querschnitte durch den Sehnerv 5 und 7 Tage alter WT-Tiere

Konfokale Aufnahmen durch den Querschnitt des Sehnervs von 5 (a) und 7 (b) Tage alten Wildtyp-Tieren bei 60x-Vergrößerung mit Färbung von DAPI, CNTF und GFAP (Wirtsspezies Maus).

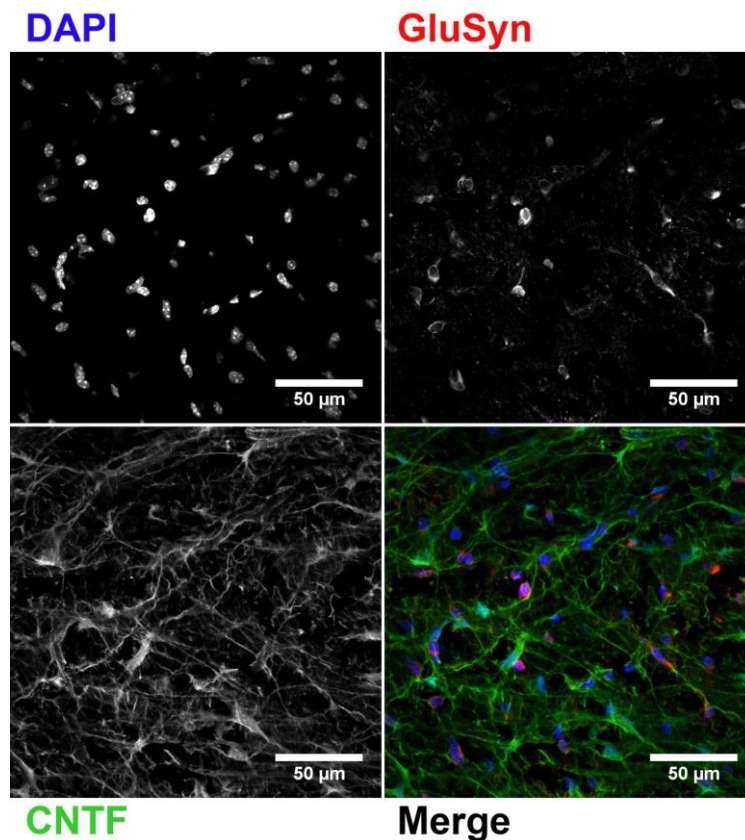


Abb. 7: Querschnitt durch die Retina eines adulten WT-Tieres

Konfokale Aufnahmen des quergeschnittenen Sehnervs eines adulten WT-Tieres mit Kofärbung von Glutamin-Synthetase (Wirtsspezies Maus) und CNTF (Wirtsspezies Kaninchen) bei 60x-Vergrößerung.

3.1.3 CNTF in der Retina

Bei Untersuchungen der CNTF-Expression des Sehnervs liegt es nahe, auch einen Blick auf die Netzhaut zu werfen. Besonders interessant ist die Frage, ob CNTF in der Retina, sowie im Sehnerv in Astrozyten exprimiert wird, einschließlich der spezialisierten Müller-Glia. Dies war bereits zuvor berichtet worden (Kirsch et al., 1997; Walsh et al., 2001).

Abb. 8 zeigt einen Querschnitt durch die Netzhaut eines adulten CNTF-Knockout-Tieres im Vergleich mit einem CNTF-Wildtyp-Tier mit CNTF-Antikörper-Färbung, sowie zugehörigen Kontrollen ohne Antikörper. Die beiden Bilder der ersten Reihe entsprechen einer regulären CNTF-Färbung mit Primär- und Sekundärantikörpern, die der zweiten Reihe Kontrollen ohne Primär- und nur mit Sekundär-Antikörper. Die Bilder der dritten Reihe entsprechen Kontrollen komplett ohne Antikörperbehandlung. In Zusammenschau mit KO-Sample und Kontrollen zeigt sich kein relevanter Unterschied in der Signalintensität oder Verteilung. Ein dediziertes CNTF-Signal lässt sich nicht sicher ausmachen.

Ein in Schnitten der Netzhaut durchgängig gegebenes hohes Hintergrundrauschen des Gewebes und eine starke Autofluoreszenz der Zapfen und Stäbchen unterschiedlichen Ausmaßes auch ohne Antikörperfärbung zeigen sich auch in diesen Bildern. Ein eventuelles schwaches, aber vorhandenes CNTF-Signal könnte durch dieses Hintergrundrauschen überlagert sein. Weiterhin wurde hier aus technischen Gründen nur ein kurzer Blick auf die adulte Netzhaut geworfen. In der Netzhaut von Jungtieren ist ein relevantes CNTF-Signal durchaus denkbar.

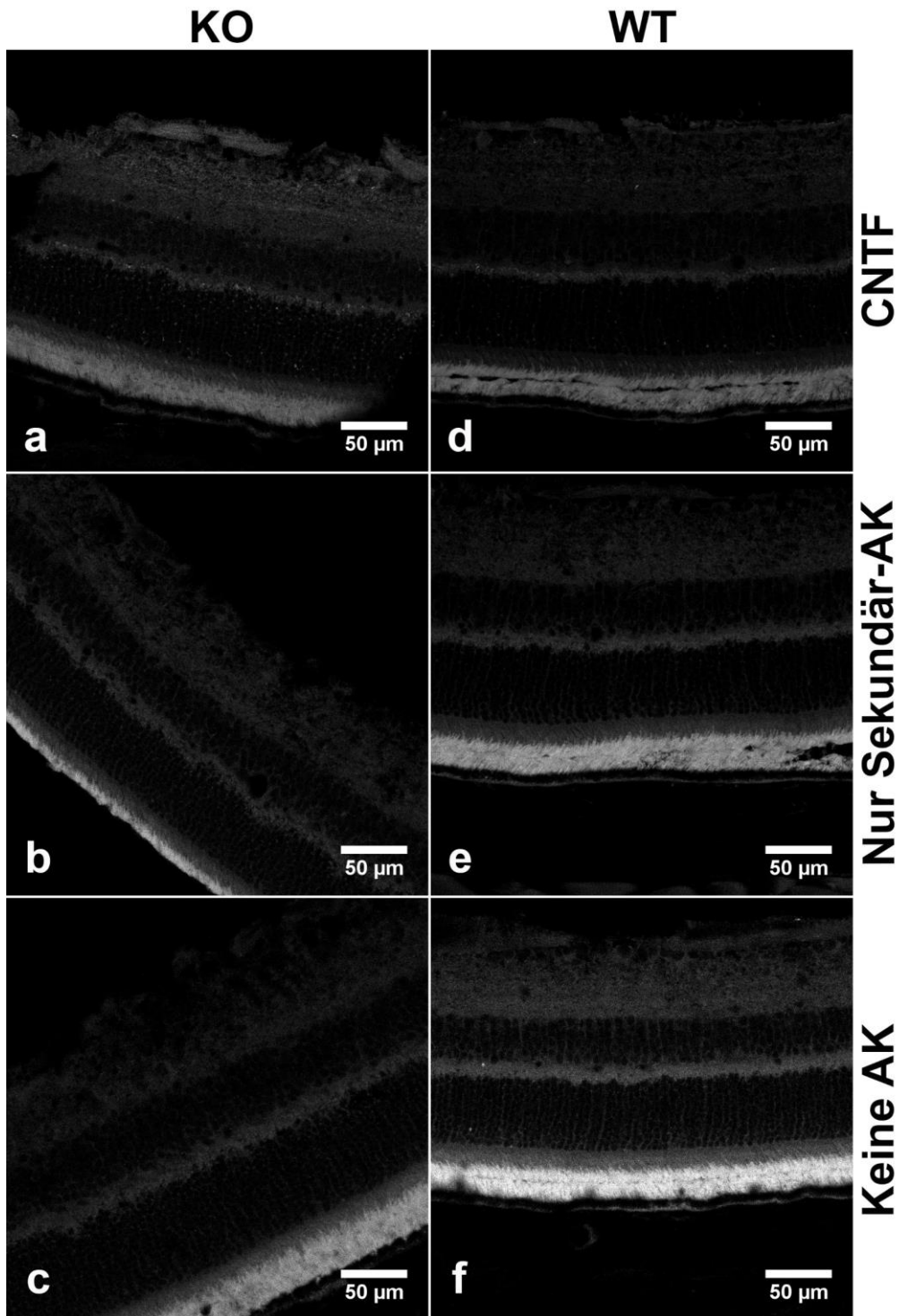


Abb. 8: CNTF-Färbung der Netzhaut in adulten CNTF-KO und WT-Tieren

Konfokale Aufnahmen bei 40x-Vergrößerung. a-c: CNTF-KO. d-f: CNTF-WT. Das Imaging erfolgte auf dem Cy3-Kanal. Als Sekundärantikörper zum CNTF-K10-Antikörper wurde ein entsprechender Esel-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Wie insbesondere in d und e erkennbar, zeigte sich die Rezeptorzellschicht mit ihren Zapfen und Stäbchen, bzw. am Übergang des Outer (OS) zum Inner Segment (IS) für Gewebedissoziationen am anfälligsten. Am relevantesten hierfür schienen die Qualität der PFA-Fixation bei transkardialer Perfusion und Nachfixation, sowie die schonende Präparation ohne Ausübung von relevanten Druck- oder Zugkräften zu sein.

3.2 Charakterisierung der CNTF-Reporter-Maus

Unter der Verwendung von transgenen Mäusen, welche unter Einfluss des CNTF-Promotors GFP exprimieren, lassen sich Fate-Mapping Experimente durchführen, um den Einfluss von CNTF auf die Zelldifferenzierung zu untersuchen.

Eine solche Maus war von Yasuhiro Ito am Institut für Klinische Neurobiologie durch homologe Integration einer Cre codierenden Sequenz in das Exon 1 des CNTF-Gens bei der Maus generiert worden. Durch Verkreuzung dieser Maus mit einer Reportermaus, bei der aus dem Rosa Locus die cDNA für das fluoreszierende Protein GFP exprimiert werden kann, können so alle Zellen markiert werden, in denen während ihrer Entwicklung über den CNTF-Promotor CNTF exprimiert wurde.

Bei heterozygoten Tieren lässt sich so untersuchen, wie sich Zellen entwickeln, welche CNTF exprimieren, sowie bei homozygot transgenen Tieren wie sich solche Zellen entwickeln, welche ursprünglich CNTF hätten exprimieren sollen, aber nicht konnten. Abb. 9 veranschaulicht diesen Zusammenhang. Hierbei standen zwei unterschiedliche Mauslinien, sowie zwei unterschiedliche Antikörper (Wirtsspezies Maus und Huhn) zur Verfügung.

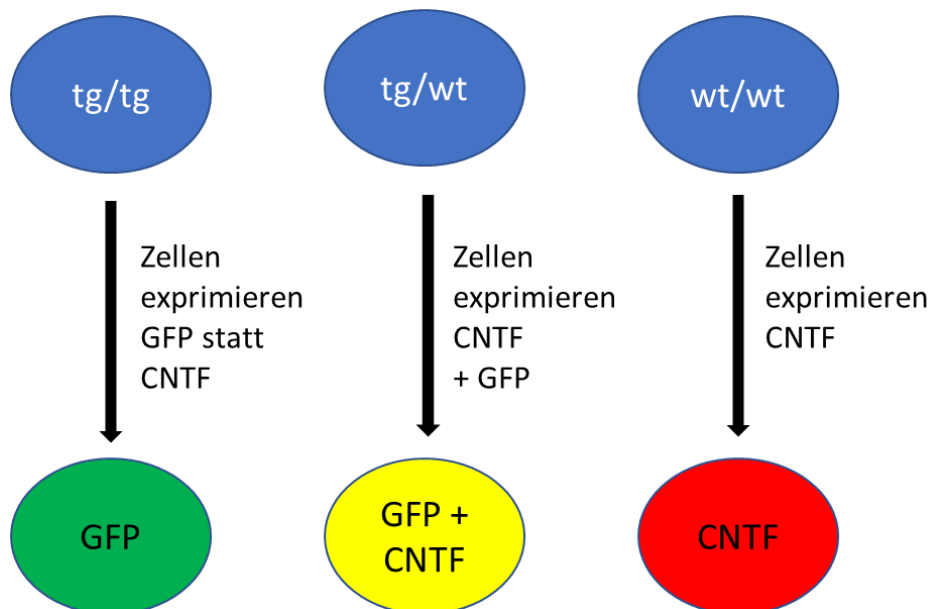


Abb. 9: Schematische Darstellung des Reporter-Systems

Sind die Tiere zumindest heterozygot transgen für sowohl die CNTF-Cre, als auch die GFP-Gensequenz, so exprimieren diese GFP statt CNTF. In den beiden verwendeten Mauslinien (s. 2.2.1) sind die GFP-Gensequenzen unterschiedlich eingebunden.

3.2.1 GFP-Detektion im N. trigeminus

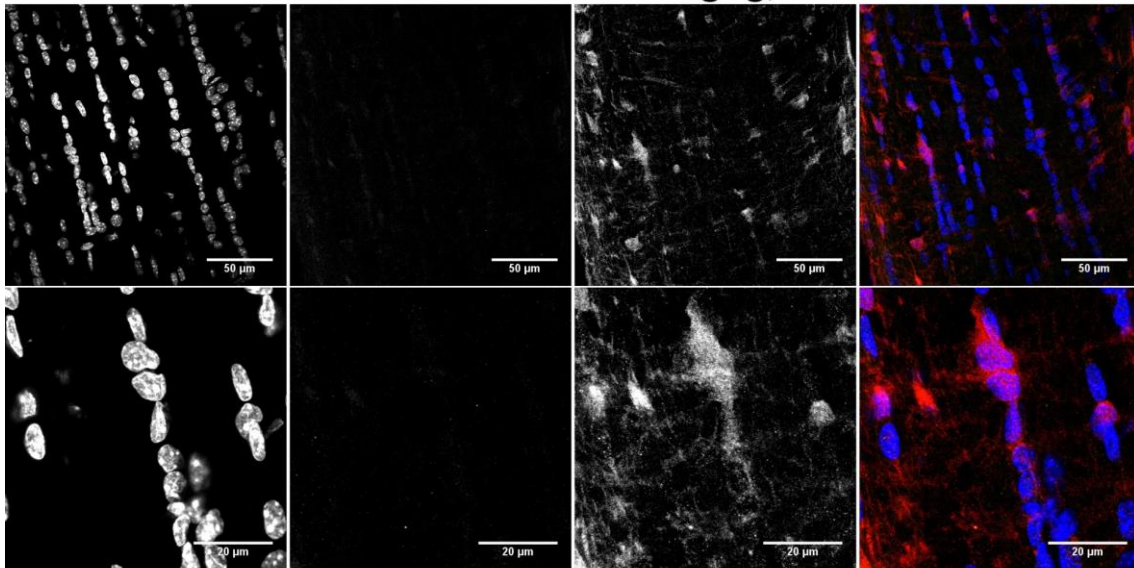
Die ersten immunhistochemischen Versuchsreihen zur GFP-Detektion erfolgten am N. Trigemini. Andere Arbeitsgruppen des Instituts verwendeten die hier benutzten Mausmodelle bereits am N. ischiadicus, welcher ebenso zum peripheren Nervensystem gehört wie der N. trigeminus, erfolgreich und konnten dabei zuverlässige GFP-Signale detektieren.

In Abb. 10 wird das in Abb. 9 schematisch dargestellte Prinzip des Fate-Mappings anhand von 2 adulten, transgenen Tieren nach konfokalem Imaging in jeweils in 2 Vergrößerungsstufen veranschaulicht. Ersteres Tier (CNTF Cre +/+) besaß keine CNTF Cre, sodass zwar CNTF, jedoch kein GFP exprimiert wurde, obwohl es die transgene GFP-Gensequenz besaß (RosaGFP tg/tg). Das zweite Tier dagegen besaß nicht nur die transgene GFP-Gensequenz (RosaGFP tg/tg), sondern war auch bezüglich der CNTF Cre heterozygot transgen (CNTF Cre +/-), sodass neben CNTF auch GFP exprimiert und in den Bildern immunhistochemisch detektiert werden konnte.

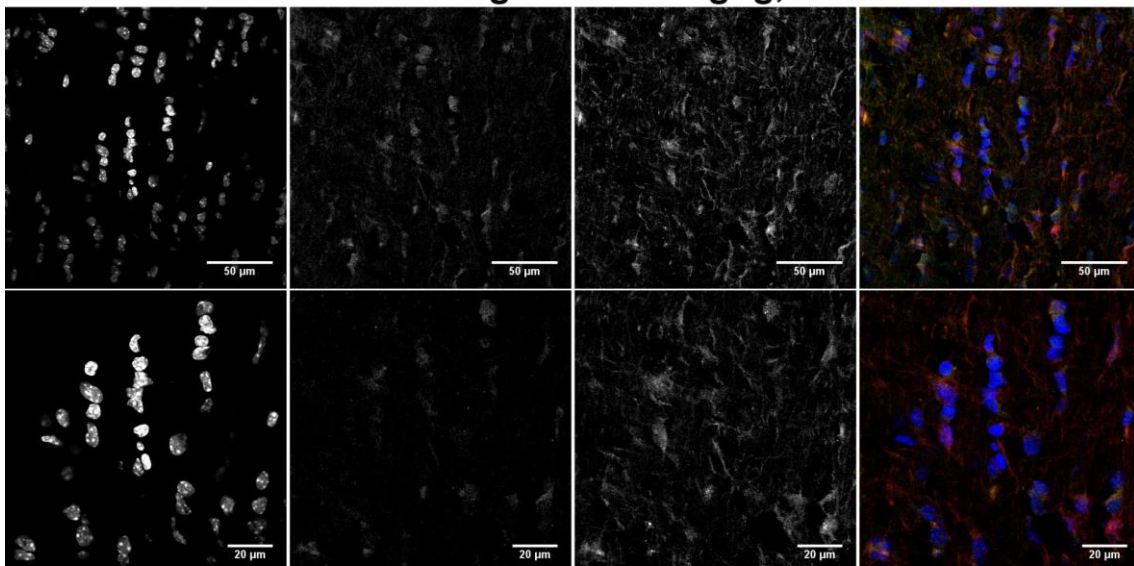
In den Abb. 11 und Abb. 12 sind weitere konfokale Bilder aus dem gleichen für die CNTF Cre heterozygot transgenen Tier mit immunhistochemischer GFP-Färbung in verschiedenen Vergrößerungsstufen gezeigt. Verwendet wurden GFP-Antikörper der Spezies Huhn, sowie Ziege-anti-Huhn-Alexa-488 Sekundärantikörper. Als Blocking Solution wurde 10% BSA, 0,5% TriX100 und 0,1% Tween 20 in 1x PBS verwendet.

Zusätzlich ist in diesen Bildern NG2 dargestellt. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel angesprochen zeigen auch diese konfokalen Aufnahmen die Schwierigkeit, das NG2-Signal eindeutig einzelnen Zellen oder zumindest Zellkernen zuzuordnen und damit quantifizierbar zu machen.

CNTF Cre +/+ RosaGFP tg/tg, adult



CNTF Cre +/- RosaGFP tg/tg, adult



DAPI

GFP

CNTF

Merge

Abb. 10: GFP-Nachweis in Längsschnitten durch den N. trigeminus adulter transgener Tiere

Ersteres Tier exprimiert keine CNTF Cre, sodass auch nach Färbung mittels GFP-Antikörper (Wirtsspezies Huhn) kein GFP-Signal nachgewiesen werden kann. Das zweite Tier exprimiert heterozygot die CNTF Cre, sodass sowohl GFP, als auch CNTF nachgewiesen werden können.

Ergebnisse

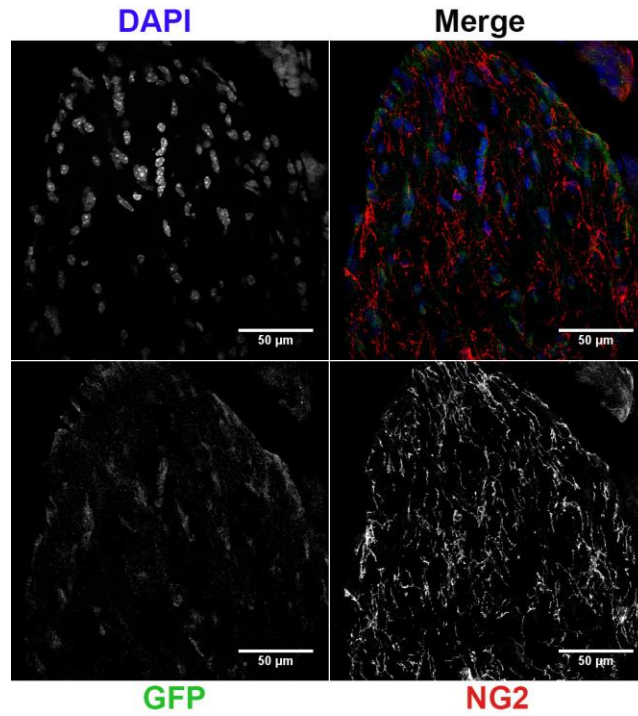


Abb. 11: Längsschnitt durch den N. trigeminus einer adulten CNTF Cre +/tg RosaGFP tg/tg Maus.

Konfokale Aufnahme bei 60x-Vergrößerung.

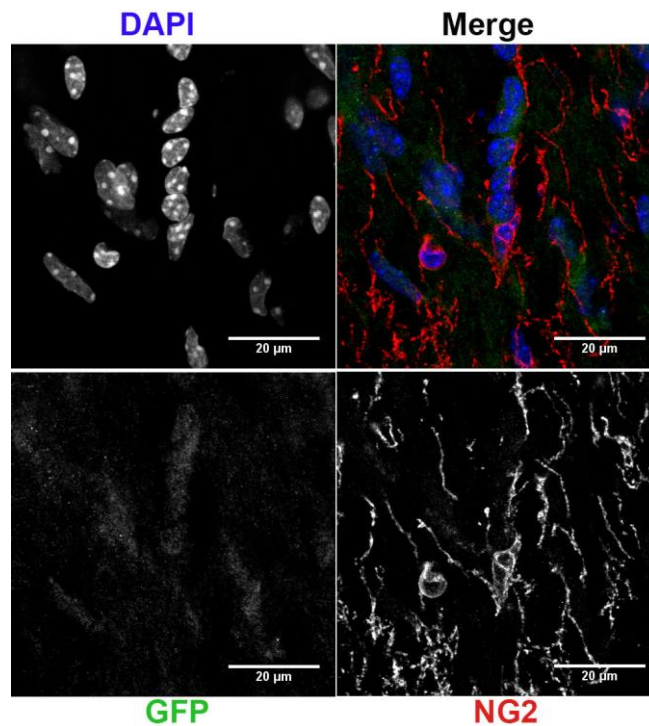


Abb. 12: Längsschnitt durch den N. trigeminus einer adulten CNTF Cre +/tg RosaGFP tg/tg Maus

Konfokale Aufnahme bei 60x Vergrößerung mittels Objektiv und zusätzlich 3x Digital-Zoom.

3.2.2 GFP-Detektion im N. opticus

Nachdem die GFP-Detektion im N. trigeminus gut funktioniert hat, wurde das gleiche Protokoll auf den Sehnerv angewandt. Abb. 13 zeigt Längsschnitte einer Färbung eines adulten heterozygoten transgenen Tieres (Rosa), Abb. 14 die zugehörigen Kontrollen mit lediglich Sekundärantikörper und gänzlich ohne Antikörper, sowie Abb. 15 und Abb. 16 die entsprechenden Querschnitte mit wiederum dazugehörigen Kontrollen. Alle Bilder stammen vom gleichen Sample und wurden einzeitig im gleichen Versuch mit den gleichen Lösungsansätzen gefärbt. Weiterhin handelt es sich um das gleiche Tier, welches im vorangegangenen Kapitel in Abb. 5 dargestellt ist.

Bei GFAP und CNTF handelte es sich um zuverlässig gelingende immunhistochemische Färbungen. Gleiches gilt für das Glutamin-Synthetase-Signal. Das A2B5-Signal zeigt eine untypische Verteilung und scheint nicht spezifisch zu sein. Weiterhin fällt die hohe Autofluoreszenz der Netzhaut, sowie das generelle Rauschen von Anti-Maus-Sekundär-Antikörpern auf.

Das GFP-Signal zeigt sich nicht einheitlich, obwohl alle Bilder einzeitig und nach gleichem Protokoll angefertigt wurden. In den Längsschnitten ist im Sehnerv kaum ein GFP-Signal zu erkennen. Zudem scheinen die Signale aufgrund des Musters nicht spezifisch zu sein. In der Retina zeigen sich flächige Signalbanden, doch auch hier scheinen die Signale nicht spezifisch zu sein. Das uneinheitliche Bild setzt sich in den Querschnitten fort: In den ersten Schnitten ist entweder kein, oder ein a.e. unspezifisches GFP-Signal zu sehen.

In den Querschnitten mit Glutamin-Synthetase als Kofärbung zeigt sich dann dagegen ein deutliches GFP-Signal.

In Abb. 13 bis Abb. 19 zeichnet sich ab, was sich auch über viele weitere Färbungen hinweg fortgesetzt gezeigt hat:

So gut der GFP-Nachweis mit dem Reporter-System auch im PNS wie dem N. ischiadicus und N. trigeminus oder auch beispielsweise im Hippocampus als ZNS-Bestandteil funktioniert hat, so wechselhaft zeigt sich das GFP-Signal im optischen Nerv und der Retina, wobei sich das Signal teilweise sogar innerhalb der gleichen Färbungen bezüglich der Qualität unterschied.

Ergebnisse

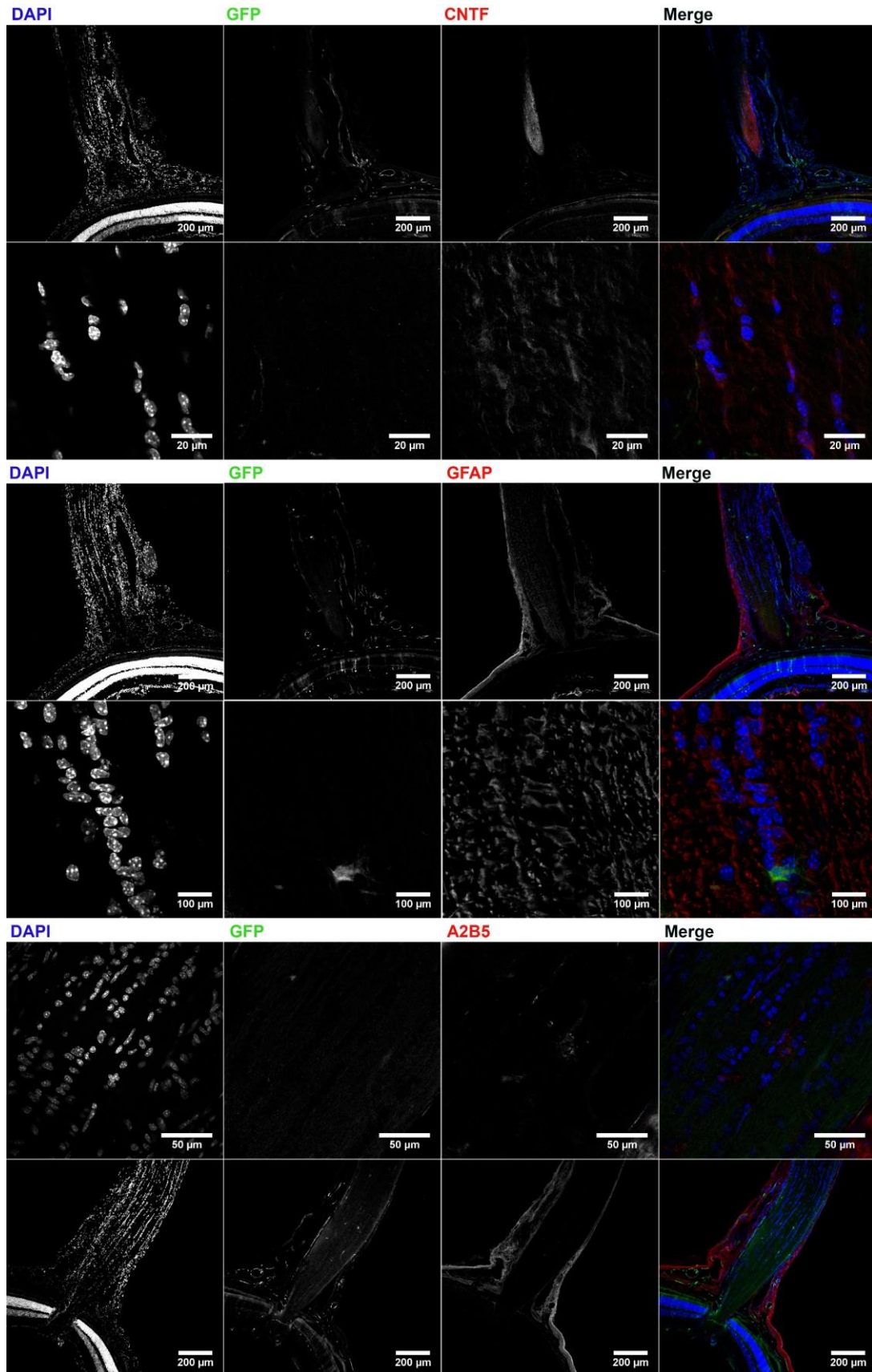


Abb. 13: GFP-Signal im Sehnerv eines adulten heterozygot transgenen CNTF Cre Tieres
Obwohl genotypisch zu erwarten, ist trotz Färbung kein eindeutiges GFP-Signal detektiert.

Ergebnisse

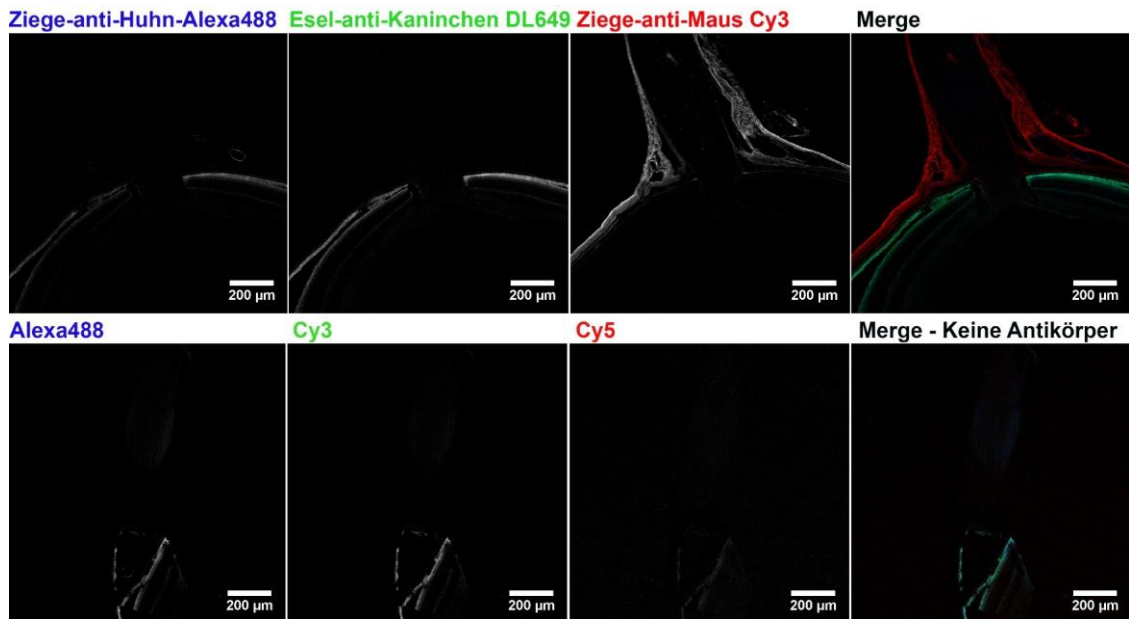


Abb. 14: Zugehörigen Kontrollen zu Abb. 13

Kontrollen mit lediglich den sekundären Antikörpern, sowie komplett ohne Antikörper.

Prinzipiell ist bei ausreichender GFP-Expression selbst ohne eine weitere immunhistochemische Färbung die Detektion gut möglich.

Dass dies in Sehnerv und Netzhaut selbst nach immunhistochemischer Färbung trotz verschiedener Antikörper und Protokollabwandlungen nicht zufriedenstellend gelang, könnte mehrere Gründe haben:

1. Das GFP hatte keine Möglichkeit zur ausreichenden Akkumulation, sei es weil die Färbung zu früh in der Entwicklung erfolgte oder einfach nicht genug GFP exprimiert wurde.
2. Die Färbung erfolgt zu spät, d.h. das GFP wurde bereits wieder abgebaut.
3. Die Zellen des Gewebes exprimieren kein CNTF und auch kein GFP, was angesichts der Arbeiten von Kirsch und Walsh unwahrscheinlich ist (Kirsch et al., 1997; Walsh et al., 2001).
4. Das GFP bzw. dessen Färbung ist sehr empfindlich, sodass bereits kleine Abweichungen in Fixation, Schnitt oder Färbeprozess das Ergebnis beeinflussen. Hierbei handelte es sich um die wohl wahrscheinlichste Ursache der erschwerten GFP-Detektion.

Ergebnisse

Am wahrscheinlichsten erscheinen technische Gründe. Da der GFP Nachweis in den verwendeten Reporter-Mäusen beispielsweise im PNS und auch Hippocampus in unserem Institut regelmäßig mit gutem Ergebnis gelingt, ist nicht von einer übermäßigen Empfindlichkeit des GFP oder des Färbvorgangs auszugehen. Eine nicht ausreichende Akkumulation des GFP in Sehnerv und Retina erscheint ebenfalls denkbar.

GFP in Sehnerv oder Retina gänzlich ohne Antikörper eindeutig zu detektieren gelang nicht, obwohl dies bei ausreichender GFP-Expression in anderen Geweben möglich ist. Dass Möglichkeit 4, d.h. kleine Abweichungen in Fixation oder sonstiger Behandlung, eine Rolle spielen kann, zeigt sich schon daran, dass selbst innerhalb der gleichen Färbungen, bei gleicher Färbelösung und gleichem Sample Unterschiede bzgl. des GFP-Signals in den einzelnen Schnitten auftreten konnten.

Möglichkeit 2, d.h. der falsche Zeitpunkt der Färbung, könnte ebenfalls eine Rolle spielen. Obwohl sowohl adultes als auch junges Gewebe untersucht wurde, wurden natürlich längst nicht alle möglichen Zeitpunkte der Entwicklung des Sehnervs abgedeckt. Möglichkeit 3, d.h. das Fehlen von CNTF, sollte angesichts nachgewiesener CNTF-Expression keine Rolle spielen.

Ergebnisse

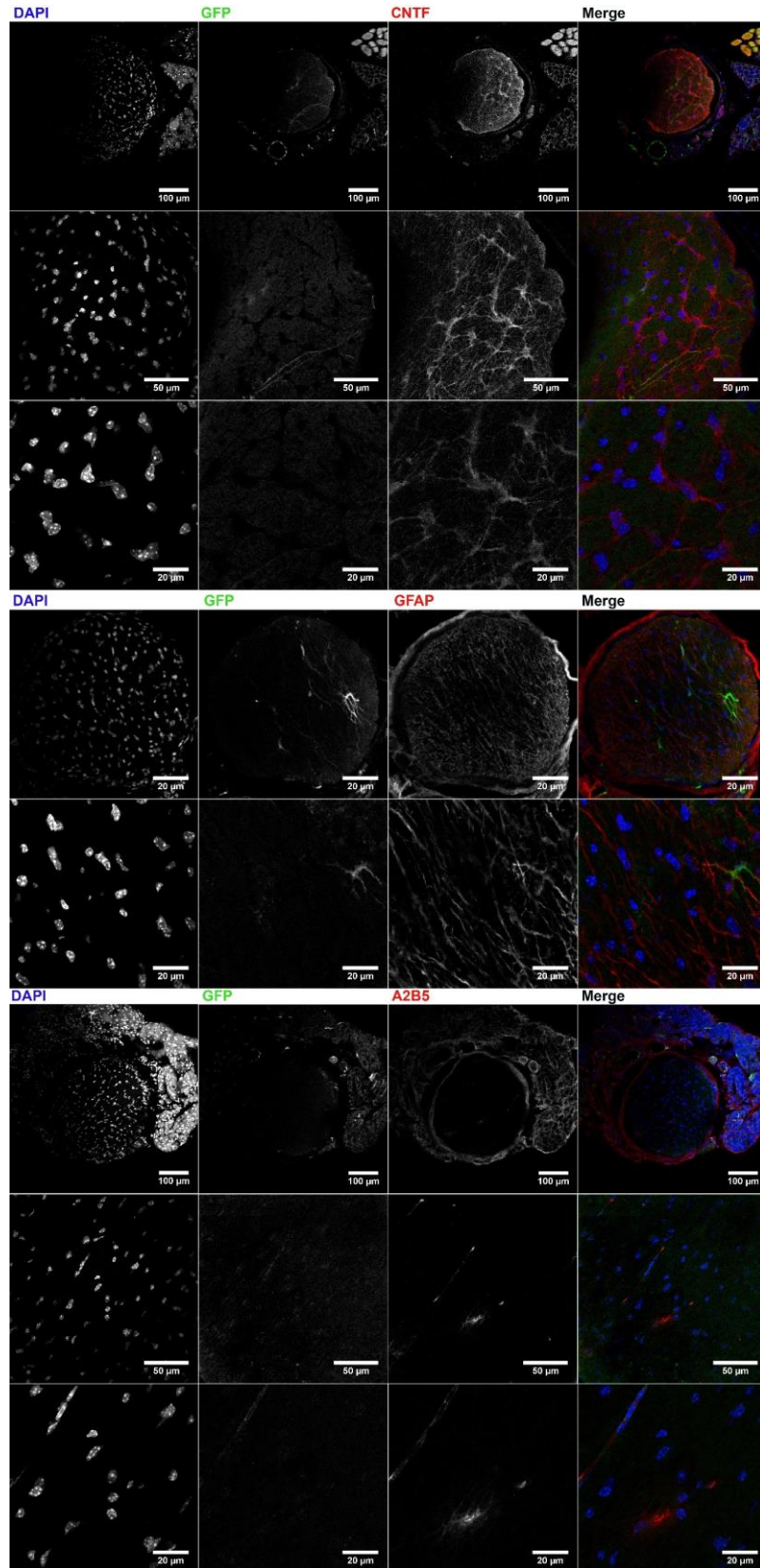


Abb. 15: GFP-Signal im Sehnerv eines adulten heterozygot transgenen CNTF Cre-Tieres
Konfokale Aufnahmen im Querschnitt aus dem Sample der beiden vorangegangenen Abbildungen.

Ergebnisse

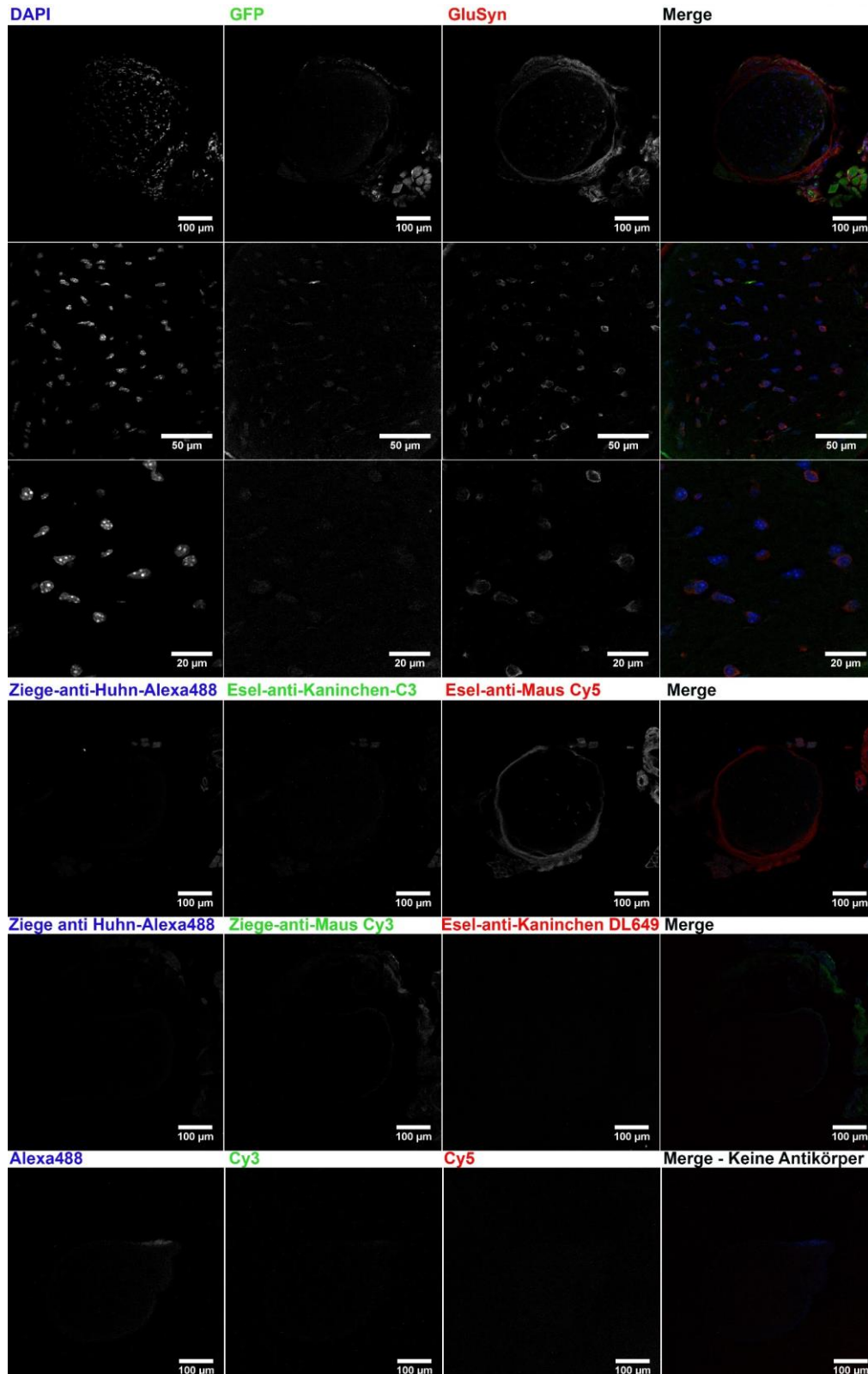


Abb. 16: GFP-Signal im Sehnerv eines adulten heterozygot transgenen CNTF Cre-Tieres
 Konfokale Aufnahmen im Querschnitt mit GFP- und GluSyn-Färbung, zugehörigen Kontrollen mit lediglich Sekundär-, sowie komplett ohne Antikörper aus dem Sample der drei vorangegangenen Abbildungen.

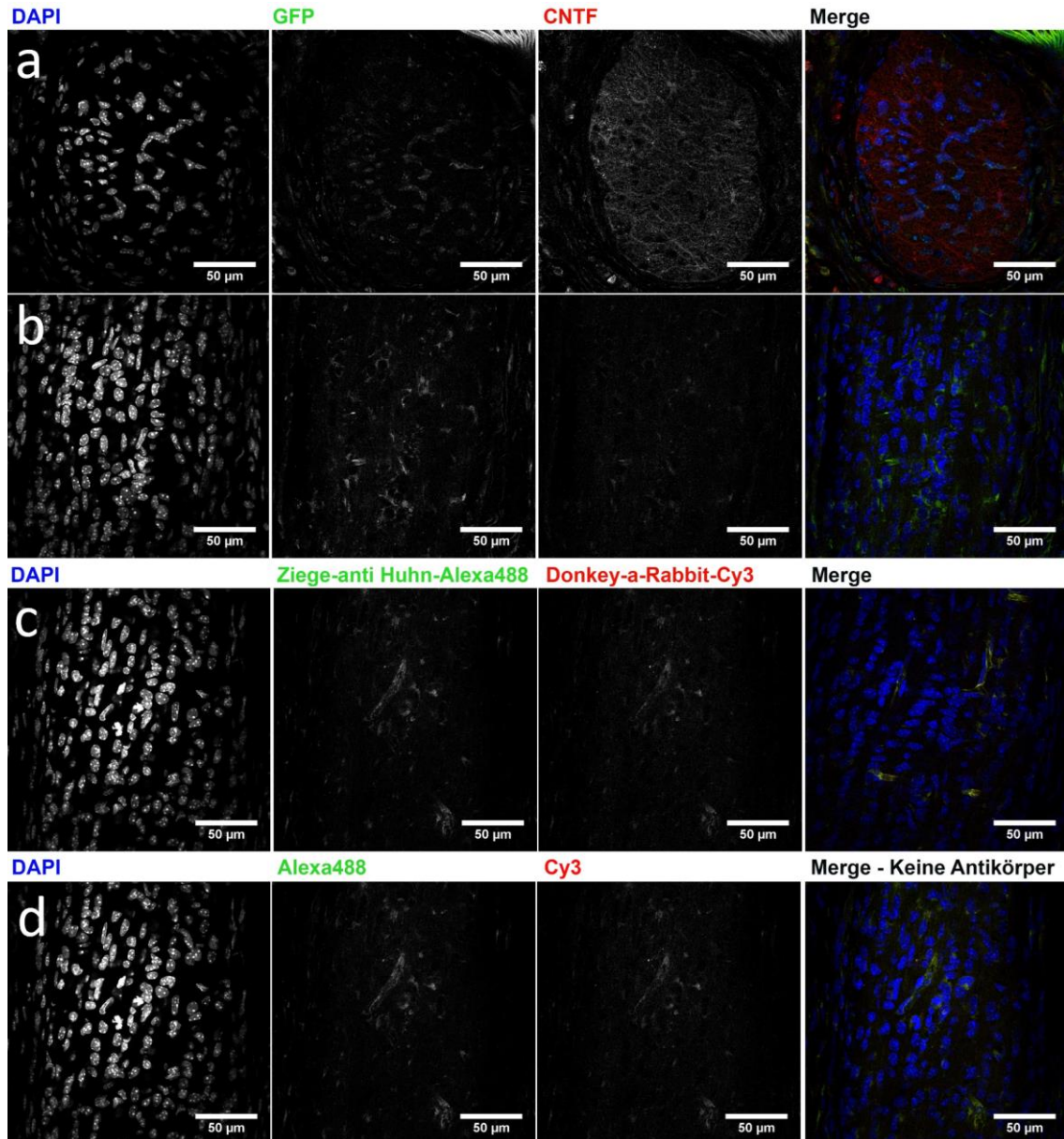


Abb. 17: Sehnerv im Querschnitt, junges heterozygotes transgenes Tier (P8).
 Im ersten Bild (a) als Quer-, im zweiten (b) als Längsschnitt. Nachfolgend die Kontrolle ohne Primärantikörper (c), sowie zuletzt die Kontrolle gänzlich ohne Antikörper (d).

Abb. 17 zeigt einen heterozygot transgenen Sehnerv im Quer- und Längsschnitt mit zugehörigen Kontrollen ohne Primärantikörper, sowie gänzlich ohne Antikörper zum Zeitpunkt P8. Sowohl CNTF, als auch GFP lassen sich nachweisen. Die Kontrollen zeigen jedoch auch ein starkes Hintergrundrauschen, was die Beurteilung der Spezifität des GFP-Signals im Längsschnitt erschwert.

Ergebnisse

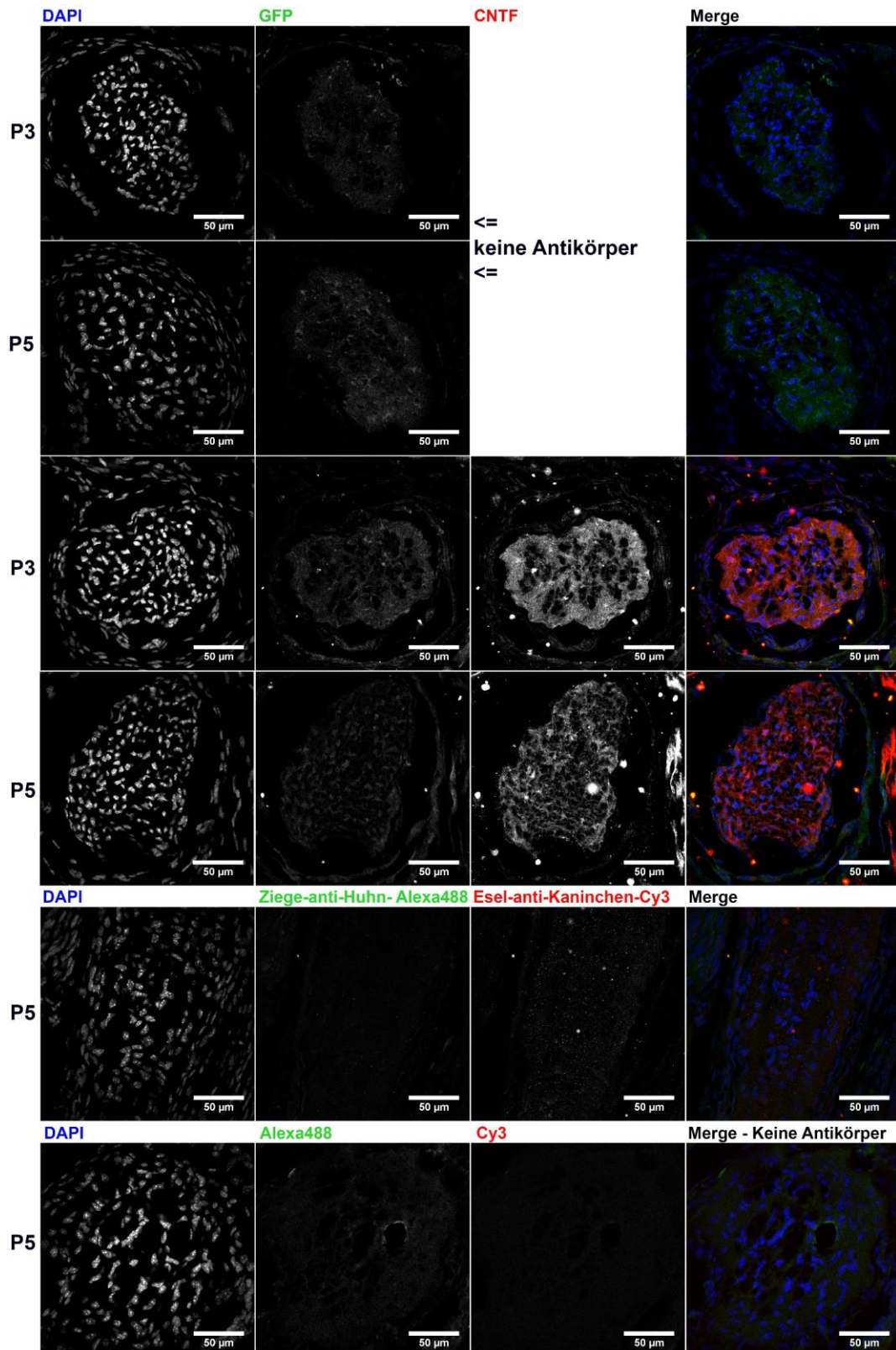


Abb. 18: Vergleich des GFP Signals mit und ohne Antikörperfärbung
 Sehnerv heterozygot transgener junger Tiere zum Zeitpunkt P3 und P5 im Querschnitt.

Ergebnisse

Abb. 18 zeigt das GFP Signal ohne Antikörperfärbung und mit GFP-Antikörper der Wirtsspezies Huhn, sowie zugehörige Kontrollen in heterozygoten transgenen Tieren zum Zeitpunkt P3 und P5. Die CNTF-Färbung ist nicht optimal gelungen, die Fixierung und Gewebequalität als Ganzes ist jedoch akzeptabel, wie die ebenfalls vorhandenen Kofärbungen der gleichen Samples mit GFAP zeigen. Erneut fällt die starke Varianz des GFP-Signals auf. Allein die Antikörper-Färbung des P5 Tieres liefert ein hinreichend verlässliches, jedoch schwaches Signal.

Abb. 19 zeigt eine Färbung mit einem GFP Antikörper der Spezies Kaninchen an Stelle von Huhn. Ein Vorteil bezüglich der Signalqualität gegenüber dem Huhn-Antikörper zeigte sich nicht.

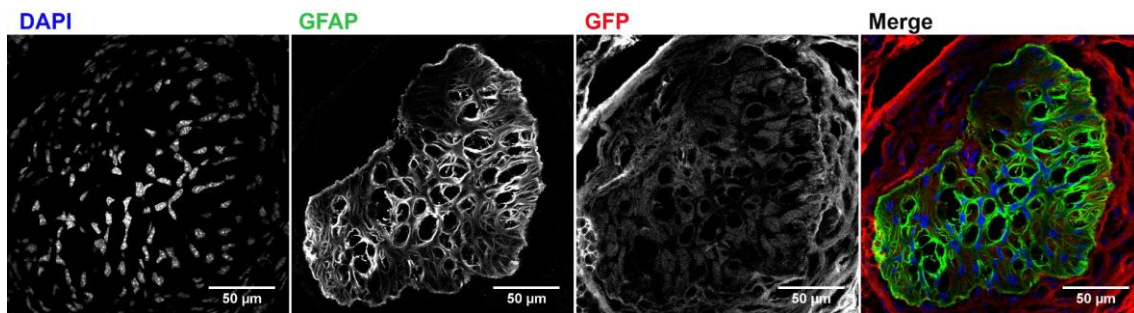


Abb. 19: GFP Färbung eines heterozygot transgenen P7-Samples

GFP-Antikörper der Spezies Kaninchen an Stelle des zuvor verwendeten GFP-Antikörpers der Spezies Huhn. Es zeigt sich kein spezifisches GFP-Signal.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass trotz einer Vielzahl von Versuchsreihen, 2 verschiedenen transgenen Mausmodellen, 2 verschiedenen GFP-Antikörpern und multiplen Abwandlungen des immunhistochemischen Färbeprotokolls im Gegensatz zu analogen Versuchen anderer Arbeitsgruppen am Institut im PNS (N. trigeminus, N. Saphenus) und ZNS (z.B. Hippocampus) kein zufriedenstellendes und sicher reproduzierbares GFP-Signal erzeugt und detektiert werden konnte.

3.3 CNTF-Einfluss auf Alterungsprozesse im Sehnerv

Etwa 2-3% der menschlichen Population sind homozygote Träger einer Mutation, welche eine CNTF-Defizienz verursacht (Takahashi et al., 1994; Thome et al., 1996). Obwohl die Träger dieser Mutationen durch Kompensationsmechanismen keinen offensichtlichen klinischen Phänotyp entwickeln, könnten sie unter einer erhöhten Vulnerabilität für zusätzlich auftretende neurodegenerative Erkrankungen, wie beispielsweise Multiple Sklerose, leiden.

So ist bekannt, dass CNTF-Defizienz den Zeitpunkt des Krankheitsbeginns, sowie den langfristigen Krankheitsverlauf von Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE), einem weit verbreiteten Maus-Modell der Multiplen Sklerose, beeinflusst (Linker et al., 2002). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Patienten beobachtet, bei denen die Krankheit bei CNTF-defizienten Individuen früher auftrat (Giess, Mäurer, et al., 2002). Dies wirft die Frage auf, ob nicht vielleicht eine CNTF-Defizienz an sich mit der Zeit zu einer langsam voranschreitenden und klinisch primär inapparenten Demyelinisierung an sich führen könnte.

Um eventuelle Auswirkungen einer CNTF-Defizienz auf den Sehnerv zu untersuchen, wurde in Semi- und Ultradünnschnitten der Sehnerven von adulten CNTF-Knockout und Wildtyp-Mäusen die G-Ratio als Maß für die Myelinisierung, der Umfang der Axone als Maß für die Axondicke, sowie die Mitochondriendichte als Parameter des Energiestoffwechsels bestimmt und miteinander verglichen.

3.3.1 Gewebeübersicht in Semidünnschnitten des Sehnervs

Für die Untersuchung wurden adulte Wildtyp- und CNTF-Knockout-Mäuse im Alter von 6-14 Monaten perfundiert, die Sehnerven präpariert, sowie in Epoxidharz eingebettet. Die Perfusion erfolgte hierbei teils mit alleinigem 4%-igem PFA, teils mit zusätzlich 2% Glutaraldehyd, da das perfundierte Gewebe auch in anderweitigen Versuchen eingesetzt wurde. Auf die Gewebequalität und nachfolgenden Untersuchungen hatte die Zugabe von Glutaraldehyd keinen relevanten Einfluss.

Ergebnisse

Die möglichst nahe am Chiasma opticum abgesetzten Sehnerven wurden makroskopisch in 3 ähnlich große Regionen eingeteilt: distal, intermediär und proximal bis zum Beginn der Netzhaut reichend.

Anschließend wurde mit aus dünnem Bruchglas hergestellten und im Ultramikrotom eingespannten Glasklingen 0,5 – 1 µm dicke, quer durch den Sehnerv laufende Semidünnschnitte angefertigt und mit Methylenblau gefärbt.

Abb. 20 zeigt exemplarisch die überwiegend hohe Gewebequalität der Proben unter dem Lichtmikroskop. Die versorgenden Blutgefäße sind von der Begleitarterie bis in die Kapillarversorgung hinein ebenso erhalten, wie das perineurale Bindegewebe und die intraneurale Bindegewebsseptierung. Auch die einzelnen quer getroffenen Axone mit ihren Myelinscheiden sind gut zu erkennen.

Auch ist hier der Einfluss der Schnittdicke auf die Bildqualität zu erkennen. Bei sehr dünnen Schnitten litt tendenziell die Gewebeintegrität, bei dickeren Schnitten der Detailreichtum.

Um für die Ausmessung einzelner Axone möglichst detailreiche und kontraststarke Bilder zu erhalten, wurden neben verschiedenen Schnittdicken auch unterschiedliche Mikroskop-Einstellungen und Objektive getestet. Abb. 21 zeigt Bilder, welche im Transmissionsmodus eines konfokalen Mikroskops aufgenommen wurden. Trotz aller Optimierungsversuche zeigte sich, dass zur exakten Beurteilung axonaler Feinstrukturen eine hochaufgelöste elektronenmikroskopische Darstellung nötig sein würde.

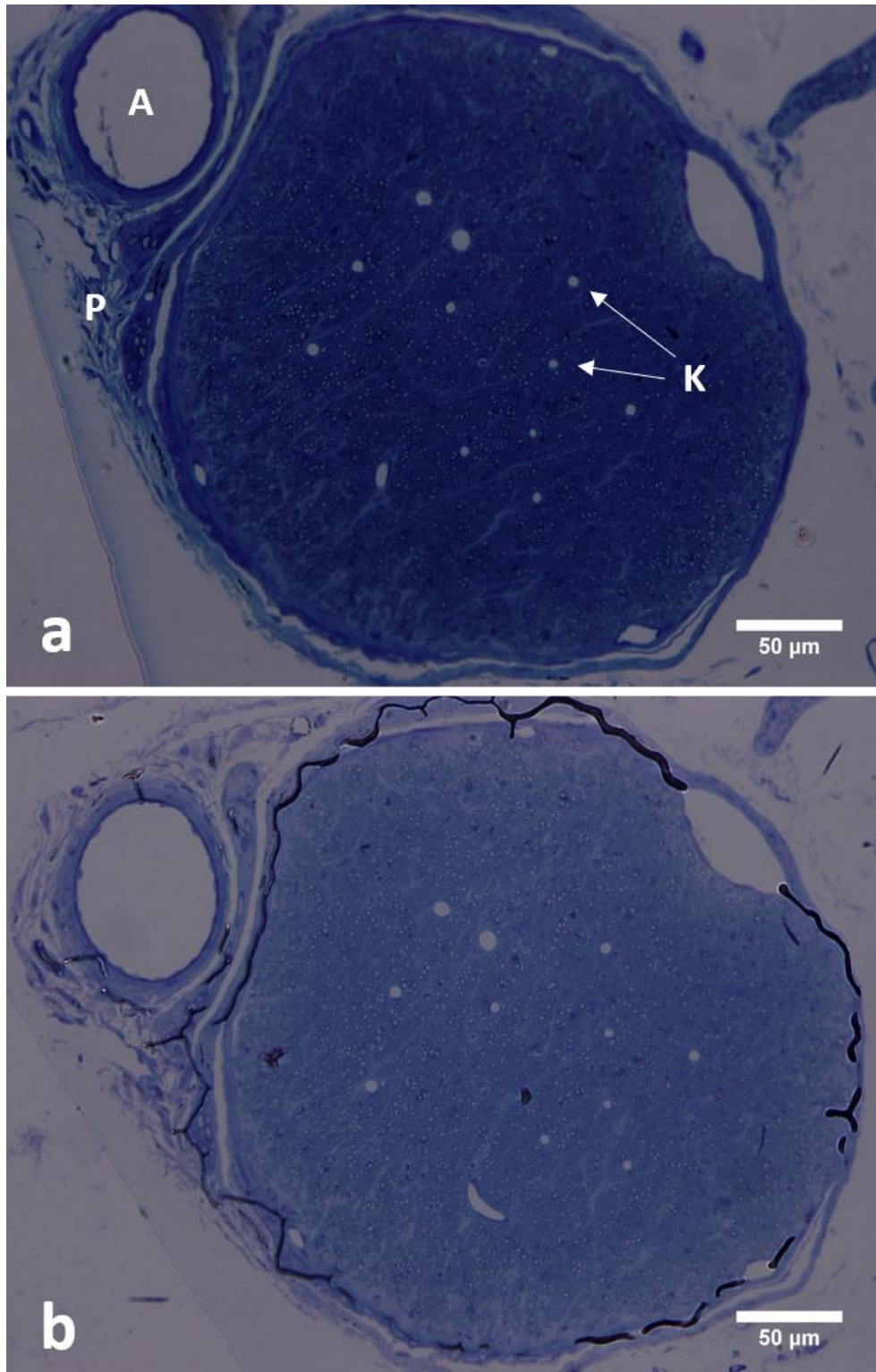


Abb. 20: Methylenblau gefärbte Semidünnschnitte des Sehnervs

Lichtmikroskopische Aufnahmen eines 1 µm (a) versus eines 0,5 µm (b) dicken Gewebequerschnittes durch den Sehnerv eines adulten Wildtyp-Tieres. Eine Schnittdicke von 0,5 µm stellte einen guten Kompromiss zwischen Gewebeintegrität und Detailreichtum dar. Selbst die Blutversorgung zeigt sich bis hin zu den Kapillaren gut erhalten. Probe #1, prox. Region, Tier 1 (♀, 6 Monate). A: Begleitarterie. P: Perineurales Bindegewebe. K: intraneurale Kapillaren.

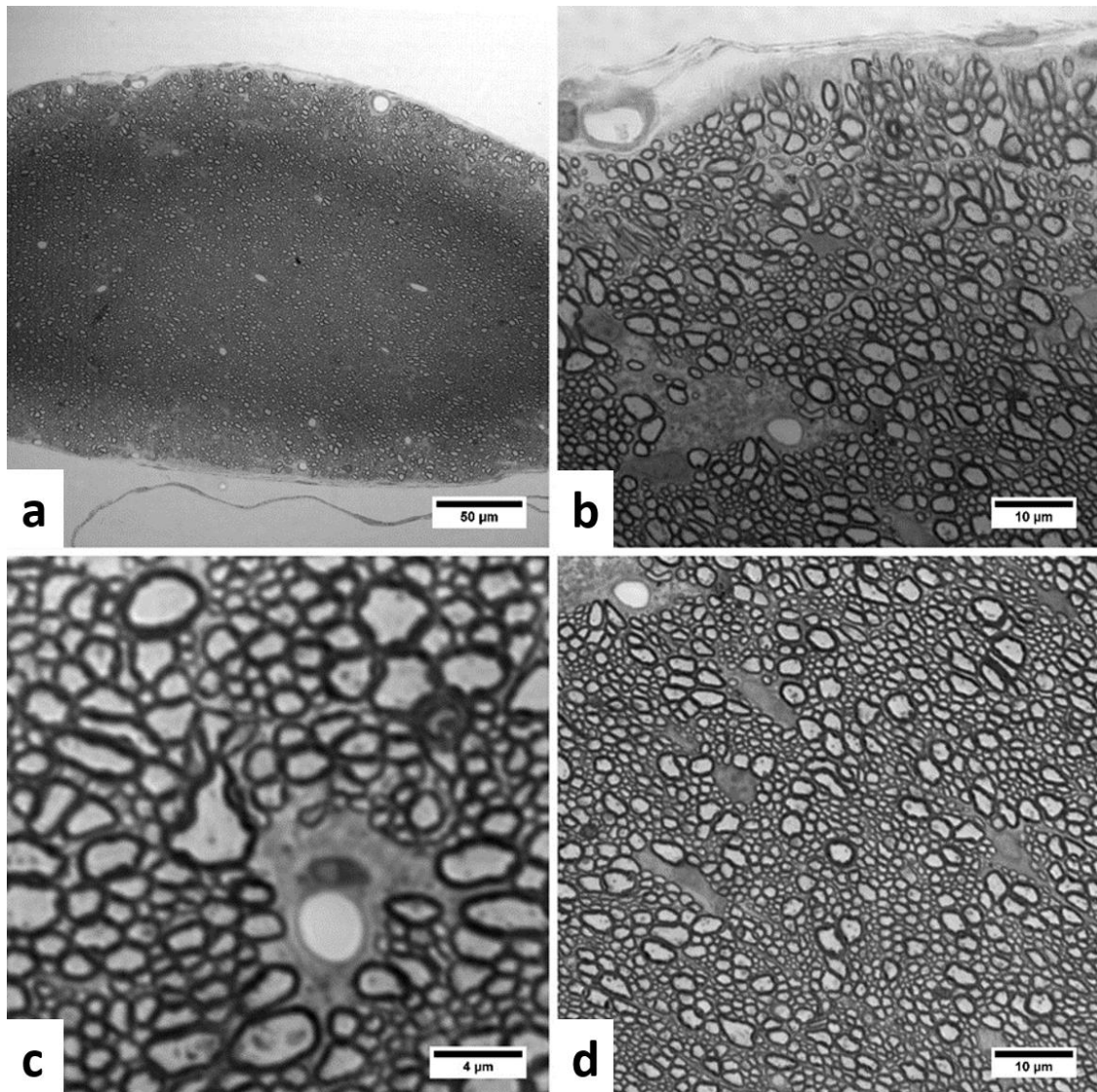


Abb. 21: Semi-Dünnschnitte des Sehnervs im Transmissionsmodus des konfokalen Mikroskops

Im Transmissionsmodus eines konfokalen Mikroskops angefertigte Aufnahme von Gewebequerschnitten durch den Sehnerv eines adulten CNTF-KO-Tieres in verschiedenen Vergrößerungsstufen. Trotz hoher Gewebequalität reicht das Auflösungsvermögen auch bei maximaler Vergrößerung (Bild c, Objektiv 60x, Apertur 1.35) nicht für eine ausreichende Beurteilung der axonalen Feinstrukturen aus.

3.3.2 Axonale Myelinisierung in elektronenmikroskopischer Darstellung

Anhand der Semidünnschnitte wurden die bezüglich der Gewebeintegrität hochwertigsten Gewebeproben ausgewählt, um mit Diamantklingen Ultradünnschnitte

Ergebnisse

mit einer Dicke von etwa 70 nm für die elektronenmikroskopische Untersuchung bei einer letztlich Vergrößerung von 10.000x anzufertigen.

So konnten G-Ratio, Axonumfang, sowie axonale Mitochondriendichte in den möglichst senkrecht quer geschnittenen Sehnerven von jeweils 4 Wild-Typ und 4 CNTF-KO-Tieren verglichen werden. Pro Tier wurden dabei 1-5 Schnitte mit jeweils 1-3 elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus verschiedenen Bereichen des Präparats untersucht, wie in Tabelle 4 dargestellt. Ausschlaggebend für die Auswahl der Präparate war eine ausreichend hohe Gewebequalität.

Gruppe A - WT

WT1 ♀ (w) (6 Monate)	#1 prox. #2 intermed. #3 intermed. #4 dist. #5 dist.
WT2 ♂ (m) (6 Monate)	#6 prox.
WT3 ♀ (w) (11 Monate)	#7 intermed.
WT4 ♀ (w) (11 Monate)	#8 intermed.

Gruppe B - CNTF-KO

KO1 ♀ (w) (11 Monate)	#9 intermed.
KO2 ♀ (w) (8 Monate)	#10 prox. #11 intermed. #12 distal.
KO3 ♂ (m) (8 Monate)	#13 prox.
KO4 ♀ (w) (14 Monate)	#14 intermed.

Tabelle 4: Übersicht der elektronenmikroskopisch untersuchten Präparate

In Ultradünnschnitten wurden jeweils 4 WT und 4 CNTF-KO-Tiere verglichen. Das Alter der Tiere reichte von 6 bis 14 Monaten. Einige der Tiere stammten aus dem selben Wurf, weswegen sie exakt das gleiche Alter haben. In beiden Gruppen befanden sich jeweils 3 weibliche und 1 männliche Maus. Weiterhin sind die Probennummer (#) und die Entnahmeregion (prox./intermed./dist.) angegeben.

Die Unterschiede in Sample-Zahl und Entnahmeregion resultieren aus der Notwendigkeit einer ausreichenden Gewebequalität und damit je nach Tier eingeschränkter Anzahl geeigneter Proben. Wie nachfolgend gezeigt, hatte dies jedoch keinen relevanten Einfluss auf die Untersuchungen.

Abb. 22 zeigt exemplarisch die überwiegend hohe Gewebe- und Bildqualität der ausgewerteten Aufnahmen.

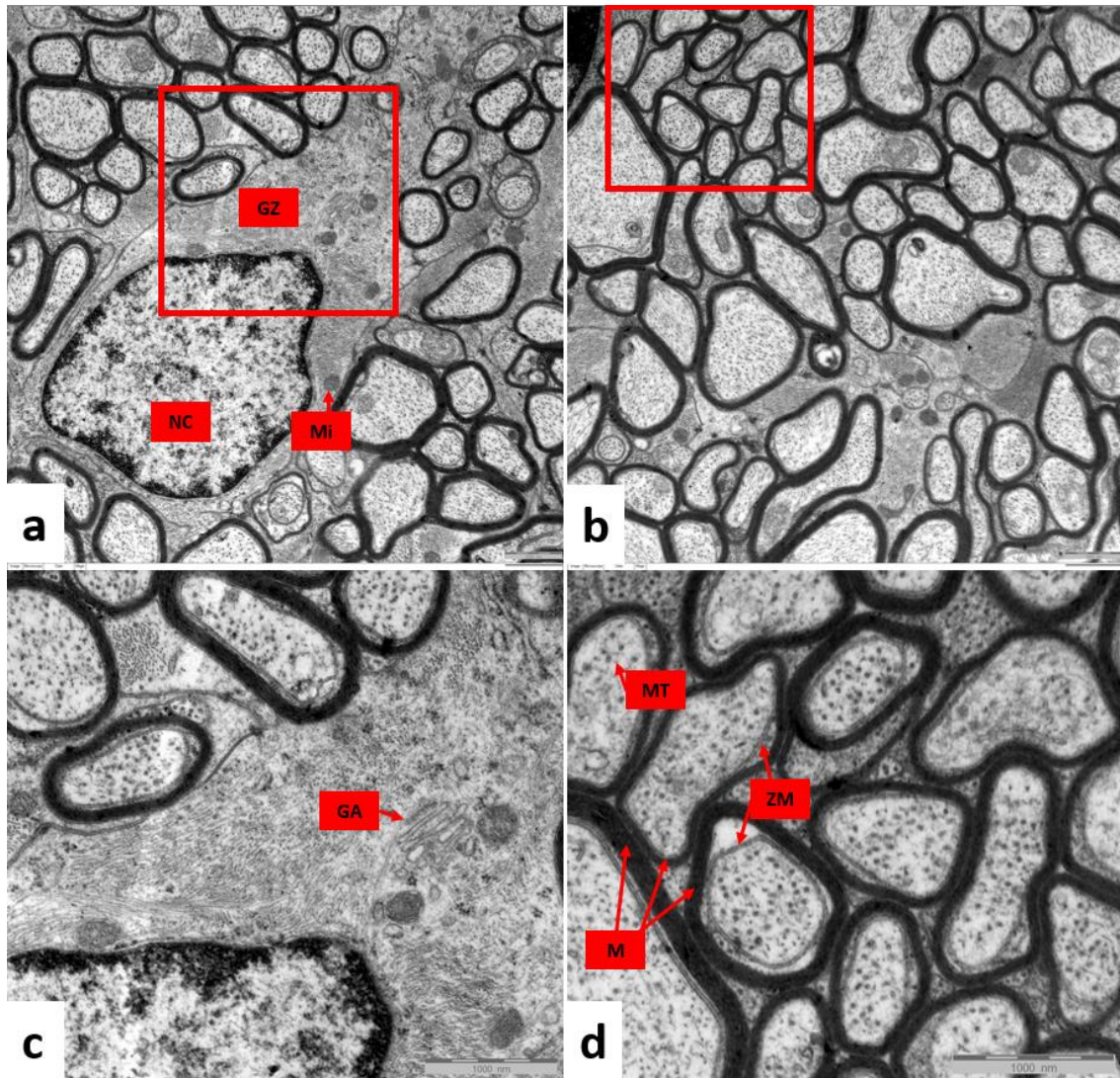


Abb. 22: Elektronenmikroskopische Aufnahme des adulten Sehnervs

a (#1) und b (#3) entstammen beide Querschnitten aus WT1 (adulte WT). c und d sind die jeweiligen vergrößerten Bildausschnitte dazu. Die Scalebar misst in allen Bildern 1000nm. In a ist der Zellkörper einer Gliazelle (GZ) mitsamt des Zellkerns (NC) zu erkennen, in welchem auch Euchromatin von Heterochromatin unterschieden werden kann. Weiterhin sind in den Bildern der Golgi-Apparat (GA), Mitochondrien (Mi), die Zellmembranen der Axone (ZM), die umgebenden Myelinscheiden (M), und selbst einzelne Mikrotubuli (Mi) zu erkennen.

Um zu untersuchen, ob sich die WT-Tiere im Myelinisierungsgrad der Axone des Sehnervs von den CNTF-KO-Tieren unterscheiden, wurde die sogenannte G-Ratio bestimmt. Die G-Ratio berechnet sich entweder aus dem Verhältnis des Axondurchmessers zum Durchmesser der kompletten myelinisierten Faser, oder aus dem Verhältnis des Umfangs des Axons zum Umfang der kompletten myelinisierten Faser. Somit ist die G-Ratio immer kleiner 1 und korreliert negativ mit der Myelindicke. Ebenso ist sie unabhängig von einer in gewissem Umfang unvermeidlichen geringen

Abweichung im Schnittlot von wenigen Grad, da sich dabei Außen- und Innumfang, bzw. Außen- und Innendurchmesser in gleichem Maße ändern und der Quotient der erhobenen Werte davon unberührt bleibt.

Da die Axone des Sehnervs im Querschnitt sehr unregelmäßig geformt sind und somit nicht der eine, exakte Durchmesser bestimmt werden kann, wurde hier die G-Ratio über den Umfang bestimmt, wie in Abb. 23 dargestellt.

$$\text{G-Ratio} = \frac{\text{Umfang des Axons}}{\text{Umfang der kompletten myelinisierten Faser.}}$$

Abb. 23: Berechnung der G-Ratio als Maß für die Myelinisierung der Axone im Sehnerv

Zu jedem der in Tabelle 4 aufgeführten Tiere wurden aus 1-5 Samples jeweils 1-3 qualitativ hochwertige Bilder ausgewählt. Gezählt wurden nur vollständig im Bild dargestellte Axone mit überwiegend intakter Myelinisierung. In Abb. 34 bis Abb. 41 sind die ausgewerteten Bilder dargestellt. Für jedes der hierbei rot markierten Axone wurden in ImageJ manuell (*Freehand selections > Measure Perimeter*) Innen- und Außenumfang der Myelinscheiden ausgemessen, in Excel-Tabellen eingetragen und die entsprechende G-Ratio berechnet.

Für jedes Tier wurde aus allen dafür ausgewerteten Axonen eine durchschnittliche G-Ratio (Funktion MITTELWERT) mit zugehöriger Standardabweichung (Funktion STABW.S) ermittelt. Aus den jeweils 4 Mittelwerten der Wildtyp und KO-Tiere wurde mittels T-Test in Microsoft Excel (Funktion TTEST) der P-Wert ermittelt. Abb. 24 und Abb. 25 fassen die Ergebnisse zusammen.

Es zeigten sich keine offensichtlichen G-Ratio-Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Die Anzahl der pro Tier untersuchten Axone, das Geschlecht der Tiere oder die untersuchte Region hatten, soweit angesichts der Sample-Zahl beurteilbar, keinen relevanten Einfluss auf die G-Ratio.

Somit lässt sich festhalten, dass CNTF-Defizienz die durchschnittliche G-Ratio als wichtigen Kennwert des Myelinisierungsgrades der Axone im Sehnerv nicht beeinflusst.

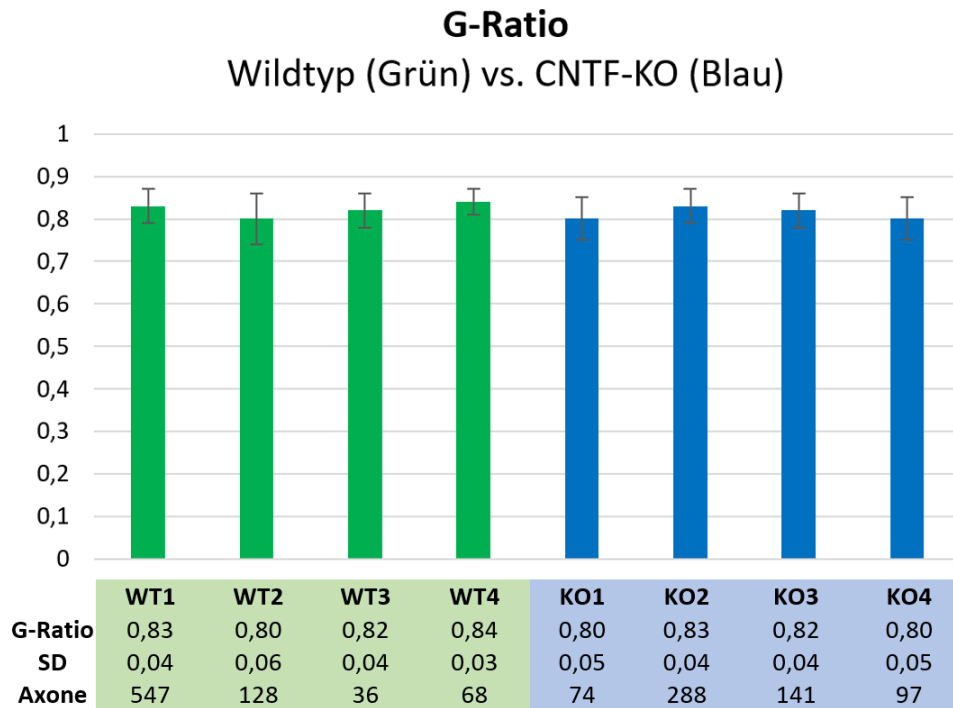


Abb. 24: Vergleich der G-Ratio zwischen allen 8 untersuchten Tieren

Insgesamt wurden der Innen- und Außenumfang von 1379 Axonen bestimmt und hiermit anschließend die durchschnittliche G-Ratio berechnet. Y-Achse: G-Ratio \pm Standardabweichung (SD). Mittelwert der G-Ratio, Standardabweichung und Anzahl der untersuchten Axone sind für jedes der 8 Tiere angegeben. Zwischen den Tieren zeigte sich kein relevanter Unterschied. Der mittels T-Test ermittelte P-Wert lag bei 0,332.

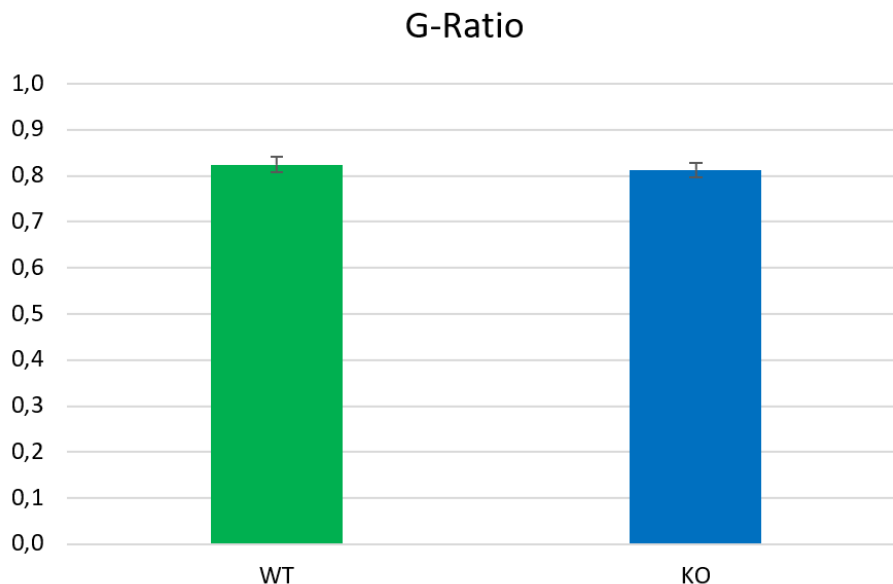


Abb. 25: Vergleich der G-Ratio zwischen der WT- und der CNTF-KO Gruppe

Y-Achse: G-Ratio. Aus den in Abb. 24 dargestellten Werte wurde die durchschnittliche G-Ratio für die Wildtyp und CNTF-KO-Gruppe mitsamt zugehöriger Standardabweichung gebildet (Mittelwert WT 0,824 (SD 0,016) vs KO 0,813 (SD 0,015). Es zeigt sich kein relevanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

3.3.3 Axonumfang in Ultradünnschnitten des Sehnervs

Neben der Myelinisierung beeinflusst auch die Dicke der Axone die Geschwindigkeit der neuronalen Reizweiterleitung erheblich. Somit liegt nahe, zu untersuchen, ob sich die Axondicke in den Sehnerven zwischen den Wildtyp- und den CNTF-Knockout-Mäusen unterscheidet.

Da, wie bereits unter 3.3.2 erwähnt, die Axone sehr unregelmäßig geformt sind, wurde der Axonumfang als repräsentatives Maß der Axondicke bestimmt.

Der bereits für die Ermittlung der G-Ratio bestimmte Axonumfang wurde mit dem bereits am Elektronenmikroskop in die Bildern integrierten Scalebar in Bezug gesetzt und somit in μm umgerechnet (Faktor näherungsweise 2,1). Erneut wurden 1379 Axone der in Tabelle 4 genannten Tiere ausgewertet.

Abb. 26 zeigt den durchschnittlichen Axonumfang und Abb. 27 den zugehörigen Median der jeweiligen Tiere. Abb. 28 vergleicht wieder beide Gruppen. Mittelwerte, Standardabweichungen und P-Wert wurden analog 3.3.2 in Microsoft Excel ermittelt.

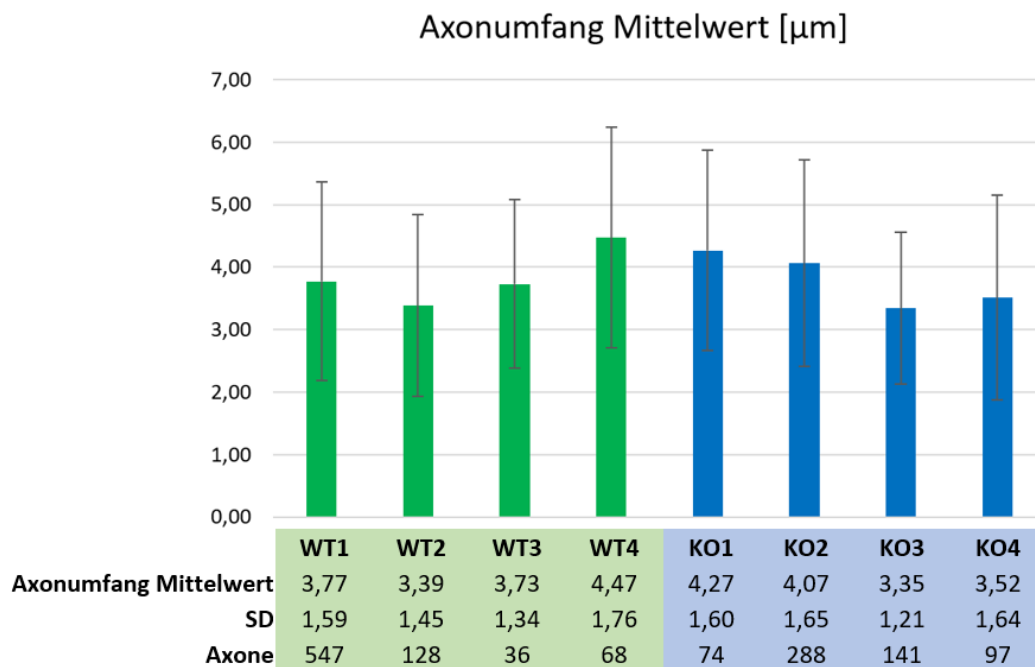


Abb. 26: Durchschnittlicher Axonumfang im Sehnerv

Die Mittelwerte des Axonumfangs zeigen eine große Varianz, sowohl innerhalb der Tiere, als auch zwischen den einzelnen Tieren. Durchschnittlicher Axonumfang, Standardabweichung und Anzahl der jeweils untersuchten Axone sind unterhalb der X-Achse angegeben. Y-Achse: Axonumfang (in μm) \pm Standardabweichung (SD). Grün: Wildtyp, Blau: CNTF-KO.

Ergebnisse

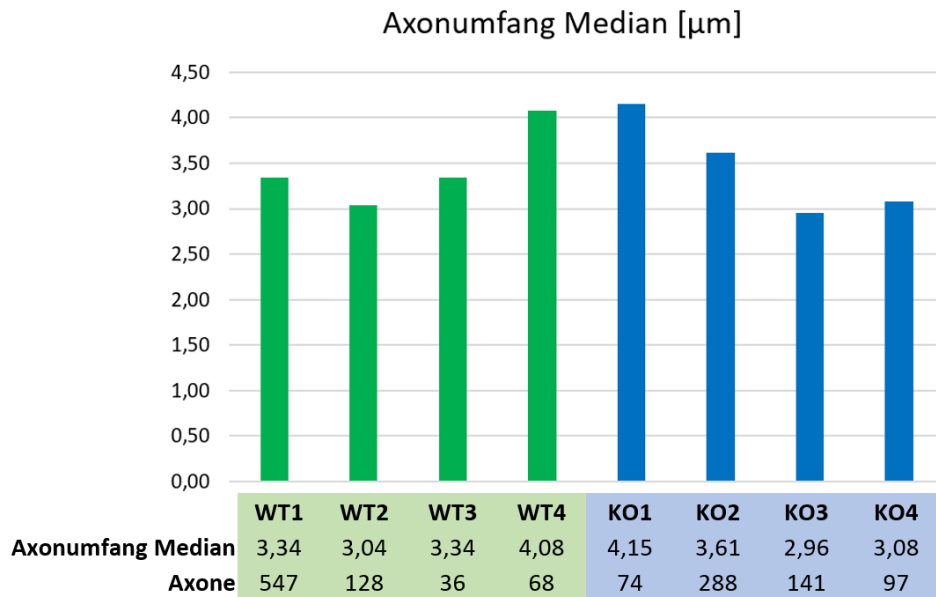


Abb. 27: Median des Umfangs der in Abb. 26 untersuchten Axone im Sehnerv

Auch die Medianwerte des Axonumfangs (X-Achse) zeigen hohe Abweichungen zwischen den einzelnen Tieren. Y-Achse: Axonumfang (in μm). Grün: Wildtyp, Blau: CNTF-KO.

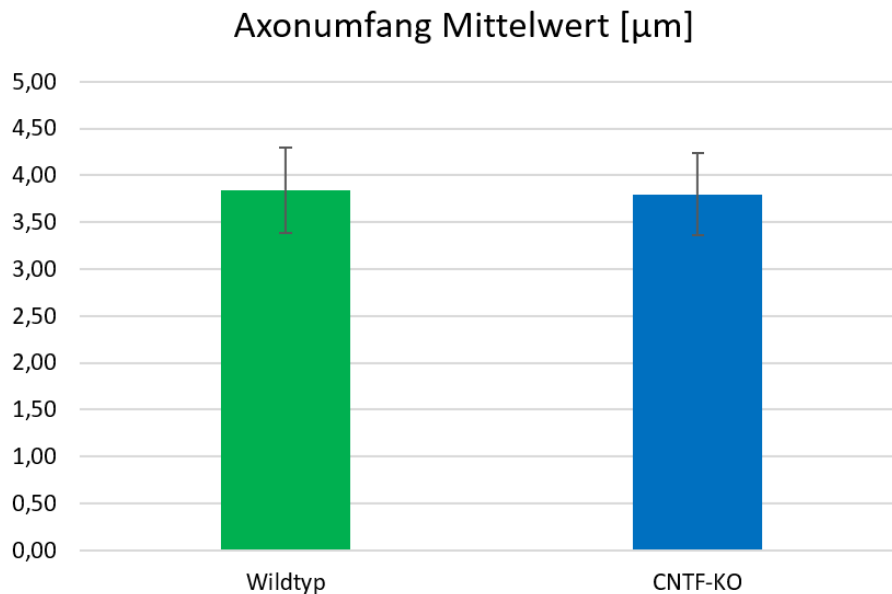


Abb. 28: Mittelwert und SD des Axonumfangs der CNTF-KO und WT-Tiere

Trotz hoher Varianzen zwischen den einzelnen Tieren unterscheiden sich die Mittelwerte des Axonumfangs der CNTF-WT-Gruppe kaum von der CNTF-KO-Gruppe. Auf der y-Achse sind die Mittelwerte (in μm) des Axonumfangs \pm SD aufgetragen. N= 4 je Gruppe. Mittelwert WT 3,84 (SD 0,46) vs KO 3,80 (SD 0,44). T-Test mit P-Wert 0,895.

Entsprechend legen die Auswertungen nahe, dass eine CNTF-Defizienz keinen relevante Auswirkung auf die Dicke der Axone in adulten Mäusen hat.

Ergebnisse

Abb. 29 und Abb. 30 geben einen Überblick über die Verteilungen des Axonumfangs innerhalb der einzelnen analysierten Querschnitte.

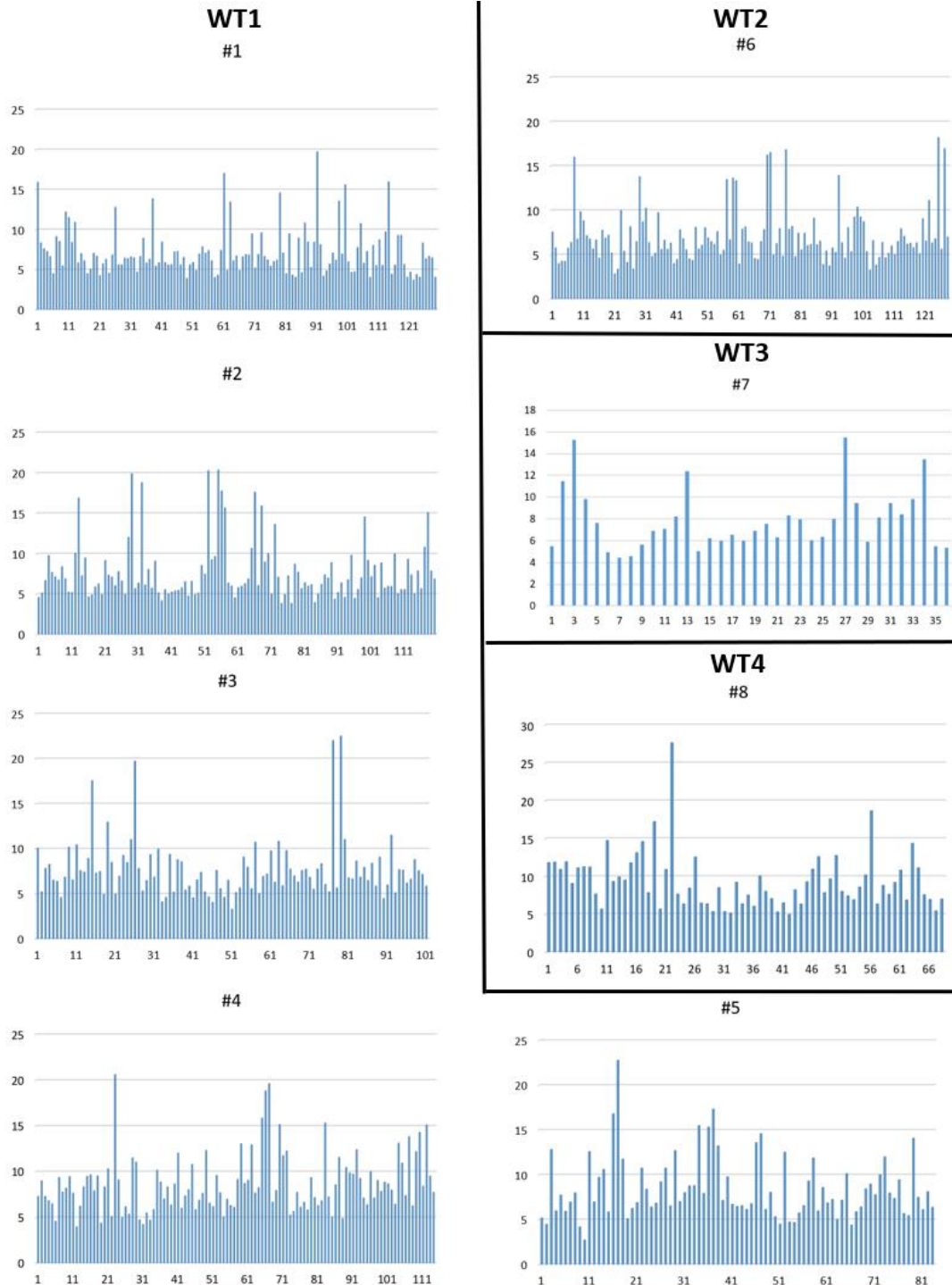


Abb. 29: Axonumfang innerhalb der Wildtyp-Samples

X-Achse: Jede Säule repräsentiert ein ausgewertetes Axon. Y-Achse: mittels ImageJ gemessener Axon-Umfang. Für die näherungsweise Umrechnung in μm ist dieser durch den Faktor 2,1 zu teilen.

Ergebnisse

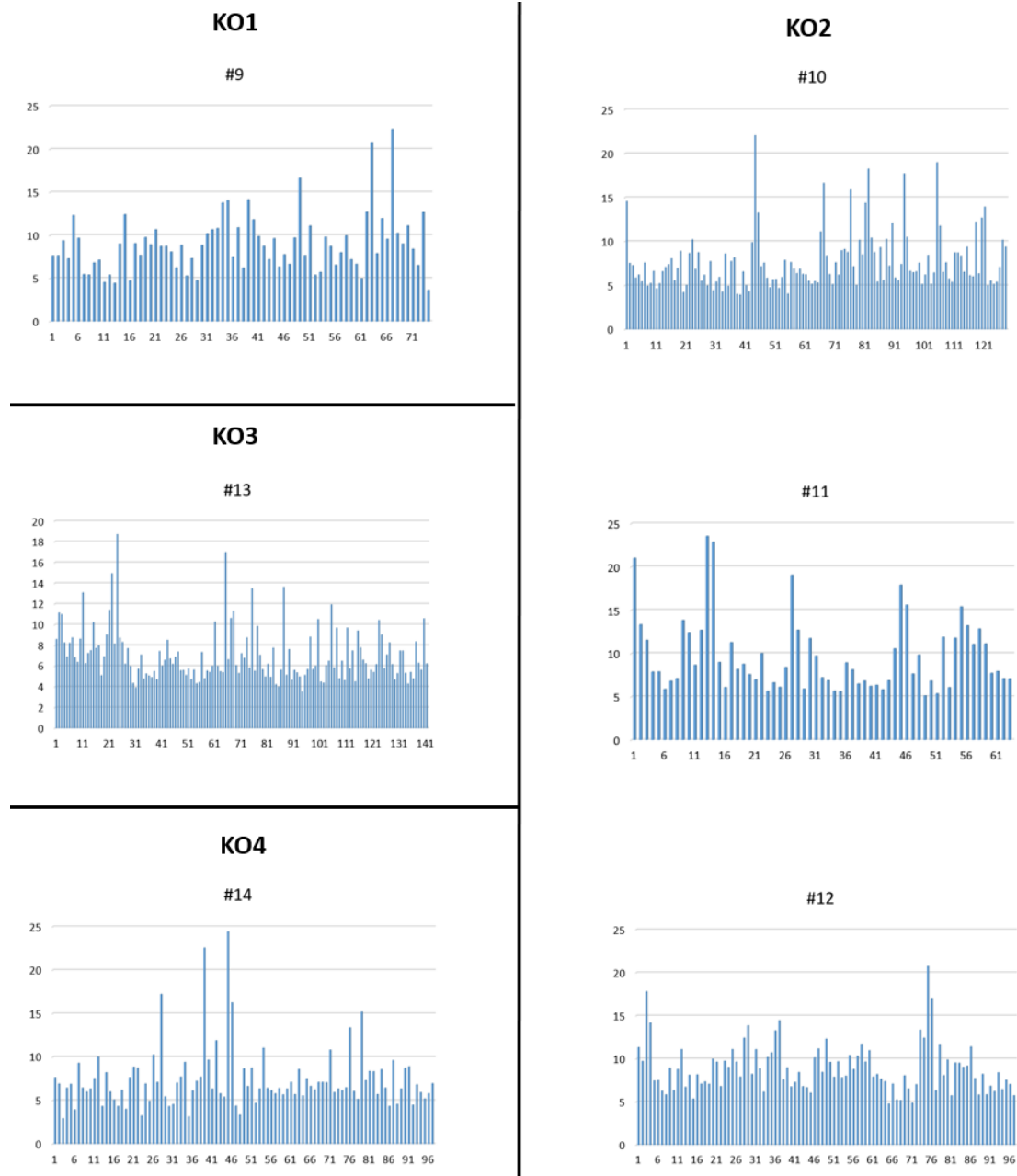


Abb. 30: Axonumfang innerhalb der CNTF-Knockout-Samples

Jede einzelne Säule entspricht dem Umfang eines Axons. Auf der X-Achse ist die Anzahl der ausgewerteten Axone aufgetragen. Teilt man den auf der Y-Achse aufgetragenen Wert (in µm) durch 2,1, so erhält man näherungsweise den Axonumfang in µm.

3.3.4 Mitochondriendichte in Ultradünnschnitten des Sehnervs

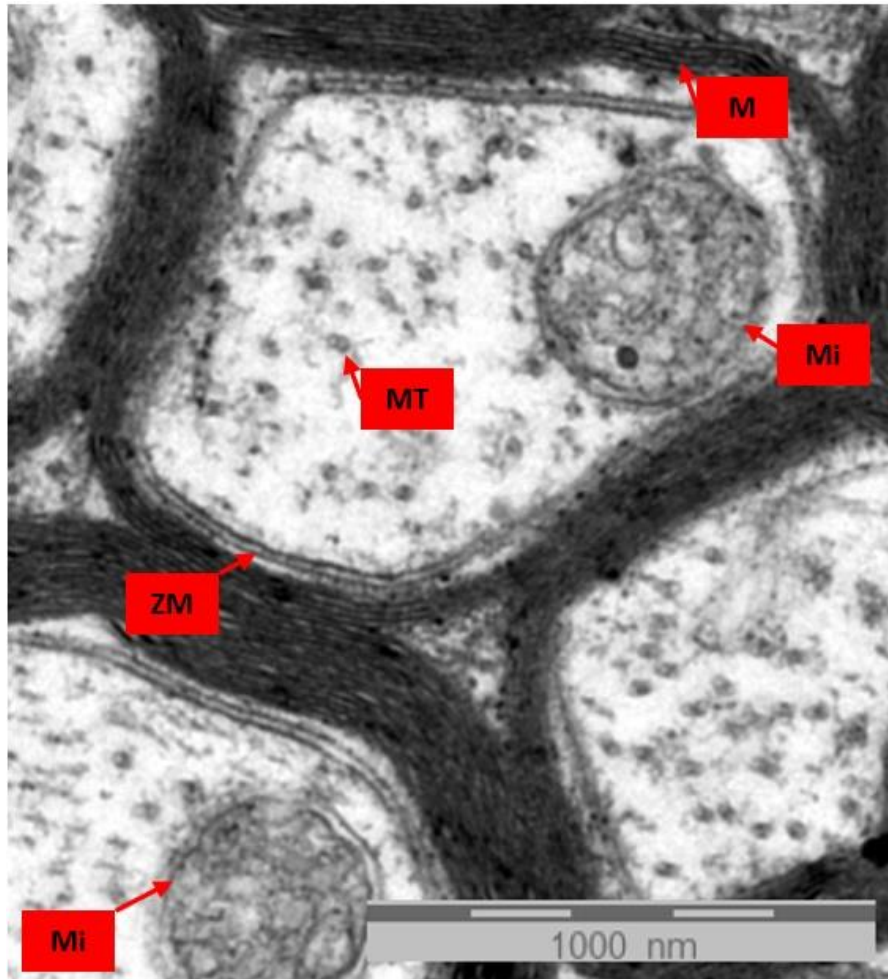


Abb. 31: Axonquerschnitt mit Mitochondrien

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Sehnerv-Querschnitts (Tier 1, CNTF-WT, Probe #3). Angesichts der guten Gewebequalität lassen sich auch einzelne Mikrotubuli (MT), Myelinschichten (M), die axonale Zellmembran (ZM) und Mitochondrien (Mi) erkennen.

Mitochondrien sind essentieller Bestandteil des Energiestoffwechsels der eukaryotischen Zelle. Um zu klären, ob eine CNTF-Defizienz die Mitochondriendichte in Axonen beeinflusst, wurde die Mitochondriendichte anhand der gewonnenen elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestimmt.

In den bereits vorangegangen bezüglich G-Ratio und Axonumfang ausgewerteten 1379 Axonen in den jeweils 4 Wildtyp- und 4 CNTF-KO-Tieren wurden insgesamt 337 Mitochondrien gezählt. Abb. 32 zeigt die durchschnittliche Mitochondrienanzahl pro Axon für jedes einzelne Tier, Abb. 33 vergleicht wieder beide Gruppen miteinander.

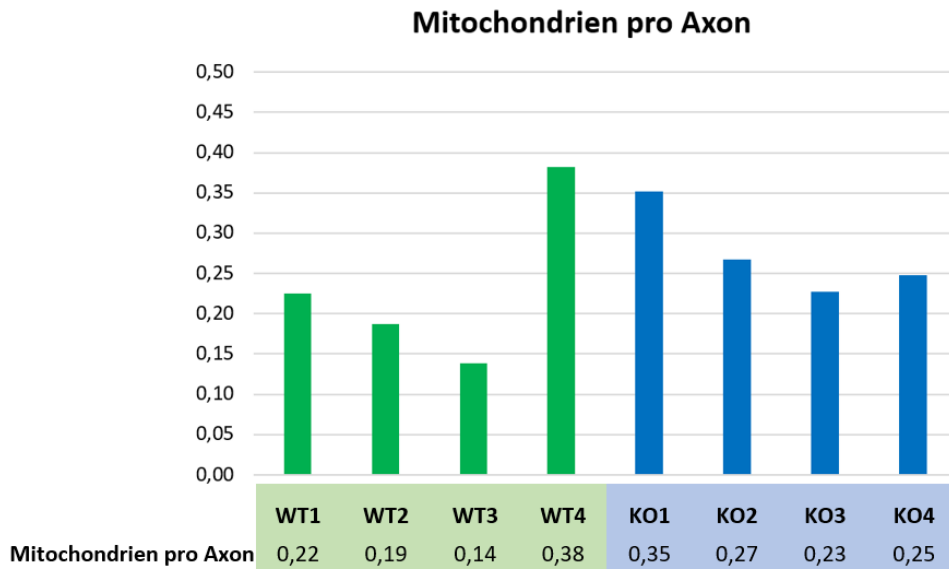


Abb. 32: Mitochondrienzahl pro Axon für die einzelnen Tiere

Y-Achse: Durchschnittliche Mitochondrienanzahl pro Axon. Die Werte zeigen von Tier zu Tier eine hohe Streuung. Grün: Wildtyp, Blau: CNTF-KO.

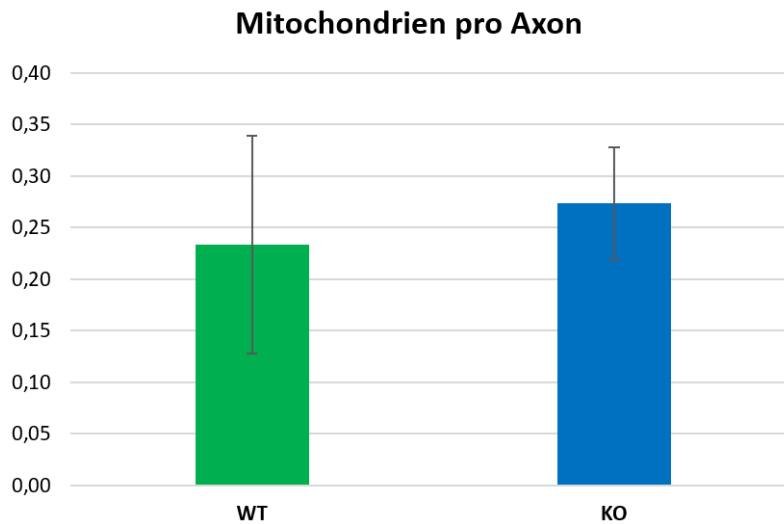


Abb. 33: Mitochondrienzahl pro Axon für die jeweiligen Gruppen

Y-Achse: durchschnittliche Mitochondrienanzahl pro Axon. Die tendenziell höhere Mitochondrienzahl zeigt sich bei einem P-Wert von 0,535 (T-Test Microsoft Excel) nicht signifikant. Mittelwert WT 0,233 (SD 0,105) vs. KO 0,273 (SD 0,055), je 4 Tiere pro Gruppe. Grün: Wildtyp. Blau: CNTF-KO.

Somit lässt sich festhalten, dass sich bezüglich der Mitochondriendichte zwischen den Wildtyp und den CNTF-defizienten Tieren keine relevanten Unterschiede finden ließen. In den Abb. 34 bis Abb. 41 sind die gemäß Tabelle 4 untersuchten Aufnahmen dargestellt. Die ausgewerteten Axone sind jeweils einzeln Rot markiert.

Ergebnisse

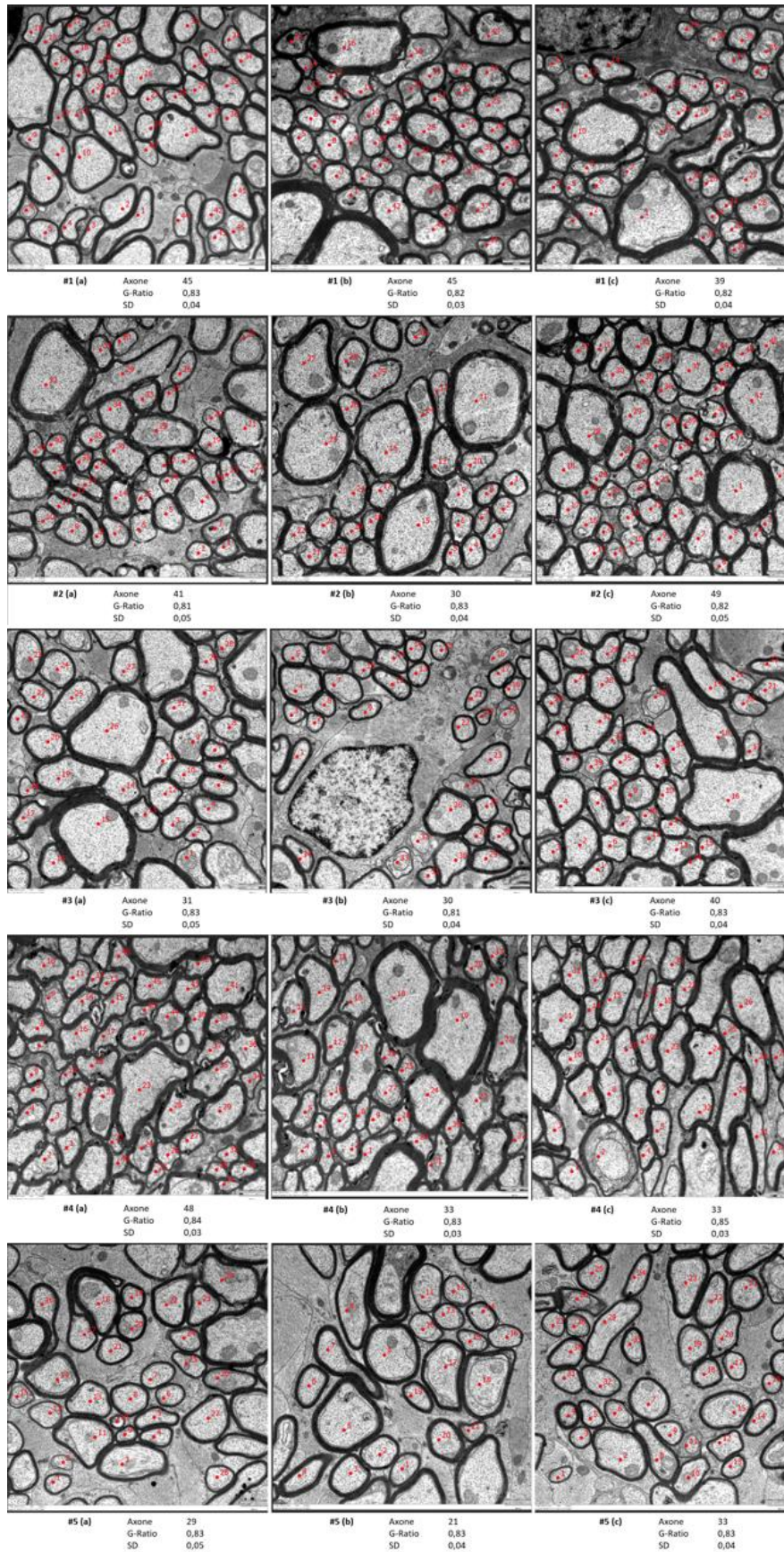


Abb. 34: WT1 (Wildtyp, ♀, 6 Monate)

Ergebnisse

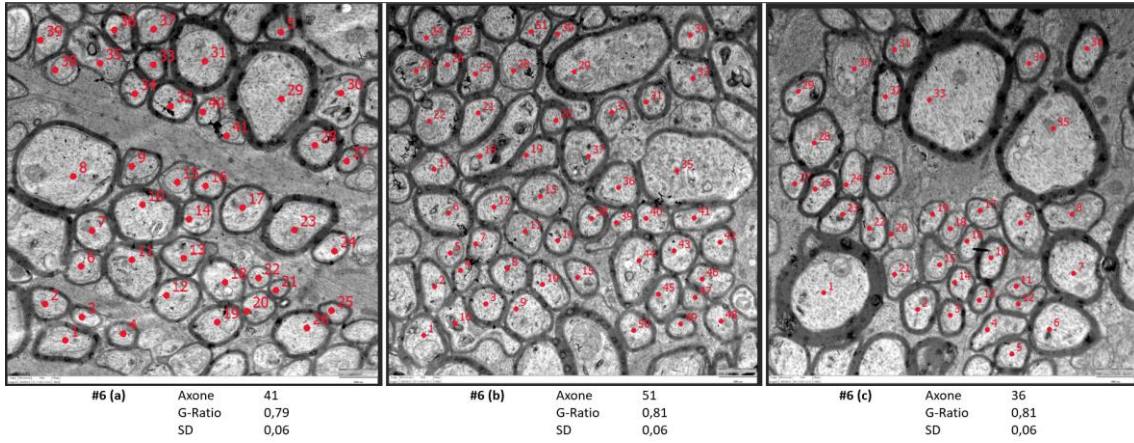
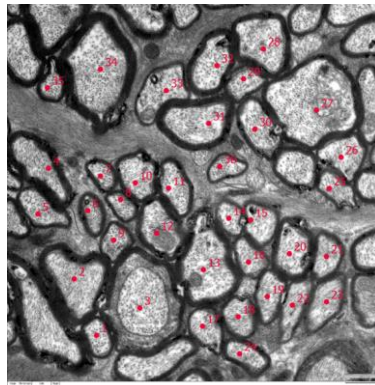


Abb. 35: WT2 (Wildtyp, ♂, 6 Monate)



Panel	Axone	G-Ratio	SD
#7 (a)	36	0,82	0,04

Abb. 36: WT3 (Wildtyp, ♀, 11 Monate)

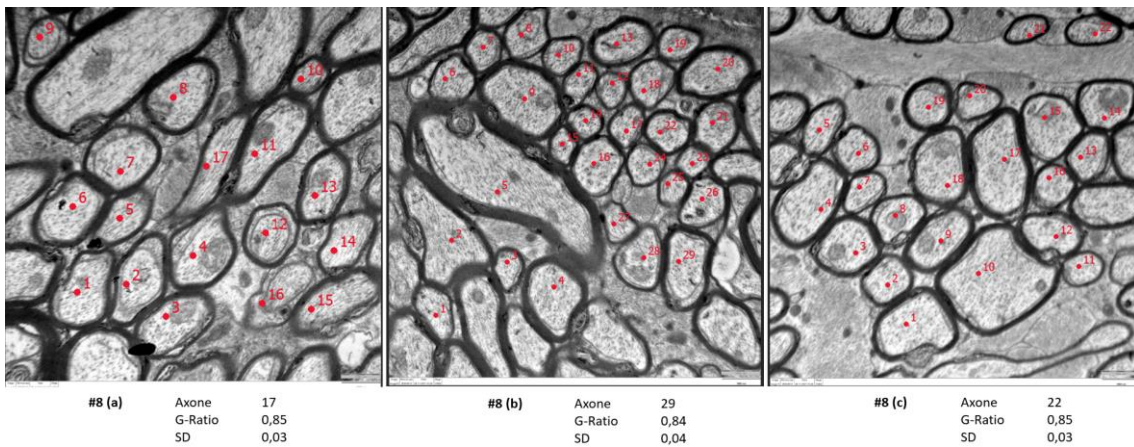
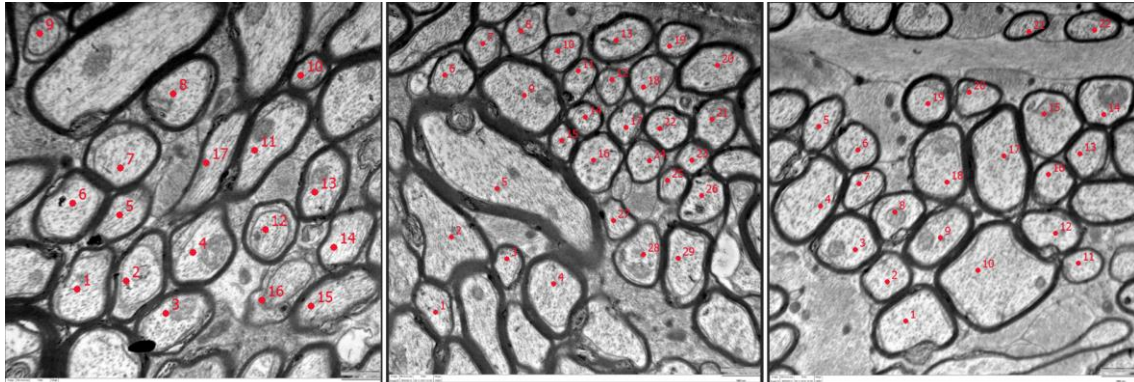


Abb. 37: WT4 (Wildtyp, ♀, 11 Monate)

Ergebnisse

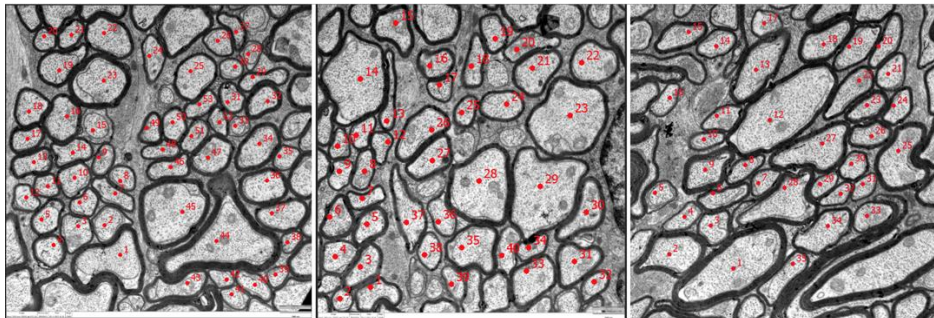


#8 (a) Axone 17
G-Ratio 0,85
SD 0,03

#8 (b) Axone 29
G-Ratio 0,84
SD 0,04

#8 (c) Axone 22
G-Ratio 0,85
SD 0,03

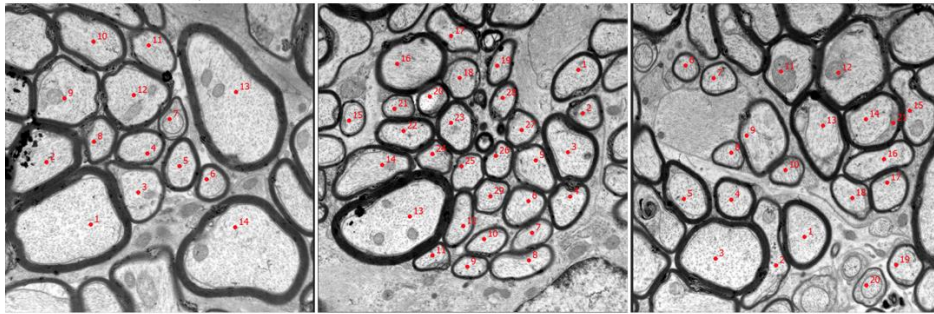
Abb. 38: KO1 (CNTF-Knockout, ♀, 11 Monate)



#10 (a) Axone 53
G-Ratio 0,82
SD 0,03

#10 (b) Axone 40
G-Ratio 0,83
SD 0,04

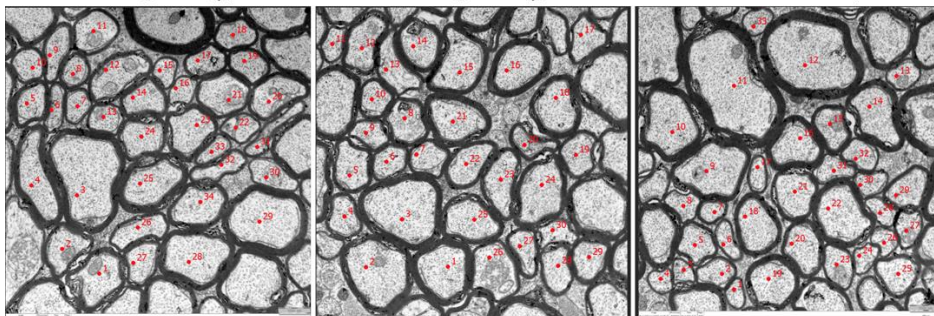
#10 (c) Axone 35
G-Ratio 0,83
SD 0,03



#11 (a) Axone 14
G-Ratio 0,83
SD 0,04

#11 (b) Axone 29
G-Ratio 0,83
SD 0,03

#11 (c) Axone 20
G-Ratio 0,85
SD 0,04



#12 (a) Axone 34
G-Ratio 0,84
SD 0,03

#12 (b) Axone 30
G-Ratio 0,82
SD 0,03

#12 (c) Axone 33
G-Ratio 0,83
SD 0,03

Abb. 39: KO2 (CNTF-Knockout, ♀, 8 Monate)

Ergebnisse

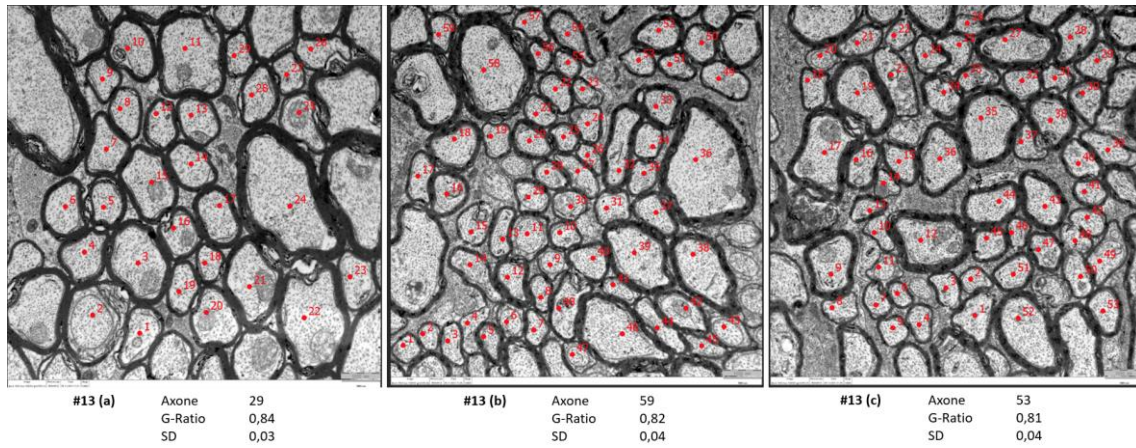


Abb. 40: KO3 (CNTF-Knockout, ♂, 8 Monate)

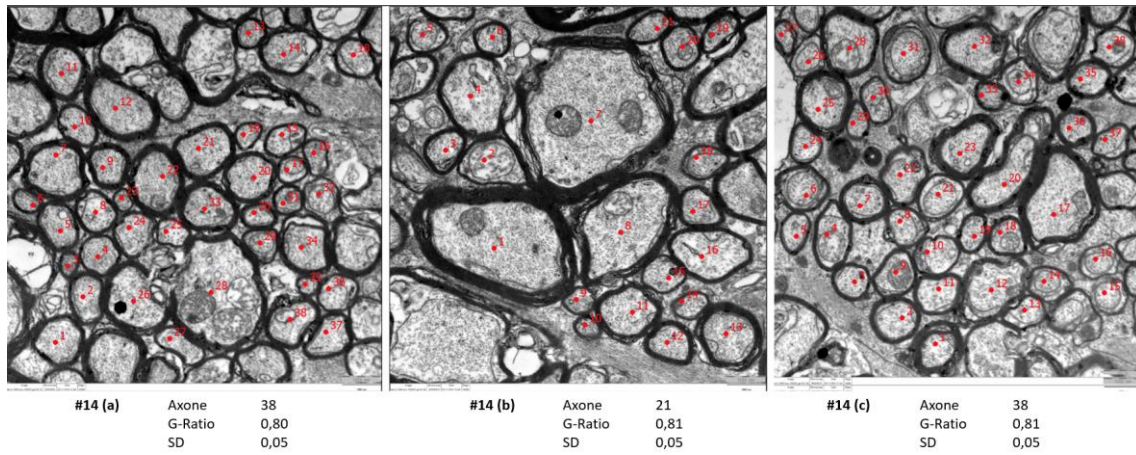


Abb. 41: KO4 (CNTF-Knockout, ♀, 14 Monate)

3.4 CNTF-Einfluss auf Alterungsprozesse in der Retina

Um zu untersuchen, ob eine CNTF-Defizienz die histologische Struktur der Retina beeinflusst, wurden 5 WT und 7 CNTF-KO-Mäuse bei einem Alter von 7-17 Monaten transkardial perfundiert und fixiert, sodass vom Bulbus Kryostat-Schnitte angefertigt werden konnten. Im Gewebequerschnitt konnte anschließend die Dicke der einzelnen retinalen Schichten als indirektes Maß für Zellzahl und morphologische Integrität vermessen werden.

3.4.1 Gewebeübersicht in Kryoschnitten der Retina

Um eine optimale Gewebequalität und dabei dennoch möglichst viele Schnitte zu erhalten, wurden Schnittstärken von 5 – 40 µm getestet. 15-20 µm erwies sich hierbei als guter Kompromiss. Eine Färbung der Zellkerne mit DAPI reichte bereits, um zusammen mit der Autofluoreszenz des Pigmentepithels einen ersten Eindruck von den Gewebeproben und eine Übersicht über die Präparate zu gewinnen. In Abb. 42 und Abb. 43 sind Schnitte durch die Sehnerv-nahe Retina in 2 adulten Wildtyp-Tieren dargestellt, wie sie am konfokalen Lasermikroskop aufgenommen wurden. Die Bilder zeigen exemplarisch die überwiegend hohe Gewebequalität- und integrität. Sie veranschaulichen jedoch auch, dass die Schnittebenen durch die nur wenige mm messenden und in Tissue-Tec eingebetteten Präparate nie exakt gleich zu reproduzieren waren. So ließen sich die Präparate beispielsweise zum Schneiden nur begrenzt ausrichten, da schon kleinster Druck zur Dissoziation der retinalen Schichten führen konnte. Auch ist gut zu erkennen, dass das Gewebe insbesondere zwischen retinalem Pigmentepithel (RPE) und äußerer Körnerschicht (ONL), sowie im Bereich der Ganglienzellschicht zur Dissoziation neigte. Neben der Schnittführung hatte auch die Perfusion und damit Fixierung großen Einfluss auf die Gewebequalität.

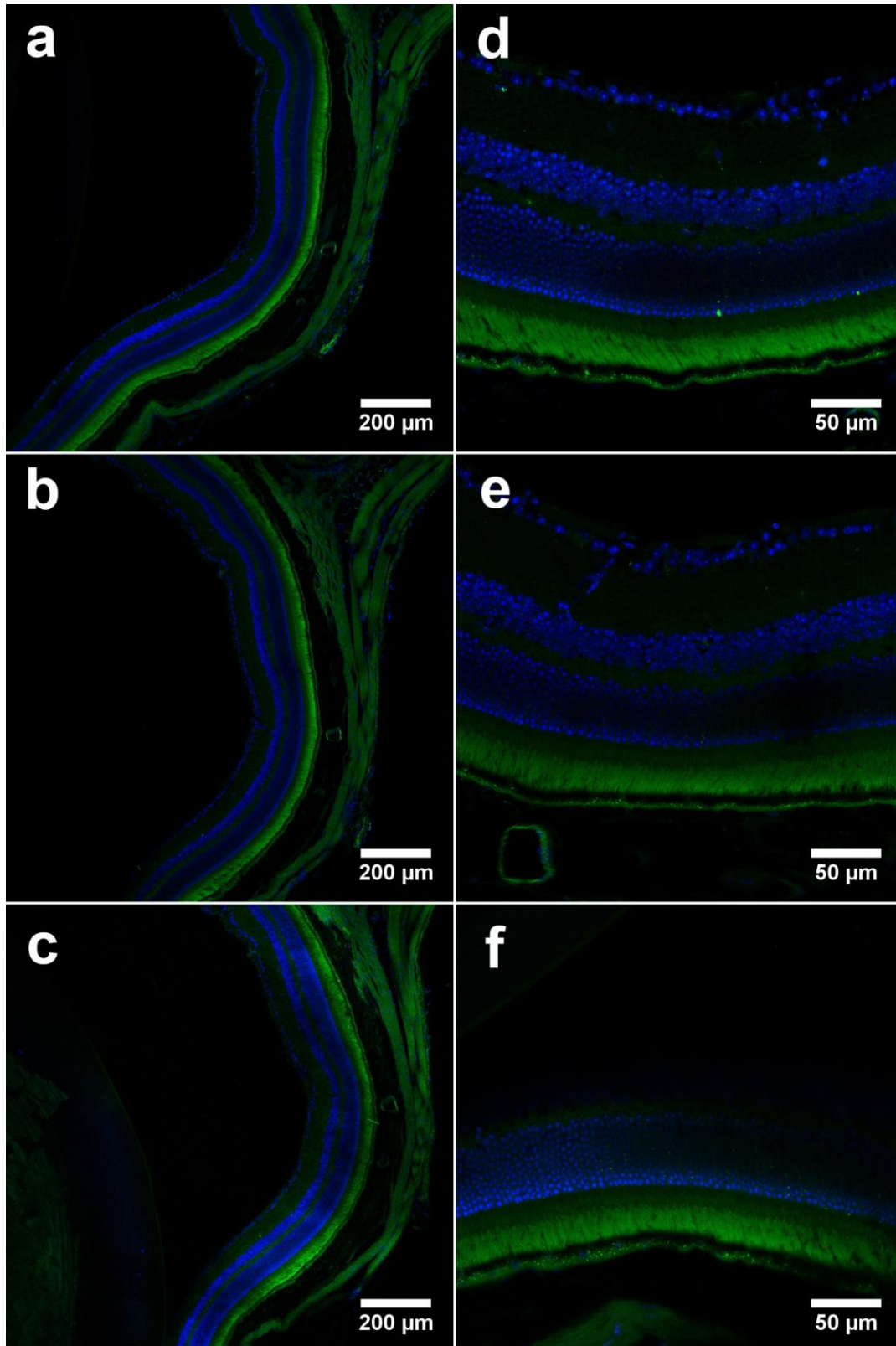


Abb. 42: Konfokale Aufnahmen der adulten Retina

3 Längsschnitte der Sehnerv-nahen Retina (links) mit jeweiliger Vergrößerungsstufe (rechts) eines 17 Monate alten CNTF-WT-Tieres (WT1) als Merge bei Anregung mit 405 und 488 nm Wellenlänge. Blau: DAPI-Färbung der Zellkerne. Grün: Eigenfluoreszenz des Pigmentepithels und in geringerem Maße des umgebenen Bindegewebes.

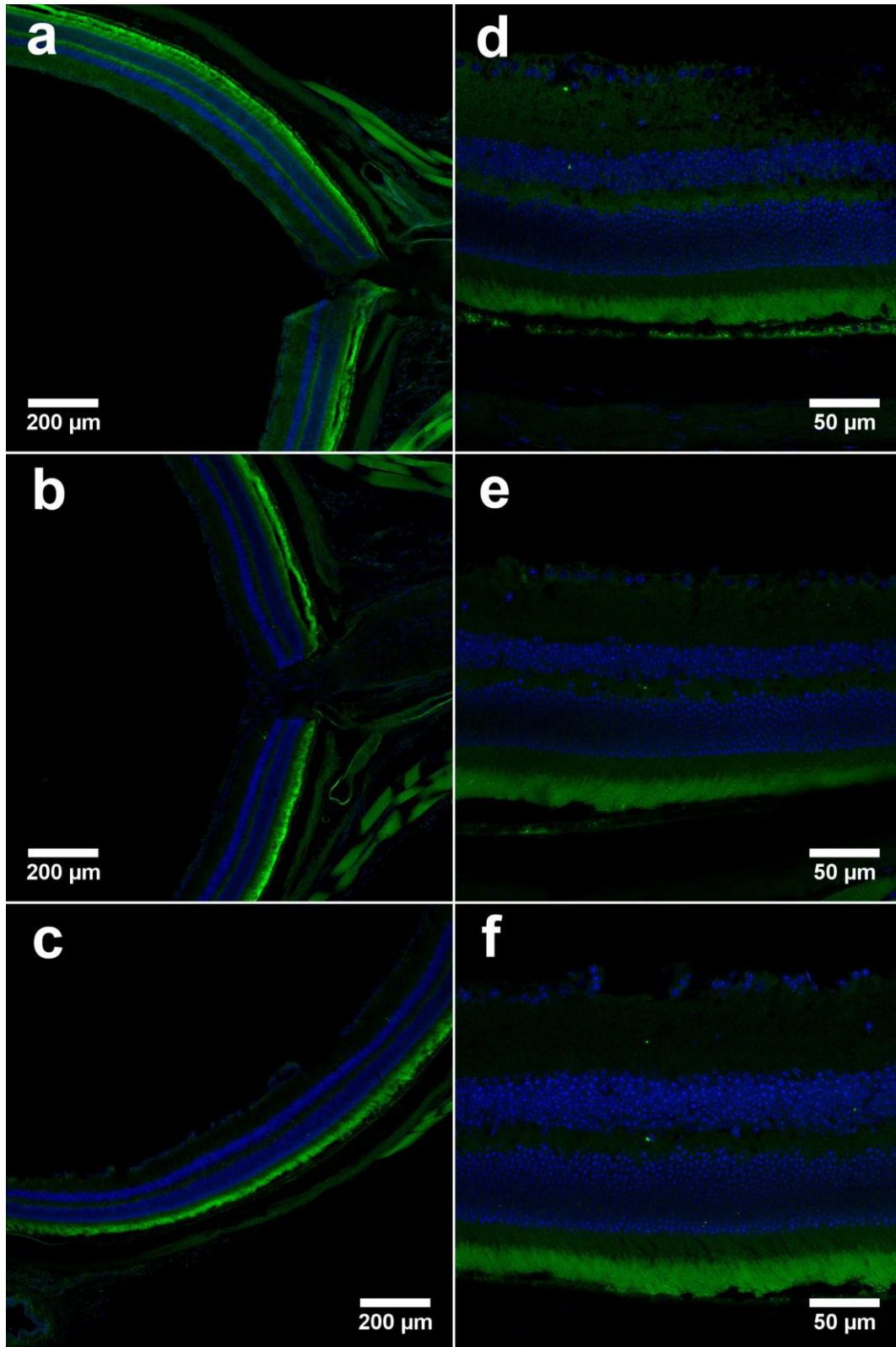


Abb. 43: Konfokale Aufnahmen der adulten Retina

3 Längsschnitte der Sehnerv-nahen Retina (links) mit jeweils zugehöriger Vergrößerungsstufe (rechts) eines 7 Monate alten CNTF-WT-Tieres (WT2) als Merge bei Anregung mit 405 nm und 488 nm Wellenlänge. Blau: DAPI-Färbung der Zellkerne. Grün: Eigenfluoreszenz des Pigmentepithels und in geringerem Maße des umgebenden Bindegewebes.

3.4.2 Schichtung der Retina

Um möglichst vergleichbare Netzhautareale zu untersuchen, wurde die Netzhaut am Mikroskop fiktiv in 3 gleich große Abschnitte A, B und C eingeteilt, wie in Abb. 44 gezeigt. Anschließend wurde möglichst nahe am Übergang von Abschnitt A zu B eine Stelle gesucht, an welcher die retinalen Schichten, von der Ganglienzellschicht bis hin zum Pigmentepithel, durchgängig intakt dargestellt waren, um dann von dieser Stelle Bilder anzufertigen und die Schichtdicken ausmessen zu können. Konnte keine einzelne Stelle gefunden werden, an welcher das Gewebe durch alle Schichten hindurch intakt war, so wurde die Messung dieser fehlenden Schicht aus einem möglichst nahe gelegenen intakten Areal ergänzt.

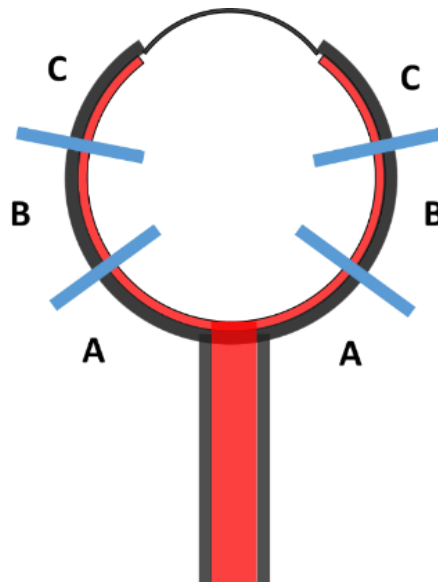


Abb. 44: Schematische Unterteilung der Retina

Um vergleichbare Regionen auszumessen, wurde die Netzhaut fiktiv in 3 gleich große Regionen A, B und C unterteilt. Die Messungen wurden, soweit es die Gewebeintegrität zuließ, möglichst nahe am Übergang von Region A zu B durchgeführt.

Im Gegensatz zur fixen nominalen Festlegung einer Messtelle, beispielsweise $X \mu\text{m}$ von der Invagination entfernt, ist die hier verwendete Festlegung der Messtelle über Verhältnisse (= Übergang Region A zu B bei 3 möglichst gleich großen Regionen A, B und C), robuster gegenüber den unvermeidlich vorhandenen, geringen Abweichungen vom senkrechten Lot bei der Schnittausführung. Selbst verhältnismäßig hohe, technisch

bedingte, Abweichungen der Schnittführung vom senkrechten Lot haben bei diesem Vorgehen einen relativ geringen Einfluss von wenigen Prozent auf die gemessenen Schichtdicken, wie in Abb. 45 dargestellt.

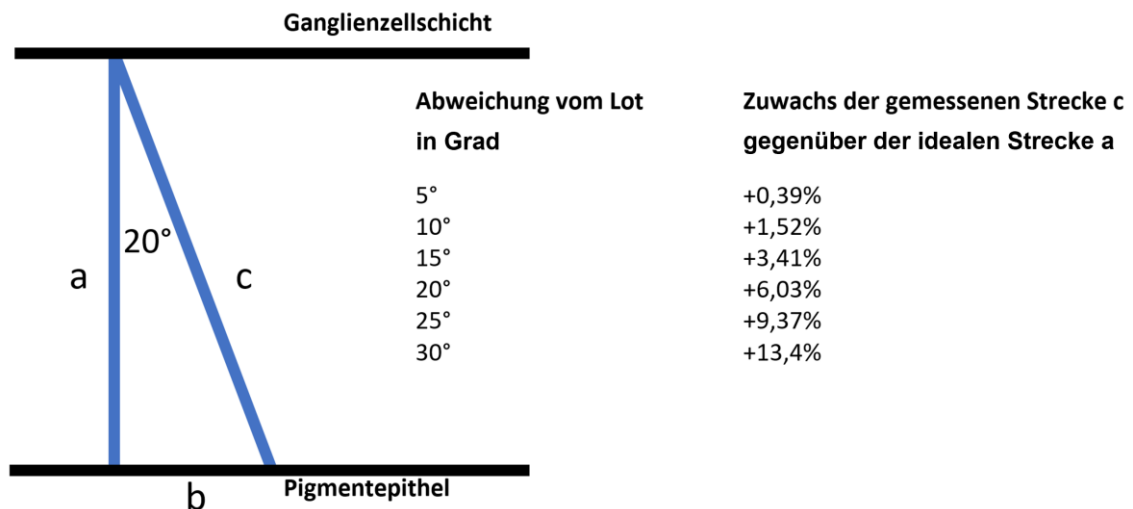


Abb. 45: Einfluss der Schnittführung auf die gemessene Schichtdicke

Trigonometrisch lässt sich das Ausmaß des Einflusses einer aus technischen Gründen vom senkrechten Lot abweichenden Schnittführung abschätzen.

In Abb. 46 sind die untersuchten Bildausschnitte aus 5 Wildtyp und 7 CNTF-Knockout-Tieren in einer Übersicht dargestellt. Bei Vergleich der Bilder miteinander zeigt sich bei trotz insgesamt guter Gewebequalität vorhandenen Unterschieden in Gewebeintegrität und Fixation die Schwierigkeit, für jedes Bild und jede einzelne Schicht eine möglichst repräsentative, intakte Messtelle auszuwählen.

In Abb. 47 ist eine Übersicht der ausgemessenen Zellschichten dargestellt. Weiterhin zeigt das Bild nach Färbung mit NfH die hierfür typischen Signale der Axone der Ganglienzellschicht und bei Färbung mit Antikörpern gegen Cholinacetyltransferase (ChAT) die entsprechenden Banden der amakrinen Zellen. In Abb. 48 werden im Transmissionsmodus des konfokalen Mikroskops aufgenommene Bilder der Netzhaut eines adulten WT- mit der eines KO-Tieres verglichen. Relevante Unterschiede in der Schichtung waren nicht zu erkennen.

Ergebnisse

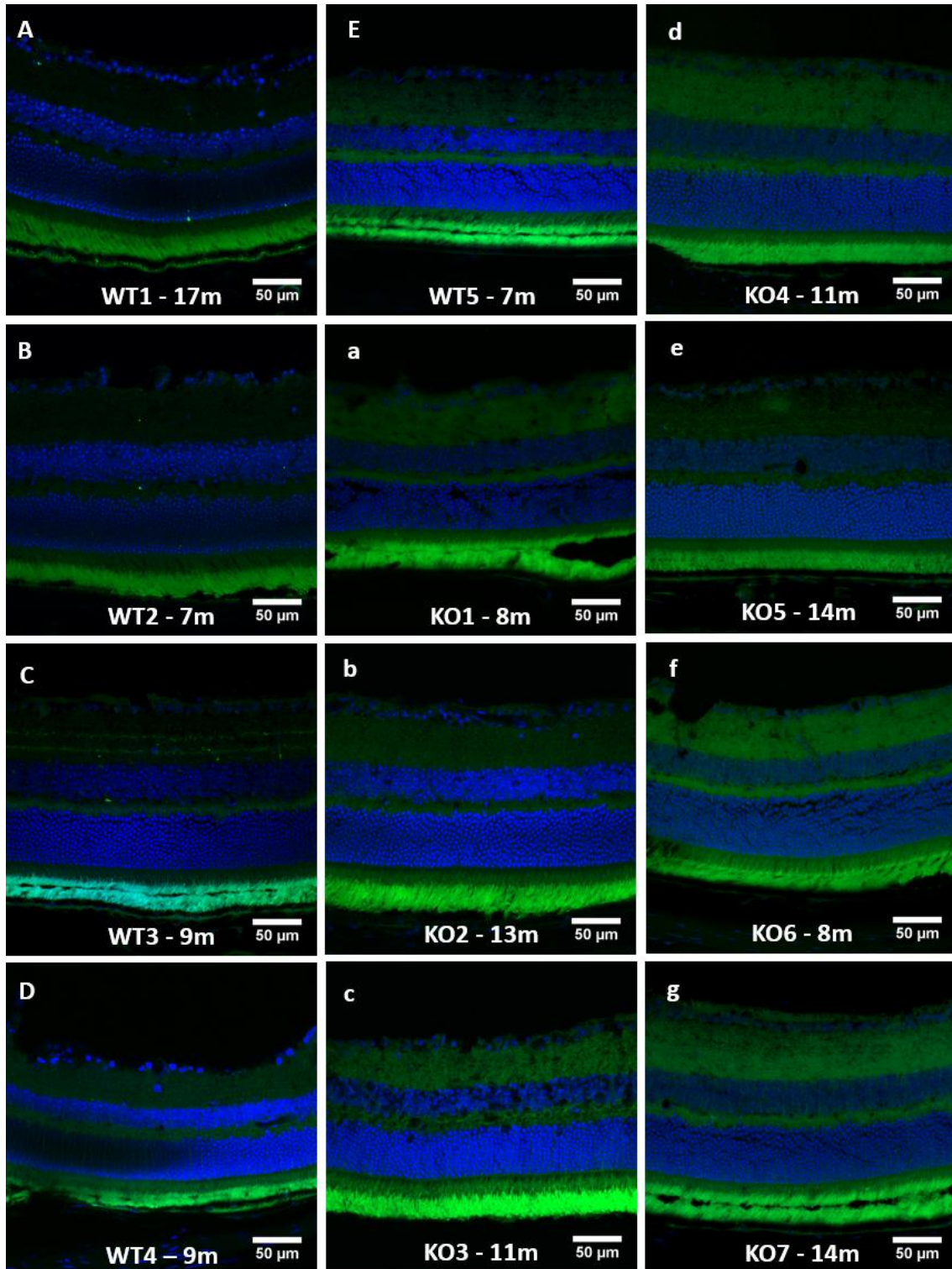


Abb. 46: Ausgewertete Netzhaut-Schnitte adulter WT und KO-Tiere

Bei A-E handelt es sich um WT-, bei a-g um KO-Tiere. Merge aus mit DAPI blau gefärbten Zellkernen bei 405 nm und grüner Autofluoreszenz insbesondere des Pigmentepithels bei 488 nm Wellenlänge. Tier-Nr. und auf volle Monate gerundetes Tieralter (m) sind im jeweiligen Bild angegeben.

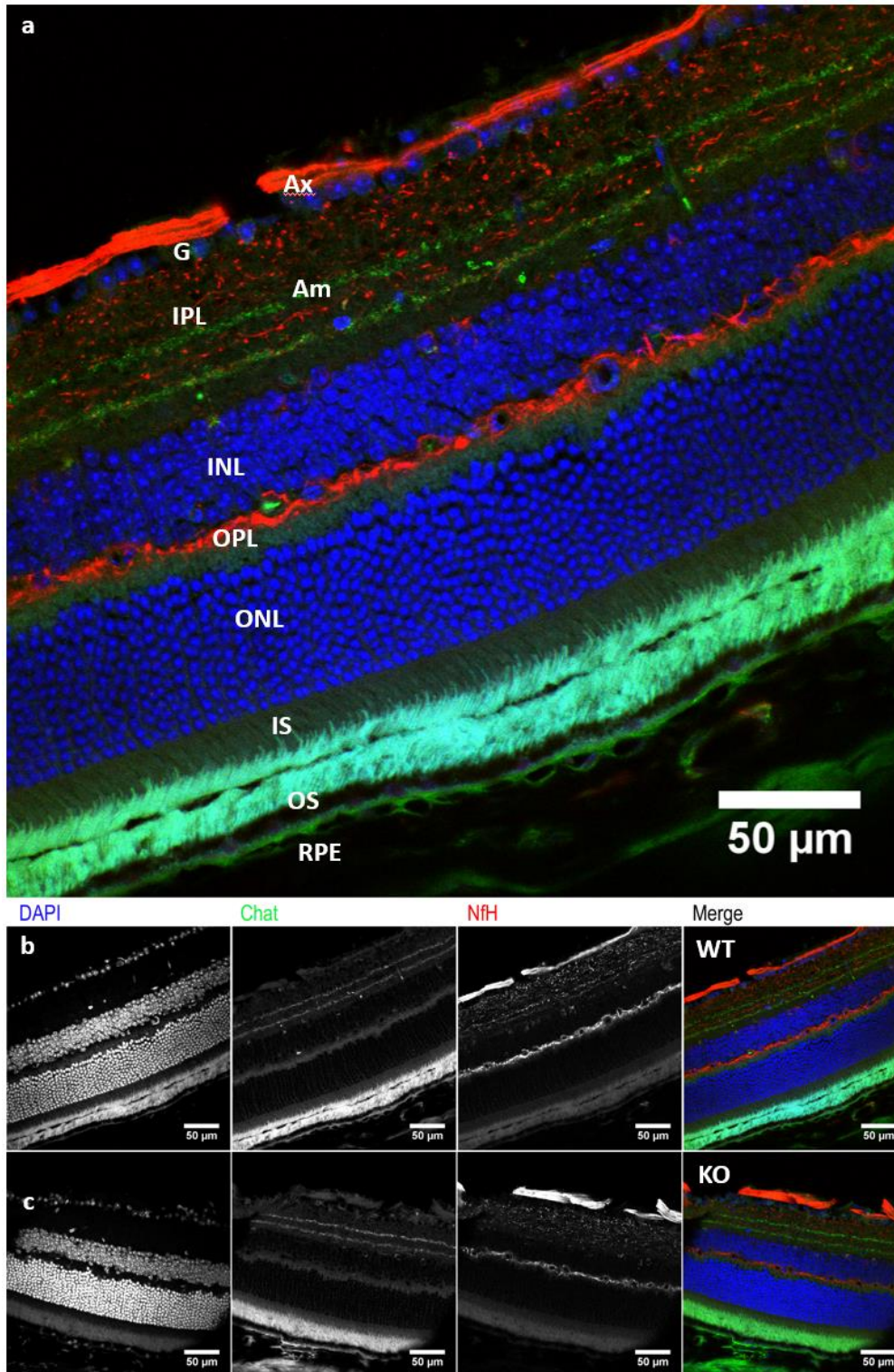


Abb. 47: Übersicht der ausgemessenen retinalen Schichtung

Konfokale Aufnahmen der Netzhaut eines adulten WT- (b, Merge vergrößert in a) und KO-Tieres (c) nach Färbung mit DAPI, Chat und NfH. RPE: retinales Pigmentepithel. OS: Outer Segment. IS: Inner Segment. ONL: Outer nuclear layer. OPL: Outer plexiform layer. INL: Inner nuclear layer. IPL: Inner plexiform layer. G: Ganglion cell layer. Ax: Axon. Am: Amacrine cells.

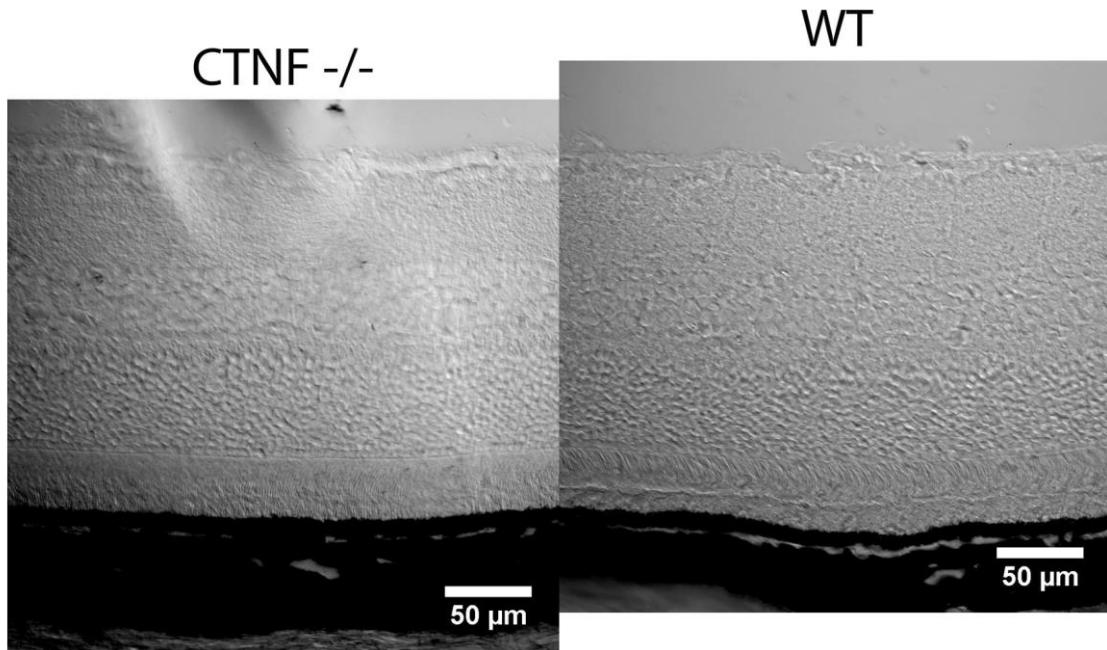


Abb. 48: Transmissionsbilder der Netzhaut adulter WT- und CNTF-KO-Tiere

Im Transmissionsmodus am konfokalen Mikroskop aufgenommene Bilder der Netzhaut eines adulten CNTF-KO und WT-Tieres. Im direkten Vergleich fallen keine relevanten Unterschiede der retinalen Schichtung auf.

Die Messergebnisse sind in Abb. 49 graphisch und in Tabelle 5 im Einzelnen für jedes Tier und jede Schicht aufgeführt. Für jede Schicht wurden in möglichst intakten Arealen der in Abb. 46 aufgeführten konfokalen Bilder zehn Einzelmessungen durchgeführt und in Microsoft Excel der Mittelwert (Funktion MITTELWERT) daraus gebildet. Mit diesen Mittelwerten wurden dann Standardabweichung (Funktion STABW.S) und P-Wert (Funktion TTEST) berechnet. Da das Gewebe am Pigmentepithel zur Dissoziation neigte, wurde die Gesamtdicke (overall thickness, OT) von Beginn des möglichst intakten OS bis knapp über die GCL-Zellkerne hinaus gemessen. Es konnte kein signifikanter Unterschied und somit kein Einfluss der CNTF-Defizienz auf die Dicke als groben histologischen Parameter der einzelnen retinalen Schichten zwischen den adulten CNTF-Wild-Typ und den CNTF-KO-Tieren nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Retinale Schichtdicken [μm]

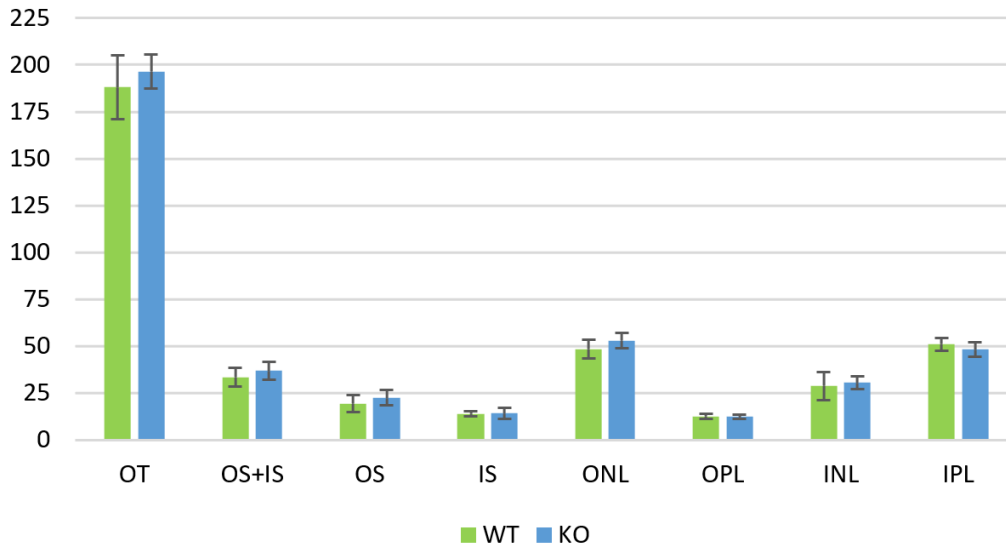


Abb. 49: Vergleich der retinalen Schichtdicken adulter WT und CNTF-KO-Tiere

An o.g. definierten Stellen wurden die Durchmesser der einzelnen retinalen Schichten in 5 WT- und 7 CNTF-KO-Tieren ausgemessen. Die resultierenden Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen sind auf der Y-Achse für jede Zellschicht (x-Achse) aufgetragen. OT = overall thickness, OS = Outer Segment, IS = Inner Segment, ONL = Outer Nuclear Layer, INL = Inner Nuclear Layer = IPL = Inner Plexiform Layer.

WT	OT	OS+IS	OS	IS	ONL	OPL	INL	IPL
WT1	185,79	34,77	20,87	14,27	47,26	12,48	25,88	47,11
WT2	209,38	34,48	18,56	15,79	53,55	14,37	39,39	51,62
WT3	200,41	37,12	22,34	14,69	52,44	13,16	33,06	51,77
WT4	166,57	24,51	11,77	12,22	40,69	11,77	19,78	55,99
WT5	178,65	36,24	22,89	12,41	47,98	10,75	25,75	48,71
Mittelwert	188,16	33,42	19,29	13,88	48,38	12,51	28,77	51,04
SD	17,05	5,10	4,52	1,53	5,09	1,37	7,57	3,40
KO	OT	OS+IS	OS	IS	ONL	OPL	INL	IPL
KO1	188,52	39,69	27,23	11,44	47,11	11,00	27,10	48,86
KO2	204,49	37,89	21,11	16,75	54,36	12,96	30,93	47,79
KO3	194,97	43,36	23,97	19,24	48,01	14,40	26,74	45,19
KO4	204,70	32,87	20,06	11,93	56,29	12,37	33,43	53,51
KO5	196,49	31,57	19,30	11,92	52,82	11,97	32,90	51,22
KO6	181,34	32,00	17,15	15,85	56,77	11,24	26,90	41,48
KO7	204,81	39,97	27,82	11,63	55,42	11,77	34,49	49,61
Mittelwert	196,47	36,76	22,38	14,11	52,97	12,24	30,36	48,24
SD	9,09	4,63	4,07	3,14	3,92	1,16	3,39	3,96
WT	OT	OS+IS	OS	IS	ONL	OPL	INL	IPL
WT	188,16	33,42	19,29	13,88	48,38	12,51	28,77	51,04
KO	OT	OS+IS	OS	IS	ONL	OPL	INL	IPL
KO	196,47	36,76	22,38	14,11	52,97	12,24	30,36	48,24
p-Value	0,36	0,28	0,26	0,87	0,13	0,74	0,68	0,22

Tabelle 5: Messwerte der retinalen Schichtdicken

Die Messwerte für jedes einzelne Tier beider Gruppen, deren Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie die zugehörigen P-Werte.

3.5 CNTF-Einfluss auf Differenzierungsprozesse des jungen Sehnervs

Um die Auswirkungen einer CNTF-Defizienz im Sehnerv weitergehend zu untersuchen, wurden Möglichkeiten gesucht, eventuelle hierdurch bedingte Verschiebungen in den Zellpopulation visualisieren zu können. Hierzu wurden über ein Dutzend Zellmarker (s. Tabelle 1) in multiplen immunhistochemischen Versuchsreihen in jungen und adulten Tieren getestet. Wie schon in Kapitel 3.1 beschrieben, stellte sich die Quantifizierung bei Oberflächen-Proteinen, fibrillären und auch zytosolischen Markern sehr schwierig dar.

3.5.1 Marker

Marker wie A2B5, Nestin, S100 β , NG2, O4, NfH und GFAP waren nicht zuverlässig untersucherunabhängig zu quantifizieren oder gar nicht erst reproduzierbar zu detektieren. Intensitätsmessungen, bei welchen mit ImageJ das Bildsignal in einem zu untersuchenden Areal aufsummiert und das Hintergrundrauschen hiervon abgezogen wurde, um als Netto-Signal ein Maß für die Marker-Intensität zu erhalten, waren ebenfalls nicht zuverlässig genug.

Kernmarker wie Olig2, Sox2 und Sox10 boten im Vergleich hierzu deutlich bessere Vergleichsmöglichkeiten. Doch auch hier war bei Auswertungen zu diskutieren, ab welcher Signalstärke ein Kern als Marker-positiv zu werten sei.

BrdU-Färbungen, bei welchen zu einem definierten Zeitpunkt einige Tage vor Perfusion und Präparation der Marker injiziert wird, funktionierten zuverlässig.

Mit Fibronectin-Antikörpern konnte die Gefäßversorgung inklusive Blut-Hirn-Schranke visualisiert werden. Abb. 50 zeigt eine kleine Auswahl der Färbungen, aus welchen sich zahlreiche Ansätze für weiterführende Experimente ergeben.

Ergebnisse

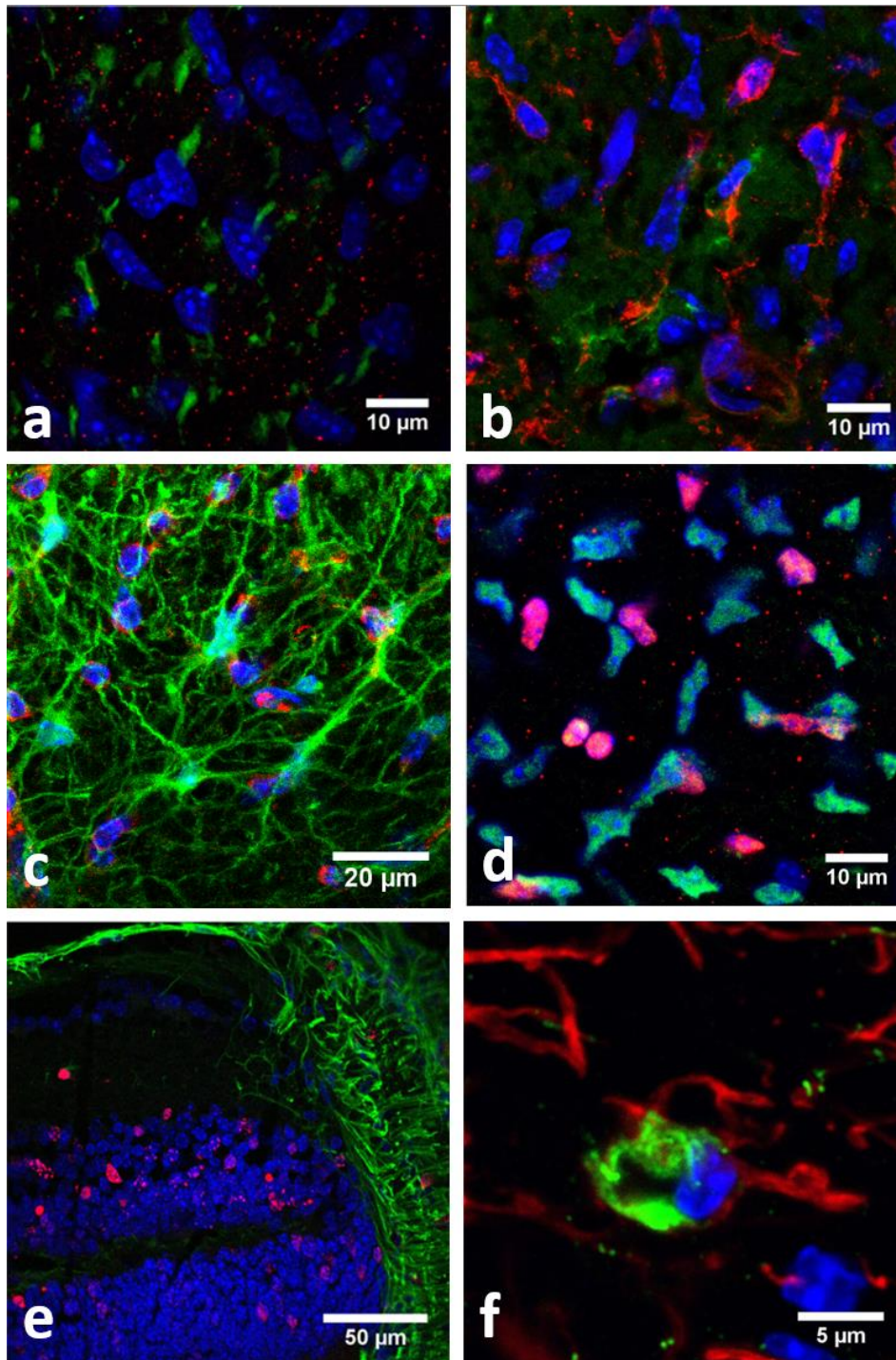


Abb. 50: Exemplarische Auswahl an untersuchten Zellmarkern im Sehnerv

- a: Blau: DAPI. Grün: O4. Rot: Olig2. Querschnitt WT-Tier, P3.
- b: Blau: DAPI. Grün: A2B5. Rot: NG2. Querschnitt WT-Tier, P4.
- c: Blau: DAPI. Grün: CNTF. Rot: GluSyn. Querschnitt WT-Tier, adult.
- d: Blau: DAPI. Grün: Sox2. Rot: Olig2. Querschnitt WT-Tier, P4.
- e: Blau: DAPI. Grün: GFAP. Rot: BrdU. Längsschnitt CNTF-KO-Tier, P10.
- f: Blau: DAPI. Grün: Fibronectin. Rot: GFAP. Querschnitt WT-Tier, adult.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Expression von CNTF im Sehnerv und der Retina untersucht, sowie die Auswirkungen einer CNTF-Defizienz auf Alterungsprozesse. Vorangegangene Arbeiten hatten gezeigt, dass der neurotrophe Faktor CNTF im zentralen Nervensystem vor allem in Astrozyten exprimiert wird (Stöckli et al., 1991). Allerdings ist die Expression in verschiedenen Bereichen des Gehirns wie der Hirnrinde und der darunter liegenden weißen Substanz, dem Corpus Callosum, dem Hippocampus, dem Hirnstamm und anderen Arealen sehr unterschiedlich. Hohe Expressionslevels für CNTF werden vor allem im Sehnerv gefunden (Stöckli et al., 1991). Im Sehnerv ist die Dichte an Astrozyten im Vergleich zu anderen Hirnarealen relativ hoch. Allerdings enthalten auch andere Areale des Gehirns, wie der Hippocampus, subkortikale Bereiche oder das Corpus Callosum eine sehr hohe Zahl an Astrozyten. In diesen Bereichen ist jedoch die Expression von CNTF relativ niedrig. Daraus kann geschlossen werden, dass CNTF nicht konstitutiv von allen Astrozyten exprimiert wird, sondern nur von einer Subpopulation. Ob diese Subpopulation von Astrozyten eine spezifische, von anderen Astrozyten funktionell unterschiedliche Subgruppe darstellt, oder ob CNTF dynamisch in Astrozyten reguliert wird, sodass die Expression zu einem Zeitpunkt nur in einer kleinen Gruppe von Astrozyten zu beobachten ist, ist bisher ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von CNTF in Astrozyten des Sehnervs klar nachgewiesen werden. Neben den Astrozyten enthält der Sehnerv auch Oligodendrozyten, sowie viele Oligodendrozyten-Vorläuferzellen. Die Zahl solcher Vorläuferzellen wird mit ca. 4% der Gesamtpopulation der Zellen im optischen Nerv angesehen (Barres & Raff, 1994; Raff, 1984). Dies ist angesichts der niedrigen Regenerationsrate von Oligodendrozyten im adulten optischen Nerv erstaunlich, sodass bereits diskutiert wurde, dass diese Oligodendrozyten-Vorläuferzellen selbst eine Funktion im Sehnerv besitzen, die über die von Vorläuferzellen als Regenerationsquelle im Fall einer Läsion hinausgeht (Fulton et al., 1991). So wurde aus der Arbeitsgruppe um Martin C. Raff gezeigt, dass solche Oligodendrozyten-Vorläuferzellen direkten Kontakt mit Axonen von retinalen Ganglienzellen aufnehmen können und Ranvier'sche Schnürringe kontaktieren (Lillien et al., 1988; Raff, 1984). Dieser Kontakt von solchen spezialisierten Gliazellen mit Ranvier'schen Schnürungen scheint spezifisch für Axone des zentralen Nervensystems zu sein und wird nicht in Axonen des peripheren Nervensystems beobachtet.

Diskussion

In Zellkultur kann die Zugabe von CNTF zu gemischten Kulturen von Gliazellen massiv die Differenzierung beeinflussen. In Kulturen von glialen Vorläuferzellen, die aus dem Sehnerv von perinatalen Ratten isoliert wurden, induziert die Zugabe von CNTF die Expression von GFAP in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Hughes et al., 1988). Solche nicht-myelinisierenden Vorläuferzellen, die GFAP exprimieren, scheinen identisch zu sein mit den Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, die Ranvier'sche Schnürknoten kontaktieren. Auf Grundlage dieser Befunde wäre zu erwarten, dass das Fehlen von CNTF zu einer Reduktion solcher nicht myelinisierenden Oligodendrozyten führt, die den Ranvier'schen Schnürring kontaktieren, und so auch zu Funktionsverlusten in Axonen von retinalen Ganglienzellen.

Während der Entwicklung benötigen nicht nur Nervenzellen Überlebenssignale von anderen Zelltypen, sondern auch Oligodendrozyten. Isolierte Oligodendrozyten in Zellkultur, die von frühen postnatalen Sehnerven der Ratte oder Maus isoliert werden, überleben nur schlecht in Zellkultur (Barres, Schmid, et al., 1993). Allerdings kann die Zugabe von Faktoren wie CNTF das Überleben massiv erhöhen. Darüber hinaus stimulieren die Faktoren CNTF und NT-3 auch die Mitose von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Barres, Schmid, et al., 1993). Die Arbeitsgruppe von Ben Barres hat 1993 Veränderungen im optischen Nerv nach Zugabe von CNTF untersucht. In den ersten 2 Wochen nach der Geburt findet man im optischen Nerv viele apoptotische Zellen. Bei diesen Zellen handelt es sich um Oligodendrozyten, die kurz nach der finalen Mitose durch aktive Zelltodprozesse eliminiert werden. Diese Elimination kann durch Zugabe von Wachstumsfaktoren wie exogenem Platelet Derived Growth Factor (PDGF) inhibiert werden (Barres, Schmid, et al., 1993; Raff et al., 1993). Wenn CNTF am vierten Tag nach der Geburt durch die Implantation von CNTF-exprimierenden Zellen zugegeben wird, also zu einem Zeitpunkt, wenn die endogene Expression von CNTF noch sehr gering ist, kann so der natürliche Zelltod von Oligodendrozyten um 80% reduziert werden (Barres, Schmid, et al., 1993). Daraus resultiert die Frage, ob auch zu späteren Stadien als der ersten postnatalen Woche CNTF einen Einfluss auf Oligodendrozyten und die Myelinisierung des optischen Nervs hat.

Meine Arbeiten zeigen, dass die Myelinisierung des Sehnervs auch bei 6-14 Monate alten Tieren im Vergleich zu Wildtypkontrollen unverändert ist. Die G-Ratio ist gleich, auch die Mitochondriendichte ist selbst im höheren Alter in Axonen bei CNTF-Knockout-Tieren unverändert. Dies entspricht dem Befund eines relativ milden Phänotyps bei

CNTF-Knockout-Mäusen (Masu et al., 1993) und der Beobachtung, dass bei Menschen mit einem homozygoten Polymorphismus im CNTF-Gen, der zu einem funktionellen Knockout führt, keine relevanten Beeinträchtigungen des Sehvermögens beobachtet wurden (Takahashi et al., 1994). Auch vorangegangene Untersuchungen zeigten unter Kontrollbedingungen keine Unterschiede bezüglich der Zahl von degenerierenden Oligodendrozyten in 2 Wochen alten Ratten. Allerdings fand sich bei CNTF-Knockout-Tieren eine deutliche Reduktion der Anzahl von Mitosen von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in den ersten 2 Wochen nach der Geburt (Barres et al., 1996). Während in Schnitten von Wildtyp-Tieren im Sehnerv von 14 Tage alten Mäusen im Durchschnitt 6 mitotische Zellen beobachtet wurden, waren es bei CNTF-Knockout-Tieren weniger als 2. Interessanterweise schien dieser Phänotyp kompensiert durch eine reduzierte Zelltodrate von Oligodendrozyten zum Zeitpunkt 2 Wochen nach der Geburt (Barres et al., 1996). Diese Daten zeigen, dass CNTF eine wichtige Funktion für die Mitose von Oligodendrozyten hat, dass jedoch die reduzierte Generierung von Oligodendrozyten durch einen reduzierten physiologischen Zelltod in der zweiten postnatalen Woche ausgeglichen wird, sodass dann am Schluss eine gleiche Zahl dieser myelinisierten Gliazellen im Sehnerv erreicht wird. Dies erklärt, warum bei CNTF-Knockout-Mäusen und auch bei Menschen mit CNTF-Defizienz keine Ausfälle im Sehvermögen zu beobachten sind.

Diese verringerte Generationsrate von Oligodendrozyten könnte jedoch langfristig auf Regenerations- und Alterungsprozesse Einfluss haben. Tatsächlich wurde bei CNTF-defizienten Individuen festgestellt, dass sie im Falle einer Erkrankung an Amyotropher Lateralsklerose und an Multipler Sklerose deutlich früher erkranken und schwerere Krankheitssymptome zeigen (Giess, Mäurer, et al., 2002). Auch in Tiermodellen und Patienten mit einer familiären Form der ALS (Giess, Holtmann, et al., 2002), sowie einem EAE-Tiermodell für die Multiple Sklerose (Linker et al., 2002) fand man schwerere Läsionen und schwerere Erkrankungen mit früherem Beginn. So hatten wir vermutet, dass auch im Alterungsprozess Veränderungen in der Zahl an Oligodendrozyten, möglicherweise der Dicke der Myelinisierung und eventuell auch der Zahl an Axonen im Sehnerv zu finden sind. Unsere Untersuchungen auf lichtmikroskopischer Ebene konnten jedoch keine sichtbaren Unterschiede zeigen. Auch in der elektronenmikroskopischen Analyse von 4 Wildtyp- und 4 Knockout-Tieren zeigte sich kein wesentlicher Unterschied der G-Ratio, einem Maß für die Myelinisierung, sowie der Mitochondriendichte in Axonen. Allerdings sind die Daten präliminär, da nur jeweils 4

Tiere pro Gruppe untersucht wurden, die sich sowohl in Bezug auf Geschlecht und Alter erheblich unterschieden (Tabelle 4). Zukünftige Untersuchungen mit höheren Tierzahlen sind notwendig, um die Anzahl der Axone, die Zahl der Oligodendrozyten und Veränderungen an Axonen bei CNTF-defizienten Mausmodellen und Patienten abzuklären und mögliche Veränderungen an nicht-myelinisierenden Oligodendrozyten und Störungen bei der Remyelinisierung zeigen zu können. Interessant wären auch Untersuchungen, wie sich das Fehlen von CNTF bei Erkrankungen der Netzhaut, die auch retinale Ganglienzellen betreffen, auswirken kann.

Eine wichtige Erkrankung, die retinale Ganglienzellen direkt in Mitleidenschaft zieht, ist das Glaukom. Tatsächlich hat die Behandlung von CNTF in einem Rattenmodell für das Glaukom einen starken neuroprotektiven Effekt (Pease et al., 2009). Untersuchungen an Patienten mit primärem offenem Winkelglaukom und altersbedingtem Katarakt zeigten, dass die CNTF-Konzentration bei beiden Erkrankungen reduziert ist, besonders bei solchen mit einem schweren Gesichtsfeldverlust. Die CNTF-Konzentration zeigte eine starke Korrelation mit der Schwere dieser Erkrankungen und legte nahe, dass das Fehlen von CNTF bei solchen Erkrankungen direkte Auswirkungen hat (Shpak et al., 2017). Aufgrund dieser Daten wird seit langem diskutiert, ob eine Zugabe von CNTF retinale Ganglienzellen nach Schädigung beim Glaukom erhalten könnte. Diese Untersuchungen sind jedoch bisher über ein frühes experimentelles Stadium nicht hinausgegangen (Kauper et al., 2012). Jedoch geben auch diese klinischen Untersuchungen keinen Hinweis darauf, ob ein potenzieller protektiver Effekt von CNTF primär die Oligodendrozyten des Sehnervs oder direkt die retinalen Ganglienzellen beeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit haben wir auch Veränderungen an der Retina von CNTF-Knockout-Mäusen untersucht. Astrozyten der Retina wandern während der Embryonalentwicklung aus dem optischen Nerv in die Retina ein (Watanabe & Raff, 1988). Insofern war es für uns interessant, ob auch retinale Astrozyten CNTF exprimieren. Jedoch konnten diese Untersuchungen aus technischen Gründen nicht zu einem konkreten Ergebnis gebracht werden. Aufgrund von technischen Schwierigkeiten war es nicht möglich, die Expression von CNTF in Müller-Gliazellen und Zellen des Pigmentepithels nachzuweisen. Zudem war die Expression von CNTF in Astrozyten der Retina sowie Pigmentepithelzellen bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt worden (Ju et al., 1999; Li et al., 2011; Walsh et al., 2001). Die Untersuchung der Retina mittels

konfokaler Laser-Mikroskopie bei Wildtyp- und CNTF-defizienten Mäusen zeigte bei meinen Untersuchungen keinen Unterschied in Bezug auf Dicke und Zelldichte in unterschiedlichen Schichten der Retina. Das entsprach der Beobachtung, dass weder CNTF-Knockout-Mäuse, noch CNTF-defiziente Menschen klinisch relevante Defizite im Sehvermögen zeigen. Allerdings ist es möglich, dass das Fehlen von CNTF zu Veränderungen vor allem in den Photorezeptoren führt. CNTF wird sowohl in Pigmentepithelzellen und in Müller-Glia-Zellen exprimiert und scheint einen Effekt bei der Resorption der distalen Segmente von Photorezeptoren zu haben (Wen, Tao, Luo, et al., 2012). Darüber hinaus wurde berichtet, dass die CNTF-Expression in Müller-Glia und Pigmentepithelzellen nach druckinduzierter Ischämie der Retina hochreguliert ist, was vor allem im Zusammenhang mit der Glaukom Pathologie von Relevanz ist (Ju et al., 1999). CNTF hat auch Effekte auf die Resorption im retinalen Pigmentepithel (Li et al., 2011) und die CNTF Expression ist nach lichtinduzierter Schädigung in Albino-Ratten sowohl in Müller-Zellen, als auch in Pigmentepithelzellen deutlich hochreguliert (Walsh et al., 2001). So wäre zu erwarten, dass die Ultrastruktur und Funktionalität von Photorezeptoren bei alternden CNTF-Knockout-Mäusen verändert sind. Möglicherweise sind dafür aber tiefgreifendere histopathologische und zellbiologische Untersuchungen notwendig, als sie in der vorliegenden Arbeit möglich waren. Tatsächlich konnte mit systematischen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Rhodopsin-Expression in Stäbchen und Zapfen der Retina von CNTF-defizienten Mäusen deutlich erhöht ist (Li et al., 2018). Dies führt zu einer erhöhten Dicke der ONL-Schicht. Auch die äußeren Segmente der Photorezeptoren sind in der Retina von CNTF-Knockout-Mäusen vergrößert. Diese Unterschiede konnten in unserer Arbeit nicht beobachtet werden, vermutlich aufgrund technischer Limitationen der konfokalen Mikroskopie. Die erhöhte Expression von Rhodopsin in Photorezeptoren von CNTF-Knockout-Mäusen wurde bestätigt durch den Nachweis von S-Opsin und M-Opsin auf Proteinebene durch Western-Blot-Untersuchungen sowie durch quantitative RT-PCR auf RNA-Level (Li et al., 2018). Auch spezifische Marker wie RPE65 mRNA erschienen auf RNA-Ebene bei CNTF-Knockout-Mäusen deutlich erhöht. Dies hat Auswirkungen auf die Funktionalität des Sehsystems. Bei skotopischen Elektroretinogramm-Untersuchungen bei dunkeladaptierten Wildtypkontroll- und CNTF-Knockout-Mäusen zeigten sich nach Behandlung mit einer Serie von Lichtblitzen deutliche Unterschiede in der Phototransduktion: Die Amplituden waren signifikant erhöht, insbesondere die Alpha-Wellen-Amplitude. Auch andere Untersuchungen zeigten, dass CNTF-Knockout Mäuse ein sensitiveres Sehvermögen haben aufgrund der höheren Expression von Rhodopsin,

sowie der Vergrößerung der äußeren Segmente. Dies jedoch macht diese Mäuse auch vulnerabler gegenüber Phototoxizität, die z.B. durch Exposition mit 12.000 Lux Licht induziert werden kann. Die Analyse der Retina bei solchen Tieren zeigt eine deutliche Reduktion der Expression von 11cRAL und eine reduzierte Alpha- und Betawellenamplitude im skotopischen ERG. Diese funktionellen Veränderungen korrelierten mit sichtbaren Schäden an den Photorezeptoren, einer verringerten Länge der äußeren Segmente und reduzierter Expression von Rhodopsin. Auch die Zahl der Photorezeptoren im zentralen Bereich der Retina war nach phototoxischer Exposition deutlich reduziert (Li et al., 2018).

Ähnlich wie bei der Myelinisierung im optischen Nerv, bei der das Fehlen von CNTF zwar zu einer verringerten Mitose-Rate führt, welche jedoch durch reduziertem Zelltod ausgeglichen wird (Barres et al., 1996), könnte das Fehlen von CNTF in der Retina auch protektive Effekte haben. CNTF scheint die Expression von Rhodopsin und die Länge der äußeren Segmente der Stäbchen und Zapfen negativ zu beeinflussen (Li et al., 2018). Der Mechanismus ist unbekannt. Es könnte jedoch sein, dass dies über die Funktionalität des Pigmentepithels geschieht. Das Pigmentepithel hat eine wichtige Funktion bei der Resorption distaler Segmente und eine Dysfunktion könnte zu einer Vergrößerung der distalen Segmente und erhöhten Levels von Rhodopsin führen, so wie sie bei CNTF-Knockout-Tieren beobachtet wurden (Li et al., 2018). So könnte das verbesserte Sehvermögen bei jungen CNTF-Knockout-Tieren, das in dieser und anderen Studien beobachtet wurde (Wen, Tao, Li, et al., 2012; Wen, Tao, Luo, et al., 2012), einer pathologischen Störung bei der Resorption distaler Segmente von Photorezeptoren entsprechen. Dies ist jedoch spekulativ und muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Auf jeden Fall sind solche Untersuchungen von großer Bedeutung, bevor CNTF als potenzielles Therapeutikum für degenerative Erkrankungen der Retina weiter in Erwägung gezogen werden kann (Kauper et al., 2012).

5 Zusammenfassung

Mittels Perfusion, mikrochirurgischer Präparation, immunhistochemischer Behandlung und anschließender konfokaler Lasermikroskopie, sowie alternativ mittels Elektronenmikroskopie, wurde untersucht, inwieweit das Fehlen des neurotrophen Faktors CNTF zu degenerativen Veränderungen im Sehnerv führt, welcher als zweiter Hirnnerv ein etabliertes ZNS-Modell darstellt. Auch die angrenzende Netzhaut und der in der Schädelbasis benachbarte Trigemiusnerv, welcher als fünfter Hirnnerv als PNS-Modell diente, wurden miteinbezogen.

Zuallererst wurde die sorgfältige mikrochirurgische Präparation des Gewebes etabliert, was wesentlich zur hohen Gewebequalität der untersuchten Samples beitrug. Die am Institut für Klinische Neurobiologie Würzburg bereits an anderen neuronalen Strukturen, beispielsweise dem Hippocampus oder N. Saphenus verwendeten immunhistochemischen Protokolle und Mausmodelle wurden erfolgreich auf Sehnerv, Trigemiusnerv und Netzhaut übertragen. Die CNTF-WT und CNTF-KO-Tiere funktionierten zuverlässig. Der verwendete prominente CNTF-Antikörper K10 zeigte sich, wie aus der Literatur zu erwarten, hoch spezifisch und sensitiv. Da CNTF im Sehnerv bekanntermaßen v.a. in Zellen der astrozytären Zellreihe exprimiert wird, deckte sich das CNTF-Expressionsmuster nahezu vollständig mit dem GFAP-Signal. Eine weitere detaillierte Charakterisierung der Zellpopulationen war mangels eindeutiger Zuordenbarkeit einzelner Zellen zu bestimmten Marker-Signalen aus technischen Gründen nicht möglich.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, inwieweit transgene Reporter-Mäuse für Fate-Mapping-Experimente verwendet werden konnten. Die Tiere exprimieren bei transgenem Allel unter dem CNTF-Promotor GFP statt CNTF und werden am Institut von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich eingesetzt. Mit homozygot transgenen Tieren kann untersucht werden, wie sich Zellpopulationen entwickeln, welche CNTF exprimieren wollten, jedoch nicht konnten. Mit heterozygot transgenen Tieren kann nachverfolgt werden, wie sich CNTF-exprimierende Zellen entwickeln, da auf einem Allel zwar GFP, auf dem anderen jedoch weiterhin CNTF exprimiert wird. Im Trigemiusnerv konnte mehrfach ein solides GFP-Signal detektiert werden. Im Sehnerv selbst gelang jedoch trotz zweier verschiedener Reporter-Maus-Linien, sowie verschiedener GFP-

Zusammenfassung

Antikörper und immunhistochemischer Färbeprotokolle keine zufriedenstellende GFP-Detektion.

In einem dritten Schritt wurde untersucht, inwieweit eine CNTF-Defizienz in älteren Tieren zu degenerativen Veränderungen führt. Hierzu wurden mittels Elektronenmikroskopie in jeweils 4 adulten CNTF-KO-Tieren und 4 adulten CNTF-WT-Tieren die G-Ratio als Maß für die Myelinisierung, der Axonumfang als Maß für die Axondicke, sowie die Mitochondriendichte pro Axon als Maß des Energiestoffwechsels mit insgesamt 1379 Axonen und 337 Mitochondrien ausgewertet. Zwischen beiden Vergleichsgruppen konnte hierbei kein signifikanter Unterschied bezüglich der untersuchten histologischen Parameter festgestellt werden.

In einem vierten Schritt wurde die retinale Schichtung der an den Sehnerv angrenzenden Netzhaut adulter Tiere mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. Hierzu wurden in möglichst vergleichbaren Regionen die einzelnen Schichtdicken in 5 CNTF-WT und 7 CNTF-KO Tieren ausgemessen und miteinander verglichen. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen CNTF-exprimierenden und CNTF-defizienten Tieren festgestellt werden.

In einem letzten Schritt wurde untersucht, inwieweit mit weiteren Markern verschiedenster Art eventuelle histologische Unterschiede zwischen CNTF-Wildtyp und Knockout-Tieren visualisiert und zuverlässig quantifiziert werden könnten. Hierbei boten sich insbesondere nukleäre Marker wie beispielsweise Sox2 und Sox10 an, während die eindeutige Zellzuordnung bei zytosolischen, membranständigen oder fibrillären Markern deutlich erschwert war. Mit BrdU-Experimenten könnte zudem in zukünftigen Experimenten der Einfluss einer CNTF-Defizienz auf die Proliferationsrate, sowie mittels Fibronectin auf die Gefäßversorgung und Blut-Hirn-Schranke untersucht werden.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- Barres, B. A., Burne, J. F., Holtmann, B., Thoenen, H., Sendtner, M., & Raff, M. C. (1996). Ciliary Neurotrophic Factor Enhances the Rate of Oligodendrocyte Generation. *Mol Cell Neurosci*, 8(2/3), 146-156
- Barres, B. A., Hart, I. K., Coles, H. S., Burne, J. F., Voyvodic, J. T., Richardson, W. D., & Raff, M. C. (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*, 70(1), 31-46
- Barres, B. A., Jacobson, M. D., Schmid, R., Sendtner, M., & Raff, M. C. (1993). Does oligodendrocyte survival depend on axons? *Curr Biol*, 3(8), 489-497
- Barres, B. A., & Raff, M. C. (1994). Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. *Neuron*, 12(5), 935-942
- Barres, B. A., Raff, M. C., Gaese, F., Bartke, I., Dechant, G., & Barde, Y. A. (1994). A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. *Nature*, 367(6461), 371-375
- Barres, B. A., Schmid, R., Sendtner, M., & Raff, M. C. (1993). Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development*, 118(1), 283-295
- Beltran, W. A. (2008). On the role of CNTF as a potential therapy for retinal degeneration: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Adv Exp Med Biol*, 613, 45-51
- Beltran, W. A., Wen, R., Acland, G. M., & Aguirre, G. D. (2007). Intravitreal injection of ciliary neurotrophic factor (CNTF) causes peripheral remodeling and does not prevent photoreceptor loss in canine RPGR mutant retina. *Exp Eye Res*, 84(4), 753-771
- Bibel, M., & Barde, Y. A. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev*, 14(23), 2919-2937
- Bok, D., Yasumura, D., Matthes, M. T., Ruiz, A., Duncan, J. L., Chappelow, A. V., Zolotukhin, S., Hauswirth, W., & LaVail, M. M. (2002). Effects of adeno-associated virus-vectored ciliary neurotrophic factor on retinal structure and function in mice with a P216L rds/peripherin mutation. *Exp Eye Res*, 74(6), 719-735

- Bommel, H., Xie, G., Rossoll, W., Wiese, S., Jablonka, S., Boehm, T., & Sendtner, M. (2002). Missense mutation in the tubulin-specific chaperone E (Tbce) gene in the mouse mutant progressive motor neuropathy, a model of human motoneuron disease. *J Cell Biol*, *159*(4), 563-569
- Cayouette, M., Behn, D., Sendtner, M., Lachapelle, P., & Gravel, C. (1998). Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse. *J Neurosci*, *18*(22), 9282-9293
- Cen, L. P., Liang, J. J., Chen, J. H., Harvey, A. R., Ng, T. K., Zhang, M., Pang, C. P., Cui, Q., & Fan, Y. M. (2017). AAV-mediated transfer of RhoA shRNA and CNTF promotes retinal ganglion cell survival and axon regeneration. *Neuroscience*, *343*, 472-482
- Cohen, J. J. (1991). Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol*, *50*, 55-85
- Ernfors, P., Lee, K. F., & Jaenisch, R. (1994). Target derived and putative local actions of neurotrophins in the peripheral nervous system. *Prog Brain Res*, *103*, 43-54
- Feng, G., Mellor, R. H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q. T., Wallace, M., Nerbonne, J. M., Lichtman, J. W., & Sanes, J. R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*, *28*(1), 41-51
- Fudalej, E., Justyniarska, M., Kasarekło, K., Dziedziak, J., Szaflik, J. P., & Cudnoch-Jędrzejewska, A. (2021). Neuroprotective Factors of the Retina and Their Role in Promoting Survival of Retinal Ganglion Cells: A Review. *Ophthalmic Res*, *64*(3), 345-355
- Fulton, B. P., Burne, J. F., & Raff, M. C. (1991). Glial cells in the rat optic nerve. The search for the type-2 astrocyte. *Ann N Y Acad Sci*, *633*, 27-34
- Giess, R., Goetz, R., Schrank, B., Ochs, G., Sendtner, M., & Toyka, K. (1998). Potential implications of a ciliary neurotrophic factor gene mutation in a German population of patients with motor neuron disease. *Muscle Nerve*, *21*(2), 236-238
- Giess, R., Holtmann, B., Braga, M., Grimm, T., Müller-Myhsok, B., Toyka, K. V., & Sendtner, M. (2002). Early onset of severe familial amyotrophic lateral sclerosis with a SOD-1 mutation: potential impact of CNTF as a candidate modifier gene. *Am J Hum Genet*, *70*(5), 1277-1286

- Giess, R., Mäurer, M., Linker, R., Gold, R., Warmuth-Metz, M., Toyka, K. V., Sendtner, M., & Rieckmann, P. (2002). Association of a null mutation in the CNTF gene with early onset of multiple sclerosis. *Arch Neurol*, *59*(3), 407-409
- Hamburger, V. (1934). The effects of wing bud extirpation on the development of the central nervous system in chick embryos. *J.Exp.Zool.* *68*:449-494
- Hamburger, V., & Yip, J. W. (1984). Reduction of experimentally induced neuronal death in spinal ganglia of the chick embryo by nerve growth factor. *J Neurosci*, *4*(3), 767-774
- Holtmann, B., Wiese, S., Samsam, M., Grohmann, K., Pennica, D., Martini, R., & Sendtner, M. (2005). Triple knock-out of CNTF, LIF, and CT-1 defines cooperative and distinct roles of these neurotrophic factors for motoneuron maintenance and function. *J Neurosci*, *25*(7), 1778-1787
- Huang, S. P., Lin, P. K., Liu, J. H., Khor, C. N., & Lee, Y. J. (2004). Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor rescues photoreceptor degeneration in RCS rats. *J Biomed Sci*, *11*(1), 37-48
- Hughes, S. M., Lillien, L. E., Raff, M. C., Rohrer, H., & Sendtner, M. (1988). Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. *Nature*, *335*(6185), 70-73
- Ju, W. K., Lee, M. Y., Hofmann, H. D., Kirsch, M., & Chun, M. H. (1999). Expression of CNTF in Müller cells of the rat retina after pressure-induced ischemia. *Neuroreport*, *10*(2), 419-422
- Kauper, K., McGovern, C., Sherman, S., Heatherton, P., Rapoza, R., Stabila, P., Dean, B., Lee, A., Borges, S., Bouchard, B., & Tao, W. (2012). Two-year intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor by encapsulated cell technology implants in patients with chronic retinal degenerative diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *53*(12), 7484-7491
- Kirsch, M., Lee, M. Y., Meyer, V., Wiese, A., & Hofmann, H. D. (1997). Evidence for multiple, local functions of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinal development: expression of CNTF and its receptors and in vitro effects on target cells. *J Neurochem*, *68*(3), 979-990
- Kirsch, M., Schneider, T., Lee, M. Y., & Hofmann, H. D. (1998). Lesion-induced changes in the expression of ciliary neurotrophic factor and its receptor in rat optic nerve. *Glia*, *23*(3), 239-248
- LaVail, M. M., Unoki, K., Yasumura, D., Matthes, M. T., Yancopoulos, G. D., & Steinberg, R. H. (1992). Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins

rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(23), 11249-11253

- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., & Barde, Y. A. (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*, 341(6238), 149-152
- Levi-Montalcini, R., and V. Hamburger. (1953). A diffusible agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J.Exp.Zool.* 123:233-278.
- Levi-Montalcini, R., & Angeletti, P. U. (1968). Nerve growth factor. *Physiol Rev*, 48(3), 534-569
- Li, R., Wen, R., Banzon, T., Maminishkis, A., & Miller, S. S. (2011). CNTF mediates neurotrophic factor secretion and fluid absorption in human retinal pigment epithelium. *PLoS One*, 6(9), e23148
- Li, S., Sato, K., Gordon, W. C., Sendtner, M., Bazan, N. G., & Jin, M. (2018). Ciliary neurotrophic factor (CNTF) protects retinal cone and rod photoreceptors by suppressing excessive formation of the visual pigments. *J Biol Chem*, 293(39), 15256-15268
- Liang, F. Q., Dejneka, N. S., Cohen, D. R., Krasnoperova, N. V., Lem, J., Maguire, A. M., Dudus, L., Fisher, K. J., & Bennett, J. (2001). AAV-mediated delivery of ciliary neurotrophic factor prolongs photoreceptor survival in the rhodopsin knockout mouse. *Mol Ther*, 3(2), 241-248
- Lichtman, J. W., & Purves, D. (1980). The elimination of redundant preganglionic innervation to hamster sympathetic ganglion cells in early post-natal life. *J Physiol*, 301, 213-228
- Lillien, L. E., Sendtner, M., Rohrer, H., Hughes, S. M., & Raff, M. C. (1988). Type-2 astrocyte development in rat brain cultures is initiated by a CNTF-like protein produced by type-1 astrocytes. *Neuron*, 1(6), 485-494
- Linker, R. A., Maurer, M., Gaupp, S., Martini, R., Holtmann, B., Giess, R., Rieckmann, P., Lassmann, H., Toyka, K. V., Sendtner, M., & Gold, R. (2002). CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med*, 8(6), 620-624
- Martin, A., Hofmann, H. D., & Kirsch, M. (2003). Glial reactivity in ciliary neurotrophic factor-deficient mice after optic nerve lesion. *J Neurosci*, 23(13), 5416-5424
- Martin, D. P., Schmidt, R. E., DiStefano, P. S., Lowry, O. H., Carter, J. G., & Johnson, E. M., Jr. (1988). Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent

- neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J Cell Biol*, 106(3), 829-844
- Masu, Y., Wolf, E., Holtmann, B., Sendtner, M., Brem, G., & Thoenen, H. (1993). Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature*, 365(6441), 27-32
- Mathews, M. K., Guo, Y., Langenberg, P., & Bernstein, S. L. (2015). Ciliary neurotrophic factor (CNTF)-mediated ganglion cell survival in a rodent model of non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy (NAION). *Br J Ophthalmol*, 99(1), 133-137
- Nakamura, T., Colbert, M. C., & Robbins, J. (2006). Neural crest cells retain multipotential characteristics in the developing valves and label the cardiac conduction system. *Circ Res*, 98(12), 1547-1554
- Naumann, T., Schnell, O., Zhi, Q., Kirsch, M., Schubert, K. O., Sendtner, M., & Hofmann, H. D. (2003). Endogenous ciliary neurotrophic factor protects GABAergic, but not cholinergic, septohippocampal neurons following fimbria-fornix transection. *Brain Pathol*, 13(3), 309-321
- Pease, M. E., Zack, D. J., Berlinicke, C., Bloom, K., Cone, F., Wang, Y., Klein, R. L., Hauswirth, W. W., & Quigley, H. A. (2009). Effect of CNTF on retinal ganglion cell survival in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(5), 2194-2200
- Pu, S. F., Zhuang, H. X., Marsh, D. J., & Ishii, D. N. (1999). Insulin-like growth factor-II increases and IGF is required for postnatal rat spinal motoneuron survival following sciatic nerve axotomy. *J Neurosci Res*, 55(1), 9-16
- Raff, M. C. (1989). Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science*, 243(4897), 1450-1455
- Raff, M. C., Abney, E. R., & Miller, R. H. (1984). Two glial cell lineages diverge prenatally in rat optic nerve. *Dev Biol*, 106(1), 53-60
- Raff, M. C., and R.H. Miller. (1984). Glial cell development in the rat optic nerve. *Trends in Neuroscience*. 7:469-472
- Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y., & Jacobson, M. D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*, 262(5134), 695-700
- Selvaraj, B. T., Frank, N., Bender, F. L., Asan, E., & Sendtner, M. (2012). Local axonal function of STAT3 rescues axon degeneration in the pmn model of motoneuron disease. *J Cell Biol*, 199(3), 437-451

Anhang

- Sendtner, M., Arakawa, Y., Stöckli, K. A., Kreutzberg, G. W., & Thoenen, H. (1991). Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival. *J Cell Sci Suppl*, 15, 103-109
- Sendtner, M., Carroll, P., Holtmann, B., Hughes, R. A., & Thoenen, H. (1994). Ciliary neurotrophic factor. *J Neurobiol*, 25(11), 1436-1453
- Sendtner, M., Dittrich, F., Hughes, R. A., & Thoenen, H. (1994). Actions of CNTF and neurotrophins on degenerating motoneurons: preclinical studies and clinical implications. *J Neurol Sci*, 124 Suppl, 77-83
- Sendtner, M., Götz, R., Holtmann, B., Escary, J. L., Masu, Y., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Brület, P., & Thoenen, H. (1996). Cryptic physiological trophic support of motoneurons by LIF revealed by double gene targeting of CNTF and LIF. *Curr Biol*, 6(6), 686-694
- Sendtner, M., Götz, R., Holtmann, B., & Thoenen, H. (1997). Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *J Neurosci*, 17(18), 6999-7006
- Sendtner, M., Kreutzberg, G. W., & Thoenen, H. (1990). Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature*, 345(6274), 440-441
- Sendtner, M., Schmalbruch, H., Stöckli, K. A., Carroll, P., Kreutzberg, G. W., & Thoenen, H. (1992). Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature*, 358(6386), 502-504
- Sendtner, M., Stöckli, K. A., & Thoenen, H. (1992). Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. *J Cell Biol*, 118(1), 139-148
- Sferra, A., Baillat, G., Rizza, T., Barresi, S., Flex, E., Tasca, G., D'Amico, A., Bellacchio, E., Ciolfi, A., Caputo, V., Cecchetti, S., Torella, A., Zanni, G., Diodato, D., Piermarini, E., Niceta, M., Coppola, A., Tedeschi, E., Martinelli, D., . . . Bertini, E. (2016). TBCE Mutations Cause Early-Onset Progressive Encephalopathy with Distal Spinal Muscular Atrophy. *Am J Hum Genet*, 99(4), 974-983
- Shpak, A. A., Guekht, A. B., Druzhkova, T. A., Kozlova, K. I., & Gulyaeva, N. V. (2017). Ciliary neurotrophic factor in patients with primary open-angle glaucoma and age-related cataract. *Mol Vis*, 23, 799-809

- Sieving, P. A., Caruso, R. C., Tao, W., Coleman, H. R., Thompson, D. J., Fullmer, K. R., & Bush, R. A. (2006). Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(10), 3896-3901
- Stöckli, K. A., Lillien, L. E., Näher-Noé, M., Breitfeld, G., Hughes, R. A., Raff, M. C., Thoenen, H., & Sendtner, M. (1991). Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. *J Cell Biol*, *115*(2), 447-459
- Stöckli, K. A., Lottspeich, F., Sendtner, M., Masiakowski, P., Carroll, P., Götz, R., Lindholm, D., & Thoenen, H. (1989). Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature*, *342*(6252), 920-923
- Taga, T., & Kishimoto, T. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *Faseb j*, *6*(15), 3387-3396
- Takahashi, R., Yokoji, H., Misawa, H., Hayashi, M., Hu, J., & Deguchi, T. (1994). A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat Genet*, *7*(1), 79-84
- Thome, J., Kornhuber, J., Baumer, A., Rösler, M., Beckmann, H., & Riederer, P. (1996). Association between a null mutation in the human ciliary neurotrophic factor (CNTF) gene and increased incidence of psychiatric diseases? *Neurosci Lett*, *203*(2), 109-110
- Walsh, N., Valter, K., & Stone, J. (2001). Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina. *Exp Eye Res*, *72*(5), 495-501
- Wang, W. J., Jin, W., Yang, A. H., Chen, Z., & Xing, Y. Q. (2018). Protective effects of ciliary neurotrophic factor on the retinal ganglion cells by injure of hydrogen peroxide. *Int J Ophthalmol*, *11*(6), 923-928
- Watanabe, T., & Raff, M. C. (1988). Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature*, *332*(6167), 834-837
- Wen, R., Tao, W., Li, Y., & Sieving, P. A. (2012). CNTF and retina. *Prog Retin Eye Res*, *31*(2), 136-151
- Wen, R., Tao, W., Luo, L., Huang, D., Kauper, K., Stabila, P., LaVail, M. M., Laties, A. M., & Li, Y. (2012). Regeneration of cone outer segments induced by CNTF. *Adv Exp Med Biol*, *723*, 93-99

Yungher, B. J., Ribeiro, M., & Park, K. K. (2017). Regenerative Responses and Axon Pathfinding of Retinal Ganglion Cells in Chronically Injured Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 58(3), 1743-1750

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mosaik-Aufnahme des adulten Sehnervs mit Netzhaut.....	7
Abb. 2: Repräsentative Gelelektrophorese bei Genotypisierung von CNTF-Knockout-Tieren...	29
Abb. 3: Repräsentative Gelelektrophorese bei Genotypisierung einer GFP-Reporter-Maus	31
Abb. 4: Längsschnitt durch den N. trigeminus einer 14 Tage alten Wildtyp-Maus	33
Abb. 5: Längs- und Querschnitte durch Sehnerv und Retina eines adulten Tieres	35
Abb. 6: Querschnitte durch den Sehnerv 5 und 7 Tage alter WT-Tiere.....	36
Abb. 7: Querschnitt durch die Retina eines adulten WT-Tieres.....	36
Abb. 8: CNTF-Färbung der Netzhaut in adulten CNTF-KO und WT-Tieren	38
Abb. 9: Schematische Darstellung des Reporter-Systems	39
Abb. 10: GFP-Nachweis in Längsschnitten durch den N. trigeminus adulter transgener Tiere .	41
Abb. 11: Längsschnitt durch den N. trigeminus einer adulten CNTF Cre +/tg RosaGFP tg/tg Maus.	42
Abb. 12: Längsschnitt durch den N. trigeminus einer adulten CNTF Cre +/tg RosaGFP tg/tg Maus	42
Abb. 13: GFP-Signal im Sehnerv eines adulten heterozygot transgenen CNTF Cre Tieres	44
Abb. 14: Zugehörigen Kontrollen zu Abb. 13	45
Abb. 15: GFP-Signal im Sehnerv eines adulten heterozygot transgenen CNTF Cre-Tieres.....	47
Abb. 16: GFP-Signal im Sehnerv eines adulten heterozygot transgenen CNTF Cre-Tieres.....	48
Abb. 17: Sehnerv im Querschnitt, junges heterozygot transgenes Tier (P8).	49
Abb. 18: Vergleich des GFP Signals mit und ohne Antikörperfärbung	50
Abb. 19: GFP Färbung eines heterozygot transgenen P7-Samples.....	51
Abb. 20: Methylenblau gefärbte Semidünnschnitte des Sehnervs	54
Abb. 21: Semi-Dünnschnitte des Sehnervs im Transmissionsmodus des konfokalen Mikroskops	55
Abb. 22: Elektronenmikroskopische Aufnahme des adulten Sehnervs	57
Abb. 23: Berechnung der G-Ratio als Maß für die Myelinisierung der Axone im Sehnerv	58
Abb. 24: Vergleich der G-Ratio zwischen allen 8 untersuchten Tieren.....	59
Abb. 25: Vergleich der G-Ratio zwischen der WT- und der CNTF-KO Gruppe	59
Abb. 26: Durchschnittlicher Axonumfang im Sehnerv	60
Abb. 27: Median des Umfangs der in Abb. 26 untersuchten Axone im Sehnerv	61
Abb. 28: Mittelwert und SD des Axonumfangs der CNTF-KO und WT-Tiere	61
Abb. 29: Axonumfang innerhalb der Wildtyp-Samples	62
Abb. 30: Axonumfang innerhalb der CNTF-Knockout-Samples	63
Abb. 31: Axonquerschnitt mit Mitochondrien.....	64
Abb. 32: Mitochondrienzahl pro Axon für die einzelnen Tiere	65

Anhang

Abb. 33: Mitochondrienzahl pro Axon für die jeweiligen Gruppen	65
Abb. 34: WT1 (Wildtyp, ♀, 6 Monate)	66
Abb. 35: WT2 (Wildtyp, ♂, 6 Monate)	67
Abb. 36: WT3 (Wildtyp, ♀, 11 Monate)	67
Abb. 37: WT4 (Wildtyp, ♀, 11 Monate)	67
Abb. 38: KO1 (CNTF-Knockout, ♀, 11 Monate).....	68
Abb. 39: KO2 (CNTF-Knockout, ♀, 8 Monate).....	68
Abb. 40: KO3 (CNTF-Knockout, ♂, 8 Monate).....	69
Abb. 41: KO4 (CNTF-Knockout, ♀, 14 Monate).....	69
Abb. 42: Konfokale Aufnahmen der adulten Retina	71
Abb. 43: Konfokale Aufnahmen der adulten Retina	72
Abb. 44: Schematische Unterteilung der Retina	73
Abb. 45: Einfluss der Schnittführung auf die gemessene Schichtdicke	74
Abb. 46: Ausgewertete Netzhaut-Schnitte adulter WT und KO-Tiere.....	75
Abb. 47: Übersicht der ausgemessenen retinalen Schichtung	76
Abb. 48: Transmissionsbilder der Netzhaut adulter WT- und CNTF-KO-Tiere.....	77
Abb. 49: Vergleich der retinalen Schichtdicken adulter WT und CNTF-KO-Tiere	78
Abb. 50: Exemplarische Auswahl an untersuchten Zellmarkern im Sehnerv	80

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Primärantikörper	17
Tabelle 2: Liste der verwendeten Sekundärantikörper	18
Tabelle 3: Verwendeter DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) Fluoreszenzfarbstoff	18
Tabelle 4: Übersicht der elektronenmikroskopisch untersuchten Präparate	56
Tabelle 5: Messwerte der retinalen Schichtdicken	78

Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Sendtner für die Überlassung des spannenden Themas, Bereitstellung der benötigten Materialien und Infrastruktur, die Aufnahme ins Promotionsprogramm des SFB 581 und die damit verbundene hochwertige wissenschaftliche Ausbildung am Institut für klinische Neurobiologie, sowie die intensive Betreuung, welche diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Weiterhin möchte ich mich auch bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Robert Blum, sowie seiner gesamten Arbeitsgruppe für die unschätzbar wertvolle langjährige Begleitung und wissenschaftliche Ausbildung, beginnend von den ersten Pipettierschritten bis hin zur fortgeschrittenen konfokalen Mikroskopie, zutiefst bedanken.

Ich danke auch Frau Prof. Dr. Esther Asan und ihrer Arbeitsgruppe ganz herzlich für die Ermöglichung und Begleitung der Versuche am Elektronenmikroskop am Institut für Anatomie und Zellbiologie Würzburg.

Weiterhin möchte ich auch den zahlreichen weiteren Mitgliedern der Institute für Klinische Neurobiologie, sowie Anatomie und Zellbiologie danken, welche mich auf meinem Weg unterstützt haben und eine Zeit prägten, an die ich mich stets gerne zurückerinnere.

Schließlich gilt mein Dank auch meiner Familie und allen Freunden außerhalb der Institute, welche mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.