

Titelblatt zum Schlussbericht

(Gemäß Nrn. 6.6 BNBest-BMBF 98 bzw. 11.6 NKBF 98)

Thema: *Rethealthsi - Gap-Junctions als Verteiler von Heilsignalen an Nervenzellen der erkrankten Netzhaut*

Förderkennzeichen <i>(von allen Zuwendungen des Verbundes)</i>	Autoren <i>(hier bitte alle Autorinnen und Autoren nennen, um Plagiatsvorwürfe zu vermeiden)</i>	Zuwendungsempfänger <i>(Teilprojekte zuordnen)</i>	Laufzeit <i>(Beginn und Ende)</i>	Hinweis auf Vertraulichkeit
01EW2107	Dedek Karin https://orcid.org/000-0003-1490-0141	<i>Carl von Ossietzky Universität Oldenburg</i>	01.05.2021 – 31.12.2024	
	Völgyi Béla https://orcid.org/000-0001-7481-390X	<i>Universität Pécs, Ungarn</i>		
	Rizzo Stanislao https://orcid.org/000-0001-6302-063X	<i>Policlinico Gemelli, Rom, Italien</i>		

Kontaktperson:

Prof. Dr. Karin Dedek

Carl-von-Ossietzky-Str. 9-11

26129 Oldenburg

karin.dedek@uol.de

+49 441 798 3425

Schlussbericht zum Vorhaben

ERA-NET NEURON Cofund

RETHEALTHSI – Gap-Junctions als Verteiler von Heilsignalen an Nervenzellen der erkrankten Netzhaut

Prof. Dr. Karin Dedek
AG Neurosensorik, Universität Oldenburg

Zuwendungsempfänger: Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

Förderkennzeichen: **01EW2107**

Vorhabenbezeichnung: Rethealthsi - Gap-Junctions als Verteiler von Heilsignalen an Nervenzellen der erkrankten Netzhaut - Zellkultur- und Gewebestudien zur Permeabilität von Gap-Junctions der Netzhaut und des Pigmentepithels

Laufzeit des Vorhabens: 01.05.2021 – 31.12.2024

I. Kurz-Darstellung

1. Aufgabenstellung

Erkrankungen der Retina beeinträchtigen weltweit Millionen von Menschen in ihrem Lebensstil, verursachen Blindheit und belasten die Gesundheitssysteme. Dabei ist Retinitis Pigmentosa die häufigste degenerative Erkrankung mit ca. 1 Mio. Betroffenen weltweit und einer Inzidenz von ca. 1:4.000. Mehr als 100 verschiedene Mutationen, die zu Retinitis Pigmentosa führen können, sind bekannt. Obwohl es viele vielsprechende therapeutische Ansätze gibt, ist Retinitis Pigmentosa nicht heilbar. Daher ist weitere Forschung zu mutationsunabhängigen Therapien notwendig. Dieses Projekt leistet dazu einen direkten Beitrag, denn es schlägt vor, Gap-Junctions als Vermittler von Heil- und Überlebenssignalen in der erkrankten Netzhaut (Retina) zu nutzen. Dabei sollte die Grundlagenforschung zur Durchlässigkeit von Gap-Junctions über die Studien an Tiermodellen in ein therapeutisches Setting übertragen werden.

2. Voraussetzungen für das Vorhaben

Das Gesamtprojekt Rethealthsi hatte folgende Ziele:

- a. Zu ermitteln, ob Gap-Junctions in der Retina als Vermittler von Heilsignalen genutzt werden können. Dazu sollten die physiko-chemischen Eigenschaften von retinalen Gap-Junctions untersucht werden.
- b. Zu ermitteln, inwieweit Veränderungen in den Tight-Junctions und Gap-Junctions des retinalen Pigmentepithels (RPE) zu neurodegenerativen Erkrankungen der Retina beitragen.
- c. Zu untersuchen, ob Dexamethason (ein synthetisches Steroid) einen neuroprotektiven Effekt auf die Retina von Retinitis-Pigmentosa-Patientinnen und -Patienten haben kann.
- d. Erkenntnisse aus *Rethealthsi* der Öffentlichkeit zugänglich zu machen, zu publizieren und zu verbreiten. Das geförderte Vorhaben auf deutscher Seite sollte unmittelbar zu den Zielen a., b. und d. beitragen. Mit Hilfe von Zellkultur-Experimenten, Farbstoff-Injektionen und Netzhaut-Ganzpräparaten sollte die Durchlässigkeit von retinalen Gap-Junctions untersucht werden (a.). Zusätzlich sollte das RPE physiologisch untersucht werden. Dazu sollte ein Verfahren entwickelt werden, dass es erlaubt, die Integrität des RPE in gesunden und erkrankten Mäusen zu messen (b.). Ergebnisse sollten auf nationalen und internationalen Konferenzen dem Fachpublikum und auch Patientenorganisationen präsentiert werden (d.).

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben startete auf deutscher Seite am 1.05.2021, allerdings dauerte es durch die Covid19-Pandemie und die damit verbundenen Reise- und Visaeinschränkungen bis zum 1.10.2024 bis die eingestellte Doktorandin ihre Arbeit aufnehmen konnte. Der Projektverlauf erfolgte in enger Absprache mit den internationalen Partnern aus Ungarn und Italien und wurde, zunächst in online-Treffen und dann auch in persönlichen Projekttreffen, immer wieder angepasst.

Innerhalb des ersten Jahres haben wir die Permeabilität von retinalen Gap-Junctions in Zellkultur-Systemen und Geweben studiert. Wir konnten wichtige Erkenntnisse zum Transport des Gap-Junction-Proteins Connexin36 gewinnen, die wir zusammen mit anderen 2023 in der Zeitschrift *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht haben ([Tetenborg et al., 2023](#)¹). Ein weiterer Meilenstein war, zu zeigen, dass Serotonin die Gap-Junctions von Horizontalzellen der Mausretina passieren kann. Unser Kooperationspartner Prof. Béla Völgyi hat ähnliche Ergebnisse zu anderen retinalen Zelltypen gezeigt ([Szarka et al., 2023](#)).

¹ Literaturangaben sind in **blau**, Arbeiten aus dem Konsortium in **fett blau** dargestellt.

Ein noch wichtigerer Meilenstein war erreicht, als wir zeigen konnten, dass einige – jedoch nicht alle – retinalen Gap-Junctions für sehr große Substanzen (>0.8 kDa) durchlässig sind. Wir bestätigen damit, dass es auch bei neurodegenerativen Erkrankungen der Netzhaut möglich sein könnte, therapeutische Wirkstoffe zu verabreichen und sie durch interzelluläre Gap-Junction-Kanäle im Gewebe zu verteilen. Diese Studie haben wir 2023 in der Zeitschrift *Frontiers in Ophthalmology* veröffentlicht (Yuan et al., 2024).

Anschließend haben wir uns auf die Studien zum RPE konzentriert und Messungen zur Durchlässigkeit des RPEs an gesunden Mäusen etabliert. Dies hat zwar länger gedauert als erwartet, aber es ist uns gelungen, den sogenannten Transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) in einer Sklera-RPE-Retina-Präparation zu messen. Dies war ein großer Meilenstein, der auf dem jährlichen Treffen der Stiftung Pro Retina - Stiftung zur Verhütung von Blindheit 2024 von uns präsentiert wurde. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die TEER-Messung sensitiv genug ist, um akute Veränderungen des RPE zu detektieren. Dafür haben wir unsere TEER-Messungen mit einer quantitativen morphologischen Analyse des RPE verknüpft. Diese Ergebnisse bereiten wir gerade für eine Publikation vor (Yuan et al., in Vorbereitung).

4. Stand der Wissenschaft

Gap-Junctions wurden schon vor vielen Jahren mit dem sogenannten Bystander-Effekt in Verbindung gebracht, der beschreibt, dass absterbende Zelle in erkranktem Gewebe „Todessignale“ zu den Nachbarzellen leiten. Daher wurde vorgeschlagen, Gap-Junctions zu blockieren, um diesen Effekt zu verhindern. Allerdings konnte unser Konsortium in vielen Vorarbeiten zeigen, dass Gap-Junctions in der Retina für den Sehprozess unerlässlich sind (Maxeiner, 2005; Dedek et al., 2006; Bloomfield and Völgyi, 2009; Spinelli et al., 2024). Dabei haben wir bereits viele Techniken entwickelt, die für das Studium von Gap-Junctions notwendig sind (Shelley et al., 2006; Dedek et al., 2008).

In fortgeschrittenen neurodegenerativen Erkrankungen der Netzhaut verändert sich außerdem das retinale Pigmentepithel (RPE). Es wird durchlässiger, vermutlich weil sich die Schlussleisten (Tight-Junctions) und Gap-Junctions zwischen den Epithelzellen verändern. Dies führt dazu, dass die Blut-Retina-Schranke, die vom RPE gebildet wird, zusammenbricht und Immunzellen, toxische Substanzen etc. die Retina erreichen und zu Entzündungsprozessen führen und damit den sekundären Zelltod beschleunigen. Hier haben wir auf Erfahrungen innerhalb des Konsortiums bzw. auf Studien der italienischen Kooperationspartner aufgebaut (Napoli et al., 2021; Napoli and Strettoi, 2023).

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Projektpartner haben sich bei virtuellen Meetings, beim Midterm-Symposium in Alcalá de Henares (Spanien), beim European Retina Meeting 2023 in Tübingen und beim Abschluss-Symposium in Rom und Pisa (Italien) intensiv ausgetauscht. Durch die enge Zusammenarbeit ist eine Sonderausgabe in *Frontiers in Cellular Neuroscience* entstanden, das von Mitgliedern unseres Konsortiums gemeinsam editiert wurde. Zusätzlich wurden Laborbesuche initiiert und weitere gemeinsame Publikationen geplant. Insgesamt hat sich eine starke Synergie ergeben zwischen den Laboren, die mit Grundlagenforschung befasst waren (Prof. Dedek, Deutschland, Prof. Völgyi, Ungarn, Prof. Strettoi, Italien), und den klinischen Partnern (Prof. Rizzo, Italien).

Titelblatt zum Schlussbericht

(Gemäß Nrn. 6.6 BNBest-BMBF 98 bzw. 11.6 NKBF 98)

Thema: *Rethealthsi - Gap-Junctions als Verteiler von Heilsignalen an Nervenzellen der erkrankten Netzhaut*

Förderkennzeichen <i>(von allen Zuwendungen des Verbundes)</i>	Autoren <i>(hier bitte alle Autorinnen und Autoren nennen, um Plagiatswürfe zu vermeiden)</i>	Zuwendungsempfänger <i>(Teilprojekte zuordnen)</i>	Laufzeit <i>(Beginn und Ende)</i>	Hinweis auf Vertraulichkeit
01EW2107	Dedek Karin https://orcid.org/0000-0003-1490-0141	<i>Carl von Ossietzky Universität Oldenburg</i>	01.05.2021 – 31.12.2024	
	Völgyi Béla https://orcid.org/0000-0001-7481-390X	<i>Universität Pécs, Ungarn</i>		
	Rizzo Stanislao https://orcid.org/0000-0001-6302-063X	<i>Policlinico Gemelli, Rom, Italien</i>		

Kontaktperson:

Prof. Dr. Karin Dedek

Carl-von-Ossietzky-Str. 9-11

26129 Oldenburg

karin.dedek@uol.de

+49 441 798 3425

Schlussbericht zum Vorhaben

ERA-NET NEURON Cofund

RETHealthSI – Gap-Junctions als Verteiler von Heilsignalen an Nervenzellen der erkrankten Netzhaut

Prof. Dr. Karin Dedek
AG Neurosensorik, Universität Oldenburg

Zuwendungsempfänger: Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

Förderkennzeichen: **01EW2107**

Vorhabenbezeichnung: Rethealthsi - Gap-Junctions als Verteiler von Heilsignalen an Nervenzellen der erkrankten Netzhaut - Zellkultur- und Gewebestudien zur Permeabilität von Gap-Junctions der Netzhaut und des Pigmentepithels

Laufzeit des Vorhabens: 01.05.2021 – 31.12.2024

I. Kurzbericht (siehe Anlage)

II. Eingehende Darstellung

1. Ergebnisse

Der Arbeitsplan des Gesamtprojekts umfasste vier Arbeitspakete (AP); in AP 1, 2 und 4 war das Vorhaben auf deutscher Seite direkt beteiligt.

a. AP 1: Gap-Junctions in Nervenzellen

Gap Junctions übertragen elektrische Signale von einem Neuron zum anderen und sind wichtig für die metabolische Kopplung und chemische Kommunikation. Sie bestehen aus interzellulären Kanälen mit wässrigen Poren, die Ionen und kleine Moleküle durchlassen (Harris, 2001). In der Netzhaut von Wirbeltieren sind Gap-Junctions wichtig für die visuelle Verarbeitung, z.B. für das Sehen bei Dämmerlicht (Maxeiner, 2005; Dedek et al., 2006; Bloomfield and Völgyi, 2009¹) oder die Informationsverarbeitung in Horizontalzellen (Shelley et al., 2006; Dedek et al., 2008). Kopplung über Gap-Junction fördert jedoch auch den Zelltod nach Schädigung durch Exzitotoxizität (Wang et al., 2010) und Hypoxie (Contreras et al., 2004). Unser Konsortium hat vorgeschlagen, dass man therapeutische Agenzien durch Gap-Junctions ausbreiten und so neurodegenerative Erkrankungen der Netzhaut behandeln könnte.

Um als Vermittler von Gesundheitssignalen zu fungieren, müssen die Gap-Junctions relativ große Moleküle durchlassen können. Die Durchlässigkeit der retinalen Netzwerke für Moleküle >0,6 kDa wurde jedoch noch nicht systematisch untersucht. Wir haben verschiedene Techniken genutzt, um dies zu studieren (Cut-Loading in Zellkultur, Einzelinjektionen in kultivierte Zellen). Um Gap-Junctions im Zellkultur-System untersuchen zu können, sollten die Zellen mit verschiedenen retinalen Connexinen transfiziert werden, z.B. mit Connexin36, das das wichtigste neuronale Connexin darstellt. Die Transfektionseffizienz in Zellkulturzellen (N2A-Zellen, HeLa-Zellen und ARPE-19 Zellen) war jedoch zu gering, um die Permeabilität der Gap-Junctions ermitteln zu können. Mit Connexin36 stabil-transfizierte Zellen wiesen in höheren Passagezahlen gar keine Connexin36-Expression mehr auf (Abb. 1).

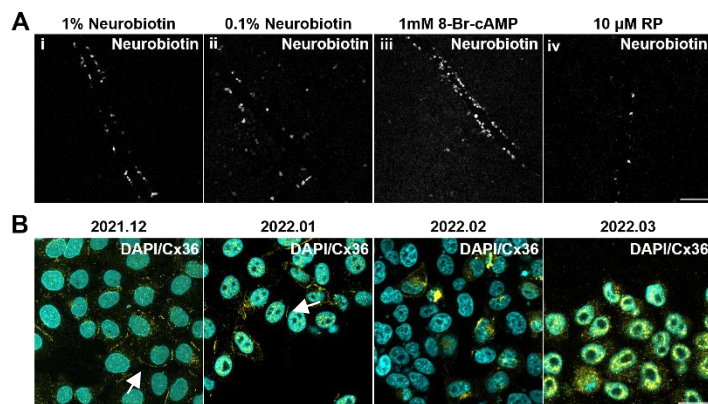


Abb. 1: Permeabilität und Expressionsmuster von Cx36 in HeLa-Cx36-Zellen, nach Cut-Loading. (A) Cut-Loading-Experimente unter verschiedenen Bedingungen. (i) Die Zellen wurden mit 1 % Neurobiotin kultiviert; (ii) das Cut-Loading wurde mit 0,1 % Neurobiotin durchgeführt; (iii) wie (ii), aber die Zellen wurden 5 Minuten lang mit 1 mM 8-Br-cAMP vorinkubiert; (iv) wie (ii), aber die Zellen wurden 5 Minuten lang mit 10 μM RP (Rp-8-CPT-cAMP) vorinkubiert. Trotz Änderungen am Experiment wurde in keiner der Gruppen eine Diffusion von Neurobiotin über den Rand des Cuts hinaus beobachtet. Balken: 200 μm. (B) Immunfärbung von Cx36 in HeLa-Cx36-Zellen bei verschiedenen

Passagenzahlen. Cx36-haltige Gap-Junctions nahmen allmählich ab und verschwanden ab Passage 19. Dies verdeutlicht den passage-abhängigen Verlust der funktionellen Cx36-Expression in HeLa-Cx36-Zellen. Pfeile zeigen auf Gap-Junction-Plaques zwischen benachbarten HeLa-Zellen. Maßstabsleiste: 20 μm. Quelle: [Dissertation, Dr. Chunxu Yuan, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, April 2025](#).

¹ Literaturangaben sind in blau, Arbeiten aus dem Konsortium in fett blau dargestellt.

Wir haben auf verschiedenste Art versucht, die Transfektionseffizienz und die Durchlässigkeit der Gap-Junctions in Zellkulturzellen zu erhöhen. Wir haben zum Beispiel die Konzentration von Neurobiotin und die Pufferbedingungen variiert (**Abb. 1**). Neurobiotin ist ein Gap-Junction-passierender Tracer, der uns als Kontrollsubstanz diente. Wir haben versucht, die Gap-Junctions pharmakologisch zu öffnen (**Abb. 1**), um die Ausbreitung der Substanzen zu erleichtern (s. Dissertation Dr. Chunxu Yuan, Experimente mit 8-br-cAMP etc), jedoch war keine der Methoden ausreichend erfolgreich, um die Permeabilität von retinalen Gap-Junctions in Zellkultur systematisch quantifizieren zu können.

Im Rahmen der Zellkultur-Experimente mit Connexin36 (**Abb. 1B**) haben wir jedoch die wichtige Erkenntnis gewonnen, dass der Transport des Gap-Junction-Proteins Connexin36 ein intaktes PDZ-Bindungsmotiv erfordert. Ist dieses Motiv mutiert, bleibt Connexin36 im Endoplasmatischen Retikulum stecken (**Tetenborg et al., 2023**). Dieser Befund liefert wichtige Hinweise auf den Transport von Gap-Junction-Proteinen in die Membran.

Aufgrund der Schwierigkeiten mit Zellkultur-Systemen haben wir uns schließlich dazu entschieden, die Permeabilität von retinalen Gap-Junctions direkt in ihrer natürlichen Umgebung zu messen. Dazu haben wir direkte Einzelzell-Injektionen im Retina-Ganzpräparat getestet (**Abb. 2**). Diese waren insbesondere mit dem Tracer Serotonin sehr erfolgreich. Allerdings ist Serotonin sehr klein und hat ein relativ niedriges Molekulargewicht (<0.2 kDa), so dass Serotonin für unsere Fragestellung nicht geeignet war. Unser Kooperationspartner in Ungarn (Prof. Völgyi) hat Serotonin jedoch erfolgreich genutzt, um die Gap-Junctions zwischen Ganglienzellen und zwischen Amakrinzellen und Ganglienzellen weiter zu charakterisieren (**Szarka et al., 2023**).

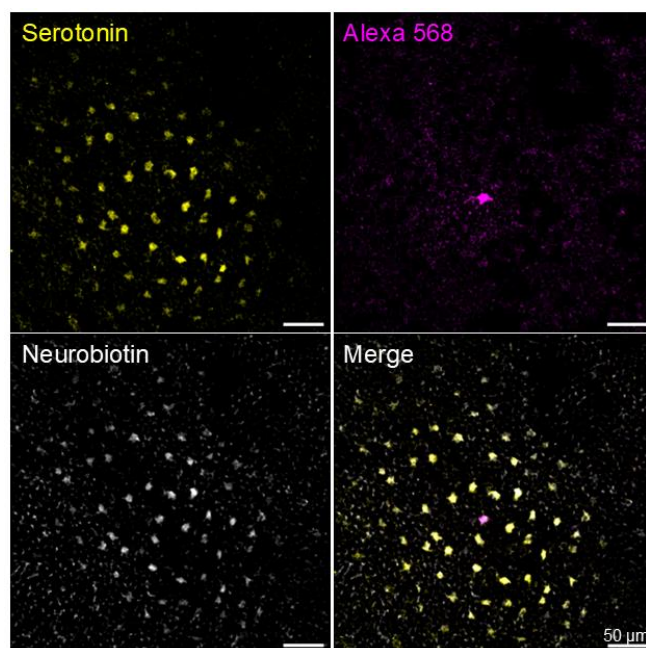


Abb. 2: Serotonin kann durch die Gap-Junctions zwischen Horizontalzellen der Mausretina diffundieren. Einzelzellinjektion in der Mausretina. Alexa 568 ist zu groß für die Gap-Junctions, die aus Connexin 57 bestehen (**Hombach et al., 2004; Shelley et al., 2006**), während Serotonin und Neurobiotin Connexin57-haltige Gap-Junctions passieren können und sehr ähnliche Kopplungsmuster zeigen, die mit anderen Studien vergleichbar sind (**Shelley et al., 2006; Spinelli et al., 2024**). Maßstabsbalken: 50 µm.

Mit der Einzelzellinjektion kann man nur die Gap-Junctions eines Zelltyps untersuchen. Um jedoch die Permeabilität von möglichst vielen verschiedenen Klassen von Gap-Junctions in der Mausretina zu untersuchen, haben wir die Cut-Loading-Methode erfolgreich etabliert (**Abb. 3; Myles and McFadden, 2022**). Dabei wird eine Klinge mit der Test-Substanz benetzt und die Retina geschnitten.

Über die angeschnittenen Fortsätze wird die Substanz in die Zellen aufgenommen und ggf. über Gap-Junctions an benachbarte Zellen weitergegeben. Auf diese Weise können die Gap-Junctions von vielen verschiedenen Zelltypen gleichzeitig studiert werden. Mit dieser Technik haben wir getestet, ob Gap-Junction-Netzwerke in der Mausretina für cGMP und cAMP, gekoppelt an Biotin, durchlässig sind (**Yuan et al., 2024**). Der gut charakterisierte Tracer Neurobiotin diente dabei als Kontrolle. Biotin-cGMP und -cAMP haben ein Molekulargewicht von >0,8 kDa und dienten als Stellvertreter für größere, therapeutisch relevante Substanzen

oder Moleküle, wie miRNA oder siRNA. Ein neues Fluoreszenzmikroskop (Zeiss AxioImager.Z2 mit Apotome3), das durch das Vorhaben angeschafft wurde, ermöglichte eine detaillierte Quantifizierung der Cut-Loading-Experimente.

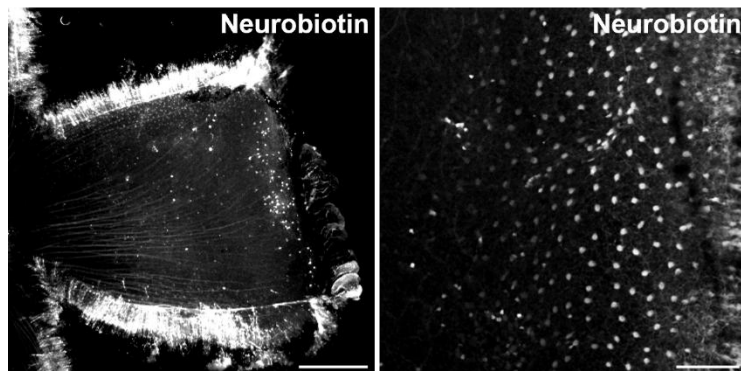


Abb. 3: Cut-Loading-Experiment an der Mausretina. Überblick über einen Retina-Quadranten. Neurobiotin diffundiert durch die Gap-Junctions zwischen Horizontalzellen und zeigt ein großes Kopplungsfeld. Aufgenommen mit dem Zeiss AxioImager.Z2 mit Apotome3. Maßstabsbalken: 1 mm, 100 μ m. Quelle: Dr. Chunxu Yuan.

So konnten wir zeigen, dass Biotin-cGMP und -cAMP zwar nicht die Gap-Junctions der Horizontalzellen passieren können, aber die Gap-Junctions verschiedener Amakrinzellen. Um zu beweisen, dass das detektierte Biotin-cGMP und -cAMP tatsächlich durch die Gap-Junctions diffundiert ist, haben wir dieses Ergebnis mit dem Gap-Junction-Blocker Meclofenaminsäure validiert, was die Anzahl der Biotin-positiven Zellen signifikant reduzierte (Yuan et al., 2024).

miRNAs haben eine Größe von ~ 1 kDa. Daher können unsere Ergebnisse in der Mausretina darauf hindeuten, dass sogar in intaktem Nervengewebe einige Gap-Junctions für miRNAs oder siRNAs durchlässig sind. Dies eröffnet höchst interessante Möglichkeiten für den Schutz von Nervenzellen in der Retina: Amakrinzellen sterben den programmierten Zelltod, wenn retinale Ganglienzellen aufgrund einer Ischämie absterben. Dies geschieht durch einen Gap-Junction-vermittelten Bystander-Effekt (Akopian et al., 2014). Die Gap-Junction-vermittelte Ausbreitung von siRNAs, die in apoptotische Signalwege eingreifen, hat das Potenzial, den fortschreitenden (sekundären) Zellverlust bei degenerativen Erkrankungen der Netzhaut zu verhindern (Yuan et al., 2024).

b. AP 2: Gap-Junctions in Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE)

Im Auge umfasst die äußere Blut-Retina-Schranke (oBRB, *outer blood-retina barrier*) die Aderhaut, die Bruchsche Membran und das retinale Pigmentepithel (RPE). Die oBRB reguliert den Transport von gelösten Stoffen und Nährstoffen von der Aderhaut in den subretinalen Raum (Zhang et al., 2025). Insbesondere die Zell-Zell-Kontakte (Tight- und Gap-Junctions) zwischen den Zellen des RPE sind wichtig für die Integrität der oBRB. Bei Retinitis pigmentosa, der häufigsten fortschreitenden erblichen Netzhautdegeneration, die zur Erblindung führt (Verbakel et al., 2018), sind die Tight-Junctions des RPE verändert, was zu Flüssigkeitsaustritt und Entzündungen in der neuralen Netzhaut führen kann (Napoli et al., 2021; Napoli and Strettoi, 2023). Das RPE stellt ein Epithel dar, was aus einer einzelnen Zellschicht besteht. Seine Integrität kann mithilfe von transepithelialen elektrischen Widerstandsmessungen (TEER) bewertet werden. Je höher der Widerstand, desto dichter ist das Epithel. TEER-Messungen waren jedoch bisher auf kultivierte RPE-Zellen der Maus beschränkt. Da es sehr viele Mausmodelle für retinale degenerative Erkrankungen gibt, war es notwendig, ein System zu etablieren, das TEER-Messungen am RPE von Mäusen erlaubt. Daher haben wir ein Sklera-oBRB-Retina-Präparat entwickelt und ein kommerziell erhältliches Ussing-Kammersystem für TEER-Messungen in intaktem Mausgewebe modifiziert

Unsere Ergebnisse zeigen eine neu entwickelte Methodik zur quantitativen Bewertung der oBRB-Integrität in Mausmodellen für Netzhautdegeneration, die als funktionelles Readout nach therapeutischer Intervention verwendet werden kann. Die Publikation dieser Ergebnisse ist zurzeit in Vorbereitung (Yuan et al., in Vorbereitung). Ein Manuskript liegt bereits vor, muss jedoch noch final bearbeitet werden. Die Daten der TEER-Messung waren ein großer Meilenstein, der auf dem jährlichen Treffen der Stiftung Pro Retina - Stiftung zur Verhütung von Blindheit 2024 von uns präsentiert wurde.

c. AP 4: Verbreitung/Bekanntmachung der Ergebnisse

Die meisten Ergebnisse wurden bereits in begutachteten, internationalen Zeitschriften veröffentlicht. Zusätzlich wurden die Ergebnisse auf Konferenzen bekannt gemacht.

Begutachtete Publikationen:

Tetenborg S, Liss V, Breitsprecher L, Timonina K, Kotova A, Acevedo Harnecker AJ, **Yuan C**, Shihabeddin E, **Dedek K**, Zoidl G, Hensel M, O'Brien J (2023) Intralumenal docking of Cx36 channels in the ER isolates mis-trafficked protein. *J Biol Chem* 299(11):105282. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105282

Yuan C, Gerhards L, Solov'yov IA, **Dedek K** (2024) Biotin-cGMP and -cAMP are able to permeate through the gap junctions of some amacrine cells in the mouse retina despite their large size. *Front Ophthalmol* 3:1334602. doi: 10.3389/fopht.2023.1334602.

Nicht-begutachtete Publikationen:

Zusätzlich habe ich (Karin Dedek) mit Dr. Kovács-Öller, einem Wissenschaftlichen Mitarbeiter im Labor von *Rethealthsi*-Koordinator Prof. Völgyi einen Sonderband in *Frontiers of Cellular Neuroscience* editiert und gemeinsam mit ihm und Dr. Hillier ein Editorial dazu verfasst:

Kovács-Öller T, **Dedek K**, Hillier D (2022) Editorial: Visual code: From the retina to the brain. *Front Cell Neurosci* 16:1018229. doi: 10.3389/fncel.2022.1018229.

Publikationen in Vorbereitung:

Yuan C, Yuan S, **Dedek K**. Assessing the Paracellular Permeability of Retinal Pigment Epithelium in Mice Using Transepithelial Resistance Measurements. *In Vorbereitung*.

Szarka G, Hoffmann G, Kovács-Öller T, Di Marco B, Strettoi E, **Yuan C**, **Dedek K**, Völgyi B. Gap Junctions Form Bridges between Bench Studies and Clinical Ophthalmology. Review, in Vorbereitung.

Dissertation:

Chunxu Yuan: *Assessing the Permeability of Retinal Gap Junctions and Retinal Pigment Epithelium in Mice Using Cut-Loading and Transepithelial Resistance Measurements*. April 2025.

Bachelorarbeit:

Anna Perner: Immunhistologische Analyse der Horizontalzellen in der Mausretina. Dezember 2024.

Konferenzbeiträge:

Mid-term Treffen, Alcalá de Henares, Spanien

Dye injection and cut loading experiments to determine the permeability of retinal gap junctions,

European Retina Meeting 2023, Tübingen, Deutschland, *Dye injection and cut loading experiments to determine the permeability of retinal gap junctions*

Jahrestreffen Stiftung Pro Retina - Stiftung zur Verhütung von Blindheit 2024, Potsdam, Deutschland, *Ussing chamber system to test the transepithelial resistance of the retinal pigment epithelium in mice*

FASEB Summer Research Conference *Retinal Neurobiology and Visual Processing 2024*, Southbridge, MA, USA, *Horizontal cell density, morphology, and electrical coupling are tailored to the visual environment*

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Zuwendung wurde im Wesentlichen für folgende Maßnahmen genutzt:

- a. Rekrutierung einer qualifizierten Wissenschaftlerin (Chunxu Yuan, MSc), die die Experimente zur Permeabilität der Gap-Junctions durchgeführt hat und die TEER-Messungen erfolgreich etabliert hat. Frau Chunxu Yuan wurde die Möglichkeit zur Dissertation gegeben wurde. Die erfolgreiche Disputation fand am 23.04.2025 statt.
- b. Beschaffung eines Fluoreszenzmikroskops mit Tilescan-Funktion sowie hoher räumlicher Auflösung und schneller Datenaufnahme (Axio Imager Z2 mit Apotome).
Im Rahmen des ERA-Net Projekts wurde die Permeabilität von Gap-Junctions, die direkte Zell-Zell-Verbindungen darstellen, untersucht. Dazu wurden Substanzen in Zellen und Gewebe eingebracht und anschließend mittels Fluoreszenz dargestellt. Um die Wanderung der Substanzen durch Gap-Junctions auch über größere Bereiche (mm-Bereich) und in größeren Gewebetiefen (z.B. Horizontalzellen der Retina, ca. 100 μm tief) darstellen zu können, waren sogenannte Tilescans mit z-Stapeln notwendig, die mit Hilfe des neuen Mikroskops erstellt werden konnten (s. auch [Abb. 1, 2](#) und [Yuan et al., 2024](#)).
- c. Beschaffung eines Dual Channel Epithelial Voltage Clamp Systems.
Die Ussingkammer ist eine Diffusionskammer mit zwei Kompartimenten, zwischen die das RPE oder der RPE/Choroidkomplex gespannt wird. Um das TEER zu messen, werden elektrische Pulse generiert. Dazu wurde das neu beschaffte Voltage-Current-Clamp 600 Gerät benötigt, da der vorhandene Patch-clamp-Verstärker keine ausreichend großen Pulse generieren konnte.

Für weitere Details siehe auch Verwendungsnachweis.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die unter II.1.c genannten Publikationen wurden bereits mehrfach zitiert, was ihre Notwendigkeit sehr gut dokumentiert. Unsere Arbeit zur Permeabilität von Gap-Junctions zeigt, dass bestimmte retinale Gap-Junctions ausreichend große Poren aufweisen, um größere, therapeutisch sinnvolle Moleküle mit einem Molekulargewicht von >0.8 kDa in der Retina zu verbreiten. Angesichts der Vielzahl (>150) an Mausmodellen für retinale, degenerative Erkrankungen ([Fradot et al., 2024](#)) ist es notwendig, Methoden zu etablieren, die es erlauben, die Durchlässigkeit/Dichtheit des RPE von Mäusen zu ermitteln. Hier leistet unsere Arbeit einen sehr wichtigen Beitrag. S. auch beigefügter Erfolgskontrollbericht.

4. Voraussichtlicher Nutzen

Gap-Junction-vermittelte Kopplung erleichtert Zelltodprozesse. Andererseits wurden in Zellkulturzellen Substanzen mit potenziell therapeutischem Wert (miRNAs) über Gap-Junctions verbreitet. Diese

miRNAs haben eine Größe von ~1 kDa. Unsere Ergebnisse über den Transport von relativ großen Substanzen durch einige Gap-Junctions in der Mausretina machen es wahrscheinlich, dass sogar in intaktem neuronalem Gewebe einige Gap-Junctions für miRNAs oder siRNAs durchlässig sind. Dies eröffnet spannende Möglichkeiten für den Schutz von Neuronen. Nach Ischämie-induziertem Ganglienzelltod sterben beispielsweise Amakrinzellen durch Apoptose. Die Gap-Junction-vermittelte Ausbreitung von siRNAs, die in apoptotische Signalwege eingreifen, hat das Potential, den fortschreitenden Zellverlust bei degenerativen Erkrankungen der Netzhaut zu verhindern (Yuan et al., 2024).

Die Entwicklung unseres Ussing-Kammer-Systems, mit dem wir messen können, wie durchlässig die Blut-Retina-Schranke ist, wird für die Analyse von Mausmodellen zur Retina-Degeneration sehr nützlich sein, denn unsere Partner in Italien haben gezeigt, dass Retina-Degeneration mit dem Abbau der Blut-Retina-Schranke einhergeht (Napoli et al., 2021; Napoli and Strettoi, 2023).

5. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass Gap-Junctions enormes therapeutisches Potential haben. González-Casanova et al. (2021) schlagen mehrere Substanzen als Gap-Junction-Modulatoren in Diabetischer Retinopathie vor und fassen die vorhandenen Befunde zusammen. Außerdem werden gerade neue Agenzien wie Connexin-mimetische Proteine ausprobiert, um einzelne Gap-Junction-Klassen in der Retina zu modulieren (Domenech-Bendaña et al., 2025). Das zeigt, dass retinale Gap-Junctions mehr und mehr in den Fokus rücken, um neurodegenerative Erkrankungen der Retina zu heilen.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichung des Ergebnisses

s. II.1.c. c. AP 4: Verbreitung/Bekanntmachung der Ergebnisse

7. Literaturverzeichnis

- Akopian A, Atlasz T, Pan F, Wong S, Zhang Y, Völgyi B, Paul DL, Bloomfield SA (2014) Gap junction-mediated death of retinal neurons is connexin and insult specific: a potential target for neuroprotection. *J Neurosci* 34:10582–10591.
- Bloomfield SA, Völgyi B (2009) The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. *Nat Rev Neurosci* 10:495–506.
- Contreras JE, Sánchez HA, Véliz LP, Bukauskas FF, Bennett MVL, Sáez JC (2004) Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue. *Brain Res Brain Res Rev* 47:290–303.
- Dedek K, Pandarinath C, Alam NM, Wellershaus K, Schubert T, Willecke K, Prusky GT, Weiler R, Nirenberg S (2008) Ganglion cell adaptability: does the coupling of horizontal cells play a role? *PLoS ONE* 3:e1714.
- Dedek K, Schultz K, Pieper M, Dirks P, Maxeiner S, Willecke K, Weiler R, Janssen-Bienhold U (2006) Localization of heterotypic gap junctions composed of connexin45 and connexin36 in the rod pathway of the mouse retina. *Eur J Neurosci* 24:1675–1686.
- Domenech-Bendaña A, Salazar N, Locascio A, Ponce-Mora A, Gimeno-Mallench L, Bejarano E (2025) Targeting Connexins Biology as Therapeutic Strategies Against Retinal Diseases. *Adv Exp Med Biol* 1468:485–489.

- Fradot V, Augustin S, Fontaine V, Marazova K, Guillonneau X, Sahel JA, Picaud S (2024) Rodent Models of Retinal Degeneration: From Purified Cells in Culture to Living Animals. *Cold Spring Harb Perspect Med* 14:a041311.
- González-Casanova J, Schmachtenberg O, Martínez AD, Sanchez HA, Harcha PA, Rojas-Gomez D (2021) An Update on Connexin Gap Junction and Hemichannels in Diabetic Retinopathy. *Int J Mol Sci* 22:3194.
- Hombach S, Janssen-Bienhold U, Söhl G, Schubert T, Büssow H, Weiler R, Willecke K (2004) Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. *European Journal of Neuroscience* 19:2633–2640.
- Klettner A, Brinkmann A, Winkelmann K, Käckenmeister T, Hildebrandt J, Roeder J (2020) Effect of long-term inflammation on viability and function of RPE cells. *Exp Eye Res* 200:108214.
- Maxeiner S (2005) Deletion of Connexin45 in Mouse Retinal Neurons Disrupts the Rod/Cone Signaling Pathway between All Amacrine and ON Cone Bipolar Cells and Leads to Impaired Visual Transmission. *Journal of Neuroscience* 25:566–576.
- Myles WE, McFadden SA (2022) Analytical methods for assessing retinal cell coupling using cut-loading. *PLoS One* 17:e0271744.
- Napoli D, Biagioni M, Billeri F, Di Marco B, Orsini N, Novelli E, Strettoi E (2021) Retinal Pigment Epithelium Remodeling in Mouse Models of Retinitis Pigmentosa. *Int J Mol Sci* 22:5381.
- Napoli D, Strettoi E (2023) Structural abnormalities of retinal pigment epithelial cells in a light-inducible, rhodopsin mutant mouse. *J Anat* 243:223–234.
- Ozal SA, Turkecul K, Gurlu V, Guclu H, Erdogan S (2018) Esculetin Protects Human Retinal Pigment Epithelial Cells from Lipopolysaccharide-induced Inflammation and Cell Death. *Curr Eye Res* 43:1169–1176.
- Shelley J, Dedek K, Schubert T, Feigenspan A, Schultz K, Hombach S, Willecke K, Weiler R (2006) Horizontal cell receptive fields are reduced in connexin57-deficient mice. *Eur J Neurosci* 23:3176–3186.
- Spinelli M, Acevedo Harnecker A, Block CT, Lindenthal L, Schuhmann F, Greschner M, Janssen-Bienhold U, Dedek K, Puller C (2024) The first interneuron of the mouse visual system is tailored to the natural environment through morphology and electrical coupling. *iScience* 27:111276.
- Szarka G, Hoffmann G, Kovács-Öller T, Völgyi B (2023) Serotonin is a gap junction-permeable neuronal tracer in the mouse retina. *Front Ophthalmol (Lausanne)* 3:1151024.
- Tetenborg S, Liss V, Breitsprecher L, Timonina K, Kotova A, Acevedo Harnecker AJ, Yuan C, Shihabeddin E, Ariakia F, Qin G, Chengzhi C, Dedek K, Zoidl G, Hensel M, O'Brien J (2023) Intraluminal docking of connexin 36 channels in the ER isolates mistrafficked protein. *J Biol Chem* 299:105282.
- Verbakel SK, van Huet RAC, Boon CJF, den Hollander AI, Collin RWJ, Klaver CCW, Hoyng CB, Roepman R, Klevering BJ (2018) Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* 66:157–186.
- Wang Y, Denisova JV, Kang KS, Fontes JD, Zhu BT, Belousov AB (2010) Neuronal gap junctions are required for NMDA receptor-mediated excitotoxicity: implications in ischemic stroke. *J Neurophysiol* 104:3551–3556.

Yuan C, Gerhards L, Solov'yov IA, Dedek K (2023) Biotin-cGMP and -cAMP are able to permeate through the gap junctions of some amacrine cells in the mouse retina despite their large size. *Front Ophthalmol (Lausanne)* 3:1334602.

Zhang C-L, Ma J-J, Li X, Yan H-Q, Gui Y-K, Yan Z-X, You M-F, Zhang P (2025) The role of transcytosis in the blood-retina barrier: from pathophysiological functions to drug delivery. *Front Pharmacol* 16:1565382.