

Aus dem
Department für Augenheilkunde Tübingen
Universitäts-Augenklinik

Inaugural-Dissertation

**Neuroprotektion mittels eines TrkB-Aptamer an der porcinen
Retina**

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der medizinischen Fakultät der
Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von:

Schleicher, Isabell

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Dr. S. Schnichels
2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

Tag der Disputation: 20.11.2024

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungen	VI
II	Tabellen	VIII
III	Abkürzungen	IX
1	Einleitung	1
1.1	Das menschliche Auge	1
1.2	Retinitis pigmentosa	4
1.3	Altersbedingte Makuladegeneration	5
1.4	BDNF und TrkB	6
1.4.1	TrkB als neuroprotektive Zielstruktur	6
1.4.2	BDNF als TrkB-Ligand	7
1.4.3	Aptamere als Therapeutika	8
1.5	Zielsetzung der Arbeit	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Verbrauchsmaterialien	11
2.2	Assays & Kits	13
2.3	Aptamere	14
2.4	Antikörper	15
2.5	Primer	17
2.6	Geräte	18
2.7	Schweineaugen als Versuchsmaterial	19
2.8	Präparation der Schweineaugen	19
2.9	Herstellung retinaler Explantate	20
2.10	Kultivierung von porcinen Müllerzellen	20
2.11	Behandlung der Müllerzellen	21
2.12	Behandlung retinaler Explantate	22
2.13	mRNA/cDNA-Synthese	22

2.14	qRT-PCR	23
2.14.1	Bicinchoninic acid assay (BCA)	24
2.15	Western Blot	25
2.16	Immunfluoreszenz	28
2.16.1	Kryoschnitte	28
2.16.2	DAPI-Färbung	29
2.17	TUNEL-Färbung	29
2.18	Assays	30
2.18.1	Caspase 3/7-Assay	30
2.18.2	Viabilitätsassay mit retinalen Explantaten	31
2.18.3	MTS-Assay	31
2.18.4	Kristallviolett Färbung	31
2.19	Blaulicht Bestrahlung	32
2.20	Übersicht über verwendete Marker in qRT-PCR und WB	33
2.21	Statistische Analyse	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Optimierung der Aptamerkonzentration	34
3.1.1	Die Rezeptoraktivierung ist abhängig von der TrkB-Konzentration	35
3.1.2	Verträglichkeitstest des RNA-Aptamers in der Retina	37
3.1.3	Viabilität der MZ ist abhängig von der RNA-TrkB-Aptamer-Konzentration	42
3.2	Zeitlicher Ablauf der TrkB-Rezeptor-Aktivierung	43
3.2.1	Die Behandlung mit dem RNA-TrkB-Aptamer führt zur Rezeptorinternalisierung	44
3.2.2	Das RNA-TrkB-Aptamer führt zur Aktivierung der TrkB-Signalwege	46
3.2.3	Retinale Zellen profitieren von der Behandlung mit dem RNA-TrkB-Aptamer	48
3.3	Vergleich des RNA- mit dem DNA-TrkB-Aptamer	51
3.3.1	Vergleich der Signalwegaktivierung durch das RNA- und DNA-TrkB-Aptamer	51
3.3.2	Vergleich der Effekte der beiden Aptamere auf retinale Zellpopulationen	53
3.3.3	Verträglichkeitstest des DNA-TrkB-Aptamers	56
3.4	Neuroprotektiver Effekt des RNA-TrkB-Aptamers im BL-Stressmodell	58
3.5	Behandlung im BL-Stressmodell	59
3.6	Retinaler Zellstress im BL-Stressmodell	61
3.7	Expression zellspezifischer retinaler Marker nach BL-Bestrahlung	63

3.7.1	Apoptoseinduktion durch BL-Bestrahlung	65
3.7.2	MZ im BL-Stressmodell	67
3.8	Neuroprotektiver Effekt des TrkB-Aptamers	71
4	Diskussion	75
4.1	Der TrkB-Rezeptor als neuroprotektives Target	75
4.2	Literaturkontext bezüglich BDNF-Behandlung	76
4.3	Das RNA-TrkB-Aptamer	77
4.4	Ergebnisse RNA-TrkB-Aptamer Konzentrationstestung	78
4.5	Zeitverlauf der TrkB-Aktivierung	80
4.6	Vergleich von RNA- und DNA-TrkB-Aptamer	81
4.7	Neurodegenerative Erkrankungen der Retina	85
4.8	BL als Krankheitsmodell für Neurodegeneration	86
4.9	Ausblick	90
5	Zusammenfassung	91
6	Quellenverzeichnis	92
7	Erklärung zum Eigenanteil	101
8	Veröffentlichungen	102
8.1	Danksagung	103

I Abbildungen

Abbildung 1: Hinterer Augenabschnitt	3
Abbildung 2: Aufbau der Retina	3
Abbildung 3: Übersicht der verwendeten Marker in qRT-PCR und WB	33
Abbildung 4: Schema des Versuchsaufbaus Isolation retinaler Stanzen und Untersuchung mittels qRT-PCR	35
Abbildung 5: RNA-TrkB-Aptamerbehandlung kann die mRNA-Expression von Wachstumsfaktoren signifikant induzieren	36
Abbildung 6: RNA-TrkB-Aptamerbehandlung kann die mRNA-Expression von zellspezifischen Markern signifikant induzieren	38
Abbildung 7: Hohe Konzentrationen des RNA-TrkB-Aptamers induzieren signifikant die mRNA-Expression von Zellstressmarkern	40
Abbildung 8: Die RNA-TrkB-Aptamerbehandlung reduziert die Menge des Zellstressmarkers HSP70 signifikant	41
Abbildung 9: Die Behandlungen mit dem RNA-TrkB-Aptamer und BDNF steigern die Zellviabilität von Müllerzellen signifikant	43
Abbildung 10: Versuchsaufbau-Schema Isolation retinaler Stanzen und Untersuchung mittels WB	44
Abbildung 11: Die RNA-TrkB-Aptamerbehandlung führt nach 48 h zur Rezeptorinternalisierung	45
Abbildung 12: Die Proteinmenge an inaktivem Akt ist zum Zeitpunkt 0h signifikant höher als die Proteinmenge des aktivierten pAkt	46
Abbildung 13: Die Behandlung mit dem RNA-TrkB-Aptamer führt zur signifikanten TrkB-Signalwegaktivierung über (p)Akt	48
Abbildung 14: Die Behandlung mit dem RNA-TrkB-Aptamer steigert signifikant die Proteinmenge der zellspezifischen Marker S-Opisin und TUBB3	50
Abbildung 15: Schematischer Versuchsaufbau Isolation retinaler Stanzen und Untersuchung mittels qRT-PCR	52
Abbildung 16: Die DNA-TrkB-Aptamerbehandlung führt zur signifikanten Induktion der mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren <i>BDNF</i> und <i>CNTF</i>	53
Abbildung 17: Die DNA-TrkB-Aptamerbehandlung führt zur signifikanten Induktion der mRNA-Expression des Gliazellmarkers GFAP 24 h nach Behandlung	54
Abbildung 18: Die DNA-TrkB-Aptamerbehandlung führt zur signifikanten Induktion der mRNA-Expression der zellspezifischen Marker <i>TUBB3</i> und <i>S-Opisin</i>	55

Abbildung 19: Das DNA-TrkB-Aptamer führt in niedriger Konzentration zur Reduktion des Zellstressmarkers <i>TNFα</i> . In hohen Konzentrationen kommt es zur signifikanten Induktion der Zellstressmarkerexpression von <i>HSP70</i> und <i>IL-1β</i> _____	57
Abbildung 20: Schema des Versuchsaufbaus des BL-Stressmodells und anschließender Behandlung mit dem RNA-TrkB-Aptamer _____	59
Abbildung 21: Schema des Versuchsaufbaus Induktion von Zellstress in MZ mittels BL-Bestrahlung und danach Behandlung mit RNA-TrkB-Aptamer _____	59
Abbildung 22: Die RNA-TrkB-Aptamerbehandlung verhindert den durch BL induzierten Zellviabilitätsverlust _____	61
Abbildung 23: Die RNA-TrkB-Aptamerbehandlung reduziert den durch BL induzierten Zellstress in der Retina _____	62
Abbildung 24: Das RNA-TrkB-Aptamer steigert die mRNA-Expression zellspezifischer Marker nach BL-Bestrahlung _____	64
Abbildung 25: Das RNA-TrkB-Aptamer rettet Zellen vor der durch BL induzierten Apoptose in der Retina _____	66
Abbildung 26: Die RNA-TrkB-Aptamerbehandlung verhindert den durch BL induzierten Zelltod in der Retina _____	67
Abbildung 27: Die Viabilität von MZ profitiert von der RNA-TrkB-Aptamerbehandlung nach BL-Bestrahlung _____	69
Abbildung 28: Die Behandlung mit dem RNA-TrkB-Aptamer verhindert die durch BL induzierte Apoptose der MZ _____	70
Abbildung 29: Retinale Zellen können mittels der RNA-TrkB-Aptamerbehandlung vor der durch BL ausgelösten Apoptose gerettet werden _____	73
Abbildung 30: Zusammenfassende Übersicht der Wirkung der Behandlung mit dem Aptamer und BDNF an der ungestressten Retina _____	85
Abbildung 31: Zusammenfassender Überblick der Ergebnisse der Aptamerwirkung im BL-Stressmodell _____	89

II Tabellen

Tabelle 1: Übersicht verwendeter Abkürzungen	X
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	12
Tabelle 3: Verwendete Assays und Kits	13
Tabelle 4: Verwendete Aptamere und BDNF	14
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper	15
Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blots	16
Tabelle 7: Verwendete Primer für qRT-PCR	17
Tabelle 8: Verwendete Geräte	18
Tabelle 9: Analysierte Proteine im Western Blot	28
Tabelle 10: Vergleich der Vor- und Nachteile von RNA- und DNA-Aptameren	82

III Abkürzungen

Abkürzung	Begriff
Abb.	Abbildung
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
TUBB3	Beta-III-Tubulin
BPZ	Bipolarzellen
BSA	Bovines Serum Albumin
BL	Blaulicht
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> / vom Gehirn stammender neurotropher Faktor
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i> / ziliärer neurotropher Faktor
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> / Saures Gliafaserprotein
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> / Hanks balancierte Salzlösung
h	<i>Hours</i> / Stunden
HSP70	<i>Heat-Shock Protein 70</i> /Hitzeschock-Protein 70
IL-1 β /IL-1 β	Interleukin 1 beta
iNos	<i>Inducible Nitric oxide synthase</i> / Induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
min	Minuten
MZ	Müllerzellen
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> / Phosphat gepufferte Salzlösung
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
qRT-PCR	<i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i>
RGZ	Retinale Ganglienzellen
RM	Retina-Medium
RPE	Retinales Pigmentepithel
RP	<i>Retinitis pigmentosa</i>

RT	Raumtemperatur
SOD	Superoxiddismutase
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TrkB	Tropomyosin-Rezeptorkinase B
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> / vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
Vgl.	Vergleich
vs.	<i>versus</i>
WB	Western Blot
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabelle 1: Übersicht verwendeter Abkürzungen

1 Einleitung

Das Auge ist eines der zentralen Sinnesorgane des Menschen und ermöglicht das Sehen. Essenziell für die Sinneswahrnehmung ist hierbei die Retina. Sie ist ein Teil des Gehirns und verantwortlich für die Wahrnehmung von Licht und Umwandlung der Reize in Signale, die in der Sehrinde zu einem Seheindruck verarbeitet werden können [1]. Hierfür ist die Interaktion einer Vielzahl an verschiedenen Zellen fein reguliert. Dieses Zellgeflecht ist hoch empfindlich für pathologische Noxen, wie mechanischer oder oxidativer Stress. Werden Zellen der Retina geschädigt gehen sie in Apoptose und es kommt zur Neurodegeneration [2]. Dieser Prozess geht für betroffene Patient*innen meist aufgrund der progredienten Visusminderung mit einem hohen Leidensdruck einher [3, 4]. Erkrankungen, deren Pathogenese auf retinaler Neurodegeneration durch oxidativen Stress beruht, sind beispielsweise die *Retinitis pigmentosa (RP)* und die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) [5, 6]. Bisher ist keine der Erkrankungen kurativ behandelbar, weil ursächliche genetische Veränderungen und die pathogenetischen Prozesse sehr vielseitig sind [7]. Aufgrund dessen wird intensiv daran geforscht die Neurodegeneration als therapeutischen Ansatzpunkt nutzbar zu machen, um den Prozess des Zellsterbens dieser Erkrankungen zu verlangsamen oder aufzuhalten. Diesen neuroprotektiven Therapieansatz verfolgt auch diese Doktorarbeit mittels eines TrkB-Aptamers. Dieses Aptamer wurde hinsichtlich Wirkung und neuroprotektiver Potenz in der porcinen Retina untersucht.

1.1 Das menschliche Auge

Das Auge, als eines der wichtigsten Sinnesorgane des Menschen, lässt sich grob in zwei Abschnitte, den vorderen und hinteren Augenabschnitt, unterteilen. Der vordere Augenabschnitt umfasst Strukturen wie die Hornhaut (*Cornea*), Bindehaut (*Konjunktiva*), Lederhaut (*Sclera*), vordere Augenkammer, Iris und Linse. Zum hinteren Augenabschnitt gehören unter anderem Strukturen wie die Aderhaut (*Choroidea*) und die Retina mit dem Punkt des schärfsten Sehens (*Makula*) und dem Austritt des Sehnervs (*Papilla nervi optici*) (Abb. 1) [8, 9]. Die

Retina besteht aus vielen verschiedenen Zellen. Hierzu zählen unter anderem die drei Neuronenpopulationen, die eng miteinander verwoben sind und ständig interagieren. Die ersten Neurone im Sehvorgang sind die lichtempfindlichen Photorezeptoren, unterteilbar in Zapfen (Farbsehen) und Stäbchen (Hell-Dunkel-Sehen). Darauf folgen die Bipolarzellen (BPZ) und als letztes die Ganglienzellen (RGZ), welche mit ihren Axonen den *Nervus opticus* (Sehnerv) bilden und die Reize an das Gehirn weiterleiten. Weitere Zelltypen, die wichtig für die Verschaltung in der Retina und die Entstehung eines Seheindrucks sind die Amakrinzellen, Horizontalzellen und Gliazellen. Eine wichtige Untergruppe der Gliazellen sind die Müllerzellen (MZ), da sie als retinale Gliazellen als optische Leitfasern für einfallendes Licht dienen [71]. Zudem sind sie essentiell für die Homöostase der Retina und versorgen Neurone mit Nährstoffen [72]. Sie sind damit essenziell für die Funktionsfähigkeit der Retina (Abb. 2). In Voruntersuchungen um Fietz *et al.* konnte bereits gezeigt werden, dass MZ auf Blaulicht (BL) Bestrahlung mit Apoptose reagieren [64]. Zudem spielen sie eine zentrale Rolle bei retinalem Zellstress und Neurodegeneration. Inwiefern MZ zur Pathogenese von Erkrankungen wie der AMD beitragen ist noch nicht hinreichend geklärt. Jedoch konnte eine Aktivierung der Zellen bei der AMD festgestellt werden. MZ übernehmen Recycling-Funktionen in der Netzhaut und sind somit zuständig für die Versorgung und das Überleben insbesondere der Zapfen in der Netzhaut [73]. Ihre Dichte ist in der Nähe des von der AMD betroffenen zentralen (fovealen) Netzhautanteils deutlich höher, als in den weniger betroffenen peripheren Bereichen der Retina [74]. Wenn in der Netzhaut Stress entsteht, so werden MZ aktiviert und sie reagieren mittels Induktion der GFAP-Expression darauf, welche messbar ist [75]. Diese Tatsachen deuten darauf hin, dass diese Zellpopulation wichtig für das genauere Verständnis neurodegenerativer Erkrankungen, wie der AMD und RP, ist. In dieser Forschungsarbeit spielt vor allem der hintere Augenabschnitt mit der Retina eine wichtige Rolle. Erkrankungen dieses Augenabschnitts und insbesondere der Retina und Makula, wie die AMD und RP, sind wichtige Krankheitsbilder der Augenheilkunde, da sie das Sehen stark beeinträchtigen können und einen hohen Leidensdruck für Patient*innen bedeuten [3, 12].

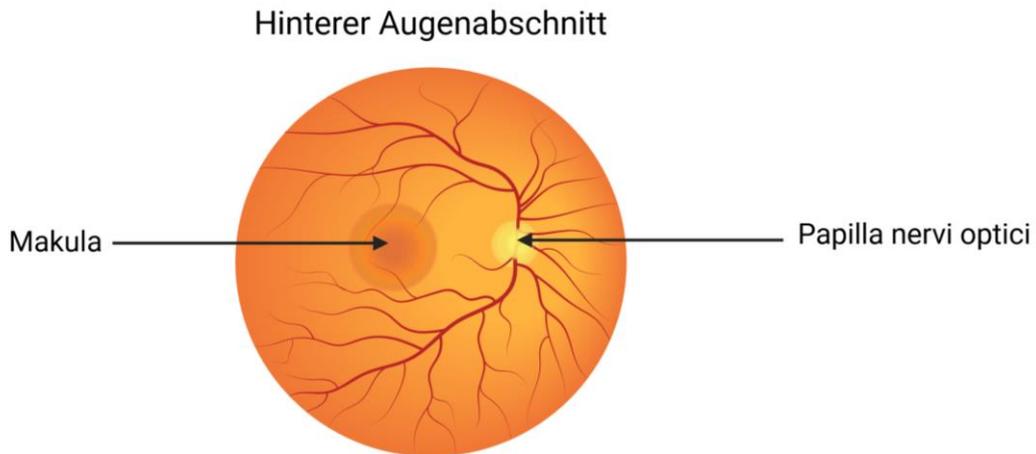


Abbildung 1: Hinterer Augenabschnitt

Abgebildet ist der hintere Augenabschnitt mit dem Austritt des Sehnervs (*Papilla nervi optici*) und dem Ort des schärfsten Sehens (Makula).

Erstellt mit BioRender.com

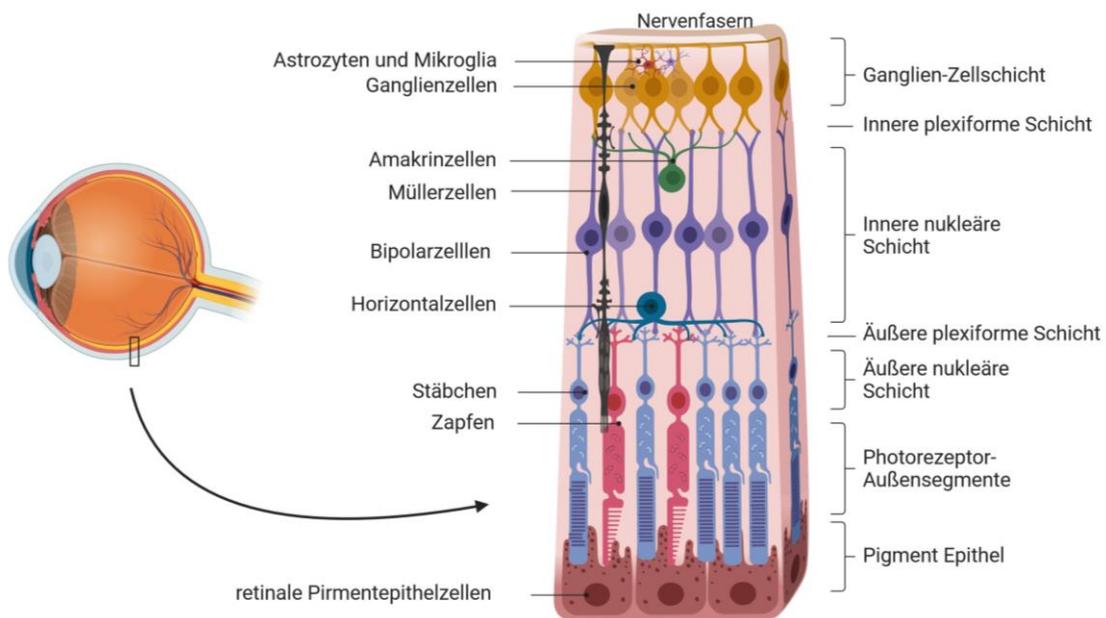


Abbildung 2: Aufbau der Retina

Dargestellt ist der schematische Querschnitt der Retina mit den verschiedenen Schichten und Zellen der Netzhaut, wie retinalen Pigmentepithelzellen (RPE), Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen), Bipolarzellen, Horizontalzellen, Amakrinzellen, Gliazellen (Müllerzelle, Astrozyten, Mikroglia) und Ganglienzellen (RGZ). Letztere bilden mit ihren Axonen den Sehnerv.

Erstellt mit BioRender.com

1.2 Retinitis pigmentosa

Die RP ist eine Erkrankung der Retina, die durch verschiedene genetische Mutationen hervorgerufen werden kann. Bisher sind über 100 ursächliche Mutationen in rund 70 Genen bekannt [13]. Diese Mutationen betreffen vor allem das RPE und die Stäbchen. Letztere degenerieren im Krankheitsverlauf als erste [3, 14]. Sie sind für das Hell-Dunkel-Sehen verantwortlich, weshalb Patient*innen zu Beginn meist Nachtblindheit als Symptom erleben. Im weiteren Verlauf gehen auch die für das Farbsehen verantwortlichen Zapfen zugrunde. Auf die Nachtblindheit folgen somit Gesichtsfeldeinengungen, gestörtes Farb- und Kontrastsehen und oft Erblindung im Endstadium der Erkrankung [15, 16]. Hypothesen zur Pathogenese der *RP* stützen sich unter anderem auf die Annahme, dass oxidativer Stress eine Ursache für die Degeneration retinaler Zellen ist. Durch das primäre Absterben der Stäbchen geht der Hauptverbraucher des Sauerstoffs in der Retina verloren. Der überschüssige Sauerstoff wird in der Folge von den Zapfen mittels der NADPH-Oxidase in reaktive Sauerstoffspezies (ROS) umgewandelt. Systeme zur Beseitigung der ROS, wie die Superoxid-Dismutase (SOD), sind überfordert. ROS akkumulieren und es entsteht oxidativer Stress in der Retina. Dieser führt zur Zellschädigung mit Neurodegeneration [17] (Abb. 3). Bis heute ist die Erkrankung weder hinreichend therapierbar, noch heilbar [18].

Retinitis pigmentos Pathogenese

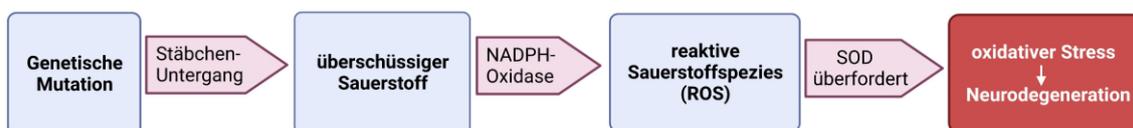


Abbildung 3: Pathogenese der *Retinitis pigmentosa*

Genetische Mutationen bedingen ein Stäbchen-Sterben. Als Hauptverbraucher von Sauerstoff in der Retina entsteht somit ein Sauerstoffüberschuss. Dieser überschüssige Sauerstoff wird mittels der NADPH-Oxidase in reaktive Sauerstoffspezies (ROS) umgewandelt. Die Superoxid-Dismutase (SOD), die diese ROS normalerweise abbaut reicht nicht aus, um alle ROS zu beseitigen, wodurch oxidativer Stress in der Retina entsteht. Dieser oxidative Stress bedingt in der Folge weitere retinale Neurodegeneration.

Erstellt mit BioRender.com

1.3 Altersbedingte Makuladegeneration

In der heutigen Forschung hat die AMD als neurodegenerative Erkrankung eine hohe Relevanz, weil sie die häufigste Ursache für Seheinschränkungen in höherem Alter in Industriestaaten ist und noch keine kurative Therapie existiert [4, 18]. Bei dieser Erkrankung spielt, wie bei der *RP*, oxidativer Stress eine wichtige Rolle in der Pathogenese [19]. Ursächlich ist eine Stoffwechselstörung der Photorezeptoren. Durch Modifikation retinaler Proteine kommt es zu Ablagerungen von Stoffwechselprodukten (Drusen) zwischen RPE-Zellen und der Bruchmembran im Bereich der Makula (siehe Abb. 2). Die Erkrankung beeinträchtigt dadurch vor allem das zentrale Sehen [20]. Das abgelagerte Sekret führt zudem zu einer Aktivierung des Immunsystems mit entzündlicher Reaktion und Komplementaktivierung [21]. Diese Entzündung bedingt eine Degeneration der RPE-Zellen. Im Krankheitsverlauf folgt dann das Absterben der Photorezeptoren aufgrund des Funktionsverlusts des RPE, wodurch der Visus der Patient*innen massiv eingeschränkt wird [22, 23].

Grundsätzlich können zwei Formen der AMD, die nicht-exsudative (trockene) Form und eine exsudative (feuchte) AMD, unterschieden werden. Bei letzterer kommt es zusätzlich zu der Drusenablagerung, zu einer retinalen Neovaskularisation ausgelöst durch chronische Hypoxie. Die Hypoxie induziert die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, wie *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), wodurch es zur Neubildung von Gefäßen kommt. Diese neuen Gefäße sind allerdings dysfunktional und führen zu retinalen Blutungen und damit einhergehendem massiven Visuseinschränkungen durch Neurodegeneration. Aktuell vorhandene Therapeutika für die exsudative AMD, wie VEGF-Inhibitoren, können den Krankheitsverlauf durch Hemmung der Neovaskularisation, nur verlangsamen. Somit spielt Neuroprotektion bei der Suche nach neuen Therapien der AMD, wie bei der *RP*, eine wichtige Rolle. Insbesondere für die exsudative AMD, mit ausgeprägter Neurodegeneration, ist die Suche nach einem neuroprotektiven Therapieansatz somit von hoher Relevanz [24].

1.4 BDNF und TrkB

Der *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) ist ein neuroprotektiver Faktor, welcher im Zentralen Nervensystem (ZNS) weit verbreitet ist. Er fördert einerseits die Differenzierung von Neuronen und andererseits, wenn pathologische Reize auf Zellen einwirken, Neuroprotektion und somit das Überleben gestresster Zellen [25]. Bekannt ist dieser Faktor bisher vor allem aus der Forschung an neurodegenerativen und psychiatrischen Erkrankungen des Gehirns, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Depression. Hier wird vermutet, dass ein Mangel an BDNF zum Neuronensterben führt. BDNF ist aufgrund dessen bei diesen Erkrankungen in der Theorie sowohl ursächlich als auch therapeutisch nutzbar [26].

1.4.1 TrkB als neuroprotektive Zielstruktur

Der Effekt von BDNF auf Neurone wird auf zellulärer Ebene mittels des BDNF-Rezeptors Tropomyosin Rezeptor Kinase B (TrkB) vermittelt. TrkB ist ein membranständiger Rezeptor, der nicht nur im Gehirn, sondern auch in der Retina von vielen Zellarten, wie RGZ, RPE, MZ, Amakrin- und Horizontalzellen exprimiert wird [27]. Nach Bindung des Liganden BDNF an den Rezeptor kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung der intrazellulär gelegenen Domänen. Es werden verschiedene Signalkaskaden ausgelöst, die zur Aktivierung von Genen für Zellwachstum, Zelldifferenzierung und neuronales Überleben wichtig sind. Zu den wichtigsten Signalwegen zählen die Aktivierung der Kinasen Akt, Erk und Phospholipase C (PLC) (Abb. 4) [28, 29]. Nach der Aktivierung von TrkB durch BDNF kann es zur Internalisierung des Rezeptors kommen [30, 31].

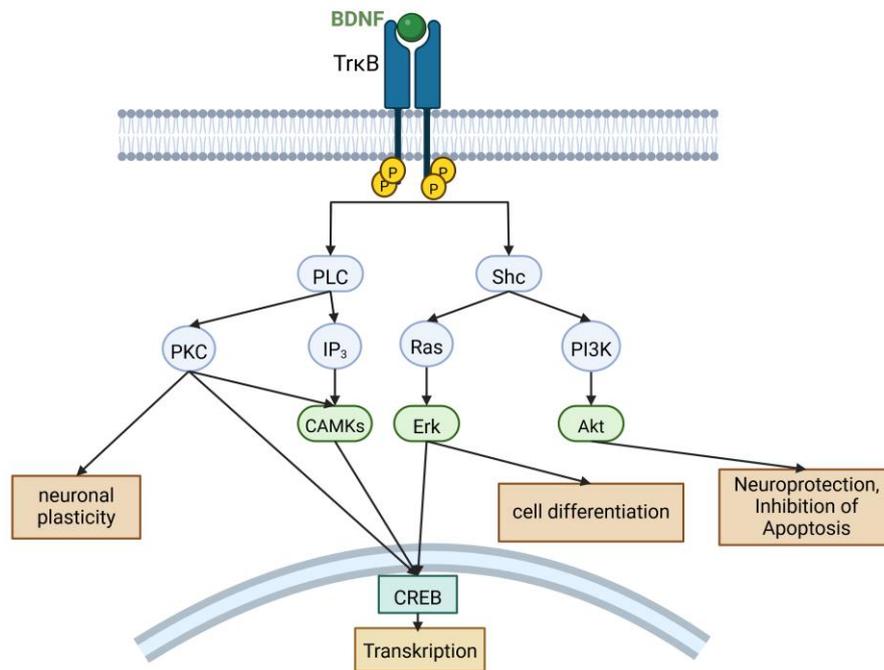


Abbildung 4: TrkB-Signalwegaktivierung durch BDNF-Bindung

BDNF ist Ligand des TrkB-Rezeptors und aktiviert verschiedene Kaskaden. Über verschiedene Signalwege (PLC, Akt, Erk) kommt es zur Förderung von Wachstum, Überleben und Differenzierung von Zellen.

BDNF=Brain derived neurotrophic factor; **PLC**=Phospholipase C, **SHC**= Src homology 2 domain containing protein; **PKC**=Proteinkinase, **IP₃**= Inositol trisphosphate; **PI3K**= Phosphoinositide 3-kinases; **CAMKs**= calmodulin-dependent protein kinase, **Erk**= extracellular signal-regulated kinases, **Akt**=PKB=Proteinkinase B; **CREB**= cyclic amp-response element binding protein.

Erstellt mit BioRender.com

1.4.2 BDNF als TrkB-Ligand

BDNF ist neben Neurotrophin 3 und Neurotrophin 4 einer der natürlichen Liganden des Rezeptors TrkB und bewirkt als voller Agonist eine maximale Aktivierung der Signalkaskaden. In Versuchen an Mäusen konnte die neuroprotektive Wirkung von BDNF an TrkB in der Retina bereits gezeigt werden [32].

Fehlregulationen dieses BDNF-TrkB-Signalwegs wurden bisher vor allem im Rahmen psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen, wie Depression [33] und Morbus Parkinson [34] untersucht. Hier erwies sich der Wachstumsfaktor als wichtiger Mediator für die Neuroprotektion im ZNS [35], da BDNF beispielsweise oxidativen Stress durch Steigerung der SOD-Level reduzieren konnte [36, 37]. Jedoch war der BDNF-TrkB-Signalweg auch im Rahmen der

pathophysiologischen Forschung an neurodegenerativen Erkrankungen des Auges, wie beispielsweise dem Glaukom [38], bereits Teil von Untersuchungen. In einem Forschungsprojekt um Weber *et al.* wurde BDNF als potenzielles neuroprotektives Therapeutikum an Katzen getestet, deren optischer Nerv ein stumpfes Trauma erfahren hatte. Sowohl die einmalige Injektion von BDNF intravitreal als auch die kontinuierliche Applikation des Wachstumsfaktors über zwei Wochen wirkte sich neuroprotektiv auf die RGZ aus. Die BDNF-Langzeittherapie erwies sich jedoch auch als problematisch, da bereits nach vier Wochen der neuroprotektive Effekt nicht mehr nachweisbar war und sich in anderen Langzeitversuchen mit BDNF-Gentherapien an der Retina Veränderungen in der Ganglienzellschicht mit Einschränkungen in der Funktionalität zeigten [39]. Des Weiteren ist bekannt, dass BDNF auch die GABA-erge Transmission im Gehirn beeinflusst und somit nicht ausschließlich über TrkB, sondern auch über andere Rezeptoren wirken kann [29].

Ansätze BDNF als Therapeutikum für neurodegenerative zentrale Prozesse, wie Alzheimer oder Morbus Parkinson, einzusetzen haben des Weiteren gezeigt, dass die exogene Zugabe des neurotrophen Faktors durch die Hyperaktivierung des Rezeptors TrkB und zusätzliche Beeinflussung der GABA-ergen Transmission neurotoxisch wirken kann [40, 41]. Dies war in Versuchen an einem Alzheimer-Mausmodell von Huang *et al.* nachweisbar. Durch exogene Zugabe von BDNF wurde neuropathischer Schmerz als unerwünschte Nebenwirkung induziert [42, 43].

Nicht zu vernachlässigen ist zudem die sehr kurze Halbwertszeit von BDNF (kleiner als 5 min) [44], welche den medikamentösen Einsatz erschwert. Die genannten Eigenschaften machen BDNF zu einer problematischen therapeutischen Option für Neurodegeneration, weshalb in dieser Doktorarbeit ein alternativer Ansatz zu BDNF getestet wurde.

1.4.3 Aptamere als Therapeutika

In dieser Doktorarbeit wurde ein TrkB-Aptamer, publiziert von Huang *et al.*, als mögliche Alternative zu BDNF getestet. Aptamere sind RNA- oder DNA-Oligonukleotide, die synthetisch mittels des *systematic evolution of ligands by*

exponential enrichment (SELEX) Verfahren entwickelt und anschließender PCR vervielfältigt werden. Sie sind hochspezifisch für ausgewählte Zielstrukturen, wie beispielsweise Rezeptoren [45-47] und weisen antikörperähnliche Eigenschaften, wie eine hohe und sehr spezifische Affinität für einen Rezeptor und die Aktivierung von Signalwegen, auf. Im Vergleich zu Antikörpern haben sie den Vorteil, dass sie nicht immunogen wirken und damit potenziell weniger Nebenwirkungen verursachen [48].

Aptamere finden sich bereits in verschiedenen Feldern der Medizin, auch in der Augenheilkunde, als etablierte Medikamente. Beispielsweise für die Therapie von diabetischer Retinopathie und AMD wurde ein VEGF-Aptamer (Pegaptanib) entwickelt, um die pathologische Angiogenese zu hemmen [49]. Das Aptamer konnte sich jedoch gegenüber alternativen Therapeutika, wie die VEGF-Antikörper Ranibizumab oder Bevacizumab, nicht als überlegen erweisen. Deshalb wurde Pegaptanib in Deutschland vom Markt genommen [50-52].

Das in dieser Arbeit hauptsächlich getestete Aptamer von Huang *et al.* ist ein RNA-Aptamer, welches mit hoher Affinität an den TrkB-Rezeptor bindet. Die Bindung am Rezeptor induziert eine Aktivierung der Signalwege, die wachstumssteigernd und neuroprotektiv wirken. Ein Vorteil dieses neuroprotektiven Therapieansatzes ist, dass er unabhängig von den Ursachen und genetischen Mutationen neurodegenerativer Erkrankungen wie AMD und RP angewendet werden kann. Dies ist vor allem deshalb von Bedeutung, da diese Erkrankungen eine Vielzahl an verschiedenen Mutationen und pathogenetischer Ursachen aufweisen. Viele dieser zugrundeliegenden genetischen Faktoren sind zudem noch nicht bekannt [18, 53].

Das TrkB-Aptamer ist im Vergleich zum natürlichen TrkB-Liganden BDNF nur ein partieller Agonist am Rezeptor und bietet in der Theorie somit den Vorteil weniger neurotoxisch zu wirken und BDNF als Therapeutikum potenziell überlegen zu sein [43]. In Vorarbeiten zur Wirkung des TrkB-Aptamers konnte bereits nachgewiesen werden, dass das Aptamer eine TrkB-Aktivierung erzeugen kann, welche mit der Wirkung des endogenen Liganden des Rezeptors, BDNF, vergleichbar ist. Das TrkB-Aptamer, ist somit ein alternativer neuroprotektiver Ansatz als Therapeutikum in der Retina [43, 54].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der Augenheilkunde sind neurodegenerative Erkrankungen von hoher Relevanz. Sie gehen mit einer progredienten Visusminderung einher, welche für betroffene Patient*innen durch massive Einschränkungen des Sehvermögens sehr belastend sind [3, 4]. Bisher existieren für führende neurodegenerative Erkrankungen, wie AMD und *RP*, nur symptomatische Therapieansätze. Deshalb ist die Forschung bezüglich neuroprotektiver Therapieansätze für neurodegenerative Erkrankungen des Auges wichtig und grundlegende Intention dieser Arbeit [7, 18]. Ein Ansatz für therapeutische Neuroprotektion stützt sich auf den im ZNS und Auge exprimierten Rezeptor TrkB und dessen Signalwege. Wie bereits erläutert führt die Aktivierung des Rezeptors durch endogene Liganden, wie den Wachstumsfaktor BDNF, zu Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Neuroprotektion. In der Theorie stellt der TrkB-Rezeptor somit einen vielversprechenden neuroprotektiven Ansatzpunkt in der Netzhaut dar. Diese Doktorarbeit konzentrierte sich auf einen synthetischen Liganden des Rezeptors, ein TrkB-Aptamer [43].

Ziel dieser Arbeit war es die Wirkung und Nebenwirkungen des TrkB-Aptamers in der Retina zu untersuchen, um herauszufinden, ob und in welcher Konzentration das Aptamer von den retinalen Zellen gut vertragen wird und ob es toxische Nebeneffekte auslöst. Die potenziellen neuroprotektiven Effekte des Aptamers wurden am Ende dieser Arbeit in einem BL-Stressmodell überprüft. Der mittels BL induzierte oxidative Stress wurde als Modell für neurodegenerative Erkrankungen wie AMD und *RP* genutzt werden [55].

Die Ergebnisse dieser Arbeit dienen als *ex vivo* Vorarbeit für weiterführende Experimente das TrkB-Aptamer als neuroprotektives Therapeutikum für neurodegenerative Erkrankungen des Auges, wie AMD und *RP*, einzusetzen.

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien

Materialname	Firma (Sitz), Katalognummer
BDNF human	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri USA), B3795-10UG
Neurobasal-A-Medium	Gibco (Thermo Fisher; Waltham, Massachusetts, USA), 10888022
Thin Certs 12 well plate	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich), 665641
B27 custom	Gibco (Thermo Fisher; Waltham, Massachusetts, USA), 0080085SA
N-2 supplement	Gibco (Thermo Fisher; Waltham, Massachusetts, USA), 17502-048
CNTF human	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri USA), 116342
DNase	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri USA), 98545
Papain	Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA), 116378
Nitrocellulosemembran	Amersham (Amersham, UK), 74252
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland), A3942,1000
Gentamycin	Gibco (Thermo Fisher; Waltham, Massachusetts, USA), #94593
HBSS	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), 98524
FBS	Gibco (Thermo Fisher; Waltham, Massachusetts, USA), 98556
Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (D-MEM) Low Glucose Without L-Glutamin	PAA (Pasching, Österreich), E15-005

Material und Methoden

Penicillin/Streptomycin	PAA (Pasching, Österreich), P11-010
Dulbecco`s PBS	PAA (Pasching, Österreich), H15-002
Trypsin-EDTA 25 %	Gibco (Thermo Fisher; Waltham, Massachusetts, USA), 25200
BSA: (bovines Serumalbumin) Albumin bovin Fraction V	Serva (Heidelberg, Deutschland), 11930
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland), A4099
Zellkulturflaschen Cellstar (50 ml, 250 ml)	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich), 61301823, 658170
12, 24 Well-Platten und Thincerts	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich), 665641, 662641
96-Well-Platten	Corning (Corning, New York, USA), 3003023
10 % mini protean TGX precast protein gels 15 well	Biorad (Hercules, California, USA), 4561036
12 % mini protean TGX precast protein gels 15 well	Biorad (Hercules, California, USA), 4561046
Multi-8 Columns	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland), 130-092-444
Multi-8 Filter and Frame	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland), 130-092-548
Intercept TBS Proteinfree Blocking Buffer	Licor (Lincoln, Nebraska, USA), 92780001
Eppendorf Gefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml, 15 ml, 50 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland), 30119401, 3002852, 3000018
G25 Kanülen	Braun (Melsungen, Deutschland)

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

2.2 Assays & Kits

Name	Firma (Land), Katalognummer
In Situ Cell Death Detection Kit TMR red	Roche (Basel, Schweiz), 12156792910
Crystal Violet Solution	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri USA), HT901-8FOZ
CellTiter-Glo® 3D Cell Assay, 10 ml	Promega (Madison, Wisconsin, USA), G9681
CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega (Madison, Wisconsin, USA), G3580
Caspase-Glo® 3/7 Assay-Kit	Promega (Madison, Wisconsin, USA), G8091
MultiMACS™ cDNA Synthesis Kit (12×8)	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland), 130-094-410
Pierce BCA Kit Protein Assay	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA), 23227
Tissue Tek	Sakura (Tokyo, Japan), 4583

Tabelle 3: Verwendete Assays und Kit

2.3 Aptamere

Name	Sequenz (5'-3'), Clusterlänge, Entwickler, Firma (Sitz)
TrkB-RNA-Aptamer	UCGUAUUAUCCGCUGCACGC, 4, Huang <i>et al.</i> [43], Biomers (Ulm, Deutschland)
TrkB-RNA-Kontrollaptamer	UUUGGGGUUUUCCCGUGCCC, 4, Biomers (Ulm, Deutschland)
TrkB-DNA-Aptamer	GGGAGGACGATGCGGTCGTATTATCCGCTGCACGCC AGACTCGCCCGA, Biomers (Ulm, Deutschland)
TrkB-DNA-Kontrollaptamer	GGGTAGGACGATGCGTTTGAGGTTCTCCCGTGCCTC AGACGACTCGCCCGA, Biomers (Ulm, Deutschland)

Tabelle 4: Verwendete Aptamere und BDNF

2.4 Antikörper

Primärantikörper	Wirtsspezies, Verdünnung	Firma (Land), Katalognummer
HSP70	Kaninchen, 1:1000	Santa Cruz (USA), sc-33575
ActinB	Maus, 1:1000	Cell signaling (USA), 3700S
Akt	Maus, 1:2000	R&D Systems, UUO0420031
pAkt	Kaninchen, 1:500	R&D Systems (USA), DZE1921071
BDNF	Maus, 1:100	R&D Systems (USA), VH151802A
TrkB	Kaninchen, 1:500	Proteintech (USA), 13129-1-AP
Bcl-2	Kaninchen, 1:100	Cell signaling (USA), MBS 438100
Bax	Kaninchen, 1:200	Cell signaling (USA), 2772S
TUBB3	Kaninchen, 1:100	R&D Systems (USA), MAB1195
Opsin	Kaninchen, 1:200	Novus Biologicals (USA), Rb0946-1-240509
p63	Kaninchen, 1:200	MyBioSource (USA), MBS4750386
Rhodopsin	Kaninchen, 1:500	Abcam, ab98887

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper

Sekundärantikörper	Wirtsspezies	Firma (Land), Katalognummer
Alexa Fluor 555 Secondary AB (rot), Anti-mouse	Ziege	Thermo Fisher (USA), A-21422
Alexa Fluor 488 Secondary AB (grün), Anti-mouse	Ziege	Thermo Fisher (USA), A-11001
Alexa Fluor 555 Secondary AB (rot), Anti-rabbit	Ziege	Thermo Fisher (USA), A-21428
Alexa Fluor 488 Secondary AB (grün), Anti-rabbit	Ziege	Thermo Fisher (USA), A-11008

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blots

2.5 Primer

Gen	Vorwärts (5'-3')	Rückwärts (3'-5')
<i>ActinB</i>	CACGCCATCCTGCGTCTGGA	AGCACCGTGTTGGCGTAGAG
<i>GFAP</i>	TTAGTGTACCCTCTCGGAAG	AGGTTAGCAGAGGTGACAAG
<i>Opsin</i>	GGGGAGCATCTTCACCTACA	GATGATGGTCTCTGCCAGGT
<i>TNFα</i>	CCCCTGTCCATCCCTTTATT	AAGCCCCAGTTCCAATTCTT
<i>Rhodopsin</i>	CCCATCAACTTCCTCACGCT	TTACACACCACCACGTACCG
<i>BDNF</i>	GCTGGCGGTTTCATAAGGATA	GTTTCCCTCTGGTCATGGAA
<i>CNTF</i>	AAATGGGCATGCAGGTTTAG	CCAAGGGTTTGAAGTGGCTA
<i>HSP70</i>	ATGTCCGCTGCAAGAGAAGT	GGCGTCAAACACGGTATTCT
<i>IL-1β</i>	CCAAAGAGGGACATGGAGAA	TTATATCTTGGCGGCCTTTG
<i>TUBB3</i>	TTCCAGCTCACCCACTCTCT	TGTCGATGCAGTAGGTCTCG

Tabelle 7: Verwendete Primer für qRT-PCR

2.6 Geräte

Name	Firma (Sitz), Katalognummer
Zellkulturschrank/CO ₂ -Inkubator	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zeiss inverses Mikroskop Axiovert 135	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
ELISA-Reader Tecan Spark M10	Tecan (Männedorf, Schweiz)
MultiMACS M96thermo Separator	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland), 130-094-534
Chemicell MagnetoFACTOR96-Plate	Chemicell (Berlin, Deutschland), 9007
Miltenyi MACSiMAG™ Separator	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland), 130-092-168
Miltenyi OctoMACS™ Separator	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland), 130-042-109
Miltenyi MACS MultiStand	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland), 130-042-303
Tecan Infinite® m200 NanoQuant	Tecan (Männedorf, Schweiz)
<i>NanoQuant Plate</i>	Tecan (Männedorf, Schweiz), 30035094
Odyssey Reader	LI-COR (Lincoln, Nebraska, USA)
Cryocut CM1800	Leica (Wetzlar, Deutschland)
RT-PCR Detection System	CFX96, Biorad (Hercules, California, USA)

Tabelle 8: Verwendete Geräte

2.7 Schweineaugen als Versuchsmaterial

Die Versuche in dieser Forschungsarbeit wurden an Schweineaugen vom Schlachthof Balingen, Hindenburgstraße 47, 72336 Balingen durchgeführt. Am Morgen der jeweiligen Schlachtung wurden die Augen entnommen und noch am selben Vormittag für die Versuche präpariert. Die Genehmigungsnummer lautet hierfür DE 08 416 1123 21 (Landratsamt Tübingen).

2.8 Präparation der Schweineaugen

Alle Versuche in dieser Doktorarbeit wurden mit Gewebe und Zellen aus porcinen Augen durchgeführt. Schweineaugen eignen sich aufgrund ihrer anatomischen Ähnlichkeit zum humanen Auge gut für die ophthalmologische *ex vivo* Forschung [56]. Notwendige Materialien zur Präparation waren desinfiziertes Präparationsbesteck und ein Becher mit 70 % Ethanol zum Desinfizieren der Augen, zwei Urinbecher mit PBS zum Waschen, eine Petrischale gefüllt mit Neurobasalmedium und ein Abfallbehälter. Die Schweineaugen wurden, gekühlt transportiert und direkt nach Ankunft im Labor präpariert. Zunächst wurden die Augen außerhalb der Sterilbank von Resten des umliegenden Gewebes an der Sklera mit Schere und Pinzette befreit. Darauf folgte die Inkubation der Augen für 5 min in 70 % Ethanol zum Desinfizieren. Alle weiteren Schritte erfolgten unter der Sterilbank. Es wurde ein Auge zunächst in den Bechern PBS gewaschen und in den Deckel der Petrischale gelegt, damit die Augen bis zur Präparation der Netzhaut nicht austrockneten. Mit dem Skalpell wurde am Rand der Cornea ein kleiner Schnitt gesetzt und diese kreisrund mit Skalpell oder Schere entlang der *Ora serrata* ausgeschnitten. Daraufhin wurde vorsichtig der Glaskörper entfernt und entsorgt. Der Augenbecher wurde nun mit der Schere viermal von außen nach innen eingeschnitten, sodass es die Form eines vierblättrigen Kleeblatts annahm. Die weiteren Schritte hingen davon ab, welches Gewebe oder welche Zellen isoliert werden sollten. Abhängig davon werden die Methodiken in den folgenden Abschnitten erläutert.

2.9 Herstellung retinaler Explantate

Für die Entnahme retinaler Stanzen wurden die Schritte der Augenpräparation, wie in 2.8 genannt, durchgeführt. Zusätzlich wurde ein kleiner Löffel, eine Stanze in gewünschter Größe (1,5 mm, 3 mm, 8 mm), sowie eine geeignete Zellkultur-Platte (Costar) mit passenden Inserts (Greiner Bio) verwendet. Für die Versuche in dieser Arbeit wurden vor allem 8 mm Stanzen in 12-Well Platten mit Inserts kultiviert. Mit der Stanze wurden pro Auge vier kreisrunde Retinastücke ausgestanzt und entnommen, indem der Augenbecher in die Petrischale mit Neurobasalmedium gelegt und mit dem Löffel vorsichtig die Retina vom RPE getrennt wurde. Reste der RPE-Zellschicht wurden mit Neurobasalmedium (Gibco) abgewaschen, bevor die Stanze mit dem Löffel in das Insert gegeben werden konnte. Wichtig bei der Kultivierung von Netzhäuten war die möglichst schonende Behandlung der retinalen Explantate, sowie die richtige Ausrichtung des Gewebes im Insert. Für diese Versuche wurde die Retina mit den Photorezeptoren nach unten und den Ganglienzellen nach oben im Insert kultiviert. Als Nährmedium wurde ein Gemisch aus 48 ml Neurobasalmedium (Gibco), 1 ml B27 (Gibco), 0,5 ml N2 (Gibco), 0,5 ml P/S (PAA), 50 µl Gentamycin (Thermo Fisher) und 0,5 µl CNTF (Sigma Aldrich) verwendet, welches im weiteren Verlauf als Retina-Medium (RM) bezeichnet wird. Davon wurden jeweils 1 ml in das Well der 12-Well-Platte gegeben und 100 µl zu dem retinalen Explantat ins Insert. Der Wechsel des Mediums erfolgte alle zwei Tage. Kultiviert wurde bei 37°C im Inkubator (Heraeus).

2.10 Kultivierung von porcinen Müllerzellen

Alle Schritte der Präparation von Schweineaugen erfolgten wie in 2.8 beschrieben. Nun wurde der Augenbecher in die Petrischale mit Neurobasalmedium (Gibco) gegeben und die Retina vollständig vom RPE gelöst und in HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*, Carl Roth) gewaschen. Daraufhin wurden die entnommenen Netzhäute mit einer Schere zerkleinert und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Dazu wurden 10 µl Papain (Thermo Fisher) und 10 µl DNase (Applichem) gegeben und für 30 min bei 37°C

geschüttelt. Währenddessen wurde eine 12-Well-Platte (Costar) mit 0,1 % Gelatine präpariert, sodass der Boden der Wells gut bedeckt war. Die Inkubation erfolgte für ca. 30 min bei 37°C. Die in der Zwischenzeit lysierten Netzhäute wurden daraufhin mit 1 ml Müllerzellmedium (DMEM low glucose (PAA), 10 % FBS (Gibco), 1 % P/S (PAA)) gemischt und zentrifugiert. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Müllerzellmedium gelöst. Die Gelatine aus der präparierten Platte wurde abgesaugt und pro Well 1 ml Müllerzellmedium vorgelegt, bevor ungefähr 50 µl der Retinasuspension (Zellpellet gelöst in 1 ml Müllerzellmedium) hinzugegeben wurden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Inkubator (Heraeus) und alle drei Tage wurde das Müllerzellmedium gewechselt. Erst wenn die Zellen im Well konfluent gewachsen waren (>80 % bedeckter Boden) konnten die Müllerzellen gesplittet werden. Zum Splitten der Zellen wurde das Medium abgesaugt und stattdessen dieselbe Menge PBS (PAA) auf die Zellen gegeben, um sie zu waschen. Das PBS wurde nach kurzem Schwenken abgesaugt. Nun wurden in jedes Well 150 µl Trypsin-EDTA (Gibco) gegeben und durch vorsichtiges Klopfen die Zellen mechanisch und enzymatisch vom Boden gelöst. Nach 3 min konnte die doppelte Menge Müllerzellmedium hinzugegeben werden, um die Enzymreaktion zu stoppen. Der komplette Inhalt der Wells wurde in ein Falcon (Eppendorf) überführt und für 5 min bei RT und 300 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pallet in 1 ml Müllerzellmedium resuspendiert. Die Resuspension wurde daraufhin in mehrere Well-Platten oder eine Flasche mit Müllerzellmedium überführt, welche wieder mit 0,1 % Gelatine präpariert waren. Ab Passage zwei konnten die MZ für Experimente verwendet werden.

2.11 Behandlung der Müllerzellen

MZ wurden mit verschiedenen Konzentrationen BDNF (Sigma Aldrich), sowie TrkB-Aptamer behandelt. BDNF (Stock-Konzentration, 0,1 mg/ml) wurde für die Behandlung der MZ mit Müllerzellmedium auf die Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml und 500 ng/ml verdünnt. Das TrkB-Aptamer und das Kontrollaptamer (Stock-Konzentration jeweils 100 µM) wurden mit

Müllerzellmedium auf die Konzentrationen 10 nM, 50 nM, 100 nM, 200nM und 500 nM verdünnt.

2.12 Behandlung retinaler Explantate

Für retinale Explantate erfolgte die Verdünnung von BDNF (Stock-Konzentration, 0,1 mg/ml) auf die Konzentrationen 10 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml und 500 ng/ml mit Retinamedium. Das TrkB-Aptamer und das Kontrollaptamer (Stock-Konzentration jeweils 100 μ M) wurden ebenfalls mit Retinamedium auf die Konzentrationen 10 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM und 500 nM verdünnt.

2.13 mRNA/cDNA-Synthese

Die Synthese von mRNA und cDNA aus retinalen Explantaten erfolgte als Vorbereitung zur Quantifizierung der mRNA-Expression verschiedener Gene. Hierfür wurden die Miltenyi MultiMACS cDNA Synthesis Kits von Miltenyi (*MultiMACS cDNA Synthese Kit* und *MultiMACS™ M96thermo Separator*) benötigt. Mittels magnetischer μ MACS Oligo (dT) MicroBeads wurde die mRNA markiert und in magnetisch geladenen Multi-8-Säulen isoliert und damit vom übrigen Zelldebris getrennt. Das Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte durch den reverse Transkriptase Mix des Synthesekits. Ausgangsmaterialien waren retinale Explantate, die nach Kultivierung und gegebenenfalls Behandlung in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen eingefroren wurden. Das gefrorene Gewebe wurde im ersten Schritt schonend auf Eis aufgetaut, durch Zugabe von 900 μ l Lysis-Binding-Buffer (Miltenyi) lysiert und die genomische DNA mithilfe von G25 Nadeln (Braun) durch wiederholtes Pipettieren zerkleinert. Daraufhin wurde das Lysat bei 4°C und 600 G für 4 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 30 μ l Oligo (dT) MicroBeads (Miltenyi) zum Überstand.

Alle weiteren Schritte erfolgten nun auf den magnetischen Säulen, die in den MultiMacs M96thermo Separator eingespannt waren. Dafür wurden die Säulen (Multi 8 Columns, Miltenyi) eingelegt, eine Waschplatte darunter gestellt und

Multi 8 Filter auf die Columns gesetzt. Die Filter wurden dann mit 100 µl Lysis-Binding-Buffer befeuchtet, bevor das Lysat-Microbeats-Gemisch auf die Filter gegeben wurde. Daraufhin wurde mit 2x200 µl Lysis-Binding-Buffer (Miltenyi) gewaschen und die Filter entsorgt. Es folgte ein erneutes Waschen mit 4x100 µl Wash-Buffer (Miltenyi) und 2x100 µl Equilibration-Wash-Buffer (Miltenyi), bevor der Synthesemix (Miltenyi) mit der Reversen Transkriptase des Synthesekits (Miltenyi) aus 20 µl Resuspension-Buffer (Miltenyi) und Synthesemixpulver (Miltenyi) hinzugegeben werden konnte. Daraufhin erfolgte die cDNA-Synthese bei 42°C für 60 min. Im Anschluss wurde mit 2x100 µl Equibrillation-Wash-Buffer gewaschen und 20 µl Release-Solution auf die Säulen gegeben. Das Gerät heizte nun erneut für 10 min auf 42°C. Anschließend wurden 20 µl Elution-Buffer auf die Säulen gegeben und die Waschplatte konnte gegen eine 96-Well-Platte ausgetauscht werden. Als letzter Schritt erfolgte die Zugabe von 50 µl Elution-Buffer (Miltenyi) auf die Säulen und die fertige cDNA konnte aus der 96-Well-Platte in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden.

Die Messung der cDNA-Konzentration erfolgte mithilfe eines TECAN-Readers (Tecan Infinite® m200 NanoQuant). Zunächst wurden hierfür je 2 µl Elutionbuffer (Miltenyi) pro Messtelle für das Blanking eingesetzt. Daraufhin wurde die Platte mit MiliQ gewaschen. Als nächstes wurden 2 µl der Probe pro Messtelle aufgetragen und die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen.

2.14 qRT-PCR

Um die Wirkung des Aptamers auf die Netzhaut genauer untersuchen zu können, wurden die Expression verschiedener Gene ermittelt. Hierfür wurde die *Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR* (qRT-PCR) verwendet. Für jedes untersuchte Gen wurde ein Reaktionsmix aus 1 µl destilliertem Wasser, 2 µl des spezifischen forward Primer, 2 µl des spezifischen reverse Primer und 10 µl SYBR® Green Master Mix (BIO-RAD) pro Well angesetzt. Eine 96-Well Platte (Costar) wurde mit 15 µl Reaktionsmix pro Well befüllt und die zuvor synthetisierte cDNA mit destilliertem Wasser auf 1 ng/µl verdünnt. Zusätzlich zu den 15 µl Reaktionsmix wurden pro Well 5 µl der verdünnten cDNA hinzugegeben. Neben den zu untersuchenden Genen wurden bei jedem

Versuchsansatz *ActinB* und *RPL4* als Housekeeping Gene zur Normierung mitgeführt. Das PCR-Gerät (RT-PCR Detection System CFX96, BIO-RAD) heizte zunächst für 3 min auf 95°C, um die cDNA zu denaturieren und die Polymerase zu aktivieren. Im Anschluss folgten 42 Zyklen, bestehend aus jeweils 10 s bei 95°C und 30 s bei 60°C in denen die Vervielfältigung der spezifischen mRNA sowie die Fluoreszenz-Messungen erfolgten. Nach 60 min war das Programm beendet und die Genexpression konnte mithilfe der ermittelten Ct-Werte über den Pfaffl-Algorithmus errechnet werden [57].

2.14.1 Bicinchoninic acid assay (BCA)

Der *Bicinchoninic acid (BCA) assay* ist eine Methode zur Quantifikation des Proteingehalts einer Probe, wie beispielsweise eines retinalen Explantats. Hierfür wurde das Pierce BCA Kit Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der Proteingehalt wurde ermittelt, um alle zu untersuchenden Proben in der gleichen Konzentration einzusetzen.

Zu Beginn wurden die retinalen Explantate oder kultivierte MZ lysiert. Hierfür wurde ein Lysepuffer (Thermo Fisher Scientific) aus 17 µl (1mM) PMSF-Stocklösung (0,3 M) (Phenylmethylsulfonylfluorid), 5 ml cell extraction buffer (Thermo Fisher Scientific) und 50 µl Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem) hergestellt. Zu einem retinalen Explantat in einem 1,5 ml Eppendorf Gefäß wurden 100 µl Lysepuffer (Thermo Fisher Scientific) hinzugegeben und alles für 30 min auf Eis inkubiert. Mithilfe eines Stößels wurde das Lysat weiter zerkleinert, bis eine homogene Flüssigkeit entstand. Diese wurde daraufhin bei 4°C und 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, das Pellet wurde verworfen. Im letzten Schritt erfolgte die Quantifizierung der Proteinmenge. Als Referenz für die Proteinbestimmung der Probe wurde eine Verdünnungsreihe mit einem Albumin-Standard (200 µg/ml) (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Hierfür wurden Verdünnungen der Konzentrationen 1500 (A), 1000 (B), 750 (C), 500 (D), 250 (E), 125 (F), 25 (G), 0 (H) µg/ml verwendet und pro Konzentration je 10 µl in Triplikaten in eine durchsichtige 96 Well-Platte (Costar) gegeben. Von der untersuchten Probe wurden je 2 µl ebenfalls in Triplikaten in derselben

Well-Platte gegeben und mit je 8 μl PBS (PAA) verdünnt. Im Anschluss wurde sowohl zu den verdünnten Proben als auch zu der Standardverdünnungsreihe 190 μl einer Mischung aus 50 Teilen BCA-Reagenz A (Thermo Fisher Scientific) und einem Teil BCA-Reagenz B (Thermo Fisher Scientific) gegeben. Die Platte wurde daraufhin bei 37°C für 30 min inkubiert, bevor mittels Tecan-Reader (Tecan Infinite® m200 NanoQuant) die Absorption bei 562 nm gemessen werden konnte. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch eine BSA-Kalibriergerade, die aus den Mittelwerten der Standard-Verdünnungsreihe erstellt werden konnte. Die Proteinkonzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ errechnete man, indem die Blank-Werte von allen Mittelwerten der Messwerte abgezogen wurden.

2.15 Western Blot

Um die Menge verschiedener Proteine zu untersuchen, wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) mit anschließendem Western Blot durchgeführt.

Dabei wird das Netzhautlysat nach der Molekülmasse aufgetrennt und die einzelnen Proteine konnten im Western Blot mittels spezifischer Antikörper detektiert werden. Die Auftrennung erfolgte entlang eines elektrischen Felds und war in ihrer Geschwindigkeit abhängig von verschiedenen Parametern, wie beispielsweise Größe, Ladung und Struktur der einzelnen Proteine. Um diese unterschiedlichen Eigenschaften zu normieren, wurde Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate; SDS) (Applichem) verwendet. Dieses ist negativ geladen und bindet an die Proteine, wodurch eine konstante Ladungsverteilung und eine gesteigerte Stabilität der Proteine erzielt werden können.

Die Proteine wurden bei 95°C denaturiert und durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol die Disulfid-Bindungen getrennt. Hiermit wurden die Proteine nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Es gilt dabei, dass kleine Moleküle pro Zeiteinheit weiter Richtung Anode wandern als größere, da diese in der Gitterstruktur des Gels hängen bleiben und abgebremst werden. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine konnten im Western Blot Verfahren auf eine Membran übertragen und mittels spezifischer Antikörper detektiert

werden. Für den Transfer wurden ein Polyacrylamidgel (Biorad) und eine Nitrocellulosemembran (Amersham) in ein elektrisches Feld gebracht. Entlang dieses Feldes wanderten die Proteine senkrecht zur Laufrichtung im Gel auf die Nitrocellulosemembran. War dieser Transfer erfolgt, so konnten mittels Primär- und Sekundärantikörpern spezifisch Proteine sichtbar gemacht werden. Durch den Bezug zu einem Referenzprotein (hier ActinB) war eine semiquantitative Analyse der Proteinmenge möglich. Für diese Doktorarbeit wurden zur Probengewinnung retinale Explantate entnommen und kultiviert, wie in 2.8 beschrieben. Alle Proben wurden mithilfe des ermittelten Proteingehalts mit PBS (PAA) auf 15 µg/µl verdünnt. Danach wurde zum PBS-Proben-Gemisch β-Mercaptoethanol im Verhältnis 1:1 zugegeben und alles bei 95°C für 10 min denaturiert und geschüttelt. Die Lagerung erfolgte bis zur Verwendung der Proben auf Eis.

Für die SDS-PAGE wurden fertige Gele (Mini-PROTEAN TGX Precast Gele (Biorad) entweder mit einer Konzentration von 10 % oder 12 %, je nach Größe des zu untersuchenden Proteins, verwendet. Die Gele stellte man in eine bereitstehende Kammer, welche mit Running Buffer (15,0 g TrisBase, 72,0 g Glycin, 5 g SDS, auf 500 ml mit MilliQ auffüllen) gefüllt war. Die einzelnen Proben konnten daraufhin in die vorgesehenen Taschen gefüllt werden. Als Größenmarker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Bei einer Spannung von zunächst 100 V erfolgte die Gelelektrophorese für 15 min. Daraufhin wurde die Spannung für 30 min auf 150 V erhöht. Anschließend konnte das Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert werden und in einer mit Towbin-Buffer (TrisBase 25 mM), Glycin (192 mM), 20 % SDS (0,005 %), Methanol (20 %), MilliQ H₂O) befüllten Kammer (Biorad) bei 250 mA unter Kühlung erfolgte für 90 min das Blotting. Nach dem Transfer konnten die Membranen entnommen werden und die transferierten Banden mittels Ponceau S sichtbar gemacht werden. Ponceau S interferiert nicht mit den aufgetrennten Proteinen und stellt so eine einfache Technik zur Darstellung der Banden nach der Elektrophorese dar [58, 59]. Die sichtbaren Banden wurden verwendet, um die Membranen in kleinere Stücke zu schneiden. Geblockt wurden die Membranen mittels 5 % BSA in TBS für

60 min bei RT. Im nächsten Schritt wurden spezifische Primärantikörper mit Intercept Protein Blocking-Buffer (LI-COR Bioscience, Homburg, Deutschland) 1:1 in TBS-T (AK-Blocking Puffer) auf die gewünschten Konzentrationen (siehe Tabelle 9) verdünnt und bei 4°C über Nacht auf die Membranen gegeben. Am nächsten Morgen wurde die Membran drei Mal 10 min mit TBS-T gewaschen und mittels passender fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper für 60 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS-T für 15 min erfolgte die Aufnahme der Proteinbanden bei 700 und 800 nm und mit dem Odyssey-Infrarot-Imager-System 2.1 ausgewertet (LI-COR Bioscience, Homburg, Deutschland).

Protein	Beschreibung	Molekülgröße	Verdünnung (in AK-Blocking Puffer)
β-Actin	konstitutiv exprimiertes Protein (<i>housekeeping Protein</i>)	45 kDa	1:1000
HSP70	Chaperon, welches unter schädlichen Bedingungen zum Schutz zellulärer Proteine vermehrt ausgeschüttet wird	70 kDa	1:1000
BDNF	Wachstumsfaktor	28 kDa	1:100
Akt	Downstream Target des TrkB-Pathways, inaktiv	50 kDa	1:2000
pAkt	Downstream Target des TrkB-Pathways, aktiv	60 kDa	1:500
TUBB3	Ganglienzellmarker	55 kDa	1:100
TrkB	Transmembranprotein	130 kDa	1:500
Opsin	Photorezeptor-Marker	55 kDa	1:200
Transducin	Photorezeptor-Marker	40 kDa	1:100
P63	Apoptose Signalweg downstream von p53	60 kDa	1:200
BCL2	Anti-apoptotisch	28 kDa	1:100
Bax	Pro-apoptotisch	20 kDa	1:200

Tabelle 9: Analytierte Proteine im Western Blot

2.16 Immunfluoreszenz

2.16.1 Kryoschnitte

Die Grundlage für die Durchführung verschiedener Färbungen waren in dieser Doktorarbeit Kryoschnitte von porcinen Netzhäuten. Die Retina wurde wie in 2.8 beschrieben entnommen, behandelt und im Anschluss in TissueTek (Sakura) mithilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Anfertigung der histologischen Schnitte erfolgte senkrecht zur Netzhautoberfläche mithilfe eines Cryocuts

(Cryocut CM1800, Leica). Es wurden je drei 12 µm dicke Schnitte pro Objektträger übertragen und bei -28°C bis zur Färbung gelagert.

2.16.2 DAPI-Färbung

Um die Zellkerne der retinalen Zellen sichtbar zu machen, wurde die DAPI-Färbung verwendet. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff namens 4',6-Diamidin-2-phenylindol, welcher nukleär an AT-reiche Sequenzen der DNA bindet und so die Zellkerne bei einer Wellenlänge von 461 nm sichtbar machen kann.

Für die Färbung wurden Kryoschnitte (siehe 2.17.1) auf Objektträgern mit -28°C kaltem Methanol für 15 min fixiert und anschließend in einem dreifachen Waschgang mit TBS gewaschen. Daraufhin wurde DAPI auf 1 µg/ml mit PBS verdünnt und 100 µl für 5 min auf jeden Schnitt gegeben. Im Anschluss wurde erneut mit TBS zweimal und ein letztes Mal mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor die Schnitte nach kurzem Lufttrocknen mit Fluorsafe und Deckgläsern eingedeckelt werden konnten. Bei Anregung mit Ultraviolettem Licht wird die DAPI-gefärbte DNA in den Zellkernen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss inverses Mikroskop Axiovert 135) blau sichtbar gemacht [60].

2.17 TUNEL-Färbung

Das *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) ist eine Färbemethode, bei der apoptotische Zellen sichtbar gemacht werden können. Die im Reagenz enthaltene *terminal deoxynucleotidyl transferase* bindet an endständige 3'Hydroxylgruppen, die durch DNA-Strangbrüche bei der Apoptose entstehen. Diese markierten Enden können mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss inverses Mikroskop Axiovert 135) detektiert werden.

Für diese Doktorarbeit wurde das *In Situ Cell Death Detection Kit TMR red* (Roche) an Kryoschnitten der Retina angewendet (siehe 2.17.1). Im ersten Schritt wurden die Kryoschnitte mit einem Fettstift umrandet und mit 4 % PFA in PBS (PAA) für 20 min bei RT fixiert. Daraufhin wurde für 30 min mit TBS gewaschen. Es folgte die Permeabilisierung mit einer Permeabilisierungslösung

(1 % Triton X-100 in 0,1 % Natriumcitrat) für 2 min auf Eis, bevor erneut mit TBS für 5 min gewaschen wurde. Während die Proben und die Negativkontrolle weiter mit TBS bedeckt blieben, konnten für 10 min 11 µl DNase (Sigma Aldrich) in 40 µl DNase-Puffer (Roche) zur Apoptoseinduktion auf die Positivkontrolle gegeben werden. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit TBS, bevor alle Schnitte, abgesehen von der Negativkontrolle, mit der im Kit enthaltenen *Labeling Solution* (Roche) und der *Enzym-Solution* (Roche) im Verhältnis 10:1 für 60 min bei 37°C im Inkubator (Heraeus) inkubiert wurden. Die Negativkontrolle wurde nur mit der *Labeling Solution* (Roche) bedeckt ebenfalls wie die anderen Proben inkubiert. Daraufhin musste erneut zweifach für je 5 min mit TBS gewaschen werden, bevor analog zu 2.17.2 eine DAPI-Färbung der Zellkerne erfolgte und die Objektträger eingedeckelt wurden. Die Aufnahme der gefärbten Schnitte erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss).

2.18 Assays

2.18.1 Caspase 3/7-Assay

Um zu untersuchen, ob die Behandlung der Netzhäute mit dem Aptamer Apoptose induziert, wurde das *Caspase-Glo® 3/7 Assay-Kit* (Promega) verwendet. Hiermit konnte die Aktivität der Apoptose induzierenden Caspasen 3 und 7 ermittelt werden. Caspasen sind eine Gruppe bestehend aus 12 Cystein-Proteasen, die bei der Induktion des programmierten Zelltods eine Schlüsselrolle spielen. Sie spalten zelleigene Proteine und führen somit über Kettenreaktionen zur Aktivierung von Effektorcaspasen, wie Caspase 3 und 7. Diese aktivieren die Nuklease, welche die DNA spaltet und so zum Tod der Zelle führt [61, 62].

Der Assay wurde in dieser Doktorarbeit auf MZ angewendet, welche in einer 96-Well Platte ausgesät waren. Nach Zugabe von 100 µl Assay-Reagenz pro Well ließ man die Platte bei RT für eine Stunde ruhen. Durch das Assay-Reagenz wurden die enthaltenen Caspasen freigesetzt und die Reaktion mit im Reagenz enthaltenen Substanzen setzte Aminoluziferin frei. Daraufhin konnte die enthaltene Luziferase das Aminoluziferin umsetzen. Diese Reaktion wurde

dann anhand der Lumineszenz im ELISA-Reader gemessen und ermöglichte so die Ermittlung der Aktivität der Caspasen.

2.18.2 Viabilitätsassay mit retinalen Explantaten

Die Viabilität retinaler Explantate wurde mittels des CellTiter-Glo® 3D Cell Assay (Promega) ermittelt. Durch Zugabe von 50 µl Assay-Reagenz zu 150 µl Müllerzellmedium und einer 3 mm Stanze pro Well wurde das Gewebe lysiert. Die Platte wurde für 10 min bei Raumtemperatur (RT) auf einem Schüttelbrett geschüttelt und anschließend bei RT lichtgeschützt 30 min inkubiert. Mittels ELISA-Reader wurde die Lumineszenz gemessen.

2.18.3 MTS-Assay

Um eine Aussage über die Vitalität von Zellen treffen zu können, wurde der MTS Assay genutzt. Im Zuge dieser Arbeit wurden so Informationen über die Toxizität der Aptamer-Behandlung gewonnen. Für die Durchführung wurde das MTS-Kit (*The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*, Promega) verwendet. Im Assay-Reagenz enthaltenes *3-(4,5-Dimethyl-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-Tetrazol (MTS)* wurde durch vitale Zellen über multiple Redoxreaktionen zu Formazan umgesetzt, welches eine blau-violette Farbe hat. Die Absorption des Formazans konnte bei 490 nm gemessen werden und erlaubte Rückschlüsse auf die Menge an lebenden Zellen. MZ wurden in eine transparenten 96er Well-Platte (Marke) ausgesät und laut Versuch behandelt. Das MTS-Reagenz wurde aufgetaut und 20 µl pro Well zu jeweils 100 µl pro Well Zellsuspension (MZ in MZ-Medium) gegeben. Nach 90 min Inkubation bei 37°C erfolgte direkt die Messung der Absorption im ELISA-Reader bei 490 nm und 690 nm als Referenz. In der Auswertung wurde der Mittelwert der Kontrollen auf 100 % festgesetzt und die Probenmesswerte in Bezug auf die Kontrollen dargestellt.

2.18.4 Kristallviolett Färbung

Die Kristallviolett (KV) Färbung erfolgte direkt im Anschluss an den MTS-Assay.

Das Verfahren trifft mittels Messung der Absorption eine Aussage über die Quantität der vitalen, adhärenen Zellen. Im Anschluss an den MTS-Assay wurde das Assay-Reagenz abgekippt und stattdessen 100 µl 4 % *Paraformaldehyd (PFA)* in PBS pro Well für 15 min bei RT auf die MZ gegeben, um sie zu fixieren. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschrte mit je 200 µl destilliertem Wasser pro Well. Danach wurden 100 µl *Crystal Violet Solution* (Sigma Aldrich) in jedes Well gegeben und alles für 30 min bei RT inkubiert. Die *Crystal Violet Solution* wurde dann in drei Waschschrten mit erneut je 200 µl destilliertem Wasser pro Well entfernt und die Zellen für 60 min in 100 µl 1 % *Sodiumdodecylsulfat (SDS)* pro Well bei RT lysiert. In Anschluss konnte die Absorption bei 595 nm im ELISA-Reader gemessen werden. Auch hier wurde in der Auswertung der Mittelwert der Kontrollen auf 100 % festgelegt und die Proben in Bezug dazu gesetzt.

2.19 Blaulicht Bestrahlung

Zur Induktion von oxidativem Stress wurde in dieser Doktorarbeit die Bestrahlung mit Blaulicht (BL) als ex vivo Zellstressmodell gewählt, welches um Fietz *et al.* an porcinen Netzhaut-Explanteten entwickelt wurde [63]. Blaues Licht mit der Wellenlänge zwischen 380 nm und 500 nm kann die vorderen Anteile des Auges (Cornea, Glaskörper) beinah ungehindert passieren und potenziell toxisch in der Netzhaut wirken [64, 65]. Die energiereiche Strahlung erzeugt *reaktive Sauerstoffspezies (ROS)*, die DNA-Schäden und damit Zelltod auslösen können [66]. Hiervon sind insbesondere die Stäbchen, eine Sorte der Photorezeptoren, betroffen [67]. Die Exposition mit BL ist in der Lage in der Retina Neurodegeneration auszulösen und eignete sich damit in dieser Arbeit als Modell für neurodegenerative Erkrankungen, wie beispielsweise der AMD. Für diese Forschungsarbeit wurden sowohl MZ als auch retinale Explantate mit BL bestrahlt. Hierfür wurden MZ in 96-Well-Platten ausgesät und von oben mit einem Abstand von 1 cm mit BL der Wellenlänge 30 nm für 1-2 h bestrahlt. Retinale Explantate kultivierte man in Inserts, wie in 2.8 beschrieben und bestrahlte sie ebenfalls von oben mit einem Abstand von 1 cm und einer Wellenlänge von 30 nm für 1-2 h. Im Anschluss erfolgte die Behandlung der

Proben mit BDNF und TrkB-Aptamer, bevor sie für weitere Versuche bei -28°C eingefroren werden konnten.

2.20 Übersicht über verwendete Marker in qRT-PCR und WB

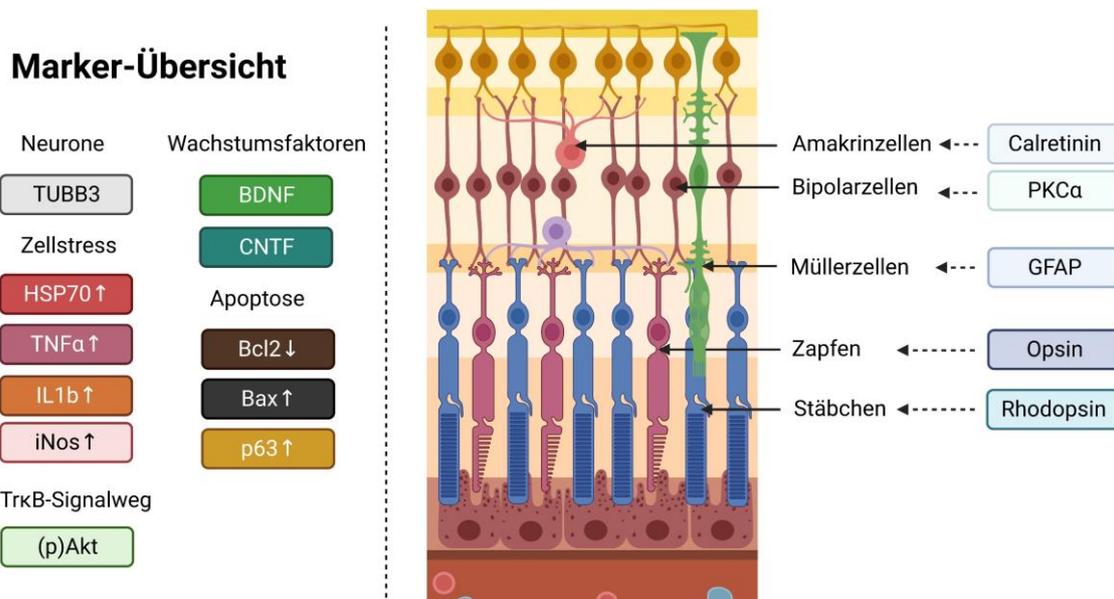


Abbildung 3: Übersicht der verwendeten Marker in qRT-PCR und WB

Linksseitig dargestellt sind die verwendeten zellspezifischen Marker, wie Calretinin für Amakrinzellen, PKCα für BPZ, GFAP für die MZ, Opsin für die Zapfen und Rhodopsin für die Stäbchen. Rechtsseitig abgebildet sind die Marker für Zellstress (HSP70, TNFα, IL-1β), Apoptose (Bax, Bcl-2 und der antiapoptotische Marker Bcl2), die Wachstumsfaktoren BDNF und CNTF, sowie die Marker für die TrkB-Signalwegaktivierung ((p)Akt), (siehe Kapitel 3. Ergebnisse).

Erstellt mit BioRender.com

2.21 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels Graphpad PRISM 9 aus den einzelnen Versuchen. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Bei Normalverteilung der Werte werden die ANOVA oder der (Welch's) t-Test verwendet.

Für nichtnormalverteilte Daten wurden Mann-Whitney-Test und Kruskal-Wallis angewendet. Das Signifikanzniveau wird auf $\alpha = 0,05$ festgesetzt. Signifikanzen werden nach gebräuchlicher Einteilung verwendet: $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$.

3 Ergebnisse

In dieser Doktorarbeit wurde der neuroprotektive Effekt eines TrkB-Aptamers in der Retina untersucht und die Arbeit hierfür in vier Arbeitspakete unterteilt. Zunächst sollte eine geeignete Konzentration des Aptamers etabliert werden, die einerseits den TrkB-Rezeptor effektiv aktiviert und andererseits nicht toxisch auf die Zellen der Retina wirkt. Im nächsten Schritt wurde die im ersten Abschnitt ermittelte Konzentration verwendet, um den zeitlichen Ablauf der Rezeptoraktivierung zu beobachten und mögliche Limitationen, wie beispielsweise eine TrkB-Internalisierung, festzustellen. Das dritte Arbeitspaket widmete sich dem Vergleich des für die bisherigen Versuche verwendeten RNA-TrkB-Aptamer mit einem DNA-TrkB-Aptamer. Im letzten Abschnitt wurde ein BL-Stressmodell eingesetzt, um Neurodegeneration in der Retina zu induzieren und das RNA-TrkB-Aptamer auf seine neuroprotektive und potenziell therapeutische Wirkung bei neurodegenerativen Prozessen der Retina zu testen.

3.1 Optimierung der Aptamerkonzentration

Bevor das Aptamer bezüglich seiner therapeutischen und neuroprotektiven Wirkung untersucht werden konnte, musste eine geeignete Konzentration gefunden und bezüglich potenzieller toxischer Nebeneffekte untersucht werden. Getestete Konzentrationen waren 10 nM, 100 nM, 200 nM und 500 nM. Als Kontrolle wurde ein RNA-Aptamer verwendet, welches eine ähnliche Sequenz und Länge zum eigentlichen TrkB-Aptamer aufweist aber nicht an den Rezeptor binden sollte, und damit nicht zu einer Aktivierung der Signalwege führt („Kontrollaptamer“). Die Konzentrationen für das Kontrollaptamer entsprachen den verwendeten Konzentrationen des RNA-TrkB-Aptamers (10 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM).

3.1.1 Die Rezeptoraktivierung ist abhängig von der TrkB-Konzentration

Eine Ligandenbindung an TrkB aktiviert den Rezeptor und induziert über verschiedene Signalwege wachstumsfördernde und neuroprotektive Effekte [41, 43]. Einige der Signalwegkomponenten wurden als Marker für die effektive Aktivierung des TrkB-Signalwegs durch das TrkB-Aptamer verwendet. Um zu untersuchen, ob die eingesetzte TrkB-Aptamer-Konzentration zur Aktivierung der TrkB-Signalkaskade geführt hat, wurde zunächst die mRNA-Expression der induzierbaren Wachstumsfaktoren *BDNF* und *CNTF* untersucht (Abb. 5 A, B). Hierfür erfolgte die Behandlung porciner, retinaler Explantate nach 24 h Kultivierung für 24 h mit den verschiedenen Konzentrationen der Aptamere (10 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM). Anschließend wurden diese mittels qRT-PCR hinsichtlich der Expression verschiedener Marker untersucht (Abb. 4).

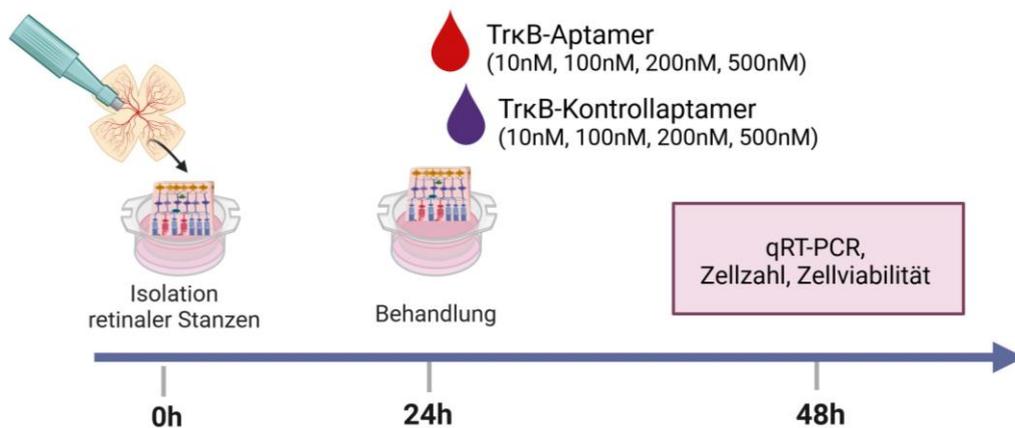


Abbildung 4: Schema des Versuchsaufbaus Isolation retinaler Stanzen und Untersuchung mittels qRT-PCR

Retinale Stanzen wurden isoliert und für 24 h kultiviert. Daraufhin wurden sie mit dem TrkB-Aptamer und Kontrollaptamer in verschiedenen Konzentrationen (10 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM) für 24 h behandelt. Die Untersuchung der mRNA-Expression unterschiedlicher Gene erfolgte mittels qRT-PCR. Zudem wurden die Zellzahl und Zellviabilität kontrolliert.

Erstellt mit BioRender.com

Die Untersuchungen ergaben, dass die Expression der Wachstumsfaktoren *BDNF* und *CNTF* abhängig von der verwendeten Aptamer-Konzentration waren. 100 nM des TrkB-Aptamers führte zu einer signifikanten Induktion (1,7-fach, $p < 0,001$) der *BDNF*-Genexpression (Abb. 5 A). Bei *CNTF* war ebenfalls eine

Induktion (2-fach) der Expression bei der Behandlung mit 100 nM des RNA-Aptamers zu beobachten, jedoch war diese nicht signifikant ($p > 0,05$). Im Gegensatz dazu führten 200 nM TrkB-Aptamer zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression beider Wachstumsfaktoren (0,3-fach, $p < 0,05$, Abb. 5 A, B). Die höchste getestete Konzentration von 500 nM erzeugte keine signifikante Steigerung der Wachstumsfaktor-Expressionen ($p > 0,05$). Der Anstieg der Gen-Expression von *BDNF* und *CNTF* ist auf eine Induktion der Wachstumsfaktor-Transkription durch die TrkB-Rezeptoraktivierung mittels Aptamerbindung zurückzuführen (Abb. 2). Im Gegensatz zum TrkB-Aptamer resultierte die Behandlung mit dem Kontrollaptamer bei keiner der verwendeten Konzentrationen in einer signifikanten Veränderung der Expressionen von *BDNF* und *CNTF* ($p > 0,05$, Abb. 5 A, B).

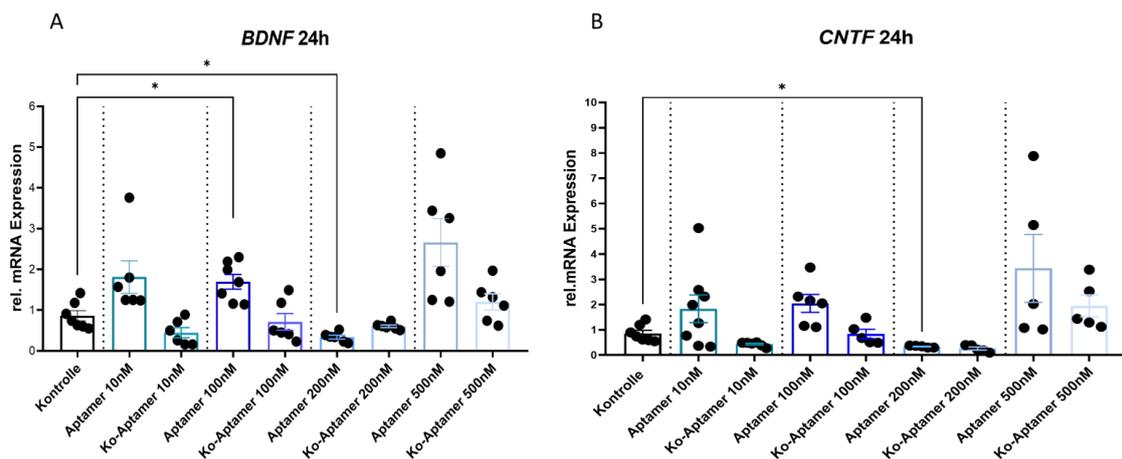


Abbildung 5: RNA-TrkB-Aptamerbehandlung kann die mRNA-Expression von Wachstumsfaktoren signifikant induzieren

Retinale Stanzen wurden nach 24 h Kultivierung mit verschiedenen Konzentrationen TrkB-Aptamer und Kontrollaptamer (10 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM) behandelt und anschließend die Genexpression von *BDNF* (A) und *CNTF* (B) mittels qRT-PCR analysiert.

(A) Die mRNA-Expression von *BDNF* wurde signifikant durch die Behandlung mit 100 nM TrkB-Aptamer induziert (1,7-fach, $p < 0,05$) und signifikant reduziert bei der Behandlung mit 200 nM TrkB-Aptamer ($p < 0,05$). Das Kontrollaptamer induzierte keine signifikanten Effekte.

(B) Die mRNA-Expression von *CNTF* wurde signifikant reduziert durch die Behandlung mit 200 nM TrkB-Aptamer (0,3-fach, $p < 0,05$). Eine Induktion war bei der Behandlung mit 100 nM TrkB-Aptamer zu beobachten. Das Kontrollaptamer induzierte keine signifikanten Effekte.

Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, $*=p < 0.05$, $n=8$.

3.1.2 Verträglichkeitstest des RNA-Aptamers in der Retina

Um eine toxische Wirkung der getesteten RNA-Aptamer-Konzentrationen auf retinale Zellen auszuschließen, wurden zelluläre Marker (*GFAP* für Gliazellen und *Opsin* für Zapfen) abgefragt (Abb. 6 A, B). Auch hier konnte ein dosisabhängiger Effekt auf die Marker-Expression ausgemacht werden, analog zu den Wachstumsfaktoren *BDNF* und *CNTF*. 100 nM und 500 nM des TrkB-Aptamers führten zu einem Anstieg der *GFAP*-Expression, welcher jedoch nicht signifikant war ($p > 0,05$). Die Konzentration von 200 nM senkt die Expression hingegen signifikant ($p < 0,001$, Abb. 6 A). Eine Steigerung der *GFAP* mRNA-Expression deutet auf eine Aktivierung von MZ und/oder Astrozyten hin [68]. *Opsin* induzierte eine Steigerung der Expression bei TrkB-Aptamerkonzentrationen von 10 nM, 100 nM und 500 nM, wobei lediglich die Steigerung bei einer Konzentration von 100 nM signifikant war (3,7-fach, $p < 0,01$, Abb. 6 B). Das RNA-Kontrollaptamer führte erneut zu keiner signifikanten Veränderung in der Expression der Marker (Abb. 6 A, B).

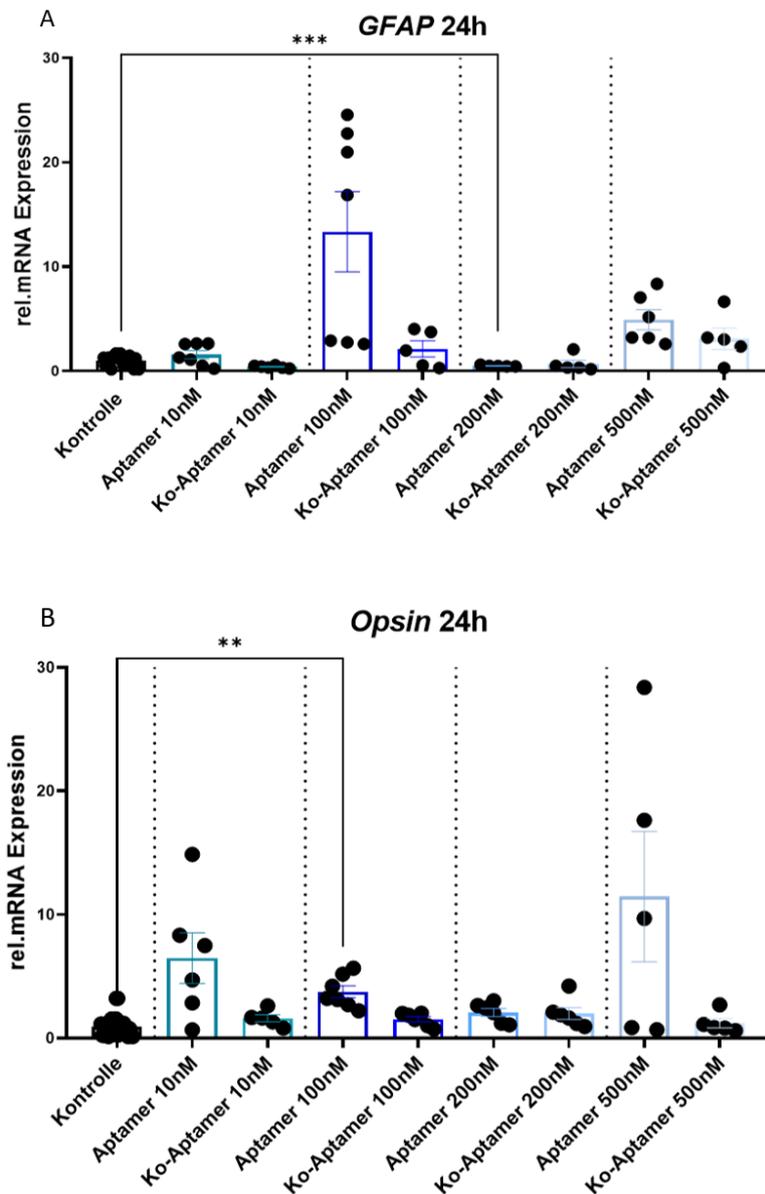


Abbildung 6: RNA-TrkB-Aptamerbehandlung kann die mRNA-Expression von zellspezifischen Markern signifikant induzieren

Retinale Stanzen wurden nach 24 h Kultivierung mit verschiedenen Konzentrationen RNA-TrkB-Aptamer und RNA-Kontrollaptamer (10 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM) behandelt und anschließend die Genexpression der zellspezifischen Marker *GFAP* (A) und *Opsin* (B) analysiert.

- (A) Die mRNA-Expression von *GFAP* wurde durch die Behandlung mit 100 nM TrkB-Aptamer induziert, jedoch nicht signifikant. Durch die Behandlung mit 200 nM TrkB-Aptamer wurde sie signifikant reduziert (0,5-fach, $p < 0,001$). Das Kontrollaptamer löste keine signifikanten Effekte aus.
- (B) Die mRNA-Expression von *Opsin* wurde durch die Behandlung mit 100 nM (3,7-fach, $p < 0,01$) TrkB-Aptamer signifikant induziert. Das Kontrollaptamer löste keine signifikanten Effekte aus.

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, $*=p < 0,05$; $**=p < 0,01$; $***=p < 0,001$, $n=8$.

Die Zellstressmarker *HSP70* und *TNF α* wurden untersucht, um zu zeigen, dass Konzentrationen die zu einer Signalwegaktivierung führten keine toxischen Effekte induzieren (Abb. 7 A, B). Die *HSP70*-mRNA-Expression wurde bei einer Behandlung mit 500 nM TrkB-Aptamer signifikant induziert (4-fach, $p < 0,05$, Abb. 7 A). Auch die mRNA-Expression von *TNF α* wurde signifikant gesteigert bei der Behandlung mit 200 nM und 500 nM TrkB-Aptamer (200 nM: 2,1-fach, 500 nM: 3,5-fach, $p < 0,05$, Abb. 7 B). Die Konzentrationen von 200 nM und 500 nM TrkB-Aptamer erwiesen sich somit als zu hoch, da sie toxische Effekte induzierten. Niedrigere Konzentrationen des Aptamers und des Kontrollaptamers führten zu keiner signifikanten Änderung der Zellstressmarker-Expression auf mRNA-Ebene und induzierten somit keine toxischen Effekte in der Netzhaut ($p > 0,05$; Abb. 7 A, B).

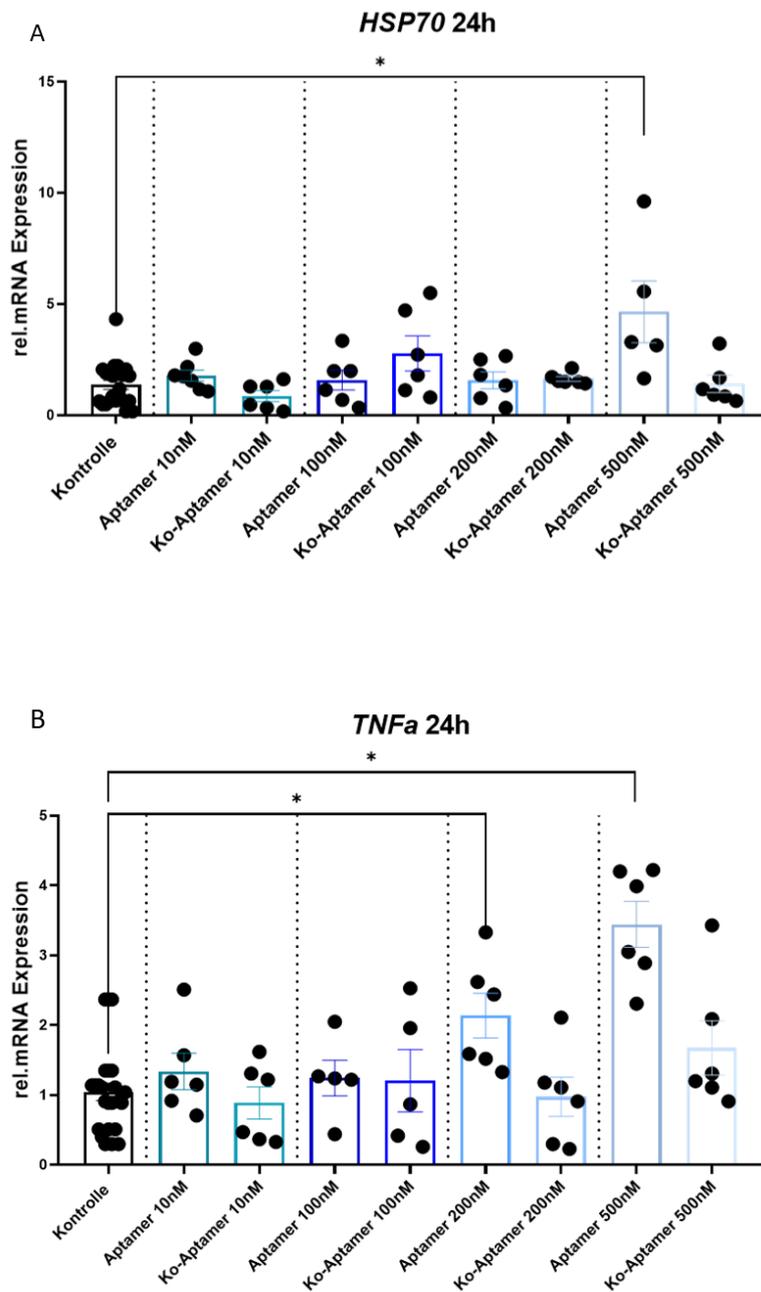


Abbildung 7: Hohe Konzentrationen des RNA-TrkB-Aptamers induzieren signifikant die mRNA-Expression von Zellstressmarkern

Retinale Stanzen wurden nach 24 h Kultivierung mit verschiedenen Konzentrationen RNA-TrkB-Aptamer und RNA-Kontrollaptamer (10 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM) behandelt und anschließend die Genexpression von *HSP70* (A) und *TNFα* (B) analysiert.

(A) Die mRNA-Expression von *HSP70* wurde durch die Behandlung mit 500nM TrkB-Aptamer signifikant um den Faktor vier induziert ($p < 0,05$). Das Kontrollaptamer löste keine signifikanten Effekte aus.

(B) Die mRNA-Expression von *TNFα* wurde durch die Behandlung mit 200 nM (2,1-fach, $p < 0,05$) und 500 nM ($p < 0,05$, Faktor 3) TrkB-Aptamer signifikant induziert. Das Kontrollaptamer erzeugte keine signifikanten Effekte.

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, $*=p < 0.05$, $n=8$.

Analog zur qRT-PCR wurde die Menge des HSP70-Proteins als Zellstressmarker auch im WB untersucht, um toxische Auswirkungen der RNA-TrkB-Aptamer- oder BDNF-Behandlung auf Proteinebene zu erfassen (Abb. 8 A-C). Weder bei einer Behandlungszeit von 24 h noch bei 48 h mit dem TrkB-Aptamer oder BDNF kam es zu einer Steigerung der HSP70-Proteinmenge. Somit ergab sich auch hier kein Hinweis auf die Induktion toxischer Effekte ($p > 0,05$, Abb. 8 A-C). Weitergehend kam es sogar zu einer signifikanten Reduktion dieses Zellstressmarkers nach 24 h Inkubation mit 100 nM TrkB-Aptamer und 100 ng/ml BDNF ($p < 0,05$, Abb. 8 A).

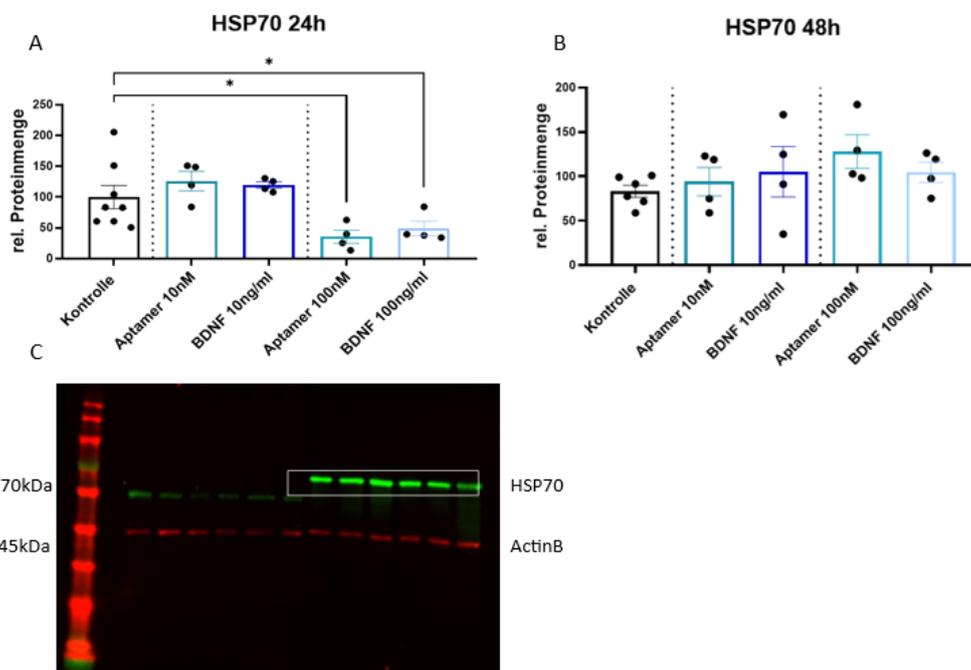


Abbildung 8: Die RNA-TrkB-Aptamerbehandlung reduziert die Menge des Zellstressmarkers HSP70 signifikant

Retinale Explantate wurden nach 24 h Kultivierung mit RNA-TrkB-Aptamer (10 nM, 100 nM) und BDNF (10 ng/ml, 100 ng/ml) in verschiedenen Konzentrationen für 24 h (A) und 48 h (B) behandelt und die Menge von HSP70 mittels WB überprüft.

(A) Nach 24 h Behandlung mit TrkB-Aptamer 100 nM kam es zur signifikanten Reduktion der HSP70-Menge. BDNF reduzierte ebenfalls signifikante die Menge bei 100 ng/ml.

(B) Nach 48 h Behandlung mit TrkB-Aptamer und BDNF konnte keine signifikanten Veränderungen in der HSP70-Menge festgestellt werden.

(C) Western Blot von HSP70: Die HSP70 Banden sind hier in Grün bei 70 kDa zu sehen, darunter in Rot befinden sich die Referenz-Banden von ActinB in Rot bei 45 kDa.

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, $*=p < 0,05$, $n=6$.

Zusammenfassend führte die Behandlung mit 100 nM RNA-TrkB-Aptamer zu einer effektiven Rezeptoraktivierung, da die signifikanten Induktionen der Expression zellspezifischer Marker und Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden konnten. Zudem löste eine Konzentration von 100 nM keine toxischen Effekte in der Netzhaut aus, da es zu keiner Induktion der Expression von Zellstressmarkern kam (Abb. 5-8). Höhere Konzentrationen (200 nM, 500 nM) lösten hingegen Zellstress aus und erwiesen sich somit als therapeutisch ungeeignete Aptamerkonzentrationen. Somit wurde die Konzentration von 100 nM in den folgenden Arbeitspaketen als bevorzugte RNA-Aptamer-Konzentration verwendet.

Die Behandlung mit dem RNA-Kontrollaptamer löste durchweg keine signifikanten Änderungen in der Expression der analysierten Marker aus. Bei einer Konzentration von 500 nM konnten jedoch leichte Steigerungen in der mRNA-Expression, vor allem bei *CNTF* und *TNF α* , beobachtet werden. Diese lassen sich auf eine schwache unspezifische Bindung und Aktivierung des Rezeptors und leichte toxische Effekte zurückführen (Abb. 5, 7).

3.1.3 Viabilität der Müllerzellen ist abhängig von der RNA-TrkB-Aptamer-Konzentration

Eine weitere Absicherung, dass die Aptamer-Behandlung keine toxischen Effekte in der Retina bewirkt, wurden die verschiedenen RNA-TrkB-Aptamerkonzentrationen ergänzend auf MZ getestet. Dazu wurden MZ ausgesät und nach 24 h mit BDNF, dem RNA-TrkB-Aptamer oder dem RNA-Kontrollaptamer behandelt. Als positive Kontrolle wurde die Behandlung mit BDNF eingesetzt (1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml), da BDNF als endogener Wachstumsfaktor nachweislich den TrkB-Rezeptor aktiviert und die damit verbundenen Signalwege aktiviert [43]. Nach 24 h Behandlungszeit wurden zur Untersuchung der Viabilität der MZ deren metabolische Aktivität und die Zellzahl gemessen. Diese wurden dann miteinander ins Verhältnis gesetzt (Ratio, Abb. 9 A, B). Die Behandlung mit den verschiedenen BDNF-Konzentrationen führte zu einer signifikant erhöhten Viabilität der überlebenden MZ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (1,5-fach bis 2-fach, $p < 0,001$,

Abb. 9 A). Eine Behandlung mit 100 nM und 200 nM RNA-TrkB-Aptamer steigerte, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, signifikant die Viabilität der MZ (1,5-fach, $p < 0,001$, Abb. 9 B). In Kombination mit den Ergebnissen der qRT-PCR erwies sich daher die Konzentration von 100 nM TrkB-Aptamer als wirksam und verträglich in der Retina und separat auch in MZ.

Da die Behandlungen mit 10 ng/ml BDNF und 100 nM RNA-TrkB-Aptamer die Viabilität der überlebenden Zellen am stärksten steigerten, wurden diesen Konzentration auch in den folgenden Arbeitspaketen bevorzugt verwendet ($p < 0,001$, Abb. 9 A, B).

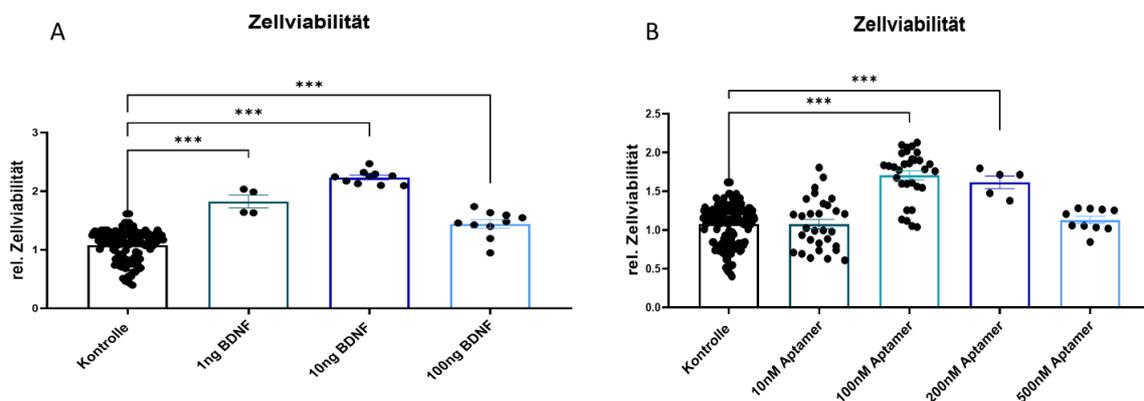


Abbildung 9: Die Behandlungen mit dem RNA-TrkB-Aptamer und BDNF steigern die Zellviabilität von Müllerzellen signifikant

MZ wurden nach 24 h Kultivierung mit verschiedenen Konzentrationen BDNF (A) (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) und RNA-TrkB-Aptamer (B) (10 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM) für 24 h behandelt und anschließend die Viabilität mittels MTS und die Zellzahl überprüft.

- (A) Die Behandlung mit BDNF führte in allen Konzentrationen zu einer gesteigerten metabolen Aktivität, was für eine erhöhte Viabilität spricht. Die stärkste Induktion erfolgt durch die Behandlung mit 10 ng/ml BDNF (2,2-fach, $p < 0,001$).
- (B) Die Behandlung mit TrkB-Aptamer steigerte signifikant die Viabilität der überlebenden MZ. Die stärkste Induktion erfolgte durch die Behandlung mit 100 nM TrkB-Aptamer (1,7-fach, $p < 0,001$).

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test Ordinary one-way ANOVA, $*=p < 0,05$; $**=p < 0,01$; $***=p < 0,001$, $n=12$.

3.2 Zeitlicher Ablauf der TrkB-Rezeptor-Aktivierung

Der Transmembranrezeptor TrkB besitzt verschiedene Liganden, wie beispielsweise BDNF, Neurotrophin-3 und Neurotrophin-4 [69]. Während BDNF, als voller Agonist, zur maximalen Aktivierung der Signalwege des Rezeptors führt stellt das TrkB-Aptamer hingegen einen partiellen Agonisten dar und führt in der Theorie nur zur submaximalen Aktivierung des Rezeptors (Abb. 2). In diesem Arbeitspaket sollte folglich geklärt werden, welchen Einfluss die Bindung

des Aptamers an den TrkB-Rezeptor hat und wie der zeitliche Ablauf der Rezeptoraktivierung ist. In anderen Untersuchungen des TrkB-Rezeptor bezüglich seiner Regulation und Reaktion auf Ligandenbindung konnte beobachtet werden, dass es durch die Bindung physiologischer Rezeptorliganden, wie BDNF, zur Internalisierung von TrkB kam [30]. Um zu überprüfen, ob das verwendete RNA-TrkB-Aptamer ebenfalls eine Internalisierung induzieren kann, wurden retinale Explantate mit dem TrkB-Aptamer und BDNF in verschiedenen Konzentrationen für 24 h und 48 h behandelt. Im Anschluss erfolgten die Analysen der Expression verschiedener Proteine mittels Western Blot (Abb. 10).

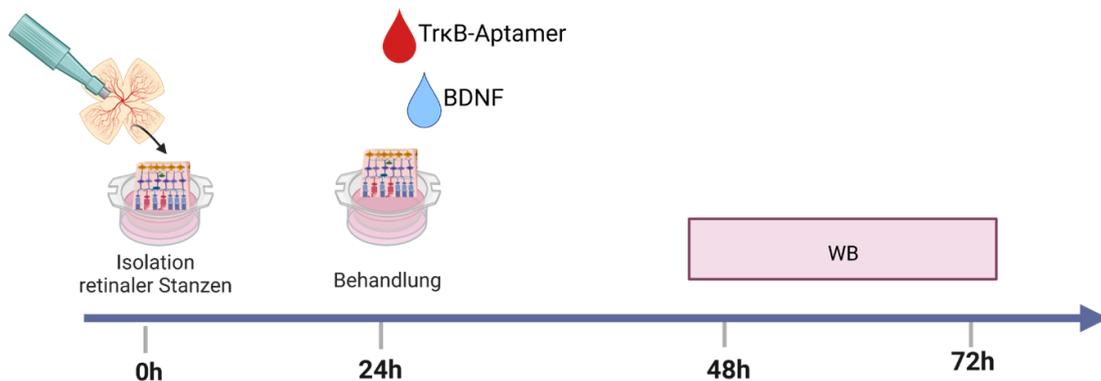


Abbildung 10: Versuchsaufbau-Schema Isolation retinaler Stanzen und Untersuchung mittels WB

Retinale Stanzen wurden isoliert und für 24 h kultiviert. Daraufhin wurden sie mit dem RNA-TrkB-Aptamer (10 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM) und BDNF (10 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml) in verschiedenen Konzentrationen für 24 h behandelt. Die Untersuchung der Expression verschiedener Proteine erfolgte mittels WB.

Erstellt mit BioRender.com

3.2.1 Die Behandlung mit dem RNA-TrkB-Aptamer führt zur Rezeptorinternalisierung

Als primärer Marker bezüglich der Rezeptorinternalisierung wurde TrkB verwendet. Eine signifikante Reduktion der relativen Proteinmenge durch die Behandlung spricht für eine Internalisierung des Rezeptors nach Ligandenbindung. Nach einer Behandlungszeit von 24 h mit dem RNA-TrkB-Aptamer (10 nM, 100 nM) und BDNF (10 ng/ml, 100 ng/ml) konnte keine Reduktion der TrkB-Expression und somit keine Internalisierung des Rezeptors beobachtet werden. Es kam hingegen zur signifikanten Induktion der TrkB-Expression

durch 10 ng/ml BDNF (2,5-fach, $p < 0,01$, Abb. 11 A) und 100 nM TrkB-Aptamer (2-fach, $p < 0,05$, Abb. 11 A). Nach 24 h Behandlungszeit konnten somit weder der endogene Ligand BDNF noch das Aptamer eine Internalisierung von TrkB bewirken. Nach einer Behandlungszeit von 48 h mit 100 nM RNA-TrkB-Aptamer und 100 ng/ml BDNF zeigte sich hingegen eine signifikante Reduktion der TrkB-Rezeptor Expression ($p < 0,01$, Abb. 11 B). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass TrkB sowohl durch die Bindung des vollen Agonisten BDNF als auch durch das RNA-TrkB-Aptamer, einen partiellen Agonisten, nach 48 h Behandlungsdauer internalisiert werden kann (Abb. 11 B).

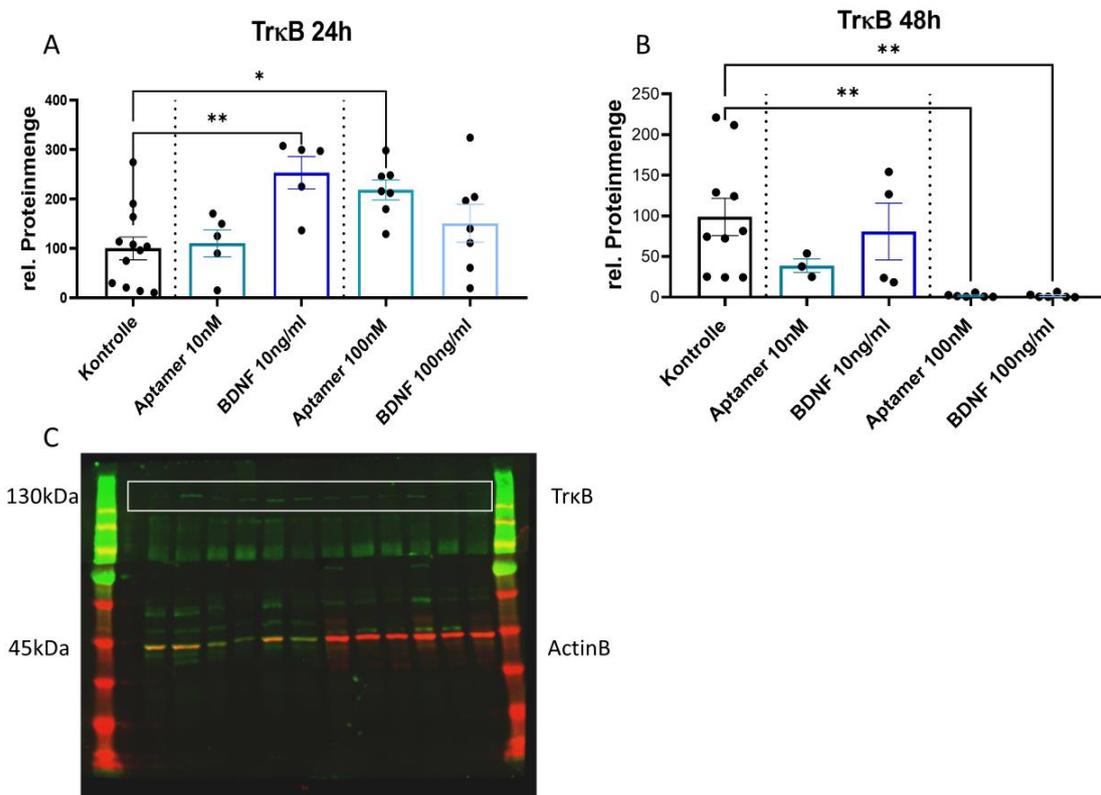


Abbildung 11: Die RNA-TrkB-Aptamerbehandlung führt nach 48 h zur Rezeptor-Internalisierung

Die Behandlung mit RNA-TrkB-Aptamer 100 nM und BDNF 10 ng/ml steigert nach 24 h signifikant die TrkB-Menge. Nach 48 h kommt es mit TrkB-Aptamer 100 nM und BDNF 100 ng/ml zur Internalisierung des Rezeptors. Retinale Explantate werden nach 24 h Kultivierung mit RNA-TrkB-Aptamer (10 nM, 100 nM) und BDNF (10 ng/ml, 100 ng/ml) für 24 h (A) und 48 h (B) behandelt. Daraufhin wird die TrkB-Expression mittels WB überprüft (C).

(A) Nach 24 h führt die Behandlung mit TrkB-Aptamer 100 nM (2-fach, $p < 0,05$) und BDNF 10 ng/ml (2,5-fach, $p < 0,01$) zur signifikanten Induktion der TrkB-Menge.

(B) Nach 48 h führt die Behandlung mit TrkB-Aptamer 100 nM und BDNF 100 ng/ml zur signifikanten Reduktion der TrkB-Menge ($p < 0,01$).

(C) Western Blot von TrkB. Die TrkB-Banden sind in Grün bei 130 kDa dargestellt. Auf der Höhe von 45 kDa sind die roten Banden des Referenzprotein ActinB visualisiert.

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, $* = p < 0,05$; $** = p < 0,01$, $n = 8$.

3.2.2 Das RNA-TrkB-Aptamer führt zur Aktivierung der TrkB-Signalwege

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss des RNA-TrkB-Aptamers auf die Rezeptor-Signalwege untersucht, indem das Verhältnis von Akt und pAkt als Zielproteine und Marker der Signalweg-Aktivierung analysiert wurden (Vergleich Abb. 2). Um zu analysieren, ob die Behandlung mit dem RNA-TrkB-Aptamer (10 nM und 100 nM) bzw. BDNF (10 ng/ml und 100 ng/ml) zu vermehrt phosphoryliertem und daher aktiviertem Akt führt, wurden die retinalen Stanzen 24 h mit diesen Konzentrationen inkubiert.

Bevor die behandelten Explantate auf die Expression anderer Proteine des Signalweges untersucht wurden, erfolgte eine Erfassung des Grundzustands. Hierfür wurden retinale Explantate 24 h kultiviert und im Anschluss direkt, ohne Behandlung, zur Analyse eingefroren. Das Grundlevel der Proteinmenge wurde als „Zeitpunkt 0h“ betitelt (Abb. 12). Im Grundzustand, ohne Behandlung, konnte eine signifikant höheres Verhältnis von Akt zu pAkt ausgemacht werden (3-fach, $p > 0,001$). Somit war der Signalweg ohne Behandlung inaktiv und das Zielprotein Akt weitestgehend unphosphoryliert (Abb. 12).

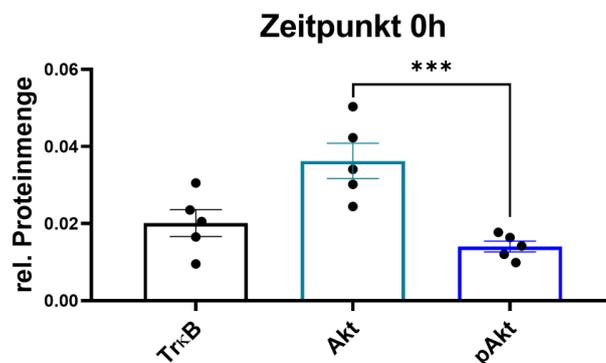


Abbildung 12: Die Proteinmenge an inaktivem Akt ist zum Zeitpunkt 0h signifikant höher als die Proteinmenge des aktivierten pAkt

Retinale Explantate wurden nach 24 h Kultivierung unbehandelt eingefroren und die Menge verschiedener Proteine mittels WB überprüft.

Im Anschluss daran erfolgte die Behandlung der Explantate mit BDNF und dem RNA-TrkB-Aptamer für 24 h und die Analyse des Signalwegmarkers (p)Akt. Die Behandlung mit 10 ng/ml BDNF, sowie 100 nM TrkB-Aptamer führten nach 24 h zu einem signifikant höherem pAkt/Akt-Verhältnis (BDNF: 4-fach, $p < 0,05$;

TrkB-Aptamer: 2,5-fach, $p < 0,05$), verglichen mit dem Grundzustand (Abb. 12, 13 A). Folglich wurde durch die Behandlung mit 100 nM RNA-TrkB-Aptamer für 24 h der Signalweg induziert, da Akt phosphoryliert und damit aktiviert wurde. Behandlungen mit 10 nM TrkB-Aptamer und 100 ng/ml BDNF konnten innerhalb von 24 h keine signifikante Phosphorylierung von Akt hervorrufen ($p > 0,05$, Abb. 13 A).

Die Behandlung über 48 h erbrachte ebenfalls eine signifikante Steigerung des pAkt/Akt-Verhältnisses mittel der Behandlung mit 10 nM und 100 nM RNA-TrkB-Aptamer (4-fach, $p < 0,05$, Abb. 13 B). Jedoch waren bei dieser längeren Behandlungszeit schon 10 nM des Aptamers ausreichend für eine Aktivierung des Signalweges, da hier bereits eine signifikante Steigerung des pAkt/Akt-Verhältnisses zu verzeichnen war (6-fach, $p < 0,001$, Abb. 13 B). Akt wurde folglich bereits durch die niedrigere TrkB-Aptamer-Konzentration von 10 nM phosphoryliert und der Signalweg aktiviert.

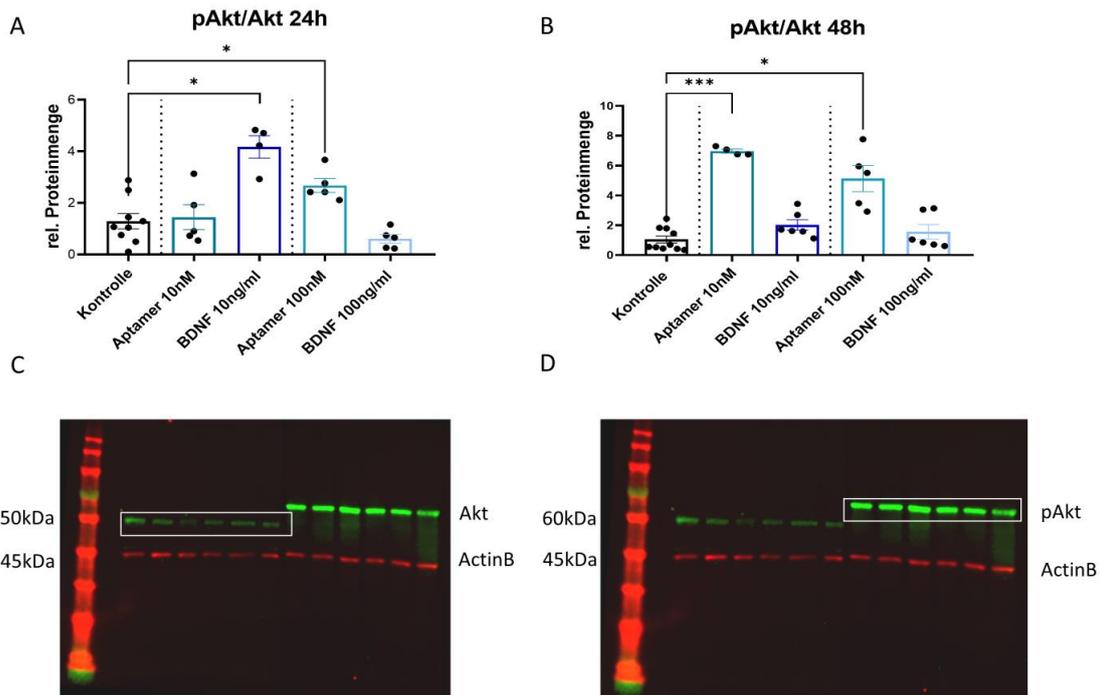


Abbildung 13: Die Behandlung mit dem RNA-TrkB-Aptamer führt zur signifikanten TrkB-Signalwegaktivierung über (p)Akt

Retinale Explantate wurden nach 24 h Kultivierung mit RNA-TrkB-Aptamer (10 nM, 100 nM) und BDNF (10 ng/ml, 100 ng/ml) in verschiedenen Konzentrationen für 24 h (A) und 48 h (B) behandelt und die Menge von pAkt und Akt mittels WB bestimmt. Dargestellt ist das Verhältnis von aktiviertem pAkt zu inaktivem Akt.

- (A) Nach 24 h Behandlung mit TrkB-Aptamer 100 nM ($p < 0,05$, Faktor 2,5) und BDNF 10 ng/ml ($p < 0,05$, Faktor 4) kam es zur signifikanten Steigerung der Menge von pAkt im Verhältnis zu Akt und damit zur Signalwegaktivierung.
- (B) Nach 48 h Behandlung mit TrkB-Aptamer 10 nM ($p < 0,001$, Faktor 6) und 100 nM ($p < 0,05$, Faktor 4,3) kam es zur signifikanten Steigerung der Menge von pAkt im Verhältnis zu Akt und damit zur Signalwegaktivierung. Die Behandlung mit BDNF induzierte keine signifikanten Veränderungen der Menge.
- (C) Western Blots von Akt: Nachweis von Akt im Western Blot bei 50 kDa, hier in Grün. Unterhalb davon, bei 45 kDa, sind die Banden von ActinB, als Referenz, dargestellt.
- (D) Western Blot pAkt: Nachweis der aktivierten/phosphorylierten Form von Akt (pAkt) bei 60 kDa, ebenfalls in Grün dargestellt. Die roten Banden bei 45 kDa visualisieren zu ActinB.

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, $*=p < 0,05$, $**=p < 0,01$, $***=p < 0,001$, $n=6$.

Im Folgenden wurde die Proteinmenge zellspezifischer Marker untersucht, um zu erfassen, welche Effekte die TrkB-Aktivierung auf die einzelnen Zellpopulationen der Retina hat. Die Photorezeptoren, im Speziellen die Zapfen, wurden über die Menge einer ihrer spezifischen Marker S-Opsin untersucht (Abb. 14 A). Nach einer Behandlungszeit von 24 h konnte eine signifikante

Steigerung der Proteinmenge durch die Behandlung mit 100 nM RNA-TrkB-Aptamer (3-fach, $p < 0,05$) beobachtet werden (Abb. 14 A). Bei einer Behandlungsdauer von 48 h zeigte sich bei 10 nM TrkB-Aptamer ein signifikanter Anstieg (3-fach, $p < 0,01$, Abb. 14 B), während die Behandlungen mit 100 nM TrkB-Aptamer und beide BDNF-Behandlungen keine signifikante Erhöhung der S-Opsin-Menge bewirkten ($p > 0,05$, Abb. 14 A,B). Zusammenfassend profitierten die Zapfen von der Behandlung mit dem TrkB-Aptamer. Für die kürzere Behandlungszeit von 24 h erwies sich die Konzentration von 100 nM und für längere Behandlungen über 48 h die Konzentration von 10 nM des RNA-TrkB-Aptamers als besonders wirksam.

Die RGZ wurden mittels des Markers TUBB3 untersucht. Eine signifikante Steigerung in der relativen Proteinmenge durch 100 nM des RNA-Aptamers wurde für 24 h nachgewiesen (1,5-fach, $p < 0,01$, Abb. 14 C). BDNF konnte hingegen keine signifikante Steigerung der Expression des RGZ-Markers bewirken ($p > 0,05$, Abb. 14 C). Nach 48 h wurde ebenfalls eine signifikante Steigerung in der TUBB3-Expression durch die Behandlung mit 10 nM TrkB-Aptamer (3-fach, $p < 0,05$, Abb. 14 D) und 100 nM TrkB-Aptamer erreicht (2-fach, $p < 0,001$, Abb. 14 D). Analog zum pAkt/Akt-Verhältnis war bei einer Behandlungszeit von 48 h die niedrige Konzentration von 10 nM des TrkB-Aptamers ausreichend für einen signifikanten Effekt. 100 nM bewirkten bereits nach 24 h Behandlungsdauer einen signifikanten Effekt. Die Untersuchung der Menge retinaler zellspezifischer Marker zeigte somit, dass die Aktivierung des TrkB-Signalwegs durch das RNA-TrkB-Aptamer auch auf Proteinebene signifikante Effekte auf retinale Neuronenpopulationen erzielen kann.

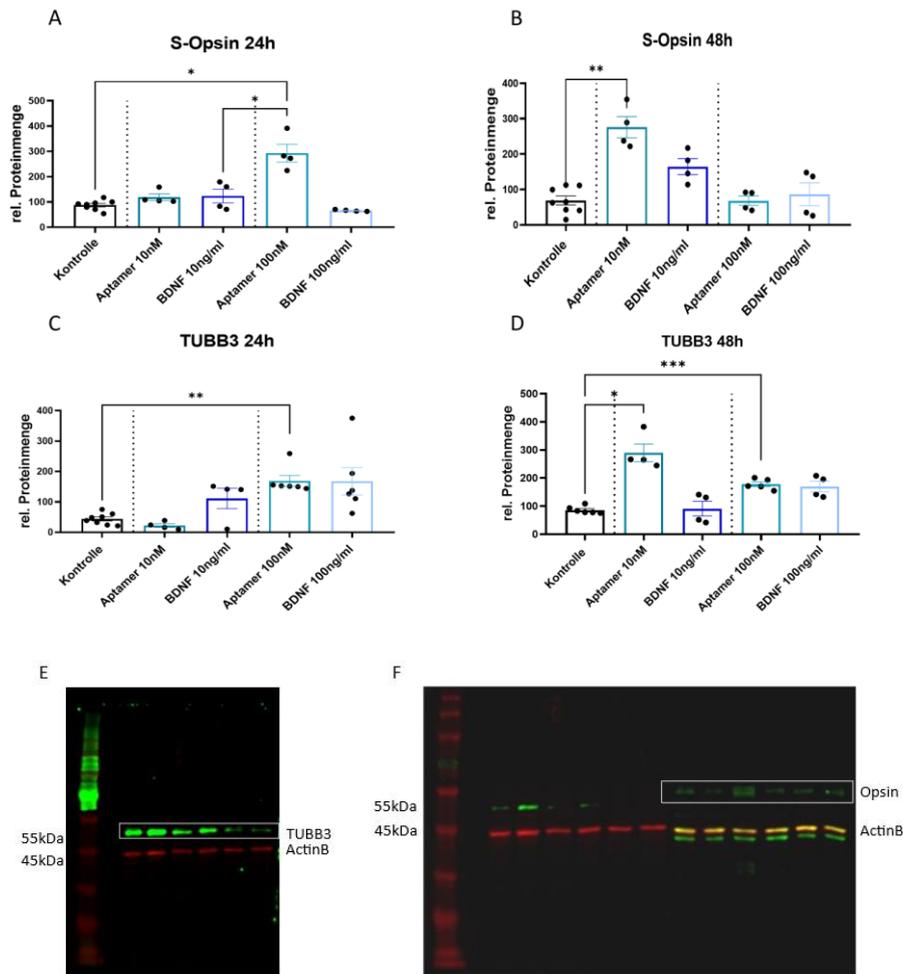


Abbildung 14: Die Behandlung mit dem RNA-TrkB-Aptamer steigert signifikant die Proteinmenge der zellspezifischen Marker S-Opsin und TUBB3

Retinale Explantate wurden nach 24 h Kultivierung mit RNA-TrkB-Aptamer (10 nM, 100 nM) und BDNF (10 ng/ml, 100 ng/ml) in verschiedenen Konzentrationen für 24 h (A,C) und 48 h (B,D) behandelt und die Menge von S-Opsin und TUBB3 mittels WB überprüft.

- (A) Nach 24 h Behandlung mit TrkB-Aptamer 100 nM kam es zur signifikanten Steigerung der S-Opsin-Menge ($p < 0,05$, Faktor 3). BDNF löste keine signifikanten Steigerungen der Menge aus.
- (B) Die TrkB-Aptamer Behandlung mit 10 nM für 48 h führte zur signifikanten Induktion der S-Opsin-Menge ($p < 0,01$, Faktor 3). Die Behandlung mit BDNF induzierte erneut keine signifikanten Veränderungen der Menge.
- (C) Nach 24 h Behandlungszeit mit TrkB-Aptamer 100 nM konnte eine signifikante Induktion der TUBB3-Menge beobachtet werden ($p < 0,01$, Faktor 1,5). Die BDNF-Behandlung führte weiterhin zu keinen signifikanten Veränderungen in der Expression.
- (D) Die Behandlung mit dem TrkB-Aptamer 10 nM und 100 nM für 48 h konnte eine signifikante Steigerung der Menge von TUBB3 erzeugen. Die Steigerung war durch 100 nM TrkB-Aptamer signifikanter ($p < 0,001$, Faktor 1,5), als durch 10 nM TrkB-Aptamer ($p < 0,05$, Faktor 3). Die Behandlung mit BDNF induzierte auch hier keine signifikanten Veränderungen in der TUBB3-Menge.
- (E) Nachweis von TUBB3 im Western Blot bei 55 kDa, hier Grün dargestellt. In Rot bei 45 kDa sind die Banden von ActinB visualisiert.
- (F) Nachweis von Opsin mittels Western Blot in Grün bei 55 kDa. Ebenfalls darunter, bei 45 kDa, ist in Rot ActinB als Referenz dargestellt.

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, n=6.

3.3 Vergleich des RNA- mit dem DNA-TrkB-Aptamer

Das in den vorangegangenen Versuchen verwendete RNA-TrkB-Aptamer wurde von Huang *et al.* im Zuge von Forschungen an neurodegenerativen Erkrankungen im Mäusehirn entwickelt. Es bindet spezifisch an TrkB und wirkt dort als partieller Agonist. Durch verschiedene Modifikationen ist es stabilisiert, um seine spezifische Faltung zu bewahren und den Abbau durch RNAsen zu verhindern [43]. Neben RNA-Aptameren gibt es jedoch auch die Möglichkeit DNA als Grundstruktur zu verwenden. RNA-Aptamere sind teurer in der Herstellung und sie können von Zellen nicht selbst synthetisiert werden. Ein DNA-Aptamer hingegen bietet den Vorteil, dass es günstiger in der Herstellung ist und über Vektoren in Zellen eingebracht und von diesen selbst hergestellt werden kann [47]. Deshalb wird in dieser Doktorarbeit auch ein bisher nicht getestetes DNA-TrkB-Aptamer integriert und mit dem RNA-TrkB-Aptamer bezüglich seiner Wirkung verglichen. Das DNA-TrkB-Aptamer unterscheidet sich in seiner Grundstruktur und Sequenz vom bisher verwendeten RNA-Aptamer, ist jedoch ebenfalls ein hochspezifischer Agonist an TrkB. Seine genaue Faltung und Effekte an TrkB sind bisher unbekannt.

3.3.1 Vergleich der Signalwegaktivierung durch das RNA- und DNA-TrkB-Aptamer

Retinale Explantate wurden für den Aptamervergleich entnommen, kultiviert und nach 24 h mit 100 nM, 200 nM und 500 nM des DNA-TrkB-Aptamers für 24 h behandelt. Als Referenzsubstanz wurde auch hier ein Kontrollaptamer verwendet. Die Untersuchung der Expression verschiedener Gene erfolgte mittels qRT-PCR (Abb. 15).

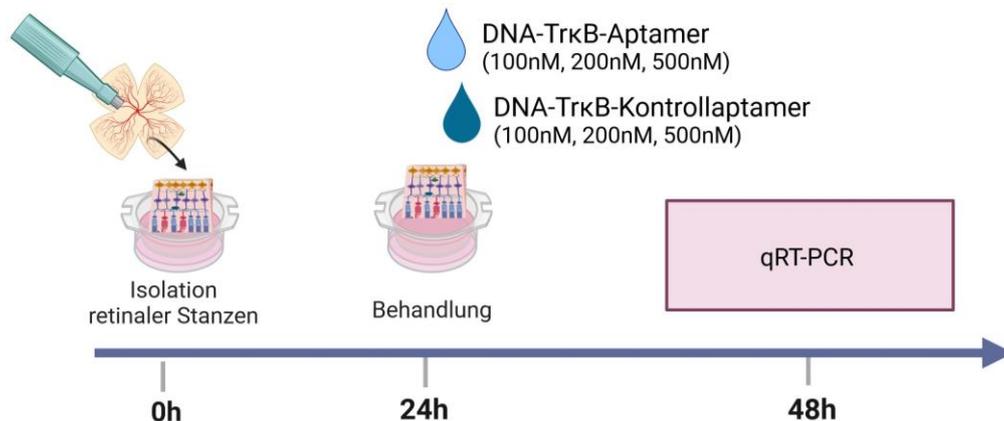


Abbildung 15: Schematischer Versuchsaufbau Isolation retinaler Stanzen und Untersuchung mittels qRT-PCR

Retinale Explantate wurden nach 24 h Kultivierung mit DNA-TrkB-Aptamer (100 nM, 200 nM, 500 nM) in verschiedenen Konzentrationen behandelt und die Expression verschiedener Gene mittels qRT-PCR überprüft.

Erstellt mit BioRender.com

Analog zu 3.1. wurden auch in diesem Arbeitspaket drei große Gruppen an Markerexpressionen mittels qRT-PCR untersucht. Zum einen die Wachstumsfaktoren *BDNF* und *CNTF*, die als Downstream-Targets durch die Behandlung induziert werden (Vergleich Abb. 2, Abb. 16 A, B). Zum anderen wurden zellspezifische Marker, wie *GFAP* (Abb. 17) für die Gliazellen, *Opsin* für die Zapfen, und *TUBB3* für die RGZ (Abb. 18), sowie die Zellstressmarker *TNF α* , *IL-1 β* und *HSP70* (Abb. 18) bezüglich ihrer Expression untersucht.

Durch die Behandlung mit 100 nM DNA-TrkB-Aptamer wurde die mRNA-Expression beider Wachstumsfaktoren *BDNF* und *CNTF* signifikant induziert (5-fach, $p < 0,05$, Abb. 16 A, B). Es kam somit zu einer Aktivierung des Rezeptors und seiner Signalwege durch die Behandlung mit 100 nM des DNA-TrkB-Aptamers. Wurden die retinalen Explantate jedoch mit höheren Konzentrationen inkubiert (200 nM und 500 nM) konnten gegenteilige Effekte beobachtet werden. Sowohl die mRNA-Expression von *BDNF* als auch von *CNTF* wurde signifikant reduziert ($p < 0,05$, Abb. 16 A, B). Diese Konzentrationen des DNA-Aptamers aktivierten den TrkB-Signalwegs somit nicht effektiv.

Das RNA-Aptamer hatte bei einer Konzentration von 100 nM vergleichbare Effekte auf die *BDNF*- und *CNTF*-Expression. Diese Konzentration konnte eine effektive Signalwegaktivierung induzieren (Vgl. 3.1).

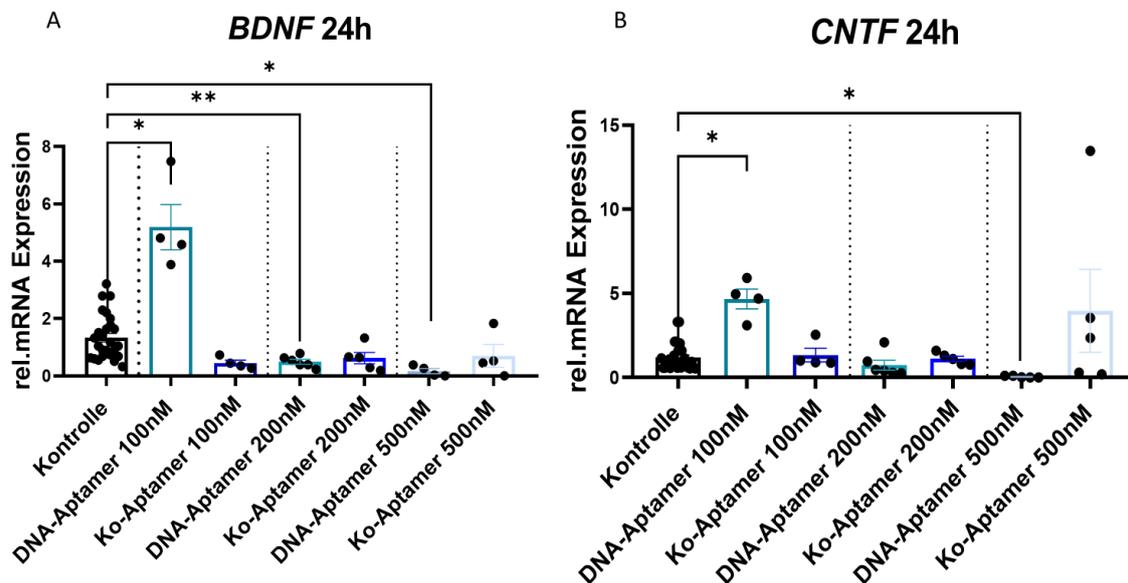


Abbildung 16: Die DNA-TrkB-Aptamerbehandlung führt zur signifikanten Induktion der mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren *BDNF* und *CNTF*

Retinale Explantate wurden nach 24 h Kultivierung mit DNA-TrkB-Aptamer (100 nM, 200 nM, 500 nM) in verschiedenen Konzentrationen behandelt und die mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren *BDNF* (A) und *CNTF* (B) mittels qRT-PCR überprüft.

- A) Durch die Behandlung mit 100 nM DNA-TrkB-Aptamer wurde die mRNA-Expression von *BDNF* signifikant gesteigert ($p < 0,05$, 5-fach). Höhere Konzentrationen des Aptamers führten zu einer signifikanten Reduktion der Wachstumsfaktor-Expression ($p < 0,05$).
- B) Durch die Behandlung mit 100 nM DNA-TrkB-Aptamer wurde die mRNA-Expression von *CNTF* signifikant gesteigert ($p < 0,05$, 5-fach). Höhere Konzentrationen konnten die Wachstumsfaktor-Expression nicht signifikant steigern ($p > 0,05$).

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, $*=p < 0,05$, $**=p < 0,01$, $n=8$.

3.3.2 Vergleich der Effekte der beiden Aptamere auf retinale Zellpopulationen

Im nächsten Schritt wurden die oben bereits eingeführten zellulären Marker für die verschiedenen Zellpopulationen untersucht, um die Wirkung des DNA-Aptamers auf die einzelnen Zellpopulationen der Retina zu untersuchen. Die Ergebnisse des DNA-TrkB-Aptamers wurden dann mit den in 3.1 und 3.2 aufgezeigten Wirkungen des RNA-TrkB-Aptamers verglichen.

GFAP, als Marker für die retinalen Gliazellen, wurde durch die Behandlung mit

100 nM DNA-TrkB-Aptamer für 24 h signifikant gesteigert (5-fach, $p < 0,05$, Abb. 17). Dabei lag die Induktion unter der gesteigerten Expression durch das RNA-TrkB-Aptamers (13-fach, $p < 0,01$, Vgl. Abb. 6). Eine Induktion der GFAP-Expression spricht für eine Aktivierung der MZ und Astrozyten [70] und somit für eine Aktivierung der Zellen mittels TrkB-Rezeptor. Bei den Konzentrationen 200 nM und 500 nM ließen sich hingegen keine signifikanten Effekte beobachten ($p > 0,05$, Abb. 17). Unabhängig von der Grundstruktur zeigten beide Aptamere das Potenzial die MZ zu aktivieren.

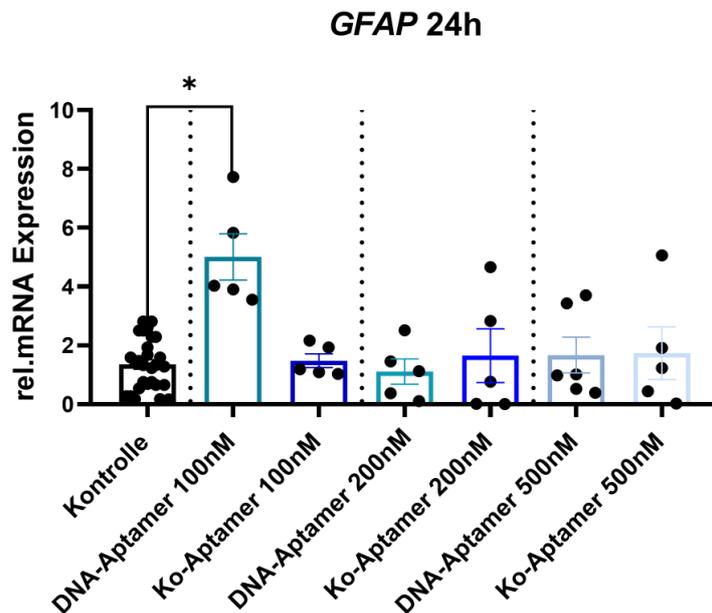


Abbildung 17: Die DNA-TrkB-Aptamerbehandlung führt zur signifikanten Induktion der mRNA-Expression des Gliazellmarkers GFAP 24 h nach Behandlung

Retinale Explantate wurden nach 24 h Kultivierung mit DNA-TrkB-Aptamer (100 nM, 200 nM, 500 nM) in verschiedenen Konzentrationen behandelt und die mRNA-Expression des zellspezifischen Markers *GFAP* für retinale Ganglienzellen mittels qRT-PCR überprüft.

Durch die Behandlung mit 100 nM DNA-TrkB-Aptamer wurde die mRNA-Expression von *GFAP* signifikant gesteigert ($p < 0,05$, 5-fach). Höhere Konzentrationen des Aptamers führten zu keiner signifikanten Steigerung der Expression.

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, $* = p < 0,05$, $n = 8$.

Der RGZ-Marker *TUBB3* wurde, basierend auf den bisherigen Daten zur 100 nM Aptamerkonzentration, nur bei dieser DNA-Aptamer-Konzentration untersucht. Die Behandlung mit dem DNA-TrkB-Aptamer führte dabei zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression ($p < 0,001$, Abb. 18 A), was für eine unterstützende Wirkung der Aptamerbehandlung auf die RGZ spricht.

Zudem wurde eine Sorte der Zapfen, die S-Zapfen für blaues Licht, durch den Marker *S-Opisin* untersucht. Die *Opisin*-Expression wurde signifikant durch die 100 nM DNA-TrkB-Aptamer Behandlung für 24 h induziert (3,8-fach, $p < 0,001$, Abb. 18 B). Auch die Konzentration von 500 nM führte hier zu einer signifikanten Steigerung (5,6-fach, $p < 0,01$, Abb. 18 B). Lediglich die Behandlung mit 200 nM für 24 h löste einen gegenteiligen Effekt aus und reduzierte die mRNA-Expression signifikant ($p < 0,05$, Abb. 18 B). Diese Ergebnisse waren mit den Effekten des RNA-TrkB-Aptamers vergleichbar (Abb. 6), wodurch auch hier beide Aptamer-Behandlungen ähnliche Wirkungen zeigten.

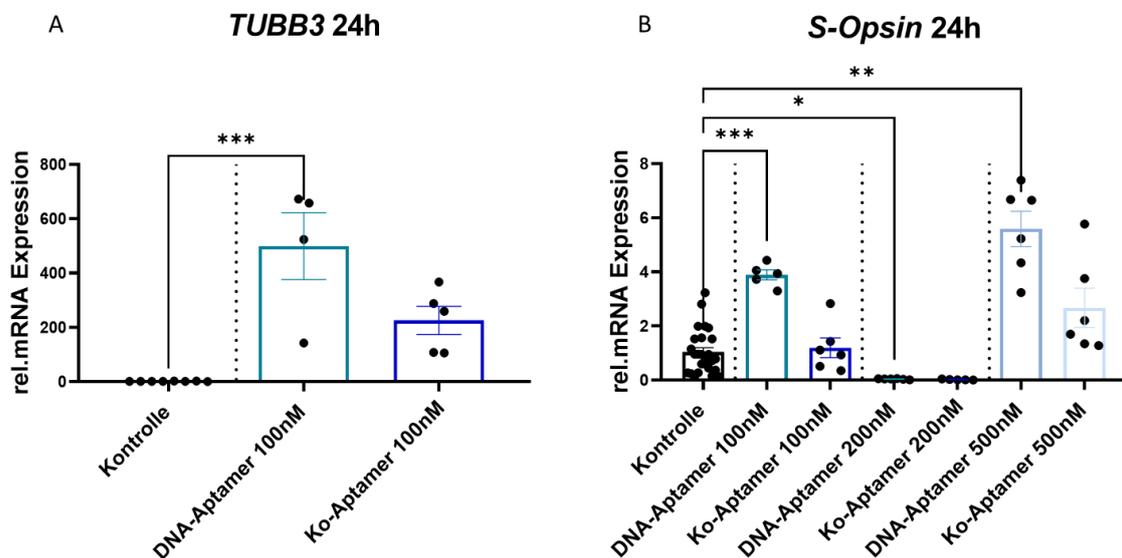


Abbildung 18: Die DNA-TrkB-Aptamerbehandlung führt zur signifikanten Induktion der mRNA-Expression der zellspezifischen Marker *TUBB3* und *S-Opisin*

Retinale Explantate wurden nach 24 h Kultivierung mit DNA-TrkB-Aptamer 100 nM behandelt und die mRNA-Expression der zellspezifischen Marker *TUBB3* (A) für retinale Ganglienzellen und *S-Opisin* (B) für s-Zapfen mittels qRT-PCR überprüft.

(A) Durch die Behandlung mit 100 nM DNA-TrkB-Aptamer wurde die mRNA-Expression von *TUBB3* signifikant gesteigert ($p < 0,001$, Faktor 500).

(B) Durch die Behandlung mit 100 nM DNA-TrkB-Aptamer wurde die mRNA-Expression von *S-Opisin* signifikant gesteigert ($p > 0,001$, 3,8-fach). Auch die höchste Konzentration mit 500 nM führte zu einer signifikanten Steigerung der Marker-Expression ($p < 0,01$, 5,6-fach). 200 nM des DNA-TrkB-Aptamers hingegen senken die Expression von *S-Opisin* signifikant ($p < 0,05$).

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, n=6, n=8.

3.3.3 Verträglichkeitstest des DNA-TrkB-Aptamers

Aufgrund der Tatsache, dass das DNA-TrkB-Aptamer in dieser Doktorarbeit erstmalig getestet wurde, war eine Untersuchung auf mögliche toxische Effekte der Behandlung wichtig. Als Zellstress-Indikatoren wurden die mRNA-Expressionen von *HSP70*, *IL-1 β* und *TNF α* untersucht. Die Behandlung mit DNA-TrkB-Aptamer 100 nM für 24 h zeigte keine Induktion dieser Marker und somit keine toxischen Effekte ($p < 0,05$, Abb. 19 A-C). Die *TNF α* -Expression konnte zudem durch die Behandlung mit 100 nM DNA-Aptamer signifikant reduziert werden ($p < 0,01$, Abb. 19 C). Diese Konzentration induzierte somit keine toxischen Effekte, sondern erwies sich als potenziell neuroprotektiv.

Die Behandlung mit 200 nM DNA-TrkB-Aptamer ergab hingegen eine signifikante Induktion der *HSP70*- und *IL-1 β* -Expression ($p < 0,01$, *HSP70*: 3,6-fach, *IL-1 β* : 2,6-fach, Abb. 19 A, B). Auch bei 500 nM DNA-TrkB-Aptamer-Behandlung ließ sich eine signifikante Induktion der *HSP70*-Expression beobachten ($p < 0,05$, 4,1-fach, Abb. 19 A). Das Kontrollaptamer führte zu keiner signifikanten Änderung der verschiedenen Genexpressionen ($p > 0,05$, siehe Abb. 19 A-C).

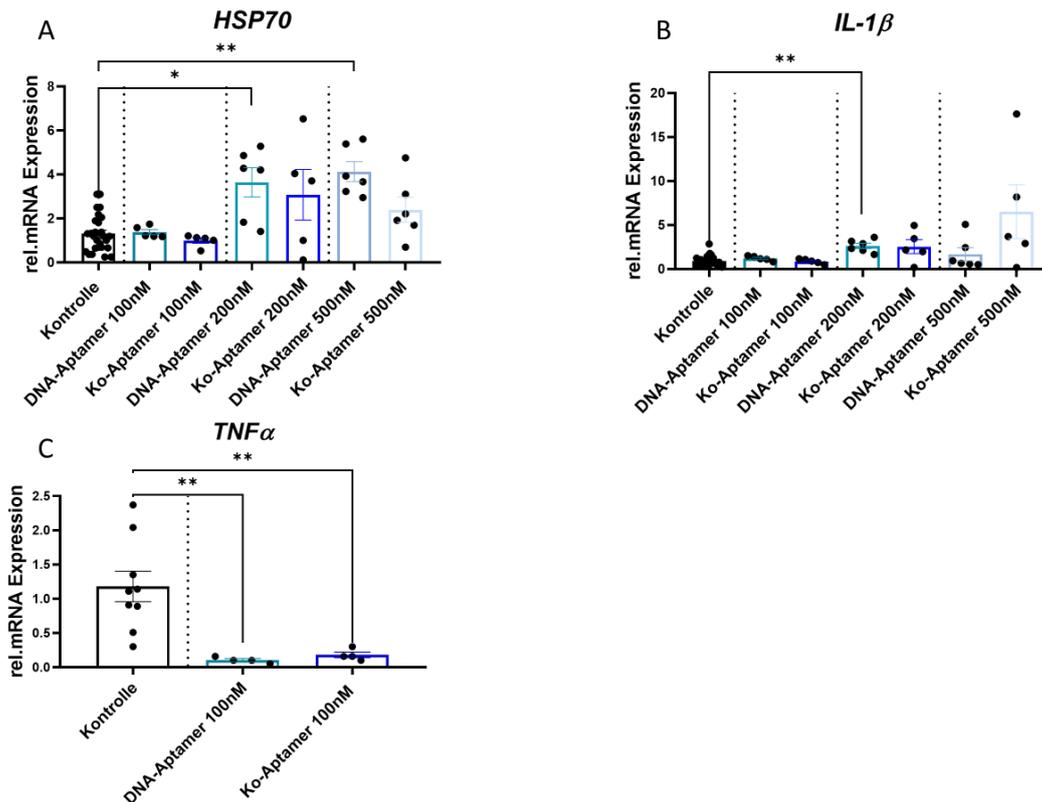


Abbildung 19: Das DNA-TrkB-Aptamer führt in niedriger Konzentration zur Reduktion des Zellstressmarkers *TNFα*. In hohen Konzentrationen kommt es zur signifikanten Induktion der Zellstressmarkerexpression von *HSP70* und *IL-1β*

Retinale Explantate wurden nach 24 h Kultivierung mit DNA-TrkB-Aptamer (100 nM, 200 nM, 500 nM) in verschiedenen Konzentrationen behandelt und die mRNA-Expression der Zellstressmarker *HSP70* (A), *IL-1β* (B) und *TNFα* (C) mittels qRT-PCR überprüft.

- (A) Durch die Behandlung mit 200 nM und 500 nM DNA-TrkB-Aptamer wurde die mRNA-Expression des Zellstressmarkers *HSP70* signifikant gesteigert ($p < 0,05$, 3,6-fach). 100 nM DNA-TrkB-Aptamer zeigte keine signifikanten Effekte.
- (B) Durch die Behandlung mit 200 nM DNA-TrkB-Aptamer wurde die mRNA-Expression des Zellstressmarkers *IL-1β* signifikant gesteigert ($p < 0,01$, 2,6-fach). 100 nM und 500 nM DNA-TrkB-Aptamer induzierte keine signifikanten Effekte.
- (C) Durch die Behandlung mit 100 nM DNA-TrkB-Aptamer wurde die mRNA-Expression des Zellstressmarkers *TNFα* signifikant reduziert ($p < 0,01$).

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, $*=p < 0,05$, $**=p < 0,01$, $n=8$.

Vergleicht man die oben genannten Ergebnisse mit den in 3.1. vorgestellten Daten des RNA-TrkB-Aptamers, so zeigt sich, dass sowohl das DNA-, als auch das RNA-TrkB-Aptamer für eine Behandlungszeit von 24 h die besten Ergebnisse bei einer Konzentration von 100 nM erzielten. Beide Aptamere induzierten dabei signifikant die Expression von Downstream-Targets wie *BDNF* (Abb. 5 A, 16 A) und steigerten signifikant die mRNA-Expression verschiedener retinaler Zellmarker, wie *Opsin* (Abb. 6 B; 18 A). Zellstress wurde hierbei nicht ausgelöst (Abb. 7, 19).

3.4 Neuroprotektiver Effekt des RNA-TrkB-Aptamers im BL-Stressmodell

Oxidativer Stress spielt in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen des Auges, wie AMD und *RP*, eine zentrale Rolle. Um das Aptamer bezüglich seiner neuroprotektiven Wirkung unter oxidativem Stress *in vitro* zu testen, wurde ein BL-Stressmodell verwendet. Wie bereits in 2.19 beschrieben kann die energiereiche Strahlung von BL zur Bildung von ROS und damit zu Zellstress führen.

Retinale Explantate wurden für 1 h bzw. 2 h mit BL bestrahlt und im Anschluss mit 100 nM RNA-TrkB-Aptamer, 100 nM Kontrollaptamer und 10 ng/ml BDNF für 24 h behandelt. In diesem Arbeitspaket wurde nur das RNA-TrkB-Aptamer zur Behandlung verwendet, da über seine Wirkung und Verträglichkeit in der Retina mehr Voruntersuchungen erfolgten als bezüglich des DNA-Aptamers. Die Untersuchung des neuroprotektiven Effekts erfolgte mittels qRT-PCR, Western Blot und verschiedener Assays (TUNEL, 3D-Viabilitätsassay, 3D-Caspase-3/7-Assay) an retinalen Explantaten (Abb. 20).

Aufgrund der in 1.1 genannten Eigenschaften und Funktionen wurden die MZ in diesem Abschnitt der Doktorarbeit separat zu den restlichen retinalen Zellen untersucht. Hierfür wurden primäre porcine MZ kultiviert und für 1,5 h mit 30 mW/cm² Blaulicht bestrahlt. Im Anschluss erfolgte ebenfalls die Behandlung mit dem TrkB-Aptamer und BDNF in verschiedenen Konzentrationen. Der neuroprotektive Effekt wurde hier mittels MTS-Assay und KV-Färbung überprüft (Abb. 21).

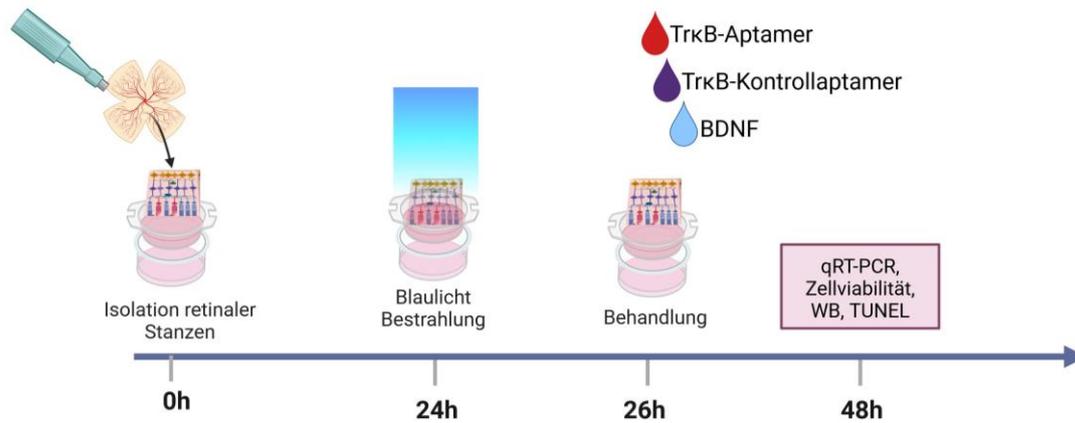


Abbildung 20: Schema des Versuchsaufbaus des BL-Stressmodells und anschließender Behandlung mit dem RNA-TrkB-Aptamer

Retinale Explantate wurden nach 24 h Kultivierung für 1 h und 2 h mit BL 30 mW/cm² bestrahlt und im Anschluss mit TrkB-Aptamer 100 nM und BDNF 10 ng/ml behandelt. Daraufhin erfolgte eine erneute 24 h Kultivierung und im Anschluss wurde die Analyse der Expression verschiedener Gene mittels qRT-PCR durchgeführt.

Erstellt mit BioRender.com

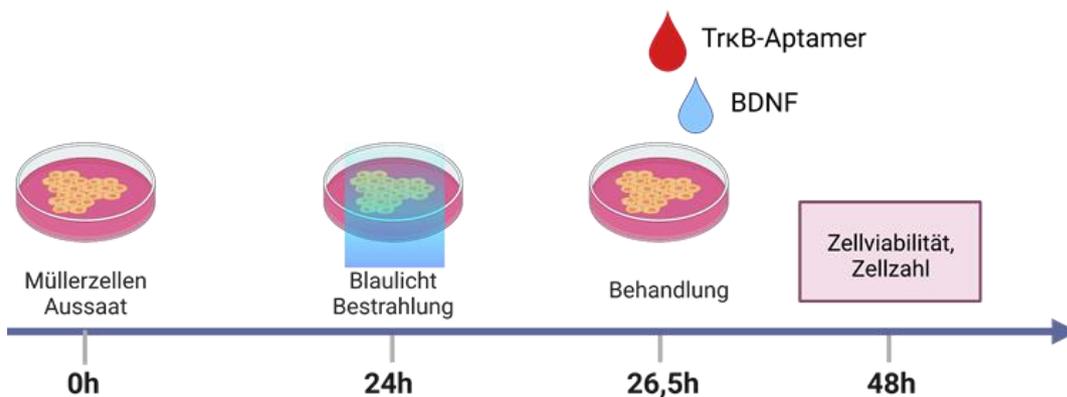


Abbildung 21: Schema des Versuchsaufbaus Induktion von Zellstress in MZ mittels BL-Bestrahlung und danach Behandlung mit RNA-TrkB-Aptamer

Primäre MZ wurden nach 24 h Kultivierung für 1 h und 2 h mit BL 30mW/cm² bestrahlt und im Anschluss mit TrkB-Aptamer 100 nM und BDNF 10 ng/ml behandelt. Daraufhin wurden die Zellen erneut 24 h kultiviert und dann die Zellviabilität mittels MTS und KV analysiert.

Erstellt mit BioRender.com

3.5 Behandlung im BL-Stressmodell

Im ersten Schritt wurde an retinalen Explantaten mittels 3D-Viabilitätsassay überprüft, ob die BL-Bestrahlung die Viabilität der Netzhautzellen senken und somit oxidativen Stress induzieren konnte. Des Weiteren wurde untersucht inwiefern die Behandlung mit dem RNA-TrkB-Aptamer und BDNF einen

protektiven Effekt auf die gestresste Retina hatte. Durch die Bestrahlung der Netzhäute mit BL für 1 h bzw. 2 h konnte die Viabilität jeweils signifikant gesenkt werden ($p < 0,01$, Abb. 22). Dabei ließ sich ein dosisabhängiger Effekt nachweisen. Die längere Bestrahlungsdauer von 2 h führte zu einer stärkeren Reduktion der Viabilität (Abb. 22).

Auf die BL-Bestrahlung folgte direkt die Behandlung der Explantate mit 100 nM RNA-TrkB-Aptamer oder 10 ng/ml BDNF. Diese erhöhte jeweils signifikant die Viabilität der retinalen Zellen, verglichen mit den bestrahlten, aber unbehandelten retinalen Explantaten ($p < 0,05$, Aptamer: 2,5-fach, BDNF: 4-fach, Abb. 22). Den stärksten protektiven Effekt induzierte die Behandlung mit BDNF 10 ng/ml. Die Viabilität konnte hier wieder auf das Level der Kontroll-Gruppe (unbestrahlt, unbehandelt) ansteigen. Die Behandlung mit dem RNA-TrkB-Aptamer hatte denselben Effekt, jedoch in schwächerer Ausprägung. Diese Ergebnisse wiesen auf einen neuroprotektiven Effekt der Behandlung gestresster Netzhäute mit dem RNA-TrkB-Aptamer und BDNF (Abb. 22).

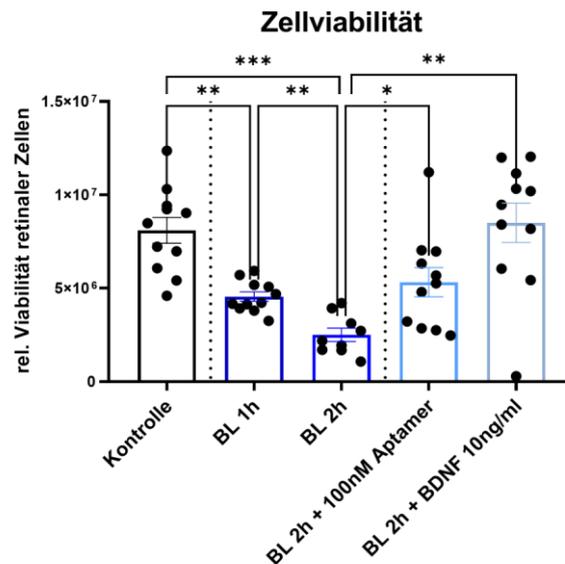


Abbildung 22: Die RNA-TrkB-Aptamerbehandlung verhindert den durch BL induzierten Zellviabilitätsverlust

Retinale Explantate wurden nach 1 h und 2 h BL-Bestrahlung mit RNA-TrkB-Aptamer 100 nM und BDNF 10 ng/ml behandelt. Daraufhin wurden die Zellen 24 h kultiviert und dann die Zellviabilität mittels Viabilitätsassay analysiert.

Nach 1 h und 2 h BL-Bestrahlung sank die Zellviabilität jeweils signifikant, wobei der Effekt durch 2 h BL-Bestrahlung stärker ist ($p < 0,01$). Durch die Behandlung mit TrkB-Aptamer 100 nM und BDNF 10 ng/ml nach 2 h BL-Bestrahlung konnte dies verhindert werden ($p < 0,05$, Aptamer: 2,5-fach, BDNF: 4-fach) im Vergleich zu den unbehandelten, 2 h bestrahlten Explantaten.

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, $*=p < 0,05$, $**=p < 0,01$, $***=p < 0,001$, $n=12$.

3.6 Retinaler Zellstress im BL-Stressmodell

Die genauere Untersuchung des protektiven Effekts des RNA-TrkB-Aptamer in der gestressten Retina erfolgte mittels qRT-PCR und WB. Die relative mRNA-Expression der Zellstressmarker *iNos* und *TNF α* wurde durch die Bestrahlung retinaler Explantate mit BL für 2 h jeweils signifikant gesteigert ($p < 0,05$, *iNos*: 2-fach, *TNF α* : 1,9-fach, Abb. 23 A, B). Die Behandlung mit 100 nM TrkB-Aptamer induzierte eine signifikante Reduktion der durch BL induzierten Stressmarker ($p < 0,05$) und zeigte somit einen neuroprotektiven Effekt (Abb. 23 A-D). Die Behandlung mit 10 ng/ml BDNF konnte hingegen lediglich die relative Proteinmenge von HSP70 signifikant reduzieren ($p < 0,001$, Abb. 23 C-D). Die Behandlung mit dem Kontrollaptamer 100 nM löste keine signifikante Änderung der Expression der Zellstressmarker *iNos*, *TNF α* und HSP70 aus ($p > 0,05$, Abb. 23 A-D).

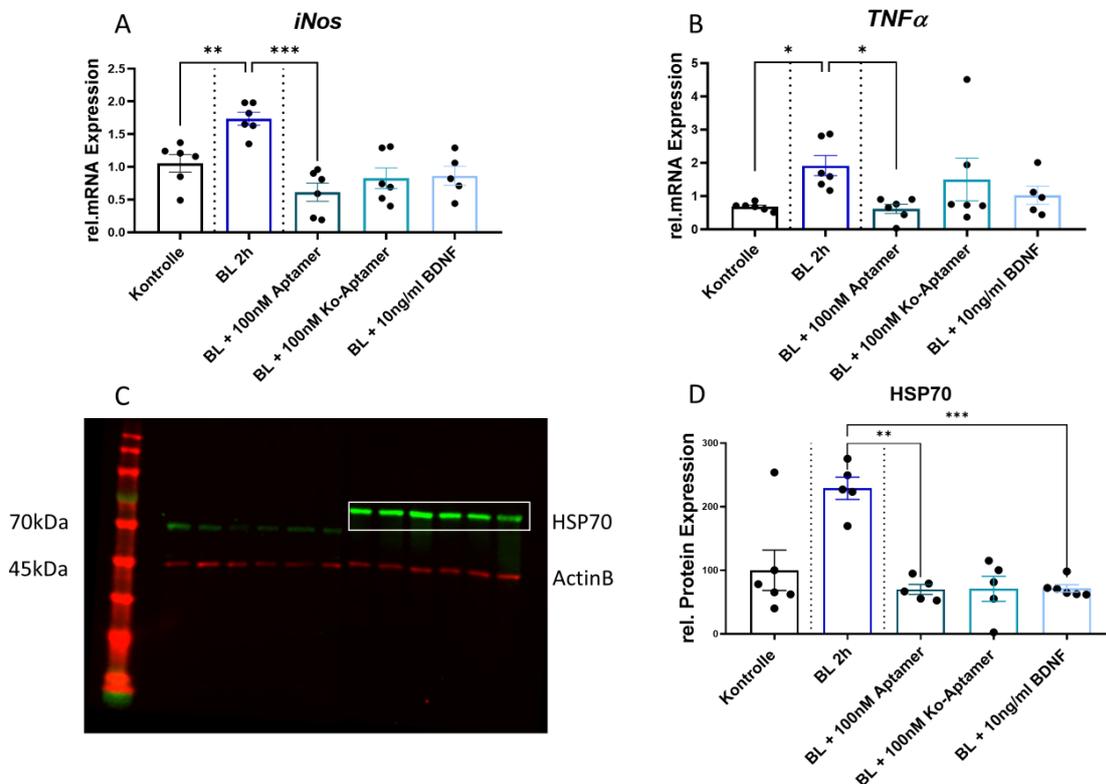


Abbildung 23: Die RNA-TrkB-Aptamerbehandlung reduziert den durch BL induzierten Zellstress in der Retina

Retinale Explantate wurden nach 2 h BL-Bestrahlung mit RNA-TrkB-Aptamer 100 nM, Kontrollaptamer 100 nM und BDNF 10 ng/ml behandelt. Daraufhin werden die Zellen 24 h kultiviert und dann die mRNA-Expression der Zellstressmarker *iNos* (A) und *TNFα* (B), sowie der WB (C) mit der Proteinmenge von HSP70 (D) analysiert.

- (A) Nach 2 h BL-Bestrahlung stieg die *iNos*-Expression signifikant an ($p < 0,01$, 1,6-fach). Die darauffolgende Behandlung mit TrkB-Aptamer 100 nM konnte die Expression wieder signifikant senken.
- (B) Nach 2 h BL-Bestrahlung stieg die *TNFα*-Expression signifikant an ($p < 0,05$, 1,9-fach). Die darauffolgende Behandlung mit TrkB-Aptamer 100 nM wirkte diesem Effekt entgegen.
- (C) Western Blot von HSP70: Die HSP70 Banden sind hier in Grün bei 70 kDa zu sehen, darunter in Rot befinden sich die Referenz-Banden von ActinB in Rot bei 45 kDa.
- (D) Nach 2 h BL-Bestrahlung stieg die HSP70-Proteinmenge an (2,2-fach). Die darauffolgende Behandlung mit TrkB-Aptamer 100 nM konnte die Expression wieder signifikant senken. Auch die Behandlung mit BDNF 10 ng/ml nach der BL-Bestrahlung führte zu einer signifikanten Reduktion der HSP70-Expression.

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, $n = 8$.

3.7 Expression zellspezifischer retinaler Marker nach BL-Bestrahlung

Weitere Marker deren mRNA-Expression in der gestressten Retina untersucht wurden waren *GFAP* (MZ), *Rhodopsin* (Photorezeptoren), *PKCa* (Bipolarzellen) und *Calretinin* (Amakrinzellen). Die relative mRNA-Expression von *GFAP*, einem Marker für die Aktivierung von MZ, wurde durch die 24 h-Behandlung mit 100 nM RNA-TrkB-Aptamer nach 2 h BL-Bestrahlung signifikant gesteigert (10-fach, $p < 0,001$, Abb. 24 A). Die Behandlung mit 10 ng/ml BDNF erhöhte ebenfalls signifikant die *GFAP*-Expression (4-fach, $p < 0,01$, Abb. 24 A). Eine Induktion der *GFAP*-Expression deutet auf eine Aktivierung der MZ hin. Das Kontrollaptamer hatte keine signifikanten Effekte auf die *GFAP*-Expression. *Rhodopsin*, als Marker für die Stäbchen in der Retina, ergab hingegen weder durch die BL-Bestrahlung noch durch die darauffolgende Behandlung mit dem Aptamer, Kontrollaptamer oder BDNF eine signifikante Änderung in der mRNA-Expression ($p > 0,05$, Abb. 24 B). Die relative mRNA-Expression von *PKCa* wurde untersucht, um eine Aussage über eine retinale Neuronenpopulation, die BPZ, treffen zu können. Durch die BL-Bestrahlung konnte eine signifikante Reduktion der *PKCa*-Expression erzielt werden, welche durch die Behandlung mit 100 nM *TrkB*-Aptamer für 24 h nicht nur rückgängig gemacht werden konnte, sondern sogar eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression im Vergleich zur BL-Gruppe, induzierte (2-fach, $p < 0,001$, Abb. 24 C). Durch die Behandlung mit 10 ng/ml BDNF und 100 nM Kontrollaptamer konnten hier keine signifikanten Ergebnisse beobachtet werden ($p > 0,05$, Abb. 24 C). *Calretinin*, als Marker für die Amakrinzellen, wurde analog zu *PKCa* signifikant durch die BL-Bestrahlung reduziert ($p < 0,05$, Abb. 24 D) und durch die darauffolgende Behandlung mit 100 nM Aptamer wieder auf das Ausgangsniveau gehoben (3,2-fach, $p < 0,001$, Abb. 24 D). Auch hier zeigten BDNF und das Kontrollaptamer keine signifikanten Änderungen in der mRNA-Expression von *Calretinin* ($p > 0,05$, Abb. 24 D).

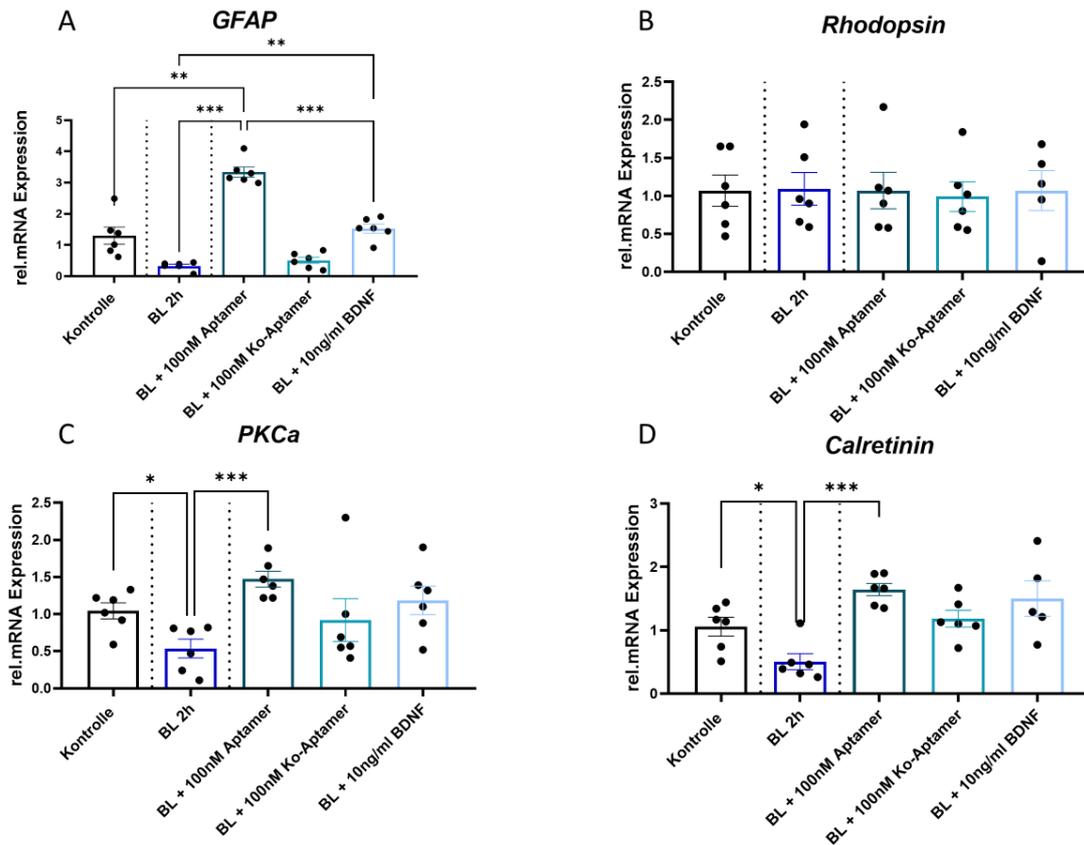


Abbildung 24: Das RNA-TrkB-Aptamer steigert die mRNA-Expression zellspezifischer Marker nach BL-Bestrahlung

Retinale Explantate werden nach 2 h BL-Bestrahlung mit RNA-TrkB-Aptamer 100 nM, Kontrollaptamer 100 nM und BDNF 10 ng/ml behandelt. Daraufhin wurden die retinalen Explantate 24 h kultiviert und anschließend die Expression der zellspezifischen Marker *GFAP* (A), *Rhodopsin* (B), *PKCa* (C) und *Calretinin* (D) mittels qRT-PCR analysiert.

- (A) Die Behandlung mit TrkB-Aptamer 100 nM nach 2 h BL-Bestrahlung konnte die Expression von *GFAP* signifikant steigern (10-fach). Die Behandlung mit BDNF 10 ng/ml löste vergleichbare Effekte aus (5-fach). Das Kontrollaptamer zeigt keine signifikanten Effekte.
- (B) Die Behandlung mit TrkB-Aptamer 100 nM, Kontrollaptamer 100 nM und BDNF 10 ng/ml hatte nach 2 h BL-Bestrahlung keinen signifikanten Effekt auf die *Rhodopsin*-Expression.
- (C) Die Behandlung mit TrkB-Aptamer 100 nM nach 2 h BL-Bestrahlung konnte die Expression von *PKCa* signifikant steigern (2-fach). Die Behandlungen mit Kontrollaptamer 100 nM und BDNF 10 ng/ml führten zu keinen signifikanten Veränderungen.
- (D) Die Behandlung mit TrkB-Aptamer 100 nM nach 2 h BL-Bestrahlung konnte die Expression von *Calretinin* signifikant steigern (3,2-fach). Die Behandlungen mit Kontrollaptamer 100 nM und BDNF 10 ng/ml führten zu keinen signifikanten Veränderungen.

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, $n=8$.

3.7.1 Apoptoseinduktion durch BL-Bestrahlung

Zellstress durch ROS kann in der Retina Apoptose und Neurodegeneration induzieren [76]. Die spezifische Untersuchung der Apoptoseinduktion erfolgte in diesem Arbeitspaket anhand der relativen Proteinexpression von Bax und Bcl-2. Bax ist ein pro-apoptotisches Protein, während Bcl-2 als dessen Inhibitor anti-apoptotisch wirkt. Ein hoher Quotient aus Bax und Bcl-2 spricht somit für eine Apoptoseinduktion, während ein niedriger Quotient für das Überwiegen von Bcl-2 und damit Apoptoseinhibition spricht.

Retinale Explantate wurden nach 24 h Kultivierung für 1,5 h mit BL bestrahlt und im Anschluss für 24 h mit dem RNA-TrkB-Aptamer 100 nM, Kontrollaptamer 100 nM und BDNF 10 ng/ml behandelt. Die Analyse der Proteinexpression von Bax und Bcl-2 erfolgte mittels WB. Im geschilderten Versuchsaufbau wurde durch die BL-Bestrahlung ein signifikanter Anstieg des Verhältnisses von Bax und Bcl-2 ausgelöst ($p < 0,01$, Abb. 25 A). Die BL-Bestrahlung von retinalen Explantaten für 1,5 h induzierte somit signifikant Apoptose. Eine darauffolgende Behandlung mit 100 nM RNA-TrkB-Aptamer, 100 nM Kontrollaptamer oder 10 ng/ml BDNF für 24 h konnte die Bax Expression jeweils signifikant auf Werte vergleichbar zum Kontrollniveau senken ($p < 0,01$, Abb. 25 A) und damit anti-apoptotische Effekte induzieren.

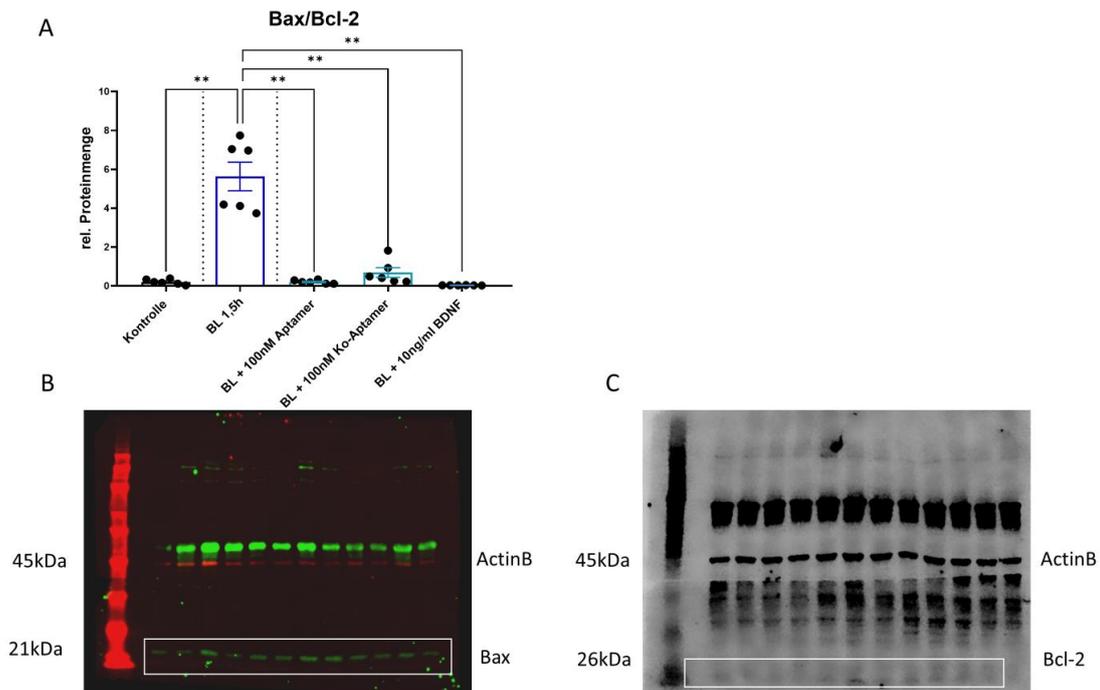


Abbildung 25: Das RNA-TrkB-Aptamer rettet Zellen vor der durch BL induzierten Apoptose in der Retina

Retinale Explantate wurden nach 1,5 h BL-Bestrahlung mit RNA-TrkB-Aptamer 100 nM, Kontrollaptamer 100 nM und BDNF 10 ng/ml behandelt. Daraufhin wurden die Zellen 24 h kultiviert und dann die Expression der Apoptose-Marker Bax und Bcl-2 mittels WB bestimmt. Dargestellt wird der Quotient aus Bax und Bcl-2 (A), sowie die einzelnen WB (B, C).

(A) Die Bestrahlung der retinalen Explantate für 1,5 h mit BL induzierte signifikant Apoptose, da der Quotient aus Bax und Bcl-2 signifikant ansteigt ($p < 0,01$). Die darauffolgenden Behandlungen mit TrkB-Aptamer 100 nM, Kontrollaptamer 100 nM und BDNF 10 ng/ml konnten die Apoptoseinduktion verhindern und den Quotienten aus den Expressionen von Bax und Bcl-2 auf Werte ähnlich zum Kontrollniveau wieder signifikant senken ($p < 0,01$). Die durch BL induzierte Apoptose wurde somit durch die Behandlungen inhibiert.

(B) Zu sehen ist der Western Blot von Bax mit grünen Banden bei 21 kDa. In Rot dargestellt ist ActinB als Referenz.

(C) Nachweis der Bcl-2-Banden bei 26 kDa. Bei 45 kDa ist ActinB erneut ActinB als Referenz.

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, $** = p < 0,01$, $n = 8$.

Mittels WB wurde die Expression von p63 untersucht, ein Protein welches essenziell für die p53-abhängige Apoptose ist. P63 wird durch p53 induziert und sorgt im Signalweg für Zellzyklusarrest und Apoptose. Experimentell konnte analog zu Bax und Bcl-2 eine signifikante Induktion durch die BL-Bestrahlung retinaler Explantate für 1,5 h (1,2-fach, $p < 0,001$, Abb. 26) und damit eine Induktion der Apoptose nachgewiesen werden. Durch die Behandlung mit

100 nM RNA-TrkB-Aptamer und 10 ng/ml BDNF nach der Bestrahlung konnte die Proteinmenge wieder signifikant gesenkt und damit einen anti-apoptotischen Effekt ausgelöst werden ($p < 0,05$, Abb. 26). Das Kontrollaptamer ergab hier keine signifikanten Änderungen in der Proteinmenge ($p > 0,05$, Abb. 26).

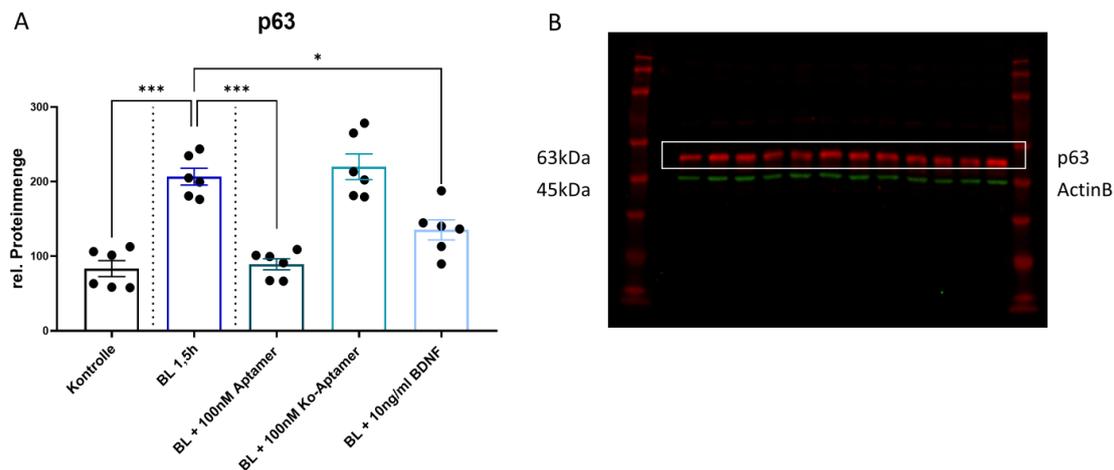


Abbildung 26: Die RNA-TrkB-Aptamerbehandlung verhindert den durch BL induzierten Zelltod in der Retina

Retinale Explantate wurden nach 1,5 h BL-Bestrahlung mit RNA-TrkB-Aptamer 100 nM, Kontrollaptamer 100 nM und BDNF 10 ng/ml behandelt. Daraufhin werden die Zellen 24 h kultiviert und dann die Menge des Apoptose-Markers p63 mittels WB bestimmt.

(A) Die Bestrahlung der retinalen Explantate für 1,5 h mit BL induzierte die Expression von p63 ($p < 0,001$, 1,2-fach). Die darauffolgenden Behandlungen mit TrkB-Aptamer 100 nM und BDNF 10 ng/ml reduzierte die Expressionen wieder signifikant ($p < 0,05$). Das Kontrollaptamer zeigt keine signifikanten Effekte.

(B) WB von p63. In Rot sind die p63-Banden bei 63 kDa zu sehen. Als Referenz sind in Grün die Banden von ActinB bei 45 kDa dargestellt.

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, $*=p < 0,05$, $**=p < 0,01$, $***=p < 0,001$, $n=6$.

3.7.2 MZ im BL-Stressmodell

Als weiterer Teil dieses Arbeitspakets wurde der Effekt der BL-Bestrahlung und Aptamer-Behandlung gesondert an MZ untersucht, da sie eine wichtige Rolle bei der Reaktion der Retina auf Zellstress und Neurodegeneration spielen (siehe 1.1).

Mittels MTS-Assay und KV wurde die Viabilität der MZ in der Retina untersucht. Die MTS/KV-Ratio gab Auskunft darüber, wie die Viabilität der überlebenden Zellen war. Die BL-Bestrahlung führte zu einer signifikanten Reduktion des

Quotienten aus MTS und KV ($p < 0,001$, Abb. 27) und somit zu einer reduzierten Zellviabilität. Die Behandlungen der bestrahlten MZ mit 10 nM, 100 nM, 200 nM und 500 nM RNA-TrkB-Aptamer konnten dem Effekt entgegenwirken und die Ratio signifikant steigern ($p < 0,001$, 10 nM Aptamer: 4,8-fach, 100 nM Aptamer: 3,4-fach, 200 nM Aptamer: 4,8-fach, 500 nM Aptamer: 3,5-fach, Abb. 27). In der Zusammenschau der Ergebnisse der Darstellung des Verhältnisses aus MTS und KV zeigte die Behandlung mit 100 nM RNA-TrkB-Aptamer nach 1,5 h BL-Bestrahlung die stärkste Induktion der Zellviabilität ($p < 0,001$, Abb. 27). Als Vergleichsgruppe zur TrkB-Aptamer-Behandlung wurden die MZ nach der Bestrahlung in diesem Versuchsaufbau auch mit BDNF 1 ng/ml, 10 ng/ml oder 100 ng/ml behandelt. Nach BL-Bestrahlung ergab der KV hier eine signifikante Reduktion der lebenden Zellen ($p < 0,001$, Abb. 27). Die darauffolgende Behandlung mit 1 ng/ml BDNF führte zu einer weiteren signifikanten Reduktion ($p < 0,01$, Abb. 27). Erst bei einer Konzentration von 10 ng/ml BDNF konnte eine signifikante Induktion im KV im Vergleich zu der unbehandelten, aber bestrahlten Kontrolle beobachtet werden (1,5-fach, $p < 0,001$, Abb. 27). Auch hier wurde zusätzlich die MTS/KV-Ratio analysiert, um eine Aussage über die Viabilität der überlebenden MZ treffen zu können. Die BL-Bestrahlung führte zu einer signifikanten Reduktion der relativen Zellviabilität ($p < 0,001$, Abb. 27) und analog zur TrkB-Aptamer-Behandlung konnten alle verwendeten BDNF-Konzentrationen den Quotienten aus MTS und KV signifikant steigern ($p < 0,001$, Abb. 27). Somit führte die Behandlung mit BDNF zu einer verbesserten relativen Zellviabilität nach BL-Bestrahlung, vergleichbar mit den Ergebnissen der RNA-TrkB-Aptamer-Behandlung.

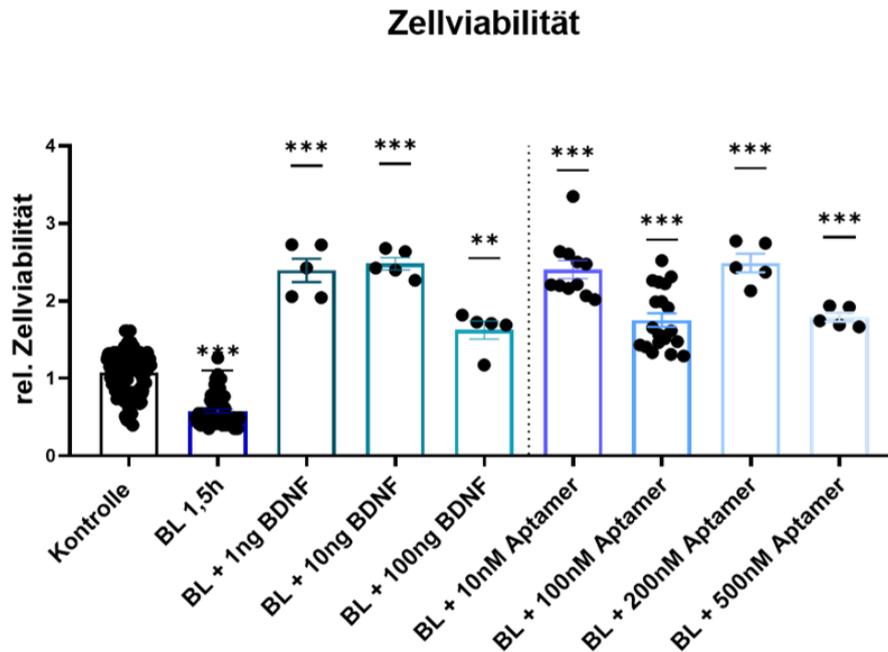


Abbildung 27: Die Viabilität von MZ profitiert von der RNA-TrkB-Aptamerbehandlung nach BL-Bestrahlung

MZ wurden nach 24 h Kultivierung für 1,5 h mit BL bestrahlt und im Anschluss mit BDNF 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml bzw. RNA-TrkB-Aptamer 10 nM, 100 nM, 200 nM und 500 nM für weitere 24 h behandelt. Die Untersuchung der Zellviabilität wurde mittels MTS und KV untersucht. Dargestellt ist das Verhältnis aus MTS und KV bei der jeweiligen Behandlung.

Die Bestrahlung der MZ mit BL für 1,5 h führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität, da eine signifikante Reduktion des Quotienten aus MTS und KV beobachtet werden kann ($p < 0,001$). Alle verwendeten BDNF-Konzentrationen erzielten nach der Bestrahlung eine signifikante Steigerung der Zellviabilität ($p < 0,001$). Auch alle TrkB-Aptamer Konzentrationen induzierten nach der Bestrahlung eine signifikante Steigerung der Zellviabilität ($p < 0,001$, 10 nM Aptamer: 4,8-fach, 100 nM Aptamer: 3,4-fach, 200 nM Aptamer: 4,8-fach, 500 nM Aptamer: 3,5-fach).

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung in Bezug auf die unbehandelte und unbestrahlte Kontrolle, Statistischer Test Ordinary one-way ANOVA Brown-Forsythe and Welch, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, $n = 16$.

Um die Apoptoseinduktion durch die BL-Bestrahlung und den neuroprotektiven Effekt der RNA-TrkB-Aptamer-Behandlung weiter zu analysieren, wurde die Caspase3/7-Aktivität gemessen. Eine hohe Caspase3/7-Aktivität spricht dabei für die Induktion von Apoptose. Hierfür wurde lediglich die Konzentration von 100 nM des TrkB-Aptamers und 10 ng/ml BDNF verwendet, weil diese in der Zusammenschau der vorangegangenen Versuche die besten Ergebnisse bezüglich der Rezeptoraktivierung ergab und erste neuroprotektive Effekte im BL-Stressmodell beobachtet werden konnten. Die BL-Bestrahlung führte in den MZ zu einer signifikanten Induktion der Caspase3/7-Aktivität (2,2-fach, $p < 0,001$,

Abb. 28) und damit zur Apoptoseinduktion. Dieser Effekt deckt sich mit Vorarbeiten bezüglich der zelltoxischen Effekte von BL in der Retina [77]. Durch die anschließende Behandlung mit 10 ng/ml BDNF bzw. 100 nM RNA-TrkB-Aptamer war die Aktivität der Caspasen signifikant niedriger (Abb. 28).

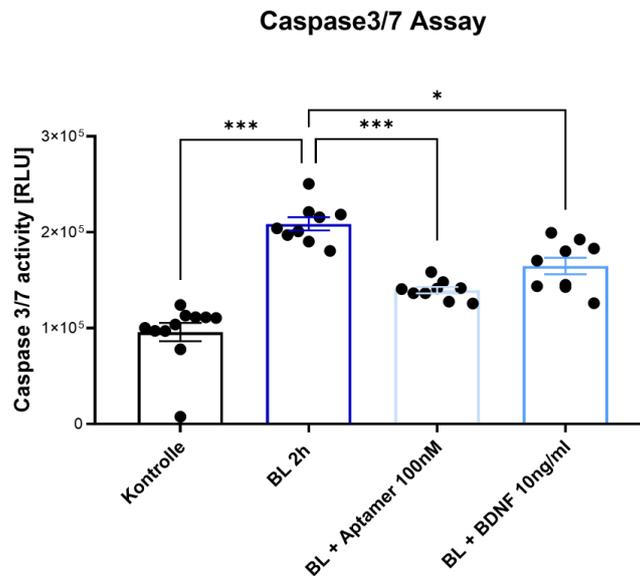


Abbildung 28: Die Behandlung mit dem RNA-TrkB-Aptamer verhindert die durch BL induzierte Apoptose der MZ

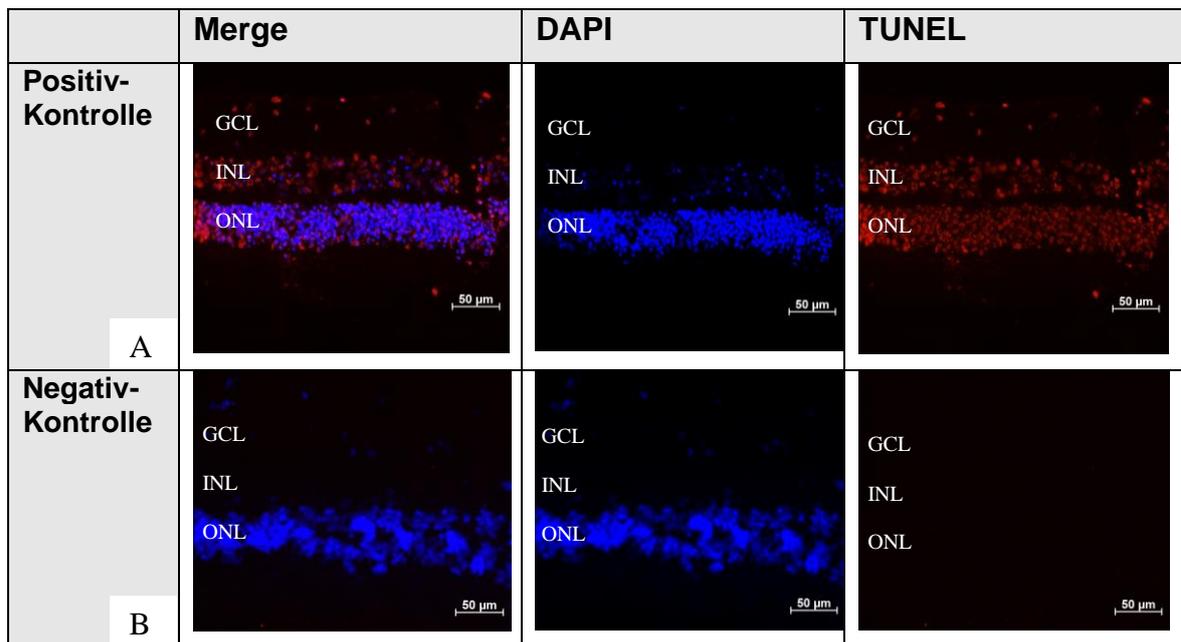
MZ wurden nach 24 h Kultivierung für 2 h mit BL bestrahlt und im Anschluss mit 100 nM RNA-TrkB-Aptamer bzw. BDNF 10 ng/ml und für weitere 24 h behandelt. Um die Apoptoseinduktion zu untersuchen, wurde die Caspase3/7-Aktivität mittels eines Assays analysiert (A).

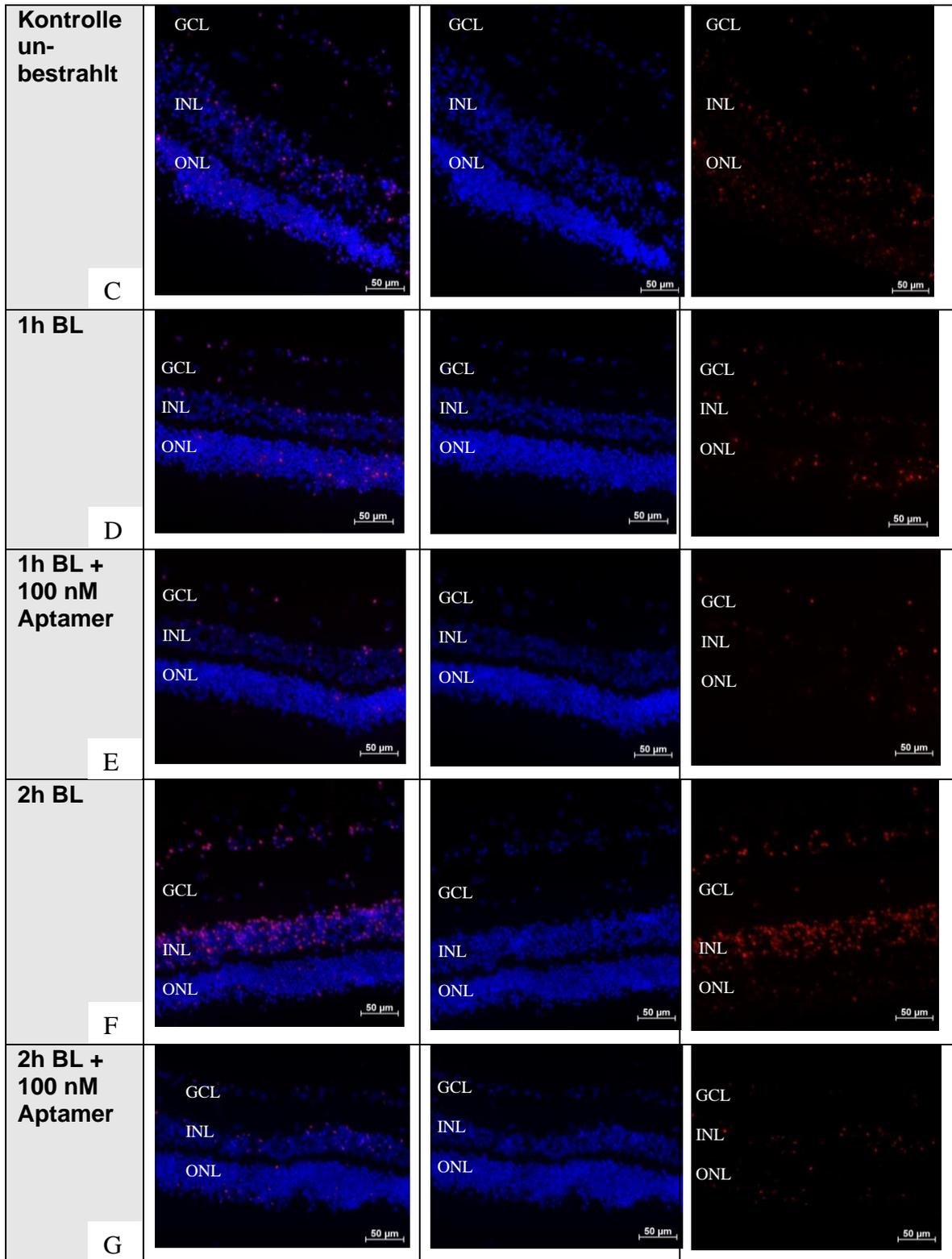
Die Bestrahlung der MZ mit BL für 2 h führte zu einer signifikanten Steigerung der Caspase3/7-Aktivität. Diese konnte sowohl mittels der 24 h-Behandlung mit 100 nM TrkB-Aptamer als auch 10 ng/ml BDNF wieder signifikant reduziert werden.

Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test Ordinary one-way ANOVA Brown-Forsythe and Welch, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, $n = 16$.

3.8 Neuroprotektiver Effekt des TrkB-Aptamers

In einer abschließend durchgeführten TUNEL-Färbung wurden die bereits in den vorangegangenen Versuchen des BL-Stressmodells gewonnenen Erkenntnisse weiter überprüft. Hierfür wurde der TUNEL-Assay verwendet, welcher apoptotische Zellen in den retinalen Schnitten sichtbar machen kann. Die BL-Bestrahlung retinaler Explantate für 2 h führte im Vergleich zu den nicht bestrahlten Kontrollen zu einer Induktion der TUNEL-positiven Zellen (2-fach, $p < 0,001$, Abb. 31F, Abb. 29). Bei einer kürzeren Bestrahlungszeit von 1 h ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen feststellen ($p > 0,05$, Abb. 31D, Abb. 29). Durch die Behandlung 2 h bestrahlter Explantate mit TrkB-Aptamer 100 nM konnte ein anti-apoptotischer Effekt nachgewiesen werden, da die Anzahl der apoptotischen Zellen signifikant gesenkt werden konnte ($p < 0,001$, Abb. 31G, Abb. 29).





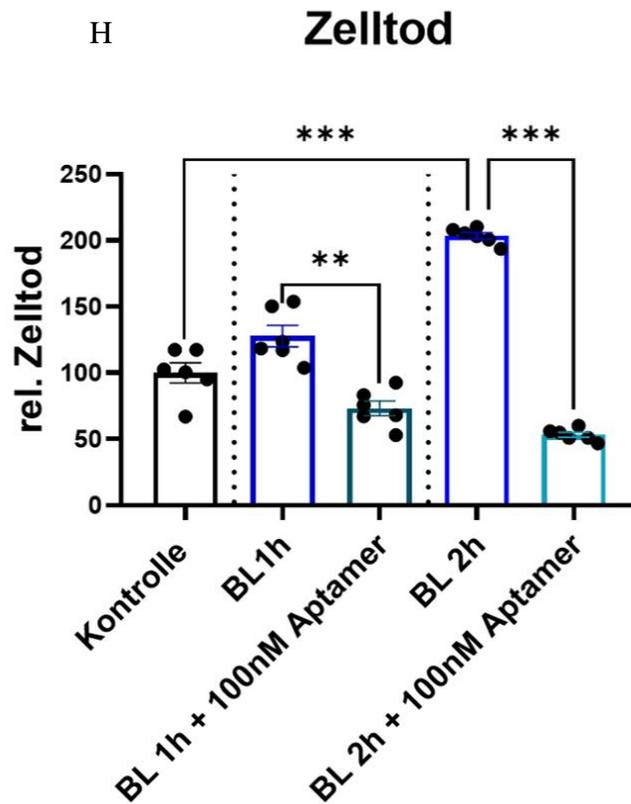


Abbildung 29: Retinale Zellen können mittels der RNA-TrkB-Aptamerbehandlung vor der durch BL ausgelösten Apoptose gerettet werden

Retinale Explantate wurden nach 24 h Kultivierung für 1 h und 2 h mit BL bestrahlt und im Anschluss jeweils mit TrkB-Aptamer 100 nM für weitere 24 h behandelt. Hier dargestellt sind repräsentative Bilder der TUNEL Färbung (A-G), sowie die auf der Färbung basierende Quantifizierung der apoptotischen Zellen. Das rote Signal entspricht in der TUNEL-Färbung apoptotischen Zellen, blau wurden Zellkerne mittels DAPI gefärbt.

- (A)+(B) Die TUNEL-Färbung konnte verwendet werden, da die Positivkontrolle positiv (rote Signale) und die Negativkontrolle negativ waren (keine roten Signale)
- (C) Die unbestrahlte und unbehandelte Kontrolle ergab nur vereinzelte TUNEL-positive Zellen, sie repräsentierte den ungestressten Zustand der Retina.
- (D) Nach 1 h BL-Bestrahlung waren viele rote Signale, vor allem in der INL und GCL zu sehen. Die Retina war gestresst, es kam zur Induktion von Apoptose.
- (E) Die Behandlung Netzhäute nach 1 h BL-Bestrahlung mit TrkB-Aptamer 100 nM konnte die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen in INL und GCL senken.
- (F) Nach 2 h BL-Bestrahlung waren viele rote Signale in INL und GCL zu sehen. Die Retina war durch die Bestrahlung gestresst, es kam zur Induktion von Apoptose.
- (G) Die Behandlung der Netzhäute nach 2 h BL-Bestrahlung mit TrkB-Aptamer 100 nM konnte die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen in INL und GCL senken.
- (H) Quantitative Darstellung basierend auf der TUNEL-Färbung
Die Bestrahlung der retinalen Explantate mit BL für 1 h führte zu keiner signifikanten Steigerung der TUNEL-positiven Zellen. Durch die längere Bestrahlungszeit von 2 h konnte hingegen eine signifikante Steigerung der positiven und damit apoptotischen Zellen erzielt werden ($p < 0,001$, 2-fach). Die Behandlung mit RNA-TrkB-Aptamer 100 nM der Explantate nach der 1 h und der 2 h-Bestrahlung konnte die Anzahl der TUNEL-positiven Zahlen im Vergleich zur 2 h bestrahlten Probe wieder signifikant senken ($p < 0,01$). Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung, Statistischer Test ANOVA Brown-Forsythe and Welch, $**=p < 0,01$, $***=p < 0,001$, $n=6$.

ONL=outer nuclear layer, INL=inner nuclear layer, GCL=ganglion cell layer.

Ergebnisse

Zusammenfassend induzierte die BL-Bestrahlung sowohl in der Retina als auch spezifisch in MZ Zellstress und Apoptose. Das RNA-TrkB-Aptamer konnte bei einer Konzentration von 100 nM innerhalb von 24 h diesen Zellstress signifikant reduzieren und Zellen vor der Apoptose retten. Dieser Effekt ließ sich mit den Ergebnissen des endogenen Wachstumsfaktors BDNF in der Konzentration von 10 ng/ml vergleichen.

4 Diskussion

Neurodegeneration ist ein Phänomen, welches bei einem Großteil der ophthalmologischen Erkrankungen, wie der AMD oder *RP*, auftritt [17, 20, 78]. Beide Erkrankungen sind bisher nicht kurativ behandelbar [18, 79]. Die Anzahl der AMD-Patient*innen steigt aufgrund des demographischen Wandels jedoch stetig, weshalb dringender Handlungsbedarf in der Suche nach neuen Therapeutika besteht [80, 81]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein neuer, potenziell neuroprotektiver Therapieansatz, ein TrkB-Aptamer, getestet.

4.1 Der TrkB-Rezeptor als neuroprotektives Target

Der TrkB-Rezeptor ist ein membranständiger Rezeptor, der sowohl im ZNS als auch in der Retina von verschiedenen Zellen exprimiert wird. Seine natürlichen Liganden sind der endogene Wachstumsfaktor BDNF, sowie Neurotrophin 3 und 4 [82]. Bindet einer dieser Liganden an den Rezeptor, so kommt es zur Dimerisierung und Phosphorylierung desselben, was zur Aktivierung verschiedener Signalwege führt (Abb. 2). Teil dieser Signalwege sind Kinasen, wie Akt und Erk, die ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert werden und im Verlauf zur Zelldifferenzierung, Zellwachstum, Inhibition von Apoptose und damit Neuroprotektion beitragen [83]. Pathologien und Fehlregulationen des TrkB-Rezeptors wurden bisher vor allem im Kontext neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen erforscht, wo sich der Rezeptor als unverzichtbarer Teil synaptischer Entwicklung, Differenzierung und des neuronalen Überlebens erwies [82]. Abgesehen von der Funktion des Rezeptors im ZNS ist bekannt, dass TrkB, retinal exprimiert von RGZ, RPE, MZ, Amakrin- und Horizontalzellen, für die Entwicklung der RGZ besonders wichtig ist [27, 84]. Jedoch hängt das Überleben aller retinaler Neurone maßgeblich von diesem Rezeptor und seinen Funktionen ab. In einem Experiment an TrkB-Knockout Mäusen um Harada et. al konnte gezeigt werden, dass die MZ ebenfalls den TrkB-Rezeptor exprimieren und regulatorische Aufgaben übernehmen, die das Überleben der retinalen Neurone mitbestimmen [85].

Somit ist der TrkB-Rezeptor eine vielversprechende Zielstruktur für Neuroprotektion in der Retina [27, 53].

4.2 Literaturkontext bezüglich BDNF-Behandlung

BDNF ist neben Neurotrophin 3 und Neurotrophin 4 einer der natürlichen Liganden des TrkB-Rezeptors [86]. Die Bindung an den Rezeptor führt zur Aktivierung desselben und damit zur Signalwegaktivierung. Dies induziert im ZNS neuroprotektive und neurotrophe Effekte [29, 38, 87] (Abb. 2).

Wie bereits zuvor genannt, wurden Pathologien des BDNF-TrkB-Signalwegs im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen, wie Depression [33] und Morbus Parkinson [34], untersucht. In der ophthalmologischen Forschung wurde der Effekt von BDNF und TrkB beispielsweise in Bezug auf Erkrankungen wie Glaukom erforscht [39]. In Voruntersuchungen an porcinen Augen um Heng *et al.* zum Thema Neuroprotektion mittels BDNF bei traumatischer optischer Neuropathie konnte der neuroprotektive Effekt von BDNF auf RGZ nachgewiesen werden. Der optische Nerv von Schweineaugen wurde durch Abklemmen einer versorgenden Arterie *in vivo* geschädigt. In der Folge konnte ein Sterben der RGZ und Axondegeneration des Sehnervs beobachtet werden. Im Anschluss wurde BDNF in therapeutischer Absicht intravitreal injiziert. Die Behandlung erwies sich auch hier als neuroprotektiv wirksam, da RGZ vor der Apoptose gerettet werden konnten und die Axondegeneration des optischen Nervs verhindert wurde. In diesen *in vivo* Versuchen erwiesen sich, im Vergleich zu den in dieser Arbeit getesteten BDNF-Behandlungen, deutlich höhere Konzentrationen von BDNF als wirksam (50-250 µg). Ähnliche *in vivo* Versuche bezüglich der neuroprotektiven Effekte intravitrealer BDNF-Injektion in Katzen- und Rattenaugen ergaben ebenfalls, dass das Überleben RGZ durch die Behandlung signifikant gebessert werden konnte [88]. Auch in diesen Experimenten wurden höhere BDNF-Konzentrationen zwischen 15 µg und 1000 µg verwendet [89, 90]. Für diese Doktorarbeit wurden jedoch bewusst niedrigere BDNF-Konzentrationen verwendet, da die benötigte Menge an BDNF bei intravitrealer Injektion vom Glaskörpervolumen abhängig ist [90]. Bei der direkten *ex vivo* Applikation von

BDNF auf explantierte Netzhäute ohne Glaskörper, wie in dieser Doktorarbeit, wurden somit schon aufgrund des fehlenden Wirkstoffverlusts durch Verteilung im Glaskörper deutlich geringere Dosen (10-100 ng/ml) BDNF benötigt als bei der intravitreallyen Injektion in vitale Schweineaugen. Der in diesen Vorversuchen nachgewiesene neuroprotektive Effekt der TrkB-Aktivierung auf RGZ konnte auch im Rahmen dieser Doktorarbeit, sowohl mittels BDNF als auch mit dem TrkB-Aptamer, gezeigt werden (Abb. 6, 17, 18, 24). In weiteren Voruntersuchungen zeigte sich zudem, dass nicht nur ein Mangel an BDNF bei der Pathogenese von Erkrankungen des ZNS eine Rolle spielt, sondern auch ein Überschuss des Wachstumsfaktors pathogen wirken kann. So erwies sich eine gesteigerte Freisetzung von BDNF aus Mikroglia im Rückenmark als Trigger für die Entwicklung von neuropathischen Schmerzen [91]. Diesen Effekt konnte unter anderem die Forschungsgruppe um Huang *et al.*, die das in dieser Arbeit verwendete TrkB-Aptamer entwickelte, durch exogene Zugabe von BDNF im Mäusehirn reproduzieren [43]. TrkB wurde aufgrund der nachgewiesenen neuroprotektiven Effekte der TrkB-Signalwegaktivierung ausgewählt. Da jedoch BDNF potenziell neurotoxische Effekte bei exogener Zugabe auslösen kann, wurde in dieser Arbeit ein synthetischer Ligand von TrkB als alternatives neuroprotektives Therapeutikum gewählt. Als Grundstruktur des synthetischen Liganden fiel die Wahl auf ein Aptamer, da deren fehlende Immunogenität ein entscheidender Vorteil gegenüber Antikörpern als potenzielles neuroprotektives Therapeutikum für neurodegenerative Erkrankungen der Retina darstellt.

4.3 Das RNA-TrkB-Aptamer

Das in dieser Arbeit getestete RNA-TrkB-Aptamer wurde von Huang *et al.* entwickelt. Es ist ein partieller TrkB-Agonist und selektiv für diesen Rezeptor. Huang *et al.* testete das eigens entwickelte Aptamer zunächst im Rahmen der Forschung an neurodegenerativen Erkrankungen des Gehirns, wie Morbus Alzheimer. Dort erwies es sich aufgrund toxischer Nebeneffekte und fehlender neuroprotektiver Wirkung nicht als geeignetes Therapeutikum für neurodegenerative Erkrankungen des Gehirns. Nichtsdestotrotz bleiben die Ergebnisse auch für diese Arbeit hoch relevant [43]. Die Tatsache, dass

Voruntersuchungen, beispielsweise durch Huang *et al.*, nachweisen konnten, dass das TrkB-Aptamer in der Lage war an den Rezeptor zu binden und seine Signalwege zu aktivieren wurde es als Ausgangspunkt für diese Doktorarbeit verwendet.

4.4 Ergebnisse RNA-TrkB-Aptamer Konzentrationstestung

In dieser Doktorarbeit wurde das RNA-TrkB-Aptamer als neuroprotektives Therapeutikum *ex vivo* an der porcinen Retina getestet. Da die porcine Retina als ein Geflecht aus Nervenzellen nicht analog zum Mäusehirn aufgebaut ist konnten die verwendeten Konzentrationen des RNA-TrkB-Aptamers und BDNF von Huang *et al.* nicht einfach übernommen werden [92]. Stattdessen musste für die porcine Retina eine optimale Konzentration der verwendeten Substanzen etabliert werden.

Im Rahmen der Konzentrationstestung wurden die besten Ergebnisse für die Behandlung mit 100 nM des RNA-TrkB-Aptamers bei einer Behandlungszeit von 24 h erzielt. Mit dieser Konzentration wurde der TrkB-Signalweg effektiv aktiviert, da Downstream-Targets (z.B. pAkt, BDNF) sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene signifikant induziert wurden (Abb. 5, 13). Zudem führte die Behandlung mit 100 nM zu einer Steigerung der Expression zellspezifischer Marker, wie *GFAP* und *Opsin* (Abb. 6, 14). Dies wies darauf hin, dass verschiedene Zellpopulationen der Retina, wie beispielsweise RGZ, von den verwendeten Substanzen profitierten. In dieser Konzentration war das Aptamer in der Retina somit biokompatibel, da keine Zellstressmarker (z.B. TNF α , HSP70) induziert wurden (Abb. 7,8). Des Weiteren ist hervorzuheben, dass die Zellviabilität der retinalen Zellen durch das TrkB-Aptamer signifikant gesteigert werden konnte (Abb. 9). Im Vergleich zur Behandlung mit dem physiologischen Ligand BDNF zeigten die 10 nM RNA-TrkB-Aptamer einen deutlich längeren aktivierenden Effekt auf TrkB (Behandlungszeit 48 h, Abb. 11, 13). Dies kann einen entscheidenden Vorteil des TrkB-Aptamers gegenüber BDNF im Hinblick auf die therapeutische Anwendung im Auge bedeuten, da eine längere Wirksamkeit die Anwendung als Therapeutikum durch größere Applikationsabstände vereinfacht.

Höhere Konzentrationen als 100 nM erbrachten auch spannende neue Erkenntnisse. So führte eine Behandlung mit 200 nM weder zur signifikanten Steigerung von *Downstream Targets* noch von zellspezifischen Markern. Zellstressmarker wurden hingegen signifikant in ihrer Expression induziert, was bedeutet, dass diese Konzentration weder zur effektiven Signalwegaktivierung führte noch gut verträglich für die Zellen der Retina war (Abb. 5-8, 13, 14). Weshalb die Behandlung mit 200 nM die Rezeptorsignalwege nicht effektiv aktivieren konnte und zugleich toxische Effekte induzierte bleibt an dieser Stelle unklar und müsste anhand weiterer Versuche mit 200 nM des Aptamers genauer untersucht werden. Aufgrund der fehlenden Relevanz bezüglich des therapeutischen Einsatzes wurden diese Untersuchungen hier nicht durchgeführt. Die höchste getestete Konzentration von 500 nM induzierte hingegen eine gute Aktivierung des Rezeptors und seiner Signalwege. Zudem erbrachte sie auch gute Ergebnisse bezüglich der Induktion zellspezifischer Marker (Abb. 5-8, 13, 14). Die Behandlung mit 500 nM induzierte jedoch Zellstress, da eine signifikante Steigerung der Zellstressmarker-Expression (z.B. HSP70, TNF α) beobachtet werden konnte (Abb. 7, 8). Die höchste Konzentration von 500 nM des Aptamers erwies sich somit als zu hoch und therapeutisch ungeeignet.

Bei der Entwicklung des Aptamers durch Huang *et al.* erwiesen sich bereits Konzentrationen von 2-20 nM des TrkB-Aptamers als ausreichend für eine effektive Rezeptoraktivierung im Mäusehirn. Die dort höchste getestete Konzentration von 200 nM zeigte in diesen Vorarbeiten eine gute Rezeptoraktivierung, was sich mit den Ergebnissen bezüglich der Behandlung mit 200 nM des RNA-Aptamers in dieser Arbeit nicht deckt. Dieser Unterschied kann darauf zurückgeführt werden, dass die Versuche um Huang *et al.* an kortikalen Neuronen von Mäusen durchgeführt wurden. Die Resultate sind somit nicht direkt auf die porcine Netzhaut übertragbar, liefern aber interessante Erkenntnisse über den Vergleich der verschiedenen Gewebe [43].

Eine längere Behandlungsdauer von 48 h konnte sich nicht als effektiver gegenüber der 24 h-Behandlung erweisen und zudem keine Reduktion der HSP70-Expression durch die TrkB-Aptamer-Behandlung beobachtet werden

(Abb. 7, 8). Dies deutet darauf hin, dass die längere Behandlungszeit von 48 h keinen Mehrwert in Bezug auf die Reduktion von Zellstress und Induktion neuroprotektiver Signalwege gegenüber 24 h hatte. Zudem war die Signalwegaktivierung bei längerer Behandlungsdauer weniger effektiv (Abb. 5-8, 13, 14). In der Zusammenschau der Ergebnisse war 100 nM die optimale Konzentration des RNA-TrkB-Aptamers bei einer Behandlungszeit von 24 h, da höhere als auch niedrigere Konzentrationen nicht zu einer vergleichbar effektiven Signalwegaktivierung führten und es zur Induktion von Zellstress kam. Somit wurden 100 nM des TrkB-Aptamers bei einer Behandlungszeit von 24 h als bevorzugte Konzentration ausgewählt und für weiterführende Versuche bezüglich der Wirkung des Aptamers verwendet.

4.5 Zeitverlauf der TrkB-Aktivierung

Das RNA-TrkB-Aptamer wurde bisher bezüglich seiner Wirkung in der Retina nur in wenigen Voruntersuchungen getestet. Erste Versuche an retinalen Explantaten und Zellen wurden von Kolleg*innen der AG Schnichels durchgeführt und konnten zeigen, dass das Aptamer auch in der Netzhaut an TrkB bindet, biokompatibel ist und sowohl *in vivo* als auch *in vitro* TrkB-Signalwege aktivieren kann [54]. Aufgrund dessen wurde im Rahmen dieser Arbeit darauf aufbauend untersucht, wie die Rezeptoraktivierung in der porcinen Retina abläuft. TrkB ist als Transmembranrezeptor in der Netzhaut auf verschiedenen Zellpopulationen exprimiert. Vor allem RGZ und MZ exprimieren diesen Rezeptor [38, 93], welche als relevante Zellpopulationen in neuroprotektiven Prozessen der Netzhaut gelten [94, 95]. Die Untersuchungen in dieser Forschungsarbeit ergaben, dass unter Verwendung der bevorzugten Konzentration von 100 nM bei einer Behandlungszeit von 24 h eine effektive Aktivierung der TrkB-Signalwege stattfinden konnte. Wie in anderen Arbeiten bereits nachgewiesen wurde, führt die BDNF-Bindung am Rezeptor im Gehirn zur Internalisierung desselben [30, 31]. Nach 24 h konnte in dieser Doktorarbeit jedoch keine Internalisierung durch die BDNF- oder TrkB-Aptamer-Behandlung festgestellt werden. Erst nach 48 h wurde interessanterweise durch die Behandlung mit 100 nM TrkB-Aptamer und 100 ng/ml BDNF

eine Internalisierung von TrkB beobachtet (Abb. 11). Das RNA-Aptamer ist somit, wie der endogene Ligand BDNF, in der Lage nach 48 h Behandlungsdauer eine Rezeptorinternalisierung zu induzieren.

4.6 Vergleich von RNA- und DNA-TrkB-Aptamer

Nach den Versuchen bezüglich der Wirkung des RNA-TrkB-Aptamers an TrkB in der Netzhaut, wurden vergleichbare Untersuchungen mit einem DNA-TrkB-Aptamer durchgeführt. Wie bereits in 1.5 aufgeführt, gibt es sowohl Aptamere mit RNA- als auch DNA-Grundstruktur. Das von Huang *et al.* entwickelte Aptamer ist ein RNA-Aptamer und aufgrund dessen vielfältiger in seiner Faltungsmöglichkeiten und besser modifizierbar. Diese Vorteile machen RNA-Aptamere allerdings in ihrer Herstellung teurer. DNA-Aptamere bieten hingegen den Vorteil, dass sie kostengünstiger in der Produktion sind und zudem mittels Vektoren in Zellen eingebracht und endogen synthetisiert werden können [47]. Beide Aptamerformen haben gemeinsam, dass sie eine hohe Affinität für Zielstrukturen aufweisen und spezifische Liganden verwendet werden können.

Aufgrund der genannten Vor- und Nachteile beider Aptamerformen, wurde in dieser Doktorarbeit neben dem vorwiegend getesteten RNA-TrkB-Aptamer auch ein DNA-TrkB-Aptamer erstmalig untersucht und mit den Ergebnissen des RNA-Aptamers verglichen (siehe 3.1, Abb. 16-19, 30).

	RNA-Aptamer	DNA-Aptamer
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> • Besser modifizierbar • Vielfältigere Faltungsmöglichkeiten 	<ul style="list-style-type: none"> • billiger in der Herstellung • stabilere Grundstruktur • unmodifiziert längere HWZ • zelleigene Synthese mittels Vektoren induzierbar
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> • teurere und zeitintensivere Synthese • instabilere Grundstruktur • unmodifiziert kürzere HWZ 	<ul style="list-style-type: none"> • Weniger vielfältige Modifikations- und Faltungsoptionen

Tabelle 10: Vergleich der Vor- und Nachteile von RNA- und DNA-Aptameren

In der Zusammenschau der Aptamer-Vergleiche zeigte das RNA-Aptamer in der bevorzugten Konzentration von 100 nM bei einer Behandlungszeit von 24 h eine stärkere Induktion der Expression zellspezifischer Marker auf mRNA-Ebene (Abb. 6). Das DNA-TrkB-Aptamer konnte jedoch ebenfalls eine signifikante Steigerung der Expression dieser Marker erzielen (Abb. 17, 18, 30). In zukünftigen Versuchen muss mittels WB und Immunhistologie überprüft werden, ob die induzierte mRNA-Expression von zellspezifischen Markern wie *TUBB3* (Abb. 18) auch tatsächlich mit einer Induktion auf Proteinebene einhergehen. Interessanterweise ergab sich bei einer Behandlung mit 100 nM des DNA-TrkB-Aptamers für 24 h eine stärkere Induktion der Expression von Downstream-Faktoren, wie beispielsweise dem Wachstumsfaktoren BDNF (Abb. 16), als bei dem RNA-Aptamer (Abb. 5). Beide Aptamerformen scheinen somit bei einer Konzentration von 100 nM und 24 h-Behandlungszeit TrkB-Signalwege effektiv zu aktivieren und zeigen vergleichbare, aber keine identischen Effekte.

Die Konzentration von 200 nM ergab beim RNA-TrkB-Aptamer keine Induktion von Wachstumsfaktoren und zellspezifischen Markern. Es kam hingegen zum Anstieg der Expression von Zellstressmarkern (Abb. 7, 8, 19, 30). Es lässt sich somit vermuten, dass bei 200 nM RNA-TrkB-Aptamer die toxischen Effekte überwiegen und die Konzentration nicht ausreicht, um in 24 h die Signalwege effektiv zu aktivieren. Das DNA-TrkB-Aptamer lieferte interessanterweise vergleichbare Effekte bei einer Konzentration von 200 nM über 24 h (Abb. 16-19, 30). Auch hier waren die Wirkungen der beiden Aptamere in ihrer Wirkung vergleichbar. Die höchste getestete Konzentration von 500 nM induzierte bei beiden Aptamerformen signifikant Zellstress in der Retina und war damit ebenfalls ungeeignet als potenzielle therapeutische Konzentration (Abb. 7, 8, 19, 30). Einzelne Effekte des DNA-TrkB-Aptamers, wie die signifikanten Änderungen der Expression von Markern, wie *HSP70* bei 500 nM (Abb. 19) konnten aktuell nicht ausreichend erklärt werden. Es ist möglich, dass nicht die Funktion des Aptamers spezifisch Zellstress induzierte, sondern lediglich die Menge an applizierter DNA zu der genannten Änderung in der Expression dieses Markers führte. Ein solches Phänomen wurde bereits von Andrade *et al.* als „biomolecular noncovalent interaction“ beschrieben [96]. Hierbei wird ein Zustand von TNF α durch die Interaktion mit DNA stabilisiert, der zytotoxisch wirksam ist. Dieser Effekt war unter anderem verstärkt zu beobachten bei einer größeren Menge an extrazellulärer DNA [96]. Dieser Effekt sollte bei der Auswahl der Grundstruktur des verwendeten Aptamers somit zukünftig bedacht werden. Zusammenfassend erwiesen sich somit beide Aptamere in der Konzentration von 100 nM als nicht toxisch in der Retina. Zellstressmarker, wie *HSP70* oder TNF α , wurden durch die Behandlungen nicht signifikant induziert (Abb. 7, 8, 19, 30). Um diese Ergebnisse in zukünftigen Versuchen detaillierter zu überprüfen, müssen jedoch weitere Zellstressmarker abgefragt werden. Beispiele hierfür wären Interferon- γ , iNos, TGF- β und diverse Interleukine. Die Wirkung des DNA-TrkB-Aptamers konnte in diesen ersten Untersuchungen vergleichbare Effekte zum bisher verwendeten RNA-Aptamer erzeugen und war mit 100 nM ebenfalls ein gut verträglicher und effektiver Ligand an TrkB, der zur effektiven Signalwegaktivierung führen konnte.

Da die Aptamerfaltung des DNA-TrkB-Aptamers jedoch noch weitestgehend unbekannt ist und die Vorarbeiten zum Aufbau, der Verträglichkeit, Faltung und Wirkung des RNA-Aptamers umfassender sind [43, 54], wurde für die restlichen Versuche dieser Doktorarbeit das RNA-TrkB-Aptamer verwendet. In kommenden Arbeiten wäre es spannend auch das DNA-TrkB-Aptamer diesbezüglich genauer zu untersuchen, um die oben genannten Vorteile der DNA-Grundstruktur, wie beispielsweise die Möglichkeit der endogenen Expression, nutzbar machen zu können. Hierbei ist es beispielsweise relevant die Wirkung des DNA-TrkB-Aptamers in niedrigeren Konzentrationen, wie 10 nM, zu testen und die Effekte bei längeren Behandlungszeiten, wie 48 h, mit den Effekten des RNA-TrkB-Aptamers zu vergleichen.

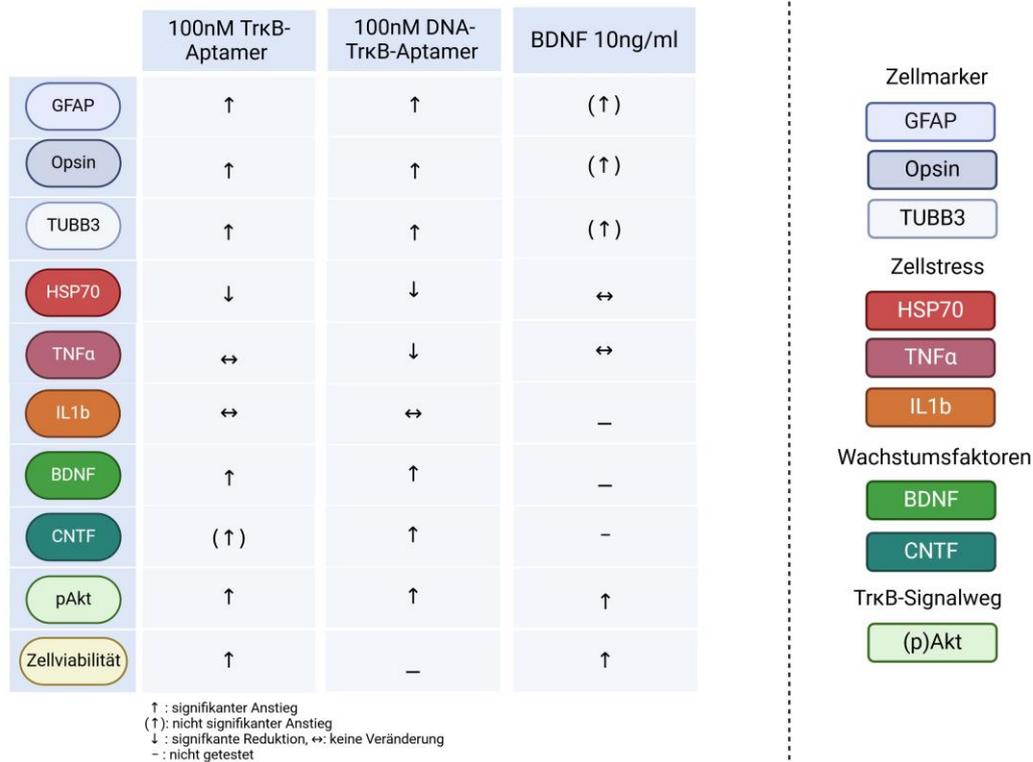


Abbildung 30: Zusammenfassende Übersicht der Wirkung der Behandlung mit dem Aptamer und BDNF an der ungestressten Retina

Abgebildet sind die Effekte der Behandlung mit 100 nM RNA-TrkB-Aptamer, 100 nM DNA-TrkB-Aptamer und 10 ng/ml BDNF auf die verschiedenen getesteten Marker bei einer 24 h-Behandlungszeit (Vgl. Ergebnisse 3.1-3.4).

Beide Aptamere aktivieren den TrkB-Signalweg effektiv (Anstieg pAkt), steigern die Expression zellspezifischer Marker (GFAP; TUBB3, Opsin) und Wachstumsfaktoren (BDNF, CNTF). Sie induzieren keinen Zellstress in der Retina (HSP70, TNFα). Die Behandlung mit BDNF zeigt mit 10 ng/ml eine ähnliche, jedoch schwächer ausgeprägte Wirkung auf die retinalen Explantate. Sowohl das RNA-TrkB-Aptamer als auch BDNF wirken sich positiv auf die Zellviabilität aus.

Somit ist die Vergleichbarkeit der verwendeten Behandlungskonzentrationen mit 100 nM des Aptamers und der 10 ng/ml BDNF basierend auf den Daten der Verträglichkeitstestung und der Fähigkeit zur TrkB-Signalwegaktivierung gegeben. Niedrigere und höhere Konzentrationen führten bei beiden Substanzen entweder zur schlechteren Verträglichkeit, wie beispielsweise zur Induktion von Zellstressmarkern, oder zur ungenügenden Signalwegaktivierung. Auch ohne genaue Analyse der Rezeptoraffinität und genauen Biodynamik und -kinetik von BDNF und dem TrkB-Aptamer können diese beiden Behandlungskonzentrationen folglich qualitativ verglichen werden.

Erstellt mit BioRender.com

4.7 Neurodegenerative Erkrankungen der Retina

AMD und RP sind wichtige neurodegenerative Erkrankungen in der Ophthalmologie [13, 97]. Sie haben trotz unterschiedlicher Genese gemeinsam, dass oxidativer Stress in der Retina entsteht und zur Neurodegeneration führt. Das TrkB-Aptamer soll genau an diesem Punkt durch Aktivierung des TrkB-Rezeptors wirksam werden und somit das Überleben der Neurone

unterstützen und sichern. Um diese neuroprotektiven Effekte des Aptamers in der porcinen Retina untersuchen zu können wird ein Stressmodell benötigt.

4.8 BL als Krankheitsmodell für Neurodegeneration

Bei der Auswahl eines Stressmodells fiel die Wahl auf das *ex vivo* BL-Stressmodell, da es an porcinen retinalen Explantaten und Zellkulturen von Fietz *et al.* etabliert wurde. Hier erwies sich BL, als hochenergetisches Licht mit niedriger Wellenlänge, als geeignet um Zellstress in der porcinen Retina zu induzieren und konnte sich auch gegenüber weißem Licht als wirksamerer Stressor behaupten [63]. Dieses Modell bietet zudem die Vorteile, dass es keine direkte Zugabe von toxischen Substanzen in das Zellmedium benötigt und es sich bei dem in den Vorarbeiten getesteten Gewebe ebenfalls um porcine Netzhaut-Explantate handelt [63]. Hiermit konnte eine mögliche Fehlerquelle, durch Interaktion der zugegebenen stressenden Substanz mit dem therapeutischen Aptamer, vorab ausgeschlossen werden. Die Applikation von BL war somit die Option mit dem geringsten Interaktionspotenzial. Da BL auch im alltäglichen Leben auf das Auge einwirken kann, hat das Stressmodell zusätzlich eine hohe externe Validität [64]. Andere Modelle, wie beispielsweise die Induktion von oxidativem Stress mittels H_2O_2 oder $CoCl_2$, wurden ebenfalls an porcinem Gewebe getestet, hätten aber vorab auf Interaktionen mit dem Aptamer überprüft werden müssen, um die Ergebnisse der Stressmodellversuche in ihrer Aussagekraft gleichwertig zum BL-Stressmodell einordnen zu können [98, 99].

Im BL-Stressmodell induzierte die Bestrahlung retinaler Explantate und kultivierter MZ durch energiereiche Strahlung oxidativen Stress und damit Neurodegeneration durch Apoptoseinduktion [64, 100]. Die BL-Bestrahlung (30 mW/m^2) führte sowohl bei 1 h als auch bei 2 h Bestrahlungsdauer zur signifikanten Reduktion der Zellviabilität und zur signifikanten Steigerung der Expression von Zellstressmarkern, wie *HSP70*, *TNF α* und *iNos* (Abb. 23, 31). Die Bestrahlung erwies sich somit als geeignetes *ex vivo* Stressmodell, um oxidativen Stress und Neurodegeneration in der porcinen Retina zu erzeugen.

Die Behandlung der gestressten Explantate nach der BL-Bestrahlung mit der etablierten Konzentration von 100 nM TrkB-Aptamer führte zur signifikanten Induktion der Viabilität und Reduktion von Zellstressmarkern (Abb. 22, 23, 31). Zudem konnten die neuroprotektiven Eigenschaften Apoptose verhindern. Dies zeigte sich an der signifikanten Reduktion der Bax/Bcl-2-Ratio, p63-Expression und im TUNEL-Assay (Abb. 25, 26, 29, 31). Aufgrund dieser Effekte in gestressten retinalen Explantaten erwies sich das TrkB-Aptamer als neuroprotektiv wirksam. Interessanterweise sind die Ergebnisse auch signifikanter als bei der Behandlung mit dem Wachstumsfaktor BDNF (Abb. 22-29, 31), was die zu Beginn aufgestellte Hypothese unterstützt, dass das Aptamer als partieller Agonist spezifischer neuroprotektive Effekte an TrkB auslösen kann, ohne toxische Nebeneffekte zu induzieren. Weshalb auch das Kontrollaptamer eine signifikante Reduktion des Bax/Bcl-2-Ratio erzielte bleibt an dieser Stelle ungeklärt (Abb. 25).

An *ex vivo* MZ zeigten sich im BL-Stressmodell vergleichbare Ergebnisse. MZ übernehmen die wichtige Funktion als optische Leitfasern in der Retina zu dienen. Sie durchspannen fast die komplette Netzhaut und leiten das Licht in Richtung der Photorezeptoren im Inneren der Retina [71]. Sie sind somit zellschädigendem Licht, wie hier BL, ungeschützt ausgesetzt. Sie besitzen im Vergleich zum RPE keine protektiven Substanzen wie Melanin und sind somit sehr empfindlich gegenüber der BL-Bestrahlung [75, 101]. Dies bestätigte sich in unseren Versuchen. BL reduzierte die Zellviabilität und führte zur Induktion von Apoptose mit gesteigerter Caspase3/7-Aktivität. Durch die Behandlung mit dem Aptamer und BDNF konnte dieser Effekt abgefangen werden. Die Zellviabilität wurde signifikant gesteigert und Apoptose konnte auch hier verhindert werden (Abb. 27-29, 31).

Bei der Bestrahlung der ganzen Netzhaut-Explantate und Untersuchung des MZ-Markers GFAP wurde die GFAP-Expression zunächst gesenkt (Abb. 24 A). Erst nach der anschließenden Behandlung mit dem RNA-Aptamer für 24 h zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression. Eine Induktion der GFAP-Expression spricht für eine Aktivierung der MZ. Bei der Etablierung des

BL-Stressmodells um Fietz *et al.* wurde, im Gegensatz zu den hier erhobenen Daten, die GFAP-Induktion bereits bei BL-Bestrahlung ohne weitere Behandlung beobachtet. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist, dass in den Voruntersuchungen die Bestrahlungsdauer mit 24-48 h deutlich länger war als in den hier durchgeführten Experimenten mit 1-2 h [63]. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Aktivierung der MZ und die damit einhergehende GFAP-Induktion einerseits abhängig von der Bestrahlungsdauer ist und andererseits die MZ-Aktivierung länger als 24 h anhält und nicht innerhalb dieser Zeitspanne durch die RNA-Aptamer-Behandlung aufgehoben werden kann. Basierend auf den hier erhobenen Daten scheint die GFAP-Expression somit kein primärer Marker für retinalen Zellstress zu sein, sondern lediglich indirekt anzuzeigen, dass die MZ auf retinale Prozesse reagieren und aktiviert werden. Zu betonen ist diesbezüglich auch, dass die genaue Rolle der MZ bei neurodegenerativen Prozessen und Zellstress in der Retina bisher nicht ausreichend geklärt ist. Allerdings konnte bereits in anderen Versuchen gezeigt werden, dass beispielsweise bei der *RP*-induzierten Photorezeptor-Degeneration eine MZ-Aktivierung festgestellt werden konnte, die vermuten lässt, dass MZ aktiv werden, um diese pathogenen Effekte zu kompensieren. Fest steht bisher nur, dass eine MZ-Aktivierung bei Erkrankungen wie AMD und *RP* in der Netzhaut beobachtet werden konnte [102, 103]. Ob diese nun ein Nebeneffekt der Pathogenese ist, kompensatorisch auf die Neurodegeneration stattfindet oder aktiver Bestandteil der Krankheitspathogenesen ist, bleibt an dieser Stelle weiterhin offen und sollte weitergehend erforscht werden [72]. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse über MZ im *ex vivo* BL-Stressmodell, mit einer Induktion der GFAP-Expression nach BL-Bestrahlung und Aptamerbehandlung, deuten am ehesten auf eine kompensatorische Aktivierung der Zellen hin. Dies stützt die These, dass MZ ein wichtiger Schlüssel bei neuroprotektiven Therapieansätzen der AMD und RP spielen könnten. Das TrkB-Aptamer erwies sich zusammenfassend als effektive neuroprotektive Substanz im *ex vivo* Blaulicht-Stressmodell an porcinen Netzhäuten und primären MZ (Abb. 22-29, 31).

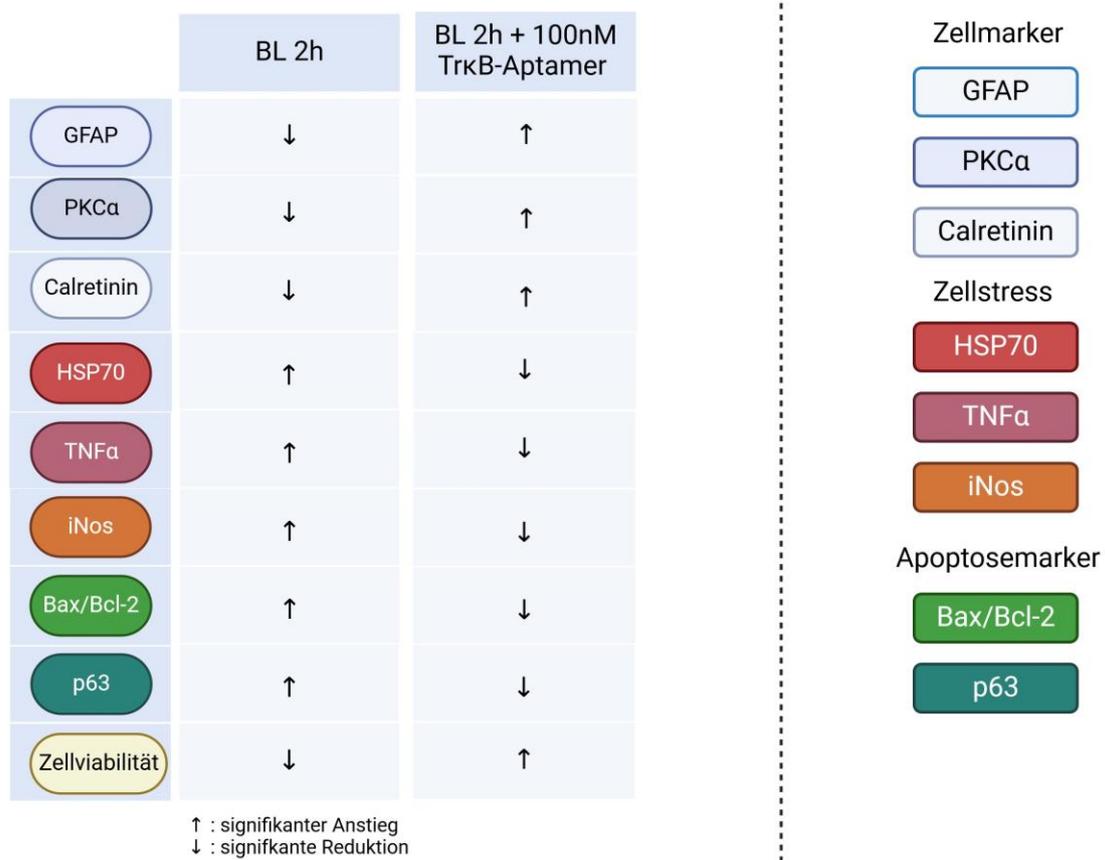


Abbildung 31: Zusammenfassender Überblick der Ergebnisse der Aptamerwirkung im BL-Stressmodell

Abgebildet sind die Effekte der 2 h BL-Bestrahlung und der BL-Bestrahlung mit anschließender RNA-TrkB-Aptamer-Behandlung (100 nM) auf die verschiedenen Zellmarker (GFAP, PKCα, Calretinin), Zellstressmarker (HSP70, TNFα, iNos) und Apoptose-Marker (Bax/Bcl-2, p63) (Vgl. Ergebnisse 3.4).

Die BL-Bestrahlung induziert signifikanten Zellstress (Anstieg HSP70, TNFα, iNOS) in der Retina und wirkt pro-apoptotisch (Anstieg Bax/Bcl-2-Ratio, p63). Die Zellviabilität sinkt durch die Bestrahlung. BL ist somit ein geeignetes ex vivo Modell zur Induktion von Zellstress in der Retina. Die Behandlung mit dem 100 nM RNA-TrkB-Aptamer für 24 h kann die induzierte Apoptose signifikant reduzieren und auch den Zellstress senken. Auch die Zellviabilität steigt nach Behandlung der gestressten Zellen signifikant an.

Die Aptamerbehandlung kann somit ex vivo auch in der gestressten Retina über die TrkB-Aktivierung neuroprotektive Effekte induzieren.

Erstellt mit BioRender.com

4.9 Ausblick

Die Etablierung des RNA-TrkB-Aptamer als potenzielles Therapeutikum für neurodegenerative Erkrankungen des Auges erfordert in der Zukunft weiterführende Untersuchungen. Bevor *in vivo* Versuche erfolgen können, muss das Aptamer noch genauer bezüglich toxischer Nebenwirkungen untersucht werden. Hier sind vor allem längere Behandlungszeiträume und wiederholte Applikationen des Aptamers von Interesse. Weitere Zellstressmarker, wie Interferon- γ , iNos, TGF- β und Interleukine sollten zusätzlich abgefragt werden. Zudem sind Versuche an menschlichen Explantaten anzustreben, um zu eruieren, ob der an porcinen Augen beobachtete Effekt auch am humanen Auge reproduzierbar ist. Es ist hier zu beachten, dass gegebenenfalls Konzentration und Behandlungszeit auf das neue Gewebe angepasst werden müssen. Zudem ist eine weitere Untersuchung der MZ und deren Rolle und Funktion bei neurodegenerativen Erkrankungen wie AMD und RP essenziell für das genauere Verständnis der Krankheiten und der Entwicklung neuer Therapeutika.

Für erste *in vivo* Versuche ist es wichtig verschiedene Applikationsformen (intravitreal vs. subretinal; einmalige Applikation vs. kontinuierliche Applikation) des Aptamers zu vergleichen und die Möglichkeit anderer Delivery-Möglichkeiten zu eruieren. So könnte ein Ansatz sein die Vorteile des DNA-Aptamers zu nutzen und es mittels Vektoren in Zellen einzubringen, um das Aptamer endogen zu synthetisieren.

5 Zusammenfassung

Neurodegenerative Erkrankungen, wie AMD oder *RP*, können derzeit noch nicht kurativ behandelt werden. Aufgrund dessen wurde in dieser Doktorarbeit ein TrkB-Aptamer, als ein neuer Ansatz Neurodegeneration in der Retina therapierbar zu machen, getestet. Das Aptamer ist ein Ligand des TrkB-Rezeptors, dessen Aktivierung neurotrophe und neuroprotektive Effekte auslöst. BDNF, der endogene Ligand an TrkB, erwies sich in Vorversuchen als therapeutisch ungeeignet. Die exogene Gabe führte im ZNS zu schweren Nebeneffekten. Das getestete TrkB-Aptamer ist ein partieller Agonist an TrkB und damit potenziell besser verträglich als BDNF. In dieser Forschungsarbeit wurde das RNA-TrkB-Aptamer *ex vivo* auf seine Verträglichkeit und Wirksamkeit an der porcinen Retina getestet. Die Konzentration 100 nM erwies sich bei einer Behandlungszeit von 24 h als wirksam und gut verträglich. Diese Konzentration konnte sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene eine signifikante TrkB-Signalwegaktivierung induzieren. Bei einer längeren Behandlungszeit von 48 h erwies sich bereits eine Konzentration von 10 nM als wirksam. 100 nM des Aptamers führten nach 48 h zur Internalisierung des Rezeptors. Des Weiteren wurden die gewonnenen Erkenntnisse über das RNA-TrkB-Aptamer mit einem DNA-TrkB-Aptamer verglichen. Dieses lieferte vergleichbare Ergebnisse bei einer Konzentration von 100 nM für 24 h.

Zuletzt erfolgte die Untersuchung der neuroprotektiven Effekte des RNA-TrkB-Aptamers in der durch BL gestressten Retina. Das Aptamer konnte in diesem *ex vivo* Stressmodell die Zellen vor der Apoptose retten und oxidativen Stress in der Retina reduzieren. Vergleichbare Ergebnisse lieferten Versuche mit durch BL gestressten MZ. Zusammenfassend kann aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse auf eine gute Verträglichkeit und Wirksamkeit des RNA-TrkB-Aptamers in der porcinen Retina geschlossen werden. 100 nM des Aptamers aktivierten neuroprotektive Signalwege und konnten im *ex vivo* BL-Stressmodell retinale Zellen vor der Apoptose retten.

6 Quellenverzeichnis

1. **Leydhecker, W. and F. Grehn**, *Das Auge*, in *Augenheilkunde*. 1993, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 3-10.
2. **Ozawa, Y.**, *Oxidative stress in the light-exposed retina and its implication in age-related macular degeneration*. *Redox Biol*, 2020. **37**: p. 101779.
3. **Pagon, R.A.**, *Retinitis pigmentosa*. *Surv Ophthalmol*, 1988. **33**(3): p. 137-77.
4. **Fleckenstein, M., et al.**, *Age-related macular degeneration*. *Nat Rev Dis Primers*, 2021. **7**(1): p. 31.
5. **Datta, S., et al.**, *The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD*. *Prog Retin Eye Res*, 2017. **60**: p. 201-218.
6. **Gallenga, C.E., et al.**, *Molecular Mechanisms Related to Oxidative Stress in Retinitis Pigmentosa*. *Antioxidants (Basel)*, 2021. **10**(6).
7. **Schnichels, S., et al.**, *Retina in a dish: Cell cultures, retinal explants and animal models for common diseases of the retina*. *Prog Retin Eye Res*, 2021. **81**: p. 100880.
8. **Gumus, K. and S.C. Pflugfelder**, *Anterior Segment Optical Coherence Tomography (AS-OCT) in the Management of Dry Eye*. *International Ophthalmology Clinics*, 2017. **57**(2): p. 13-22.
9. **Klabe, K. and H. Kaymak**, *Veränderungen im hinteren Augenabschnitt*, in *Das Marfan-Syndrom*. 2017, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 99-105.
10. **Reichenbach, A. and A. Bringmann**, *New functions of Müller cells*. *Glia*, 2013. **61**(5): p. 651-78.
11. **Xue, Y., et al.**, *The role of retinol dehydrogenase 10 in the cone visual cycle*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 2390.
12. **Schultz, N.M., et al.**, *Global Burden of Dry Age-Related Macular Degeneration: A Targeted Literature Review*. *Clin Ther*, 2021. **43**(10): p. 1792-1818.
13. **Hartong, D.T., E.L. Berson, and T.P. Dryja**, *Retinitis pigmentosa*.

- Lancet, 2006. **368**(9549): p. 1795-809.
14. **Dias, M.F., et al.**, *Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: Basic research and clinical perspectives*. Prog Retin Eye Res, 2018. **63**: p. 107-131.
 15. **Chader, G.J.**, *Animal models in research on retinal degenerations: past progress and future hope*. Vision Res, 2002. **42**(4): p. 393-9.
 16. **Ferrari, S., et al.**, *Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms*. Curr Genomics, 2011. **12**(4): p. 238-49.
 17. **Narayan, D.S., et al.**, *A review of the mechanisms of cone degeneration in retinitis pigmentosa*. Acta Ophthalmol, 2016. **94**(8): p. 748-754.
 18. **Kaur, G. and N.K. Singh**, *The Role of Inflammation in Retinal Neurodegeneration and Degenerative Diseases*. Int J Mol Sci, 2021. **23**(1).
 19. **Imamura, Y., et al.**, *Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(30): p. 11282-7.
 20. **Pujol-Lereis, L.M., et al.**, *Interrelation Between Oxidative Stress and Complement Activation in Models of Age-Related Macular Degeneration*. Adv Exp Med Biol, 2016. **854**: p. 87-93.
 21. **Ambati, J., J.P. Atkinson, and B.D. Gelfand**, *Immunology of age-related macular degeneration*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(6): p. 438-51.
 22. **Wu, Q., et al.**, *Dysregulations of follicular helper T cells through IL-21 pathway in age-related macular degeneration*. Mol Immunol, 2019. **114**: p. 243-250.
 23. **Palestine, A.G., et al.**, *Plasma C-C Chemokine Concentrations in Intermediate Age-Related Macular Degeneration*. Front Med (Lausanne), 2021. **8**: p. 710595.
 24. **Ambati, J. and B.J. Fowler**, *Mechanisms of age-related macular degeneration*. Neuron, 2012. **75**(1): p. 26-39.
 25. **Gauthier, R., et al.**, *Brain-derived neurotrophic factor gene delivery to muller glia preserves structure and function of light-damaged*

- photoreceptors*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(9): p. 3383-92.
26. **Lu, B., G. Nagappan, and Y. Lu**, *BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction*. Handb Exp Pharmacol, 2014. **220**: p. 223-50.
27. **Grishanin, R.N., et al.**, *Retinal TrkB receptors regulate neural development in the inner, but not outer, retina*. Mol Cell Neurosci, 2008. **38**(3): p. 431-43.
28. **Huang, E.J. and L.F. Reichardt**, *Neurotrophins: roles in neuronal development and function*. Annu Rev Neurosci, 2001. **24**: p. 677-736.
29. **Kim, J., et al.**, *Brain-derived neurotrophic factor and GABAergic transmission in neurodegeneration and neuroregeneration*. Neural Regen Res, 2017. **12**(10): p. 1733-1741.
30. **Du, J., et al.**, *Regulation of TrkB receptor tyrosine kinase and its internalization by neuronal activity and Ca²⁺ influx*. Journal of Cell Biology, 2003. **163**(2): p. 385-395.
31. **Frank, L., et al.**, *BDNF down-regulates neurotrophin responsiveness, TrkB protein and TrkB mRNA levels in cultured rat hippocampal neurons*. Eur J Neurosci, 1996. **8**(6): p. 1220-30.
32. **Azadi, S., et al.**, *CNTF+BDNF treatment and neuroprotective pathways in the rd1 mouse retina*. Brain Research, 2007. **1129**: p. 116-129.
33. **Zhang, J.C., W. Yao, and K. Hashimoto**, *Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-TrkB Signaling in Inflammation-related Depression and Potential Therapeutic Targets*. Curr Neuropharmacol, 2016. **14**(7): p. 721-31.
34. **Jin, W.**, *Regulation of BDNF-TrkB Signaling and Potential Therapeutic Strategies for Parkinson's Disease*. J Clin Med, 2020. **9**(1).
35. **Lu, B., et al.**, *BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases*. Nat Rev Neurosci, 2013. **14**(6): p. 401-16.
36. **Tsai, C.Y., et al.**, *Brain-derived neurotrophic factor ameliorates brain stem cardiovascular dysregulation during experimental temporal lobe status epilepticus*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33527.
37. **Mattson, M.P., et al.**, *Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced*

- accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons.* J Neurochem, 1995. **65**(4): p. 1740-51.
38. **Kimura, A., et al.,** *Neuroprotection, Growth Factors and BDNF-TrkB Signalling in Retinal Degeneration.* International Journal of Molecular Sciences, 2016. **17**(9): p. 1584.
39. **Weber, A.J. and C.D. Harman,** *BDNF treatment and extended recovery from optic nerve trauma in the cat.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(10): p. 6594-604.
40. **Croll, S.D., et al.,** *Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex.* Neuroscience, 1999. **93**(4): p. 1491-506.
41. **Wurzelmann, M., J. Romeika, and D. Sun,** *Therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a small molecular mimics of BDNF for traumatic brain injury.* Neural Regen Res, 2017. **12**(1): p. 7-12.
42. **Nagahara, A.H. and M.H. Tuszynski,** *Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders.* Nature Reviews Drug Discovery, 2011. **10**(3): p. 209-219.
43. **Huang, Y.Z., et al.,** *RNA aptamer-based functional ligands of the neurotrophin receptor, TrkB.* Mol Pharmacol, 2012. **82**(4): p. 623-35.
44. **Wu, D. and W.M. Pardridge,** *Neuroprotection with noninvasive neurotrophin delivery to the brain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(1): p. 254-9.
45. **Lam, S.Y., H.L. Lau, and C.K. Kwok,** *Capture-SELEX: Selection Strategy, Aptamer Identification, and Biosensing Application.* Biosensors (Basel), 2022. **12**(12).
46. **Keefe, A.D., S. Pai, and A. Ellington,** *Aptamers as therapeutics.* Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(7): p. 537-50.
47. **Ni, X., et al.,** *Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons.* Curr Med Chem, 2011. **18**(27): p. 4206-14.

48. **Fu, Z. and J. Xiang**, *Aptamers, the Nucleic Acid Antibodies, in Cancer Therapy*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(8).
49. **Vavvas, D. and D.J. D'Amico**, *Pegaptanib (Macugen): treating neovascular age-related macular degeneration and current role in clinical practice*. Ophthalmol Clin North Am, 2006. **19**(3): p. 353-60.
50. **Colquitt, J.L., et al.**, *Ranibizumab and pegaptanib for the treatment of age-related macular degeneration: a systematic review and economic evaluation*. Health Technol Assess, 2008. **12**(16): p. iii-iv, ix-201.
51. **Takeda, A.L., et al.**, *Pegaptanib and ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: a systematic review*. Br J Ophthalmol, 2007. **91**(9): p. 1177-82.
52. **Bundesausschuss, G.**, *Courtesy translation – only the German version is legally binding. Justification to the Resolution of the Federal Joint Committee (G-BA) on an Amendment of the Pharmaceuticals Directive (AM-RL): Annex XII – Benefit Assessment of Medicinal Products with New Active Ingredients According to Section 35a SGB V Brolocizumab (Neovascular Age-related Macular Degeneration)*. 2020: p. 4.
53. **Trifunović, D., et al.**, *Neuroprotective strategies for the treatment of inherited photoreceptor degeneration*. Curr Mol Med, 2012. **12**(5): p. 598-612.
54. **Löscher, M., et al.**, *Potential therapy of neurodegenerative retinopathies via activation of the BDNF-TrkB signaling pathway by a specific aptamer*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2019. **60**(9): p. 5708-5708.
55. **Zhao, Z.C., et al.**, *Research progress about the effect and prevention of blue light on eyes*. Int J Ophthalmol, 2018. **11**(12): p. 1999-2003.
56. **Guduric-Fuchs, J., et al.**, *Immunohistochemical study of pig retinal development*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 1915-28.
57. **Pfaffl, M.W.**, *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
58. **Salinovich, O. and R.C. Montelaro**, *Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by*

- sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. Anal Biochem, 1986. **156**(2): p. 341-7.
59. **Sander, H., et al.**, *Ponceau S waste: Ponceau S staining for total protein normalization*. Anal Biochem, 2019. **575**: p. 44-53.
60. **Karg, T.J. and K.G. Golic**, *Photoconversion of DAPI and Hoechst dyes to green and red-emitting forms after exposure to UV excitation*. Chromosoma, 2018. **127**(2): p. 235-245.
61. **Julien, O. and J.A. Wells**, *Caspases and their substrates*. Cell Death Differ, 2017. **24**(8): p. 1380-1389.
62. **Lakhani, S.A., et al.**, *Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis*. Science, 2006. **311**(5762): p. 847-51.
63. **Fietz, A., et al.**, *Blue Light Damage and p53: Unravelling the Role of p53 in Oxidative-Stress-Induced Retinal Apoptosis*. Antioxidants (Basel), 2023. **12**(12).
64. **Fietz, A., J. Hurst, and S. Schnichels**, *Out of the Shadow: Blue Light Exposure Induces Apoptosis in Müller Cells*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(23).
65. **Mainster, M.A., et al.**, *The Blue Light Hazard Versus Blue Light Hype*. Am J Ophthalmol, 2022. **240**: p. 51-57.
66. **Arnault, E., et al.**, *Phototoxic action spectrum on a retinal pigment epithelium model of age-related macular degeneration exposed to sunlight normalized conditions*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71398.
67. **Ham, W.T., Jr., H.A. Mueller, and D.H. Sliney**, *Retinal sensitivity to damage from short wavelength light*. Nature, 1976. **260**(5547): p. 153-5.
68. **Lupien, C., et al.**, *Expression of glial fibrillary acidic protein in primary cultures of human Müller cells*. Exp Eye Res, 2004. **79**(3): p. 423-9.
69. **Ahmed, F., M.D. Paul, and K. Hristova**, *The biophysical basis of receptor tyrosine kinase ligand functional selectivity: Trk-B case study*. Biochem J, 2020. **477**(23): p. 4515-4526.
70. **Wu, K.H., et al.**, *Differential expression of GFAP in early v late AMD: a quantitative analysis*. Br J Ophthalmol, 2003. **87**(9): p. 1159-66.
71. **Franze, K., et al.**, *Müller cells are living optical fibers in the vertebrate retina*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(20): p. 8287-92.

72. **Navneet, S., K. Wilson, and B. Rohrer,** *Müller Glial Cells in the Macula: Their Activation and Cell-Cell Interactions in Age-Related Macular Degeneration.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2024. **65**(2): p. 42.
73. **Wang, J.S. and V.J. Kefalov,** *The cone-specific visual cycle.* Prog Retin Eye Res, 2011. **30**(2): p. 115-28.
74. **Dubis, A.M., et al.,** *Relationship between the foveal avascular zone and foveal pit morphology.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. **53**(3): p. 1628-36.
75. **Iandiev, I., et al.,** *Müller cell response to blue light injury of the rat retina.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(8): p. 3559-67.
76. **Dunaief, J.L., et al.,** *The role of apoptosis in age-related macular degeneration.* Arch Ophthalmol, 2002. **120**(11): p. 1435-42.
77. **Kuse, Y., et al.,** *Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light.* Sci Rep, 2014. **4**: p. 5223.
78. **Tezel, G.,** *Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences.* Prog Retin Eye Res, 2006. **25**(5): p. 490-513.
79. **Fabre, M., et al.,** *Recent Advances in Age-Related Macular Degeneration Therapies.* Molecules, 2022. **27**(16).
80. **Cai, X. and J.F. McGinnis,** *Nanocerria: a Potential Therapeutic for Dry AMD.* Adv Exp Med Biol, 2016. **854**: p. 111-8.
81. **Heinemann, M., et al.,** *Awareness of Age-Related Macular Degeneration in Community-Dwelling Elderly Persons in Germany.* Ophthalmic Epidemiol, 2019. **26**(4): p. 238-243.
82. **Gupta, V.K., et al.,** *TrkB receptor signalling: implications in neurodegenerative, psychiatric and proliferative disorders.* Int J Mol Sci, 2013. **14**(5): p. 10122-42.
83. **Massa, S.M., et al.,** *Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents.* J Clin Invest, 2010. **120**(5): p. 1774-85.
84. **Saito, T., et al.,** *TrkB-T1 receptors on Muller cells play critical role in*

- brain-derived neurotrophic factor-mediated photoreceptor protection against phototoxicity*. *Curr Eye Res*, 2009. **34**(7): p. 580-8.
85. **Harada, C., et al.**, *Glia- and neuron-specific functions of TrkB signalling during retinal degeneration and regeneration*. *Nat Commun*, 2011. **2**: p. 189.
86. **Andero, R., D.C. Choi, and K.J. Ressler**, *BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders*. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2014. **122**: p. 169-92.
87. **Cappoli, N., et al.**, *The emerging role of the BDNF-TrkB signaling pathway in the modulation of pain perception*. *J Neuroimmunol*, 2020. **349**: p. 577406.
88. **Heng, K., et al.**, *BDNF and cAMP are neuroprotective in a porcine model of traumatic optic neuropathy*. *JCI Insight*, 2024. **9**(3).
89. **Mansour-Robaey, S., et al.**, *Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(5): p. 1632-6.
90. **Chen, H. and A.J. Weber**, *BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001. **42**(5): p. 966-74.
91. **Coull, J.A., et al.**, *Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain*. *Nature*, 2003. **424**(6951): p. 938-42.
92. **Pereiro, X., et al.**, *Differential Distribution of RBPMS in Pig, Rat, and Human Retina after Damage*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(23).
93. **Bennett, J.L., S.R. Zeiler, and K.R. Jones**, *Patterned expression of BDNF and NT-3 in the retina and anterior segment of the developing mammalian eye*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999. **40**(12): p. 2996-3005.
94. **Harada, T., et al.**, *Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration*. *J Neurosci*, 2002. **22**(21): p. 9228-36.
95. **Harada, C., et al.**, *TrkB Signaling in Retinal Glia Stimulates Neuroprotection after Optic Nerve Injury*. *Am J Pathol*, 2015. **185**(12): p.

- 3238-47.
96. **Andrade, H., W. Lin, and Y. Zhang**, *Specificity from nonspecific interaction: regulation of tumor necrosis factor- α activity by DNA*. J Biol Chem, 2019. **294**(16): p. 6397-6404.
97. **Li, J.Q., et al.**, *Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: a systematic review and meta-analysis*. Br J Ophthalmol, 2020. **104**(8): p. 1077-1084.
98. **Hurst, J., et al.**, *A novel porcine ex vivo retina culture model for oxidative stress induced by H₂O₂*. Altern Lab Anim, 2017. **45**(1): p. 11-25.
99. **Kuehn, S., et al.**, *Degenerative effects of cobalt-chloride treatment on neurons and microglia in a porcine retina organ culture model*. Exp Eye Res, 2017. **155**: p. 107-120.
100. **Ouyang, X., et al.**, *Mechanisms of blue light-induced eye hazard and protective measures: a review*. Biomed Pharmacother, 2020. **130**: p. 110577.
101. **Hunter, J.J., et al.**, *The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light*. Prog Retin Eye Res, 2012. **31**(1): p. 28-42.
102. **Tomita, Y., et al.**, *Müller glial responses compensate for degenerating photoreceptors in retinitis pigmentosa*. Exp Mol Med, 2021. **53**(11): p. 1748-1758.
103. **Di Pierdomenico, J., et al.**, *Coordinated Intervention of Microglial and Müller Cells in Light-Induced Retinal Degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020. **61**(3): p. 47.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Department für Augenheilkunde Tübingen / Universitäts-Augenklinik unter Betreuung von Dr. rer. nat. Sven Schnichels durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. rer. nat. Sven Schnichels und Dr. rer. nat. José Hurst.

Die Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. José Hurst und Agnes Fietz) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. rer. nat. José Hurst und Agnes Fietz von mir selbst.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

8 Veröffentlichungen

- 04/2023 **ARVO Annual Meeting 2023 New Orleans, USA**
Posterpräsentation „Neuroprotection using a TrkB-aptamer on the porcine retina“
- Isabell Schleicher, José Hurst, Agnes Fietz, Sven Schnichels
- 10/2022 **DOG-Kongress 2022 Berlin, Deutschland**
Vortrag „Neuroprotektion mittels TrkB-Aptamer an der porcinen Retina“
- Isabell Schleicher

8.1 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Dr. rer. nat. Sven Schnichels, Leiter der AG Schnichels an der Augenklinik Tübingen, bedanken, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit unter seiner Leitung und außerordentlicher Betreuung durchzuführen. Vielen Dank auch für die Geduld und das Vertrauen in mich über die Jahre, sowie die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und dem Verfassen meiner Doktorarbeit. Nicht zuletzt bin ich sehr dankbar für die Ermöglichung der Teilnahme und Unterstützung während meiner ersten Kongresserfahrungen auf der DOG und ARVO.

Frau Dr. rer. nat. José Hurst danke ich besonders für die ausführliche Einarbeitung und die herausragende Betreuung meiner Arbeit. Des Weiteren vielen Dank für das große Vertrauen in mich, die vielen Korrekturen und Hilfestellungen bezüglich meiner Arbeit und die ständige Erreichbarkeit bei Fragen.

Besonderer Dank auch an Agnes Fietz für die hervorragende Einarbeitung im Labor, sowie für die jederzeit verfügbare Hilfe, moralische und fachliche Unterstützung und nicht zuletzt für deine Freundschaft.

Zudem möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe für die gute Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft danken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein großes Dankeschön gilt auch der DOG. Das DOG-Doktoranden-Stipendium hat mich nicht nur finanziell, sondern vor allem auch darüber hinaus durch die Teilnahme am DOG-Jahreskongress wissenschaftlich, fachlich und sozial enorm bereichert.

Nicht zuletzt gilt mein großer Dank meiner Familie und meinen Freunden für die nie endende Geduld und Unterstützung über die letzten Jahre, sowie die unzähligen Korrekturen meiner Doktorarbeit.