

## Einleitung

Verletzung oder degenerative Schädigung des kornealen Nervenplexus (KNP) sind Hauptursachen der Entstehung einer Neurotrophen Keratopathie (NK) und des neurogen induzierten trockenen Auges. Die spontane Regeneration der Hornhautnerven ist oftmals unvollständig und die zugrunde liegenden Mechanismen sind nahezu unbekannt. Die Stimulation der Hornhautnervenregeneration stellt einen vielversprechenden kurativen Ansatz zur Behandlung dieser Erkrankungen dar. Ziel dieser Studie war es, die Wirkung eines Rho-Kinase-Inhibitors auf die Regeneration der Hornhautnerven in einem *in vivo* Mausmodell mittels konfokaler Mikroskopie über einen Zeitverlauf von 4 Wochen zu untersuchen.

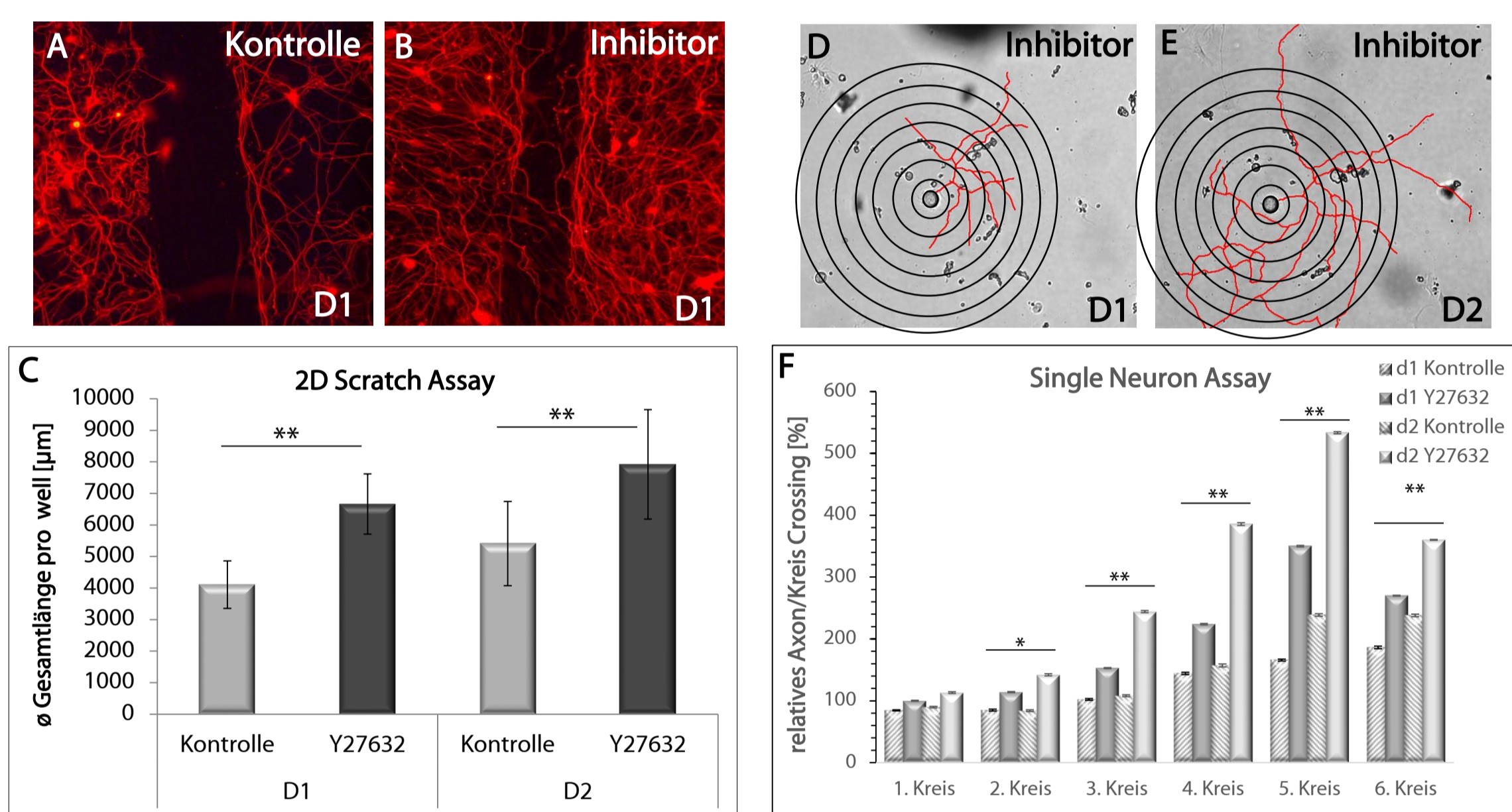
## Methoden

Der KNP in den rechten Augen von 8-10 Wochen alten C57BL/6 Mäusen (n=24) wurde mittels eines 1.2mm tiefenregulierten Trepan durchtrennt. Die Augen wurden zweimal täglich mit 10 µl Augentropfen behandelt, welche entweder 100µM Y27632/NaCl/50%Glycerin oder nur NaCl/50%Glycerin enthielten. An Tag 0, 7, 14, 21, und 28 wurden die kornealen Nerven mittels HRT III mit RCM dokumentiert. Die Länge der Nervenfasern wurde mittels CCMetrix Software in 20 HPF/Maus gemessen. An Tag 14 und 28 wurden je 12 Tiere aus dem Versuch genommen, die Korneas präpariert und mit  $\beta$ III-tubulin als whole-mount angefärbt. Die trigeminalen Ganglien (TG) wurden ebenfalls entnommen und die mRNA Expression von ROCK1 und 2, LIMK, cdc42, GAP43 und NGF mittels qrtPCR in den TG der operierten Seite (OP-G) der nicht-operierten Seite (OP-KO-G) und der unbehandelten nativen Kontrolle (KO-G) gemessen.



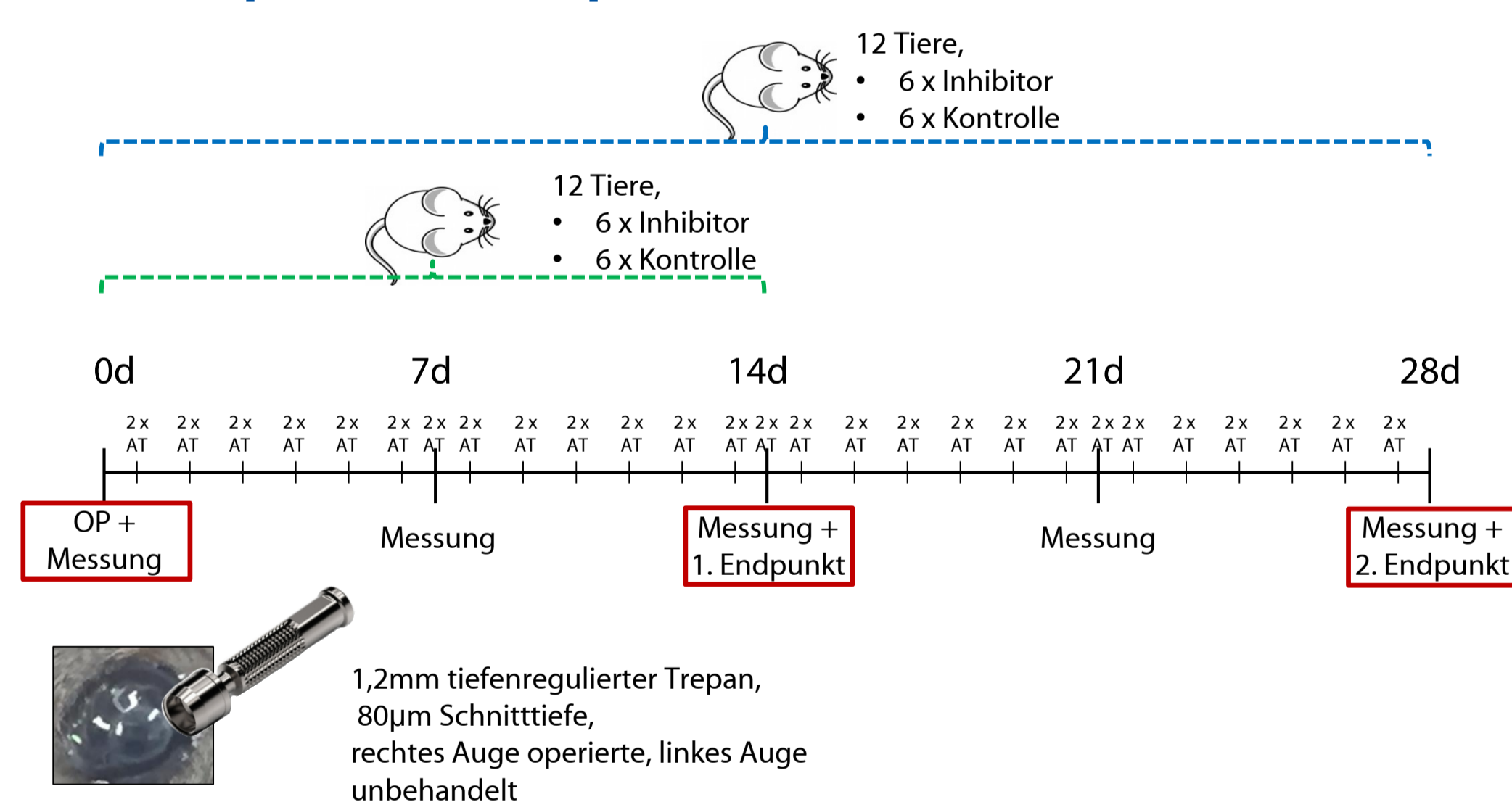
## Ergebnisse

### 2D Assays



(A,B) Beispiel des neuronalen Scratch Assays 24 Stunden nach scratchen (A) ohne Behandlung und (B) mit Inhibitor-Treatment. (C) Ergebnisse des 2D Scratch Assay mit Messung der Gesamtfaserlänge. Sowohl an Tag 1 als auch an Tag 2 zeigen Neurone behandelt mit Inhibitor eine signifikant höhere Faserlänge als die Kontrollen. (D-F) Beispiel des Single Neuron Assays mit Auswertung (D) nach 24h und (E) nach 48h Treatment mit Inhibitor. Es zeigt sich auch hier ein vermehrtes Kreuzen der Axone in den hinteren Kreisen unter Inhibitor-Treatment, was auf eine erhöhte Faserlänge schließen lassen kann.

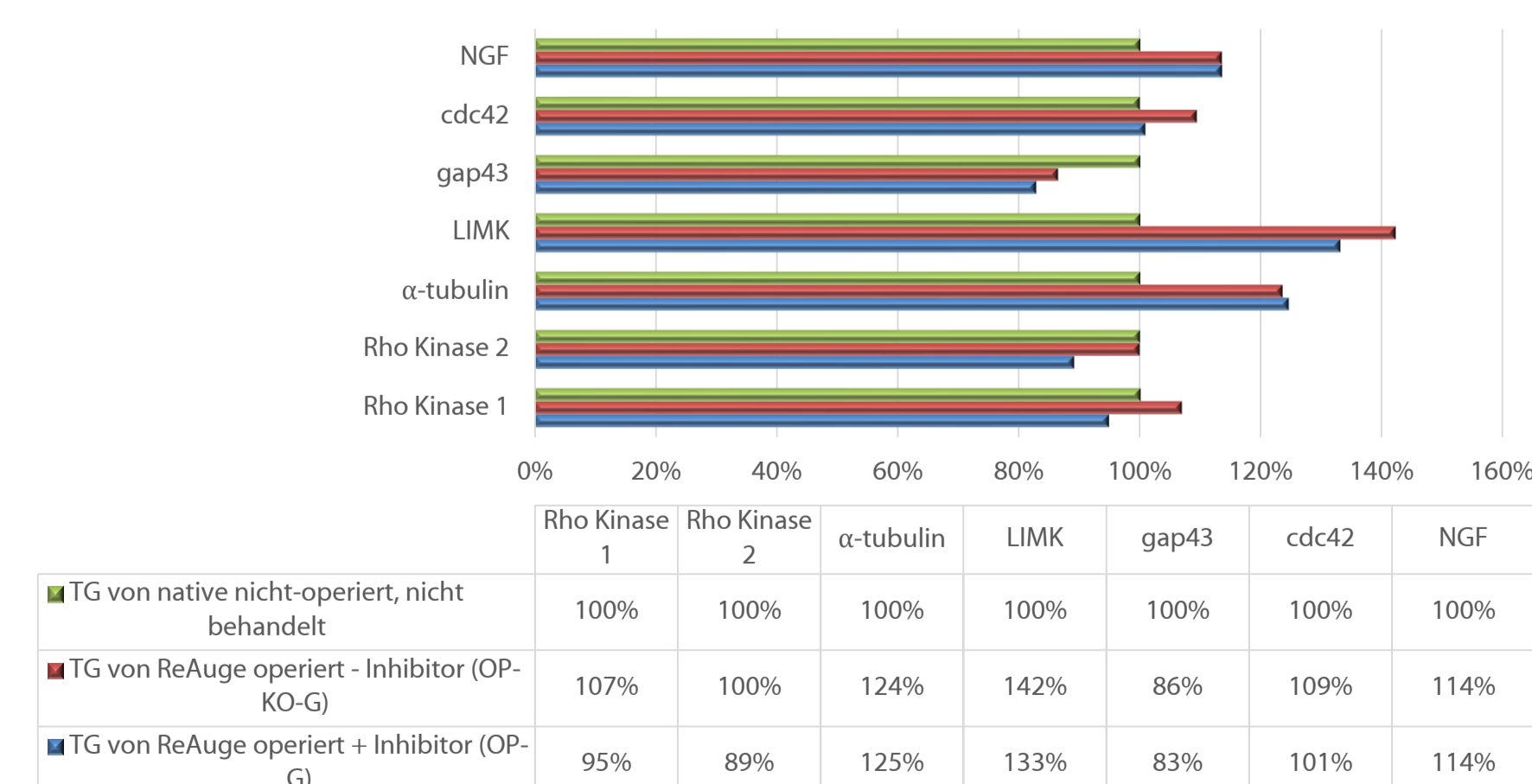
### In vivo Experiment Setup



**Timeline:** Die rechten Augen der 24 C57BL/6J Mäuse wurden trepaniert und 2x tgl im Abstand von 10 Stunden mit 10µl Rho Kinase Inhibitor in 0.9% NaCl/50% Glycerin oder nur 0.9%NaCl/50%Glycerin behandelt. Der KNP wurde wöchentlich mit dem HRT III mit RCM vermessen. Nach 14 und 28 Tagen wurden jeweils 12 Tiere aus dem Versuch genommen und die Korneas als wholemount angefärbt.

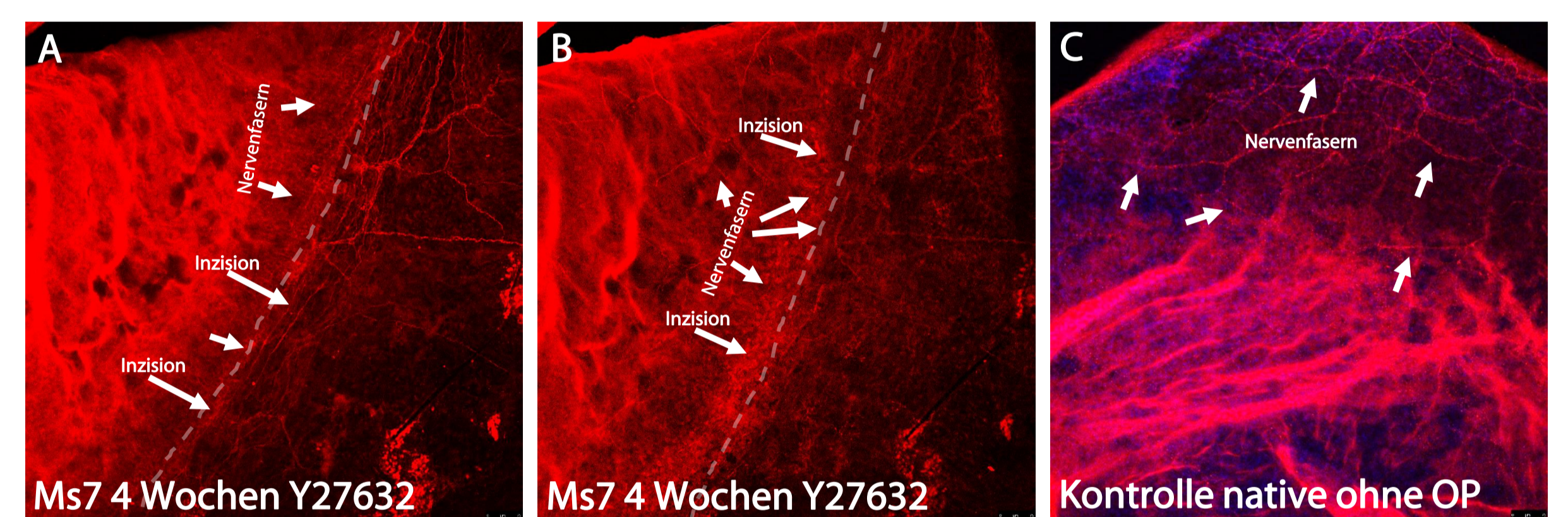
### qrtPCR Messung der Trigeminalen Ganglien 14Tage postOP

mRNA Expression des Trigeminalen Ganglions nach 14 Tagen-Treatment



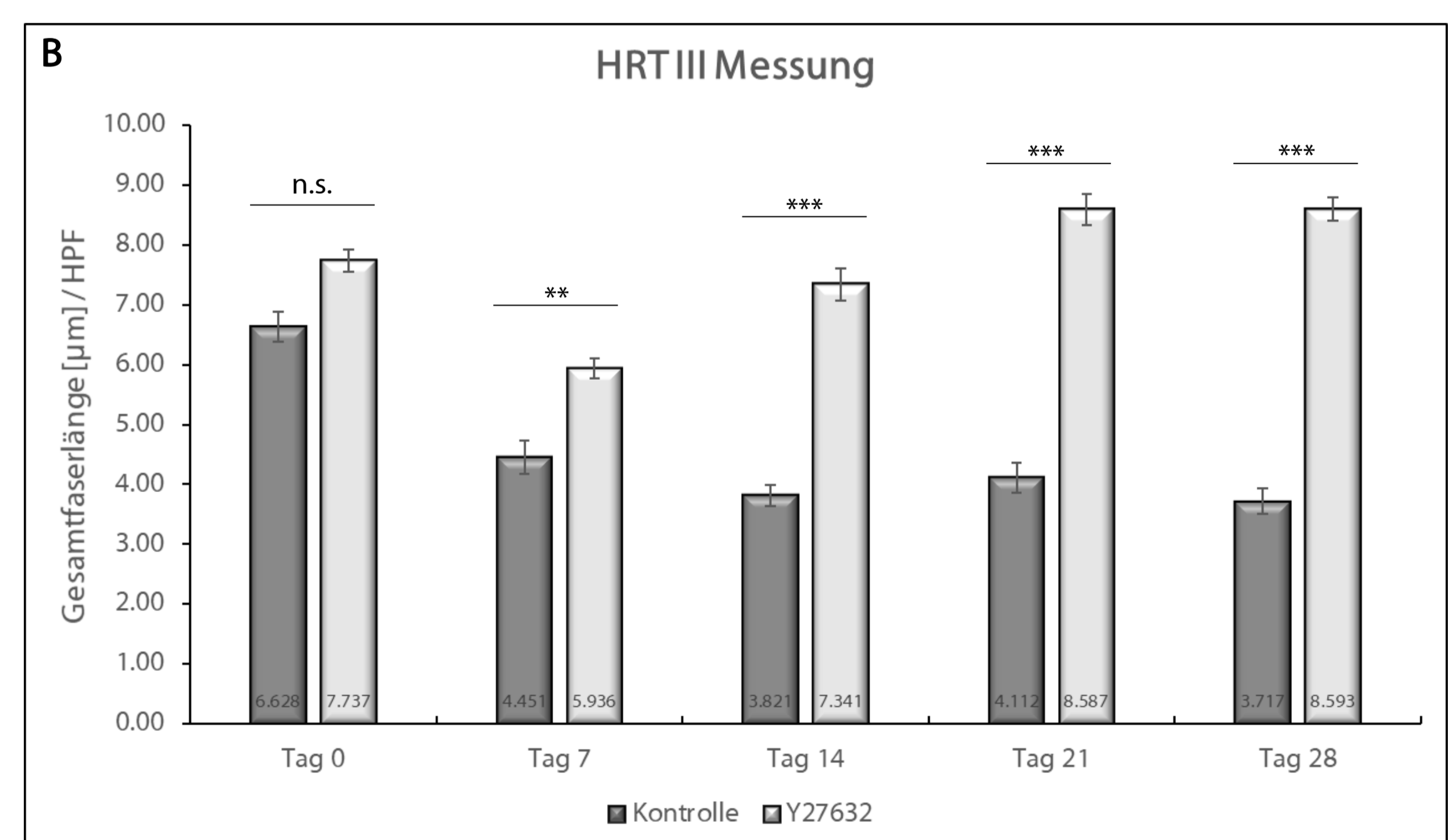
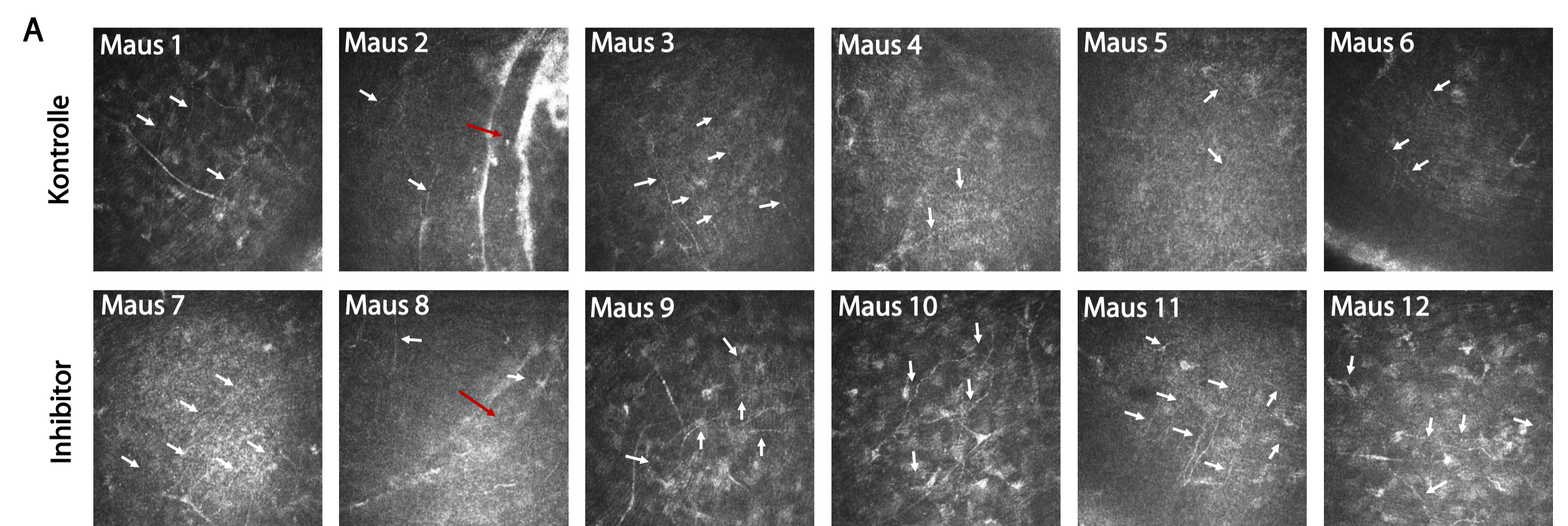
**mRNA Expressionslevel** in den Trigeminalen Ganglien mit und ohne Inhibitor-Behandlung. Nach 14 Tage Inhibitor-Behandlung zeigte sich eine Herunterregulierung von ROCK1, ROCK2 und gap43. Ebenfalls zeigte sich eine gesteigerte Expression von  $\alpha$ -tubulin, LIMK und NGF im direkten Vergleich mit den TGs von unoperierten Tieren (gesetzt als 100%).

### Wholemount-Staining 28 Tage postOP



Wholemount-Staining mit anti- $\beta$ III-tubulin (rot). (A,B) Maus Nr7 mit Y27632 Behandlung, die Inzision der Kornea ist deutlich sichtbar, ebenfalls zeigen sich Nervenfasern, welche die Inzisionsstelle in verschiedenen Tiefen kreuzen. (C) Maus Kontrolle ohne Inzision und ohne Behandlung zeigt ein dichtes Netz der Nervenfasern.

### In vivo konfokale Messung mit HRT III und RCM 28 Tage postOP



A) HRT III Bilder von Maus 1-12 4 Wochen nach OP. Für die Auswertung wurden jeweils 20 HPF pro Tier /Messung verblindet mittels CCMetrix Software ausgewertet. B) Ergebnisse der Gesamtfaserlänge pro HPF zu allen gemessenen Zeitpunkten. Direkt nach Op zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Faserlänge. Nach 7 Tagen reduzierte sind in allen Tieren die Faserlänge signifikant, ein direkter Vergleich zwischen Kontrolle und Y27632 zeigt jedoch eine signifikant erhöhte Faserlänge bei den Inhibitor-Tieren. In den Kontrolltieren nimmt die Faserlänge weiter ab bis Tag 28, in den Inhibitor-Tieren zeigt sich eine Steigerung der Faserlänge bis auf den Ursprungswert nach 21 Tagen.

## Schlussfolgerung

In dieser *in vivo* Studie konnte erstmalig ein positiver Einfluss einer Rho Kinase Inhibition auf das Auswachsen kornealer Nerven nach Verletzung aufgezeigt werden. Die topische Applikation eines Rho Kinase Inhibitors stellt eine potentiell vielversprechende neue Therapie-Option zur Behandlung der NK, sowie des neurogen induzierten trockenen Auges dar.