Aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin und aus der Experimentellen Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Komplementfaktor C5a reduziert die retinale Vasoobliteration, Neovaskularisation und die Anzahl mononukleärer Phagozyten im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

> vorgelegt von **Sabrina Dege** Tierärztin aus Berlin

Berlin 2017 Journal-Nr.: 3983

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan: Erster Gutachter: Zweiter Gutachter: Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Jürgen Zentek Univ.-Prof. Dr. med. vet. Corinna Eule Univ.-Prof. Dr. med. Antonia Joussen PD Dr. Friederike Stumpff

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice; animal models; man; retinopathy; blood vessels; neovascularization, pathologic (MeSH); surface antigens; immunohistochemistry; polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 10.07.2017

Meinen Eltern und meiner Schwester

Inhaltsverzeichnis

Einleitung		1
1. Literat	urübersicht	3
1.1. Di	e Netzhaut	3
1.1.1.	Allgemeine Vergleichbarkeit der Anatomie und Histologie des Auges und der	
Netzha	aut von Mensch und Maus	3
1.1.2.	Die allgemeine Anatomie und Histologie der Netzhaut	3
1.1.3.	Die Schichten der Netzhaut	4
1.1.4.	Die Blutversorgung der Netzhaut	8
1.2. Di	e retinale Blutgefäßentwicklung	9
1.2.1.	Die zellulären Vorgänge der retinalen Blutgefäßneubildung	9
1.2.2.	Die retinale Blutgefäßentwicklung beim Menschen	. 10
1.2.3.	Die retinale Blutgefäßentwicklung bei der Maus	.10
1.3. Di	e Frühgeborenenretinopathie	.12
1.4. Da	as Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie	.15
1.5. Hi	stomorphologische Darstellung der vaskulären, avaskulären und Tuft-Region im	ı
Mausmo	dell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie	. 18
1.6. Üt	pertragbarkeit des Mausmodells der Sauerstoff-induzierten Retinopathie auf die	
Frühgeb	orenenretinopathie des Menschen	20
1.7. Da	as Komplementsystem	.22
1.7.1.	Das Komplementsystem – Ein leistungsstarker Teil des angeborenen	
Immur	nsystems	.22
1.7.2.	Die extraimmunologischen Aufgaben des Komplementsystems	26
1.7.3.	Die Rolle des Komplementsystems im zentralen Nervensystem	.27
1.7.4.	Das Komplementsystem und die retinale Neovaskularisation	.29
1.8. Di	e CD11b-positiven Zellen – Eine Zellpopulation mit vielfältigen Funktionen	.31
1.8.1.	Der Komplement-Rezeptor 3 – Ein wichtiges Bindeglied zwischen dem	
Kompl	ementsystem und den retinalen CD11b-positiven Zellen	.31
1.8.2.	Die Rolle der CD11b-positiven Zellen im zentralen Nervensystem	.31
1.8.3.	Die CD11b-positiven Zellen und die retinale Neovaskularisation	.36
2 Ziele u	ind Hypothesen der Arbeit	.40

3.	Mate	rial un	d Methoden	.43
3	.1. N	lateria	۱	.43
	3.1.1	. Elte	erntiere	.43
	3.1.2	. Ge	räte	.43
	3.1.3	. Ga	se	.44
	3.1.4	. Inje	ektionslösungen	. 44
	3.1.5	. Sta	ammlösungen und Puffer	. 44
	3.1.6	. Imr	nunreagenzien / Enzyme	.46
	3.1.7	. Ch	emikalien	.46
	3.1.8	. Ve	rbrauchsmaterialien	. 47
	3.1.9	. Re	agenzsysteme / Kits	. 48
	3.1.1	0. P	rimer	. 48
	3.1.1	1. S	oftware	.49
3	.2. N	lethod	len	.49
	3.2.1	. Ve	rsuchstiere	.49
	3.2.2	. Tie	rmodell	. 50
	3.2.3	. Ve	rsuchstiergruppen	. 53
	3.2.4	. Intr	aperitoneale Injektionen	. 53
	3.2.5	. Pro	bbengewinnung	. 54
	3.2.6	. His	tomorphologische Untersuchung	. 55
	3.2	2.6.1.	Herstellung von Paraffinschnitten	. 55
	3.2	2.6.2.	Protokoll der Hämatoxilin-Eosin-Färbung	. 55
	3.2	2.6.3.	Mikroskopie und Digitalisierung	. 56
	3.2.7	. Imr	nunhistochemische Untersuchungen	. 56
	3.2	2.7.1.	Retinale Flachpräparate	. 56
	3	3.2.7.1	.1. Fixierung und Präparation von retinalen Flachpräparaten	. 56
	3	3.2.7.1	.2. Isolectin IB₄-CD11b-Färbung	. 57
	3	3.2.7.1	.3. Mikroskopie und Digitalisierung	. 57
	3	3.2.7.1	.4. Quantifizierung der avaskulären Fläche mittels ImageJ	. 57
	3	3.2.7.1	.5. Quantifizierung der Gesamt-Tuftfläche mittels ImageJ	. 58
	3	3.2.7.1	.6. Quantifizierung der Gesamt-CD11b-positiven Zellen und aktivierten	
	(CD11b	p-positiven Zellen	. 58

3.2.7.2.	Retinale Paraffinschnitte	59
3.2.7.2.1	1. Herstellung von Paraffinschnitten	59
3.2.7.2.2	2. Glial Fibrillary Acidic Protein-Vimentin-Färbung	60
3.2.7.2.3	3. Mikroskopie, Digitalisierung und Auswertung	60
3.2.8. Gen	expressionsanalytische Untersuchungen (messenger Ribonukleinsäu	re -
Expression)		61
3281	Präparation und Lagerung von nativen Retina-Proben	61
3.2.8.2.	Ribonukleinsäure-Isolierung	
3.2.8.3.	Reverse Transkription (Umschreiben in komplementäre	
Desoxyrib	onukleinsäure)	62
3.2.8.4.	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion	63
3.2.8.5.	Relative Quantifizierung der Daten mittels der C⊤-Vergleichsmethode	64
3.3. Statistisc	che Auswertung	65
3.4. Vergleici	nbarkeit der Supplementierungs- und der Innibierungsgruppe	65
4. Ergebnisse		66
4.1. Ergebnis	se der histomorphologischen Untersuchungen	66
4.2. Ergebnis	se der immunhistochemischen Untersuchungen	66
4.2.1. Qua	ntifizierung der avaskulären Fläche	66
4.2.2. Qua	ntifizierung der Gesamt-Tuftfläche	67
4.2.3. Qua	ntifizierung der Gesamt-CD11b-positiven Zellen	68
4.2.3.1.	Vergleich der einzelnen Vaskularisierungszonen innerhalb einer	
Versuchsg	Jruppe	68
4.2.3.2.	Gruppenvergleich innerhalb der avaskulären Zone	71
4.2.3.3.	Gruppenvergleich innerhalb der Tuft-Zone	73
4.2.3.4.	Vergleich der Verteilung CD11b-positiver Zellen zwischen der innerer	und
der äußere	en Schicht in der Netzhaut	74
4.2.4. Qua	ntifizierung der aktivierten CD11b-positiver Zellen	78
4.2.4.1.	Vergleich der einzelnen Vaskularisierungszonen innerhalb einer	
Versuchso	Jruppe	78
4.2.4.2.	Gruppenvergleich innerhalb der avaskulären Zone	82
4.2.4.3.	Gruppenvergleich innerhalb der Tuft-Zone	83

4.2.5. Relativer Anteil der aktivierten an der Gesamtzahl CD11b-positiver Zellen8	34
4.2.5.1. Vergleich der einzelnen Vaskularisierungszonen innerhalb einer	
Versuchsgruppe	34
4.2.5.2. Gruppenvergleich innerhalb der avaskulären Zone	36
4.2.5.3. Gruppenvergleich innerhalb der Tuft-Zone8	38
426 Ausgemessene Auszählungsareale der Tuff-Zone zur Quantifizierung der	
aktivierten CD11h-nositiven Zellen – Ein Nebenbefund	R
4 2 7 Qualitative Evaluierung der Müller-Zellen	,5 71
	~
4.3. Ergebnisse der genexpressionsanalytischen Untersuchungen	13 26
	10
5. Diskussion	99
5.1. Einfluss von C5a auf die Pathologie im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten	
Retinopathie9	99
5.1.1. Histomorphologie9	99
5.1.2. Avaskuläre Fläche und Tuft-Ausbildung10)0
5.1.3. Verteilung und Aktivierung der CD11b-positiven Zellen)3
5.1.4. Reaktion der Müller-Zellen10)8
5.1.5. Genexpression von C3, C1q und Properdin11	10
5.2. Inhibierung von C5a mittels NOX-D20 im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten	
Retinopathie11	12
5.3. Aussagekraft dieser Studie – Methodische Stärken und Schwächen	15
6. Schlussfolgerungen und Ausblick	20
7. Zusammenfassung	25
8. Summary	28
9. Literaturverzeichnis	31
Anhang	I
Ergänzende Abbildung aus einer Pilotuntersuchung	1
Abbildungsverzeichnis	. 11
Tabellenverzeichnis	.V
PublikationsverzeichnisV	/11
DanksagungVI	111
Selbstständigkeitserklärung	.Х

Abkürzungsverzeichnis

(enthält Abkürzungen, die mehr als einmal im Text verwendet werden)

Abkürzung	ausgeschrieben (z.T. zweisprachig)	
%	Prozent	
°C	Grad Celcius	
2 ^{-∆CT}	Wert der relativ quantifizierten mRNA-	
	Expression	
А	avaskuläre Zone	
Abb.	Abbildung	
A	avaskuläre Zone der inneren Schicht	
Ao	avaskuläre Zone der äußeren Schicht	
AP	Alternative Pathway	Alternativer Komplementpfad
bp	Basenpaare	
bzw.	beziehungsweise	
С	Complement factor	Komplementfaktor
C3a	Komplementfaktor 3a	
C3aR	Komplementfaktor 3a-Rezeptor	
C3b	Komplementfaktor 3b	
C3R	Komplementfaktor 3-Rezeptor	
C5a	Komplementfaktor 5a	
C5aR	Komplementfaktor 5a-Rezeptor	
C5b	Komplementfaktor 5b	
C5L2	C5a receptor-like-2	
CD	Cluster of differentiation	
cDNA	komplementäre	
	Desoxyribonukleinsäure	
CNV	choroidale Neovaskularisation	
СР	Classical Pathway	Klassischer Komplementpfad
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	
DNA	Deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease	
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Ethylendiamintetraessigsäure
ELM	External limiting membrane	äußere Grenzmembran
et al.	et alii/ et aliae/ et alia	und andere
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-	
	Dehydrogenase	
GCL	Ganglion cell layer	Ganglienzellschicht
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure	

GOIGene of interestuntersuchte mRNA-ExpressionHCIHydrogenchloridChlorwasserstoffHEHämatoxilin-EosinChlorwasserstoffiG3binaktivierter Komplementfaktor 3binativierter Komplementfaktor 3bi,p.intraperitonealintraperitonealIB4Isolectin IB4isolectin IB4Iba-1 <i>lonized calcium binding adaptor</i> protein 1insulinähnlicher WachstumsfaktorICF-1 <i>Insulin-like growth factor 1</i> insulinähnlicher WachstumsfaktorILInterleukininner GrenzmembranINL <i>Inner nuclear layer</i> innere KörnerschichtIPL <i>Inner plexiform layer</i> innere plexiforme SchichtMAC-1Makrophagen-Antigen-1HaupthistokompatibilitätskomplezMCH-II <i>Major histocompatibility complex I</i> HaupthistokompatibilitätskomplezMCP-1Monocyte chemotactic protein 1mainminMinutenmessenger ribonucleic acidmessenger RibonukleinsäureMWMittelwertmessenger Ribonukleinsäure	-1 : I
HCIHydrogenchloridChlorwasserstoffHEHämatoxilin-EosiniG3binaktivierter Komplementfaktor 3bi,p.intraperitonealIB4Isolectin IB4Iba-1 <i>lonized calcium binding adaptor</i> protein 1IGF-1 <i>Insulin-like growth factor 1</i> ILInterleukinILInterleukinINLInner limiting membraneINLInner nuclear layerINLInner plexiform layerMAC-1Marophagen-Antigen-1MBLManose-bindendes LektinMCH-IIMajor histocompatibility complex IMCH-IIMajor histocompatibility complex IIMinutenminutenmm²QuadratmillimetermRNAmessenger ribonucleic acidMWMittelwertN(allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	-1 : II
HEHämatoxilin-EosiniC3binaktivierter Komplementfaktor 3bi.p.intraperitonealIB4Isolectin IB4Iba-1 <i>lonized calcium binding adaptor</i> protein 1IGF-1 <i>Insulin-like growth factor 1</i> ILInterleukinILInner limiting membraneINL <i>Inner nuclear layer</i> IPL <i>Inner plexiform layer</i> MAC-1Makrophagen-Antigen-1MBLMajor histocompatibility complex IMCH-IIMajor histocompatibility complex IIMCP-1Monocyte chemotactic protein 1minMinutenmm²QuadratmillimetermRNAmessenger ribonucleic acidMW(allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	~ 1
iC3binaktivierter Komplementfaktor 3bi.p.intraperitonealIB4Isolectin IB4Iba-1Ionized calcium binding adaptor protein 1IGF-1Insulin-like growth factor 1insulinähnlicher WachstumsfaktoILInterleukinILMInner limiting membraneinnere GrenzmembranINLInner nuclear layerinnere KörnerschichtIPLInner plexiform layerinnere plexiforme SchichtMAC-1Makrophagen-Antigen-1HaupthistokompatibilitätskomplezMCH-IIMajor histocompatibility complex IHaupthistokompatibilitätskomplezMCP-1Monocyte chemotactic protein 1HaupthistokompatibilitätskomplezMCP-1Minutenmessenger ribonucleic acidmessenger RibonukleinsäureMWMittelwertMittelwertmessenger Ribonukleinsäure	~ 1 : I
i.p.intraperitonealIB4Isolectin IB4Iba-1Ionized calcium binding adaptor protein 1IGF-1Insulin-like growth factor 1InterleukinILMInner limiting membraneINLInner nuclear layerIPLMakrophagen-Antigen-1MBLManose-bindendes LektinMCH-IMajor histocompatibility complex IMCH-IIMajor histocompatibility complex IIMCP-1Monocyte chemotactic protein 1minMinutenmm²QuadratmillimeterMWMittelwertN(allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	-1 : I
IB4Isolectin IB4Iba-1Ionized calcium binding adaptor protein 1IGF-1Insulin-like growth factor 1InterleukinILMInner limiting membraneINLInner nuclear layerIPLInner plexiform layerIMAC-1Makrophagen-Antigen-1MBLMannose-bindendes LektinMCH-IMajor histocompatibility complex IMCP-1Monocyte chemotactic protein 1minMinutenmm²QuadratmillimeterMRNAmessenger ribonucleic acidMWMittelwertN(allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	-1 : I : II
Iba-1Ionized calcium binding adaptor protein 1IGF-1Insulin-like growth factor 1insulinähnlicher WachstumsfaktorILInterleukininnere GrenzmembranILMInner limiting membraneinnere GrenzmembranINLInner nuclear layerinnere KörnerschichtIPLInner plexiform layerinnere plexiforme SchichtMAC-1Makrophagen-Antigen-1MBLMannose-bindendes LektinMCH-IMajor histocompatibility complex IMCP-1Major histocompatibility complex IIMCP-1Monocyte chemotactic protein 1minMinutenmm²QuadratmillimetermRNAmessenger ribonucleic acidmessenger RibonukleinsäureMWMittelwertN(allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	~ 1 : I
protein 1IGF-1Insulin-like growth factor 1insulinähnlicher WachstumsfaktorILInterleukinILMInner limiting membraneinnere GrenzmembranINLInner nuclear layerinnere KörnerschichtIPLInner plexiform layerinnere plexiforme SchichtMAC-1Makrophagen-Antigen-1HaupthistokompatibilitätskomplezMBLManose-bindendes LektinHaupthistokompatibilitätskomplezMCH-IIMajor histocompatibility complex IHaupthistokompatibilitätskomplezMCP-1Monocyte chemotactic protein 1Haupthistokompatibilitätskomplezmm²Quadratmillimetermessenger ribonucleic acidmessenger RibonukleinsäureMWMittelwert(allgemein:) Anzahl der ausgewertetenManuen	r1 : I
IGF-1Insulin-like growth factor 1insulinähnlicher WachstumsfaktorILInterleukininnere GrenzmembranILMInner limiting membraneinnere GrenzmembranINLInner nuclear layerinnere KörnerschichtIPLInner plexiform layerinnere plexiforme SchichtMAC-1Makrophagen-Antigen-1Makrophagen-Antigen-1MBLMannose-bindendes LektinHaupthistokompatibilitätskomplezMCH-IIMajor histocompatibility complex IHaupthistokompatibilitätskomplezMCP-1Monocyte chemotactic protein 1Haupthistokompatibilitätskomplezmm²Quadratmillimetermessenger RibonukleinsäureMWMittelwertnessenger Ribonukleinsäure	r1 : II
ILInterleukinILMInner limiting membraneinnere GrenzmembranINLInner nuclear layerinnere KörnerschichtIPLInner plexiform layerinnere plexiforme SchichtMAC-1Makrophagen-Antigen-1HaupthistokompatibilitätskomplezMBLMannose-bindendes LektinHaupthistokompatibilitätskomplezMCH-IMajor histocompatibility complex IHaupthistokompatibilitätskomplezMCP-1Monocyte chemotactic protein 1Haupthistokompatibilitätskomplezmm²Quadratmillimetermessenger ribonucleic acidmessenger RibonukleinsäureMWMittelwert(allgemein:) Anzahl der ausgewertetenMannose-teres	:1
ILMInner limiting membraneinnere GrenzmembranINLInner nuclear layerinnere KörnerschichtIPLInner plexiform layerinnere plexiforme SchichtMAC-1Makrophagen-Antigen-1MBLMannose-bindendes LektinMCH-IMajor histocompatibility complex IMCH-IIMajor histocompatibility complex IIMCP-1Monocyte chemotactic protein 1minMinutenmm²QuadratmillimetermRNAmessenger ribonucleic acidmessenger RibonukleinsäureMWMittelwertN(allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	:1
INLInner nuclear layerinnere KörnerschichtIPLInner plexiform layerinnere plexiforme SchichtMAC-1Makrophagen-Antigen-1innere plexiforme SchichtMBLMannose-bindendes LektinHaupthistokompatibilitätskomplexMCH-IMajor histocompatibility complex IHaupthistokompatibilitätskomplexMCP-1Major histocompatibility complex IIHaupthistokompatibilitätskomplexMCP-1Monocyte chemotactic protein 1Haupthistokompatibilitätskomplexmm²Quadratmillimetermessenger ribonucleic acidmessenger RibonukleinsäureMWMittelwertMittelwertMittelwertN(allgemein:) Anzahl der ausgewertetenMonex den setter	:1
IPLInner plexiform layerinnere plexiforme SchichtMAC-1Makrophagen-Antigen-1MBLMannose-bindendes LektinMCH-IMajor histocompatibility complex IHaupthistokompatibilitätskomplexMCH-IIMajor histocompatibility complex IIHaupthistokompatibilitätskomplexMCP-1Monocyte chemotactic protein 1Haupthistokompatibilitätskomplexmm²Quadratmillimetermessenger ribonucleic acidMWMittelwertMittelwertN(allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	: 1 : 11
MAC-1Makrophagen-Antigen-1MBLMannose-bindendes LektinMCH-IMajor histocompatibility complex IMCH-IIMajor histocompatibility complex IIMCP-11Major histocompatibility complex IIMCP-1Monocyte chemotactic protein 1minMinutenmm²QuadratmillimetermRNAmessenger ribonucleic acidMWMittelwertN(allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	: II
MBLMannose-bindendes LektinMCH-IMajor histocompatibility complex IHaupthistokompatibilitätskomplexMCH-IIMajor histocompatibility complex IIHaupthistokompatibilitätskomplexMCP-1Monocyte chemotactic protein 1HaupthistokompatibilitätskomplexminMinutenMinutenmm²Quadratmillimetermessenger ribonucleic acidMWMittelwertMittelwertN(allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	: I : II
MCH-IMajor histocompatibility complex IHaupthistokompatibilitätskomplexMCH-IIMajor histocompatibility complex IIHaupthistokompatibilitätskomplexMCP-1Monocyte chemotactic protein 1HaupthistokompatibilitätskomplexminMinutenUadratmillimetermRNAmessenger ribonucleic acidmessenger RibonukleinsäureMWMittelwert(allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	: :
MCH-IIMajor histocompatibility complex IIHaupthistokompatibilitätskomplesMCP-1Monocyte chemotactic protein 1HaupthistokompatibilitätskomplesminMinutenMinutenmm²Quadratmillimetermessenger ribonucleic acidMWMittelwertMittelwertN(allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	
MCP-1Monocyte chemotactic protein 1minMinutenmm²QuadratmillimetermRNAmessenger ribonucleic acidmessenger RibonukleinsäureMWMittelwertN(allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	
minMinutenmm²QuadratmillimetermRNAmessenger ribonucleic acidmessenger RibonukleinsäureMWMittelwertN(allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	
mm²QuadratmillimetermRNAmessenger ribonucleic acidmessenger RibonukleinsäureMWMittelwertN(allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	
mRNAmessenger ribonucleic acidmessenger RibonukleinsäureMWMittelwertN(allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	
MWMittelwertN(allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	
N (allgemein:) Anzahl der ausgewerteten	
Datensätze	
n Zellzahl	
NaOH Natriumhydroxid Natronlauge	
NFL Nerve fiber layer Nervenfaserschicht	
normoxia Normoxia Umgebungsluft (ca. 21 %	
Sauerstoffgehalt)	
NOX NOX-D20 C5-/ C5a-Inhibitor	
NV Neovascularisation Neovaskularisation	
O ₂ -Box Sauerstoffbox	
OIR Oxygen-induced retinopathy Sauerstoff-induzierte Retinopathi	Э
OIR+C5a Sauerstoff-induzierter Retinopathie	
plus intraperitoneale C5a-Injektionen	
OIR+PBS Sauerstoff-induzierter Retinopathie	
plus intraperitoneale PBS-Injektionen	
ONL Outer nuclear layer äußere Körnerschicht	

OPL	Outer plexiform layer	äußere plexiforme Schicht
OS	Outer Segments	Photorezeptorschicht
		(Außensegmente der
		Photorezeptoren)
Р	postnataler Tag	
p-Wert	Signifikanzwert	
PBS	Phosphate buffered saline	Phosphatgepufferter Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd	
qPCR	Quantitative Real-Time Polymerase-	
	Kettenreaktion	
R	Rezeptor	
R _a	Anzahl auszählbarer Retinae	
R _{ges}	Anzahl ausgewerteter Retinae	
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease	
ROP	Retinopathy of prematurity	Frühgeborenenretinopathie
RPE	retinales Pigmentepithel	
SEM	Standard error of the mean	Standardfehler des Mittelwertes
Т	Tuft-Zone	
Tab.	Tabelle	
TAMs	Tumor-associated macrophages	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBS	Tris-buffered saline	dreifach gepufferter
		Kochsalzlösung
Τ _Ι	Tuft-Zone der inneren Schicht	
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α	
To	Tuft-Zone der äußeren Schicht	
V	vaskuläre Zone	
VEGF	Vascular endothelial growth factor	vaskulärer endothelialer
		Wachstumsfaktor
vgl.	vergleiche	
VI	vaskuläre Zone der inneren Schicht	
VO	Vaso-obliteration	Vasoobliteration
Vo	vaskuläre Zone der äußeren Schicht	
VZ	Vaskularisierungszone	
ZNS	zentrales Nervensystem	
μm	Mikrometer	
μm²	Quadratmikrometer	

Einleitung

Einleitung

Die Frühgeborenenretinopathie ist eine von krankhaftem Wachstum aepräate Blutgefäßerkrankung der Netzhaut, von der zu früh geborene Babys oder Babys mit einem sehr geringem Geburtsgewicht betroffen sind (Husain et al 2013). Bei geschätzt 11% aller Geburten handelt es sich um Frühgeburten (Caprara & Grimm 2012). Die Erkrankungsrate der Frühgeborenenretinopathie ist durch die erhöhte Anzahl von Frühgeborenen, beispielsweise durch die vermehrte Durchführung künstlicher Befruchtungen und das damit verbundene erhöhte Vorkommen von Mehrlingsgeburten (World Health Organisation (WHO) 2012), und die erhöhte Überlebensrate sehr kleiner Frühgeborener in der Vergangenheit angestiegen (Shah et al 2016, Zin & Gole 2013). So hat deutlich die Frühgeborenenretinopathie in der Augenheilkunde stark an Bedeutung gewonnen.

Die Frühgeborenenretinopathie stellt eine der häufigsten Ursachen für Sehschwächen und Blindheit bei Kindern dar und kann demnach zu einer lebenslangen Erkrankung führen ((Good & Hardy 2001) zitiert nach (Yanai et al 2012)). In den Industrieländern werden bis zu einem Fünftel aller Erblindungen und Sehschwächen bei Kindern von der Frühgeborenenretinopathie hervorgerufen (Gilbert et al 1997).

Die Entstehung der Erkrankung wird auf den im Rahmen der Geburt plötzlich einsetzenden deutlich höheren Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft verglichen mit dem in der Gebärmutter zurückgeführt (Bell & Klein 1994, Stahl et al 2010b). Dieser enorme Unterschied wird durch die anschließende künstliche Sauerstoffsubstitution nochmals erhöht (Stahl et al 2010b, Yanai et al 2012). Die starken Schwankungen in der Sauerstoffversorgung, denen die Frühgeborenen beispielsweise während durchgeführter medizinischer Untersuchungen ausgesetzt sind, tragen zusätzlich zu der Entstehung und der Entwicklung der Krankheit bei (Caprara & Grimm 2012). Die Folge ist ein abnormes Blutgefäßwachstum in der Netzhaut, das erst zum Verschluss (Poulaki 2007, Stahl et al 2010b) und dann in der zweiten Phase zu überschießendem Wachstum führt (Sapieha et al 2010).

Derzeitige Behandlungsmethoden (vor allem Hitze- oder Kälte-bedingte Gewebszerstörung und Hemmung von Blutgefäßwachstumsfaktoren; im fortgeschrittenen Krankheitsstadium auch chirurgische Entfernung des Glaskörpers oder ggfs. Entfernung des gesamten Augapfels) sind oft mit einem hohen Grad an Gewebeschädigung und/ oder dem Risiko von lokalen und systemischen Komplikationen verbunden (Pahor 1998, van Wijngaarden et al 2005). Sie schaffen es oft nicht das abnorme Blutgefäßwachstum vollständig und dauerhaft zu unterdrücken (Hu et al 2012). Aktuell ist zudem bislang noch unklar, welche langfristigen Nebenwirkungen der systemische Einsatz von Mitteln, die Blutgefäßwachstumsfaktoren hemmen. im Säuglingsalter haben wird (Sato et al 2012). Die aktuellen Therapiemöglichkeiten setzen zum Großteil da an, die aus der Erkrankung heraus

Einleitung

resultierenden abnormen Blutgefäße zu eliminieren. Der Ansatz die damit zusammenhängende und parallel stattfindende normale Blutgefäßentwicklung in der Netzhaut zu fördern und somit überschießende Blutgefäßfehlbildungen erst gar nicht entstehen zu lassen, wird aktuell oft vernachlässigt.

Um die Ursachen und Einflussfaktoren der (pathologischen) Blutgefäßneubildung in der Netzhaut detailliert untersuchen zu können, wurde das Mausmodell der Sauerstoffinduzierten Retinopathie (Smith et al 1994) entwickelt. Dieses Modell imitiert viele Vorgänge der menschlichen Frühgeborenenretinopathie und ermöglicht eine Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen (Smith et al 1994, Stahl et al 2010b). In der Literatur Hinweise darauf, dass findet man zahlreiche das Ausmaß des abnormen Blutgefäßwachstums im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie von dem angeborenen Immunsystem (im Besonderen dem Komplementsystem und den Mikroglia-Zellen/ Makrophagen) beeinflusst wird. Die Zusammenhänge zwischen dem Komplementsystem, den Mikroglia-Zellen/ Makrophagen und der Blutgefäßneubildung in der Netzhaut und deren mögliche gegenseitige Beeinflussung sind allerdings bisher nur unvollständig verstanden.

Aktuell gibt es keine kausale Therapie für die Frühgeborenenretinopathie. Mit steigender Zahl Frühgeborener und den stetig verbesserten Behandlungsmöglichkeiten nimmt die Zahl der Frühgeborenenretinopathie-Patienten fortlaufend zu, sodass ein dringender Bedarf an neuen Therapie-Ansätzen besteht. Das Ziel der vorliegenden Studie besteht deshalb darin, die bisher gewonnenen Erkenntnisse so zu erweitern, dass die Zusammenhänge zwischen dem Komplementsystem und der Entwicklung des abnormen Blutgefäßwachstums in der Netzhaut – der Auslöser der Frühgeborenenretinopathie – unter Einbezug der Interaktion mit den Mikroglia-Zellen und Makrophagen klarer definiert werden können. Dieser Erkenntnisgewinn soll zu neuen therapeutischen Ansatzpunkten verhelfen, damit zukünftig eine adäquate Therapie der Frühgeborenenretinopathie möglich wird.

1.1. Die Netzhaut

1.1.1. Allgemeine Vergleichbarkeit der Anatomie und Histologie des Auges und der Netzhaut von Mensch und Maus

Das Säugetier-Auge des Menschen und der Maus ist in vielen Gesichtspunkten vergleichbar. Anatomische und histologische Unterschiede zwischen dem humanen und murinen Auge bestehen vor allem in Bezug auf die relativen Größenverhältnisse (Treuting et al 2012). Bei dem Vergleich histologischer Präparate fällt vor allem die sehr große runde Linse der Maus auf, die den Großteil des Glaskörpers ausfüllt (vgl. **Abb. 6** Ü), wohingegen der Mensch eine flache und verhältnismäßig deutlich kleinere Linse aufweist (vgl. Figure 2 und 3 in (Treuting et al 2012)). Der auffallendste Unterschied zwischen der humanen und murinen Netzhaut (Retina) ist die Makula, der Bereich des schärfsten Sehens bei Menschen, die der Maus fehlt (Treuting et al 2012). Eine zentrale Vertiefung der Makula stellt die Fovea dar, die sich durch eine zentrale Avaskularität auszeichnet und vor allem aus Photorezeptoren besteht. Demnach ist im Gegensatz zur Maus die Schichtdicke der humanen Netzhaut abhängig von der Nähe zur Fovea variabel (Treuting et al 2012). Das humane retinale Blutgefäßnetz ist bogenförmig, das murine strahlenförmig ausgebildet (Treuting et al 2012).

1.1.2. Die allgemeine Anatomie und Histologie der Netzhaut

Der zentrale Teil des Sehorgans (Organum visus) stellt Netzhaut dar. Sie wandelt Lichtsignale über chemische Reaktionen in neuronale Signale um, die schließlich im Gehirn vom Organismus als visuelles Bild wahrgenommen werden (König & Liebich 2005, Maggs et al 2008).

Die Netzhaut stellt die innerste der drei Wandschichten des Augapfels dar (**Abb. 1**) und wird deshalb auch als innere Augenhaut (Tunica interna bulbi) bezeichnet (Benninghoff & Drenckhanhn 2008, König & Liebich 2005). Sie gliedert sich in einen vorderen, lichtunempfindlichen Abschnitt (Pars caeca retinae) und einen hinteren mit lichtsensiblen Rezeptoren ausgestatteten Abschnitt (Pars optica retinae) (Benninghoff & Drenckhanhn 2008, König & Liebich 2005). Den Übergang der Pars caeca zur Pars optica retinae bildet die Ora serrata (Benninghoff & Drenckhanhn 2008, König & Liebich 2005). Den Übergang der Pars caeca zur Pars optica retinae bildet die Ora serrata (Benninghoff & Drenckhanhn 2008, König & Liebich 2005). Die Pars optica retinae gliedert sich in zwei Blätter: das äußere Stratum pigmentosum retinae (= Pigmentepithel) und das innere Stratum nervosum retinae (= Rezeptorschicht) (Benninghoff & Drenckhanhn 2008). Das retinale Pigmentepithel (RPE, Stratum pigmentosum retinae) liegt zwischen der Aderhaut (Choroidea), dem hinteren Teil der mittleren Augenhaut (Tunica

vasculosa Bulbi), und den Außensegmenten (OS) der Photorezeptoren des Stratum nervosum retinae (**Abb. 3**) (König & Liebich 2005, Sachsenweger 2003). Das RPE ist an zwei Stellen, an der Ora serrata und an der Austrittsstelle des Sehnerven (Nervus opticus), mit dem Stratum nervosum retinae fest verbunden (Benninghoff & Drenckhanhn 2008, König & Liebich 2005). Das Stratum nervosum retinae bildet die Netzhaut im eigentlichen Sinn. Sie ist mehrfach geschichtet (vgl. Abschnitt **1.1.3**) (König & Liebich 2005). Die Netzhaut entsteht embryologisch aus dem Neuroektoderm (Sachsenweger 2003) durch Ausstülpung des Zwischenhirns (Schnorr & Kressin 2006), ist somit Teil des Zwischenhirns und schließt demzufolge Gliazellen und Nervenzellen mit ein (König & Liebich 2005). Die Netzhaut stellt aus ihrer Entwicklung heraus demnach einen Teil des zentralen Nervensystems dar, weshalb zelluläre und molekulare Vorgänge ähnlich ablaufen und durchaus vergleichbar sind.



Abb. 1 Schematische Darstellung des Wirbeltier-Auges in der Medianebene modifiziert nach Talos (Talos 2008).

1.1.3. Die Schichten der Netzhaut

Die Netzhaut besteht sowohl beim Menschen als auch bei der Maus aus 10 Schichten (Benninghoff & Drenckhanhn 2008, Maggs et al 2008, Sachsenweger 2003, Treuting et al 2012) und einer Reihe verschiedener Zelltypen (**Abb. 2**, **Abb. 3**). Im Folgenden werden die einzelnen Schichten von außen (der Aderhaut zugewandt) nach innen (dem Glaskörper zugewandt) vorgestellt:

1. Retinales Pigmentepithel (RPE)

Das RPE ist einschichtig isoprismatisch, pigmentiert, umgibt kappenartig die Photorezeptoren und reicht vom Sehnervenkopf bis zur Ora serrata (König & Liebich 2005, Treuting et al 2012). Es stellt die metabolische Schnittstelle zwischen den Photorezeptoren und der choroidalen Blutversorgung dar. dient dem Wiederaufbereitung des "verbrauchten" Sehpigments, absorbiert Licht und pumpt aktiv Flüssigkeit aus dem subretinalen Raum mit dem Ziel die Adhäsion der Netzhaut zu sichern (Maggs et al 2008, Sachsenweger 2003, Treuting et al 2012). Das RPE spielt außerdem eine phagozytotische Rolle bei retinalen Entzündungsgeschehen (Maggs et al 2008).

- Außensegmente der Photorezeptoren/ Photorezeptorschicht (*Outer segments*, OS) Die Photorezeptorschicht besteht aus den Außensegmenten der Stäbchen und Zapfen und Fortsätzen der Müller-Zellen (Benninghoff & Drenckhanhn 2008, Maggs et al 2008). Mit Hilfe des Sehpigments erfolgt hier die Umwandlung des Lichtstimulus in das erste neuronale Signal (Maggs et al 2008, Sachsenweger 2003).
- 3. Äußere Grenzmembran (*External limiting membrane*, ELM)

Die äußere Grenzmembran wird von den Endfortsätzen, die die Zellmembranen der Zapfen und Stäbchen verbinden und von den Müllerzellen gebildet (Maggs et al 2008).

Die Müller-Zellen erstrecken sich von der äußeren bis hin zur inneren Grenzmembran über die gesamte Retina und erfüllen somit eine strukturelle Stützfunktion (Maggs et al 2008, Sachsenweger 2003). Kleine Zellausläufer der Müller-Zellen verlaufen zwischen den Außensegmenten der Photorezeptoren und tragen so zur Bildung der äußeren Grenzmembran bei (Benninghoff & Drenckhanhn 2008, Maggs et al 2008). Die Müller-Zellen dienen mit Ausnahme der Stäbchen- und Zapfenschicht der nutritiven Versorgung sämtlicher Schichten der Netzhaut (König & Liebich 2005) und nehmen eine Art Vermittlerposition zwischen den retinalen Blutgefäßen und Neuronen ein (Bringmann et al 2006, Rungger-Brändle et al 2000).

4. Äußere Körnerschicht (Outer nuclear layer, ONL)

Die äußere Körnerschicht wird von den Zellkernen der Zapfen und Stäbchen gebildet (Maggs et al 2008, Sachsenweger 2003). Bei Mäusen umfasst die ONL zehn bis zwölf Schichten und ist somit doppelt so mächtig wie die innere Körnerschicht (Treuting et al 2012). Sowohl die humanen als auch die murinen Photorezeptoren bestehen zu 95% aus Stäbchen (Treuting et al 2012).

5. Äußere plexiforme Schicht (Outer plexiform layer, OPL)

In der äußeren plexiformen Schicht findet die erste synaptische Verschaltung die Axone der Photorezeptoren mit Dendriten der Bipolar- und Horizontalzellen und auch mit benachbarten Photorezeptorzellen statt (Maggs et al 2008, Sachsenweger 2003). Im Bereich der Makula ist die OPL stärker ausgeprägt (Treuting et al 2012).

6. Innere Körnerschicht (Inner nuclear layer, INL)

Die innere Körnerschicht enthält Zellkerne der Bipolar-, Müller-, Horizontal- und Amakrinzellen (Sachsenweger 2003) und umfasst in der Regel sechs bis neun Schichten (Treuting et al 2012). Bei den Horizontal- und Amakrinzellen handelt es sich um lateral kommunizierende Zellen, die die neuronale Aktivität und das visuelle Signal modulieren (Maggs et al 2008).

7. Innere plexiforme Schicht (Inner plexiform layer, IPL)

Die innere plexiforme Schicht ist die zweite synaptische Schicht der Retina und besteht aus Axonen von Bipolar-, Horizontal- und Amakrinzellen und den Dendriten der Ganglienzellen (Maggs et al 2008, Sachsenweger 2003). Es bestehen eine Vielzahl von synaptischen Verbindungen zwischen Bipolar- und Ganglienzellen und in lateraler Form zwischen Horizontal- und Amakrinzellen und zwischen Bipolar- und Ganglienzellen. Diese lateralen Verbindungen koordinieren und vernetzen die Funktionen der Netzhaut (Maggs et al 2008).

8. Ganglienzellschicht (Ganglion cell layer, GCL)

In der Ganglienzellschicht befinden sich die Zellkörper der Ganglienzellen (Maggs et al 2008). Die murine und periphere (d.h. außerhalb der Makula) humane GCL besteht aus einer einzelnen Zellkörperschicht. Innerhalb der Makula des Menschen besteht sie aus mehreren Zellkörperschichten. Die höchste Ganglienzelldichte befindet sich bei der Maus temporal des Sehnervenkopfes mit abnehmender Dichte in der dorsalen und peripheren Retina (Treuting et al 2012).

9. Nervenfaserschicht (*Nerve fiber layer*, NFL)

In der Nervenfaserschicht wird gebildet durch die Axone der Ganglienzellen. Diese laufen parallel zur inneren Netzhautoberfläche und vereinigen sich am Sehnervenkopf (Maggs et al 2008, Sachsenweger 2003). Bei Mäusen verdickt sich die NFL zum Sehnervenkopf hin und zeigt sich undeutlich in der Netzhautperipherie (Treuting et al 2012). Im Durchschnitt hat der Mensch 1-1,2 Millionen Ganglienzell-Axone; Mäuse in etwa ein Zehntel davon, was aber stark zwischen den einzelnen Inzuchtstämmen variiert (Treuting et al 2012). Die Nervenfaserbündel treten als Sehnerv (Nervus opticus) zentral im Augenhintergrund durch die äußere Augenhaut (Tunica fibrosa bulbi) an einer siebartig perforierten Stelle (Lamina cribrosa) aus (König & Liebich 2005).

10. Innere Grenzmembran (Inner limiting membrane, ILM)

Die innerste Schicht der Netzhaut ist die innere Grenzmembran, die dem Glaskörper direkt zugewandt ist (Maggs et al 2008, Sachsenweger 2003). Es handelt sich dabei um eine Basalmembran, der die inneren Zellfortsätze der Müller-Zellen eng anliegen (Benninghoff & Drenckhanhn 2008, Maggs et al 2008).



Abb. 2 Schematische Darstellung der Schichten und Zelltypen der Säugetier-Retina modifiziert nach Hartmann (Hartmann 2013).

Abb. 3 Histologische Darstellung der Schichten der Säugetier-Retina am Beispiel der Maus im retinalen Paraffinschnitt (4 µm Schichtdicke) nach Hämatoxilin-Eosin-Färbung.

Maßstabsbalken entspricht 50 µm. ILM, *Inner limiting membrane* (innere Grenzmembran); NFL, *Nerve fiber layer* (Nervenfaserschicht); GCL *Ganglion cell layer* (Ganglienzellschicht); IPL, *Inner plexiform layer* (innere plexiforme Schicht); INL, *Inner nuclear layer* (innere Körnerschicht); OPL, *Outer plexiform layer* (äußere plexiforme Schicht); ONL, *Outer nuclear layer* (äußere Körnerschicht); ELM, *External limiting membrane* (äußere Grenzmembran); OS, *Outer segments* (Photorezeptorschicht); RPE, retinales Pigmentepithel. Die Abbildung wurde von der Verfasserin der vorliegenden Dissertation eigenständig angefertigt.

1.1.4. Die Blutversorgung der Netzhaut

Die Netzhaut ist gemessen am Sauerstoffverbrauch das metabolisch am meisten aktive Gewebe des Körpers. Deshalb verfügt die Netzhaut über eine bei Mensch und Maus gleichermaßen ausgebildete doppelte Blutversorgung (Treuting et al 2012). Der äußere Teil der Netzhaut (Photorezeptorzellen) wird über die Aderhaut versorgt, der mittlere und innere Teil werden über die intraretinalen Blutgefäße versorgt (Maggs et al 2008, Sachsenweger 2003, Treuting et al 2012). Beim Menschen zweigt sich die zentrale Netzhaut-Arterie in vier, bei der Maus in vier bis sechs (sehr variabel) retinale Arteriolen auf; der venöse Abfluss erfolgt bei beiden Spezies über ähnliche Wege (Treuting et al 2012).

Die Blut-Retina-Schranke umfasst bedingt durch die doppelte Blutversorgung eine epitheliale

und eine endotheliale Komponente. Die äußere Blut-Retina-Schranke wird vom retinalen Pigmentepithel gebildet (Treuting et al 2012), das die Retina von der Aderhaut trennt (vgl. Die Blut-Retina-Schranke wird gebildet durch die Abb. 3). innere retinalen Blutgefäßendothelzellen und deren Basalmembran (Maggs et al 2008, Sachsenweger 2003). Beide Schranken begrenzen im intakten Zustand den unkontrollierten Übertritt von Zellen und Molekülen in die Netzhaut (Maggs et al 2008). Die Blut-Retina-Schranke lässt im physiologischen Zustand lediglich kleine Moleküle in die Netzhaut diffundieren (Sachsenweger 2003). Aufgrund des nur sehr begrenzt vorhandenen retinalen Extrazellarraumes, geschieht der Transport gelöster kapillärer Stoffe über die Makrogliazellen (Müller-Zellen und Astrozyten) (Maggs et al 2008).

1.2. Die retinale Blutgefäßentwicklung

1.2.1. Die zellulären Vorgänge der retinalen Blutgefäßneubildung

Die retinale Blutgefäßneubildung stellt einen komplexen Prozess dar, der initiiert wird durch den erhöhten Sauerstoffbedarf der sich in Ausreifung befindlichen retinalen Neurone. Zentrale Stellung in diesem Prozess haben neben den Endothelzellen vor allem die Astrozyten (Chan-Ling et al 1995, Gerhardt et al 2003, Jiang et al 1995). Über den Sehnervenkopf treten die Astrozyten in die Netzhaut ein (Watanabe & Raff 1988). Sie bewegen sich vor den neu gebildeten Blutgefäßen her (Ling et al 1989), leiten die Endothelzellen entlang einer Matrize und sorgen somit für ein gerichtetes Blutgefäßwachstum und die Ausbildung eines funktionellem vaskulären Netzwerkes (Jiang et al 1995). Spezialisierte Endothelzellen, sogenannte tip cells, an den Enden der neuen Triebe leiten das Blutgefäßwachstum durch das Gewebe (Gerhardt et al 2003). Endothelzellen des Blutgefäßschaftes, sogenannte stalk cells, proliferieren und bilden das Gefäßlumen (Gerhardt et al 2003). Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (Vascular endothelial growth factor, VEGF) ist maßgeblich an der Entwicklung des retinalen Blutgefäßsystems beteiligt (Gerhardt et al 2003, Haigh et al 2003, Marneros et al 2005, Stalmans et al 2002). Aufgrund seines Einflusses auf die Blutgefäßpermeabilität ist VEGF auch unter dem Namen vaskulärer Permeabilitätsfaktor (Vascular permeability factor, VPF) bekannt (Dvorak et al 1995). VEGF wird in der Netzhaut von Astrozyten (Stone et al 1995), Müller-Zellen (Bai et al 2009, Pierce et al 1995, Wang et al 2010), Endothelzellen (Aiello et al 1995a), dem RPE (Nozaki et al 2006, Thurman et al 2009) und Ganglienzellen (Stone et al 1996) exprimiert.

1.2.2. Die retinale Blutgefäßentwicklung beim Menschen

Das vaskuläre Netz, das für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der inneren Netzhautabschnitte sorgt, durchläuft während der retinalen Entwicklung eine drastische Reorganisation, wenn das hyaloide durch das intraretinale Blutgefäßsystem ersetzt wird (Caprara & Grimm 2012). Beim Menschen beginnt die Vaskularisation der Netzhaut ungefähr in der 16. Schwangerschaftswoche ((Stahl et al 2010b), (Roth 1977) zitiert nach (Sapieha et al 2010)). Bis zu dem Zeitpunkt wird die embryologische innere Netzhaut durch die hyaloiden Blutgefäße versorgt, die im Sehnerven ihren Ursprung haben und durch den primitiven Glaskörper in Richtung des vorderen Augenabschnitts ziehen (Saint-Geniez & D'Amore 2004). Parallel zur Entwicklung der retinalen Blutgefäße erfolgt eine Regression des hyaloiden Blutgefäßsystems, um eine vollständige Transparenz des Glaskörpers (Mitchell et al 1998) und somit der gesamten späteren optischen Achse zu erreichen. Wenn die hyaloide Rückbildung circa in der 34. Schwangerschaftswoche abgeschlossen ist (Stahl et al 2010b), ist die Bildung des retinalen Blutgefäßnetzes bereits weit fortgeschritten und findet ihren Abschluss etwa in der 40. Schwangerschaftswoche ((Roth 1977) zitiert nach (Sapieha et al 2010)), also pränatal. Ein termingerecht geborenes Kind, wird demnach mit einem voll entwickelten retinalen Blutgefäßnetz und komplett rückgebildeten hyaloiden Blutgefäßen geboren (Stahl et al 2010b). Das retinale Blutgefäßnetz besteht beim Menschen aus zwei Blutgefäßplexus: einem oberflächlichen, lokalisiert in der Nervenfaserschicht und der Ganglienzellschicht, und einem tiefen, dessen Kapillaren in der inneren plexiformen Schicht verlaufen (Chalam & Sambhav 2016).

1.2.3. Die retinale Blutgefäßentwicklung bei der Maus

Die retinale Blutgefäßentwicklung der Maus ähnelt in vielen Punkten der des Menschen Im Gegensatz zum (Smith et al 1994). Menschen werden Mäuse jedoch physiologischerweise mit einem unvollständig entwickelten retinalen Blutgefäßnetz und noch präsenten hyaloiden Gefäßen geboren ((Gyllensten & Hellstrom 1954) zitiert nach (Smith 2002), (Stahl et al 2010b)). Wie auch beim Menschen laufen die Regression der Hyaloidgefäße und die Entwicklung der Netzhautgefäße bei der Maus parallel ab, allerdings postnatal (Dorrell & Friedlander 2006, Ritter et al 2006). Bezüglich der Vergleichbarkeit von Studienergebnissen ist es wichtig zu wissen, dass der zeitliche Ablauf der normalen retinalen Blutgefäßentwicklung zwischen verschiedenen Mausstämmen beträchtlich variiert. Unter den Wildtypmäusen sind die C75BI/6-Mäuse der am häufigsten genutzte Stamm (Stahl et al 2010b). Im Folgenden wird der zeitliche und räumliche Verlauf der Entwicklung der intraretinalen Blutgefäße der C75BI/6-Mäuse beschrieben (die auch für die vorliegende Studie genutzt wurden):

In der ersten postnatalen Woche entwickelt sich der oberflächliche Plexus, der zentral in der Netzhaut dem Sehnervenkopf entspringt, sich in der Nervenfaserschicht zentrifugal über die innere retinale Oberfläche ausbreitet und den peripheren Rand der Netzhaut ungefähr am postnatalen Tag (P)8 erreicht (Connolly et al 1988, Ritter et al 2006, Stahl et al 2010b). Von P7 an beginnen die superfiziellen Kapillaren sich senkrecht zu verzweigen und erst den tiefen und dann den mittleren Blutgefäßplexus zu bilden (Ritter et al 2006, Stahl et al 2010b). Der tiefe Plexus ist in der äußeren plexiformen Schicht der Netzhaut lokalisiert. Er entwickelt sich schnell und erreicht die Netzhautperipherie circa an P12. Bis zu diesem Zeitpunkt ist die Netzhautperipherie physiologisch avaskulär. Der mittlere Plexus erreicht die Netzhautperipherie zwischen P12 und P15 und verläuft in der inneren plexiformen Schicht der Netzhaut. Am Ende der dritten Lebenswoche sind alle drei Plexus vollständig ausgereift und über vernetzende Blutgefäße miteinander verbunden (Stahl et al 2010b).

Parallel zur Blutgefäßentwicklung findet die Ausreifung der retinalen Neurone statt (Stone et al 1995). Mit der Ausreifung dieser Zellen und aller anderen retinalen Zellen steigt der Sauerstoffbedarf im Gewebe. Die während dieser Zeit der Netzhautentwicklung stattfindende "physiologische Hypoxie" führt zu einer gesteigerten VEGF-Expression, die deutlich höher in der avaskulären peripheren Retina ausgeprägt ist als in den bereits vaskularisierten zentralen Bereichen (Pierce et al 1996, Stone et al 1996, Stone et al 1995, West et al 2005). Es wird angenommen, dass dieser VEGF-Gradient das Wachstum des primären Blutgefäßplexus leitet und lenkt (Caprara & Grimm 2012). Die für ein gerichtetes und geordnetes Blutgefäßwachstum sorgenden Astrozyten gelten als eine mögliche Quelle für VEGF in der avaskulären Netzhaut (Chan-Ling et al 1995, Dorrell et al 2002, Gerhardt et al 2003, Pierce et al 1996, Salhia et al 2000, Stone et al 1995, West et al 2005). Als weitere VEGF-Quellen während der retinalen angiogenen Entwicklung gelten die Ganglienzellen (Kim et al 2010, Sapieha et al 2008, Stone et al 1996) und die Müllerzellen (Caprara & Grimm 2012, Pierce et al 1995). Neben VEGF gibt es noch eine Reihe weiterer proangiogener Wachstumsfaktoren (zum Beispiel Insulin-like growth factor, IGF1 (Hellstrom et al 2001); Placental growth factor, PIGF (Feeney et al 2003)), die ebenfalls das Gefäßwachstum während der Entwicklung beeinflussen (Caprara & Grimm 2012).

Im Rahmen der Netzhautentwicklung kommt es also zu schwankenden Sauerstoffsättigungen im retinalen Gewebe der Maus. Die Netzhaut reagiert auf hypoxische Zustände mit Angiogenese, mit dem Ziel wieder eine ausgeglichene Sauerstoffhomöostase herzustellen. Verminderte Sauerstoffsättigung gilt somit als entscheidende treibende Kraft für die Entwicklung des retinalen Blutgefäßnetzes bei der Maus (Caprara & Grimm 2012).

1.3. Die Frühgeborenenretinopathie

Neben Entwicklungsstörungen sind Frühgeburten der häufigste Grund, der zu einer veränderten Blutgefäßentwicklung in der Netzhaut führt (Stahl et al 2010b). Die Frühgeborenenretinopathie (*Retinopathy of prematurity*, ROP) ist eine vaskuläre Netzhauterkrankung, von der Frühgeborene und/ oder Babys mit sehr geringem Geburtsgewicht (definiert als <1500g) betroffen sind (Husain et al 2013). Bei geschätzt 11% aller Geburten handelt es sich um Frühgeburten (Caprara & Grimm 2012).

Die ROP ist eine der häufigsten Ursachen für Sehschwächen und Blindheit bei Kindern. Bis zu einem Fünftel aller Erblindungen und Sehschwächen bei Kindern in den Industrieländern werden von der ROP hervorgerufen (Gilbert et al 1997). Zudem haben die erblindeten ROP-Patienten einen hohen sozioökonomischen Einfluss dadurch, dass sich eine lebenslange Behandlung anschließen kann ((Good & Hardy 2001) zitiert nach (Yanai et al 2012)). Die Prävalenz der ROP ist durch die erhöhte Überlebensrate sehr kleiner Frühgeborener in der Vergangenheit deutlich angestiegen (Shah et al 2016, Zin & Gole 2013). Zusätzlich führt die erhöhte Zahl von Mehrlingsgeburten, die zu einem großen Teil auf künstliche Befruchtungen zurückzuführen ist, zu einer erhöhten Anzahl von Frühgeborenen, die potentiell die ROP ausbilden können (World Health Organisation (WHO) 2012). Good et al. konnten in einer groß angelegten Studie aus dem Jahre 2005 zeigen, dass mehr als zwei Drittel aller Babys mit einem Geburtsgewicht von weniger als 1251g die ROP entwickelten (Good et al 2005). Geburtsgewicht, Das die Schwangerschaftsdauer und die postnatale frühe Gewichtszunahme, welche bei sehr jungen Frühgeborenen alle nur sehr gering sind, gelten als wichtige Indikatoren für die Entwicklung einer therapiebedürftigen ROP (Husain et al 2013). Die Frühgeborenenretinopathie hat somit im Zuge des medizinischen Fortschritts in der Ophthalmologie stark an Bedeutung gewonnen.

Zu früh geborene Babys kommen mit einem nur unvollständig entwickelten retinalen Blutgefäßnetz zur Welt (vgl. Abschnitt **1.2.2**). Die ROP zeigt sich klinisch als Zwei-Phasen-Erkrankung (Poulaki 2007, Stahl et al 2010b, Yanai et al 2012). Phase I umfasst die durch Hyperoxie herbeigeführte Unterbrechung des retinalen Blutgefäßwachstums und Phase II das durch relative Hypoxie hervorgerufene übermäßige retinale Blutgefäßwachstum (Poulaki 2007).

Phase I ist gekennzeichnet durch von Sauerstoff(radikalen) verursachte Blutgefäßverletzung und Obliteration der noch unreifen und dadurch empfindlichen retinalen Blutgefäße. Die erste Phase wird hervorgerufen durch den plötzlich nach der Geburt verglichen mit den Verhältnissen in der Gebärmutter deutlich höheren Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft, dem die Frühgeborenen ausgesetzt sind (Bell & Klein 1994, Stahl et al 2010b). Verstärkt wird dieser Umstand noch zusätzlich durch die künstliche Sauerstoffsubstitution, die den

Frühgeborenen zur Unterstützung der Funktion der noch unvollständig entwickelten Lungen verabreicht wird (Stahl et al 2010b, Yanai et al 2012). Neben starken Schwankungen in der Sauerstoffversorgung (Caprara & Grimm 2012), werden auch noch weitere früh auftretende Faktoren wie Vitamin E-Mangel, Sepsis und intraventrikuläre Blutungen als Krankheitsauslöser in Betracht gezogen (Poulaki 2007). Die postnatal erlebte relative Hyperoxie kann im Normalfall von reif geborenen Babys gut toleriert werden (Weinberger et al 2002), führt bei Frühgeborenen aber zum Gefäßverschluss (Vasoobliteration) der bereits existierenden retinalen Blutgefäße und zum Einstellen oder starker Verlangsamung der Blutgefäßentwicklung innerhalb der Retina (Poulaki 2007, Stahl et al 2010b). Vermittelt wird dies über eine Herunterregulierung von angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF und dem insulinähnlichen Wachstumsfaktor 1 (Insulin-like growth factor 1) (Leske et al 2004) und eine Hochregulierung von anti-angiogenen Faktoren (Dawson et al 1999). Es entstehen avaskuläre Bereiche in der Retina. Im Rahmen der parallel stattfindenden Ausreifung retinaler Zellen, erhöht sich die metabolische Aktivität der Netzhaut (Yanai et al 2012) und somit der Sauerstoffbedarf. Dies führt nach und nach zu einer immer stärker werdenden relativen Hypoxie des retinalen Gewebes, die zu dem Zeitpunkt nochmal schlagartig verstärkt wird, wenn die Sauerstoffsubstitution des Frühgeborenen - meist von einen Moment auf den anderen – eingestellt und das Kind in normale Umgebungsluft verbracht wird (Poulaki 2007).

Die Phase II der ROP, die der retinalen Neovaskularisation, wird hervorgerufen durch diese schlagartig hervorgerufene relative Hypoxie (Smith 2004, Stahl et al 2010b). Sie ist gekennzeichnet von der funktionellen Wiederherstellung der geschädigten und obliterierten Blutgefäße und der Entwicklung eines vollständigen Blutgefäßnetzes (Poulaki 2007, Stahl et al 2010b). In dieser Phase, die der anderer proliferativer Retinopathien gleicht, wird der Hypoxie-abhängige pro-angiogene Wachstumsfaktor VEGF hochreguliert (Provis et al 1997, Stone et al 1996). Es kommt zu überschießendem und unkontrolliertem präretinalen Blutgefäßwachstum in Richtung des Glaskörpers und der Linse (Sapieha et al 2010).

Es wird davon ausgegangen, dass sich der Grad des neovaskulären Blutgefäßwachstums direkt proportional zu der während der Phase I der Erkrankung ausgebildeten Größe der avaskulären retinalen Fläche verhält (Flynn 1987, Yanai et al 2012). In den meisten Fällen kommt es nur zu einer milden Form der ROP mit vollständiger Revaskularisation der avaskulären Bereichen, der Ausbildung eines vollständigen retinalen Blutgefäßbettes – wenn auch deutlich zeitverzögert (Stahl et al 2010b) – und der komplikationslosen Rückbildung der pathologischen Neovaskularisationen (Mantagos et al 2009, Yanai et al 2012). In schwerwiegenden Fällen kann es zu der Unfähigkeit kommen, diese Hypoxie-gesteuerte Antwort zu überwinden (Yanai et al 2012). Persistierenden Neovaskularisationen können dann zu Komplikationen wie neuronaler Zelltod, Blutungen, Netzhautablösungen,

verminderte Sehschärfe oder vollständiger Blindheit führen (Andersen & Phelps 2000, Repka et al 2006, Schaffer et al 1993, Smith 2002, Yanai et al 2012).

Die Entwicklung der Frühgeborenenretinopathie kann aktuell nicht verhindert werden (Husain et al 2013). Prädisponierte Babys, die aufgrund ihrer stark ausgeprägten Unreife und/ oder ihres sehr geringen Geburtsgewichtes als gefährdet eingeschätzt wurden, werden deshalb normierten ROP-Screening-Programmen unterzogen, die in den Industrieländern in die Routine der neonatalen Versorgung integriert sind (Husain et al 2013). Das Ziel dieser ROP-Screenings ist, die Babys, die eine schwerwiegende ROP entwickelt haben, so früh wie möglich zu erkennen und den Krankheitsverlauf therapeutisch zum Stillstand zu bringen bzw. weitere Komplikationen zu verhindern (Husain et al 2013). Derzeit besteht die Behandlung der ROP vor allem in einer punktuellen Laserbestrahlung der ischämischen Netzhautbereiche und in der Verabreichung von VEGF-Inhibitoren (Hartnett & Penn 2012, Mintz-Hittner et al 2011). Laserabtragung und angiostatische Präparate schaffen es häufig aber nicht das pathologische Blutgefäßwachstum vollständig zu unterdrücken. Ihr Einsatz ist oft verbunden mit einem hohen Grad an Gewebeschädigung und dem Risiko von lokalen und auch systemischen Komplikationen (Mintz-Hittner et al 2011, Pahor 1998, van Wijngaarden et al 2005). Zudem ist bislang noch unklar, welche langfristigen systemischen Nebenwirkungen die Unterdrückung der Gefäßwachstumsfaktoren im Säuglingsalter haben wird (Sato et al 2012). In Verlaufsstudien konnte gezeigt werden, dass es nach intravitrealer Anti-VEGF-Therapie zu einer erneuten retinalen Blutgefäßproliferation mit Progression der ROP kommen kann (Hu et al 2012). Es ist wichtig, sich auch über mögliche schädliche Effekte der Inhibierung von Wachstumsfaktoren auf Blutgefäß-assoziierte Zellen, wie Astrozyten und Mikroglia-Zellen, Gedanken zu machen (Dorrell et al 2010). Sicherlich unterbindet die Inhibierung von VEGF die Endothelzellproliferation und reduziert die Blutgefäßpermeabilität, aber sie könnte auch zum Verlust der für die Netzhautfunktion und homöostase so wichtigen Astrozyten und Mikroglia-Zellen mit daraus resultierenden Langzeitschäden führen (Dorrell et al 2010). Einen interessanten neuen zukünftigen Therapie-Ansatz lieferten Ritter et al. unter Verwendung des Mausmodells der Sauerstoffinduzierten Retinopathie (vgl. Abschnitt 1.4), das zur Untersuchung der Pathogenese der ROP verwendet wird (Ritter et al 2006). Sie konnten zeigen, dass intravitreal injizierte autologe adulte Knochenmarksvorläuferzellen erfolgreich zum Wiederaufbau und zur Stabilisierung des funktionellen Blutgefäßnetzes im hypoxischen Retinalgewebe führten (Ritter et al 2006). Dieser Ansatz zielt auf die Unterstützung der physiologischen Blutgefäße ab und setzt somit einen Schritt eher an, anstatt die aus der Erkrankung resultierenden pathologischen "Problemgefäße" und die mit ihrem Auftreten einhergehenden Komplikationen zu beseitigen, wenn sie bereits da sind. Ein ähnlicher Gedankengang lag der

Konzeption der vorliegenden Studie zugrunde.

Aktuell gibt es keine kausale etablierte Therapie für die Frühgeborenenretinopathie. Mit dem Ziel neue Therapie-Ansätze hervorzubringen bedient sich die vorliegende Studie des Mausmodells der Sauerstoff-induzierten Retinopathie, die viele Aspekte der ROP erfolgreich imitiert (Penn et al 1993, Smith et al 1994).

1.4. Das Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie

Das Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (Oxygen-induced retinopathy, OIR) (Smith et al 1994) (Abb. 4) ist ein 1994 entwickeltes und heute etabliertes Tiermodell, das die Krankheitsmerkmale der humanen Frühgeborenenretinopathie in einer experimentellen Umgebung zuverlässig reproduziert (Stahl et al 2010b). Es existiert ein genaues Schritt-für-Schritt-Protokoll für die Durchführung und Datenauswertung der OIR (Connor et al 2009), woran sich auch die Arbeiten der vorliegenden Studie eng orientieren. Der zeitliche Ablauf lässt sich kurzgefasst folgendermaßen darstellen: Mauswelpen werden vom postnatalen Tag (P)7 bis P12 einem Luftsauerstoffgehalt von 75% ausgesetzt und anschließend an P12 wieder in normale Umgebungsluft (21% Sauerstoff) verbracht. Während der ersten, hyperoxischen Phase (P7 bis P12), ziehen sich die Lumen Netzhautgefäße zusammen, um den intravasalen Sauerstoffpartialdruck zu regulieren (Wangsa-Wirawan & Linsenmeier 2003). Die zentral in der Netzhaut (= Sehnervenkopf-nah) bereits vorhandenen unausgereiften Kapillaren (vgl. Abschnitt 1.2.3) bilden sich zurück und es entsteht die sogenannte zentrale avaskuläre Zone (Stahl et al 2010b) (Abb. 5). Da sich die Einwirkung der Hyperoxie mit der Phase der physiologischen Entwicklung des tiefen und mittleren retinalen Blutgefäßplexus aus dem oberflächlichen Plexus heraus überschneidet, findet diese Entwicklung der tieferen intraretinalen Blutgefäße im OIR-Modell deutlich zeitverzögert statt (Stahl et al 2010b). Es bleiben lediglich acht Blutgefäße größeren Kalibers übrig, die strahlenförmig in die Netzhautperipherie ziehen und das periphere Blutgefäßnetz versorgen (Fischer et al 2011) (Abb. 5). Die Sauerstoff-induzierte Vasoobliteration der zentralen Netzhaut geschieht sehr schnell. Die avaskuläre Zone erreicht ihr größtes Ausmaß bereits 48 Stunden nach Beginn Hyperoxie (entspricht P9) (Lange et al 2009) und die Revaskularisation beginnt bereits zwischen P9 und P12, während die Mauswelpen immer noch den 75% Luftsauerstoff ausgesetzt sind (Gu et al 2002, Lange et al 2009). Diese früh einsetzende Revaskularisation spiegelt wahrscheinlich die fortschreitende Ausreifung der Netzhaut und den damit verbundenen erhöhten Sauerstoffbedarfs des sich entwickelnden Gewebes wider (Lange et al 2009, Ozaki et al 1999). An P12, der Zeitpunkt, an dem die

Mäuse wieder zurück in normale Raumluft verbracht werden, erfährt die avaskuläre Zone der Netzhaut eine plötzliche relative Hypoxie (Caprara & Grimm 2012, Chen et al 2009) und es kommt zu einer rapiden Hochregulierung der Expression des pro-angiogenen Wachstumsfaktors VEGF, vor allem in den Glia- und Müllerzellen (Ozaki et al 1999, Pierce et al 1995, Smith et al 1999).

Die avaskuläre Netzhaut der OIR unterscheidet sich von der physiologisch avaskulären Netzhautperipherie während der retinalen Blutgefäßentwicklung (vgl. Abschnitt 1.2.3) bezüglich der Sauerstoffverhältnisse. Während Sauerstoffbedarf und -versorgung in der unausgereiften peripheren Netzhaut weitestgehend ausgeglichen sind, herrscht in der zentralen avaskulären Zone des OIR-Modells eine Sauerstoffunterversorgung (Stahl et al 2010b). Die Hypoxie-bedingte Expression angiogener Wachstumsfaktoren in der zweiten Phase der OIR ist nicht nur maßgeblich notwendig für die Revaskularisation der avaskulären Fläche; bei der Bildung pathologischer Neovaskularisationen spielen die angiogenen Wachstumsfaktoren ebenfalls eine entscheidende Rolle (Stahl et al 2010b). Diese pathologischen Blutgefäße scheren aus dem in hochorganisierten retinalen Blutgefäßnetz (vgl. Abschnitt 1.2.3) aus und wachsen stattdessen ungeordnet in den normalerweise avaskulären Glaskörper hinein (Stahl et al 2010b). Diese kleinkalibrigen pathologischen Blutgefäße werden als präretinale Tufts bezeichnet (Stahl et al 2010b). Sie gleichen den pathologischen Neovaskularisationen, die im Rahmen der humanen ROP auftreten (Smith et al 1994). Flächig gruppiert vorkommende Tufts werden Clusters genannt (Lange et al 2009). Die Tuftbildung im Mausmodell der OIR erfolgt am Übergang der zentralen avaskulären Zone zur peripheren vaskulären Zone (Lange et al 2009) (**Abb. 5**). Da in dieser sogenannten Tuft-Zone eine hohe Blutgefäßbildungs- und Blutgefäßabbauaktivität herrscht, wird die Tuft-Zone in der vorliegenden Studie auch als Aktivitätszone bezeichnet.

Abb. 4 Schematische Darstellung des Mausmodells der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR) modifiziert nach Connor et al. (oberer Teil) und Sweigard et al. (unterer Teil der Abbildung) (Connor et al 2009, Sweigard et al 2014).

Der Zeitstrahl stellt das Alter der Mäuse in postnatalen Tagen (*Days postnatal*) und die Zeit dar, die sie entweder an Raumluft (*Room Air*, blau) oder bei 75% Luftsauerstoffgehalt (*75 % Oxygen*, grün) verbringen. Die während der OIR stattfindenden normalen (orange) und pathologischen vaskulären Veränderungen (rot) sind unterhalb des Zeitstrahls dargestellt. Mauswelpen und das säugende Muttertier werden von Geburt bis zum postnatalen Tag (P)7 an Raumluft (*Normoxia*) gehalten und eine physiologische retinale Blutgefäßentwicklung findet statt. Von P7 bis P12 werden die Mäuse 75% Luftsauerstoff ausgesetzt, was zu dem Verlust unreifer retinaler Blutgefäße (*Vaso-obliteration*) und verlangsamter Entwicklung des retinalen Blutgefäßnetzes und somit zu einer zentralen Zone der Vasoobliteration (*Vaso-obliteration*, VO) führt. Nachdem die Mäuse an P12 wieder an Raumluft zurückkehren, wird die zentrale avaskuläre Zone hypoxisch, was sowohl die normale Revaskularisation (*Vascular re-growth*) als auch die pathologische Bildung präretinaler Neovaskularisation (*Regression*; *NV regression*) und an P25 sind kaum noch VO oder NV sichtbar.

Obwohl die Bildung der neovaskulären Tufts aus dem superfiziellen retinalen Blutgefäßplexus, heraus geschieht, zeigen die Blutgefäße der mittleren und tiefen Schicht ebenfalls Gefäßanomalien verglichen mit zeitgleichen Kontrollretinae (Stahl et al 2010b). Im Mausmodell der OIR erreicht die proliferative Phase ihren Höhepunkt an P17 (Lange et al 2009), die Gesamt-Tuftfläche hat somit ihr größtes Ausmaß. Zudem treten an diesem Zeitpunkt Plasma-Leckagen aus den präretinalen Tufts auf (Stahl et al 2010b). Im Anschluss beginnt die Regression der pathologischen Neovaskularisationen der OIR; an P25 sind bereits kaum noch avaskuläre Bereiche und/ oder Tufts erkennbar (Davies et al 2008, Lange

et al 2009, Stahl et al 2010b).

Die enge gegenseitige Abhängigkeit der Vasoobliteration und der Neovaskularisation – ersteres bestimmt den zeitlichen Verlauf und die Schwere des letzteren (vgl. auch Ausführungen in Abschnitt **1.3**) – macht die Wichtigkeit deutlich, dass im Rahmen des Mausmodells der OIR immer gemeinsam Daten zur Vasoobliteration und zur Neovaskularisation veröffentlicht werden sollten (Stahl et al 2010b).

Abb. 5 Beispiel für die Entwicklung der zentralen avaskulären Zone von P14 bis P21 und des Ausmaßes der Gesamt-Tuftfläche an P17 im retinalen Flachpräparat der Maus der Kontrollgruppe nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12).

Von P14 (links) zu P17 (Mitte) ist ein deutlicher Rückgang der zentralen avaskulären Zone (rot umrandet) erkennbar. An P21 (rechts) ist diese bereits nahezu vollständig durch revaskularisierende retinale Blutgefäße (grün) aufgehoben. Die retinalen Neovaskularisationen (Tufts) sind weiß eingezeichnet (P17, Mitte). Maßstabsbalken entspricht 1000 µm. P, postnataler Tag. Die Abbildung wurde von der Verfasserin der vorliegenden Dissertation eigenständig angefertigt.

1.5. Histomorphologische Darstellung der vaskulären, avaskulären und Tuft-Region im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie

Die avaskuläre Zone (A) erstreckt sich zentral vom Sehnervenkopf aus in peripherer Richtung bis in die Mittelperipherie (**Abb. 6** Ü, mittlerer schwarzer Kasten A) und ist durch das Fehlen von retinalen Blutgefäßen mit Ausnahme der großen Hauptgefäße charakterisiert (**Abb. 6** A). Die Tuft-Zone (T) befindet sich mittelperipher am Übergang von der vaskulären zur avaskulären Zone (**Abb. 6** T, rechter schwarzer Kasten T) und ist durch epiretinalen Blutgefäßknäuel (Tufts) gekennzeichnet (**Abb. 6** T). Die vaskuläre Zone befindet sich in der Netzhautperipherie angrenzend an die Ora serrata (**Abb. 6** V, linker schwarzer Kasten V) und zeichnet sich durch ein dichtes Netz großer und kleiner retinaler Blutgefäße aus (**Abb. 6** V).

Abb. 6 Histomorphologische Darstellung der Netzhaut einer Maus der Kontrollgruppe am postnatalen Tag (P)17 nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) im retinalen Paraffinschnitt (4 µm Schichtdicke) nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Übersicht in der Medianebene des Auges mit Aufzeigung der vergrößert dargestellten Regionen (schwarze Kästen) (Ü). Avaskuläre Region (mittlerer schwarzer Kasten der Übersicht) ohne retinale Blutgefäße (A). Tuft-Region (rechter schwarzer Kasten der Übersicht) mit epiretinalen Blutgefäßknäuel (T, schwarze Pfeilköpfe). Vaskuläre Region (linker schwarzer Kasten der Übersicht) mit retinalem Blutgefäß (V, schwarzer Pfeil). Maßstabsbalken entspricht 1000 µm (Ü) und 100 µm (A, T und V). Die Abbildung wurde von der Verfasserin der vorliegenden Dissertation eigenständig angefertigt.

1.6. Übertragbarkeit des Mausmodells der Sauerstoff-induzierten Retinopathie auf die Frühgeborenenretinopathie des Menschen

Das Mausmodell der OIR ist eines der ersten und führenden Tiermodelle sowohl für die Untersuchung der Entwicklung der Angiogenese als auch für die Untersuchung neuer in vivo Therapiestrategien für pathologische Retinopathien (Stahl et al 2009). Das OIR-Mausmodell hat sich mit mehr als 15.000 Publikationen seit der ersten Veröffentlichung 1994 (Stahl et al 2010b, Stahl et al 2009) durch Smith et al. (Smith et al 1994) zu einem etablierten Instrument für biologische und pharmakologische Blutgefäßforschung entwickelt (Lange et al 2009). Auch wenn dieses Tiermodell nicht zu 100% übertragbar auf die ROP des Menschen ist, teilen beide Pathologien viele Gemeinsamkeiten.

Die Entwicklung der retinalen Blutgefäße geschieht beim Menschen intrauterin und ist ca. mit der 40. Schwangerschaftswoche abgeschlossen ((Roth 1977) zitiert nach (Sapieha et al 2010)). Bei Mäusen hingegen findet die Ausbildung des retinalen Blutgefäßsystems erst postnatal statt (vgl. Ausführungen in Abschnitt **1.2.3**). Zum Zeitpunkt der Geburt ist demnach das murine retinale Blutgefäßsystem hingegen nur sehr unvollständig entwickelt (Sapieha et al 2010, Smith 2002), weshalb reif geborene Mäuse den retinalen Blutgefäßentwicklungsstatus eines Frühgeborenen widerspiegeln können (Madan & Penn 2003, Smith 2002). Der Ablauf der Blutgefäßentwicklung bei Mäusen ähnelt dem der Menschen (Smith et al 1994) was eine Erforschung der retinalen Angiogenese sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen ermöglicht (Sapieha et al 2010, Smith 2002). Die Maus eignet sich als Versuchstier für das OIR-Modell besonders gut (Smith et al 1994), da die physiologisch postnatal stattfindende Blutgefäßentwicklung eine vollständige Beobachtung aller ablaufenden Vorgänge ermöglicht (Blanks & Johnson 1983, Connolly et al 1988). Der Entwicklungsstatus der Netzhautgefäße neugeborener Mäuse entspricht dem frühgeborener Babys zwischen dem vierten oder fünften Schwangerschaftsmonat (Gyllensten & Hellstrom 1955). Und wie auch beim Menschen wird die Entwicklung bei der Maus durch Spindelzell-Vorläuferzellen, welche an der ROP-Pathogenese beteiligt sind, hervorgerufen (Kretzer et al 1984). Zudem ist die Haltung von Nagern mit vergleichbar wenig Platz- und Pflegepersonalaufwand verbunden und es stehen mittlerweile zahlreiche genmodifizierte Mäuse zur Erforschung spezieller Einflussfaktoren zur Verfügung (Huberman & Niell 2011). Es ist allerdings wichtig zu wissen, dass verschiedene Wildtyp-Stämme die OIR-Pathologie unterschiedlich stark ausbilden (Chan et al 2005, Ritter et al 2006) und dass es innerhalb desselben Mausstammes sogar Unterschiede je nach Züchter geben kann (Stahl et al 2010b). Um diese Unterschiede unter Kontrolle zu behalten und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu wahren, sollten für das gesamte Experiment alle Mäuse (Behandlungs- und Kontrollgruppe) von demselben Stamm und nur von einem
Züchter bezogen werden (Stahl et al 2010b). In der vorliegenden Studie wurden diese beiden wichtigen Voraussetzungen gewahrt.

Das Mausmodell der OIR reproduziert verlässlich die definierten Krankheitsmerkmale der Vasoobliteration (Phase I der ROP) und der pathologischen Neovaskularisation (Phase II der ROP) und auch häufig vorkommende Komplikationen wie vaskuläre Leckagen, die während der Entwicklung der humanen ROP beobachtet werden (Chen & Smith 2007, Connor et al 2009, Sapieha et al 2010, Smith et al 1994, Stahl et al 2010b). In Phase I werden unreif geborene Babys, verglichen mit den intrauterin vorherrschenden Verhältnissen, einer hyperoxischen Umwelt ausgesetzt (Singer & Mühlfeld 2007). Dies wird im Modell durch das fünftägige Halten der Mäuse bei 75% Umgebungssauerstoff nachempfunden (Smith et al 1994, Stahl et al 2010a, Stahl et al 2010b). Die Hyperoxie führt sowohl in der OIR wie auch in der ROP zur retinalen Vasoobliteration und dem Einstellen der normalen Blutgefäßentwicklung (Ashton 1966, Penn et al 1994, Smith et al 1994). Die zweite Phase zeichnet sich durch Gewebshypoxie der avaskulären Retina und nachfolgender Hochregulierung pro-angiogener Faktoren aus (Stahl et al 2010a). Das Mausmodell bildet diese reaktive retinale Angiogenese der ROP ebenfalls durch die vergleichbare Bildung funktioneller Netzhautgefäße und pathologischen retinalen Neovaskularisationen ab (Connor et al 2009, Smith et al 1994). Der Grad der Ausprägung der Neovaskularisation wird bestimmt von dem Grad der Vasoobliteration. Das gilt gleichermaßen für die ROP und die OIR (Flynn 1987, Stahl et al 2010b). Gemein ist der ROP und der OIR ebenfalls der Einfluss postnataler Gewichtsentwicklung auf die Schwere der ausgeprägten Pathologie (FortesFilho et al 2009, Hellström et al 2009, Hellström et al 2010, Löfqvist et al 2006, Löfqvist et al 2009, Stahl et al 2010a).

Im Mausmodell der OIR stellt sich zuverlässig eine komplette Revaskularisation und Tuft-Regression ein (Smith et al 1994). Auch bei den meisten ROP-Patienten revaskularisiert die entstandene avaskuläre Retina erfolgreich. In schwerwiegenden Fällen jedoch – in der Regel viel zu früh geborene Babys mit kaum ausgeprägter retinaler Vaskularisation – kann es zu persistierenden Neovaskularisationen kommen (Stahl et al 2010b), die, wenn sie unbehandelt bleiben, zu Sehschwächen bis hin zur kompletten Erblindung der Kinder führen können (Mechoulam & Pierce 2003).

Bezüglich der Darstellung molekularer Vorgänge während beider Phasen der neovaskulären Augenerkrankung, der Definition von Mechanismen, die zu physiologischer Blutgefäßentwicklung und auch der Entwicklung abnormaler Blutgefäße führen, und der Beurteilung potentieller neuer Therapieansätze hat sich das Mausmodell der OIR als sehr wertvoll erwiesen (Chen & Smith 2007, Connor et al 2009, Sapieha et al 2010). Es ist gut

charakterisiert und standardisiert (Connor et al 2009). Dieses sicher reproduzierbare, quantifizierbare und kostengünstige Tiermodell reflektiert die retinale Blutgefäßentwicklung und Neovaskularisation und trägt somit effektiv zur Aufklärung der Pathophysiologie von proliferativen Retinopathien bei (Smith et al 1994). Die Übertragbarkeit der durch das Mausmodell der OIR gewonnen Erkenntnisse auf die ROP des Menschen ist somit zu einem hohen Grad gegeben. Es leistet einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von angiogenen Pathomechanismen, die einigen der schwerwiegendsten Visus-bedrohenden Erkrankungen des Menschen zugrunde liegen (Stahl et al 2010b).

1.7. Das Komplementsystem

1.7.1. Das Komplementsystem – Ein leistungsstarker Teil des angeborenen Immunsystems

Das Komplementsystem stellt einen leistungsstarken Arm des angeborenen Immunsystems dar (Jacob et al 2010a) und ist involviert in wichtige Prozesse wie Angiogenese, Entzündung, Gewebsschädigung und -regeneration (Ricklin et al 2010). Es gilt als einer der ersten Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems und ist wichtig für Gewebshomöostase und die Modifikation des erworbenen Immunsystems (Walport 2001a, Walport 2001b). Die vielfältigen klassischen immunologischen Aufgaben umfassen die Eliminierung eingedrungener Erreger, die Beseitigung von Immunkomplexen, die Kontrolle entzündlicher Reaktionen, Chemotaxis, Immunzellaktivierung und Erkennung und Abbau nichtfunktionsfähiger oder toter Eigenzellen (Ricklin et al 2010, Sivaprasad & Chong 2006). Zudem wird die Blutgefäßpermeabilität, die Entstehung von Sauerstoffradikalen und die Bildung von Zytokinen vom Komplementsystem beeinflusst (Guo & Ward 2005, Jacob et al 2011, Mahajan et al 2015).

Das Komplementsystem wird oft als "zweischneidiges Schwert" bezeichnet (Zipfel & Skerka 2009), da es zwar für Gesundheit sorgt, aber unter Umständen auch selbst krankheitsauslösend wirken kann. Normalerweise stellt die Komplementkaskade einen Schutzmechanismus dar, bei übermäßiger Aktivierung kann sie allerdings auch schädlich auf den Organismus wirken (Barnum 2002, Tenner & Fonseca 2006, Zipfel & Skerka 2009). Im Rahmen von zahlreichen pathologischen Zuständen nimmt das Komplementsystem eine ausgleichende Funktion zwischen Schädigung und Schutz ein (Alawieh et al 2015). Es zeichnet sich in seiner Aktivität durch Stress beeinflussbar (Eslamloo et al 2014) und eine gewissen Schnelllebigkeit aus (Ivanovska et al 1995, Ricklin et al 2010, Thompson & Winterborn 1981).

Das Komplementsystem besteht aus mehr als 30 Serumproteinen, membrangebundenen Rezeptoren und regulatorischen Proteinen (Dunkelberger & Song 2010, Ricklin et al 2010, Sivaprasad & Chong 2006, Zipfel & Skerka 2009). Wie wichtig die Restriktion der Komplementaktivität ist, reflektiert die große Anzahl an Komplementregulatoren, die die Zahl der an der Komplementkaskade beteiligten Faktoren deutlich übersteigt (Zipfel & Skerka 2009). Die Komplementkaskade umfasst vier wesentliche Schritte: den Beginn der Komplementaktivierung, die Aktivierung und Verstärkung der Komplementfaktor (Complement factor, C) 3-Konvertase, die Aktivierung der C5-Konvertase und den terminalen Komplementpfad bzw. den Aufbau des terminalen Membranangriffskomplexes C5b-9 (Membrane attack complex, MAC; auch bekannt als Terminal complement complex, TCC) (Zipfel & Skerka 2009) (Abb. 7). Während die Komplementproteine im Sinne ihrer vielfältigen Aufgaben ubiquitär im ganzen Körper verteilt sind, geschieht ihre Aktivierung gezielt lokal (Zipfel & Skerka 2009). Dabei gibt es drei Haupt-Aktivierungspfade (Pathways): den klassischen, den alternativen und den Lektin-Pfad (Dunkelberger & Song 2010, Ricklin et al 2010, Sivaprasad & Chong 2006, Xu & Chen 2016) (Abb. 7). Während der alternative Pathway spontan und stetig aktiviert ist ((Pangburn & Müller-Eberhard 1984) zitiert nach (Zipfel & Skerka 2009)), werden die anderen beiden erst nach Kontakt mit speziellen Oberflächenstrukturen aktiviert. Im Falle des klassischen Pathways handelt es sich dabei vor allem um Antigen-Antikörper-Immunkomplexe (Dunkelberger & Song 2010). Der Lektin-Pathway wird durch Kohlenhydratstrukturen auf mikrobiellen Oberflächen aktiviert (Degn et al 2007, Fujita 2002). Alle drei Pfade münden in den Aufbau des ersten Enzyms der Kaskade, der C3-Konvertase, die das zentrale Komplementprotein C3 in C3a und C3b spaltet (Zipfel & Skerka 2009) (Abb. 7). C3a fördert die Rekrutierung und Aktivierung von Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, wie zum Beispiel Monozyten und Makrophagen (Zipfel & Skerka 2009). C3b ist zum einen beteiligt an dem Aufbau der C5-Konvertase (Pangburn & Rawal 2002) und ist zum anderen für die Opsonisierung, also die Markierung, mikrobieller oder apoptotischer Oberflächen zuständig, damit diese phagozytiert werden können (Zipfel & Skerka 2009) (Abb. 7). Die C5-Konvertase spaltet C5, setzt so das starke Anaphylatoxin C5a frei und bildet C5b (Zipfel & Skerka 2009) (Abb. 7). C5b eröffnet den terminalen Komplementpfad, an dessen Ende der Membranangriffskomplex bestehend aus C5b, C6, C7, C8 und C9 (abgekürzt C5b-9) steht, der dann durch Porenbildung direkt zur Lyse und Tod der Zielzelle führt ((Dunkelberger & Song 2010, Morgan 1999), (Müller-Eberhard 1986) zitiert nach (Zipfel & Skerka 2009)) (Abb. 7). Die Haupteffektoren des Komplementsystems stellen demnach Anaphylatoxine (C4a/C3a/C5a), der Membranangriffskomplex und Opsonine (z.B. C3b) dar (Dunkelberger & Song 2010).



Abb. 7 Schematische Darstellung der Komplement-Aktivierung und Immunregulierung nach Xu et al. (Xu & Chen 2016).

Das Komplementsystem kann über den klassischen Komplementpfad (*Classical Pathway*), den Mannose-bindenden Lektin (MBL) Komplementpfad (*MBL Pathway*) und den alternativen Komplementpfad (*Alternative Pathway*) aktiviert werden. Alle drei Pfade führen zur Spaltung von C3 durch die C3-Konvertase (*C3 Convertase*) und C5 durch die C5-Konvertase (*C5 Convertase*) und zur Bildung des terminalen Membranangriffskomplexes (C5b-9). Die Aktivierung des Komplementsystems generiert die Komplement-Spaltprodukte (*Complement Fragments*) C4a, C3a und C5a, die aktiv an der Immunantwort beteiligt sind (*Inflammation*); C3b markiert fremde Antigene und apoptotische Zellen und fördert somit deren Phagozytose (*Opsonisation*). C3a und C5a sind Anaphylatoxine mit zahlreichen immunregulatorischen Funktionen (vgl. *Inflammation*). C5b-9 kann Pathogene oder Zellen direkt zerstören (*1*) *Lysis*); der sub-lytische C5b-9 Komplex kann auch Entzündungsreaktionen fördern (*2*) *inflammation*).

Komplementregulatoren agieren auf allen Ebenen und kommen sowohl in gelöster Form als auch auf Zelloberflächen oder in Form von Membran-integrierten Komplementrezeptoren vor (Zipfel & Skerka 2009). Einige Komplementregulatoren haben noch zusätzliche nicht direkt immunologische Fähigkeiten, wie die Vermittlung von Zelladhäsion (beispielsweise die Adhäsion Neutrophiler an Endothelzellen) (Foreman et al 1996, Zipfel & Skerka 2009). Zu den gelösten Komplement-Regulatoren gehören C1q und Properdin (Zipfel & Skerka 2009).

C1q bindet an apoptotische Oberflächen und aktiviert den klassischen Komplementpfad (Perry & O'Connor 2008, Zipfel & Skerka 2009). Es spielt eine wichtige Rolle in der körpereigenen Immunabwehr und bei der Beseitigung von Immunkomplexen (Perry & O'Connor 2008, Zipfel & Skerka 2009). Das Aktivator-Protein Properdin (auch als Faktor P bekannt) bewirkt lokal den Aufbau und die funktionelle Stabilisierung der C3-Konvertase des alternativen Pathways (Hourcade 2008, Kemper & Hourcade 2008, Spitzer et al 2007, Zipfel & Skerka 2009). Zudem kann Properdin wie C1q direkt an apoptotische Oberflächen binden und so an mikrobiellen Oberflächen eine direkte Komplement-Aktivierung hervorrufen (Spitzer et al 2007). Der Komplementrezeptor C3R (auch bekannt unter CD11b-CD18 oder Makrophagen-Antigen-1, MAC-1) kommt unter anderem auf Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und myeloiden Zellen vor ((Springer et al 1979) zitiert nach (Zipfel & Skerka 2009)). C3R bindet das Opsonin (i)C3b, was zu einer C3b-vermittelten Adhäsion und Phagozytose der Zielstruktur führt ((Springer et al 1979) zitiert nach (Zipfel & Skerka 2009), (Zipfel & Skerka 2009)). Der Komplementrezeptor C3R wird in seinem Vorkommen und seinen Funktionen ausführlich in Abschnitt **1.8** beschrieben.

Die anaphylaktischen Fragmente C3a und C5a reflektieren die akute systemische Komplementaktivierung (Scholl et al 2008). Beide Anaphylatoxine vermitteln über die Komplementrezeptoren C3aR, C5aR (auch bekannt als CD88) und C5L2 (*C5a receptor-like-*2) ihre immunologischen Wirkungen der Immunzellrekrutierung und Entzündungsförderung (Bénard et al 2008, Rittirsch et al 2008, Ward 2009, Zipfel & Skerka 2009). Aktuell ist noch unklar, ob der erst kürzlich beschriebene, von Makrophagen und Neutrophilen exprimierte C5L2-Rezeptor die C5a-vermittelten Effektor-Funktionen ausübt oder diese abschwächt (Rittirsch et al 2008, Scola et al 2009, Ward 2009). C3aR wird unter anderem von Neutrophilen, Monozyten, Astrozyten, Neuronen und Glia-Zellen exprimiert (Bénard et al 2008, Zipfel & Skerka 2009), C5aR unter anderem von myeloiden Zellen, Monozyten, Neutrophilen und Endothelzellen (Gasque et al 1997, Köhl et al 2006, Rittirsch et al 2008, Ward 2009). C3aR, und C5L2 erfahren eine fast ubiquitäre Expression durch ihre zusätzliche Präsenz auf epithelialen, endothelialen und parenchymalen Zellen (Haviland et al 1995, Mahajan et al 2015).

Vor allem C5a/ C5aR nehmen im gesamten Körper eine zentrale Stellung bei entzündlichen Geschehen ein. Bei Alveolar-Makrophagen konnte eine Entzündungs-assoziierte erhöhte Expression von C5aR beobachtet, die als Folge das Phagozytose-Potential erhöhen könnte (Hu et al 2014). Dafür spricht ebenfalls die Beobachtung, dass C5a generell zu einer erhöhten Expression von dem Phagozytose-vermittelnden Komplementrezeptor C3R führt (Monk & Banks 1991, Monk et al 1994). Es gibt Hinweise, dass Kupffer-Zellen, die Makrophagen der Leber, durch Rezeptorbindung von C5a direkt zur Zellproliferation stimuliert werden können (Mastellos et al 2001). Für Neutrophile und Monozyten stellt C5a

ein starkes Chemotoxin dar. Es hat die Fähigkeit das Anlagern an die Blutgefäßwand und den Übertritt aus dem Blutgefäß in das Gewebe, sowie die Aktivierung dieser Zellen zu fördern (Ikeda et al 1997, Romay-Penabad et al 2007). In aktuellen Studien zur akuten Lungenschädigung (*Acute lung injury*, ALI) konnte gezeigt werden, dass die direkte C5avermittelte Zellaktivierung bei Neutrophilen und Makrophagen zur Produktion von proinflammatorischen Faktoren und verschiedenen Chemokinen führt (Bosmann & Ward 2012, Sun et al 2011). C5a führt ebenfalls zur VEGF-Produktion verschiedener C5aR-positiven Zellen (Cheng et al 2013). Zudem konnten sowohl pro- als auch anti-apoptotische C5a-Wirkungen beobachtet werden (Farkas et al 1998, Flierl et al 2008a, Guo et al 2004, Jacob et al 2010a, Niculescu et al 2004, Osaka et al 1999b, Ward 2008). Es mehren sich also die Hinweise darauf, dass C5a als eines der zentralen Komplementproteine einen beträchtlichen Einfluss auf das immunologischen Geschehen im Rahmen von wichtige Prozessen wie Entzündung, Gewebeschädigung und -regeneration hat.

1.7.2. Die extraimmunologischen Aufgaben des Komplementsystems

Jüngste Forschungsergebnisse konnten demonstrieren, dass die Komplementkaskade zusätzlich zu ihren bereits lange bekannten immunologischen Funktionen – ebenfalls in eine Vielzahl wichtiger physiologischer und pathophysiologischer Prozesse involviert ist (Rutkowski et al 2010). Dazu gehören vor allem Prozesse der embryonalen und postnatalen Entwicklung und der Gewebsregeneration in einer Vielzahl von Organen (Rutkowski et al 2010). Zu den Komplement-vermittelten Entwicklungsprozessen gehören beispielsweise die Bildung und das Erhalten von Nervenzellen, die Zellmigration, das Anwachsen von hämatopoetischen Stammzellen im Zielgewebe, die Knochenentwicklung, die Angiogenese (Benoit & Tenner 2011, Bénard et al 2008, Rutkowski et al 2010, Shiniyo et al 2009) und die Entwicklung und Eliminierung von Synapsen (Stevens et al 2007) (vgl. auch Abschnitt 1.7.3). Rutkowski et al. beschreibt in einem Review-Artikel sehr übersichtlich wie die Komplementproteine direkt an verschiedenen Zellaustausch-, Heilungs-, Proliferations- und Regenerationsprozessen beteiligt sind (Rutkowski et al 2010). In der Abwesenheit von Entzündungsprozessen sorgen die Komplementproteine zudem für die Unversehrtheit der Gewebe und unterstützen die Beseitigung von Zelltrümmern, um das Ausbrechen von Autoimmunerkrankungen zu verhindern (Rutkowski et al 2010). Verschiedene in vivo und in vitro Studien konnten zeigen, dass Komplementproteine einen starken Reiz bezüglich zellproliferativer Regenerationsvorgänge in Gliedmaßen (Del Rio-Tsonis et al 1998, Kimura et al 2003), im Auge (Kimura et al 2003) und in der Leber (Markiewski et al 2004, Mastellos et al 2001, Strey et al 2003) ausüben können. Alle diese Mechanismen stehen nicht in Zusammenhang mit der Immunantwort, sondern stellen eine wichtige funktionelle

Erweiterung des Komplementsystems dar.

1.7.3. Die Rolle des Komplementsystems im zentralen Nervensystem

Die allgemeingültigen Funktionen der Komplementproteine können zu großen Teilen analog auf das zentrale Nervensystem (ZNS) übertragen werden (vgl. Abschnitt 1.7.1 und 1.7.2). Die Blut-Hirn- bzw. Blut-Retina-Schranke schützt normalerweise das neuronale Gewebe vor dem Eindringen von Plasma-Komplementproteinen und Immunzellen. Die lokale Synthese von Komplementproteinen ist deshalb im zentralen Nervensystem besonders wichtig, um im Falle von Gewebsschädigung und/ oder entzündlichem Geschehen angemessen reagieren zu können und für lokale Abwehr, Neuroprotektion und Homöostase zu sorgen (Stephan et al 2012, Veerhuis et al 2011). Sowohl im gesunden ZNS (einschließlich des in der Entwicklung/ Ausreifung befindliche ZNS), als auch im geschädigten ZNS stellen Mikrogliaund Astrozyten die Hauptkomplementguellen dar, wobei auch Neurone Zellen Komplementproteine synthetisieren (Barnum 1995, Veerhuis et al 2011, Woodruff et al exprimieren hohe Mengen an C1q und 2010). Mikroglia-Zellen sowie die Komplementrezeptoren 3 und 5 (Stephan et al 2012, Veerhuis et al 1999). Diese Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Phagozytose Komplement-markierter Strukturen und regulieren Chemokin-Signale und Immunzell-Chemotaxis (Stephan et al 2012, Veerhuis et al 1999) (vgl. Abschnitt **1.7.1**). Astrozyten hingegen exprimieren vor allem C3, aber auch noch weitere Komplementproteine (Cahoy et al 2008, Lévi-Strauss & Mallat 1987). Ihre Komplementprotein-Synthese können die Nervenzellen im Falle von Gewebsschädigung hochregulieren (Veerhuis et al 2011).

Der Komplementfaktor C5a hat auch im ZNS chemotaktische Eigenschaften und kann hier zu der Rekrutierung von Mikroglia-Zellen und Astrozyten beitragen (Armstrong et al 1990, Yao et al 1990). Für C5a sind sowohl Nervenzell-schützende (Mukherjee et al 2008, Niculescu et al 2003) als auch -schädigende (Fonseca et al 2009, Jacob et al 2010b) Eigenschaften beschrieben. Eine Komplementinhibierung führte in einer Studie von Alawieh et al. zu weniger Aktivierung von Makrophagen/ Mikroglia-Zellen und zu weniger Astrogliose (Alawieh et al 2015). Reaktive Astrozyten, Mikroglia-Zellen und auch Endothelzellen zeigen eine erhöhte Expression von C5a-Rezeptor (Gasque et al 1997), im Falle der Endothelzellen geht dies mit einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke einher (Gasque et al 1997). Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass C5a die Integrität der Blut-Hirn-Schranke negativ beeinflusst (Jacob et al 2011, Jacob et al 2010b, Mahajan et al 2015). C5a löst über seinen Rezeptor C5aR strukturelle Veränderungen in Endothelzellen aus (Jacob et al 2011, Jacob et al 2010b), die zu einer erhöhten Permeabilität, Zellaktivierung und sogar zu Apoptose führen können (Jacob et al 2011). Die dadurch bedingte Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke

kann durch C5a- oder C5aR-Inhibierung gemildert werden (Jacob et al 2010b). Der C5a-Rezeptor konnte bisher nicht nur auf Endothelzellen, sondern auch auf einer Reihe verschiedener retinaler Zellen nachgewiesen werden. Dazu zählen die Zellen des retinalen Pigmentepithels, Müller-Zellen, Astrozyten und Neurone (Cheng et al 2013, Dong et al 2015, Gasque et al 1997, Hu et al 2011, Jacob et al 2010b). Die Expression des C5a-Rezeptors wird im Rahmen von entzündlichen Geschehen und/ oder Zellaktivierung erhöht (Cheng et al 2013, Gasque et al 1997, Jacob et al 2010b).

Eine erhöhte Komplementexpression konnte ebenfalls während der Ausreifung des zentralen Nervengewebes beobachtet werden. Vor allem die Komplementproteine des klassischen Pathways scheinen an der postnatalen neuronalen Entwicklung beteiligt zu sein (Stephan et al 2012, Stevens et al 2007). In der postnatalen Phase findet im ZNS eine Umgestaltung der synaptischen Verschaltungen statt (Hua & Smith 2004, Huberman et al 2008, Katz & Shatz 1996). Im Mausauge findet der Großteil dieser Umgestaltung statt, bevor das Sehen beginnt, aber hält noch an, nachdem sich die Augen geöffnet haben (insgesamt über den Zeitraum von postnatalen Tag 8 bis 30 bei der Maus) (Stevens et al 2007). Während dieser entscheidenden postnatale Entwicklungsphase konnte sowohl eine zeitliche und räumliche Assoziation der Synapsen zu unreifen Astrozyten und als auch zu den Komplementproteinen C1q und C3 beobachtet werden (Allen & Barres 2005, Bolton & Eroglu 2009, Eroglu & Barres 2010, Stephan et al 2012, Stevens et al 2007). Die genauen Abläufe und Zusammenhänge des Prozesses der Ausreifung der synaptischen Verschaltungen sind aktuell noch nicht hinreichend geklärt (Eroglu & Barres 2010, Stevens et al 2007). Es wird angenommen, dass über ein noch unbekanntes Signal der unreifen Astrozyten die sensorischen Neurone der Netzhaut (retinale Ganglienzellen) zu einer Hochregulierung von Komplementproteinen angeregt werden (Eroglu & Barres 2010, Stephan et al 2012, Stevens et al 2007). Der C1-Komplex führt dann über die Aktivierung des klassischen Komplementpfades zur C3-Spaltung (Stephan et al 2012). C3b-markierte schwächere Synapsen können dann von aktivierten Makophagen/ Mikroglia-Zellen über die C3R-C3bzw. CD11b/CD18-abhängige Phagozytose eliminiert werden (Eroglu & Barres 2010, Stephan et al 2012) (vgl. Abb. 8). Mikroglia-Zellen, die gewebsständigen Phagozyten des zentralen Nervensystems, sind die einzigen gewebsständigen Zellen des ZNS, die diesen C3- bzw. CD11b/CD18-Rezeptor exprimieren (Graeber 2010, Guillemin & Brew 2004, Ransohoff & Perry 2009, Zipfel & Skerka 2009). Diese frühe Entwicklungsphase stellt ein Beispiel für den funktionellen Zusammenhang bzw. Abhängigkeit zwischen dem Komplementsystem und CD11b-positiven Zellen dar. Dass das Synaptic pruning allerdings nicht allein von dem klassischen Komplementpfad abhängig zu sein scheint, sondern auch Komplement-unabhängige Synapsen-Eliminierung existiert, zeigt die Beobachtung von

Stevens et al., dass C1q- und C3-Knock-out-Mäuse trotzdem noch ein beachtliches Maß an Synapsen-Eliminierung zeigen (Stevens et al 2007).



Abb. 8 Schematische Darstellung der Komplement-vermittelten Ausreifung der synaptischen Verschaltungen (*Synapse elimination*) während der Entwicklungsphase des zentralen Nervensystems modifiziert nach Ricklin et al. (Ricklin et al 2010).

Ein bisher unbekanntes Signal (?) unreifer Astrozyten (*Immature astrocyte*) führt zur Erkennung schwacher oder ungeeigneter Synapsen (*Weak or inappropriate synapse*) durch den Komplementfaktor 1q (*C1q*), der zur C3b-Markierung der entsprechenden Synapse führt; im Anschluss erfolgt die C3b-Komplementrezeptor (*CR*)-vermittelte Phagozytose durch aktivierte Mikroglia-Zellen (*Phagocytic microglia*). C3b, Komplementfaktor 3b.

1.7.4. Das Komplementsystem und die retinale Neovaskularisation

Die Komplementrezeptoren C3aR und C5aR werden von vaskulären Endothelzellen sowohl unter normalen als auch unter entzündlichen Bedingungen exprimiert. Das gilt für murine und humane Endothelzellen gleichermaßen (Haviland et al 1995). Die C5a-Bindung an seinen typischen Endothelzell-Rezeptor führt Entzündungseffekten zu wie erhöhte Blutgefäßpermeabilität, erhöhte Expression von Zelladhäsionsmolekülen und einer verstärkten Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten (Guo et al 2004, Ikeda et al 1997, Langkabel et al 1999); aber auch zu einer erhöhten Produktion von Sauerstoffradikalen und Zytokinen, die über Blutgefäßschädigung bis hin zur Zellnekrose oder Apoptose führen kann (Albrecht et al 2004, Guo et al 2004). Neben seiner proinflammatorischen Funktion, hat C5a demnach auch blutgefäßschädigende Eigenschaften.

In einem Mausmodell für altersbedingte Makuladegeneration (AMD) (Mausmodell der Laserinduzierten choroidalen Neovaskularisation, CNV) konnte beobachtet werden, dass C3a und C5a die Expression von VEGF nicht nur *in vivo* sondern auch *in vitro* induzieren (Nozaki et al 2006). Entgegen dieser Beobachtung konnte in einem Mausmodell für Schlaganfall nach Inhibierung des alternativen Komplementpfades ebenfalls eine erhöhte VEGF-Expression festgestellt werden (Alawieh et al 2015).

Studien zum Komplementeinfluss auf die retinale Neovaskularisation haben zu verschiedenen Ergebnissen geführt. Während mit dem Modell der Laser-induzierten choroidalen Neovaskularisation eine pro-angiogene Komplementfunktion in Verbindung gebracht wird (Anderson et al 2010, Bora et al 2005, Nozaki et al 2006), brachten zwei andere Studien (ein Mausmodell für ROP und ein Mausmodell für plazentaren Dysfunktion) hervor, dass es durchaus auch eine anti-angiogene Wirkung besitzt (Girardi et al 2006, Langer et al 2010).

Zu der Thematik Komplementsystem und retinale Neovaskularisation liegt eine sehr interessante Studie von Langer et al. vor (Langer et al 2010). Diese Studie konnte mit Hilfe des Mausmodells der Sauerstoff-induzierten Retinopathie unter der Verwendung von Hämatoxilin-Eosin-gefärbten Schnittpräparaten zeigen, dass das Komplementsystem als negativer Regulator pathologischer Neovaskularisation im Rahmen von vasoproliferativen Retinopathien fungiert. Gleichzeitig gewonnene in vitro-Daten unterstützen diese Ergebnisse zusätzlich. Genmodifizierte C3- und C5aR-defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte retinale Angiogenese (Langer et al 2010). Langer et al. konnten feststellen, dass dieser beobachtete anti-angiogene Komplementeffekt auf das Blutgefäßendothel auf die Präsenz von Makrophagen angewiesen war, also scheinbar Makrophagen-vermittelt stattfand (Langer et al 2010). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass vor allem C5a eine bedeutende Rolle in diesem Zusammenhang spielt, indem es Makrophagen gemessen an ihrem Zytokin-Sekretionsmuster hin zu einem proinflammatorischen Phänotyp, der auch als Angiogeneseinhibierender Phänotyp angesehen wird, polarisierte (Langer et al 2010). Unterstützt wird diese Behauptung durch die in vitro-Studienergebnisse von Girardi et al., die zeigen konnten, dass Monozyten bzw. Makrophagen unter der Einwirkung von C5a erhöhte Mengen an soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sVEGFR1), einem anerkannten Angiogenese-Inhibitor, sezernieren (Girardi et al 2006).

Nach aktuellen Erkenntnissen spielt bei der Bildung der pathologischen retinalen Neovaskularisation also vor allem die C5a-C5aR-Achse eine bedeutende Rolle (Langer et al 2010). Ebenfalls im Rahmen des Mausmodells der OIR konnte gezeigt werden, dass der klassische Pathway des Komplementsystems hingegen die Regression der retinalen Neovaskularisationen fördert (Sweigard et al 2014). Dabei stellt der klassische Pathway eine

Art Schutzmechanismus der Autoimmunität dar, indem er den Organismus unterstützt zwischen pathologischen Neovaskularisationen und dem physiologischen Blutgefäßnetz zu unterscheiden (Sweigard et al 2014). Das Ausmaß der retinalen Neovaskularisation im Mausmodell der OIR unterliegt nach den aktuellen Erkenntnissen dem Einfluss des Komplementsystems.

1.8. Die CD11b-positiven Zellen – Eine Zellpopulation mit vielfältigen Funktionen

1.8.1. Der Komplement-Rezeptor 3 – Ein wichtiges Bindeglied zwischen dem Komplementsystem und den retinalen CD11b-positiven Zellen

Der Komplementrezeptor 3 (*Complement 3 receptor*, C3R) ist ein membrangebundenen Glykoprotein (Ross 2000, Solovjov et al 2005) und besteht als transmembranes Heterodimer aus zwei Untereinheiten: einer α -Untereinheit (*Cluster of differentiation* 11b, CD11b) und einer β -Kette (CD18) (Ross 2000, Springer et al 1979, Zipfel & Skerka 2009). Synonym werden deshalb auch die Bezeichnungen CD11b-CD18, α M β 2 Integrin sowie Makrophagen-Antigen-1 (MAC-1) verwendet (Springer et al 1979, Zipfel & Skerka 2009).

C3R wird von Monozyten, Makrophagen (beide Teil des sogenannten mononukleären Phagozytensystems (MPS) (Wiesner & Ribbeck 2000)), myeloiden Zellen, Neutrophilen und anderen Leukozyten exprimiert (Solovjov et al 2005, Springer et al 1979, Zipfel & Skerka 2009) und bindet das inaktivierte C3b (iC3b). Das iC3b verstärkt als Opsonin den Kontakt zu einer markierten Zielstruktur, sodass diese nach Adhäsion C3R-vermittelte phagozytiert werden kann (Springer et al 1979, Zipfel & Skerka 2009). Neben seiner Funktion in der Unterstützung der Phagozytose von opsonisierten Oberflächen, reguliert C3R zudem Zytokin-Antworten, den Übertritt von Leukozyten aus dem Blut in das Gewebe und die Ausbildung von Synapsen (Ricklin et al 2010) (vgl. Abschnitt **1.7.3**).

In der vorliegenden Studie wird für diesen Komplementrezeptor im Folgenden der Begriff "CD11b" verwendet und die Zellen, die diesen Rezeptor exprimieren, dementsprechend als "CD11b-positive Zellen" bezeichnet.

1.8.2. Die Rolle der CD11b-positiven Zellen im zentralen Nervensystem

Bei den CD11b-positiven Zellen des zentralen Nervensystems handelt es sich vor allem um Makrophagen und Mikroglia-Zellen. Makrophagen sind Phagozyten, die aus einer myeloischen Stammzelle (Monoblast) hervorgehen, und ein bis zwei Tage im Blut als

Monozyten zirkulieren, bevor sie in verschiedene Gewebe einwandern und dort zu Makrophagen ausdifferenzieren (Wiesner & Ribbeck 2000). In der Netzhaut, die einen Teil des ZNS darstellt (vgl. Ausführungen in Abschnitt **1.1.2**), werden diese gewebsständigen Makrophagen dann als Mikroglia-Zellen bezeichnet (Wiesner & Ribbeck 2000). Retinale Mikroglia-Zellen sind im Gegensatz zu den Neuronen und anderen Gliazellen, die dem Neuroektoderm entstammen, mesodermalen Ursprungs (Jordan & Thomas 1988). Mikroglia-Zellen überwachen permanent das neuronale Gewebe und reagieren bei Entzündungen, Gewebsdegeneration und/ oder lokalem Gewebeschaden (Aloisi 2001, Kreutzberg 1996, Nakajima & Kohsaka 2004, Rao et al 2003). Ihre vor allem historisch gesehene Hauptaufgabe besteht in der Immunabwehr und in Reparationsvorgängen (Chan et al 2001, Chan et al 2003, Mitrasinovic & Murphy 2002).

Je nach Entwicklungs- und Aktivierungsstatus entwickeln Mikroglia-Zellen verschiedene morphologische und immunologische Eigenschaften (Santos et al 2008, Streit et al 1999). Während der embryologischen und postnatalen Entwicklungsphase zeigen die unreifen Mikroglia-Zellen eine amöboide Form mit lediglich primitiv ausgebildeten Zellfortsätzen (Santos et al 2008). Der Phänotyp der ausgereiften Zellen zeichnen sich durch einen kleinen Zellkörper und deutlich ausgeprägte Ramifizierung aus (Ransohoff & Perry 2009) (vgl. Abb. 9). Entgegen einer veralteten Einschätzung sind diese stationären Zellen keineswegs in einem ruhenden Zustand. Mit ihren langen, stark verzweigten Zellfortsätzen, die sich permanent bewegen, überwachen sie ihre direkte Umgebung (Nimmerjahn et al 2005), weshalb der Ausdruck surveying microglia diese Zellpopulation deutlich besser beschreibt als der in der Literatur nach wie vor viel verwendete Begriff der resting microglia (Hanisch & Kettenmann 2007). Im Falle jeglicher Schädigung des ZNS werden die Mikroglia-Zellen aktiviert (Hanisch & Kettenmann 2007, Kreutzberg 1996). Über einige Zwischenstufen nehmen sie einen den Makrophagen sehr ähnlichen morphologischen Phänotyp an (Cuadros et al 2006, Streit et al 1999) (vgl. Abb. 9). Die Expression von Oberflächenmolekülen wie beispielsweise CD11b wird erhöht und gleicht ebenfalls der von Makrophagen (Dijkstra et al 1985, Stoll & Jander 1999). Zusätzlich zur Mikroglia-Zellaktivierung werden bei ZNS-Schädigung Makrophagen monozytären Ursprungs aus dem Blut rekrutiert (Chen et al 2012, Mildner et al 2007). Es ist somit häufig schwer zwischen aktivierten Mikroglia-Zellen und peripheren Makrophagen zu unterscheiden (Stoll & Jander 1999) weshalb in der Literatur oft der Ausdruck "Makrophagen/ Mikroglia-Zellen" verwendet wird (Santos et al 2008).

Auch über die exprimierten Oberflächen-Antigene ist keine eindeutige Unterscheidung möglich. Entwicklungsgemäß sind Makrophagen und Mikroglia-Zellen eine Reihe von Oberflächenmarker gemein, wie beispielsweise CD11b, *Major histocompatibility complex* (MCH)-I und -II, CD45, *Ionized calcium binding adaptor protein* (Iba)-1 und F4/80 (Cuadros et al 2006, Dijkstra et al 1985, Provis et al 1995, Stoll & Jander 1999, Xu et al 2007). Bis

heute gibt es keinen Zellmarker, der eine eindeutige Unterscheidung ermöglicht (Guillemin & Brew 2004). Je nach Ausmaß der Expression der einzelnen Marker kann zusammen mit der anatomischen Lokalisation und der Morphologie der Zellen im Gewebe aber eine Aussagen darüber getroffen werden, ob es sich wahrscheinlich um eine parenchymale (ramifizierte) Mikroglia-Zelle oder einen aus dem Blut stammenden perivaskulären (kaum oder gar nicht ramifizierten) Makrophagen handelt (Cuadros et al 2006, Dick et al 1995, Xu et al 2007, Zhang et 2005a). werden deshalb oft immunhistochemische al Aktuell Kombinationsfärbungen durchgeführt (vgl. beispielsweise ((Xu et al 2007)).



Abb. 9 Beispiel für die morphologischen Veränderungen der retinalen CD11b-positiven Mikroglia-Zellen im Rahmen des Aktivierungsprozesses ausgelöst durch ein Aktivierungssignal.

Vor der Aktivierung zeigen die Zellen eine hoch verzweigte Morphologie (links, A). Auf ein Aktivierungssignal (z.B. Gewebsschädigung oder entzündliche Prozesse) hin, beginnen sie ihre langen Zellausläufer zurückzuziehen und mitunter neue, kürzere Ausstülpungen zu bilden (rechts, B). Dargestellt sind Beispiele für den ramifizierten (A) und den amöboiden Phänotyp (B) im CD11b-gefärbten retinalen Flachpräparat der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12). Maßstabsbalken entspricht 50 µm. Die Abbildung wurde von der Verfasserin der vorliegenden Dissertation eigenständig angefertigt.

Es gibt einige aktuelle Studien, die sich mit der Mikroglia-Zellentwicklung bei der Maus beschäftigt haben. Die allerersten Mikroglia-Zellen dringen in die Netzhaut während der Embryogenese ein (Diaz-Araya et al 1995, Xu et al 2007). Es wird vermutet, dass die Erstbesiedlung in zwei Phasen abläuft (Diaz-Araya et al 1995): Ein erster Zustrom, der noch vor dem Vorhandensein retinaler Blutgefäße stattfindet (Ashwell 1991, Sorokin et al 1992, Wang et al 1996), und ein zweiter während der Blutgefäßentwicklung der Netzhaut (Cuadros & Navascués 2001). Zwischen dem postnatalen Tag (P)0 und P7 wandern monozytären Vorläuferzellen peripher über Blutgefäße des Ziliarkörpers und zentral über das hyaloide Blutgefäßnetz über den Glaskörper und den Sehnervenkopf in das Netzhautgewebe ein

(Chen et al 2002, Santos et al 2008). Santos et al. konnten in der murinen Retina die höchste Dichte von *lonized calcium binding adaptor protein 1* (Iba-1)-positiven Zellen zum Zeitpunkt P7 feststellen, was vermutlich auf die voran gegangene Mikroglia-Zelleinwanderung zurückzuführen ist. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Zelldichte von P7 zu P14 und von P14 zu P21 jeweils signifikant abnahm (Santos et al 2008).

Nach Abschluss der retinalen Entwicklung, verteilen sich die ausdifferenzierten, ramifizierten Mikroglia-Zellen innerhalb der murinen Netzhaut im Wesentlichen auf zwei horizontale Schichten (Fischer et al 2011): Die innere Mikroglia-Schicht, die sich über die Nervenfaserschicht (NFL), die Ganglienzellschicht (GCL) und die innere plexiforme Schicht (IPL) erstreckt und die äußere Mikroglia-Schicht befindet sich in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) (Fischer et al 2011). Selten werden Mikroglia-Zellen auch in der inneren nukleären Schicht (INL) beobachtet; in der äußeren nukleären Schicht (ONL) kommen keine Mikroglia-Zellen vor (Santos et al 2008). Einige Studien konnten zeigen, dass diese normale typische Zellverteilung im Rahmen von Netzhauterkrankungen und der damit verbundenen Zellaktivierung und erhöhter Lokomotion durchaus beeinflusst wird (Chen et al 2002, Roque et al 1996, Santos et al 2008, Stence et al 2001). Die Ramifizierung der Mikroglia-Zellen ist in den plexiformen Schichten stärker ausgeprägt, innerhalb Zellkern-beinhaltenden Schichten zeigen sie eine eher kompakte Form auf (Santos et al 2008). In allen Schichten stehen die Mikroglia-Zellen oft in enger Verbindung mit Blutgefäßen was auf eine Interaktion zwischen Mikroglia- und vaskulären Zellen schließen lassen könnte (Fischer et al 2011) (vgl. Abschnitt **1.8.3**).

Genau wie Makrophagen (Nathan 1987) sind aktivierte Mikroglia-Zellen in der Lage potentiell schädliche lösliche Faktoren (z.B. Sauerstoffradikale) oder (potentiell) schädliche inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)-α oder Interleukin (IL)-1 freizusetzen (Banati et al 1993, Kreutzberg 1996, Renno et al 1995, Stoll & Jander 1999). Diese freigesetzten Entzündungsfaktoren können, wie auch das aktivierte C5a (Hu et al 2014, Romay-Penabad et al 2007), eine Infiltration neutrophiler Zellen auslösen, die "am Ort des Geschehens" noch mehr Entzündungsfaktoren freisetzen (Bosmann & Ward 2012, Flierl et al 2008b, Hu et al 2014, Sun et al 2011). C5a fördert in Marophagen die Aktivierung, Phagozytoseaktivität und die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Hu et al 2014), die wiederrum noch mehr Neutrophile anlocken. So wird vom Organismus eine sehr schnelle, sich selbst verstärkende Immunreaktion ausgelöst mit dem Ziel den physiologischen Zustand so schnell wie möglich wieder herzustellen. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass C5a die Expression von CD11b steigern kann (Kishimoto et al 1989, Monk & Banks 1991, Monk et al 1994), was die erhöhte Phagozytose-Aktivität der CD11b-positiven Zellen nach C5a-Einfluss erklärt. In einem *in vitro* Experiment

konnte darstellt werden, dass Mikroglia-Zellen und Astrozyten von Ratten in Richtung eines C5a-Gradienten wandern (Armstrong et al 1990). Astrozyten und Endothelzellen sind über das Freisetzen des Monocyte chemotactic protein (MCP)-1 und von VEGF in der Lage Monozyten aus dem Blutstrom zu rekrutieren (Berman et al 1996, Clauss et al 1990, Glabinski et al 1996, Leek et al 2000). Sobald die Monozyten das (geschädigte) neuronale Gewebe erreicht haben, differenzieren sie zu gewebsspezifischen Makrophagen (= Mikroglia-Zellen) aus und erhöhen so die retinale Gesamtzahl der CD11b-positiven Zellen (Davies et al 2006, Xu et al 2007). Ob ein Überwinden der Blut-Hirn- bzw. Blut-Retinamonozytären Vorläuferzellen in der Schranke von Abwesenheit eines Entzündungszustandes im Sinne eines Zellaustausches (sogenannter Turnover) von Mikroglia möglich ist, ist aktuell nicht geklärt (Xu et al 2007). Einige Studien konnten eine sehr niedrige Turnover-Rate von mehr als einem Jahr darstellen (Albini et al 2005, Kennedy & Abkowitz 1997, Lassmann et al 1993), eine andere allerdings auch eine relativ hohe über eine Zeitspanne von zwei bis sechs Monaten (Xu et al 2007). Es wird vermutet, dass die Monozyten über die inneren retinalen Blutgefäße in die Netzhaut einwandern (Xu et al 2007). Eine weitere, wenn auch seltene, Möglichkeit der Mikroglia-Populationserneuerung besteht in der in situ Proliferation von gewebsständigen Mikroglia-Zellen (Xu et al 2007).

Makrophagen und Mikroglia-Zellen reagieren prompt auf ischämische Läsionen des zentralen Nervensystems. Stoll et al. haben zu dem Thema eine Übersichtsarbeit veröffentlich. welche die Zusammenhänge zwischen zerebraler Ischämie. Entzündungsreaktion und Gliazell-Antwort umfassend erläutert (Stoll et al 1998). Aufgrund seiner Übertragbarkeit auf die Netzhaut sollen ein Teil der Inhalte des Reviews an dieser Stelle kurz dargestellt werden: Die fokale zerebrale Ischämie wird begleitet von einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (Stoll et al 1998). Der Blutmangel ruft eine starke inflammatorische und Gliazell-Antwort hervor (Stoll et al 1998). Mikroglia-Zellen werden innerhalb von Stunden am Übergang vom Infarktbereich zum normal vaskularisierten Gewebe aktiviert und verwandeln sich innerhalb von Tagen in Phagozyten (Stoll et al 1998). Parallel dazu findet über die geschädigte Blut-Hirn-Schranke ein drastischer Zustrom von hämatogenen Monozyten statt. Aktivierte Mikroglia-Zellen und rekrutierte Makrophagen können dann gemeinsam innerhalb von kurzer Zeit das durch die Ischämie hervorgerufene Zelldebris beseitigen (Stoll et al 1998).

Reaktive mononukleäre Phagozyten können im Anschluss an ischämische Zustände Neurotoxine ausschütten (Giulian et al 1993), die im Falle der Retina zu möglichen dauerhaften Sehschwächen führen können. Allerdings gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass Mikroglia-Zellen auch neurotrophe und/ oder neuroprotektive Moleküle synthetisieren,

die das Überleben der neuronalen Zellen des zentralen Nervensystems fördern (Nakajima & Kohsaka 2004).

1.8.3. Die CD11b-positiven Zellen und die retinale Neovaskularisation

Aktuelle Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass Makrophagen über viele verschiedene und sogar gegenteilige Funktionen verfügen je nach Krankheitsgeschehen, der Mikroumgebung und dem Aktivierungsstatus (Yanai et al 2012). Gegenwärtig gibt es immer mehr Belege, dass bestimmte Subpopulationen der Makrophagen/ Mikroglia-Zellen das retinale Blutgefäßnetz auf unterschiedliche Arten regulieren (Yanai et al 2012). Die genauen Populationen und Prozessabläufe sind noch weitestgehend unbekannt (Yanai et al 2012). Aber es konnte bereits festgestellt werden, dass Mikroglia-Zellen und infiltrierende Monozyten eine Rolle in der Pathogenese der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR) spielen (Yanai et al 2012).

Eine Reihe neuerer Studien konnten im Mausmodell der OIR eine räumliche Nähe von Makrophagen/ Mikroglia-Zellen und retinalen Neovaskularisationen darstellen (Banin et al 2006, Connor et al 2007, Davies et al 2006, Davies et al 2008, Fischer et al 2011, Shen et al 2007). In der Studie von Davies et al. wurde im OIR-Modell ein sehr starker Anstieg einer F4/80-positiven Makrophagen-/ Mikrogliazell-Population mit ihrem Höchststand zwischen P17 und P21 beobachtet (Davies et al 2006). Damit verbunden konnte ebenfalls ein Anstieg des Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) an P17, dem Zeitpunkt der stärksten neovaskulären Ausprägung der OIR (Lange et al 2009), verzeichnet werden (Davies et al 2006). Aufgrund dessen dass zeitgleich keine Mikroglia-Zellproliferation beobachtet werden konnte, wurde der Rückschluss gezogen, dass der Anstieg der F4/80-positiven Makrophagen-/ Mikroglia-Zellen auf eine monozytäre Infiltration zurückzuführen war (Davies et al 2006). Die Untersuchungsergebnisse von Fischer et al. lieferten allerdings klare Hinweise darauf, dass die Mikroglia-Zelldichte im OIR-Modell nicht mit der retinalen Vasoobliteration oder Revaskularisation korreliert (Fischer et al 2011). Stattdessen deutete das beobachtete verstärkte Vorkommen aktivierter Mikroglia in der inneren Schicht zwischen P16 und P18 darauf hin, dass die Aktivierung der Zellen – und nicht die Zelldichte – in Zusammenhang mit der retinalen Neovaskularisation in der hypoxischen Phase der OIR stehen könnte (Fischer et al 2011).

Im OIR-Modell konnte eine reduzierte Zahl von Mikroglia-Zellen in retinalen Bereichen mit mangelhafter Blutversorgung beobachtet werden, was auf eine geänderte Aktivität hinweisen könnte (Vessey et al 2011). Im Gegensatz dazu konnten in ischämischen Netzhäuten eine erhöhte Anzahl an Makrophagen gefunden werden. Diese Makrophagen zeigten sowohl eine räumliche Nähe zu Blutgefäßen, die sich im Wachstum befanden, als auch zu Blutgefäßen,

die sich in der Rückbildung befanden (Shen et al 2007), was die gegensätzlichen Fähigkeiten dieser Zellen bezüglich der Ausbildung des retinalen Blutgefäßnetzes widerspiegelt (Shen et al 2007). An Tumor-assoziierten Makrophagen (*Tumor-associated macrophages*, TAMs) konnte gezeigt werden, dass Makrophagen vermehrt in avaskulärem (Tumor-)Gewebe vorkommen (Leek et al 1999, Murdoch & Lewis 2005, Onita et al 2002). VEGF könnte als Makrophagen-lockender Faktor möglicherweise für die Rekrutierung der TAMs in das hypoxische Gebiet verantwortlich sein (Lewis et al 2000). VEGF fungiert allgemein als starker chemotaktischer Faktor für Makrophagen und Endothelzellen und gilt als Stimulanz der Angiogenese (Ferrara & Davis-Smyth 1997). Die VEGF-Freisetzung durch TAMs lockt noch mehr Makrophagen in die hypoxischen Bereiche was dann den Vaskularisationsprozess zusätzlich beschleunigt (Murdoch & Lewis 2005). Vergleichbare Prozesse könnten auch in den hypoxischen/ avaskulären Bereichen der Retina im Mausmodell der OIR stattfinden.

Im Rahmen der OIR konnten bislang sowohl Hinweise auf pro- als auch auf anti-angiogene Einflüsse von Makrophagen/ Mikroglia-Zellen bzw. Leukozyten beobachtet werden (Checchin et al 2006, Davies et al 2008, Dorrell et al 2010, Ishida et al 2003, Ritter et al 2006, Rivera et al 2013). Seit den späten 1970er Jahren sind die pro-angiogenen Eigenschaften von Makrophagen anerkannt (Crowther et al 2001, Knighton et al 1983, Lingen 2001, Polverini et al 1977, Sunderkötter et al 1991). Makrophagen induzieren Blutgefäßwachstum, in dem sie verschiedene pro-angiogene Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Zytokine, sezernieren und andere Zellen anregen dies ebenfalls zu tun (Lingen 2001). Bei Mikroglia-Zellen konnte beobachtet werden, dass sie ihre Zellfortsätze in Richtung sprießender Blutgefäße ausrichten (Ashwell et al 1989, Pennell & Streit 1997). Eine diesbezügliche Beeinflussung der Angiogenese konnte bisher allerdings noch nicht bewiesen werden (Checchin et al 2006). In einer Studie von Checchin et al. konnte dargestellt werden, dass für eine ordnungsgemäße Ausbildung des retinalen Blutgefäßnetzes eine angemessene Population an gewebsständischen Mikroglia-Zellen benötigt wird (Checchin et al 2006). Reduziertes Blutgefäßwachstum und -dichte konnte künstlich durch eine Chlodronat-vermittelte Mikroglia-Depletion hervorgerufen werden (Checchin et al 2006). Im Rahmen einer ischämischen Retinopathie, kommt es ebenfalls zu einem solchen Rückgang der Mikroglia-Zelldichte (Checchin et al 2006). Welche Mediatoren genau beteiligt sind und wie diese offenbare Interaktion zwischen Mikroglia-Zellen und Endothelzellen vermittelt wird, ist aktuell noch unbekannt (Checchin et al 2006). Ritter et al. konnten im Mausmodell der OIR zeigen, dass Mikroglia-Zellen während der Netzhautentwicklung an der retinalen Vaskularisierung beteiligt sind. Die den OIR-Mäusen intravitreal injizierten Knochenmark-stämmige myeloiden Vorläuferzellen differenzierten sich

in der avaskulären Zone zu Mikroglia-Zellen. Im Vergleich zu den Kontrollmäusen wurden eine erhöhte Revaskularisierungsrate und eine verringerte Ausbildung retinaler Neovaskularisationen beobachtet (Ritter et al 2006). Dass rekrutierte myeloide Zellen das Blutgefäßwachstum auch im Herz- und Lebergewebe beeinflussen können, konnte in einer Studie von Grunewald et al. dargestellt werden (Grunewald et al 2006).

Der Verlust von Mikroglia-Zellen und Astrozyten korreliert direkt mit der Entwicklung retinaler Neovaskularisationen (Dorrell et al 2010). Dorrell et al. konnten im OIR-Modell zeigen, dass geeignete Schutzmaßnahmen zum Populationserhalt der Gliazellen zu einer erhöhten Revaskularisationsrate und einer verringerten retinalen Tuftbildung führten (Dorrell et al 2010). Dadurch dass während der OIR das Ausmaß der avaskulären Zone das Ausmaß der Tuft-Bildung direkt beeinflusst (Stahl et al 2010b) (vgl. auch Ausführungen in Abschnitt 1.3 und 1.4), kann es sein, dass die verringerte retinale Tuftbildung auch nur indirekt über eine Erhöhung der Revaskularisationsrate hervorgerufen wurde. Es scheint als könnten Makrophagen/ Mikroglia-Zellen aber auch über ihre proapoptotischen Fähigkeiten direkt Einfluss auf die Tuft-Regression nehmen (Davies et al 2008). Aktivierte Makrophagen haben die Fähigkeit über die Produktion von TNF- α und weiteren Zytokinen eine Apoptose von Blutgefäßzellen hervorrufen (Ashton et al 2003, Duffield et al 2000, Koizumi et al 2003, Li et al 2003). Genmodifizierte MCP-1-defiziente Mäuse zeigten im OIR-Modell eine verringerte Assoziation zwischen Makrophagen/ Mikroglia-Zellen und retinalen Tufts, eine verminderte Tuft-Apoptose und eine verzögerte Regression der retinalen Neovaskularisationen (Davies et al 2008). Diese Studienergebnisse von Davies et al. deuten darauf hin, dass Makrophagen/ Mikroglia-Zellen sowohl im gesunden und als auch im erkrankten Auge Endothelzell-Apoptose hervorrufen können (Davies et al 2008). Infiltrierte Makrophagen scheinen laut den Ergebnissen einer Vorstudie derselben Arbeitsgruppe weniger an der Tuft-Bildung als viel mehr an deren Regression beteiligt zu sein ((Davies MH, et al. IOVS 2006;47:ARVO E-Abstract 3223) zitiert nach (Davies et al 2008)), d.h. sie agieren bezüglich der retinalen Neovaskularisationen anti-angiogen. Dass der anti-angiogene Einfluss auf die retinale Neovaskularisation der OIR ursprünglich von der C5a-C5aR-Achse des Komplements induziert wird und Makrophagen auch lediglich in einer Vermittlerfunktion agieren können, konnten Langer et al. in einer aktuellen Studie zeigen (Langer et al 2010) (vgl. Ausführungen in Abschnitt **1.7.4**).

All diese Beobachtungen schließen eine pro-angiogene Funktion der Makrophagen/ Mikroglia-Zellen während der frühen Phase der OIR (Checchin et al 2006, Ritter et al 2006) keineswegs aus, sondern zeigen vielmehr das Potential der Makrophagen/ Mikroglia-Zellen viele verschiedene Rollen bezüglich der retinalen Blutgefäßbildung einzunehmen (Davies et al 2008). Bekannt ist, dass Makrophagen anhängig von den jeweiligen äußeren Reizen sowohl pro- als auch anti-angiogene Funktionen ausbilden (Apte et al 2006, Kelly et al 2007, Knighton et al 1983, Langer et al 2010, Polverini et al 1977). Dennoch besteht aktuell noch sehr viel Klärungsbedarf bezüglich der genauen Prozessabläufe und Zusammenhänge.

2. Ziele und Hypothesen der Arbeit

Trotz des bereits vorhandenen Wissens über einzelne Komponenten der Sauerstoffinduzierten Retinopathie bleibt das Verständnis über die Zusammenhänge zwischen Komplementsystem, CD11b-positiver Zellen und retinaler Neovaskularisation – der Auslöser der Frühgeborenenretinopathie – sowie deren mögliche gegenseitige Beeinflussung noch unvollständig. Die vorliegende Studie greift die bisher gewonnenen Erkenntnisse zu der Thematik auf und verfolgt den Zweck, diese um weitere verständnisfördernde Informationen zu erweitern. Dieser Erkenntnisgewinn soll zu neuen therapeutischen Ansatzpunkten auf dem Gebiet der Komplement- und Immunzellbeeinflussung bezüglich der retinalen Angiogenese führen und damit zukünftig eine adäquate kausale Therapie der Frühgeborenenretinopathie ermöglichen.

Das Ziel der Studie im engeren Sinne besteht darin, mit Hilfe des Mausmodells der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR) den Einfluss der C5a-C5aR-Komplementachse auf die retinale Angiogenese und das räumliche Verteilungsmuster der retinalen CD11bpositiven Zellen in Bezug auf die physiologisch und pathologisch vaskularisierten Bereiche der Netzhaut zu untersuchen. Ergänzend soll überprüft werden, ob das verwendete Mausmodell per se zu einer veränderten Komplementaktivität in der Netzhaut führt und ob die retinalen Müller-Zellen aktiv in das Krankheitsgeschehen der OIR involviert sind.

Vor dem gegenwärtigen Stand des Wissens ergeben sich für die vorliegende Studie unter Verwendung des Mausmodells der OIR folgende Arbeitshypothesen:

- **Hypothese 1:** Die C5a-C5aR-Achse des Komplementsystems agiert <u>pro</u>-angiogen bezüglich der Revaskularisierung der avaskulären Fläche und <u>anti</u>-angiogen bezüglich der retinalen Neovaskularisation.
- **Hypothese 2:** Das räumliche Verteilungsmuster der retinalen CD11b-positiven Zellen korreliert mit der Aktivitätszone (= Tuft-Zone) der OIR, wo Tuftregression und Blutgefäßproliferation nebeneinander her ablaufen.
- Hypothese 3: Eine Beeinflussung des Verteilungsmusters der retinalen CD11b-positiven Zellen in der Aktivitätszone der OIR durch C5a-Supplementierung ist möglich.

- **Hypothese 4:** In der Aktivitätszone der OIR kommen vermehrt retinale CD11b-positive Zellen des aktivierten Phänotyps vor.
- **Hypothese 5:** Das verwendete Mausmodell der OIR führt per se zu einer reaktiven Müller-Zell-Gliose, die durch C5a-Supplementierung noch verstärkt wird.
- **Hypothese 6:** Das verwendetet Mausmodell führt per se zu einer Erhöhung der retinalen Komplementaktivität.
- **Hypothese 7:** Im Mausmodell der OIR ist vermehrt der klassische Pathway in der Netzhaut aktiv.
- **Hypothese 8:** Eine Beeinflussung der retinalen Komplementaktivität durch C5a-Supplementierung ist möglich.

Folgende <u>Fragestellungen</u> sollen demzufolge im Rahmen der vorliegenden Studie beantwortet werden:

- 1. Führt die C5a-Supplementierung zu einem verringerten Ausmaß der retinalen Vasoobliteration im Mausmodell der OIR im Vergleich zur Kontrollgruppe?
- 2. Steigert die Inhibierung von C5a mittels NOX-D20 das Ausmaß der retinalen Vasoobliteration im Mausmodell der OIR im Vergleich zur Kontrollgruppe?
- Führt die C5a-Supplementierung zu einer reduzierten retinalen Neovaskularisation im Mausmodell der OIR im Vergleich zur Kontrollgruppe?
- 4. Steigert die Inhibierung von C5a mittels NOX-D20 die retinale Neovaskularisation im Mausmodell der OIR im Vergleich zur Kontrollgruppe?
- 5. Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem quantitativen Verteilungsmuster der retinalen CD11b-positiven Zellen und der Aktivitätszone der OIR?
- 6. Gleicht das Verteilungsmuster des aktivierten Phänotyps der retinalen CD11bpositiven Zellen dem der Gesamt-CD11b-positiven Zellen in der Netzhaut?
- 7. Lässt sich das quantitative Verteilungsmuster der (aktivierten) retinalen CD11bpositiven Zellen in der avaskulären Zone und/ oder in der Aktivitätszone der OIR durch C5a-Supplementierung und/ oder C5a-Inhibierung mittels NOX-D20 beeinflussen?
- Führt das verwendete Mausmodell der OIR zu einer reaktiven Hyperplasie der Müller-Zellen (= Müller-Zell-Gliose)? Ist eine Beeinflussung der Reaktion der Müller-Zellen durch C5a-Supplementierung und/ oder C5a-Inhibierung mittels NOX-D20 möglich?

- 9. Führt das verwendete Mausmodell der OIR per se schon zu einer veränderten retinalen Komplementaktivität? Ist eine Beeinflussung der retinalen Komplementaktivität durch C5a-Supplementierung und/ oder C5a-Inhibierung mittels NOX-D20 möglich?
- 10. Ist im Rahmen des Mausmodells der OIR einer der Komplementpfade klassischer oder alternativer in der Netzhaut vermehrt aktiv?
- 11. Ist eine Beeinflussung der retinalen Komplementaktivität durch C5a-Supplementierung und/ oder C5a-Inhibierung mittels NOX-D20 möglich?

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Elterntiere

Elterntiere	Herkunft
Mäuse des Stammes C57BL/6JRj	Janvier Labs (Saint-Berthevin
(weiblich/männlich), fertil	Cedex/Frankreich)

3.1.2. Geräte

Es sind nur über die Laborgrundausstattung hinausgehende Geräte aufgeführt.

Geräte	Firma
Apo-Tome.2	Zeiss (Jena)
(Strukturierte Mikroskopbeleuchtung)	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,
AxioCam MRm (Mikroskop-Kamera)	Zeiss (Jena)
Axio Imager.M2 (Mikroskop)	Zeiss (Jena)
Centrifuge 5424 (Zentrifuge)	Eppendorf (Hamburg)
Gelkammer	PEQLAB (Erlangen)
Molecular Imager [®] ChemiDoc [™] XRS (Gel-	Bio-Rad (München)
Bildgebung)	
NanoDrop 2000 (Spektralphotometer)	peqlab / Thermo Scientific (Dreieich)
O2 Box (Sauerstoffbox)	Ehret (Emmendingen)
ph 340i (pH-Messgerät)	WTW (Weilheim)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
PowerPac 1000 (Spannungsgeber)	Bio-Rad (München)
Programmable Thermal Controller PTC-100	MJ Research / Biozym (Hess. Oldendorf)
Rotor- <i>Gene</i> Q (Real-Time PCR-Cycler)	Qiagen (Hilden)
Simatic C7-613 V 2.01	Siemens (Berlin und München)
(Automatisierungstechnik Sauerstoffbox)	
Trockenschrank ED 53	Binder (Tuttlingen)
Universal Hood II	Bio-Rad (München)
Vortex Mixer VF2	Janke & Kunkel / IKA-Werk (Staufen)

3.1.3. Gase

Gase	Firma
Luft (druckverdichtet)	Linde (Pullach)
Sauerstoff (druckverdichtet)	Linde (Unterschleißheim)

3.1.4. Injektionslösungen

Injektionslösungen / -bestandteile	Firma
Aqua ad iniectabilia	Braun (Melsungen)
Ketamin-Actavis (Ketamin 50 mg/ml)	Actavis Deutschland (München)
Natriumchlorid 0,9 %	Fresenius Kabi (Bad Homburg v.d.H.)
NOX-D20	NOXXON Pharma AG (Berlin)
PBS Dulbecco	Biochrom AG (Berlin)
Recombinant Mouse C5a	Hycultec Biotec (Uden/Niederlande)
Rompun 2 % (Xylazin 20 mg/ml)	Bayer HealthCare (Leverkusen)

C5a-Stammlösung (0,1 µg/µl)

100 µg Recombinant Mouse C5a Lyophylisat

1000 µl Aqua ad iniectabilia

Injektionslösung 1:2 in PBS Dulbecco (0,05 µg/µl)

NOX-D20-Stammlösung (1 µg/µl)

1000 µg NOX-D20 Lyophylisat

1000 µI Aqua ad iniectabilia

Injektionslösung 1:10 in Aqua ad iniectabilia (0,1 µg/µl)

3.1.5. Stammlösungen und Puffer

4 % Paraformaldehyd (PFA)/ Phosphate buffered saline (PBS) (0,1 mol)

- 4 g PFA
- 50 ml PBS (0,2 mol)

ad 100 ml Aqua dest.

mit Natronlauge klären und

mit Natronlauge und Salzsäure auf pH 7,4 einstellen

4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) (10x) – Stammlösung (30 µM)

27,5 μl DAPI (10,9 mM)

10 ml TBS (1x)

Gebrauchsverdünnung 1:10 in TBS (1x) (DAPI (1x), 3 µM)

Davidson Fixierlösung

ad

ad

ad

12	ml	100 % Essigsäure
22	ml	37 % Formaldehyd
31,5	ml	Ethanol absolut
100	ml	Aqua dest.

TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (50x), pH 8,3

242	g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	(M: 121,14 g)
57,1	ml	Essigsäure 100 %	
100	ml	Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	(0,5 M), pH 8,0
1000	ml	Aqua dest.	

ggfs. mit Natronlauge und Säure auf pH 8,3 einstellen, Gebrauchsverdünnung 1:50 in Aqua dest. (TAE 1x)

Tris-buffered saline (TBS) (10x), pH 7,6

24	g	Tris-Hydrogenchlorid (HCI)	(M: 157,6 g)
5,6	g	Tris-Natriumhydroxid (NaOH)	(M: 121,1 g)
88	g	Natriumchlorid (NaCl)	(M: 58,4 g)
1000	ml	Aqua dest.	

ggfs. mit Natriumhydroxid (= Natronlauge) und Salzsäure auf pH 7,6 einstellen, Gebrauchsverdünnung 1:10 in Aqua dest. (TBS 1x)

3.1.6. Immunreagenzien / Enzyme

Immunreagenzien / Enzyme	Firma
Antikörper Isolection IB₄ von <i>Griffonia</i>	Invitrogen / Life Technologies (Darmstadt)
<i>simplicifolia</i> , Alexa Fluor [®] 488-konjugiert	
Antikörper Ziege anti-Ratte, Cy3-konjugiert	Jackson ImmunoResearch Europe Ldt.
	(Suffolk/ Vereinigtes Königreich)
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI),	Invitrogen / Life Technologies (Darmstadt)
Dilactate	
Monoklonaler Antikörper Ratte anti-CD11b	antibodies-online (Aachen)
Monoklonaler Antikörper Maus anti-Vimentin	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Polyklonaler Antikörper Esel anti-Kaninchen,	Thermo Scientific (Dreieich)
Alexa Fluor [®] 488-konjugiert	
Polyklonaler Antikörper Kaninchen anti-	Dako (Hamburg)
fibrilläres saures Gliaprotein (GFAP)	
Polyklonaler Antikörper Ziege anti-Maus,	Thermo Scientific (Dreieich)
Alexa Fluor [®] 546-konjugiert	
Proteinase K	Dako (Hamburg)
Ziegenserum (normal)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

3.1.7. Chemikalien

Chemikalien	Firma
2-Propanol	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
BlueJuice [™] Gel Loading Buffer (10x)	Invitrogen [™] / Thermo Fisher Scientific
	(Dreieich)
Cytoseal XYL [®]	Richard-Allan Scientific / Thermo
	Scientific (Dreieich)
Dako Pen (Fettstift)	Dako (Hamburg)
Diethyl Pryrokarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich (Steinheim)
(EDTA)	
Eosin G – Lösung 0,5 % wässrig	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure (100 %)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Chemikalien	Firma
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Fluorescence Mounting Medium [®]	Dako (Hamburg)
Formaldehyd Lösung 37 %	AppliChem (Darmstadt)
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl) (MW: 58,44 g/mol)	Roth (Karlsruhe)
Natronlauge (NaOH) (5 mol/l – 5 N)	Merck (Darmstadt)
O'GeneRuler 100 bp, DNA Ladder (0,1 μg/	Thermo Scientific (Dreieich)
µl)	
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt)
Phosphate Buffered Saline (PBS) Tabletten	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Salzsäure (6 mol/L – 6 N)	Roth (Karlsruhe)
SmartLadder SF	Eurogentec (Köln)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Merck (Darmstadt)
(MW: 121,14 g/mol)	
Trizma [®] Hydrochlorid (Tris-HCI) (MW: 157,6	Sigma-Aldrich (Steinheim)
g/mol)	
Trizma [®] Base (Tris-NaOH) (MW: 121,1 g/mol)	Sigma-Chemie (Deisenhofen)
Triton [®] X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Xylol (Isomere)	Roth (Karlsruhe)

3.1.8. Verbrauchsmaterialien

VerbrauchsmaterialenFirmaChirurgische Einmal-SkalpelleBraun / Aesculap (Tuttlingen)Collection Tubes (2 ml)Qiagen (Hilden)Deckgläser (18 x 18 mm)VWR (Darmstadt)Deckgläser (24 x 40 mm)Menzel-Gläser / Thermo Fisher Scientific (Dreieich)Deckgläser (24 x 60 mm)R. Langenbrinck (Emmendingen)Einmal-Injektionskanülen (30G ½" 0,3 x 13 mm)BD (Heidelberg)Einmal-Injektionskanülen (21G x 1½" 0,8 x 40 EinmalpipettenBraun (Melsungen)Einmal-Insulinspritzen-Kanülen-KombinationFalcon TM / Life Sciences (Durham/USA)Einmal-Insulinspritzen-Kanülen-KombinationTerumo (Leuven/Beligien)		
Chirurgische Einmal-SkalpelleBraun / Aesculap (Tuttlingen)Collection Tubes (2 ml)Qiagen (Hilden)Deckgläser (18 x 18 mm)VWR (Darmstadt)Deckgläser (24 x 40 mm)Menzel-Gläser / Thermo Fisher Scientific (Dreieich)Deckgläser (24 x 60 mm)R. Langenbrinck (Emmendingen)Einmal-Injektionskanülen (30G ½" 0,3 x 13)BD (Heidelberg)mm)Einmal-Injektionskanülen (21G x 1½" 0,8 x 40)Braun (Melsungen)mm BL/LB)Falcon [™] / Life Sciences (Durham/USA)Einmal-Insulinspritzen-Kanülen-KombinationTerumo (Leuven/Beligien)U-40 Insulin, 1 ml (26Gx ½", 0,45 x 12 mm)Heidelberg)	Verbrauchsmaterialen	Firma
Collection Tubes (2 ml)Qiagen (Hilden)Deckgläser (18 x 18 mm)VWR (Darmstadt)Deckgläser (24 x 40 mm)Menzel-Gläser / Thermo Fisher Scientific (Dreieich)Deckgläser (24 x 60 mm)R. Langenbrinck (Emmendingen)Einmal-Injektionskanülen (30G ½" 0,3 x 13 mm)BD (Heidelberg)mm)Einmal-Injektionskanülen (21G x 1½" 0,8 x 40 mm BL/LB)Braun (Melsungen)Einmal-Insulinspritzen-Kanülen-Kombination U-40 Insulin, 1 ml (26Gx ½", 0,45 x 12 mm)Falcon [™] / Life Sciences (Durham/USA)	Chirurgische Einmal-Skalpelle	Braun / Aesculap (Tuttlingen)
Deckgläser (18 x 18 mm)VWR (Darmstadt)Deckgläser (24 x 40 mm)Menzel-Gläser / Thermo Fisher Scientific (Dreieich)Deckgläser (24 x 60 mm)R. Langenbrinck (Emmendingen)Einmal-Injektionskanülen (30G ½ 0,3 x 13)BD (Heidelberg)mm)Einmal-Injektionskanülen (21G x 1½ 0,8 x 40)Braun (Melsungen)mm BL/LB)Einmal-Insulinspritzen-Kanülen-KombinationFalcon [™] / Life Sciences (Durham/USA)Einmal-Insulinspritzen-Kanülen-KombinationTerumo (Leuven/Beligien)	Collection Tubes (2 ml)	Qiagen (Hilden)
Deckgläser (24 x 40 mm)Menzel-Gläser / Thermo Fisher Scientific (Dreieich)Deckgläser (24 x 60 mm)R. Langenbrinck (Emmendingen)Einmal-Injektionskanülen (30G ½" 0,3 x 13) mm)BD (Heidelberg)Einmal-Injektionskanülen (21G x 1½" 0,8 x 40) mm BL/LB)Braun (Melsungen)EinmalpipettenFalcon [™] / Life Sciences (Durham/USA)Einmal-Insulinspritzen-Kanülen-Kombination U-40 Insulin, 1 ml (26Gx ½", 0,45 x 12 mm)Terumo (Leuven/Beligien)	Deckgläser (18 x 18 mm)	VWR (Darmstadt)
(Dreieich)Deckgläser (24 x 60 mm)R. Langenbrinck (Emmendingen)Einmal-Injektionskanülen (30G ½" 0,3 x 13)BD (Heidelberg)mm)Einmal-Injektionskanülen (21G x 1½" 0,8 x 40)Braun (Melsungen)mm BL/LB)EinmalpipettenFalcon [™] / Life Sciences (Durham/USA)Einmal-Insulinspritzen-Kanülen-KombinationTerumo (Leuven/Beligien)	Deckgläser (24 x 40 mm)	Menzel-Gläser / Thermo Fisher Scientific
Deckgläser (24 x 60 mm)R. Langenbrinck (Emmendingen)Einmal-Injektionskanülen (30G ½ 0,3 x 13)BD (Heidelberg)mm)Einmal-Injektionskanülen (21G x 1½ 0,8 x 40)Braun (Melsungen)mm BL/LB)EinmalpipettenFalcon™ / Life Sciences (Durham/USA)Einmal-Insulinspritzen-Kanülen-KombinationTerumo (Leuven/Beligien)U-40 Insulin, 1 ml (26Gx ½", 0,45 x 12 mm)Einmal		(Dreieich)
Einmal-Injektionskanülen ($30G \frac{1}{2}$ " $0,3 \times 13$ BD (Heidelberg)mm)Einmal-Injektionskanülen ($21G \times 1\frac{1}{2}$ " $0,8 \times 40$ Braun (Melsungen)mm BL/LB)EinmalpipettenFalcon TM / Life Sciences (Durham/USA)Einmal-Insulinspritzen-Kanülen-KombinationTerumo (Leuven/Beligien)U-40 Insulin, 1 ml ($26Gx \frac{1}{2}$ ", $0,45 \times 12$ mm)Terumo (Leuven/Beligien)	Deckgläser (24 x 60 mm)	R. Langenbrinck (Emmendingen)
mm) Einmal-Injektionskanülen (21G x 1½ °0,8 x 40 Braun (Melsungen) mm BL/LB) Einmalpipetten Falcon [™] / Life Sciences (Durham/USA) Einmal-Insulinspritzen-Kanülen-Kombination Terumo (Leuven/Beligien) U-40 Insulin, 1 ml (26Gx ½", 0,45 x 12 mm)	Einmal-Injektionskanülen (30G ½" 0,3 x 13	BD (Heidelberg)
Einmal-Injektionskanülen (21G x $1\frac{1}{2}$ 0,8 x 40Braun (Melsungen)mm BL/LB)Falcon TM / Life Sciences (Durham/USA)Einmal-Insulinspritzen-Kanülen-KombinationTerumo (Leuven/Beligien)U-40 Insulin, 1 ml (26Gx $\frac{1}{2}$, 0,45 x 12 mm)Life Sciences (Durham/USA)	mm)	
mm BL/LB)Falcon™ / Life Sciences (Durham/USA)Einmal-Insulinspritzen-Kanülen-KombinationTerumo (Leuven/Beligien)U-40 Insulin, 1 ml (26Gx ½", 0,45 x 12 mm)Terumo (Leuven/Beligien)	Einmal-Injektionskanülen (21G x 1½" 0,8 x 40	Braun (Melsungen)
EinmalpipettenFalcon [™] / Life Sciences (Durham/USA)Einmal-Insulinspritzen-Kanülen-KombinationTerumo (Leuven/Beligien)U-40 Insulin, 1 ml (26Gx ½", 0,45 x 12 mm)Terumo (Leuven/Beligien)	mm BL/LB)	
Einmal-Insulinspritzen-Kanülen-Kombination Terumo (Leuven/Beligien) U-40 Insulin, 1 ml (26Gx ½", 0,45 x 12 mm)	Einmalpipetten	Falcon [™] / Life Sciences (Durham/USA)
	Einmal-Insulinspritzen-Kanülen-Kombination	Terumo (Leuven/Beligien)
	<i>U-40 Insulin</i> , 1 ml (26Gx ½'', 0,45 x 12 mm)	

Verbrauchsmaterialen	Firma	
Einmal-Spritzen-Kanülen-Kombination, 1ml	Braun (Melsungen)	
(26G x ½", 0,45 x 12 mm)		
Einmal-Spritzen, 10 ml	Braun (Melsungen)	
Einweg-Pasteurpipetten, graduiert	Roth (Karlsruhe)	
Nunc [®] CryoTubes [®]	Sigma-Aldrich (Steinheim)	
Objektträger	Megro (Wesel)	
Pipettenspitzen		
gestopft	Biozym (Hess. Oldendorf)	
nicht gestopft	Sarstedt (Nümbrecht)	
QIAshredder Mini Spin - Säulen	Qiagen (Hilden)	
Reagiergefäße (0,5/ 1,5/ 2,0 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)	
Reagiergefäße (15 ml)	Falcon [™] / BD Biosciences (Durham/USA)	

3.1.9. Reagenzsysteme / Kits

Reagenzsysteme / Kits	Firma
QuantiTect [®] Reverse Transcription Kit	Qiagen (Hilden)
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden)
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Rotor-Gene [®] SYBR [®] Green PCR Kit	Qiagen (Hilden)

3.1.10. Primer

Alle Primer wurden von *Eurofins Genomics* (Ebersberg) bezogen und waren HPLC (Highperformance liquid chromatography)-aufbereitet.

Gen	Forward Sequenz (5' $ ightarrow$ 3')	Reverse Sequenz (5' $ ightarrow$ 3')
GAPDH	TTGTGCAGTGCCAGCCTC	TTGCCGTGAGTGGAGTCATAC
C1q	AGAGGGGAGCCAGGAGC	CTTTCACGCCCTTCAGTCCT
C3	GAGAAAAGCCCAACACCAGC	CTGGGCTGTAGTCAGTTGGG
Properdin	GCCGTACCTTGCCCTGTAAA	TCCTTGAACGTGACTGCTGG

GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

Software	Quelle / Firma
GraphPad Prism, Version 5.02, für Windows	GraphPad Software, Inc. (San
(Statistik-Software, genutzt nur für qPCR-	Diego/USA)
Daten)	
IBM SPSS Statictics, Version 22, für	IBM (Armonk/USA)
Macintosh (Statistik-Software)	
ImageJ, Version 1.48v	http://imagej.nih.gov/ij
(Bildverarbeitungssoftware)	
Microsoft Excel 2013	Microsoft (Unterschleißheim)
NanoDrop 2000, Version 1.4.2 (Photometer-	Thermo Scientific (Dreieich)
Software)	
Primerblast (Primer-Designsoftware)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-
	blast/
Rotor-Gene Q – Pure Detection, Version 2.2.3	Qiagen (Hilden)
(PCR-Cycler-Software)	
Quantity One, Version 4.6.7	Bio-Rad (München)
ZEN 2012, Version 1.1.2.0 (Mikroskop-	Zeiss (Jena)
Software)	

3.1.11. Software

3.2. Methoden

3.2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Mauswelpen, welche der eigenen Zucht in der zentralen Tierhaltung der *Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin* (FEM), *Charité Berlin – Campus Virchow Klinikum*, entstammten. Fertile Elterntiere des Wildtyps C57BL/6JRj wurden von *Janvier Labs* bezogen (vgl. Abschnitt **3.1.1**). Alle Mäuse wurden in Mauskäfigen gemäß der EU-Leitlinien 2007/526/EG für die Unterbringung und Pflege von Versuchstieren (Gruppenhaltung, Beschäftigungs- und Nestmaterial vorhanden, Futter und Wasser ad libitum, 12-Stunden Tag-/Nachtrhythmus) gehalten.

Die Verpaarung der Elterntiere erfolgte frühestens nach einer Akklimatisationszeit von sieben Tagen in der Haltungseinrichtung. Es wurde immer ein Männchen mit zwei Weibchen verpaart. Sobald die Weibchen deutlich sichtbar tragend waren, wurden diese zur Geburt einzeln in große Mauskäfige separiert. Die Vatertiere wurden jeweils bis zur nächsten Verpaarung wieder in die Gruppenhaltung der männlichen Mäuse integriert. Die weiblichen Mäuse wurden maximal zweimal nach einer Regenerationszeit von mindestens acht Wochen für den Versuch eingesetzt.

Die Versuchstierhaltung und -zucht sowie der Tierversuch waren gemäß dem Tierschutzgesetz §11 Abs.1 bzw. gemäß §8 Abs. 1 durch die örtliche Tierschutzbehörde genehmigt (Bearbeitungsnummer beim *Landesamt für Gesundheit und Soziales*, Turmstr. 21, 10559 Berlin: *G0366/12, Teil VI*).

Über die gesamte Zeit der Haltung und insbesondere während der Versuchsdurchführung hat die Verfasserin der vorliegenden Dissertation sich eigenverantwortlich und selbstständig um das Wohlergehen der Mäuse mit Ausnahmen der Tierpflegerarbeiten (Füttern, Tränken und Misten) gekümmert. Auf die Verträglichkeit der Mäuse untereinander nach Zusammenstellung neuer Gruppenkonstellationen wurde dabei ein besonderes Augenmerk gelegt und einzelne Mäuse wenn nötig separiert.

3.2.2. Tiermodell

Bei dem verwendeten Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie handelt es sich um ein in der Arbeitsgruppe etabliertes Tiermodell (Kociok et al 2006), das in modifizierter Form des Protokolls von Smith und Kollegen (Smith et al 1994) durchgeführt wurde.

Am postnatalen Tag (P)7 wurden die Mauswelpen begleitet von dem säugenden Muttertier über 7200 Minuten (entspricht fünf vollen Tagen, P7 bis P12) einem Luftsauerstoffgehalt von 75% ausgesetzt, indem der gesamte Käfig in eine geschlossene sogenannte Sauerstoffbox (O₂-Box) gestellt wurde (vgl. Abb.10, Abb. 11 und Abb. 12). Das Wohlergehen der Mäuse wurde einmal täglich augenscheinlich ohne Berührung überprüft, indem der Käfig für wenige Minuten aus der O₂-Box herausgenommen und zur Tierkontrolle kurz geöffnet wurde. Anschließend wurde der Käfig zügig zurückgestellt, die Glasfronttür der wieder geschlossen, sodass der Sauerstoffgehalt innerhalb der O₂-Box automatisch wieder auf 75% hochgeregelt werden konnte. Schwankungsausgleiche der Luftzusammensetzung erfolgten während des gesamten Versuchs vollautomatisch. Nach Ablauf der 7200 Minuten schaltete die O₂-Box sich ebenfalls automatisch ab. Der Käfig verblieb bei geschlossener Tür noch weitere drei bis vier Stunden in der O₂-Box, damit der Sauerstoffgehalt für die Mäuse langsam absinken und sich dem der normalen Umgebungsluft annähern konnte. Bei einem Sauerstoffgehalt von etwa 35% wurden die Mäuse in ihrem Käfig aus der Sauerstoffbox herausgenommen. Anschließend wurde je nach Versuchstiergruppenzugehörigkeit einem Teil der Mäuse die erste intraperitoneale (i.p.) Injektion an P12 verabreicht.



Maus-Abbildung: The Jackson Laboratory (http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html)

Abb. 10 Projektskizze.

Zeitliche und methodische Projektübersicht. Die ersten 7 Tage nach der Geburt (P0 bis P7) verbrachten die Mäuse in Raumluft (ca. 21% Luftsauerstoff). Es folgten 5 Tage unter hyperoxischen Bedingungen von 75% Luftsauerstoff in der Umgebung (P7 bis P12, rosa), bevor die Mäuse anschließend wieder in Raumluft verbracht wurden. Je nach Versuchstiergruppenzugehörigkeit (vgl. Abschnitt **3.2.3**) wurde einem Teil der Mäuse von P12 bis P16 anschließend täglich im Abstand von 24 Stunden intraperitoneale Injektionen verabreicht. Die Versuchstiergruppen wurden im Rahmen der Genexpressionsanalytische Untersuchungen (vgl. Abschnitt **3.2.8**) zudem mit ausschließlich in Umgebungsluft gehaltenen Welpen verglichen. Die Gewebeanalysen (grüner Kasten) fanden nach Opferung der Mäuse und anschließender Enukleation (blauer Kasten) zu den Untersuchungszeitpunkten P14, P17 und P21 statt (blau eingekreist). P, postnataler Tag; CD, *Cluster of differentiation*; mRNA, messenger Ribonukleinsäure; C3, Komplementfaktor 3; C1q, Komplementfaktor 1q



Abb. 11 Die zur Umsetzung des Mausmodells der Sauerstoff-induzierten Retinopathie genutzte Sauerstoffbox *Simatic C7-613 V 2.01* (*Siemens*, Berlin und München).

Innerhalb der Sauerstoffbox befinden sich zwei große Mauskäfige mit jeweils einem säugenden Muttertier und seinen Welpen, die vom postnatalen Tag (P)7 bis P12 (= 7200 Minuten) einem durch die Automatisierungstechnik der Sauerstoffbox erzeugten Luftsauerstoffgehalt von 75% ausgesetzt sind.



Abb. 12 Messwertanzeige der Sauerstoffbox *Simatic C7-613 V 2.01* (*Siemens*, Berlin und München) zu Beginn der Versuchsdurchführung des Mausmodells der Sauerstoff-induzierten Retinopathie. Angegeben sind die verbleibende Versuchszeit des Mausmodells der Sauerstoff-induzierten Retinopathie in Minuten (*Restzeit*) und der aktuell innerhalb der Sauerstoffbox herrschende Luftsauerstoffgehalt in Prozent (*O2-Messwert*).

3.2.3. Versuchstiergruppen

- Supplementierungsgruppe (i.p. Injektion von dem aktivierten Komplementfaktor C5a), im Folgenden C5a-Gruppe genannt
- 2. Inhibierungsgruppe (i.p. Injektion von dem C5/C5a-Inhibitor NOX-D20 (Hoehlig et al 2013)), im Folgenden *NOX-Gruppe* genannt
- 3. Kontrollgruppe (i.p. Injektion von steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) als Vehikelflüssigkeit), im Folgenden *PBS-Gruppe* genannt
- 4. Vergleichsgruppe mit alleiniger Sauerstoff-induzierter Retinopathie, im Folgenden *OIR-Gruppe* genannt

Die Versuchstiergruppen wurden im Rahmen der Genexpressionsanalytische Untersuchungen (vgl. Abschnitt **3.2.8**) zudem mit ausschließlich in Umgebungsluft gehaltenen Mäusen verglichen, im Folgenden *Normoxia-Gruppe* genannt.

3.2.4. Intraperitoneale Injektionen

Vor der ersten intraperitonealen Injektion wurden die Welpen eines Wurfes zufällig in drei gleich große Gruppen (C5a-, NOX- und PBS-Gruppe) aufgeteilt.

Bei händischer Fixierung erfolgten jeweils im Abstand von 24 Stunden eine gewichtsadaptierte Injektion C5a (1,3µg/g Körpergewicht) oder NOX-D20 (2,5µg/g Körpergewicht) bzw. ein entsprechendes Volumen PBS in einen der unteren rechten oder linken Quadranten des Bauches (Seite täglich wechselnd). Um die Studienergebnisse später vergleichen zu können, orientieren sich die Injektionsdosen an denen von Langer et al. verwendeten Dosierungen von 8µg C5a und 15µg C5a-Rezeptor-Antagonist pro Maus und Injektion (Langer et al 2010). Die Injektionsdosen von Langer et al. dienten der Orientierung und wurden für die Berechnung der in der vorliegenden Studie genutzten gewichtsadaptierten Dosis (erstellt mit Hilfe von Mittelgewichten von Mäusen zu den entsprechenden Zeitpunkten aus vorangegangenen ROP-Projekten der Arbeitsgruppe) genutzt.

Die Mäuse des Untersuchungszeitpunktes P14 bekamen insgesamt zwei (an P12 und P13), die der Untersuchungszeitpunkte P17 und P21 insgesamt fünf Injektionen (P12 bis P16) verabreicht. Alle Injektionsflüssigkeiten hatten zur Verabreichung Raumtemperatur. Dieser kurze Eingriff wurde ohne vorherige Anästhesie oder Narkotisierung durchgeführt.

Jeder Mauswelpe wurde im Anschluss an die erste i.p. Injektion mit Hilfe von Ohrstanzen individuell markiert und das Geschlecht notiert, bevor er zurück zum Muttertier in das Nest gesetzt wurde. Es wurden immer erst die C5a-Mäuse, dann die NOX-Mäuse und zuletzt die PBS-Mäuse (Kontrolle) gespritzt.

3.2.5. Probengewinnung

Die Untersuchungszeitpunkte waren der 14., 17. und 21. postnatale Lebenstag. Der postnatale Tag (P)17 gilt als Zeitpunkt der maximalen Ausprägung der pathologischen Blutgefäßproliferation (Lange et al 2009, Stahl et al 2010b). Die Auswertung von P14 ist wichtig, da dieser Zeitpunkt die frühe Behandlungsphase (nach 2 intraperitonealen Injektionen) repräsentiert und an P14 eine Hochregulierung des C5a-Rezeptors im Netzhautgewebe der dem OIR-Modell ausgesetzten Mäuse stattfindet (Langer et al 2010). P21 ist ebenfalls von gesondertem Interesse, da dieser Zeitpunkt zum einen eine späte Regenerationsphase darstellt (P25 markiert das Ende der neovaskulären Regression) (Lange et al 2009) und zum anderen an P21 bereits eine deutlich erhöhte Anzahl an Mikroglia-Zellen und Makrophagen im OIR-Modell beobachtet werden konnte (Davies et al 2006, Stahl et al 2010b).

Die Mäuse wurden jeweils 24 Stunden nach Verabreichung der letzten i.p. Injektion zunächst einer tiefen intraperitoneal verabreichten Narkose (Injektionslösung aus Ketamin 0,563% und Xylazin 0,085%; Dosis: 0,1ml/10g Körpergewicht; entspricht 100µg/g Körpergewicht Ketamin und 15µg/g Körpergewicht Xylazin) unterzogen. Die Tötung der Mäuse erfolgte durch zervikale Dislokation. Direkt im Anschluss wurden die Augen enukleiert und je nach Untersuchungsmethode weiter behandelt. Im Verlauf der Studie wurden die noch ausstehenden Analysen bezüglich der zu untersuchenden Versuchstiergruppen und Untersuchungszeitpunkte an die ersten Ergebnisse entsprechend angepasst (**Tab. 1**).

Tab. 1 Studiendesign.

Übersicht über die in der vorliegenden Studie durchgeführten Untersuchungen inklusive der für die jeweilige Untersuchung genutzten Retina-Gewebepräparate, Versuchsgruppen, Zeitpunkte und Anzahl der verwendeten Einzelaugen.

Untersuchung	Retina-Gewebe	Versuchsgruppen	Zeitpunkte	N (Augen)
Avaskuläre Fläche	Flachpräparat	C5a, PBS, NOX	P14, P17, P21	6 - 8
Gesamt-Tuftfläche	Flachpräparat	C5a, PBS, NOX	P17	6 - 8
CD11b ⁺ Zellen	Flachpräparat	C5a, PBS, NOX	P14, P17, P21	6 - 8
<i>Aktivierte</i> CD11b [⁺] Zellen	Flachpräparat	C5a, PBS, NOX	P14, P17, P21	6 - 8
IHC-Färbung	Paraffinschnitt	C5a, PBS,	P14, P17	3
HE-Färbung	Paraffinschnitt	C5a, PBS, NOX	P14, P17, P21	3
qPCR	Nativpräparat	C5a, PBS, OIR	P17	4

CD11b⁺ Zellen, CD11b-positive Zellen; IHC, Immunhistochemie; HE, Hämatoxilin-Eosin; qPCR, Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion; C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); OIR, Sauerstoff-induzierte Retinopathie (Vergleichsgruppe); P, postnataler Tag; N, Anzahl der für die Untersuchung verwendeten Einzelaugen.

3.2.6. Histomorphologische Untersuchung

3.2.6.1. Herstellung von Paraffinschnitten

Für die Hämatoxilin-Eosin (HE)-Färbung wurden die Augen 48 Stunden bei 4°C in Davidson Fixierlösung fixiert, welche gegenüber der oft standardmäßig verwendetem Formalin Fixierlösung zu einer deutlich schonenderen und Artefakt-ärmeren Fixierung der Retina führt (Treuting et al 2012). Nach Dehydratation in aufsteigender Ethanolreihe (50 und 70 %, je 30 min) wurden die Augen in Paraffin eingebettet und Serienschnitte mit einer Schichtdicke von 4 µm angefertigt.

3.2.6.2. Protokoll der Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxilin-Eosin (HE)-Färbung dient der histomorphologischen Übersicht über die verschiedenen Strukturen und Zellen des Auges. Dazu wurde ein zentraler Paraffinserienschnitt auf Höhe des Sehnervenaustritts (Medianebene) ausgewählt. Wenn nicht anders beschrieben erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur.

- 1. Trocknen der Schnitte bei 60°C 1 x 60 Minuten (min)
- 2. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol 2 x 10 min, danach 2-Propanol 2 x 10 min

- 3. Hydrieren der Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (96 90 70 50%, je 5 min)
- 4. Spülen der Schnitte in Aqua dest. 2 x 5 min
- 5. Färben mit Hämalaun 1 x 10 min. und kurzes Spülen der Schnitte in Aqua dest.
- 6. Wässern der Schnitte in warmem Leitungswasser 1 x 10 min
- 7. Färben mit Eosin 1 x 10 min und kurzes Spülen der Schnitte in Aqua dest.
- 8. Kurzes Spülen in Ethanol 70%
- Dehydrieren der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 90 96%, je 5 min) und 2-Propanol 2 x 5 min
- 10. Schlussbehandlung mit Xylol 2 x 10 min
- 11. Eindecken der Schnitte mit Cytoseal XYL®

3.2.6.3. Mikroskopie und Digitalisierung

Von jedem Präparat wurde mit dem Mikroskop *Axio Imager.M2* und der Mikroskop-Kamera *AxioCam MRm* eine Übersichtsaufnahme des gesamten Auges mit 2,5-facher Vergrößerung und zusätzlich von ausgewählten Präparaten Bilder der vaskulären, avaskulären und Tuft-Region in 20-facher Vergrößerung gemacht. Die entstandenen Bilder dienen der Veranschaulichung der Lokalisation von vaskulärer, avaskulärer und Tuft-Zone und den neovaskulären Tufts selbst (vgl. **Abb. 6**) und wurden für die histomorphologische Untersuchung der verschiedenen Versuchsgruppen hinsichtlich der Vaskularisierungs-, Tuft-Dichte und der typischen Schichtung der Retina genutzt (vgl. Abschnitt **4.1**).

3.2.7. Immunhistochemische Untersuchungen

3.2.7.1. Retinale Flachpräparate

3.2.7.1.1. Fixierung und Präparation von retinalen Flachpräparaten

Die Augen wurden nach Perforation der Kornea mit einer Kanüle in 4% Paraformaldehyd (PFA) zwölf Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend bis zur Präparation der retinalen Flachpräparate in dreifach gepufferter Kochsalzlösung (*Tris-buffered saline*, TBS) (1x) aufbewahrt. Die Hornhaut wurde mit Hilfe eines kreisförmigen Scherenschnittes entlang des Limbus abgetrennt und Linse und Glaskörper vorsichtig entfernt. Der verbliebene Augenbecher wurde mit einem Skalpell vierfach sternförmig eingeschnitten, sodass eine kleeblattähnliche Form entstand. Durch diese Gewebeschnitte wurde eine adäquate Planarität der ursprünglich konkaven Strukturen erzielt. Die retinalen Anheftungen an der Ora serrata und am Sehnervenaustritt wurden getrennt, sodass die Netzhaut vorsichtig von der Choroidea und Sklera abgehoben und bis zum Beginn der immunhistochemischen
Färbung in TBS (1x) überführt und gelagert werden konnte.

3.2.7.1.2. Isolectin IB₄-CD11b-Färbung

Diese Färbung dient der Visualisierung der retinalen Blutgefäße (Isolectin IB₄ (IB₄)-positiv) und der CD11b-positiven Zellen. Wenn nicht anders beschrieben erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur.

- 1. Permeabilisieren der Zellmembranen in 1% Triton-X-100/ TBS (1x) 1 x 10 min
- 2. Waschen der Flachpräparate in TBS (1x) 3 x 8 min
- 3. Blocken unspezifischer Antigene in 15% Ziegenserum/ TBS (1x)
- 4. Inkubieren im ersten primären Antikörper CD11b 1:200 in 10% Ziegenserum/ TBS (1x) über Nacht bei 4°C
- 5. Waschen der Flachpräparate in TBS (1x) 4 x 8 min
- Inkubieren im sekundären Antikörper Cy3 Ziege anti-Ratte 1:100 in 10% Ziegenserum/ TBS (1x) für 120 min
- 7. Waschen der Flachpräparate in TBS (1x) 4 x 8 min
- Inkubieren im zweiten gekoppelten primären Antikörper IB₄-Alexa488 1:100 in 10% Ziegenserum/ TBS (1x) über Nacht bei 4°C
- 9. Waschen der Flachpräparate in TBS (1x) 4 x 8 min
- 10. Eindecken der Flachpräparate mit Fluorescence Mounting Medium®

3.2.7.1.3. Mikroskopie und Digitalisierung

Von jedem retinalen Flachpräparat wurde eine Übersichtsaufnahme (automatisch erstelltes 9er-Kompositbild bestehend aus aus 3 x 3 Einzelbildern, 2,5-fache Vergrößerung) für die Analysen der avaskulären Fläche und der Gesamt-Tuftfläche angefertigt. Weitere interessante, der Veranschaulichung von verschiedenen Befunden dienende Bereiche wurden in 10- oder 20-facher Vergrößerung fotografiert.

3.2.7.1.4. Quantifizierung der avaskulären Fläche mittels ImageJ

Die Ausmessungen und Berechnungen erfolgten verblindet durch eine mit der Analyse vertraute, geübte zweite Person der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Joussen.

Die Analyse der avaskulären Fläche wurde mit der Bildverarbeitungssoftware *ImageJ* analog der beschriebenen Vorgehensweise im *Nature Protocol* von Connor et al. (Connor et al 2009) durchgeführt. Kurz beschrieben wurde zunächst die Gesamtfläche des retinalen

Flachpräparates und dann die Fläche des avaskulären Zone (Bereich der obliterierten kleinen retinalen Blutgefäße) ausgemessen. Die großen Venen und Arterien verbleiben auch im Rahmen des OIR-Modells aktiv und wurden bei den Ausmessungen nicht berücksichtigt. Der Anteil der avaskulären Zone an der totalen Retinafläche wurde rechnerisch bestimmt. Die Angabe erfolgte in Prozent.

3.2.7.1.5. Quantifizierung der Gesamt-Tuftfläche mittels ImageJ

Vor Beginn der Untersuchung wurden die einzelnen Übersichtsaufnahmen der retinalen Flachpräparate von einer zweiten Person der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Joussen verblindet; im Anschluss wurde die Untersuchung von der Verfasserin der vorliegenden Dissertation durchgeführt.

Die quantitative Tuftanalyse erfolgte computergestützt mit *ImageJ* analog der beschriebenen Vorgehensweise im *Nature Protocol* von Connor et al. (Connor et al 2009). Die Auswahl der Tuft-Bereiche erfolgte halbautomatisch mit der sogenannten Zauberstab-Funktion, die alle angrenzenden Bereiche mit ähnlicher Pixelfarbe wie die der manuell angeklickten Neovaskularisation auswählt. Am Schluss erfasst das Programm die Summe aller ausgewählten Bereiche. Wie bei der Berechnung der avaskulären Fläche wurden die Gesamt-Tuftfläche und die totale Retinafläche zueinander ins Verhältnis gesetzt und der Anteil der Neovaskularisation an der Gesamtfläche in Prozent angegeben.

3.2.7.1.6. Quantifizierung der Gesamt-CD11b-positiven Zellen und aktivierten CD11b-positiven Zellen

Vor Beginn der Untersuchung wurden die immunhistologischen Präparate der retinalen Flachpräparate von einer zweiten Person der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Joussen verblindet; im Anschluss wurde die Untersuchung von der Verfasserin der vorliegenden Dissertation direkt am immunhistologischen Präparat durchgeführt.

Für die Gesamtzellzahl wurde in der vaskulären, avaskulären und Tuft-Region in jeweils 4 Arealen à 0,15 mm² (in der Regel eines pro Blättchen) pro Flachpräparat die Zellzahl visuell bestimmt (**Abb. 13**). Zusätzlich wurde zudem die Lokalisation der gezählten Zellen in der inneren beziehungsweise äußeren Schicht erfasst.

Das Vorgehen zur Quantifizierung der aktivierten CD11b-positiven Zellen erfolgte analog in jeweils 8 Arealen à 0,15 mm² je Region (in der Regel zwei pro Blättchen). Dabei wurden alle Zellen, die nicht die stark ausgeprägte Verästelung (sog. *R-stage* in Figure 8 von (Stence et

al 2001)) aufzeigten, als morphologisch aktiviert gewertet (**Abb. 9**). Wo das Auszählungsareal die Größe von 0,15 mm² nicht erreichte, wurde zudem die Größe der ausgezählten Fläche dokumentiert. Die Analyse der Daten wurde einmal inklusive und einmal exklusive der Auszählungsareale, deren Größe eine Fläche von 10.000 μ m² unterschritt, durchgeführt, um eine mögliche Verzerrung der Ergebnisse durch zu starke Gewichtung der hoch gerechneten Daten auszuschließen.

Die Zellzahl wurde entsprechend der aktuellen Literatur pro mm² angegeben.

Für die Quantifizierung der Gesamtzahl der CD11b-positiven Zellen und der aktivierten CD11b-positiven Zellen konnte nicht in jedem Fall für alle ausgewerteten Retinae die methodisch vorgegebene Anzahl auszuzählender Areale erreicht werden (weil beispielsweise die avaskuläre Zone bereits fast vollständig revaskularisiert war). Daraus ergibt sich im Ergebnisteil (vgl. Abschnitt **4.2.3** und **4.2.4**) die Angabe der Anzahl ausgezählter Areale (N) aus der Anzahl auszählbarer Retinae (R_a).



Abb. 13 Schema zur Quantifizierung der CD11b-positiven Zellen im retinalen Flachpräparat der Maus. In der vaskulären, avaskulären und Tuft-Region wurde in jeweils 4 Arealen à 0,15 mm² (weiße Kästchen, nicht maßstabsgetreu) pro Flachpräparat die Anzahl der CD11b-positiven Zellen nach immunhistochemischer Färbung bestimmt. In Grün dargestellt sind die retinalen Blutgefäße.

3.2.7.2. Retinale Paraffinschnitte

3.2.7.2.1. Herstellung von Paraffinschnitten

Die Herstellung der Paraffinschnitte erfolgte analog der für die Hämatoxilin-Eosin-Färbung (vgl. Abschnitt **3.2.6.1**).

3.2.7.2.2. Glial Fibrillary Acidic Protein-Vimentin-Färbung

Das Glial Fibrillary Acidic Protein (Gliales fibrilläres saures Protein, GFAP) ist Teil des Zytoskeletts von Zellen astrozytären Ursprungs und wird vor allem im Rahmen einer Schädigung des zentralen Nervensystems oder der Netzhaut hochreguliert. Die betroffenen Zellen werden als *aktiviert* bezeichnet. Vimentin, ebenfalls Bestandteil des Zytoskeletts, gilt in der Netzhaut als Marker für Müller-Zellen.

Wenn nicht anders beschrieben erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur.

- 1. Trocknen der Schnitte bei 60°C 1 x 60 min
- 2. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol 2 x 10 min, danach 2-Propanol 2 x 10 min
- Hydrieren der Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (96 90 70 50%, je 5 min) und kurzes Spülen der Schnitte in Aqua dest.
- 4. Andauung des histologischen Präparats mit Proteinase K 1 x 10 min
- 5. Permeabilisieren der Zellmembranen in 0,1% Triton-X-100/ TBS (1x) 3 x 5 min
- 6. Blocken unspezifischer Antigene in 5% Bovinem Serumalbumin/ TBS (1x) 1 x 60 min
- Inkubieren mit den primären Antikörpern GFAP 1:250 und Vimentin 1:100 in 0,8% Bovinem Serumalbumin/ 0,1% Triton-X-100/ TBS (1x) bzw. Kontrollserum (Negativ-Kontrolle ohne Antikörper) in feuchter Kammer bei 4°C für 24 Stunden (h)
- 8. Waschen der Schnitte in TBS (1x) 3 x 5 min
- Inkubieren mit den sekundären Antikörpern Alexa488 Esel Anti-Kaninchen (für GFAP) und Alexa546 Ziege Anti-Maus (für Vimentin) jew. 1:10.000 in 0,8% Bovinem Serumalbumin/ 0,1% Triton-X-100/ TBS (1x) für 1 x 60 min
- 10. Waschen der Schnitte in TBS (1x) 3 x 5 min
- 11. Anfärben der Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (1x) 1 x 5 min
- 12. Waschen der Schnitte in TBS (1x) 2 x 5 min
- 13. Eindecken der Schnitte mit Fluorescence Mounting Medium®

3.2.7.2.3. Mikroskopie, Digitalisierung und Auswertung

Von jedem Präparat wurden mit dem Mikroskop *Axio Imager.M2* und der Mikroskop-Kamera *AxioCam MRm* Übersichtsaufnahmen in 20-facher Vergrößerung gemacht. Aufgrund der Tatsache, dass die DAPI-gefärbten Zellkerne der äußeren und inneren nukleären Schicht auf einer anderen Ebene fokussiert werden als die Müller-Zellen, wurden die Einzelbilder in dem Computerprogramm *ImageJ* übereinander gelegt und ein Kompositbild erstellt. Anschließend erfolgte die qualitative Evaluierung der aktivierten Müller-Zellen.

3.2.8. Genexpressionsanalytische Untersuchungen (messenger Ribonukleinsäure -Expression)

Zur Beantwortung der Fragen, ob das verwendete Mausmodell der OIR per se schon zu einer veränderten retinalen Komplementaktivität führt und ob eine Beeinflussung durch C5a-Supplementierung möglich ist, wurden zusätzlich zu den messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Expressionsdaten der PBS- und C5a-Gruppe Daten von in Umgebungsluft gehaltenen Mäusen (Normoxia-Gruppe) und von Mäusen, die nur dem OIR-Modell ohne Verabreichung von i.p. Injektionen unterzogen wurden (OIR-Gruppe), erhoben.

3.2.8.1. Präparation und Lagerung von nativen Retina-Proben

Im Anschluss an die Enukleation wurde die Cornea sofort kreuzförmig eröffnet und die Linse und der Glaskörper vorsichtig entfernt. Anschließend wurde das Retinamaterial vorsichtig, aber zügig in einem Stück unter Fixierung des Sehnervens und unter Schonung der Choroidea durch die Cornea-Öffnung herausgeschoben und einzeln in einem vorbereitetes *Cryo Tube* in Flüssigstickstoff überführt. Bis zur mRNA-Isolierung, wurden die Proben bei minus 80°C gelagert.

3.2.8.2. Ribonukleinsäure-Isolierung

Jedes native Retina-Präparat wurde in 350µl eisgekühltem *Buffer RLT* Lysis-Puffer (Bestandteil des Qiagen *RNeasy Mini Kit*) auf Eis aufgetaut und dann mit Hilfe eines Pistills (vorher über Nacht in 0,1 % Diethyl Pryrokarbonat (DEPC)/ Aqua dest. inkubiert, dann darin autoklaviert) homogenisiert, bevor die gesamte Lösung auf eine *QIAshredder*-Säule aufgetragen und 3 min bei maximaler Geschwindigkeit (20.000 rpm) zentrifugiert wurde. Die anschließende Ribonukleinsäure (RNA)-Isolierung erfolgte nach Herstellerprotokoll mit dem *RNeasy Mini Kit* einschließlich Desoxyribonuklease (DNase)-Verdau auf der Säule. Die fertig isolierte RNA wurde in 52 µl Ribonukleasen (RNase)-freiem Wasser gelöst und die Konzentration und Reinheit der RNA spektrometrisch mit dem *NanoDrop* (nach Herstellerangaben) bestimmt. Erfolgte die Weiterverarbeitung direkt im Anschluss, wurden die Proben kurzzeitig auf Eis gehalten. Ansonsten wurde die isolierte RNA bis zur Umschreibung in komplementäre Desoxyribonukleinsäure bei -80°C gelagert.

3.2.8.3. Reverse Transkription (Umschreiben in komplementäre Desoxyribonukleinsäure)

Während der Reversen Transkription wird aus der isolierten RNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) synthetisiert, welche für die quantitative Real-Time PCR benötigt wird. Die Umschreibung wurde mit dem *QuantiTect Reverse Transcription Kit* entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden mögliche eventuell noch vorhandene Verunreinigungen mit genomischer Desoxyribonukleinsäure (gDNA) eliminiert. Dazu wurde zuerst jede RNA-Probe (maximal 1 μ g) mit 2 μ l *gDNA Wipeout Buffer* versetzt und das Reaktionsvolumen dann mit RNase-freiem Wasser auf 14 μ l aufgefüllt (**Tab. 2**), 2 min. bei 42°C inkubiert und dann direkt auf Eis gestellt.

Tab. 2 Reaktionsansatz für die Elimination genomischer Desoxyribonukleinsäure (gDNA) modifiziert nach Qiagen Protokoll.

Komponente	Volumen/ Reaktion
gDNA Wipeout Buffer, 7x	2,0 µl
Template-RNA	variabel (max. 1 µg)
RNase-freies Wasser	variabel
Gesamtreaktionsvolumen	14,0 µl

gDNA, genomische Desoxyribonukleinsäure; RNA, Ribonukleinsäure, RNase, Ribonuklease.

Für die Reverse Transkription wurden im Anschluss die Reaktionsansätze gemäß **Tab. 3** pipettiert, die Proben 15 min bei 42°C inkubiert und die Reaktion dann bei 95°C (für 3 min) abgestoppt. Die Proben wurden unmittelbar auf Eis umgelagert und bis zur Verwendung für die Polymerase-Kettenreaktion bei -20°C aufbewahrt. Eine enzymfreie Kontroll-Probe wurde stets mitgeführt.

Komponente	Volumen/ Reaktion
Master Mix für Reverse Transkription	
Reverse Transkriptase (RT), 20x	1,0 µl
RT-Puffer, 5x	4,0 µl
RT Primer-Mix, 20x	1,0 µl
Template-RNA	
aus gDNA-Eliminierungs-Reaktion	14,0 µl
Gesamtreaktionsvolumen	20,0 µl

Tab. 3 Reaktionsansatz f
 i reverse Transkription modifiziert nach Qiagen Protokoll.

RT beinhaltet Ribonuklease-Inhibitor; RT-Puffer inklusive Magnesium²⁺ und Desoxy-Nukleosidtriphosphate (dNTPs).

RNA, Ribonuleinsäure ; gDNA, genomische Desoxyribonukleinsäure.

3.2.8.4. Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde zur gezielten Amplifikation der hergestellten cDNA-Fragmente eingesetzt und dient in der vorliegenden Studie der mRNA-Expressionsanalyse von Komplementfaktoren. Die entstandene Menge des jeweiligen Transkripts wird dabei parallel zur laufenden Reaktion mittels des Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR Green* detektiert. Das Primerdesign erfolgte mit Hilfe der Software *Primerblast (Ye et al 2012)*. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Primer möglichst Exon-Exon-überspannend waren, wodurch die Amplifikation von DNA-Kontaminanten vermieden und eine selektive Primer-Bindung an die cDNA-Fragmente erreicht wird. Als Normierungsgen (*house keeping gene*) für die spätere relative Quantifizierung der Untersuchungsergebnisse nach Schmittgen und Livak (Schmittgen & Livak 2008) diente die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). GAPDH wurde im Rahmen von voran gegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe für das verwendete Versuchstier Maus im OIR-Modell als sehr stabil validiert.

Für die Verifizierung der konstruierten Primer wurden einmalig im Anschluss an die qPCR 10µl der amplifizierten Proben (+ 2,5µl blauem Ladepuffer) in einem 2,0% Agarosegel getrennt.

Die qPCR wurde mit dem *Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Für jedes Primer-Paar wurde ein dreifacher Reaktionsansatz (Triplet) entsprechend der **Tab. 4** angefertigt und die Daten eines Triplets dann in einem Mittelwert zusammengefasst. Die Amplifizierung der Proben im *Rotor Gene Q* erfolgte in 40 Zyklen. Einer einmaligen Denaturierungszeit von 5 Minuten bei 95°C folgten Zyklen mit je 15 Sekunden bei 95°C (DNA-Denaturierung), je 15 Sekunden bei 60°C (Primer-

Annealing) und 15 Sekunden bei 72°C (DNA-Synthese). Dann wurde von 72°C jeweils um 1°C erhöht bis 95°C (Denaturierung der DNA für die Schmelzkurvenanalyse) und die fertigen Proben am Ende bei 20°C gehalten. Pro Primer-Paar wurde jeweils eine Wasserkontrolle mitgeführt.

Die Datenerhebung erfolgte mit der Software Rotor Gene Q von Qiagen.

Tab. 4 Reaktionsansatz für die Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion modifiziert nach Qiagen Protokoll.

Komponente	Volumen/ Reaktion
2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix*	12,5 µl
Forward Primer (1 µM)	2,5 µl
Backward Primer (1 µM)	2,5 µl
cDNA (3 ng/ μl)	5,0 µl
RNase-freies Wasser	2,5 µl
Gesamtreaktionsvolumen	25,0 μl

*inklusive HotStarTaq *Plus* Desoxyribonukleinsäure Polymerase, Rotor-Gene SYBR Green-Puffer und SYBR Green I.

cDNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure; RNase, Ribonuklease.

3.2.8.5. Relative Quantifizierung der Daten mittels der C_T-Vergleichsmethode

Die Aufzeichnung der Rohdaten, die Schmelzkurvenanalyse und das manuelle Setzen des Schwellenwertes erfolgte mit der *QIAGEN Rotor Gene* Q-Software.

Anhand einer Schmelzkurvenanalyse wurde zunächst überprüft, ob ein einziges Amplifikationsprodukt mit einem eindeutigen Maximum der Schmelzkurve entstanden ist und nicht unspezifische Primerdimere (qualitative Untersuchung der qPCR-Produkte). Parallel wurde die korrekte Größe des Amplifikationsproduktes (in Basenpaaren, bp) mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt (vgl. Abschnitt **3.2.8.4**). Um die C_T-Werte zu ermitteln, wurde manuell im unteren Drittel des parallel verlaufenden exponentiellen Kurvenwachstums (Y-Achse: Fluoreszenz; X-Achse: Anzahl der Zyklen) ein Schwellenwert (*Threshold*, T) gesetzt. Der sich daraus ergebende C_T-Wert beschreibt den PCR-Zyklus (*Cycle*, C), an dem die gemessene Fluoreszenz aller Proben diesen Schwellenwert übersteigt (Schmittgen & Livak 2008). Der C_T-Wert stellt demnach das zentrale Element der relativen Quantifizierung der Daten dar.

Die mRNA-Expressionsdaten wurden mit Hilfe einer modifizierten von Applied Biosystems

User Bulletin #2 vorgefertigten *Excel*-Tabelle nach der sogenannten *comparative* C_T *method* (C_T -Vergleichsmethode) (Schmittgen & Livak 2008) – auch bekannt als $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode – relativ quantifiziert. Bei der relativen Quantifizierung werden die qPCR-Daten relativ zu einem endogenen Normierungsgen dargestellt (Schmittgen & Livak 2008). Dazu wurde im ersten Schritt für jede einzelne Probe der Versuchs- und Kontrollgruppen der ΔC_T -Wert errechnet, indem die Differenz aus dem C_T -Wert des Normierungsgens (GAPDH) und dem des zu untersuchenden Gen (*Gene of interest*, GOI) gebildet wurde [$\Delta C_T = (C_T \text{ GOI - } C_T \text{ GAPDH})$]. Die ΔC_T -Werte einer Gruppe (Versuchs- oder Kontrollgruppe) wurden gemittelt und die Gruppen-Daten in Balkendiagrammen dargestellt (Schmittgen & Livak 2008).

3.3. Statistische Auswertung

Eine statistische Analyse erfolgte mit dem Statistikprogramm *SPSS* für die erhobenen Daten der avaskulären Fläche, der Gesamt-Tuftfläche, der CD11b-positiven Zellen und der aktivierten CD11b-positiven Zellen und mit dem Grafik- und Statistikprogramm *GraphPadPrism* für die mRNA-Expressionsanalyse. Für die Gruppenstatistiken wurden die Anzahl der Datensätze (N), der Mittelwert (MW) und der Standardfehler des Mittelwertes (*Standard error of the mean*, SEM) bestimmt. Mit Hilfe von Balkendiagrammen wurden die Werte graphisch dargestellt und verglichen.

Die Daten der einzelnen Versuchsgruppen und Zeitpunkte wurden nach erfolgreicher Prüfung der Variablen auf Normalverteilung mit einem zweiseitigen ungepaarten t-Test (aufgrund unterschiedlicher Varianzen inklusive Korrektur nach Welch) auf signifikante Unterschiede untersucht. Ein p-Wert von kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

3.4. Vergleichbarkeit der Supplementierungs- und der Inhibierungsgruppe

Bei der Datenauswertung erfolgte bewusst kein Vergleich zwischen der Supplementierungsund der Inhibierungs-Gruppe. Dies wäre nur im Falle einer kombinierten Inhibierungs-Injektion von C5a und NOX (C5a+NOX) sinnvoll gewesen, welche die Überprüfung der erfolgreichen C5a-Inhibierung durch NOX möglich gemacht und so die Vergleichbarkeit (C5a vs. C5a+NOX) erreicht hätte (zum Beispiel nach diesem Prinzip durchgeführt von (Rohan et al 2000)). Beide Effektorgruppen (C5a und NOX) wurden deshalb nur in Relation zur Kontrollgruppe (PBS) betrachtet und nicht direkt miteinander verglichen.

4.1. Ergebnisse der histomorphologischen Untersuchungen

In den HE-Schnitten zeigten sich zwischen den einzelnen Gruppen histomorphologisch keine Unterschiede bezüglich der Vaskularisierungs-Dichte, Tuft-Dichte oder der typischen physiologischen Schichtung der Retina. Die charakteristischen Merkmale der vaskulären, avaskulären und Tuft-Zone waren in allen drei Gruppen ausgeprägt.

4.2. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

4.2.1. Quantifizierung der avaskulären Fläche

Die Größe der avaskulären Fläche der C5a-Gruppe und die der PBS-Gruppe waren zum Zeitpunkt P14 vergleichbar (21,5% \pm 0,7%; N = 6 versus 20,9% \pm 0,8%; N = 6; p = 0,602; **Abb. 14** oben links). An P17 war die avaskuläre Fläche der C5a-Gruppe mit 5,6% \pm 1,1% (N = 6) signifikant kleiner als die der PBS-Gruppe mit 8,9% \pm 1,0% (N = 8) (p = 0,044; **Abb. 14** oben Mitte). Zum Zeitpunkt P21 betrug die avaskuläre Fläche in der C5a-Gruppe 0,8% \pm 0,8% (N = 6). Verglichen mit der PBS-Gruppe (0,3% \pm 0,2%; N = 6) gab es keinen signifikanten Unterschied (p = 0,513; **Abb. 14** oben rechts).

Die Größe der avaskulären Fläche der NOX-Gruppe betrug an P14 18,8% \pm 0,9% (N = 6), an P17 8,0% \pm 1,4% (N = 8) und an P21 1,7% \pm 1,1% (N = 6) und unterschied sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von der PBS-Gruppe (p = 0,122 für P14, p = 0,600 für P17 und p = 0,235 für P21; **Abb. 14** unten).

Die Rückbildung (Revaskularisation) der avaskulären Fläche konnte bei allen drei Versuchsgruppen deutlich im zeitlichen Verlauf der untersuchten Zeitpunkte P14, P17 und P21 beobachtet werden.

Abb. 5 zeigt anhand der PBS-Gruppe beispielhaft die Entwicklung der avaskulären Zone von P14 bis P21 im verwendeten OIR-Modell.



Abb. 14 Anteil der avaskulären Fläche an der Gesamtfläche der Netzhaut der Maus in Prozent nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12).

Vergleich der prozentualen Größe der avaskulären Fläche zwischen der C5a-Gruppe (oben) und der NOX-Gruppe (unten) mit der PBS-Gruppe zum Untersuchungszeitpunkt P14, P17 und P21 (v.l.n.r.) (N = 6–8). MW ± SEM; *p < 0,05. P, postnataler Tag; C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); N, Anzahl der ausgewerteten Retinae pro Zeitpunkt; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes.

4.2.2. Quantifizierung der Gesamt-Tuftfläche

Zum Zeitpunkt P17 betrug die Gesamt-Tuftfläche der C5a-Gruppe 2,0% \pm 0,5% (N = 6) der gesamten Retinafläche und war signifikant geringer als die der PBS-Gruppe (5,9% \pm 1,0%; N = 8; p = 0,006; **Abb. 15** links). Der Anteil der Tufts an der gesamten Retinafläche der NOX-Gruppe unterschied sich zum selben Zeitpunkt nicht von dem der PBS-Gruppe (5,6% \pm 1,3%; N = 8 versus 5,9% \pm 1,0%; N = 8; p = 0,853; **Abb. 15** rechts).

Abb. 5 zeigt anhand der PBS-Gruppe beispielhaft das Ausmaß der Gesamt-Tuftfläche an P17 im verwendeten OIR-Modell.

Die Tuftausprägung erreicht ihr Maximum zum Zeitpunkt P17 (Stahl et al 2010b). Deshalb und aufgrund der Tatsache, dass in den Untersuchungen zu der avaskulären Fläche (vgl.

Abschnitt **4.2.1**), den Gesamt-CD11b-positiven Zellen (vgl. Abschnitt **4.2.3**) und den aktivierten CD11b-positiven Zellen (vgl. Abschnitt **4.2.4**) signifikante Unterschiede überwiegend nur an P17 gefunden wurden, wurde auf die Analyse der Zeitpunkte P14 und P21 verzichtet.



Abb. 15 Anteil der Gesamt-Tuftfläche an der Gesamtfläche der Netzhaut der Maus in Prozent nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12).

Vergleich der Größe der Gesamt-Tuftfläche zwischen der C5a-Gruppe (links) und der NOX-Gruppe (rechts) mit der PBS-Gruppe zum Untersuchungszeitpunkt P17 (N = 6–8). MW \pm SEM; **p < 0,01. P, postnataler Tag; C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); N, Anzahl der ausgewerteten Retinae pro Zeitpunkt; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes.

4.2.3. Quantifizierung der Gesamt-CD11b-positiven Zellen

4.2.3.1. Vergleich der einzelnen Vaskularisierungszonen innerhalb einer Versuchsgruppe

Die Gesamtzahl der CD11b-positiven Zellen in der avaskulären Zone war in allen drei Gruppen (C5a, PBS und NOX) zu den Zeitpunkten P14 und P17 signifikant kleiner verglichen mit der vaskulären Zone (**Tab. 5**, **Abb. 16**). An P17 waren es ebenfalls gruppenübergreifend signifikant weniger CD11b-positive Zellen in der avaskulären Zone als in der Tuft-Zone (**Tab. 5**, **Abb. 16**). Die Zellverteilung in den drei Vaskularisierungszonen war an P21 für die C5a- und die PBS-Gruppe ohne signifikante Unterschiede (**Tab. 5**, **Abb. 16**). In der NOX-Gruppe gab es zum Zeitpunkt P21 eine signifikant kleinere Anzahl Gesamt-CD11b-positiver Zellen in der Tuft-Zone (**Tab. 5**, **Abb. 16**).

68

Da für die avaskuläre Zone der PBS-Gruppe zum Zeitpunkt P21 nur ein einzelner Wert bestimmt werden konnte, war eine statistische Analyse für und in Zusammenhang mit diesem Wert nicht sinnvoll (**Tab. 5**).

Tab. 5 Übersicht: Vergleich der Gesamtzahl der CD11b-positiven Zellen pro mm² in retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoff von P7 bis P12) zwischen den verschiedenen Vaskularisierungszonen (avaskuläre, Tuft- und vaskuläre Zone) innerhalb der einzelnen Injektionsgruppen C5a (oberer Abschnitt der Tabelle), PBS (mittlerer Abschnitt der Tabelle) bzw. NOX (unterer Abschnitt der Tabelle) zum Untersuchungszeitpunkt P14, P17 und P21.

Gruppe	Zeitpunkt	D	V7	N / R _a	MW	±SEM	<i>p</i> Wert	<i>p</i> Wert	p Wert
Gruppe	Zeitpuliki	rges	٧Z		(n/mm ²)	(n/mm ²)	A vs V	A vs T	V vs T
C5a	P14	6	А	24 / 6	321	14	0.004		
			V	24 / 6	400	22	0,004	_	_
	P17	6	А	24 / 6	189	13			
			Т	24 / 6	277	8	< 0,001	< 0,001	0,700
			V	24 / 6	282	10			
	P21	6	А	8/3	307	57			
			Т	12 / 4	313	26	0,361	0,918	0,061
			V	24 / 6	364	13			
PBS	P14	6	А	24 / 6	323	16	0.000		
			V	24 / 6	451	17	0,000	_	_
	P17	8	А	32 / 8	279	16			
			Т	32 / 8	385	19	0,001	< 0,001	0,433
			V	32 / 8	365	18			
	P21	6	А	1 / 1	360	-			
			Т	21/6	380	17	-	-	0,282
			V	24 / 6	407	18			
NOX	P14	6	А	24 / 6	329	14	< 0.001		
			V	24 / 6	467	27	< 0,001	_	_
	P17	8	А	30/ 8	258	13			
			Т	32 / 8	348	13	< 0,001	< 0,001	0,050
			V	32 / 8	391	17			
	P21	6	А	9/3	315	41			
			Т	17 / 5	321	24	0,050	0,893	0,019
			V	24 / 6	393	18			

C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); P, postnataler Tag; R_{ges} , Anzahl ausgewerteter Retinae; VZ, Vaskularisierungszone; A, avaskuläre Zone; T, Tuft-Zone; V, vaskuläre Zone; N, Anzahl ausgezählter Areale; R_a , Anzahl auszählbarer Retinae; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes; n, Zellzahl; fett gedruckt, signifikante *p* Werte (p < 0,05).





Vergleich der drei Vaskularisierungszonen (avaskulär, Tuft und vaskulär) innerhalb der C5a-Gruppe (oben), PBS-Gruppe (Mitte) und NOX-Gruppe (unten) zum Untersuchungszeitpunkt P14, P17 und P21 (v.l.n.r.) (N = 6–8). MW \pm SEM; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. P, postnataler Tag; C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); N, Anzahl der ausgewerteten Retinae pro Zeitpunkt; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes.

4.2.3.2. Gruppenvergleich innerhalb der avaskulären Zone

In der avaskulären Zone war die Gesamtzahl der CD11b-positiven Zellen der C5a-Gruppe und die der PBS-Gruppe zum Zeitpunkt P14 vergleichbar groß ($321/mm^2 \pm 14/mm^2$; N = 24

versus $323/\text{mm}^2 \pm 16/\text{mm}^2$; N = 24; p = 0,928; **Abb. 17** oben links). An P17 waren mit 189 ± 13 (N = 24) signifikant weniger CD11b-positive Zellen pro mm² in der avaskulären Zone der C5a-Gruppe als in der der PBS-Gruppe mit 279 ± 16 (N = 32) (p < 0,001; **Abb. 17** oben Mitte). Zum Zeitpunkt P21 waren in der avaskulären Zone der C5a-Gruppe 307 ± 57 CD11b-positive Zellen pro mm² (N = 8).

In der NOX-Gruppe betrug die Gesamtzahl der CD11b-positiven Zellen in der avaskulären Zone an P14 329/mm² \pm 14/mm² (N = 24), an P17 258/mm² \pm 13/mm² (N = 30) und an P21 315/mm² \pm 41/mm² (N = 9) und unterschied sich weder an P14 noch an P17 signifikant von der PBS-Gruppe (p = 0,767 für P14, p = 0,304 für P17; **Abb. 17** unten links und unten Mitte). Ein Vergleich mit der PBS-Gruppe für den Zeitpunkt P21 (360/mm²; N = 1; **Abb. 17** rechts oben und unten) war wie oben bereits erläutert nicht möglich.



Abb. 17 Verteilung der Gesamtzahl CD11b-positiver Zellen pro mm² in der avaskulären Zone von retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12).

Vergleich zwischen der C5a-Gruppe (oben) und der NOX-Gruppe (unten) mit der PBS-Gruppe zum Untersuchungszeitpunkt P14, P17 und P21 (v.l.n.r.) (N = 6–8). MW \pm SEM; ***p < 0,001. P, postnataler Tag; C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); N, Anzahl der ausgewerteten Retinae pro Zeitpunkt; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes.

4.2.3.3. Gruppenvergleich innerhalb der Tuft-Zone

In der Tuft-Zone war die Anzahl der Gesamt-CD11b-positiven Zellen der C5a-Gruppe sowohl zum Zeitpunkt P17 als auch an P21 signifikant kleiner als die der PBS-Gruppe (277/mm² \pm 8/mm²; N = 24 versus 385/mm² \pm 19/mm²; N = 32; p < 0,001 und 313/mm² \pm 26/mm²; N = 12 versus 380/mm² \pm 17/mm²; N = 21; p = 0,030; **Abb. 18** oben).

Während zum Zeitpunkt P17 vergleichbar viele CD11b-positive Zellen in der Tuft-Zone der NOX-Gruppe und der PBS-Gruppe vorhanden waren (348/mm² \pm 13/mm²; N = 32; p = 0,117), war die Anzahl in der NOX-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe an P21 signifikant reduziert (321/mm² \pm 24/mm²; N = 17; **Abb. 18** unten).



Abb. 18 Verteilung der Gesamtzahl CD11b-positiver Zellen pro mm² in der Tuft-Zone von retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12).

Vergleich zwischen der C5a-Gruppe (oben) und der NOX-Gruppe (unten) mit der PBS-Gruppe zum Untersuchungszeitpunkt P17 (links) und P21 (rechts) (N = 6–8). MW ± SEM; *p < 0,05; ***p < 0,001. P, postnataler Tag; C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); N, Anzahl der ausgewerteten Retinae pro Zeitpunkt; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes.

4.2.3.4. Vergleich der Verteilung CD11b-positiver Zellen zwischen der inneren und der äußeren Schicht in der Netzhaut

Zum Zeitpunkt P14 war in der inneren Schicht die Gesamtzahl der CD11b-positiven Zellen der avaskulären und vaskulären Zone sowohl in der C5a-Gruppe als auch in der PBS-Gruppe vergleichbar (**Tab. 6**, **Abb. 19**). Während bei der C5a-Gruppe und der PBS-Gruppe an P14 nur in der äußeren Schicht signifikant weniger Zellen in der avaskulären im Vergleich zur vaskulären Zone waren (**Tab. 7**, **Abb. 19**), traf dies bei der NOX-Gruppe an P14 in beiden Schichten zu (**Tab. 6**, **Tab. 7**, **Abb. 19**).

Bei der C5a- und der PBS-Gruppe waren zum Zeitpunkt P17 in der inneren Schicht signifikant mehr CD11b-positive Zellen in der Tuft- als in der avaskulären und der vaskulären Zone vorhanden; die Zellzahl in der avaskulären und vaskulären Zone war dabei vergleichbar groß (**Tab. 6**, **Abb. 19**). In der NOX-Gruppe war an P17 die Zellzahl in der inneren Schicht in der avaskulären Zone signifikant geringer verglichen mit der in der Tuftund in der vaskulären Zone; die Zellzahl der inneren Schicht in der Tuft- und der vaskulären Zone war vergleichbar groß (**Tab. 6**, **Abb. 19**).

An P21 gab es in der inneren Schicht sowohl bei der C5a- als auch bei der NOX-Gruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Vaskularisierungszonen (**Tab. 6**, **Abb. 19**). Bezüglich der äußeren Schicht war gruppenübergreifend wie zum Zeitpunkt P17 auch die Zellzahl in der avaskulären Zone am geringsten, in der vaskulären hingegen am größten und alle Unterschiede waren statistisch signifikant; ausgenommen davon: PBS P21 avaskuläre Zone und Vergleiche damit (**Tab. 7**, **Abb. 19**). Den einzigen signifikanten Unterschied an P21 innerhalb der inneren Schicht gab es in der PBS-Gruppe, wo die Gesamtsumme der CD11b-positiven Zellen in der Tuft-Zone signifikant höher war als in der vaskulären Zone (**Tab. 7**, **Abb. 19**).

Die Unterschiede der Gesamtzahl CD11b-positiver Zellen zwischen den einzelnen Vaskularisierungszonen waren in der äußeren Schicht mit wenigen Ausnahmen hoch signifikant, in einem größeren Ausmaß als in der inneren Schicht. Zudem fällt auf, dass in der inneren Schicht der vaskulären Zone zwar durchgehend mehr Zellen waren als in der äußeren, der Unterschied im zeitlichen Verlauf jedoch deutlich abnahm (**Tab. 7**, **Abb. 19**).

Tab. 6 Übersicht: Vergleich der Gesamtzahl der CD11b-positiven Zellen der inneren Schicht pro mm² in retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) zwischen den verschiedenen Vaskularisierungszonen (avaskuläre, Tuft- und vaskuläre Zone) innerhalb der einzelnen Injektionsgruppen C5a (oberer Abschnitt der Tabelle), PBS (mittlerer Abschnitt der Tabelle) bzw. NOX (unterer Abschnitt der Tabelle) zum Untersuchungszeitpunkt P14, P17 und P21.

Gruppo	Zaitaunkt	Б		N/R	MW	±SEM	p Wert	p Wert	<i>p</i> Wert
Gruppe	Zeitpuliki	Rges	٧Z	N/Ka	(n/mm ²)	(n/mm ²)	$A_I vs V_I$	A _I vs T _I	$V_{I} vs T_{I}$
C5a	P14	6	A	24 / 6	263	13	0.001		
			V	24 / 6	274	17	0,601	_	_
	P17	6	A	24 / 6	175	12			
			Τı	24 / 6	206	8	0,677	0,034	0,001
			VI	24 / 6	169	8			
	P21	6	A	8/3	257	45			
			T	12 / 4	217	24	0,310	0,399	0,669
			VI	24 / 6	207	11			
PBS	P14	6	Aı	24 / 6	266	13	0.405		
			V	24 / 6	293	13	0,135	_	_
	P17	8	A	32 / 8	229	12			
			T	32 / 8	279	15	0,745	0,013	0,009
			VI	32 / 8	223	14			
	P21	6	A	1 / 1	239	-			
			T	21 / 6	270	13	_	-	0,048
			VI	24 / 6	231	14			
NOX	P14	6	A	24 / 6	266	11			
			VI	24 / 6	316	20	0,039	-	-
	P17	8	A	30 / 8	217	12			
			T	32 / 8	255	11	0,049	0,025	0,962
			VI	32 / 8	254	14			
	P21	6	A	9/3	102	34			
			T	17 / 5	218	16	0,239	0,365	0,607
			V	24 / 6	208	11			

C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); P, postnataler Tag; R_{ges} , Anzahl ausgewerteter Retinae; VZ, Vaskularisierungszone; A_I, avaskuläre Zone der inneren Schicht; T_I, Tuft-Zone der inneren Schicht; V_I, vaskuläre Zone der inneren Schicht; N, Anzahl ausgezählter Areale; R_a, Anzahl auszählbarer Retinae; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes; n, Zellzahl; fett gedruckt, signifikante *p* Werte (p < 0,05).

Tab. 7 Übersicht: Vergleich der Gesamtzahl der CD11b-positiven Zellen der äußeren Schicht pro mm² in retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) zwischen den verschiedenen Vaskularisierungszonen (avaskuläre, Tuft- und vaskuläre Zone) innerhalb der einzelnen Injektionsgruppen C5a (oberer Abschnitt der Tabelle), PBS (mittlerer Abschnitt der Tabelle) bzw. NOX (unterer Abschnitt der Tabelle) zum Untersuchungszeitpunkt P14, P17 und P21.

0	7 - : • • • • • • • • • •				MW	±SEM	<i>p</i> Wert	<i>p</i> Wert	p Wert
Gruppe	Zeitpunkt	R _{ges}	٧Z	N / R _a	(n/mm²)	(n/mm²)	$A_{\text{O}}\text{vs}V_{\text{O}}$	A_{O} vs T_{O}	V_{O} vs T_{O}
C5a	P14	6	Ao	24 / 6	58	4	4 0 004		
			Vo	24 / 6	126	8	< 0,001	_	_
	P17	6	Ao	24 / 6	14	3			
			To	24 / 6	71	6	< 0,001	< 0,001	< 0,001
			Vo	24 / 6	114	4			
	P21	6	Ao	8/3	50	16			
			Τo	12 / 4	96	9	< 0,001	0,015	< 0,001
			Vo	24 / 6	157	6			
PBS	P14	6	Ao	24 / 6	57	6	< 0.001		
			Vo	24 / 6	158	7	< 0,001	_	_
	P17	8	Ao	32 / 8	50	6			
			To	32 / 8	107	6	< 0,001	< 0,001	< 0,001
			Vo	32 / 8	142	6			
	P21	6	Ao	1 / 1	67	-			
			Τo	21 / 6	110	8	-	-	< 0,001
			Vo	24 / 6	176	8			
NOX	P14	6	Ao	24 / 6	63	7	< 0.001		
			Vo	24 / 6	151	10	< 0,001	_	_
	P17	8	Ao	30 / 8	42	4			
			To	32 / 8	93	4	< 0,001	< 0,001	< 0,001
			Vo	32 / 8	137	5			
	P21	6	Ao	9/3	62	10			
			To	17 / 5	103	10	< 0,001	0,015*	< 0,001
			Vo	24 / 6	185	11			

C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); P, postnataler Tag; R_{ges} , Anzahl ausgewerteter Retinae; VZ, Vaskularisierungszone; A₀, avaskuläre Zone der äußeren Schicht; T₀, Tuft-Zone der äußeren Schicht; V₀, vaskuläre Zone der äußeren Schicht; N, Anzahl ausgezählter Areale; R_a, Anzahl auszählbarer Retinae; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes; n, Zellzahl; fett gedruckt, signifikante *p* Werte (p < 0,05).



Abb. 19 Verteilung der Gesamtzahl CD11b-positiver Zellen pro mm² in retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) in den einzelnen Injektionsgruppen unterteilt nach Schichtzugehörigkeit.

Vergleich der drei Vaskularisierungszonen (avaskulär, Tuft und vaskulär) unterteilt in innere (schwarze Balken) und äußere Schicht (graue Balken) innerhalb der C5a-Gruppe (oben), PBS-Gruppe (Mitte) und NOX-Gruppe (unten) zum Untersuchungszeitpunkt P14, P17 und P21 (v.l.n.r.) (N = 6–8). MW \pm SEM; innere Schicht: $\phi < 0.05$; $\phi < 0.01$; äußere Schicht: p < 0.05; ***p < 0.001. C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); P, postnataler Tag; N, Anzahl der ausgewerteten Retinae pro Zeitpunkt; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes.

4.2.4. Quantifizierung der aktivierten CD11b-positiver Zellen

Die Analyse der Daten wurde einmal inklusive und einmal exklusive der Auszählungsareale, deren Größe eine Fläche von 10.000 μ m² unterschritt, durchgeführt. Die statistischen Signifikanzen waren in beiden Fällen bis auf eine Ausnahme gleich, sodass auch die hoch gerechneten Daten dieser Kleinstareale mit in die Auswertung aufgenommen wurden.

4.2.4.1. Vergleich der einzelnen Vaskularisierungszonen innerhalb einer Versuchsgruppe

Die Anzahl der aktivierten CD11b-positiven Zellen in der avaskulären Zone war in allen drei Gruppen (C5a, PBS und NOX) zu den Zeitpunkten P14 und P17 signifikant größer verglichen mit der vaskulären Zone. Für die NOX-Gruppe traf dies auch für P21 zu (**Tab. 8**, **Abb. 20**).

An P17 und P21 waren gruppenübergreifend signifikant mehr aktivierte CD11b-positive Zellen in der Tuft-Zone als in der vaskulären Zone, wobei die Zellzahl in der avaskulären und in der Tuft-Zone vergleichbar groß war (**Tab. 8**, **Abb. 20**).

Der Großteil aktivierter CD11b-positiver Zellen befand sich in der avaskulären und in der Tuft-Zone. Ihre Anzahl in der vaskulären Zone stieg im zeitlichen Verlauf in allen drei Gruppen signifikant an (**Abb. 21**). Zwischen P14 und P17 war in der PBS-Gruppe und in der NOX-Gruppe der signifikante Anstieg der Zellzahl für die vaskuläre, in der C5a-Gruppe für die avaskuläre Zone zu verzeichnen. Zwischen P17 und P21 gab es einen zusätzlichen signifikanten Anstieg der Zellzahl der aktivierten CD11b-positiven Zellen in der vaskulären Zone in der C5a-Gruppe.

In der avaskulären Zone kamen die aktivierten CD11b-positiven Zellen überwiegend in großen, räumlich deutlich begrenzten Ansammlungen vor, d.h. es gab avaskuläre Bereiche mit sehr vielen und, direkt daran angrenzend, Bereiche ohne aktivierte CD11b-positiven Zellen (**Abb. 22**). Es wurde zudem eine räumliche Nähe dieser Zellansammlungen zu den sog. *tip cells* der Tuft-Region beobachtet (**Abb. 22**).

In sechs Fällen (1x C5a-Gruppe P21, 1x PBS-Gruppe P14, 3x PBS-Gruppe P21und 1x NOX-Gruppe P21) wurden vergleichbare Zellansammlungen in der vaskulären Zone gefunden (**Abb. 23**). Diese Zellansammlungsbereiche wurden bei der Zellauszählung innerhalb der vaskulären Zone bewusst ausgeschlossen.

In retinalen Flachpräparaten von Normoxia-Kontrollmäusen wurden über die gesamte Fläche verteilt so gut wie keine aktivierten CD11b-positiven Zellen gefunden (vgl. **Ergänzende Abb. 33** im Anhang; Daten sind nicht Teil der vorliegenden Studie).

Tab. 8 Übersicht: Vergleich der aktivierten CD11b-positiven Zellen pro mm² in retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) zwischen den verschiedenen Vaskularisierungszonen (avaskuläre, Tuft- und vaskuläre Zone) innerhalb der einzelnen Injektionsgruppen C5a (oberer Abschnitt der Tabelle), PBS (mittlerer Abschnitt der Tabelle) bzw. NOX (unterer Abschnitt der Tabelle) zum Untersuchungszeitpunkt P14, P17 und P21.

Cruppo	Zoitpupkt	D	17	Z N / R _a	MW	±SEM	<i>p</i> Wert	<i>p</i> Wert	<i>p</i> Wert
Gruppe	Zeitpunkt	Rges	٧Z		(n/mm ²)	(n/mm²)	A vs V	A vs T	V vs T
C5a	P14	6	А	48 / 6	153	11	< 0.001		
			V	49 / 6	11	3	< 0,001	_	_
	P17	6	А	38 / 6	232	36			
			Т	47 / 6	209	34	< 0,001	0,642	< 0,001
			V	48 / 6	10	2			
	P21	6	А	12 / 3	202	85			
			Т	25 / 4	298	70	0,082	0,420	0,001
			V	48 / 6	38	6			
PBS	P14	6	Α	48 / 6	289	15	10.004		
			V	48 / 6	11	2	< 0,001	_	_
	P17	8	А	64 / 8	227	30			
			Т	64 / 8	312	37	< 0,001	0,079	< 0,001
			V	64 / 8	42	9			
	P21	6	А	9/3	214	101			
			Т	43 / 6	338	53	0,114	0,331	< 0,001
			V	48 / 6	35	5			
NOX	P14	6	А	48 / 6	234	13	< 0.001		
			V	48 / 6	8	2	< 0,001	_	_
	P17	8	А	59 / 8	245	28			
			Т	64 / 8	298	28	< 0,001	0,179	< 0,001
			V	64 / 8	19	4			
	P21	6	А	18 / 3	167	45			
			Т	35 / 6	222	43	0,007	0.419	< 0,001
			V	50 / 6	30	5			

C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); P, postnataler Tag; R_{ges}, Anzahl ausgewerteter Retinae; VZ, Vaskularisierungszone; A, avaskuläre Zone; T, Tuft-Zone; V, vaskuläre Zone; N, Anzahl ausgezählter Areale; R_a, Anzahl auszählbarer Retinae; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes; n, Zellzahl; fett gedruckt, signifikante *p* Werte (p < 0,05).



Abb. 20 Verteilung der aktivierten CD11b-positiven Zellen pro mm² in retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) in den einzelnen Injektionsgruppen.

Vergleich der drei Vaskularisierungszonen (avaskulär, Tuft und vaskulär) innerhalb der C5a-Gruppe (oben), PBS-Gruppe (Mitte) und NOX-Gruppe (unten) zum Untersuchungszeitpunkt P14, P17 und P21 (v.l.n.r.) (N = 6–8). MW \pm SEM; **p < 0,01; ***p < 0,001. C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); P, postnataler Tag; N, Anzahl der ausgewerteten Retinae pro Zeitpunkt; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes.



Abb. 21 Zeitlicher Verlauf der Verteilung der aktivierten CD11b-positiven Zellen pro mm² in retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) in den einzelnen Injektionsgruppen.

Vergleich der Entwicklung von den Untersuchungszeitpunkten P14 zu P17 und P17 zu P21 in der avaskulären Zone (grob gestrichelt), der Tuft-Zone (durchgängige Linie) und der vaskulären Zone (fein gestrichelt) innerhalb der C5a-Gruppe (links), PBS-Gruppe (Mitte) und NOX-Gruppe (rechts) (N = 6–8). MW \pm SEM; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); P, postnataler Tag; N, Anzahl der ausgewerteten Retinae pro Zeitpunkt; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes.



Abb. 22 Beispiel für die räumliche Ansammlung aktivierter CD11b-positiver Zellen (weißes Oval) in der avaskulären Zone des retinalen Flachpräparats einer mit C5a-Injektionen behandelten Maus zum Zeitpunkt P17 nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12). In Grün dargestellt sind die retinalen Blutgefäße (IB₄-positiv), in Rot die CD11b-positiven Zellen. Sowohl IB₄- als auch CD11b-positive Strukturen erscheinen in der Vereinigung beider Kanäle (Merge) gelb. Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); weißer Stern, zentrale Retina-Region (Sehnervenkopf-nah); A, avaskuläre Zone; T, Tuft-Zone.



Abb. 23 Beispiel für die räumliche Ansammlung aktivierter CD11b-positiver Zellen (weißer Kasten) in der vaskulären Zone des retinalen Flachpräparats einer mit PBS-Injektionen behandelten Maus zum Zeitpunkt P21 nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12). Links: Übersicht eines zur Hälfte dargestellten retinalen Flachpräparates mit den retinalen Blutgefäßen (IB₄-positiv, grün) und den CD11b-positiven Zellen (rot). Rechts: Vergrößerte Darstellung der markierten Zellansammlung der linken Abbildung (weißer Kasten links). IB₄- und CD11b-positive Strukturen erscheinen in der Vereinigung beider Kanäle (Merge) gelb. Maßstabsbalken entspricht 500 μ m (links) und 100 μ m (rechts). PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); weißer Stern, zentrale Retina-Region (Sehnervenkopf-nah); A, avaskuläre Zone; T, Tuft-Zone; V, vaskuläre Zone.

4.2.4.2. Gruppenvergleich innerhalb der avaskulären Zone

In der avaskulären Zone waren zum Zeitpunkt P14 signifikant weniger aktivierte CD11bpositive Zellen in der C5a-Gruppe vorhanden als in der PBS-Gruppe (153/mm² ± 11/mm²; N = 48 versus 289/mm² ± 15/mm²; N = 48; p < 0,001; **Abb. 24** oben links). An P17 und P21 gab es zwischen der C5a- und der PBS-Gruppe keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zellzahl in der avaskulären Zone (232/mm² ± 36/mm²; N = 38 versus 227/mm² ± 30/mm²; N = 64; p = 0,923 für P17 und 202/mm² ± 85/mm²; N = 12 versus 214/mm² ± 101/mm²; N = 9; p = 0,929 für P21; **Abb. 24** oben Mitte und oben rechts).

In der NOX-Gruppe betrug die Anzahl der aktivierten CD11b-positiven Zellen in der avaskulären Zone an P14 234/mm² \pm 13/mm² (N = 48), an P17 245/mm² \pm 28/mm² (N = 59) und an P21 167/mm² \pm 45/mm² (N = 18) und unterschied sich nur an P14 signifikant durch eine geringerer Zellzahl von der PBS-Gruppe (p = 0,006 für P14, p = 0,073 für P17, p = 0,619 für P21; **Abb. 24** unten).



Abb. 24 Verteilung der aktivierten CD11b-positiven Zellen pro mm² in der avaskulären Zone von retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12).

Vergleich zwischen der C5a-Gruppe (oben) und der NOX-Gruppe (unten) mit der PBS-Gruppe zum Untersuchungszeitpunkt P14, P17 und P21 (v.l.n.r.) (N = 6–8). MW \pm SEM; **p < 0,01; ***p < 0,001. P, postnataler Tag; C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); N, Anzahl der ausgewerteten Retinae pro Zeitpunkt; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes.

4.2.4.3. Gruppenvergleich innerhalb der Tuft-Zone

In der Tuft-Zone waren zum Zeitpunkt P17 signifikant weniger aktivierte CD11b-positive Zellen in der C5a-Gruppe als in der PBS-Gruppe ($209/mm^2 \pm 34/mm^2$; N = 47 versus $312/mm^2 \pm 37/mm^2$; N = 64; p = 0,049; **Abb. 25** oben links). An P21 waren die Zellzahlen der C5a- und der PBS-Gruppe vergleichbar groß ($298/mm^2 \pm 70/mm^2$; N = 25 versus $338/mm^2 \pm 53/mm^2$; N = 43; p = 0,656; **Abb. 25** oben rechts).

In der NOX-Gruppe betrug die Anzahl der aktivierten CD11b-positiven Zellen in der Tuft-Zone an P17 298/mm² \pm 28/mm² (N = 64) und an P21 222/mm² \pm 43/mm² (N = 35) und unterschied sich weder an P17 noch an P21 signifikant von der PBS-Gruppe (p = 0,776 für P17, p = 0,109 für P21; **Abb. 25** unten).



Abb. 25 Verteilung der aktivierten CD11b-positiven Zellen pro mm² in der Tuft-Zone von retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12).

Vergleich zwischen der C5a-Gruppe (oben) und der NOX-Gruppe (unten) mit der PBS-Gruppe zum Untersuchungszeitpunkt P17 (links) und P21 (rechts) (N = 6–8). MW \pm SEM; *p < 0,05. P, postnataler Tag; C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); N, Anzahl der ausgewerteten Retinae pro Zeitpunkt; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes.

4.2.5. Relativer Anteil der aktivierten an der Gesamtzahl CD11b-positiver Zellen

4.2.5.1. Vergleich der einzelnen Vaskularisierungszonen innerhalb einer Versuchsgruppe

Mit einer Ausnahme war in allen drei Gruppen zu allen drei Zeitpunkten der relative Anteil der aktivierten CD11b-positiver Zellen an der Gesamtmenge signifikant höher in der avaskulären Zone verglichen mit der vaskulären Zone (**Tab. 9**, **Abb. 26**). Die Ausnahme kommt durch den oben bereits erwähnten einzelnen Wert bei der Untersuchung der Gesamt-CD11b-positiven Zellen in der PBS-Gruppe zum Zeitpunkt P21 zustande. Ebenfalls gruppenübergreifend war der relative Anteil der aktivierten CD11b-positiven Zellen in der P17 und P21 signifikant höher als in vaskulären Zone (**Tab. 9**, **Abb. 26**). Im Vergleich zwischen der avaskulären und der Tuft-Zone gab es keine signifikanten Unterschiede. In diesen beiden Zonen war der relative Anteil der aktivierten an

der Gesamtmenge der CD11b-positiven Zellen vor allem an P14 und P17 sehr hoch im Vergleich zur vaskulären Zone.

Tab. 9 Übersicht: Vergleich des relativen Anteils der aktivierten CD11b-positiven Zellen an der Gesamtmenge CD11b-positiver Zellen in Prozent in retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) zwischen den verschiedenen Vaskularisierungszonen (avaskuläre, Tuft- und vaskuläre Zone) innerhalb der einzelnen Injektionsgruppen C5a (oberer Abschnitt der Tabelle), PBS (mittlerer Abschnitt der Tabelle) bzw. NOX (unterer Abschnitt der Tabelle) zum Untersuchungszeitpunkt P14, P17 und P21.

Cruppo	Zoitpunkt	Р	1/7	N	MW	±SEM	<i>p</i> Wert	<i>p</i> Wert	<i>p</i> Wert
Gruppe	Zeitpunkt	Rges	٧Z	IN	(%)	(%)	A vs V	A vs T	V vs T
C5a	P14	6	А	24	50	5	< 0.001		
			V	24	3	1	< 0,001	_	_
	P17	6	А	21	84	6			
			Т	24	69	16	< 0,001	0,421	< 0,001
			V	24	3	1			
	P21	6	А	8	48	16			
			Т	12	64	11	0,046	0,391	< 0,001
			V	23	10	2			
PBS	P14	6	А	24	83	3			
			V	24	3	1	< 0,001	-	-
	P17	8	А	32	66	6			
			Т	32	69	6		0,772	< 0,001
			V	32	12	3			
	P21	6	А	1	26	-			
			Т	20	68	8	-	-	< 0,001
			V	24	18	5			
NOX	P14	6	А	24	71	4			
			V	24	2	1	< 0,001	-	-
	P17	8	А	30	72	7			
			Т	32	70	6	< 0,001	0,814	< 0,001
			V	32	5	1			
	P21	6	А	9	51	13			
			Т	17	48	10	0,010	0,876	0,001
			V	23	8	2			

C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); P, postnataler Tag; R_{ges} , Anzahl ausgewerteter Retinae; VZ, Vaskularisierungszone; A, avaskuläre Zone; T, Tuft-Zone; V, vaskuläre Zone; N, Anzahl der Vergleiche zwischen den Daten der Gesamt- und den Daten der aktivierten CD11b-positiven Zellen; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes; fett gedruckt, signifikante *p* Werte (p < 0,05).





Vergleich der drei Vaskularisierungszonen (avaskulär, Tuft und vaskulär) innerhalb der C5a-Gruppe (oben), PBS-Gruppe (Mitte) und NOX-Gruppe (unten) zum Untersuchungszeitpunkt P14, P17 und P21 (v.l.n.r.) (N = 1–24; vgl. **Tab. 9**). MW \pm SEM; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); P, postnataler Tag; N, Anzahl der Vergleiche zwischen den Daten der Gesamt- und den Daten der aktivierten CD11b-positiven Zellen; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes.

4.2.5.2. Gruppenvergleich innerhalb der avaskulären Zone

In der avaskulären Zone war der relative Anteil aktivierter an der Gesamtmenge CD11bpositiver Zellen zum Zeitpunkt P14 signifikant geringer in der C5a-Gruppe verglichen mit der PBS-Gruppe (50% \pm 5%; N = 24 versus 83% \pm 3%; N = 24; p < 0,001; **Abb. 27** oben links). An P17 gab es zwischen der C5a- und der PBS-Gruppe keine signifikanten Unterschiede (84% \pm 6%; N = 21 versus 66% \pm 6%; N = 32; p = 0,054; **Abb. 27** oben Mitte). An P21 lag der relative Anteil aktivierter CD11b-positiver Zellen der C5a-Gruppe bei 44% \pm 16% (N = 8) (**Abb. 27** oben rechts).

In der NOX-Gruppe betrug der relative Anteil aktivierter CD11b-positiver Zellen an der Gesamtmenge in der avaskulären Zone an P14 71% \pm 4% (N = 24), an P17 72% \pm 7% (N = 30) und an P21 51% \pm 13% (N = 9) und unterschied sich an P14 durch eine signifikant geringerer Zellzahl von der PBS-Gruppe (p = 0,031 für P14, p = 0,521 für P17; **Abb. 27** unten).

Aufgrund des avaskulären Einzelwertes von P21 der PBS-Gruppe war ein statistischer Vergleich mit den Effektorgruppen für diesen Zeitpunkt nicht möglich.





Vergleich zwischen der C5a-Gruppe (oben) und der NOX-Gruppe (unten) mit der PBS-Gruppe zum Untersuchungszeitpunkt P14, P17 und P21 (v.l.n.r.) (N = 1–24; vgl. **Tab. 9**). MW \pm SEM; *p < 0,05; ***p < 0,001. P, postnataler Tag; C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); N, Anzahl der Vergleiche zwischen den Daten der Gesamt- und den Daten der aktivierten CD11b-positiven Zellen; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes.

4.2.5.3. Gruppenvergleich innerhalb der Tuft-Zone

In der Tuft-Zone war der relative Anteil aktivierter an der Gesamtmenge CD11b-positiver Zellen an P17 und P21 in der C5a-Gruppe und der PBS-Gruppe vergleichbar groß (69% \pm 16%; N = 24 versus 69% \pm 6%; N = 32; p =0,966 für P17 und 64% \pm 11%; N = 12 versus 68% \pm 8%; N = 20; p =0,742 für P21; **Abb. 28** oben).

In der NOX-Gruppe betrug der relative Anteil aktivierter CD11b-positiver Zellen an der Gesamtmenge in der Tuft-Zone an P17 70% \pm 6% (N = 32) und an P21 48% \pm 10% (N = 17). Diese Werte waren ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich zu denen der PBS-Gruppe (p = 0,864 für P17, p = 0,107 für P21; **Abb. 28** unten).



Abb. 28 Vergleich des relativen Anteils aktivierter an der Gesamtmenge CD11b-positiver Zellen in Prozent in der Tuft-Zone von retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12).

Vergleich zwischen der C5a-Gruppe (oben) und der NOX-Gruppe (unten) mit der PBS-Gruppe zum Untersuchungszeitpunkt P17 (links) und P21 (rechts) (N = 1–24; vgl. **Tab. 9**). MW \pm SEM. P, postnataler Tag; C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); N, Anzahl der Vergleiche zwischen den Daten der Gesamt- und den Daten der aktivierten CD11b-positiven Zellen; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes.

4.2.6. Ausgemessene Auszählungsareale der Tuft-Zone zur Quantifizierung der aktivierten CD11b-positiven Zellen – Ein Nebenbefund

Die zur Datenhochrechnung für eine einheitliche Angabe der Zellzahl benötigten ausgemessene Tuft-Auszählungsareale (die das normale Auszählungsareal mit einer Größe von 0,15 mm² nicht erreichten), wurden in ihrer Größe ebenfalls statistisch ausgewertet.

Zum Zeitpunkt P17 waren die zur Quantifizierung der aktivierten CD11b-positiven Zellen ausgemessenen Tuft-Auszählungsareale in ihrer Ausdehnung signifikant kleiner in der C5a-Gruppe verglichen mit der PBS-Gruppe (12.766 μ m² ± 1.597 μ m²; N = 47 versus 26.891 μ m² ± 2.612 μ m²; N = 64; p < 0,001; **Abb. 29** oben links). An P21 waren die ausgemessenen Tuft-Auszählungsareale der C5a- und der PBS-Gruppe vergleichbar groß (11.242 μ m² ± 1.553 μ m²; N = 25 versus 10.511 μ m² ± 1.354 μ m²; N = 43; p = 0,733; **Abb. 29** oben rechts). In der NOX-Gruppe betrug die Größe der ausgemessenen Tuft-Auszählungsareale an P17 27.497 μ m² ± 3.079 μ m² (N = 64) und an P21 11.383 μ m² ± 1.499 μ m² (N = 35) und unterschied sich weder an P17 noch an P21 signifikant von der der PBS-Gruppe (p = 0,881 für P17, p = 0,667 für P21; **Abb. 29** unten).

Im zeitlichen Verlauf sank die Größe der ausgemessenen Tuft-Auszählungsareale vom Zeitpunkt P17 zum Zeitpunkt P21 signifikant für die PBS- und für die NOX-Gruppe (p < 0,001 für PBS und NOX), während die ausgemessenen Tuft-Auszählungsareale für die C5a-Gruppe sich von P17 zu P21 nicht signifikant veränderten (p = 0,539; **Abb. 30**).



Abb. 29 Vergleich der Größe der ausgemessenen Auszählungsareale der Tuft-Zone zur Quantifizierung der aktivierten CD11b-positiven Zellen in μm^2 in retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12).

Vergleich zwischen der C5a-Gruppe (oben) und der NOX-Gruppe (unten) mit der PBS-Gruppe zum Untersuchungszeitpunkt P17 (links) und P21 (rechts) (N = 47 (C5a), 64 (PBS) und 64 (NOX) für P17; N = 25 (C5a), 43 (PBS) und 35 (NOX) für P21). Skala der Y-Achse in 10.000 μ m²-Schritten. MW ± SEM; ***p < 0,001. P, postnataler Tag; C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); N, Anzahl der ausgemessenen Auszählungsareale pro Zeitpunkt; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes.



Abb. 30 Zeitlicher Verlauf der Größe der ausgemessenen Auszählungsareale der Tuft-Zone zur Quantifizierung der aktivierten CD11b-positiven Zellen in μm^2 in retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) innerhalb den einzelnen Injektionsgruppen.

Vergleich der Entwicklung von dem Untersuchungszeitpunkt P17 zu P21 in der NOX-Gruppe (grob gestrichelt), in der PBS-Gruppe (durchgezogene Linie) und in der C5a-Gruppe (fein gestrichelt) (N = 47 (C5a), 64 (PBS) und 64 (NOX) für P17; N = 25 (C5a), 43 (PBS) und 35 (NOX) für P21). Skala der Y-Achse in 10.000 μ m²-Schritten. MW ± SEM; ***p < 0,001. C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); NOX, NOX-D20 (Inhibierungsgruppe); P, postnataler Tag; N, Anzahl der ausgemessenen Auszählungsareale pro Zeitpunkt; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes.

4.2.7. Qualitative Evaluierung der Müller-Zellen

Die immunhistochemischen Färbungen zeigten eine GFAP-positive Gliose in der C5a- und der PBS-Gruppe, wobei das Signal (die Gliose) im zeitlichen Verlauf von P14 zu P17 sich leicht verstärkt hat (**Abb. 31**, grün, erste Zeile). Dass es sich dabei um eine Aktivierung der Müller-Zellen handelt, bewies das gleichzeitig positive Signal für Vimentin (**Abb. 31**, rot, zweite Zeile), was sich in der Vereinigung beider Kanäle (Merge, dritte Zeile) auf den Bildern gelb darstellte. Bei den Zellen, die sich im Merge nur GFAP-positiv darstellten, handelt es sich um hyperplastische Astrozyten. Ein positives Signal (sowohl GFAP als auch Vimentin) war in der äußeren Retina (ONL) an P17, nicht an P14, erkennbar (**Abb. 31**).

Aufgrund der Tatsache, dass in den Untersuchungen zu der avaskulären Fläche (vgl. Abschnitt **4.2.1**), der Gesamtzahl der CD11b-positiven Zellen (vgl. Abschnitt **4.2.3**) und den aktivierten CD11b-positiven Zellen (vgl. Abschnitt **4.2.4**) signifikante Unterschiede überwiegend nur zwischen der PBS- und C5a-Gruppe gefunden wurden, wurde auf die Analyse der NOX-Gruppe hinsichtlich der Müller-Zell-Aktivierung verzichtet.

91



Abb. 31 Vergleich der Aktivierung von GFAP- und Vimentin-exprimierenden Glia-Zellen (Astrozyten und Müller-Zellen) im retinalen Paraffinschnitt (4 µm Schichtdicke) der Maus nach Sauerstoffinduzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) zwischen der C5a- und PBS-Gruppe zum Untersuchungszeitpunkt P14 und P17.

Immunodetektion von GFAP (grün, erste Zeile) und Vimentin (rot, zweite Zeile) und beide Kanäle vereinigt (Merge, dritte Zeile). Vergleich zwischen den mit C5a-Injektionen behandelten (Spalte A und C) und den mit PBS-Injektionen behandelten Mäusen (Spalte B und D) zum Untersuchungszeitpunkt P14 (Spalten A und B) und P17 (Spalten C und D). Im Merge sind aktivierte Müller-Zellen in Gelb (sowohl GFAP- als auch Vimentin-positiv), aktivierte Astrozyten in Grün dargestellt (nur GFAP-positiv). Das positive Signal in den Außensegmenten der Photorezeptoren ist bedingt durch unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers. Zellkernfärbung (blau) mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (alle Aufnahmen). Maßstabsbalken entspricht 50 µm. P, postnataler Tag; C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); GCL, *Ganglion cell layer* (Ganglienzellschicht); INL, *Inner nuclear layer* (innere Körnerschicht); ONL, *Outer nuclear layer* (äußere Körnerschicht); OS, *Outer segments* (Außensegmente der Photorezeptoren). Die Zellkernfärbung mittels DAPI dient der Veranschaulichung der einzelnen Netzhautschichten. Zur übersichtlicheren Darstellung der GFAP- und Vimentin-positiven Proteinstrukturen, wurde die Immunodetektion von DAPI in den rechten zwei Dritteln der Abbildungen ausgeblendet.
4.3. Ergebnisse der genexpressionsanalytischen Untersuchungen

Die Genexpression des Komplementfaktors (C)3 war sowohl in der PBS-Gruppe als auch in der C5a-Gruppe signifikant höher verglichen mit Welpen, die in Umgebungsluft (Normoxia) gehalten wurden. Die reine OIR-Gruppe unterschied sich weder signifikant von der Normoxia-Gruppe, noch von den beiden Injektionsgruppen (PBS- und C5a-Gruppe) (**Tab. 10**, **Abb. 32** links).

Die Genexpression des Komplementfaktors C1q war in der PBS-, C5a- und auch der OIR-Gruppe signifikant höher im Vergleich zur Normoxia-Gruppe (**Tab. 10**, **Abb. 32** Mitte). Die C1q-Expression war auch hier zwischen der OIR-Gruppe und den zwei Injektionsgruppen vergleichbar groß.

Die Properdin-Expression der PBS- und der C5a-Gruppe war sowohl signifikant geringer im Vergleich mit der Normoxia-Gruppe als auch im Vergleich mit der OIR-Gruppe (**Tab. 10**, **Abb. 32** rechts). Zwischen der Normoxia-Gruppe und der OIR-Gruppe konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Für keines der drei untersuchten Gene konnte ein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression zwischen der PBS- und der C5a-Gruppe festgestellt werden (**Tab. 10**, **Abb. 32**).

Aufgrund der Tatsache, dass in den Untersuchungen zur avaskulären Fläche (vgl. Abschnitt **4.2.1**), den Gesamt-CD11b-positiven Zellen (vgl. Abschnitt **4.2.3**) und den aktivierten CD11bpositiven Zellen (vgl. Abschnitt **4.2.4**) signifikante Unterschiede überwiegend nur zum Zeitpunkt P17 und zwischen der PBS- und C5a-Gruppe gefunden wurden, wurde auf die Analyse der Zeitpunkte P14 und P21 und die Analyse der NOX-Gruppe komplett verzichtet.

Ergebnisse



Abb. 32 Vergleich der relativ quantifizierten mRNA-Expression verschiedener Komplementproteine in der Retina der Maus zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen (Sauerstoff-induzierter Retinopathie mit und ohne intraperitoneale Injektion) und der unbehandelten Gruppe bzw. den Versuchstiergruppen untereinander zum Untersuchungszeitpunkt P17.

Quantitative PCR zur Untersuchung der C3-mRNA-Expression (links), der C1q-mRNA-Expression (Mitte) und der Properdin-mRNA-Expression (rechts) in der Retina nach alleiniger Sauerstoffinduzierter Retinopathie (OIR) (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) und nach Sauerstoffinduzierter Retinopathie plus PBS- (OIR+PBS) bzw. plus C5a-Injektionen (OIR+C5a) verglichen mit in Umgebungsluft gehaltenen Mäusen (normoxia) zum Untersuchungszeitpunkt P17 (N = 4 für OIR, OIR+PBS und OIR+C5a; N = 7 für normoxia). MW \pm SEM; *p < 0,05; **p < 0,01. 2^{- Δ CT}, Wert der relativ quantifizierten mRNA-Expression (vgl. Abschnitt **3.2.8.5**); GOI, *Gene of interest*; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; C3, Komplementfaktor 3; C1q, Komplementfaktor 1q; OIR, Sauerstoff-induzierte Retinopathie; C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); N, Anzahl der ausgewerteten Retinae pro Zeitpunkt; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes. **Tab. 10** Übersicht: Vergleich der relativ quantifizierten mRNA-Expression der Komplementproteine C3 (oberer Abschnitt der Tabelle), C1q (mittlerer Abschnitt der Tabelle) bzw. Properdin (unterer Abschnitt der Tabelle) in der Retina der Maus zwischen der Normoxia-Kontrollgruppe (normoxia) und den Versuchstiergruppen (Sauerstoff-induzierter Retinopathie mit (OIR+C5a, OIR+PBS) und ohne intraperitonealen Injektionen (OIR)) bzw. den Versuchstiergruppen untereinander zum Untersuchungszeitpunkt P17.

GOI	Gruppe	N	MW (2 ^{-ΔCT})	±SEM (2 ^{-ΔCT})	<i>p</i> Wert normoxia vs OIR	<i>p</i> Wert normoxia vs OIR+PBS	<i>p</i> Wert normoxia vs OIR+C5a	<i>p</i> Wert OIR vs OIR+PBS	<i>p</i> Wert OIR vs OIR+C5a	<i>p</i> Wert OIR+PBS vs OIR+C5a
C3	normoxia	7	6,1x10 ⁻⁴	7,3x10 ⁻⁵						
	OIR	4	1,9x10 ⁻³	3,9 x10 ⁻⁴	0,052	0,006	0,011	0,206	0,246	0,728
	OIR+PBS	4	1,2x10 ⁻³	1,1 x10 ⁻⁴						
	OIR+C5a	4	1,3x10 ⁻³	1,3 x10 ⁻⁴						
C1q	normoxia	7	1,0x10 ⁻³	3,7 x10⁻⁵	0,030	0,004	0,027	0,138	0,238	0,500
	OIR	4	3,5x10⁻³	6,1 x10 ⁻⁴						
	OIR+PBS	4	2,2x10 ⁻³	1,4 x10 ⁻⁴						
	OIR+C5a	4	2,5x10 ⁻³	3,5 x10 ⁻⁴						
Properdin	normoxia	7	1,2x10 ⁻³	1,8 x10 ⁻⁴	0,483	0,015	0,013	0,018	0,016	0,824
	OIR	4	1,0x10 ⁻³	1,1 x10 ⁻⁴						
	OIR+PBS	4	5,7x10 ⁻⁴	5,1 x10 ⁻⁵						
	OIR+C5a	4	5,5x10 ⁻⁴	5,2 x10 ⁻⁵						

GOI, *Gene of interest* (zu untersuchende mRNA-Expression); C3, Komplementfaktor 3; C1q, Komplementfaktor 1q; C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); normoxia, in Umgebungsluft gehaltene Mäuse; OIR, Mäuse mit Sauerstoff-induzierter Retinopathie (= 75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12); OIR+PBS, Mäuse mit Sauerstoff-induzierter Retinopathie und täglichen intraperitonealen PBS-Injektionen von P12-P16; OIR+C5a, Mäuse mit Sauerstoff-induzierter Retinopathie und täglichen intraperitonealen C5a-Injektionen von P12-P16; N, Anzahl der ausgewerteten Retinae pro Zeitpunkt; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes; $2^{-\Delta CT}$, Wert der relativ quantifizierten mRNA-Expression (vgl. Abschnitt **3.2.8.5**); fett gedruckt, signifikante *p* Werte (p < 0,05).

4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Folgende <u>allgemeine</u>, <u>gruppenübergreifende Ergebnisse</u> haben die Untersuchungen hervorgebracht:

1. Quantifizierung der avaskulären Fläche:

Die in der Literatur beschriebene Revaskularisation der avaskulären Fläche im OIR-Modell war deutlich im zeitlichen Verlauf der untersuchten Zeitpunkte P14, P17 und P21 zu sehen.

2. Quantifizierung der Gesamtzahl CD11b-positiver Zellen:

In der avaskulären Zone waren signifikant weniger Zellen als in der vaskulären (P14 und P17) und als in der Tuft-Zone (P17). Zum Zeitpunkt P21 gab es mit einer Ausnahme keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vaskularisierungszonen.

Die Zelldichte war in der inneren Schicht durchgehend höher. Im Vergleich waren die signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Vaskularisierungszonen in der äußeren Schicht wesentlich größer als in der inneren Schicht. Der Unterschied innerhalb der vaskulären Zone zwischen der inneren und äußeren Schicht nahm im zeitlichen Verlauf von P14 bis P21 deutlich ab, wobei die Zellzahl in der inneren Schicht ab-, die in der äußeren Schicht zunahm.

3. Quantifizierung der aktivierten CD11b-positiven Zellen:

Die Anzahl der aktivierten CD11b-positiven Zellen war in der avaskulären (P14 und P17, für NOX auch P21) und in der Tuft-Zone (P17 und P21) signifikant höher im Vergleich zum normal vaskularisierten peripheren Netzhautbereich. Aktivierte CD11b-positive Zellen waren vorrangig in der Tuft- und der avaskulären Zone, dagegen kaum in der vaskulären Zone vorhanden. In der avaskulären Zone kamen sie überwiegend in räumlich deutlich begrenzten Zellansammlungen vor.

4. Relativer Anteil aktivierter an der Gesamtzahl CD11b-positiver Zellen:

Zu allen Zeitpunkten war der Anteil aktivierter CD11b-positiver Zellen an der Gesamtzahl in der avaskulären Zone deutlich signifikant höher als in der vaskulären Zone. Ebenso traf dies an P17 und P21 für den Vergleich zwischen der Tuft- und der vaskulären Zone zu. Der Anteil der aktivierten CD11b-positiven Zellen war in der vaskulären Zone zu allen untersuchten Zeitpunkten sehr gering, stieg aber im zeitlichen Verlauf an.

- Qualitative Evaluierung der Müller-Zellen:
 Das verwendete OIR-Modell hat eine Gliose der Müller-Zellen ausgelöst.
- 6. Genexpressionsanalytische Untersuchungen der Komplementproteine: Im Vergleich zu Mäusen, die ausschließlich in Umgebungsluft gehalten wurden, hatten die Injektionsgruppen (OIR+PBS und OIR+C5a) eine signifikant höhere mRNA-Expression von C3 und C1q. Die Properdin-mRNA-Expression der Injektionsgruppen war nicht nur im Vergleich zur normoxia-Gruppe, sondern auch im Vergleich zur OIR-Gruppe,

die keine Injektionen bekommen hatten, signifikant reduziert.

Im Speziellen haben die <u>C5a-Injektionen</u> zu folgenden Unterschieden verglichen mit der PBS-Gruppe geführt (Besonderheiten der NOX-Gruppe werden ebenfalls aufgeführt):

- 1. Die avaskuläre Zone war zum Zeitpunkt P17 signifikant kleiner.
- Sowohl die Gesamt-Tuftfläche, als auch die im Rahmen der Quantifizierung der aktivierten CD11b-positiven Zellen ausgemessenen Tuftbereiche waren an P17 signifikant kleiner.
- 3. Es waren signifikant weniger CD11b-positive Zellen in der avaskulären (P17) und in der Tuft-Zone (P17 und P21; gilt an P21 in gleichem Maße auch für die NOX-Gruppe) vorhanden.
- 4. Es befanden sich signifikant weniger aktivierte CD11b-positive Zellen in der avaskulären Zone (P14; gilt in gleichem Maße auch für die NOX-Gruppe) und in der Tuft-Zone (P17).
- 5. Der Anteil aktivierter CD11b-positiver Zellen war signifikant geringer in der avaskulären Zone zum Zeitpunkt P14 (gilt in deutlich geringerem Maße auch für die NOX-Gruppe).
- 6. Das Ausmaß der Müller-Zell-Gliose wurde durch die C5a-Injektionen nicht beeinflusst.
- 7. Die C5a-Injektionen hatten keinen Effekt auf die mRNA-Expression von C3, C1q und Properdin.

Tab 11. Ergebnisübersicht über die durch die C5a-Injektionen hervorgerufenen signifikanten Unterschiede im Vergleich mit der PBS-Gruppe.

Untersuchung	Zeitpunkt	VZ	Signifikante Unterschiede der C5a-Injektionen (im Vergleich mit der PBS-Gruppe)
Quantifizierung der avaskulären Fläche	P17	_	ſ
Quantifizierung der Gesamt-Tuftfläche	P17	Ι	₩
Ausgemessene Auszählungsareale der Tuft-Zone (bei Quantifizierung der aktivierten CD11b-positiven Zellen)	P17	Ι	₩
Quantifizierung der Gesamt-CD11b-positiven Zellen	P17	А	₩
	P17, P21	Т	₩
Quantifizierung der aktivierten CD11b-positiven Zellen	P14	А	₩
	P17	Т	₩
Relativer Anteil der aktivierten an der Gesamtzahl CD11b-positiver Zellen	P14	A	Ų

VZ, Vaskularisierungszone; C5a, Komplementfaktor 5a (Supplementierungsgruppe); PBS, PBS, phosphatgepufferte Salzlösung (Kontrollgruppe); P, postnataler Tag; CD11b, Cluster of differentiation 11b; A, avaskuläre Zone; T, Tuft-Zone. Aufgezeigt sind ausschließlich die Untersuchungsergebnisse, die zu signifikanten Unterschieden zwischen der C5a- und der PBS-Gruppe geführt haben.

5.1. Einfluss von C5a auf die Pathologie im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie

5.1.1. Histomorphologie

In der vorliegenden Studie konnten die verschiedenen Strukturen und Zellen des Auges im HE-Schnitt standardisiert dargestellt werden. Es zeigten sich die für die Sauerstoffinduzierten Retinopathie (OIR) typischen Pathologien der zentralen Vasoobliteration und der epiretinalen Neovaskularisationen. Die typische Schichtung der Retina und die Morphologie der retinalen Körnerschichten blieben im Rahmen der OIR entsprechend der vorhandenen Literatur (Downie et al 2007) in allen Injektionsgruppen erhalten. Im Gegensatz dazu konnte die in der Literatur beschriebene Ausdünnung (Downie et al 2007, Mezu-Ndubuisi et al 2014, Vessey et al 2011) und reduzierte Vaskularisierung der Retina (Downie et al 2007) in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden. Die in der vorliegenden Studie anhand von retinalen Flachpräparaten zwischen den einzelnen Injektionsgruppen festgestellten Unterschiede bezüglich der retinalen Vasoobliteration und Neovaskularisation (vgl. Abschnitte **4.2.1**, **4.2.2** und **4.2.6**) konnten im Rahmen der histomorphologischen Untersuchung an HE-Schnitten demnach nicht dargestellt werden.

Im Gegensatz zu einem retinalen Flachpräparat, das durch seine Aufsicht das gesamte retinale Gewebe darstellt, zeigt ein nur wenige µm dickes Schnittpräparat lediglich einen sehr kleinen Ausschnitt eines Gewebes. Der Informationsgehalt eines einzelnen HE-Schnittes oder auch einer Serie von ausgewerteten Schnittpräparaten ist dementsprechend auf die Gesamtheit der Netzhaut bezogen wesentlich geringer und unter Umständen weniger wahrheitsgemäß als der eines retinalen Flachpräparates. Aus diesem Grunde wird zur Quantifizierung retinaler Neovaskularisation heute die Verwendung retinaler Flachpräparate empfohlen (Connor et al 2009, Lange et al 2009, Stahl et al 2010b) und nicht mehr die in der Vergangenheit viel genutzten Schnittpräparate (Aiello et al 1995b, Langer et al 2010, Pierce et al 1995, Smith et al 1999, Smith et al 1994). Die Reproduzierbarkeit und somit Vergleichbarkeit von erhobenen Daten zur retinalen Vasoobliteration und Neovaskularisation wird so durch den Einsatz von retinalen Flachpräparaten erheblich beeinflusst. Der Trend in der aktuellen Literatur, dass Informationsgehalt von HE-(Serien-)Schnitten sich von dem retinaler Flachpräparate unterscheidet, konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden.

5.1.2. Avaskuläre Fläche und Tuft-Ausbildung

Aufgrund der engen gegenseitigen Abhängigkeit bei der Ausbildung der retinalen Vasoobliteration und Neovaskularisation – ersteres bestimmt den zeitlichen Verlauf und die Schwere des letzteren (vgl. Ausführungen in Abschnitt **1.3** und **1.4**) – werden die Ergebnisse zur Untersuchung der avaskulären Fläche und Tuft-Ausbildung an dieser Stelle gemeinsam diskutiert.

Die pathologischen Erscheinungen der Vasoobliteration und der Neovaskularisation waren in der C5a-Gruppe verglichen mit der PBS-Gruppe zum Zeitpunkt P17 in ihrem Ausmaß deutlich reduziert: Die Größe der avaskulären Fläche war unter C5a-Injektion um ein Drittel, die der Gesamt-Tuftfläche um zwei Drittel kleiner. Weniger als halb so groß waren die ausgemessenen Tuft-Auszählungsareale. Bezüglich der Zeitpunkte P14 und P21 wurden keine Unterschiede festgestellt.

Die Revaskularisation der avaskulären Fläche dauert laut Literatur bis zum Zeitpunkt P25 an und ist dann (fast) komplett abgeschlossen (Lange et al 2009, Stahl et al 2010b). In der vorliegenden Studie war die avaskuläre Fläche sowohl in der C5a- als auch in der PBS-Gruppe bereits zum Zeitpunkt P21 fast vollständig revaskularisiert. Da es noch keine Unterschiede an P14 gab, lässt dies den Rückschluss zu, dass unter C5a-Injektion die Revaskularisation schneller abläuft, d.h. dass C5a eine direkte oder indirekte <u>pro</u>-angiogene Wirkung <u>bezüglich der Revaskularisation</u> haben könnte. Im Gegensatz dazu hatten Langer et al. im Mausmodell der OIR dargestellt, dass die C5a-C5aR-Achse des Komplementsystems <u>anti</u>-angiogen agiert, allerdings <u>bezüglich der pathologischen Neovaskularisation</u> (Langer et al 2010). Langer et al. hatten entgegen der in der Literatur vorhandenen Empfehlungen, im Rahmen des OIR-Modells immer gemeinsam Daten zur Vasoobliteration und zur Neovaskularisation zu veröffentlichen (Stahl et al 2010b), keine Untersuchungen bezüglich der Vasoobliteration getätigt (Langer et al 2010).

Der Ablauf der Komplementkaskade ist geprägt von einer großen Dynamik. Die Komplementproteine sind auf die dynamischen Umlagerungen bezüglich ihrer Amplifizierungsdomänen und Komplementrezeptor-Bindungsstellen angewiesen, um ihre spezifischen Funktionen ausüben zu können (Ricklin et al 2010). Die endogenen Anaphylatoxine des Komplementsystems entfalten ihre Wirkungen in einem komplexen System aus Aktivatoren und Oberflächenreaktionen <u>innerhalb</u> der Komplementkaskade (LeFriec et al 2009, Ricklin et al 2010). Im Gegensatz dazu ist das injizierte rekombinante C5a von diesem dynamischen System isoliert, weshalb dieses in seiner Wirkung als schwächer einzustufen ist als das frisch endogen gespaltene C5a. Das könnte erklären weshalb die Unterschiede bezüglich der Größe der avaskulären Fläche in der vorliegenden

Studie erst nach fünf und nicht schon nach zwei Injektionen/ Tagen festzustellen waren.

Das in der vorliegenden Studie systemisch injizierte C5a hat lokal im Innern des Auges einen Effekt hervorgerufen. Dafür muss es entweder die Blut-Retina-Schranke überwunden oder von außen, beispielsweise über Rezeptoren, indirekt Einfluss auf die Angiogenese genommen haben. Laut der Literatur führt das (Ratten-)Model der OIR alleine schon zu einem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke und einer erhöhten vaskulären Permeabilität in der Netzhaut (Xu & Le 2011, Zhang et al 2005b), was einen Direktübertritt von C5a möglich machen könnte. In mehreren Studien konnte festgestellt werden, dass die Integrität der Blut-Hirn-Schranke von C5a direkt beeinflusst wird (Jacob et al 2011, Jacob et al 2010b, Mahajan et al 2015). Eine direkte Beeinflussung der Zellen im Innern des Auges erscheint also prinzipiell möglich. Vielfach wurde gezeigt, dass Endothelzellen über einen C5a-Rezeptor verfügen (Gasque et al 1997, Haviland et al 1995, Hunt et al 2005, Jacob et al 2010b, Laudes et al 2002, Mahajan et al 2015, Romay-Penabad et al 2007). Einen direkten Einfluss von C5a auf die Endothelzellen bezüglich der Angiogenese konnten Langer et al. in einem in vitro Versuch mit humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) allerdings nicht nachweisen (Langer et al 2010). In dieser Studie von Langer et al. konnte aber gezeigt werden, dass C5a die Fähigkeit hat, direkt auf Makrophagen einzuwirken und diese zu einem proinflammatorischen Phänotyp polarisieren kann (Langer et al 2010), welcher mit anti-angiogenen Aktivitäten in Verbindung gebracht wird (Ferguson & Apte 2008, Kelly et al 2007). Wie bereits oben erwähnt wurde in dieser OIR-Studie von Langer et al. allerdings nicht die Vasoobliteration betrachtet, sondern isoliert der Komplementeinfluss auf die Neovaskularisation untersucht (Langer et al 2010).

In *in vivo* und *in vitro* Studien zur Erforschung der Pathomechanismen der Altersbedingten Makuladegeneration, konnte eine durch C5a bzw. das Komplementsystem hervorgerufene VEGF-Freisetzung aus dem retinalen Pigmentepithel (RPE) beobachtet werden (Nozaki et al 2006, Thurman et al 2009). Das RPE ist an dem pathologischen Geschehen der OIR nicht beteiligt, weshalb ein solcher Vergleich nur mit Vorsicht gezogen werden kann. Da die RPE-Zellen über einen C5a-Rezeptor (C5aR) verfügen (Fukuoka & Medof 2001), erscheint es möglich, dass das im OIR-Modell systemisch zirkulierende C5a ebenfalls zu einer erhöhten VEGF-Expression des RPE führen und folglich auf diesem Wege zu einer schnelleren Revaskularisation der avaskulären Fläche beigetragen haben könnte. Dass aber auch eine Hemmung des alternativen Komplementpfades zu einer erhöhten VEGF-Expression führen kann, konnten Alawieh et al. in einem Schlaganfall-Mausmodell kürzlich zeigen (Alawieh et al 2015). Das Komplementsystem kann demnach sowohl pro- als auch anti-angiogen agieren.

Rezeptoren für C5a konnten im zentralen Nervensystem für Endothelzellen, Neurone, Mikroglia-Zellen und Astrozyten nachgewiesen werden (Gasque et al 1997, Lacy et al 1995, Osaka et al 1999a). Die C5aR-Expression wird während eines inflammatorischen Geschehens in den Endothelzellen, Neuronen und Astrozyten erhöht (Gasque et al 1997, van Beek et al 2003).

Von mehreren Arbeitsgruppen wurde im Rahmen von OIR-Studien eine Beteiligung retinaler Glia-Zellen an der Blutgefäßbildung in der Netzhaut nachgewiesen (Checchin et al 2006, Dorrell et al 2010, Ritter et al 2006). Es wird postuliert, dass Astrozyten während der Revaskularisation das Wachstum neuer Blutgefäße entlang einer Matrize leiten. In Abwesenheit oder Reduktion dieser Zellen entstehen desorganisierte Blutgefäße und pathologische Neovaskularisation (Dorrell et al 2010). In Abhängigkeit des verwendeten Mausstammes reagieren Astrozyten und Mikroglia-Zellen verschieden stark auf die OIR. Astrozyten und Mikroglia-Zellen von albinotischen Mäusen des Stammes BALB/cByJ überleben im Gegensatz zu denen des pigmentierten Stammes C57BL/6J die Phase der relativen Hypoxie (ab P12) in der avaskulären Fläche; eine komplette Revaskularisation ist bereits an P17 erreicht und es kommt zu keinerlei Ausbildung pathologischer Neovaskularisation (Dorrell et al 2010). Das heißt, dass allein das verwendete Mausmodell in der vorliegenden Studie schon zu Gliazellverlusten geführt haben könnte. Diese Beobachtungen von Dorrell et al. (Dorrell et al 2010) lassen den Rückschluss zu, dass die Anzahl oder zumindest die Präsenz der Astrozyten und Mikroglia-Zellen den Ausbildungsgrad der Vasoobliteration und Neovaskularisation beeinflussen kann und eine Beeinflussung des Geschehens durch C5a möglich erscheint. Als Möglichkeiten zum Schutz dieser Zellen und somit auch zur Förderung der Revaskularisation avaskulärer Netzhautbereiche gelten nicht nur myeloide Progenitorzellen, endotheliale Progenitorzellen und Antioxidantien, sondern auch VEGF (über intravitreale Injektionen in spezifischen Dosen verabreicht) (Checchin et al 2006, Dorrell et al 2010, Ritter et al 2006). Somit erscheinen verschiedene Angriffspunkte des C5a – Makrophagen, Gliazellen oder VEGF-Induktion – für möglich, die zu einer signifikant kleineren avaskulären Fläche zum Untersuchungstag P17 in der C5a-Gruppe verglichen mit der PBS-Gruppe geführt haben.

Es ist bekannt, dass über die Produktion von Wachstumsfaktoren während der relativen hypoxischen Phase der OIR eine enge gegenseitige Abhängigkeit zwischen der Vasoobliteration und der Neovaskularisation besteht, wobei ersteres den zeitlichen Verlauf und die Schwere des letzteren bestimmt (Stahl et al 2010b). Eine schnellere Revaskularisation bedeutet für das Netzhautgewebe eine weniger starke Hypoxie und diese wiederum bedingt eine weniger starke Tuft-Ausbildung (Ritter et al 2006). Die gleichzeitige

Reduzierung der avaskulären Fläche und der Tufts (Gesamt-Tuftfläche und Größe der Auszählungsareale) der vorliegenden Studie stimmt demnach mit den Aussagen von Stahl et al. und Ritter et al. überein (Ritter et al 2006, Stahl et al 2010b). Dass C5a von vorn herein über den indirekten Weg der geringeren Vasoobliteration zu einer geringeren Tuft-Ausbildung geführt hat, erscheint nach den Erkenntnissen von Stahl et al. und Ritter et al. plausibel (Ritter et al 2006, Stahl et al 2010b). Eine zweite oder auch zusätzliche Möglichkeit ist, dass C5a eine schnellere Tuft-Regression unterstützt. Verschiedene Studien konnten eine Beteiligung des Komplementsystems und/ oder der Makrophagen und Mikroglia-Zellen an der Tuftregression zeigen (Davies et al 2008, Langer et al 2010, Sweigard et al 2014). Langer et al. konnten darstellen, dass der anti-angiogene Einfluss von C5a bezüglich der pathologischen Neovaskularisation Makrophagen-vermittelt erfolgt (Langer et al 2010). Die Methodik glich im Wesentlichen der der vorliegenden Studie, wodurch die Ergebnisse vergleichbar und die Erkenntnisse daraus durchaus übertragbar sind. Dass sowohl Makrophagen also auch C5a Apoptose induzieren können ist bekannt (Davies et al 2008, Flierl et al 2008a, Hu et al 2014, Lang et al 1994, Lobov et al 2005, Pavlovski et al 2012). Laut Langer et al. gibt es einen funktionellen Zusammenhang zwischen den retinalen Makrophagen und C5a bezüglich der Tuftregression (Langer et al 2010). Dass ein vergleichbarer Zusammenhang ebenfalls bezüglich der Revaskularisation der avaskulären Fläche zutrifft, erscheint durchaus möglich. Um mehr Erkenntnisse dazu zu sammeln, wurde im zweiten Teil der vorliegenden Studie die Anzahl und Verteilung von (aktivierten) CD11bpositiven Zellen untersucht.

5.1.3. Verteilung und Aktivierung der CD11b-positiven Zellen

Gruppenübergreifend waren in der avaskulären Zone signifikant weniger CD11-positive Zellen als in der vaskulären (P14 und P17) und als in der Tuft-Zone (P17); zum Zeitpunkt P21 war die Zellzahl in allen drei Vaskularisierungszonen vergleichbar groß. Die Zelldichte war in der inneren Schicht durchgehend höher, wobei sich dieser Unterschied in der vaskulären Zone gruppenübergreifend von P14 zu P21 hin fast ausglich (Zelldichte in der inneren Schicht sank, gleichzeitig stieg die in der äußeren Schicht). Im zeitlichen Verlauf (von P14 bis P21) waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Vaskularisierungszonen in der äußeren Schicht wesentlich größer als in der inneren.

Die C5a-Injektionen führten zu einer signifikanten Reduktion der CD11b-positiven Zellen in der avaskulären (P17) und in der Tuft-Zone (P17 und P21).

Aus den Ergebnissen lässt sich ein Zusammenhang zwischen der retinalen Blutgefäßversorgung und der Dichte der CD11b-positiven Zellen schließen. Da wo sich Blutgefäße befinden – sowohl physiologische (vaskuläre Zone) als auch pathologische (Tuft-

Zone) – ist die Zelldichte deutlich höher als in der avaskulären Zone. Dass zum Zeitpunkt P21 (Revaskularisation zu diesem Zeitpunkt fast abgeschlossen) in der avaskulären Zone wieder eine vergleichbare Zahl CD11b-positiver Zellen wie in der Tuft- und der vaskulären Zone waren, unterstützt diese Annahme. Vergangene Studien konnten zeigen, dass die ischämische proliferative Retinopathie mit dem Verlust von Mikroglia-Zellen assoziiert ist (Checchin et al 2006, Dorrell et al 2010, Ritter et al 2006).

Eine Überwindung der Blut-Retina-Schranke von knochenmark-stämmigen monozytären Vorläuferzellen geschieht über den inneren/ superfiziellen Blutgefäßplexus der Netzhaut (Xu et al 2007), der aber bereits 24 Stunden nach Beginn der hyperoxischen Phase obliteriert (Stahl et al 2010b). Im Rahmen der OIR wurden ein Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke und eine erhöhte retinale Blutgefäßpermeabilität beobachtet (Xu & Le 2011, Zhang et al 2005b). Blutgefäßerkrankungen stehen werden in Zusammenhang mit der Schädigung von Gliazellen und Neuronen gebracht (Dorrell et al 2010, Fletcher et al 2010). CD11bpositive Mikroglia-Zellen agieren neuroprotektiv und beseitigen Pathogene und nekrotisches Gewebe (Kettenmann et al 2011, Kim & de Vellis 2005, Petersen & Dailey 2004, Vilhardt 2005). Unterstützend werden Monozyten in das geschädigte zentrale Nervensystem oder die Netzhaut rekrutiert, wenn die Schutzbarrieren verletzt und inflammatorische Chemokine exprimiert werden (Chen et al 2012, Mildner et al 2007). C5a ruft eine erhöhte Expression von inflammatorischen Zytokinen durch das RPE hervor (Fukuoka & Medof 2001, Fukuoka et al 2003) und fördert so auch auf diesem Wege die Zellrekrutierung. Neben dem Hypoxiebedingten Zelltod (Dorrell et al 2010) könnte demnach auch eine geringere oder zeitverzögerte Zellrekrutierung in der avaskulären und/ oder eine erhöhte Zellrekrutierung in der Tuft- und vaskulären Zone in der Reduktion der CD11b-positiven Zellen begründet sein. Demzufolge ist es ebenfalls denkbar, dass es sich bei den in der avaskulären Zone vorhandenen CD11b-positiven Zellen vor allem um gewebsständige Mikroglia-Zellen handelt. Das Ziel der vorliegenden Studie bestand allerdings nicht in der Differenzierung zwischen gewebsständigen Mikroglia-Zellen und rekrutierten Makrophagen, sondern in der Quantifizierung der gesamten retinalen CD11b-positiven Zellpopulation.

Die Verteilung der CD11b-positiven Zellen in den zwei Schichten zeigt, dass vor allem die Zellen der äußeren Schicht für die Unterschiede zwischen den einzelnen Vaskularisierungszonen verantwortlich sind. Unterschiede waren in der äußeren Schicht zu allen Untersuchungszeitpunkten festzustellen wobei die Zelldichte in der vaskulären Zone am größten, in der avaskulären am geringsten war. Die Zellzahl in der inneren Schicht ist deutlich höher und konstanter, was Fischer et al. und Crespo-Garcia et al. durch ihre Untersuchungen bestätigen (Crespo-Garcia et al 2015, Fischer et al 2011). Lediglich zum Zeitpunkt P17 – dem Zeitpunkt des stärksten Tuft-Ausmaßes (Connor et al 2009, Lange et al

2009) – konnte in der äußeren Schicht eine höhere Zelldichte in der Tuft-Zone im Vergleich mit der avaskulären und vaskulären Zone festgestellt werden. Die Beobachtung deutet auf eine Orientierung der CD11b-positiven Zellen in Richtung der epiretinalen Neovaskularisationen hin. Die erhöhte Zellzahl in der äußeren Schicht der vaskulären Zone zum Zeitpunkt P21 könnte auf eine Zellumverteilung nach vollendeter Tuftregression und/ oder Revaskularisation zurückzuführen sein. Fischer et al. hingegen beurteilten eine Beteiligung von Mikroglia-Zellen an der Tuftregression als kritisch. Aufgrund der Beobachtung einer reduzierten Mikroglia-Zelldichte in der äußeren Schicht der avaskulären Retina während der hypoxischen Phase der OIR hielten Fischer et al. eine Beteiligung der Mikroglia-Zellen an der Revaskularisation für wahrscheinlicher (Fischer et al 2011).

Die Migration und Infiltration von Immunzellen wie den Mikroglia-Zellen, Monozyten und Makrophagen, die über einen C5a-Rezeptor verfügen, wird durch C5a gefördert (Alawieh et al 2015, Gasque et al 1997, Klos et al 2009, Zhou 2012). Dadurch dass C5a im Rahmen dieser Studie nicht lokal ins Auge, sondern systemisch intraperitoneal appliziert wurde, könnte die Reduktion der CD11b-positiven Zellen in der Netzhaut durchaus auch in Zusammenhang mit einer Auswanderung von CD11b-positiven Makrophagen an den Ort der Injektion stehen. In der Bauchhöhle entsteht kurzfristig durch die gesetzte Injektion ein hoher C5a-Gradient; der Einstich und die Injektionslösung an sich setzen zusätzliche Entzündungsreize, was eine Rekrutierung von C5aR-positiven Neutrophilen und Makrophagen zur Folge haben kann (Ehrengruber et al 1994, Gasque et al 1997). Die Expression und Aktivität von CD11b/CD18 wird nach Neutrophilen-Aktivierung durch C5a stark erhöht (Kishimoto et al 1989, Monk et al 1994). Zusätzlich haben Neutrophile das Potential, am Entzündungsort C3 und Properdin auszuschütten (Liszewski et al 2013, Wirthmueller et al 1997). Nicht nur C5a, sondern auch C3a rekrutiert Makrophagen (Nozaki et al 2006, Wu et al 2016), die dementsprechend im Szenario der vorliegenden Studie dann nicht mehr ins Auge rekrutiert werden könnten.

Das injizierte C5a verteilt sich schnell, gelangt (auch) in das intravasale System und fördert noch weiter die OIR-bedingte erhöhte Durchlässigkeit der Blutgefäße (Guo & Ward 2005, Klos et al 2009) und somit potentiell auch die der Blut-Retina-Schranke. Der Übertritt von C5a in das Auge hinein, aber auch der Austritt von Makrophagen aus dem Auge heraus in Richtung des C5a-Gradienten wird so erleichtert.

Durch die PBS-Injektion wird sicher auch ein Entzündungsreiz gesetzt. Aber dadurch, dass das PBS kein Effektor-Molekül beinhandelt, löst dieses vermutlich keine vergleichbar starke Reaktion wie das C5a aus. Ob die Zellreduktion primär auf eine C5a-bedingte Zellauswanderung zurückzuführen ist, bleibt im Rahmen dieser Studie ungeklärt. Um dies herauszufinden müsste in zukünftigen Studien das C5a lokal intravitreal appliziert werden.

Auch wenn es als gesichert gilt, dass CD11b-positive Mikroglia-Zellen als eine Aufgabe die Phagozytose von Zelldebris haben, scheint eine zweite wichtige Aufgabe die Beteiligung an der gerichteten retinalen Blutgefäßbildung zu sein (Checchin et al 2006). Eine Beteiligung von Mikroglia-Zellen und Makrophagen an der (retinalen) Blutgefäßbildung – physiologischer und pathologischer – konnte vielfach gezeigt werden (Checchin et al 2006, Dorrell et al 2010, Langer et al 2010, Lingen 2001, Polverini 1996, Ritter et al 2006, Shen et al 2007, Sunderkötter et al 1994). Die von anderen Arbeitsgruppen bereits beschriebene räumliche Nähe der CD11b-positiven Zellen zu den pathologischen Neovaskularisationen der OIR (Davies et al 2006, Fischer et al 2011) konnte im Rahmen der vorliegenden Studie bestätigt werden. Langer et al. konnten zeigen, dass Makrophagen unter C5a-Einfluss einen antiangiogenen Phänotyp annehmen und so an der Tuftregression direkt beteiligt sind (Langer et al 2010). Die C5a-Injektionen führten in der vorliegenden Studie zu einer schnelleren Revaskularisation der avaskulären Fläche und zu einer schnelleren Tuftregression unter einer verringerten Anzahl von CD11b-positiven Zellen. Eine reduzierte OIR-Pathologie scheint demnach zwar mit der Präsenz, aber nicht proportional mit der Dichte der CD11bpositiven Zellen assoziiert zu sein. Die Untersuchungen von Fischer et al. bestätigen diese Hypothese und postulieren stattdessen, dass die Aktivierung der retinalen Mikroglia-Zellen mit der Ausbildung retinaler Neovaskularisation korreliert (Fischer et al 2011). Es ist denkbar, dass C5a zu einer vermehrten Aktivierung der CD11b-positiven Zellen führt (Gasque et al 1997, Klos et al 2009). Eine alternative Möglichkeit wäre zudem, dass das C5a über einen anderen, noch unbekannten Weg die OIR-Pathologie direkt reduziert und somit sekundär, als Folge daraus, weniger Monozyten rekrutiert werden "müssen".

Der aktivierte Phänotyp der CD11b-positiven Zellen kam gruppenübergreifend primär in den pathologisch vaskularisierten Bereichen (avaskuläre und Tuft-Zone) vor. Dabei konnten zwischen diesen beiden Zonen keine quantitativen Unterschiede festgestellt werden. Allerdings kamen die aktivierten CD11b-positiven Zellen im avaskulären Bereich vor allem in räumlich begrenzten Zellansammlungen vor. Demnach konnte auch durch die Auszählung der aktivierten CD11b-Zellen keine ausschließliche Korrelation zwischen dem aktivierten Phänotyp und der OIR-Aktivitätszone (Tuft-Zone) festgestellt werden. Bei dem Großteil der CD11b-positiven Zellen in der avaskulären und in der Tuft-Zone handelte es sich zu allen untersuchten Zeitpunkten um morphologisch aktivierte Zellen. Der Anteil in der vaskulären Zone war zu allen Zeitpunkten sehr gering, stieg im zeitlichen Verlauf leicht an, während er in der avaskulären und Tuft-Zone sank. Diese Beobachtung unterstützt die Idee der oben bereits diskutierten Zellumverteilung von den pathologisch vaskularisierten Zonen (avaskulären und der Tuft-Zone) hin zur physiologisch vaskularisierten (vaskulären) Zone zum Abschluss der Revaskularisation und Tuftregression. Im Rahmen der C5a-Injektionen

wurde die Zelldichte der aktivierten CD11b-positiven Zellen in der avaskulären (P14) und in der Tuft-Zone (P17) reduziert. Der Anteil aktivierter an den Gesamt-CD11b-positiven Zellen wurde durch die C5a-Injektionen an P14 um ein gutes Drittel reduziert.

Dass eine Assoziation zwischen der Präsenz aktivierter CD11b-positiver Zellen und der OIR ausgelösten Pathologien der retinalen Vasoobliteration durch die und Neovaskularisation herrscht, zeigen Pilotuntersuchungen derselben Arbeitsgruppe der vorliegenden Studie an Normoxia-Kontrollmäusen (ebenfalls an P14, P17 und P21 untersucht), wo über die gesamte physiologisch vaskularisierte Netzhaut hinweg (zentral, mittel-peripher und peripher) so gut wie keine CD11b-Zellen des aktivierten Phänotyps zu finden waren (vgl. Ergänzende Abb. 33 im Anhang; Daten sind nicht Teil der vorliegenden Studie). Eine Konzentration von aktivierten CD11b-positiven Zellen hingegen findet dort statt wo neue Blutgefäße gebildet werden müssen: im Bereichs des Übergangs von der avaskulären zur vaskularisierten Zone (Tuft- bzw. Aktivierungszone) - von hier aus werden neue Blutgefäße aus präexistenten Blutgefäßen gebildet – und in der avaskulären Zone, in deren Richtung die neuen Endothelzellen wachsen. Abb. 22 illustriert dieses Zusammenspiel von aktivierten CD11b-positiven Zellen und der Revaskularisierung sehr anschaulich und unterstützt die Auffassung, dass Makrophagen und Mikroglia-Zellen für eine gerichtetes Blutgefäßwachstum sorgen (Checchin et al 2006). Fischer et al. konnten aktivierte CD11bpositive Zellen nur in der inneren Schicht feststellen (Fischer et al 2011), was dazu passt dass die Revaskularisation ausschließlich den superfiziellen retinalen Blutgefäßplexus betrifft (Stahl et al 2010b). Allerdings war laut Fischer et al. das Vorkommen der aktivierten Zellen im Gegensatz zu den Erkenntnissen der vorliegenden Studie rein auf die zentrale avaskuläre Zone begrenzt (Fischer et al 2011).

Der aktivierte Phänotyp zeichnet sich unter anderem durch eine hohe Fortbewegungsrate aus (McGlade-McCulloh et al 1989, Stence et al 2001), was ebenfalls im Rahmen einer Förderung des Blutgefäßwachstums wichtig ist, da die Aktivitätszone sich im Rahmen der Revaskularisation fortlaufend in Richtung des Sehnervenkopfes verschiebt. Zudem zeichnet den aktivierten Phänotyp der CD11b-positiven Zellen seine phagozytotische Aktivität aus (Lynch 2009, Ransohoff & Perry 2009). Aktivierte Mikroglia-Zellen nehmen sich toten oder geschädigten Zellen an und phagozytieren Zelltrümmer (Raivich et al 1999, Raivich et al 1998), die im Rahmen der OIR sowohl in der avaskulären als auch in der Tuft-Zone in großer Zahl vorkommen. Die Eigenschaften der aktivierten CD11b-positiven Zellen korrelieren mit den Prozessen, die während der Revaskularisation und Tuftregression stattfinden, und rechtfertigen somit die Interpretation, dass diese aktivierten Zellen an der Aufhebung der OIR-Pathologie beteiligt sind. Dass aktivierte Makrophagen Apoptose in Endothelzellen und anderen Zelltypen hervorrufen können, haben einige Studien bereits zeigen können (Ashton

et al 2003, Boyle et al 2002, Duffield et al 2000, Koizumi et al 2003, Li et al 2003). Davies et al. demonstrierten im OIR-Modell, dass eine Beteiligung der Makrophagen an der Tuftregression aufgrund ihrer pro-apoptotischen Eigenschaften wahrscheinlich ist (Davies et al 2008). In dieser Studie von Davies et al. wurde allerdings, wie in vielen anderen Studien auch, der Aktivierungsstatus der Zellen nicht mit untersucht.

Unter den C5a-Injektionen wurde an P14 sowohl die absolute Zellzahl als auch der Anteil aktivierter CD11b-positiver Zellen in der avaskulären Zone gesenkt, was interessant ist, da der Einfluss von C5a auf die Morphologie (die Größe der avaskulären Fläche) erst an P17 feststellbar war. Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass C5a erst die CD11b-positiven Zellen beeinflusst und diese dann, im zweiten Schritt, Einfluss auf die Blutgefäßbildung nehmen. In einem Maus-Modell der retinalen Regenration konnten Stoecker et al. feststellen, dass CD11b-positive Mikroglia-Zellen erst aktiviert werden und im Anschluss die ersten pro-apoptotischen Gene hochregulieren (Stoecker et al 2009). Es ist nachvollziehbar, dass Prozesse wie Blutgefäßbildung oder -abbau mehr Zeit benötigen als die Zellaktivierung.

Die Interpretation der Ergebnisse des relativen Anteils der aktivierten an den Gesamt-CD11b-positiven Zellen sollte unter Vorsicht geschehen. Dabei muss bedacht werden, dass ein hoher Anteil an aktivierten Zellen nicht zwangläufig bedeutet, dass ein Großteil der gewebsständigen retinalen CD11b-positiven Zellen aktiviert wurde. Sondern dass auch "nur" eine große Zahl von Monozyten, deren morphologischer Phänotyp dem der aktivierten Mikroglia-Zellen stark gleicht (vgl. Ausführungen im Abschnitt **1.8.2**), rekrutiert worden sein kann. Bei dieser rein rechnerischen Untersuchung wurden nur prozentuale Anteile und keine absoluten Zahlen ermittelt, weshalb ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen der aktivierten und der Gesamt-CD11b-positiven Zellen nicht möglich ist.

5.1.4. Reaktion der Müller-Zellen

Das Mausmodell der OIR hat eine Gliose der Müller-Zellen mit leichter Verstärkung im zeitlichen Verlauf (von P14 zu P17) ausgelöst, deren Ausmaß durch die C5a-Injektionen nicht beeinflusst wurde. Eine hyperplastische Reaktion der Astrozyten konnte ebenfalls als Nebenbefund festgestellt werden.

Müller-Zellen reagieren auf nahezu jede pathologische Veränderung der Retina mit reaktiver Hyperplasie, der sogenannten Müller-Zell-Gliose (Bringmann et al 2009, Bringmann et al 2006, Reichenbach & Bringmann 2010, Rungger-Brändle et al 2000). Die hohe Expression von dem Intermediärfilament GFAP ist kennzeichnend für die Müller-Zell-Gliose. Der Unterscheidung der ebenfalls reaktiven hyperplastischen GFAP-positiven Astrozyten dient

die gleichzeitige Vimentin-Expression, die nur bei den Müller-Zellen vorkommt (Lewis & Fisher 2003). Da die Müller-Zellen eine Art Vermittlerposition zwischen den retinalen Blutgefäßen und Neuronen einnehmen (Bringmann et al 2006, Rungger-Brändle et al 2000), löst die Hypoxie-bedingte Vasoobliteration im Rahmen der OIR sowohl eine die reaktive Gliose als auch eine Neurodegeneration aus (Dorrell et al 2010, Downie et al 2007, Fletcher et al 2010). Die festgestellte Müller-Zell-Gliose dient primär der Feststellung, dass das verwendete OIR-Modell funktioniert hat und dass die Müller-Zellen, und auch die Astrozyten, aktiv in das Krankheitsgeschehen der OIR involviert sind (Gu et al 2002). Jede Art von Stress löst in der Müller-Zelle eine fortlaufende Erhöhung der GFAP- und Vimentin-Expression aus, die erst endet, wenn die Zelle auf ganzer Länge mit beiden Intermediärfilamenten ausgefüllt ist (Lewis & Fisher 2003). Diese Entwicklung ist in Abb. 31 im Vergleich zwischen P14 und P17 erkennbar, wo GFAP- und Vimentin-positive Signale in den äußeren Netzhautschichten (vor allem in der ONL) erst an P17 erkennbar waren. Das erklärt die etwas stärker und auf ganzer Länge der Müller-Zellen ausgeprägte Gliose an P17, dem Zeitpunkt der stärksten Tuftausprägung (Connor et al 2009, Lange et al 2009, Stahl et al 2010b), im Vergleich zu P14.

Im Rahmen von Untersuchungen zur Diabetischen Retinopathie, ebenfalls eine proliferative Retinopathie wie die ROP, konnte festgestellt werden, dass eine reaktive Erhöhung der GFAP-Expression durch die Müller-Zellen sehr früh im Krankheitsgeschehen passiert, deutlich vor dem Sichtbarwerden von vaskulären Veränderungen (Rungger-Brändle et al 2000). Dass eine Zellaktivierung im Gegensatz zu umfangreicheren Prozessen wie z.B. der Bildung von Blutgefäßen früher festzustellen ist, wurde bereits in Abschnitt **5.1.3** diskutiert.

Der Grad der Ausprägung der Müller-Zell-Gliose ist abhängig von der Schwere der Vasoobliteration bzw. der Nähe zu noch vorhandenen Blutgefäßen (Downie et al 2007). Zusätzlich scheint eine erhöhte Blutgefäßpermeabilität und ein dadurch bedingter Austritt von Plasmaproteinen, wie sie im Rahmen der OIR vorkommen, ein erster Auslöser zu sein (Rungger-Brändle et al 2000). Unter hypoxischen Bedingungen beeinträchtigen die Müller-Zellen die Barriere-Funktion der Blut-Retina-Schranke (Tretiach et al 2005) und erhöhen die VEGF-Expression (Aiello et al 1995a, Eichler et al 2000), welches die Blutgefäßpermeabilität zusätzlich erhöht (Cheng et al 2013). Ein Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke und der weitere Austritt von Plasmaproteinen, welche die Gliose nachhaltig verstärken, sind die Folgen (Chu et al 1999). Untersuchungen am Modell der Diabetischen Retinopathie konnten zeigen, dass Müller-Zellen eine wichtige Quelle für VEGF in der Retina darstellen (Bai et al 2009, Cheng et al 2013). Cheng et al. konnten in einer *in vitro* Studie mit humanen Müller-Zellen zeigen, dass C5a über den C5a-Rezeptor, welcher unter physiologischen

Bedingungen kaum exprimiert wird, eine gesteigerte VEGF-Expression hervorruft (Cheng et al 2013).

Von Müller-Zellen stammendes VEGF führt nicht nur zu erhöhter Proliferation und Permeabilität von retinalen Endothelzellen, sondern trägt auch zur Bildung retinaler Neovaskularisationen bei (Bai et al 2009, Cheng et al 2013). Da in der C5a-Gruppe aber eine reduzierte Tuft-Ausbildung festgestellt wurde, ist davon auszugehen, dass der Einfluss der Müller-Zellen auf die Ausbildung der Neovaskularisationen eine untergeordnete Rolle spielt. Auf die Müller-Zell-Gliose hatte das injizierte C5a keinen feststellbaren Einfluss. Gründe dafür können sein, dass kein oder kaum C5a in das Auge gelangt ist, die in Abschnitt **5.1.2** bereits diskutierte schwächere Wirksamkeit des rekombinanten injizierten C5a verglichen mit dem im Rahmen der Komplementkaskade endogen frisch gespaltenen oder dass die Gliose primär als Ausdruck der durch die Hypoxie hervorgerufene retinale Schädigung gilt und nicht von C5a beeinflussbar ist.

5.1.5. Genexpression von C3, C1q und Properdin

Diese Untersuchung sollte Informationen darüber liefern, ob die systemisch gesetzten Injektionen Einfluss auf die lokale Komplementaktivität im Auge haben.

Die Genexpression von C3 und C1q wurde allein durch die OIR-Behandlung (ohne verabreichte Injektionen) im Vergleich zu den Normoxia-Kontrollmäusen erhöht, was auf eine erhöhte allgemeine Komplementaktivität (C3) und erhöhte Aktivierung des klassischen Pathways (C1q) schließen lässt. Der Unterschied in der C3-Gruppe war allerdings nicht signifikant, was vermutlich auf den relativ großen Standardfehler bei den Expressionsdaten der OIR-Gruppe zurückzuführen ist. Die Expression von Properdin, dem sogenannten Aktivator-Protein des alternativen Pathways (Hourcade 2008), unterschied sich in der Normoxia- und in der OIR-Gruppe hingegen nicht. Die Genexpression war in den Injektionsgruppen (OIR+C5a und OIR+PBS) gruppenübergreifend niedriger als in der reinen OIR-Gruppe (nur OIR, keine Injektionen), wobei der Unterschied nur in der Properdin-Gruppe signifikant war. Das heißt, dass das verwendete Modell allein – ähnlich wie bei den Müller-Zellen – die retinale Aktivität des Komplementsystems erhöht, unter den intraperitonealen Injektionen hingegen die lokale Komplementaktivität in der Retina reduziert ist.

Das Komplementsystem gilt als einer der ersten Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems und ist wichtig für die Gewebshomöostase (Walport 2001a, Walport 2001b). Die vielfältigen biologischen Aufgaben umfassen unter anderem die Kontrolle entzündlicher Reaktionen und Chemotaxis, Immunzellaktivierung und Erkennung und Abbau

nichtfunktionsfähiger oder toter Eigenzellen (Ricklin et al 2010, Walport 2001a, Walport 2001b). Die Injektionen in das Peritoneum könnten durchaus einen stärkeren Aktivierungsreiz für das Komplementsystem bzw. Rekrutierungsreiz für die Immunzellen darstellen als die OIR im Auge und somit zu einer reduzierten retinalen Komplementaktivität beitragen. In einer aktuellen Studie von Eslamloo et al. an Goldfischen konnte gezeigt werden, dass wiederholter Stress über drei Tage zu einer reduzierten Komplementaktivität führen kann (Eslamloo et al 2014). Die in der vorliegenden Studie wiederholte tägliche Verabreichung der intraperitonealen Injektionen bedeutet eine sehr hohe Stressbelastung für die Mäuse: Das Herausnehmen aus dem warmen Nest, Abwesenheit von Muttertier und Geschwistern, das Handling durch den Menschen und die betäubungslose Injektion an sich sind alles enorme Stressfaktoren für die noch sehr jungen Mauswelpen. Dieser Stress kann deshalb durchaus eine Rolle in der reduzierten Genexpression der Injektions-Gruppen gespielt haben.

C5a hatte im Vergleich zu PBS keinen Effekt auf die retinale mRNA-Expression von C3, C1q und Properdin. Es gibt eine Reihe möglicher Gründe, warum das injizierte C5a keinen Effekt auf das gesamte Kaskadensystem des Komplements gehabt haben könnte. C5a stellt zum einen ein Endprodukt der Kaskade dar – hat also vermutlich keine direkte Einwirkung auf die vor- oder nachgeschalteten Prozesse der Kaskade. Zum anderen hat das injizierte rekombinante C5a im Vergleich zum frisch gespaltenen endogenen C5a eine schwächere Wirkung (vgl. Ausführungen in Abschnitt **5.1.2**). Die injizierte Menge fällt nicht so stark ins Gewicht im Vergleich zu der vergleichbar großen endogen vorhandenen Menge. Zudem befinden sich C3, C1q und auch Properdin im Ablauf der Komplementkaskade alle vor dem C5(a)-Abschnitt (Dunkelberger & Song 2010, Zipfel & Skerka 2009). Dies könnte ein weiterer Grund dafür sein warum die C5a-Injektionen keinen Einfluss auf die vorgeschaltete Genexpression hatten und stattdessen eher zu einer verstärkten Immunzellrekrutierung und Entzündungsreaktion (Köhl et al 2006, Rittirsch et al 2008, Ward 2009) am Injektionsort geführt haben könnten (vgl. Ausführungen in Abschnitt **5.1.3**).

Das hervorstechendste Ergebnis dieser Untersuchung war die deutlich reduzierte Properdin-Expression in den Injektionsgruppen im Vergleich zu der reinen OIR-Gruppe, deren Mäuse nur der fünftägigen Hyperoxie ausgesetzt war und keine Injektionen bekommen hatte. Der Injektionsvorgang führt demnach zu einer gesenkten Aktivität des alternativen Pathways (Hourcade 2008). Die Erklärung könnte, wie bereits in Abschnitt **5.1.3** im Zusammenhang mit der reduzierten Zahl der CD11b-positiven Zellen diskutiert, wiederum in einer intraperitonealen Immunzellrekrutierung liegen. Die Injektionen setzen einen Entzündungsreiz an der Einstichstelle, woraufhin neutrophile Zellen, die (auch) Properdin

produzieren, in das Peritoneum wandern. Ein möglicher Grund für die reduzierte Properdin-Genexpression im Auge könnte deshalb sein, dass Neutrophile gar nicht oder nur in reduzierter Anzahl in das Auge und stattdessen in die Peritonealhöhle rekrutiert wurden. Neutrophilen- und Makrophagen-Rekrutierung in die Peritonealhöhle nach einem gesetzten Infektionsreizes konnte bereits von Leendertse et al. in einer *in vivo* Studie mit Mäusen dargestellt werden (Leendertse et al 2009). Dass die Rekrutierung von Neutrophilen in die Lunge C5a-bedingt sein kann, konnte ebenfalls bereits beobachtet werden (Shushakova et al 2002). Da in der vorliegenden Studie allerdings die Properdin-Genexpression in der C5aund PBS-Gruppe vergleichbar war, ist davon auszugehen, dass der durch die Injektion an sich gesetzte Reiz einen übergeordneten Einfluss auf die Neutrophilen-Rekrutierung hat im Vergleich zum injizierten C5a, das sich auch zudem schnell per Diffusion im ganzen Körper verteilt. Monozyten produzieren ebenfalls Properdin (Bongrazio et al 2003). Auch diese Zellen könnten im Rahmen ihrer Rekrutierung in die Bauchhöhle (anstatt in das Auge) an der verringerten retinalen Properdin-Genexpression beteiligt gewesen sein.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass die systemisch gesetzten Injektionen lokalen Einfluss auf die Aktivität des Komplementsystems in der Netzhaut genommen haben. Ein Unterschied zwischen den C5a- und PBS-Injektionen war aber nicht feststellbar.

5.2. Inhibierung von C5a mittels NOX-D20 im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie

Die NOX-D20-Injektionen führten zu einer reduzierten Zahl CD11b-positiver Zellen in der Tuft-Zone (P21), zu einer reduzierten Zahl aktivierter CD11b-positiver Zellen in der avaskulären Zone (P14) und zu einem geringeren Anteil aktivierter CD11b-positiver Zellen an der Gesamt-CD11b-Zellzahl (alle Unterschiede signifikant). Das NOX-D20 konnte ausschließlich Einfluss auf die CD11b-positiven Zellen – dort auch nur vereinzelt – nehmen. Die Größe der avaskulären Fläche und die Tuft-Ausbildung konnten von NOX-D20 nicht zu einem signifikanten Maß beeinflusst werden.

Aufgrund der Tatsache, dass in den Untersuchungen zur avaskulären Fläche, der Gesamtzahl der CD11b-positiven Zellen und den aktivierten CD11b-positiven Zellen signifikante Unterschiede überwiegend nur zwischen der PBS- und C5a-Gruppe gefunden wurden, wurden die NOX-Gruppe in die Untersuchungen zur qualitativen Evaluierung der Müller-Zellen und zur Genexpression nicht (mehr) mit einbezogen.

Die NOX-D20-Injektionen führten entweder zu keinem Unterschied verglichen mit der PBS-Gruppe oder zu einem Unterschied, der in dieselbe Richtung verlief wie der der C5a-Gruppe. Die intraperitoneale Injektion an sich löst einen Entzündungsreiz aus. Das gilt generell für

alle drei Gruppen. Allerdings beinhalten die NOX-D20-Injektionen, ebenso wie die C5a-Injektionen, aber im Gegensatz zu den PBS-Injektionen, aktive Bestandteile, die die ausgelöste Entzündung bzw. immunologische Reaktion vermutlich verstärken. Die CD11bpositiven Zellen (Monozyten, Makrophagen, Neutrophile) werden wie bei den C5a-Injektionen auch an den Ort der Injektion (und somit der Entzündung) rekrutiert und stehen entsprechend dem retinalen Geschehen nur in verringerter Zahl zur Verfügung (vgl. auch Ausführungen im Abschnitt **5.1.3**). Die Auswirkung des NOX-D20 auf die Dichte der retinalen CD11b-positiven Zellen war im Gegensatz zu denen des C5a nicht so stark ausgeprägt. Es könnte sein, dass NOX-D20 als C5a-Inhibitor (Hoehlig et al 2013) das endogene C5a im Peritoneum und somit die intraperitoneal ausgelöste Entzündungs-/ Immunreaktion hemmt (Fonseca et al 2009), wohingegen das injizierte chemotaktisch aktive C5a die Entzündungs-/ Immunreaktion am Injektionsort (dem Peritoneum) noch zusätzlich verstärkt. Der Grund dafür, dass hingegen die Zahl der CD11b-positiven Zellen der NOX-Gruppen in der überwiegenden Zahl der Fälle vergleichbar mit der der PBS-Gruppen war, könnte in einer mit der C5a-Inhibition zusammenhängenden geringeren Zellrekrutierung an den Ort der Injektion liegen. Diese Annahme wird unterstützt durch die Erkenntnisse von Hoehlig et al., die darstellen konnten, dass NOX-D20 in einem Mausmodells für Sepsis die Zellzahl von Polymorphkernigen Leukozyten (Neutrophile u.a.) und Monozyten in der Peritonealhöhle signifikant reduzieren konnte (Hoehlig et al 2013). Die verabreichte peritoneale Dosis betrug zudem nur ein Fünfundzwanzigstel von der in der vorliegenden Studie verabreichten Dosis. Diese Untersuchungsergebnisse spiegeln das starke lokale Inhibierungspotential des intraperitoneal injizierten NOX-D20 wider. Eine signifikante Reduzierung von CD11bpositiven Zellen konnte ebenfalls im Rahmen einer CNV-Studie beobachtet werden, wo die durch intravitreal injiziertes NOX-D20 hervorgerufene Zellreduzierung sich proportional zur verabreichten Dosis verhielt (Brockmann et al 2015).

Der Umstand, dass NOX-D20 weder signifikanten Einfluss auf die Größe der avaskulären Fläche noch auf die Tuft-Ausbildung hatte, könnte in einer methodischen Schwäche begründet sein. Mögliche Gründe in dem Zusammenhang könnten eine zu geringere Dosierung (um einen "Injektionsort-fernen" Effekt hervorzurufen), eine zu geringe Bindungsaffinität zu C5a, ein Aktivitätsverlust auf dem Weg zum Zielgewebe oder auch eine unmögliche Überwindung der Blut-Retina-Schranke gewesen sein. Um die Studienergebnisse vergleichen zu können, orientierte sich die in der vorliegenden Studie verabreichte Dosis (wie auch beim C5a) bewusst an der von Langer et al. verwendeten Dosis (Langer et al 2010). Die von Langer et al. im Rahmen des OIR-Modells täglich von P12 bis P16 intraperitoneal verabreichte Dosis C5a-Rezeptor-Antagonist resultierte in einer deutlich erhöhten retinalen Neovaskularisation im Vergleich zur Kontrollgruppe (Langer et al

2010). Aufgrund der Tatsache, dass in der vorliegenden Studie ein C5a-Inhibitor und kein Rezeptor-Antagonist verwendet wurde, ist die Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen der beiden Studien begrenzt. Die Angriffspunkte der C5a-Inhibition sind verschiedene, weshalb es sein kann, dass die intraperitoneal verabreichte NOX-D20-Dosis der vorliegenden Studie zu gering gewählt wurde, um auf die retinale Blutgefäßbildung einwirken zu können.

Die Bindungsaffinität von NOX-D20 zu murinem C5a wurde vorab von der NOXXON Pharma AG überprüft und liegt mit 19 pmol/l im picomolaren Bereich (Hoehlig et al 2013), weshalb eine zu geringere Bindungsaffinität als Grund für den nicht vorhandenen Einfluss auf die avaskuläre Fläche und die Tuft-Ausbildung als unwahrscheinlich erscheint. In einer Studie von Checchin et al. wurden im Rahmen eines Hyperkapnie-Modells 24 Stunden alten Ratten-Welpen intraperitoneal Chlodronat-Liposomen zur Depletion retinaler Mikroglia-Zellen injiziert. Es konnten ebenfalls keine Unterschiede bezüglich der retinalen Blutgefäßbildung festgestellt werden. Begründet war dies in der Unmöglichkeit für die Liposomen die Blut-Retina-Schranke zu überwinden. Eine intravitreale Injektion war nötig, um einen Effekt auf die retinale Blutgefäßbildung zu erzielen (Checchin et al 2006). Im Rahmen der OIR wurden ein Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke und eine erhöhte retinale Blutgefäßpermeabilität beobachtet (Xu & Le 2011, Zhang et al 2005b). Ob eine Überwindung der Blut-Retina-Schranke für NOX-D20 möglich war, lässt sich im Rahmen der vorliegenden Studie nicht beurteilen, scheint aber möglich. Es kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass eine Inhibierung von C5a entgegen der Untersuchungen von Langer et al. (Langer et al 2010) nur begrenzten, nicht feststellbaren Einfluss auf die retinale Neovaskularisation hat.

Bei der Diskussion der Ergebnisse sollte bedacht werden, dass die Hemmung eines Faktors eines Systems wie das Komplementsystem unter Umständen einen weitaus größeren und unvorhersehbareren Effekt haben kann, als wenn nur eine gewisse Menge an aktiviertem Bestandteil (z.B. C5a) dem System zugefügt wird. Ein unkontrollierter Ausgleich in Form von starker Neuproduktion kann die Folge sein. Der Organismus versucht auf diese Weise alle Komplementfunktionen aufrecht zu erhalten. Die Kaskaden-Gleichgewichte werden dadurch stark verändert. Eine funktionierende Inhibierung kann somit größeren Einfluss nehmen als eine reine Supplementierung von (aktivierten) Komplementfaktoren. Dass dies in Ansätzen in der vorliegenden Studie so abgelaufen sein könnte, zeigen die dargestellten Einflüsse von NOX-D20 auf die Anzahl der (aktivierten) CD11b-positiven Zellen. Eine Inhibierung kann somit eine weitaus größere Beeinflussung des Gesamtsystems herbeiführen.

Im Hinblick auf neue therapeutische Ansätze durch Komplementinhibierung hätte das in dieser Studie verwendete NOX-D20 den großen Vorteil, dass es nur ganz punktuell das

aktivierte C5a direkt hemmt (Hoehlig et al 2013). Das heißt, dass nicht nur die vorgeschalteten Prozesse z.B. auf C3-Ebene weiterhin ablaufen können (Jacob et al 2010a), sondern die gesamte Komplement-Kaskade mit ihren (Schutz-)Funktion erhalten bleibt (Fonseca et al 2009, Jacob et al 2011, Romay-Penabad et al 2007). Es wird lediglich die Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten in das Entzündungsgebiet abgeschwächt. Fähigkeiten wie die Bildung des Membranangriffkomplexes (C5b-9), C3b-Opsonierung von eingedrungenen Mikroorganismen wie auch Antikörperund T-Zell-vermittelte Immunschutzmechanismen der NOX-D20-vermittelten bleiben von C5a-Inhibierung unbeeinflusst (Fonseca et al 2009). So kann die Immunkompetenz des Komplementsystems zu einem großen Teil, auch bei Langzeittherapien, erhalten bleiben (Fonseca et al 2009).

5.3. Aussagekraft dieser Studie – Methodische Stärken und Schwächen

Die Entscheidung in der vorliegenden Studie mit Mäusen des Wildtyps zu arbeiten wurde bewusst getroffen. Es gibt einige Gründe, die gegen die Verwendung von genmodifizierten Mäusen für die Untersuchung von Komplementsystem-Einflüssen sprechen. Bei dem systemischem Ausschalten bestimmter Komplementfaktoren stellt sich die Frage der Kompensationsmöglichkeit und Überlebensfähigkeit für die Tiere (Davey & MacLean 2006, Kang et al 2004), wenn Funktionen wie die embryonalen und postnatalen Entwicklungsvorgänge, die Abwehr von Infektionserregern und die Heilung von Verletzungen nicht mehr in ausreichendem Maße ablaufen können (Davey & MacLean 2006, Fonseca et al 2009, Stevens et al 2007). Alle nachgeschalteten Prozessen können aufgrund des Fehlens des Knock-out-Komplementfaktors nicht mehr ablaufen (Fonseca et al 2009), wobei genau aus diesem Grunde auch nicht sicher gesagt werden kann, dass der untersuchte Effekt auf diesen einen und nicht einen der nachgeschalteten Komplementfaktoren zurückzuführen ist. Ebenso kann es schwierig sein, zwischen direkten Zell- und/ oder Gewebe-spezifischen Effekten und Sekundäreffekten des Knock-out-Komplement-Gens und zu unterscheiden, die auf indirekten Wirkungen in anderen Organen beruhen (Davey & MacLean 2006). Zudem gibt es immer wieder Gene, die in sehr enger räumlicher Beziehung zueinander stehen und/ oder deren Funktionen sich überschneiden (Davey & MacLean 2006). Das Abschalten eines Komplementfaktors kann dann unbeabsichtigte Folgen, wie z.B. das Fehlen eines bestimmten Phänotyps, haben (Davey & MacLean 2006, Pickering et al 2002). Fonseca et al. empfehlen deshalb die Verwendung von kleinen Rezeptor-Antagonisten in der späte(re)n Lebensphase der Tiere (Fonseca et al 2009), wenn alle Entwicklungsvorgänge bereits abgeschlossen sind. Da das Modell der OIR auf die Nutzung neugeborener Tiere angewiesen ist, war eine Verwendung von adulten Tieren für die vorliegende Studie nicht

möglich. In der vorliegenden Studie wurde ein C5a-Inhibitor verwendet, der sehr ähnlich wie ein Rezeptor-Antagonist allein die C5a-Wirkung hemmt (Hoehlig et al 2013) und somit nicht zu einer Aufhebung der C5-nachgeschalteten Komplement-Prozessen führt.

Laut Ransohoff und Perry ist die Gewebe-Immunhistochemie eine Technik von zentraler Wichtigkeit für die Erforschung von Mikroglia-Zellen (Ransohoff & Perry 2009). Keine andere Technik liefert einen vergleichbaren Reichtum an Informationen (Ransohoff & Perry 2009). Die wertvollsten Beobachtungen bezüglich Mikroglia-Zellen stammen aus intaktem ZNS-Gewebe (Ransohoff & Perry 2009). Die Immunhistochemie liefert eine lebendige, wenn auch statische Darstellung von physiologischen und pathologischen Prozessen (Ransohoff & Perry 2009) und unterstützt die quantitative Morphologie. All diese Vorteile konnten im Rahmen der vorliegenden Studie für die Untersuchungen bezüglich der Größe der avaskulären Fläche, des Ausmaßes der Tuft-Ausbildung, der Verteilung und des Aktivierungszustandes der (aktivierten) CD11b-positiven Zellen und der Reaktivität der Müllerzellen im OIR-Modell genutzt werden. Die Immunhistochemie detektiert Proteine, die dann spezifischen Zelltypen zugeordnet werden können (Ransohoff & Perry 2009). Die immunhistochemische CD11b-Färbung stellt nicht nur Mikroglia-Zellen sondern auch Makrophagen und Monozyten dar. So konnten auch Zellein- und Zellauswanderungen in die Überlegungen zur Auswertung der vorliegenden Studienergebnisse miteinbezogen werden. Eine erweiterte immunhistochemische Untersuchung hätte noch zusätzliche Erkenntnisse über den Anteil der residenten Mikroglia-Zellen an den Gesamt-CD11b-positiven Zellen in der Retina bringen können. Dies lässt sich nach aktuellem Stand des Wissens alledings nur über quantitative Kombinationsfärbungen, z.B. mit Markern für die Antigene CD45, CD11b, MHC-II, F4/80 und Iba-1, erreichen (Dick et al 1995, Xu et al 2007), da es bisher noch keinen rein Mikroglia-spezifischen Marker gibt (vgl. auch Ausführungen in Abschnitt 1.8.2). Eine spezifische immunhistochemische Mikroglia-Darstellung könnte in zukünftigen Studien noch einen zusätzlichen Erkenntnisgewinn über die Zellbewegungen von rekrutierten Makrophagen liefern.

Es kann sein, dass in der vorliegenden Studie CD11b-positive Zellen vermehrt an den Ort der Injektion rekrutiert worden sind (vgl. Ausführungen Abschnitt **5.1.3**). Wie auch in Abschnitt **5.2** ausführlich diskutiert, könnte der durch die Injektion hervorgerufene Entzündungsreiz ein Grund für die geringere Zelldichte in der C5a- und NOX-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe gewesen sein. Auch wenn von einer OIR-bedingten erhöhten Blutgefäßpermeabilität und folglich dem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke berichtet wurde (Xu & Le 2011, Zhang et al 2005b), wurde im Rahmen der vorliegenden Studie nicht geklärt, ob das intraperitoneal injizierte C5a und NOX-D20 tatsächlich das Zielgewebe (die

Retina) erreicht haben und/ oder ob sie die beobachteten intraokulären Effekte direkt herbei geführt haben. Eine lokale intravitreale Injektion hätte die Wahrscheinlichkeit des Erreichens und des Zielgewebes deutlich erhöht nicht zu einer methodisch-bedingten Immunzellrekrutierung fernab des Auges geführt. Es bleibt allerdings zu bedenken, dass die Pathologie des OIR-Modells direkt mit den retinalen Blutgefäßen assoziiert ist (Lange et al 2009, Smith et al 1994, Stahl et al 2010b). Dass die Effektoren, C5a und NOX-D20, (nach systemischer Injektion) das Zielgewebe dann über den retinalen Blutstrom erreichen, erscheint vor dem Hintergrund, dass die Beeinflussung der retinalen Blutgefäßbildung und -regression untersucht werden soll, ebenfalls als sehr sinnvoll.

Ein weiterer Vorteil der intravitrealen Injektion liegt darin, dass es die Möglichkeit einer Kontrolle innerhalb desselben Organismus gibt, indem in das eine Auge der Maus der Effektor und in das kontralaterale Auge lediglich die Vehikel-/Kontrollflüssigkeit injiziert wird; so zum Beispiel umgesetzt von Brockmann et al. und Ritter et al. (Brockmann et al 2015, Ritter et al 2006). Da jede Maus unterschiedlich auf verabreichte Injektionen reagieren kann, hat eine solche Organismus-interne Kontrolle einen höheren Wert als die Verwendung von reinen "Effektor-Mäusen" und reinen "Kontroll-Mäusen". Allerdings sind intravitreale Injektionen an Mäusen nur unter Vollnarkose durchführbar, was eine noch größere Stressbelastung für die noch sehr jungen Mäuse bedeutet als die in der vorliegenden Studie verabreichten intraperitonealen Injektionen (vgl Ausführungen in Abschnitt 5.1.5). Dennoch ist es keine Seltenheit, dass intravitreale Injektionen wenige Tage alten Mäusen und Ratten verabreicht und mit Hilfe dieser Methodik neue Erkenntnisse gewonnen werden (Checchin et al 2006, Dorrell et al 2010, Ritter et al 2006). Eine einmalig lokal gesetzte intravitreale Effektor-Injektion hat den Vorteil, dass der Wirkspiegel am Zielgewebe sofort da und vergleichbar hoch ist. Bei einer systemisch intraperitoneal gesetzten Injektion, kann bedingt durch die ausgeprägte Schnelllebigkeit des Komplementsystems (Ricklin et al 2010, Thompson & Winterborn 1981) eine erhöhte Aktivität sehr schnell wieder sinken und innerhalb von 24 Stunden wieder auf das Level vor der Injektion zurückfallen (Ivanovska et al 1995). Dementsprechend kann gegebenenfalls nur ein unzureichender lokalen Wirkspiegel am Zielgewebe erreicht werden. Die intraperitonealen Injektionen noch häufiger als alle 24 Stunden zu verabreichen, um potentiell einen (noch) stärkeren Effekt bezüglich der OIR-Pathologie zu erzielen, hätte nach der Einschätzung der Arbeitsgruppe eine zu große Belastung sowohl für die Jungtiere als auch für das Muttertier bedeutet.

Im Rahmen der guantitativen Untersuchung zur avaskulären Zone konnten Unterschiede zwischen der C5a- und der PBS-Gruppe nur an P17 festgestellt werden. Daraus wurde eine C5a-bedingte schnellere Revaskularisation geschlossen. Um genauere Informationen über den zeitlichen Verlauf dieser Revaskularisation zu erhalten, wäre es für zukünftige Studien sinnvoll, noch zusätzliche Untersuchungszeitpunkte zwischen P14 und P21 in das Studiendesign miteinzubeziehen. Bedingt durch die geringere Wirksamkeit von dem rekombinanten injizierten C5a verglichen mit dem frisch endogen gespaltenen (vgl. 5.1.2) Ausführungen in Schnelllebigkeit Abschnitt und der generellen des Komplementsystems (Ivanovska et al 1995, Ricklin et al 2010, Thompson & Winterborn 1981), kann es sein, dass P14 als Untersuchungszeitpunkt zu früh bzw. P21 zu spät gewählt wurde. Es kann sein, dass zum Zeitpunkt P14 noch kein ausreichender C5a-Wirkspiegel erreicht war und das injizierte C5a an P21 schon wieder komplett inaktiviert war und folglich kaum noch Effekte zu beobachten waren.

In der vorliegenden Studie wurden nicht perfundierte Retinae untersucht, d.h. dass die retinalen Blutgefäße nicht blutleer waren. Somit schließen die quantitativ erhobenen Daten zu den CD11b-positiven Zellen unter Umständen auch Zellen mit ein, die sich (noch) intravasal befanden. Da dies aber für alle Versuchsgruppen gleichermaßen zutrifft, waren die Ergebnisse dennoch zweifelsfrei vergleichbar. Eine häufig genutzte Methode zur Darstellung der Blutgefäße ist die immunhistochemische intrakardiale Fluoreszein-Perfusion (zum Beispiel verwendet von (Lange et al 2009) und (Smith et al 1994)). Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Studie im Anschluss an die Retina-Präparation genutzten Isolectin IB₄-Färbung, die alle retinalen Blutgefäße darstellt, werden im perfundierten Retina-Gewebe lediglich die durchgängigen Blutgefäße dargestellt, was zur Folge hat, dass sich die avaskuläre Zone einer perfundierten Netzhaut in einem größeren Ausmaß darstellt als bei der in der vorliegenden Studie verwendeten IB₄-Färbung. Damit die Vergleichbarkeit gegeben ist, ist es wichtig dass alle Proben – wie in der vorliegenden Studie geschehen – derselben immunhistochemischen Methodik unterzogen wurden. Das gilt auch und vor allem im Bezug auf den Vergleich mit anderen Studienergebnissen.

Innerhalb der Untersuchungen zur Genexpression war der Standardfehler in einigen Versuchsgruppen vergleichbar hoch, was vermutlich zu Einbußen in der Anzahl der signifikanten Unterschiede geführt hat (vgl. Ausführungen in Abschnitt **5.1.5**). Eine höhere Anzahl untersuchter Netzhäute hätte eventuell die Standardfehler der OIR-, der OIR+C5aund OIR+PBS-Gruppe gesenkt und zu einer größeren Zahl signifikanter Unterschiede geführt. Die vor Beginn der vorliegenden Studie festgelegte Gruppengröße für die genexpressionsanalytischen Untersuchungen basiert auf Erfahrungswerten und

Berechnungen aus früheren Studien der Arbeitsgruppe unter Verwendung des gleichen Mausmodells der OIR.

Die Untersuchungen von Eslamloo et al. an Goldfischen konnten zeigen, dass akuter Stress über einen Tag die Komplement-Aktivität erhöht, wiederholter Stress über drei Tage diese allerdings verringert (Eslamloo et al 2014). In der vorliegenden Studie wurde die Komplement-Aktivität im Rahmen von Untersuchungen zur Genexpression lediglich vom Untersuchungszeitpunkt P17 ermittelt, da vorab signifikante Unterschiede in den Untersuchungen zu der avaskulären Fläche (vgl. Abschnitt 4.2.1), den Gesamt-CD11bpositiven Zellen (vgl. Abschnitt 4.2.3) und den aktivierten CD11b-positiven Zellen (vgl. Abschnitt 4.2.4) überwiegend nur zu diesem Zeitpunkt gefunden wurden. Die diesen Versuchstiergruppen über fünf aufeinander folgenden Tagen verabreichten intraperitonealen Injektionen stellten eine fünftägige Stressperiode für die Mäuse dar. Die Genexpression aller untersuchten Komplementfaktoren der Injektionsgruppen erschien im Vergleich zu der reinen OIR-Gruppe verringert (allerdings nur signifikant nachgewiesen für Properdin). Den Erkenntnissen von Eslamloo et al. (Eslamloo et al 2014) nach wäre eine zusätzliche Untersuchung der Genexpression zum Zeitpunkt P14 interessant gewesen, um zu sehen, welchen Einfluss eine zweitägige Stressperiode auf die Komplementaktivität der Injektionsgruppen gehabt hätte.

Um einen generell möglichen Einfluss des C5a auf die murinen CD11b-positiven Zellen sicherzustellen, wäre es im Vorfeld der Studie sinnvoll gewesen, die Rezeptorbindung des injizierten rekombinanten C5a an murinen Monozyten zu überprüfen, ähnlich wie die Bindungsaffinität von NOX-D20 zu murinem C5a von der *NOXXON Pharma AG* im Rahmen der Studie von Hoehlig et al. überprüft wurde (Hoehlig et al 2013). Ohne diese Voruntersuchung bleibt es streng genommen offen, ob eine Interaktion zwischen dem injizierten C5a und den untersuchten CD11b-positiven Zellen prinzipiell erfolgen konnte.

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Nach Abschluss der Arbeiten können die im Abschnitt **2** erhobenen <u>Fragestellungen</u> nun an dieser Stelle beantwortet werden.

zu 1. und 2. :

Die C5a-Supplementierung hat an P17 zu einem verringerten Ausmaß der retinalen Vasoobliteration im Mausmodell der OIR im Vergleich zur Kontrollgruppe geführt (vgl. Abschnitt **4.2.1**). Die Beobachtung, dass hingegen an P14 und an P21 keine Unterschiede festgestellt werden konnten, deutet auf eine durch C5a-Supplementierung hervorgerufene schnellere Revaskularisierung der avaskulären Zone hin (vgl. Abschnitt **4.2.1**). Die Inhibierung von C5a mittels NOX-D20 hat das Ausmaß der retinalen Vasoobliteration im Mausmodell der OIR im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht beeinflusst (vgl. Abschnitt **4.2.1**). Die Hypothese, dass die C5a-C5aR-Achse des Komplementsystems bezüglich der Revaskularisierung der avaskulären Fläche <u>pro-angiogen agiert (vgl. Hypothese 1 in Abschnitt **2**), hat sich somit bestätigt.</u>

zu 3. und 4. :

Die C5a-Supplementierung hat zum Zeitpunkt P17 zu einer reduzierten Ausbildung der retinalen Neovaskularisation im Mausmodell der OIR im Vergleich zur Kontrollgruppe geführt (vgl. Abschnitt **4.2.2**). Die C5a-Inhibierung mittels NOX-D20 hat hingegen keinen Einfluss auf dieselbe gehabt (vgl. Abschnitt **4.2.2**). Die Hypothese, dass die C5a-C5aR-Achse des Komplementsystems bezüglich der retinalen Neovaskularisation <u>anti</u>-angiogen agiert (vgl. **Hypothese 1** in Abschnitt **2**), hat sich somit (zumindest bezüglich der C5a-Supplementierung) bestätigt.

zu 5. :

Die Zahl der retinalen CD11b-positiven Zellen ist in <u>beiden</u>, sowohl in einem Teil der pathologisch (Tuft-Zone) als auch in den physiologisch (vaskuläre Zone) vaskularisierten Arealen der Netzhaut signifikant höher gewesen verglichen mit dem avaskulären Bereich (avaskuläre Zone) (vgl. Abschnitt **4.2.3.1**). Zwischen der Tuft- und der vaskulären Zone hingegen hat sich kein Unterschied gezeigt (vgl. Abschnitt **4.2.3.1**). Die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen dem quantitativen Verteilungsmuster der retinalen CD11b-positiven Zellen und der Aktivitätszone der OIR gibt, lässt sich demzufolge im Rahmen der vorliegenden Studie nicht eindeutig beantworten.

Die Hypothese, dass das räumliche Verteilungsmuster der retinalen CD11b-positiven Zellen mit der Aktivitätszone der OIR korreliert (vgl. **Hypothese 2** in Abschnitt **2**), lässt sich im

Rahmen der vorliegenden Studie somit weder eindeutig bestätigen noch widerlegen.

zu 6. :

Die Zahl der aktivierten retinalen CD11b-positiven Zellen ist in den pathologisch vaskularisierten Arealen der Netzhaut (avaskuläre und Tuft-Zone) signifikant höher gewesen verglichen mit dem physiologisch vaskularisierten, peripheren Netzhautbereich (vaskuläre Zone) (vgl. Abschnitt **4.2.4.1**). Aktivierte retinale CD11b-positive Zellen sind vorrangig in der avaskulären und der Tuft-Zone, hingegen kaum in der vaskulären Zone nachgewiesen worden (vgl. Abschnitt **4.2.4.1**). Somit hat das Verteilungsmuster des aktivierten Phänotyps der retinalen CD11b-positiven Zellen nicht dem der Gesamt-CD11b-positiven Zellen geglichen. Die Hypothese, dass in der Aktivitätszone der OIR vermehrt retinale CD11b-positive Zellen des aktivierten Phänotyps vorkommen (vgl. **Hypothese 4** in Abschnitt **2**), konnte im Rahmen der vorliegenden Studie – mit dem Zusatz, dass dies ebenfalls der Fall in der avaskulären Zone gewesen ist – bestätigt werden.

zu 7. :

Die C5a-Supplementierung hat zu einer reduzierten Zahl retinaler CD11b-positiver Zellen in der avaskulären Zone (an P17 für die Gesamt-CD11b-positive Zellen, an P14 für die des aktivierten Phänotyps) (vgl. Abschnitte **4.2.3.2** und **4.2.4.2**) und in der Aktivitätszone der OIR (an P17 und P21 für die Gesamt-CD11b-positive Zellen, an P17 für die des aktivierten Phänotyps) (vgl. Abschnitte **4.2.3.3** und **4.2.4.3**) geführt. C5a-Inhibierung mittels NOX-D20 hat ebenfalls zu einer Reduktion der Zellzahl in der avaskulären Zone (an P14 für die des aktivierten Phänotyps, vgl. Abschnitt **4.2.4.2**) und in der Aktivitätszone der OIR (P21 für die Gesamt-CD11b-positive Zellen, vgl. Abschnitt **4.2.3.3**) geführt. Inwieweit diese Einflüsse direkt von den injizierten Effektor-Molekülen hervorgerufen wurden, bleibt aufgrund der verwendeten Methodik der Zielort-fernen Injektion ungeklärt (vgl. Ausführungen in Abschnitt **5.1.3** und **5.3**). Das quantitative Verteilungsmuster der (aktivierten) retinalen CD11b-positive Zellen ist von den intraperitoneal gesetzten Effektor-Injektionen beeinflusst worden. Die Hypothese, dass eine Beeinflussung des Verteilungsmusters der retinalen CD11b-positive Zellen in der Aktivitätszone der OIR durch – zumindest intraperitoneale – C5a-Supplementierung möglich ist (vgl. **Hypothese 3** in Abschnitt **2**), hat sich dennoch bestätigt.

zu 8.:

Das verwendete Mausmodell der OIR hat eine Gliose der Müller-Zellen hervorgerufen, die in ihrer Stärke nicht von der C5a-Supplementierung beeinflusst worden ist (vgl. Abschnitt **4.2.7**). Die Hypothese, dass das verwendete Mausmodell der OIR zu einer reaktiven Müller-Zell-Gliose führt (vgl. **Hypothese 5** in Abschnitt **2**), hat sich bestätigt. Die Hypothese, dass

diese Müller-Zell-Gliose durch die C5a-Supplementierung noch verstärkt wird (vgl. **Hypothese 5** in Abschnitt **2**), konnte im Rahmen der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden.

Aufgrund ergebnisbasierter Modifikationen in der Umsetzung der vorliegenden Studie, wurde der Einfluss der C5a-Inhibierung mittels NOX-D20 auf die Reaktion der Müller-Zellen im Mausmodell der OIR entgegen der ursprünglichen Planungen nicht mehr untersucht (vgl. dazu Ausführungen in Abschnitt **4.2.7**).

zu 9. und 10. :

Das verwendete Mausmodell der OIR hat per se zu einer erhöhten Genexpression von dem Komplementfaktor 1q (C1q) (knapp nicht signifikant bezüglich C3) geführt (vgl. Abschnitt **4.3**). Die Hypothese, dass das verwendete Mausmodell der OIR zu einer Erhöhung der Komplementaktivität führt (vgl. **Hypothese 6** in Abschnitt **2**), hat sich demnach bestätigt. Die Genexpression von C1q (aktiviert den klassischen Komplementpfad) betrug etwa das Dreifache im Vergleich zu der von Properdin (wichtig für Aufbau und Stabilisierung der C3-Konvertase des alternativen Komplementpfades) (vgl. Abschnitt **4.3**). Somit hat sich die Hypothese, dass im Mausmodell der OIR der klassische Pathway vermehrt aktiv ist (vgl. **Hypothese 7** in Abschnitt **2**), bestätigt.

zu 11. :

Die C5a-Supplementierung hat keinen Einfluss auf die retinale Genexpression von C1q, Properdin und C3 ausgeübt (vgl. Abschnitt **4.3**). Die Hypothese, dass eine Beeinflussung der retinalen Komplementaktivität durch C5a-Supplementierung möglich ist (vgl. **Hypothese 8** in Abschnitt **2**), hat sich somit nicht bestätigt.

Aufgrund ergebnisbasierter Modifikationen in der Umsetzung der vorliegenden Studie, wurde der Einfluss der C5a-Inhibierung mittels NOX-D20 auf die retinale Komplementaktivität im Mausmodell der OIR entgegen der ursprünglichen Planungen nicht mehr untersucht (vgl. dazu Ausführungen in Abschnitt **4.3**).

Schlussfolgernd aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie (vgl. Abschnitt **4.4**) kann man sagen, dass die C5a-C5aR-Achse des Komplementsystems das Potential hat, sowohl die im Rahmen der Sauerstoff-induzierten Retinopathie ausgebildete retinale Vasoobliteration als auch die retinale Neovaskularisation in ihrem Ausmaß signifikant zu reduzieren. Ob das supplementierte C5a von vorn herein zu einer schwächer ausgeprägten Pathologie und/ oder einer schnelleren Herstellung des Normalzustandes (durch schnellere Revaskularisation der avaskulären Zone und/ oder schnellere Tuft-Regression) führt, konnte im Rahmen der

vorliegenden Studie nicht eindeutig geklärt werden. Das im Rahmen der vorliegenden Studie beobachtete quantitative Verteilungsmuster der CD11b-positiven Zellen spricht für eine Beteiligung dieser Zellen an der retinalen Antwort auf die OIR. Es unterstützt die Feststellung von Langer et al., dass die C5a-C5aR-Achse des Komplementsystems die Bildung retinaler Neovaskularisationen im Mausmodell der OIR Makrophagen-vermittelt inhibiert (Langer 2010). Die C5a-Supplementierung hat in der vorliegenden Studie zu einer reduzierten Zahl retinaler CD11b-positiver Zellen (Gesamtzahl und aktivierter Phänotyp) in der avaskulären Zone und in der Aktivitätszone der OIR geführt. Es ist unklar, ob aufgrund der weniger stark ausgeprägten OIR-Pathologie weniger CD11b-positive Zellen "benötigt" und somit eventuell auch weniger in die Netzhaut rekrutiert wurden oder ob das supplementierte C5a eventuell zu einer so starken Aktivitätserhöhung der einzelnen CD11b-positiven Zellen geführt hat, dass die geringere Zelldichte ausreichend für die Wiederherstellung eines intakten retinalen Blutgefäßnetzes war. Aufgrund der Zielort-fernen Injektionen, kann auch eine Abwanderung der CD11b-positiven Zellen hin zu dem intraperitoneal gesetzten Entzündungsreiz nicht ausgeschlossen werden.

Den Ergebnissen der vorliegenden Studie zufolge, scheint C5a zwar am Geschehen der OIR-Pathologie beteiligt, aber nicht bestimmend zu sein. Sonst wären die C5a-Effekte bezüglich der retinalen Angiogenese und des quantitativen Verteilungsmusters der retinalen CD11b-positiven Zellen vermutlich noch deutlicher und auch nicht nur an einem Zeitpunkt festzustellen gewesen. Zudem hätte die C5a-Inhibierung mittels NOX-D20 – vorausgesetzt die Inhibierung verlief erfolgreich – deutlich gegenteilige Effekte hervorgerufen. Trotzdem kann man aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie die Schlussfolgerung ziehen, dass der aktivierte Komplementfaktor C5a durchaus das Potential hat, als neuer therapeutischer Ansatzpunkt auf dem Gebiet der Komplement- und Immunzellbeeinflussung (bezogen auf die retinalen Angiogenese) zu fungieren und dieser Forschungsansatz weiter verfolgt werden sollte.

Um den Erkenntnisgewinn der vorliegenden Studie bezüglich der Funktion der retinalen CD11b-positiven Zellen weiter auszubauen und noch vorhandene Unklarheiten weiter aufzulösen, wäre eine zukünftige Studie gleichen Aufbaus und fast gleicher Methodik, allerdings mit intravitreal (= Zielort-nah) verabreichten Injektionen, sinnvoll. Zum einen würden die Effektoren sicher am Zielort (= intraokular) "ankommen". Zum anderen würde die Möglichkeit ausgeschaltet werden, dass die Anzahl der retinalen CD11b-positiven Zellen aufgrund der intraperitoneal gesetzten Injektion und dem damit einhergehenden intraperitonealen Entzündungsreiz (und folglich vermehrter Zellauswanderung Richtung Peritonealhöhle und/ oder verringerter retinaler Immunzellrekrutierung) (mit) verringert worden ist. Das quantitative Verteilungsmuster der retinalen CD11b-positiven Zellen könnte

so in direkten Zusammenhang mit der C5a- und/ oder NOX-D20-Supplementierung gebracht werden.

Um eine Aussage über den Anteil der rekrutierten retinalen CD11b-positiven Zellen an den Gesamt-CD11b-positiven Zellen in der Netzhaut zu treffen zu können, wäre es ebenfalls sinnvoll, in einer zukünftige Arbeit mit Hilfe von immunhistochemischen Kombinationsfärbungen differenzierter zwischen retinalen Mikroglia-Zellen und peripheren Makrophagen unterscheiden zu können. Die Arbeitsgruppe plant bereits eine ergänzende Studie zur quantitativen Analyse der retinalen Makrophagen- und Mikroglia-Zell-Populationen im Mausmodell der OIR unter Verwendung der Methodik der Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS).

Das Wissen über die zellulären und molekularen Prozesse, die involviert sind in die retinale Antwort auf Ischämie und Hypoxie, stellt die Basis für die Identifizierung neuer (molekularer) Ansatzpunkte dar, um den Einfluss auf die Ausbildung und das Fortschreiten retinaler vasoproliferativer Erkrankungen, wie die Frühgeborenenretinopathie (ROP), nehmen zu können (Caprara & Grimm 2012) und nicht nur über die Möglichkeit einer symptomatischen Behandlung zu verfügen. Neu identifizierte zelluläre und molekulare Ansatzpunkte, wie im Falle der vorliegenden Studie der aktivierte Komplementfaktor C5a, könnten zukünftig pharmakologisch beeinflusst werden mit dem Ziel, die Netzhautintegrität und -funktion und somit das Sehvermögen der ROP-Patienten zu verbessern bzw. wiederherzustellen und dauerhaft zu erhalten (Caprara & Grimm 2012).

Zusammenfassung

7. Zusammenfassung

Komplementfaktor C5a reduziert die retinale Vasoobliteration, Neovaskularisation und die Anzahl mononukleärer Phagozyten im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie

EINLEITUNG

Frühgeborenenretinopathie (Retinopathy of prematurity, ROP) ist eine von Die Vasoobliteration (Phase I) und anschließender Neovaskularisation (Phase II) geprägte Blutgefäßerkrankung der Netzhaut. Bis zu einem Fünftel aller Erblindungen und Sehschwächen bei Kindern in den Industrieländern werden von der ROP hervorgerufen. Mehr als zwei Drittel aller Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von weniger als 1251 g entwickeln die ROP. Derzeitige Behandlungsmethoden (z.B. punktuelle Laserbestrahlung der ischämischen Netzhautbereiche, angiostatische Präparate) sind oft verbunden mit einem hohen Grad an Gewebeschädigung, dem Risiko von lokalen sowie systemischen Komplikationen und/ oder Rezidiven. Mit zunehmender Zahl überlebensfähiger Frühgeborener steigt auch das Bedürfnis an besseren und angemesseneren Therapiemöglichkeiten für die ROP. Die schwerwiegendste Komplikation der ROP stellt die Netzhautablösung und damit verbunden der Verlust des Sehvermögens als Folge der pathologischen Neovaskularisation dar. Eine Reihe von Forschungsansätzen postuliert, dass das Komplementsystem zusammen mit Immunzellen die Schlüsselkomponenten bei der Ausbildung der retinalen Neovaskularisation darstellen. Demzufolge verkörpern sie ideale Ansatzpunkte bei der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Korrelation zwischen dem Komplementsystem und der Entwicklung retinaler Neovaskularisationen unter Einbezug der Interaktion mit den (aktivierten) CD11b-positiven Zellen klarer definieren und daraus neue potentielle Therapieansätze identifizieren zu können. Die konkreten Ziele waren die Beantwortung folgender Fragestellungen:

- 1. Kann die C5a-C5aR-Achse des Komplementsystems die Ausbildung der retinalen Vasoobliteration und Neovaskularisation der ROP beeinflussen?
- Korreliert das r\u00e4umliche Verteilungsmuster der retinalen CD11b-positiven Zellen mit der Zone der retinalen Neovaskularisation (Tuft-Zone) unter der Hypothese, dass aktivierte CD11b-positive Zellen vor allem in der Tuft-Zone vorkommen? Ist dieses Verteilungsmuster von dem Komplementfaktor C5a beeinflussbar?
- 3. Führt das Mausmodell der OIR per se zu einer erhöhten Komplementaktivität. Ist eine Beeinflussung der Komplementaktivität durch C5a möglich?

METHODEN

Das Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (Oxygen-induced retinopathy, OIR) ist ein etabliertes Tiermodell, das die neovaskulären Charakteristika der humanen Frühgeborenenretinopathie zuverlässig imitiert. Die vorliegende Studie bedient sich diesem Tiermodell, um die Hypothesen zu untersuchen. Neonatalen OIR-Mäuse wurden vom postnatalen Tag (P)12 bis P16 täglich intraperitoneale Injektionen mit C5a, C5a-Inhibitor oder reiner Vehikelflüssigkeit (Kontrolle) verabreicht. Für die Untersuchung der Komplementaktivität wurden ergänzend reine OIR-Mäuse (ohne Injektionsbehandlung) und unter durchgehend normoxischen Bedingungen gehaltene Mäuse genutzt. Die Mäuse wurden an P14, P17 und P21 zur Probengewinnung geopfert. Immunhistochemie und retinale Flachpräparate dienten der Analyse: 1) des Ausmaßes der retinalen Vasoobliteration (avaskuläre Bereiche) und 2) der Neovaskularisation (Tufts), und 3) des quantitativen Verteilungsmusters der (aktivierten) CD11b-positiven Zellen bezüglich der avaskulären, Tuftphysiologisch und vaskularisierten Zonen. Darüber hinaus wurden retinale Genexpressionsanalysen verschiedener Komplementfaktoren mittels quantitativer PCR durchgeführt.

ERGEBNISSE

Die C5a-Supplementierung führte zu einem signifikant reduzierten Ausmaß der retinalen Vasoobliteration und Neovaskularisation im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der avaskulären Zone waren gruppenübergreifend signifikant weniger CD11b-positive Zellen als in der vaskulären (P14 und P17) und als in der Tuft-Zone (P17). Unabhängig von der Behandlung war die Anzahl der aktivierten CD11b-positiven Zellen in der avaskulären (P14 und P17) und in der Tuft-Zone (P17 und P21) signifikant höher verglichen mit den physiologisch vaskularisierten Regionen. Die C5a-Supplementierung hat sowohl die Gesamtzellzahl (P17 und P21) als auch die Zahl der aktivierten Zellen (P14 und P17) in den pathologisch vaskularisierten Zonen (avaskuläre und Tuft-Zone) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert. Die Komplementaktivität war im Rahmen der OIR erhöht und konnte nicht durch C5a-Supplementierung beeinflusst werden. Die C5a-Inhibierung hatte keinen Einfluss auf die retinale Vasoobliteration oder Neovaskularisation; das räumliche Verteilungsmuster der (aktivierten) CD11b-positiven Zellen konnte zu wenigen Zeitpunkten beeinflusst werden, wobei die Effekte mit denen der C5a-Supplementierung vergleichbar waren.

Die C5a-Injektionen führten zu einer schnelleren Revaskularisation der avaskulären Zone und schnelleren Regression der retinalen Tufts in Korrelation mit einer Reduktion CD11bpositiver Zellen. Die bereits bekannten pro- und anti-angiogenen Effekte des Komplements

Zusammenfassung

unterstützten die Ergebnisse der vorliegenden Studie.

Die "Zielort-fern" gesetzten intraperitonealen Injektionen können einen starken Entzündungsreiz im Peritoneum hervorgerufen haben, der eine stärkere Aktivierung des Komplementsystems sowie einen stärkeren Rekrutierungsreiz für die CD11b-positiven Zellen verursacht haben könnte als die gleichen lokal durch die OIR im Auge ausgelösten Stimuli. Die angewandte Methodik könnte demnach zur reduzierten Zellzahl und Komplementaktivität in der Netzhaut beigetragen haben. Das vermehrte Vorkommen der (aktivierten) CD11bpositiven Zellen in den pathologisch vaskularisierten Zonen spricht für eine Beteiligung dieser Zellen an der retinalen Blutgefäßbildung. Die wenigen beobachteten Effekte der C5a-Inhibierung könnten in einer verringerten Zellrekrutierung an den Injektionsort ausgelöst durch eingeschränkte C5a-bedingte Immunzellrekrutierung und/ oder einer methodischen Schwäche der Studie begründet sein.

SCHLUSSFOLGERUNG

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass das aktivierte Komplementsystem und insbesondere die C5a-C5aR-Achse das Potential hat, die im Rahmen des Mausmodells der OIR entwickelte retinalen Neovaskularisation signifikant zu hemmen. Eine Beteiligung der CD11b-positiven Zellen erscheint dabei als wahrscheinlich. Eine zukünftige Studie mit intravitrealen Injektionen (lokale anstatt systemischer Applikation) könnte die in der vorliegenden Studie gewonnenen Erkenntnisse um wertvolle Informationen erweitern. Dennoch deuten die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hin, dass der aktivierte Komplementfaktor C5a einen potentiellen neuen therapeutischen Angriffspunkt darstellt, der im Rahmen der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien der ROP berücksichtigt werden sollte.

8. Summary

Complement factor C5a reduces retinal vaso-obliteration, neovascularisation and number of mononuclear phagocytes in the mouse model of oxygen-induced retinopathy

INTRODUCTION

Retinopathy of prematurity (ROP) is a vascular disease of the retina characterized by vasoobliteration (phase I) and, subsequently, neovascularisation (phase II). In the industrialized countries up to one-fifth of all blindness and visual impairment among children are caused by ROP. More than two thirds of the premature infants weighing less than 1251g at birth develop ROP. Current treatment methods (e.g. selective laser irradiation of the ischemic retinal areas, angiostatic medication) are often associated with a high degree of tissue damage, the risk of local as well as systemic complications and/ or recurrences of the disease. As the number of premature infants capable of surviving increases, there is a rising need of better and more adequate therapies for ROP. The most severe complication of ROP is retinal detachment and hence loss of vision as a consequence of pathological neovascularisation. Several lines of research argue that the complement system, together with immune cells, are the key contributors to the retinal neovascularization. Thus they are ideal candidates to take into account in the development of new therapeutic strategies.

The aim of the present study was to correlate the complement system with the development of retinal neovascularisation, also taking into consideration the interaction with the (activated) CD11b-positive cells, in order to identify potential new therapeutic approaches. The specific objectives were:

- 1. Can the C5a-C5aR axis of the complement system influence the formation of retinal vaso-obliteration and neovascularisation in ROP?
- 2. Does the spatial distribution pattern of the retinal CD11b-positive cells correlate with the zone of retinal neovascularisation (tuft zone), with activated CD11b-positive cells mainly found in the tuft zone? Can this distribution pattern be influenced by the complement factor C5a?
- 3. Does the OIR mouse model per se lead to increased complement activity? Is it possible to influence the complement activity by C5a action?

METHODS

Oxygen-induced retinopathy (OIR) is a well-established mouse model that mimics the main neovascular characteristics of ROP in humans. The present study employed this animal
Summary

model to investigate the hypotheses. Neonatal OIR mice were treated with daily intraperitoneal injections of C5a, C5a inhibitor or vehicle control from postnatal day (P)12 to P16. Additionally, for the study of the complement activity, pure OIR mice (no injection treatment) and mice kept under normoxic conditions at all times were used. The mice were sacrificed at P14, P17 and P21. Immunohistochemistry and retinal whole-mounts served to analyse: 1) the extent of retinal vaso-obliteration (avascular areas) and 2) neovascularisation (tufts), and 3) the quantitative distribution pattern of the (activated) CD11b-positive cells with respect to the avascular, tuft and physiologically vascularized zones. In addition, retinal gene expression analyses of different complement factors were performed by means of quantitative PCR.

RESULTS

C5a supplementation led to a significantly reduced extent of retinal vaso-obliteration and neovascularisation in comparison to the control group. All groups presented significantly less CD11b-positive cells in the avascular zone when compared to the physiologically vascularized (P14 and P17) and the tuft zones (P17). Independently of the treatment, the number of activated CD11b-positive cells was significantly higher in the avascular (P14 and P17) and in the tuft zone (P17 and P21) when compared to physiologically vascularized regions. C5a supplementation significantly reduced the total number of CD11b-positive cells (P17 and P21), as well as the number of activated cells among them (P14 and P17) in the pathologically vascularized zones (avascular and tuft zone) when compared to control. The complement activity was increased in the context of OIR and could not be influenced by C5a supplementation. C5a inhibition had no effect on retinal vaso-obliteration or neovascularisation. The spatial distribution pattern of the (activated) CD11b-positive cells was influenced by C5a inhibition at few time points, the effects being comparable to those of C5a supplementation.

The C5a injections resulted in a faster re-vascularisation of the avascular zone and in a faster regression of the retinal tufts; this was correlated with a reduction in CD11b-positive cells. The already known pro- and anti-angiogenic effects of the complement supported the results of the present study. The intraperitoneal injections, placed far off the target location (of the retina), may have caused a strong inflammatory stimulus in the peritoneum which may have created a stronger activation of the complement system, as well as a stronger recruitment stimulus for the CD11b-positive cells compared to the same local stimuli induced by the OIR in the eye. The applied methodology could thus have contributed to the reduced cell count and complement activity in the retina. The increased occurrence of the (activated) CD11b-positive cells in the pathologically vascularized zones indicates an involvement of

Summary

these cells in the retinal angiogenesis. The few observed effects of C5a inhibition could be due to reduced cell recruitment to the injection site by inhibited C5a-induced immune cell recruitment and/ or methodological pitfalls of the study.

CONCLUSION

The results of the present study show that the activated complement and in particular the C5a-C5aR axis has the potential to significantly inhibit retinal neovascularisation developed in the OIR mouse model. An involvement of the CD11b-positive cells in the time-course of this appears to be likely. A future study with intravitreal injections (local application instead of systemic) could enrich the findings gained in the present study with valuable information. Nevertheless, the results of the present study suggest that the activated complement factor C5a is a potential new therapeutic target that could be taken into account in the development of new treatment strategies of ROP.

Literaturverzeichnis

9. Literaturverzeichnis

- Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, Takagi H, Iwamoto MA. 1995a. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 113: 1538-44
- Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, et al. 1995b. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10457-61
- Alawieh A, Elvington A, Zhu H, Yu J, Kindy MS, et al. 2015. Modulation of post-stroke degenerative and regenerative processes and subacute protection by site-targeted inhibition of the alternative pathway of complement. *J Neuroinflammation* 12: 247
- Albini TA, Wang RC, Reiser B, Zamir E, Wu GS, Rao NA. 2005. Microglial stability and repopulation in the retina. *Br J Ophthalmol* 89: 901-3
- Albrecht EA, Chinnaiyan AM, Varambally S, Kumar-Sinha C, Barrette TR, et al. 2004. C5ainduced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol* 164: 849-59
- Allen NJ, Barres BA. 2005. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 15: 542-8
- Aloisi F. 2001. Immune function of microglia. *Glia* 36: 165-79
- Andersen CC, Phelps DL. 2000. Peripheral retinal ablation for threshold retinopathy of prematurity in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*: CD001693
- Anderson DH, Radeke MJ, Gallo NB, Chapin EA, Johnson PT, et al. 2010. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Prog Retin Eye Res* 29: 95-112
- Apte RS, Richter J, Herndon J, Ferguson TA. 2006. Macrophages inhibit neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. *PLoS Med* 3: e310
- Armstrong RC, Harvath L, Dubois-Dalcq ME. 1990. Type 1 astrocytes and oligodendrocytetype 2 astrocyte glial progenitors migrate toward distinct molecules. *J Neurosci Res* 27: 400-7
- Ashton AW, Ware GM, Kaul DK, Ware JA. 2003. Inhibition of tumor necrosis factor alphamediated NFkappaB activation and leukocyte adhesion, with enhanced endothelial apoptosis, by G protein-linked receptor (TP) ligands. *J Biol Chem* 278: 11858-66
- Ashton N. 1966. Oxygen and the growth and development of retinal vessels. In vivo and in vitro studies. The XX Francis I. Proctor Lecture. *Am J Ophthalmol* 62: 412-35
- Ashwell K. 1991. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Brain Res Dev Brain Res* 58: 1-12

- Ashwell KW, Holländer H, Streit W, Stone J. 1989. The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat. *Vis Neurosci* 2: 437-48
- Bai Y, Ma JX, Guo J, Wang J, Zhu M, et al. 2009. Müller cell-derived VEGF is a significant contributor to retinal neovascularization. *J Pathol* 219: 446-54
- Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW. 1993. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7: 111-8
- Banin E, Dorrell MI, Aguilar E, Ritter MR, Aderman CM, et al. 2006. T2-TrpRS inhibits preretinal neovascularization and enhances physiological vascular regrowth in OIR as assessed by a new method of quantification. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 2125-34
- Barnum SR. 1995. Complement biosynthesis in the central nervous system. *Crit Rev Oral Biol Med* 6: 132-46
- Barnum SR. 2002. Complement in central nervous system inflammation. *Immunol Res* 26: 7-13
- Bell EF, Klein JM. 1994. Comments on Oxygen Toxicity and Retinopathy (ROP) in the Premature Infant. In *Iowa Neonatology Handbook: Pulmonary*, ed. CsH University of Iowa, Department or Pediatrics
- Benninghoff A, Drenckhanhn D. 2008. *Taschenbuch Anatomie*. 1. Auflage. München: Elsevier GmbH. ISBN: 978-3-437-41194-6.
- Benoit ME, Tenner AJ. 2011. Complement protein C1q-mediated neuroprotection is correlated with regulation of neuronal gene and microRNA expression. *J Neurosci* 31: 3459-69
- Berman JW, Guida MP, Warren J, Amat J, Brosnan CF. 1996. Localization of monocyte chemoattractant peptide-1 expression in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis and trauma in the rat. *J Immunol* 156: 3017-23
- Blanks JC, Johnson LV. 1983. Selective lectin binding of the developing mouse retina. *J Comp Neurol* 221: 31-41
- Bolton MM, Eroglu C. 2009. Look who is weaving the neural web: glial control of synapse formation. *Curr Opin Neurobiol* 19: 491-7
- Bongrazio M, Pries AR, Zakrzewicz A. 2003. The endothelium as physiological source of properdin: role of wall shear stress. *Mol Immunol* 39: 669-75
- Bora PS, Sohn JH, Cruz JM, Jha P, Nishihori H, et al. 2005. Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization. *J Immunol* 174: 491-7
- Bosmann M, Ward PA. 2012. Role of C3, C5 and anaphylatoxin receptors in acute lung injury and in sepsis. *Adv Exp Med Biol* 946: 147-59

- Boyle JJ, Weissberg PL, Bennett MR. 2002. Human macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis requires NO enhancement of Fas/Fas-L interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1624-30
- Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, et al. 2009. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res* 28: 423-51
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, et al. 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25: 397-424
- Brockmann C, Brockmann T, Dege S, Busch C, Kociok N, et al. 2015. Intravitreal inhibition of complement C5a reduces choroidal neovascularization in mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*
- Bénard M, Raoult E, Vaudry D, Leprince J, Falluel-Morel A, et al. 2008. Role of complement anaphylatoxin receptors (C3aR, C5aR) in the development of the rat cerebellum. *Mol Immunol* 45: 3767-74
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, et al. 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28: 264-78
- Caprara C, Grimm C. 2012. From oxygen to erythropoietin: relevance of hypoxia for retinal development, health and disease. *Prog Retin Eye Res* 31: 89-119
- Chalam KV, Sambhav K. 2016. Optical Coherence Tomography Angiography in Retinal Diseases. *J Ophthalmic Vis Res* 11: 84-92
- Chan A, Magnus T, Gold R. 2001. Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and modulation by different cytokines: mechanism for removal of apoptotic cells in the inflamed nervous system. *Glia* 33: 87-95
- Chan A, Seguin R, Magnus T, Papadimitriou C, Toyka KV, et al. 2003. Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and its therapeutic implications: termination of CNS autoimmune inflammation and modulation by interferon-beta. *Glia* 43: 231-42
- Chan CK, Pham LN, Zhou J, Spee C, Ryan SJ, Hinton DR. 2005. Differential expression of pro- and antiangiogenic factors in mouse strain-dependent hypoxia-induced retinal neovascularization. *Lab Invest* 85: 721-33
- Chan-Ling T, Gock B, Stone J. 1995. The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that 'physiological hypoxia' is the stimulus for normal retinal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 1201-14
- Checchin D, Sennlaub F, Levavasseur E, Leduc M, Chemtob S. 2006. Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 3595-602

- Chen J, Connor KM, Aderman CM, Willett KL, Aspegren OP, Smith LE. 2009. Suppression of retinal neovascularization by erythropoietin siRNA in a mouse model of proliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 1329-35
- Chen J, Smith LE. 2007. Retinopathy of prematurity. Angiogenesis 10: 133-40
- Chen L, Yang P, Kijlstra A. 2002. Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm* 10: 27-39
- Chen M, Zhao J, Luo C, Pandi SP, Penalva RG, et al. 2012. Para-inflammation-mediated retinal recruitment of bone marrow-derived myeloid cells following whole-body irradiation is CCL2 dependent. *Glia* 60: 833-42
- Cheng L, Bu H, Portillo JA, Li Y, Subauste CS, et al. 2013. Modulation of retinal Müller cells by complement receptor C5aR. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 8191-8
- Chu Y, Alder VA, Humphrey MF, Constable IJ. 1999. Localization of IgG in the normal and dystrophic rat retina after laser lesions. *Aust N Z J Ophthalmol* 27: 117-25
- Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, et al. 1990. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 172: 1535-45
- Connolly SE, Hores TA, Smith LE, D'Amore PA. 1988. Characterization of vascular development in the mouse retina. *Microvasc Res* 36: 275-90
- Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, Aderman CM, Chen J, et al. 2009. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat Protoc* 4: 1565-73
- Connor KM, SanGiovanni JP, Lofqvist C, Aderman CM, Chen J, et al. 2007. Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med* 13: 868-73
- Crespo-Garcia S, Reichhart N, Hernandez-Matas C, Zabulis X, Kociok N, et al. 2015. In vivo analysis of the time and spatial activation pattern of microglia in the retina following laser-induced choroidal neovascularization. *Exp Eye Res* 139: 13-21
- Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. 2001. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol* 70: 478-90
- Cuadros MA, Navascués J. 2001. Early origin and colonization of the developing central nervous system by microglial precursors. *Prog Brain Res* 132: 51-9
- Cuadros MA, Santos AM, Martín-Oliva D, Calvente R, Tassi M, et al. 2006. Specific immunolabeling of brain macrophages and microglial cells in the developing and mature chick central nervous system. *J Histochem Cytochem* 54: 727-38
- Davey RA, MacLean HE. 2006. Current and future approaches using genetically modified mice in endocrine research. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E429-38

- Davies MH, Eubanks JP, Powers MR. 2006. Microglia and macrophages are increased in response to ischemia-induced retinopathy in the mouse retina. *Mol Vis* 12: 467-77
- Davies MH, Stempel AJ, Powers MR. 2008. MCP-1 deficiency delays regression of pathologic retinal neovascularization in a model of ischemic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 4195-202
- Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, et al. 1999. Pigment epitheliumderived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285: 245-8
- Degn SE, Thiel S, Jensenius JC. 2007. New perspectives on mannan-binding lectinmediated complement activation. *Immunobiology* 212: 301-11
- Del Rio-Tsonis K, Tsonis PA, Zarkadis IK, Tsagas AG, Lambris JD. 1998. Expression of the third component of complement, C3, in regenerating limb blastema cells of urodeles. *J Immunol* 161: 6819-24
- Diaz-Araya CM, Provis JM, Penfold PL, Billson FA. 1995. Development of microglial topography in human retina. *J Comp Neurol* 363: 53-68
- Dick AD, Ford AL, Forrester JV, Sedgwick JD. 1995. Flow cytometric identification of a minority population of MHC class II positive cells in the normal rat retina distinct from CD45lowCD11b/c+CD4low parenchymal microglia. *Br J Ophthalmol* 79: 834-40
- Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P, Kraal G. 1985. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54: 589-99
- Dong Q, Sun L, Peng L, Yan B, Lv J, et al. 2015. Expression of C5a and its receptor following spinal cord ischemia reperfusion injury in the rat. *Spinal Cord* 53: 581-4
- Dorrell MI, Aguilar E, Friedlander M. 2002. Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 3500-10
- Dorrell MI, Aguilar E, Jacobson R, Trauger SA, Friedlander J, et al. 2010. Maintaining retinal astrocytes normalizes revascularization and prevents vascular pathology associated with oxygen-induced retinopathy. *Glia* 58: 43-54
- Dorrell MI, Friedlander M. 2006. Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina. *Prog Retin Eye Res* 25: 277-95
- Downie LE, Pianta MJ, Vingrys AJ, Wilkinson-Berka JL, Fletcher EL. 2007. Neuronal and glial cell changes are determined by retinal vascularization in retinopathy of prematurity. *J Comp Neurol* 504: 404-17
- Duffield JS, Erwig LP, Wei X, Liew FY, Rees AJ, Savill JS. 2000. Activated macrophages direct apoptosis and suppress mitosis of mesangial cells. *J Immunol* 164: 2110-9
- Dunkelberger JR, Song WC. 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 20: 34-50

- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. 1995. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146: 1029-39
- Ehrengruber MU, Geiser T, Deranleau DA. 1994. Activation of human neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. *FEBS Lett* 346: 181-4
- Eichler W, Kuhrt H, Hoffmann S, Wiedemann P, Reichenbach A. 2000. VEGF release by retinal glia depends on both oxygen and glucose supply. *Neuroreport* 11: 3533-7
- Eroglu C, Barres BA. 2010. Regulation of synaptic connectivity by glia. Nature 468: 223-31
- Eslamloo K, Akhavan SR, Fallah FJ, Henry MA. 2014. Variations of physiological and innate immunological responses in goldfish (Carassius auratus) subjected to recurrent acute stress. *Fish Shellfish Immunol* 37: 147-53
- Farkas I, Baranyi L, Liposits ZS, Yamamoto T, Okada H. 1998. Complement C5a anaphylatoxin fragment causes apoptosis in TGW neuroblastoma cells. *Neuroscience* 86: 903-11
- Feeney SA, Simpson DA, Gardiner TA, Boyle C, Jamison P, Stitt AW. 2003. Role of vascular endothelial growth factor and placental growth factors during retinal vascular development and hyaloid regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 839-47
- Ferguson TA, Apte RS. 2008. Angiogenesis in eye disease: immunity gained or immunity lost? *Semin Immunopathol* 30: 111-9
- Ferrara N, Davis-Smyth T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18: 4-25
- Fischer F, Martin G, Agostini HT. 2011. Activation of retinal microglia rather than microglial cell density correlates with retinal neovascularization in the mouse model of oxygeninduced retinopathy. *J Neuroinflammation* 8: 120
- Fletcher EL, Downie LE, Hatzopoulos K, Vessey KA, Ward MM, et al. 2010. The significance of neuronal and glial cell changes in the rat retina during oxygen-induced retinopathy. *Doc Ophthalmol* 120: 67-86
- Flierl MA, Rittirsch D, Chen AJ, Nadeau BA, Day DE, et al. 2008a. The complement anaphylatoxin C5a induces apoptosis in adrenomedullary cells during experimental sepsis. *PLoS One* 3: e2560
- Flierl MA, Rittirsch D, Sarma JV, Huber-Lang M, Ward PA. 2008b. Adrenergic regulation of complement-induced acute lung injury. *Adv Exp Med Biol* 632: 93-103
- Flynn JT. 1987. Retinopathy of prematurity. Pediatr Clin North Am 34: 1487-516
- Fonseca MI, Ager RR, Chu SH, Yazan O, Sanderson SD, et al. 2009. Treatment with a C5aR antagonist decreases pathology and enhances behavioral performance in murine models of Alzheimer's disease. *J Immunol* 183: 1375-83

- Foreman KE, Glovsky MM, Warner RL, Horvath SJ, Ward PA. 1996. Comparative effect of C3a and C5a on adhesion molecule expression on neutrophils and endothelial cells. *Inflammation* 20: 1-9
- FortesFilho JB, Bonomo PP, Maia M, Procianoy RS. 2009. Weight gain measured at 6 weeks after birth as a predictor for severe retinopathy of prematurity: study with 317 very low birth weight preterm babies. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247: 831-6
- Fujita T. 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2: 346-53
- Fukuoka Y, Medof EM. 2001. C5a receptor-mediated production of IL-8 by the human retinal pigment epithelial cell line, ARPE-19. *Curr Eye Res* 23: 320-5
- Fukuoka Y, Strainic M, Medof ME. 2003. Differential cytokine expression of human retinal pigment epithelial cells in response to stimulation by C5a. *Clin Exp Immunol* 131: 248-53
- Gasque P, Singhrao SK, Neal JW, Götze O, Morgan BP. 1997. Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *Am J Pathol* 150: 31-41
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, et al. 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161: 1163-77
- Gilbert C, Rahi J, Eckstein M, O'Sullivan J, Foster A. 1997. Retinopathy of prematurity in middle-income countries. *Lancet* 350: 12-4
- Girardi G, Yarilin D, Thurman JM, Holers VM, Salmon JE. 2006. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med* 203: 2165-75
- Giulian D, Corpuz M, Chapman S, Mansouri M, Robertson C. 1993. Reactive mononuclear phagocytes release neurotoxins after ischemic and traumatic injury to the central nervous system. *J Neurosci Res* 36: 681-93
- Glabinski AR, Balasingam V, Tani M, Kunkel SL, Strieter RM, et al. 1996. Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 is expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain. *J Immunol* 156: 4363-8
- Good WV, Hardy RJ. 2001. The multicenter study of Early Treatment for Retinopathy of Prematurity (ETROP). *Ophthalmology* 108: 1013-4
- Good WV, Hardy RJ, Dobson V, Palmer EA, Phelps DL, et al. 2005. The incidence and course of retinopathy of prematurity: findings from the early treatment for retinopathy of prematurity study. *Pediatrics* 116: 15-23
- Graeber MB. 2010. Changing face of microglia. Science 330: 783-8

- Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, et al. 2006. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124: 175-89
- Gu X, Samuel S, El-Shabrawey M, Caldwell RB, Bartoli M, et al. 2002. Effects of sustained hyperoxia on revascularization in experimental retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 496-502
- Guillemin GJ, Brew BJ. 2004. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* 75: 388-97
- Guo RF, Riedemann NC, Ward PA. 2004. Role of C5a-C5aR interaction in sepsis. *Shock* 21: 1-7
- Guo RF, Ward PA. 2005. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 23: 821-52
- Gyllensten LJ, Hellstrom BE. 1954. Experimental approach to the pathogenesis of retrolental fibroplasia. I. Changes of the eye induced by exposure of newborn mice to concentrated oxygen. *Acta Paediatr Suppl* 43: 131-48
- Gyllensten LJ, Hellstrom BE. 1955. Experimental approach to the pathogenesis of retrolental fibroplasia. II. The influence of the developmental maturity on oxygen-induced changes in the mouse eye. *Am J Ophthalmol* 39: 475-88
- Haigh JJ, Morelli PI, Gerhardt H, Haigh K, Tsien J, et al. 2003. Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling. *Dev Biol* 262: 225-41
- Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10: 1387-94
- Hartmann P. 2013. Schichten und Zelltypen der Säugetier-Retina. ed. edited by MG SchmidcreatingSVGversionbyЮкатан.https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Retina_layers.svg-/media/File:Retina_layers.svg Abgerufen am: 21.03.2017 um 20.00 Uhr
- Hartnett ME, Penn JS. 2012. Mechanisms and management of retinopathy of prematurity. *N* Engl J Med 367: 2515-26
- Haviland DL, McCoy RL, Whitehead WT, Akama H, Molmenti EP, et al. 1995. Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *J Immunol* 154: 1861-9
- Hellstrom A, Perruzzi C, Ju M, Engstrom E, Hard AL, et al. 2001. Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5804-8

- Hellström A, Hård AL, Engström E, Niklasson A, Andersson E, et al. 2009. Early weight gain predicts retinopathy in preterm infants: new, simple, efficient approach to screening. *Pediatrics* 123: e638-45
- Hellström A, Ley D, Hansen-Pupp I, Niklasson A, Smith L, et al. 2010. New insights into the development of retinopathy of prematurity--importance of early weight gain. *Acta Paediatr* 99: 502-8
- Hoehlig K, Maasch C, Shushakova N, Buchner K, Huber-Lang M, et al. 2013. A novel C5aneutralizing mirror-image (I-)aptamer prevents organ failure and improves survival in experimental sepsis. *Mol Ther* 21: 2236-46
- Hourcade DE. 2008. Properdin and complement activation: a fresh perspective. *Curr Drug Targets* 9: 158-64
- Hu J, Blair MP, Shapiro MJ, Lichtenstein SJ, Galasso JM, Kapur R. 2012. Reactivation of retinopathy of prematurity after bevacizumab injection. *Arch Ophthalmol* 130: 1000-6
- Hu M, Liu B, Jawad S, Ling D, Casady M, et al. 2011. C5a contributes to intraocular inflammation by affecting retinal pigment epithelial cells and immune cells. *Br J Ophthalmol* 95: 1738-44
- Hu R, Chen ZF, Yan J, Li QF, Huang Y, et al. 2014. Complement C5a exacerbates acute lung injury induced through autophagy-mediated alveolar macrophage apoptosis. *Cell Death Dis* 5: e1330
- Hua JY, Smith SJ. 2004. Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nat Neurosci* 7: 327-32
- Huberman AD, Feller MB, Chapman B. 2008. Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. *Annu Rev Neurosci* 31: 479-509
- Huberman AD, Niell CM. 2011. What can mice tell us about how vision works? *Trends Neurosci* 34: 464-73
- Hunt JR, Martin CB, Martin BK. 2005. Transcriptional regulation of the murine C5a receptor gene: NF-Y is required for basal and LPS induced expression in macrophages and endothelial cells. *Mol Immunol* 42: 1405-15
- Husain SM, Sinha AK, Bunce C, Arora P, Lopez W, et al. 2013. Relationships between maternal ethnicity, gestational age, birth weight, weight gain, and severe retinopathy of prematurity. *J Pediatr* 163: 67-72
- Ikeda K, Nagasawa K, Horiuchi T, Tsuru T, Nishizaka H, Niho Y. 1997. C5a induces tissue factor activity on endothelial cells. *Thromb Haemost* 77: 394-8
- Ishida S, Yamashiro K, Usui T, Kaji Y, Ogura Y, et al. 2003. Leukocytes mediate retinal vascular remodeling during development and vaso-obliteration in disease. *Nat Med* 9: 781-8

- Ivanovska ND, Dimov VB, Bankova VS, Popov SS. 1995. Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity in vivo. J Ethnopharmacol 47: 145-7
- Jacob A, Hack B, Bai T, Brorson JR, Quigg RJ, Alexander JJ. 2010a. Inhibition of C5a receptor alleviates experimental CNS lupus. *J Neuroimmunol* 221: 46-52
- Jacob A, Hack B, Chen P, Quigg RJ, Alexander JJ. 2011. C5a/CD88 signaling alters bloodbrain barrier integrity in lupus through nuclear factor-κB. *J Neurochem* 119: 1041-51
- Jacob A, Hack B, Chiang E, Garcia JG, Quigg RJ, Alexander JJ. 2010b. C5a alters bloodbrain barrier integrity in experimental lupus. *FASEB J* 24: 1682-8
- Jiang B, Bezhadian MA, Caldwell RB. 1995. Astrocytes modulate retinal vasculogenesis: effects on endothelial cell differentiation. *Glia* 15: 1-10
- Jordan FL, Thomas WE. 1988. Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Res* 472: 165-78
- Kang HJ, Bao L, Xu Y, Quigg RJ, Giclas PC, Holers VM. 2004. Increased serum C3 levels in Crry transgenic mice partially abrogates its complement inhibitory effects. *Clin Exp Immunol* 136: 194-9
- Katz LC, Shatz CJ. 1996. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274: 1133-8
- Kelly J, Ali Khan A, Yin J, Ferguson TA, Apte RS. 2007. Senescence regulates macrophage activation and angiogenic fate at sites of tissue injury in mice. *J Clin Invest* 117: 3421 6
- Kemper C, Hourcade DE. 2008. Properdin: New roles in pattern recognition and target clearance. *Mol Immunol* 45: 4048-56
- Kennedy DW, Abkowitz JL. 1997. Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model. *Blood* 90: 986-93
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91: 461-553
- Kim JH, Yu YS, Kim KW. 2010. Impaired retinal vascular development in anencephalic human fetus. *Histochem Cell Biol* 134: 277-84

Kim SU, de Vellis J. 2005. Microglia in health and disease. J Neurosci Res 81: 302-13

- Kimura Y, Madhavan M, Call MK, Santiago W, Tsonis PA, et al. 2003. Expression of complement 3 and complement 5 in newt limb and lens regeneration. *J Immunol* 170: 2331-9
- Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. 1989. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 245: 1238-41

- Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, Ager RR, Reis ES, Köhl J. 2009. The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol* 46: 2753-66
- Knighton DR, Hunt TK, Scheuenstuhl H, Halliday BJ, Werb Z, Banda MJ. 1983. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science* 221: 1283-5
- Kociok N, Radetzky S, Krohne TU, Gavranic C, Joussen AM. 2006. Pathological but not physiological retinal neovascularization is altered in TNF-Rp55-receptor-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 5057-65
- Koizumi K, Poulaki V, Doehmen S, Welsandt G, Radetzky S, et al. 2003. Contribution of TNF-alpha to leukocyte adhesion, vascular leakage, and apoptotic cell death in endotoxin-induced uveitis in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 2184-91
- Kretzer FL, Mehta RS, Johnson AT, Hunter DG, Brown ES, Hittner HM. 1984. Vitamin E protects against retinopathy of prematurity through action on spindle cells. *Nature* 309: 793-5
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312-8
- Köhl J, Baelder R, Lewkowich IP, Pandey MK, Hawlisch H, et al. 2006. A regulatory role for the C5a anaphylatoxin in type 2 immunity in asthma. *J Clin Invest* 116: 783-96
- König HE, Liebich H-G. 2005. Sehorgan (Organum visus) In Anatomie der Haussäugetiere, ed. HE König, H-G Liebich, pp. 567–80. Stuttgart: Schattauer GmbH. ISBN: 3-7945-2390-3.
- Lacy M, Jones J, Whittemore SR, Haviland DL, Wetsel RA, Barnum SR. 1995. Expression of the receptors for the C5a anaphylatoxin, interleukin-8 and FMLP by human astrocytes and microglia. *J Neuroimmunol* 61: 71-8
- Lang R, Lustig M, Francois F, Sellinger M, Plesken H. 1994. Apoptosis during macrophagedependent ocular tissue remodelling. *Development* 120: 3395-403
- Lange C, Ehlken C, Stahl A, Martin G, Hansen L, Agostini HT. 2009. Kinetics of retinal vasoobliteration and neovascularisation in the oxygen-induced retinopathy (OIR) mouse model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247: 1205-11
- Langer HF, Chung KJ, Orlova VV, Choi EY, Kaul S, et al. 2010. Complement-mediated inhibition of neovascularization reveals a point of convergence between innate immunity and angiogenesis. *Blood* 116: 4395-403
- Langkabel P, Zwirner J, Oppermann M. 1999. Ligand-induced phosphorylation of anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR is mediated by "G protein-coupled receptor kinases. *Eur J Immunol* 29: 3035-46
- Lassmann H, Schmied M, Vass K, Hickey WF. 1993. Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia* 7: 19-24

- Laudes IJ, Chu JC, Huber-Lang M, Guo RF, Riedemann NC, et al. 2002. Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. *J Immunol* 169: 5962-70
- Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, Lewis CE, Royds JA, Harris AL. 2000. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol* 190: 430-6
- Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. 1999. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 79: 991-5
- Leendertse M, Willems RJ, Giebelen IA, Roelofs JJ, van Rooijen N, et al. 2009. Peritoneal macrophages are important for the early containment of Enterococcus faecium peritonitis in mice. *Innate Immun* 15: 3-12
- LeFriec G, Friec GL, Kemper C. 2009. Complement: coming full circle. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 57: 393-407
- Leske DA, Wu J, Fautsch MP, Karger RA, Berdahl JP, et al. 2004. The role of VEGF and IGF-1 in a hypercarbic oxygen-induced retinopathy rat model of ROP. *Mol Vis* 10: 43-50
- Lewis GP, Fisher SK. 2003. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol* 230: 263-90
- Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol* 192: 150-8
- Li JH, Kirkiles-Smith NC, McNiff JM, Pober JS. 2003. TRAIL induces apoptosis and inflammatory gene expression in human endothelial cells. *J Immunol* 171: 1526-33
- Ling TL, Mitrofanis J, Stone J. 1989. Origin of retinal astrocytes in the rat: evidence of migration from the optic nerve. *J Comp Neurol* 286: 345-52
- Lingen MW. 2001. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med* 125: 67-71
- Liszewski MK, Kolev M, Le Friec G, Leung M, Bertram PG, et al. 2013. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity* 39: 1143-57
- Lobov IB, Rao S, Carroll TJ, Vallance JE, Ito M, et al. 2005. WNT7b mediates macrophageinduced programmed cell death in patterning of the vasculature. *Nature* 437: 417-21
- Lynch MA. 2009. The multifaceted profile of activated microglia. Mol Neurobiol 40: 139-56

- Lévi-Strauss M, Mallat M. 1987. Primary cultures of murine astrocytes produce C3 and factor B, two components of the alternative pathway of complement activation. *J Immunol* 139: 2361-6
- Löfqvist C, Andersson E, Sigurdsson J, Engström E, Hård AL, et al. 2006. Longitudinal postnatal weight and insulin-like growth factor I measurements in the prediction of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 124: 1711-8
- Löfqvist C, Hansen-Pupp I, Andersson E, Holm K, Smith LE, et al. 2009. Validation of a new retinopathy of prematurity screening method monitoring longitudinal postnatal weight and insulinlike growth factor I. *Arch Ophthalmol* 127: 622-7
- Madan A, Penn JS. 2003. Animal models of oxygen-induced retinopathy. *Front Biosci* 8: d1030-43
- Maggs DJ, Miller PE, Ofri R. 2008. *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. Fourth Edition. St. Louis: Saunders Elsevier. ISBN: 978-0-7216-0561-6.
- Mahajan SD, Parikh NU, Woodruff TM, Jarvis JN, Lopez M, et al. 2015. C5a alters bloodbrain barrier integrity in a human in vitro model of systemic lupus erythematosus. *Immunology* 146: 130-43
- Mantagos IS, Vanderveen DK, Smith LE. 2009. Emerging treatments for retinopathy of prematurity. *Semin Ophthalmol* 24: 82-6
- Markiewski MM, Mastellos D, Tudoran R, DeAngelis RA, Strey CW, et al. 2004. C3a and C3b activation products of the third component of complement (C3) are critical for normal liver recovery after toxic injury. *J Immunol* 173: 747-54
- Marneros AG, Fan J, Yokoyama Y, Gerber HP, Ferrara N, et al. 2005. Vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium is essential for choriocapillaris development and visual function. *Am J Pathol* 167: 1451-9
- Mastellos D, Papadimitriou JC, Franchini S, Tsonis PA, Lambris JD. 2001. A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration. *J Immunol* 166: 2479-86
- McGlade-McCulloh E, Morrissey AM, Norona F, Muller KJ. 1989. Individual microglia move rapidly and directly to nerve lesions in the leech central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 1093-7
- Mechoulam H, Pierce EA. 2003. Retinopathy of prematurity: molecular pathology and therapeutic strategies. *Am J Pharmacogenomics* 3: 261-77
- Mezu-Ndubuisi OJ, Wanek J, Chau FY, Teng PY, Blair NP, et al. 2014. Correspondence of retinal thinning and vasculopathy in mice with oxygen-induced retinopathy. *Exp Eye Res* 122: 119-22

- Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, et al. 2007. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 10: 1544-53
- Mintz-Hittner HA, Kennedy KA, Chuang AZ, Group B-RC. 2011. Efficacy of intravitreal bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity. *N Engl J Med* 364: 603-15
- Mitchell CA, Risau W, Drexler HC. 1998. Regression of vessels in the tunica vasculosa lentis is initiated by coordinated endothelial apoptosis: a role for vascular endothelial growth factor as a survival factor for endothelium. *Dev Dyn* 213: 322-33
- Mitrasinovic OM, Murphy GM. 2002. Accelerated phagocytosis of amyloid-beta by mouse and human microglia overexpressing the macrophage colony-stimulating factor receptor. *J Biol Chem* 277: 29889-96
- Monk PN, Banks P. 1991. The role of protein kinase C activation and inositol phosphate production in the regulation of cell-surface expression of Mac-1 by complement fragment C5a. *Biochim Biophys Acta* 1092: 251-5
- Monk PN, Barker MD, Partridge LJ. 1994. Multiple signalling pathways in the C5a-induced expression of adhesion receptor Mac-1. *Biochim Biophys Acta* 1221: 323-9
- Morgan BP. 1999. Regulation of the complement membrane attack pathway. *Crit Rev Immunol* 19: 173-98
- Mukherjee P, Thomas S, Pasinetti GM. 2008. Complement anaphylatoxin C5a neuroprotects through regulation of glutamate receptor subunit 2 in vitro and in vivo. *J Neuroinflammation* 5: 5
- Murdoch C, Lewis CE. 2005. Macrophage migration and gene expression in response to tumor hypoxia. *Int J Cancer* 117: 701-8
- Müller-Eberhard HJ. 1986. The membrane attack complex of complement. *Annu Rev Immunol* 4: 503-28
- Nakajima K, Kohsaka S. 2004. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 4: 65-84
- Nathan CF. 1987. Secretory products of macrophages. J Clin Invest 79: 319-26
- Niculescu T, Weerth S, Niculescu F, Cudrici C, Rus V, et al. 2004. Effects of complement C5 on apoptosis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 172: 5702-6
- Niculescu T, Weerth S, Soane L, Niculescu F, Rus V, et al. 2003. Effects of membrane attack complex of complement on apoptosis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 530-3
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308: 1314-8

- Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, et al. 2006. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2328-33
- Onita T, Ji PG, Xuan JW, Sakai H, Kanetake H, et al. 2002. Hypoxia-induced, perinecrotic expression of endothelial Per-ARNT-Sim domain protein-1/hypoxia-inducible factor-2alpha correlates with tumor progression, vascularization, and focal macrophage infiltration in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 8: 471-80
- Osaka H, McGinty A, Höepken UE, Lu B, Gerard C, Pasinetti GM. 1999a. Expression of C5a receptor in mouse brain: role in signal transduction and neurodegeneration. *Neuroscience* 88: 1073-82
- Osaka H, Mukherjee P, Aisen PS, Pasinetti GM. 1999b. Complement-derived anaphylatoxin C5a protects against glutamate-mediated neurotoxicity. *J Cell Biochem* 73: 303-11
- Ozaki H, Yu AY, Della N, Ozaki K, Luna JD, et al. 1999. Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 182-9
- Pahor D. 1998. Visual field loss after argon laser panretinal photocoagulation in diabetic retinopathy: full- versus mild-scatter coagulation. *Int Ophthalmol* 22: 313-9
- Pangburn MK, Müller-Eberhard HJ. 1984. The alternative pathway of complement. *Springer Semin Immunopathol* 7: 163-92
- Pangburn MK, Rawal N. 2002. Structure and function of complement C5 convertase enzymes. *Biochem Soc Trans* 30: 1006-10
- Pavlovski D, Thundyil J, Monk PN, Wetsel RA, Taylor SM, Woodruff TM. 2012. Generation of complement component C5a by ischemic neurons promotes neuronal apoptosis. *FASEB J* 26: 3680-90
- Penn JS, Tolman BL, Henry MM. 1994. Oxygen-induced retinopathy in the rat: relationship of retinal nonperfusion to subsequent neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3429-35
- Penn JS, Tolman BL, Lowery LA. 1993. Variable oxygen exposure causes preretinal neovascularization in the newborn rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 576-85
- Pennell NA, Streit WJ. 1997. Colonization of neural allografts by host microglial cells: relationship to graft neovascularization. *Cell Transplant* 6: 221-30
- Perry VH, O'Connor V. 2008. C1q: the perfect complement for a synaptic feast? *Nat Rev Neurosci* 9: 807-11
- Petersen MA, Dailey ME. 2004. Diverse microglial motility behaviors during clearance of dead cells in hippocampal slices. *Glia* 46: 195-206

- Pickering MC, Cook HT, Warren J, Bygrave AE, Moss J, et al. 2002. Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H. *Nat Genet* 31: 424-8
- Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. 1995. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 905-9
- Pierce EA, Foley ED, Smith LE. 1996. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 114: 1219-28
- Polverini PJ. 1996. How the extracellular matrix and macrophages contribute to angiogenesis-dependent diseases. *Eur J Cancer* 32A: 2430-7
- Polverini PJ, Cotran PS, Gimbrone MA, Unanue ER. 1977. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 269: 804-6
- Poulaki V. 2007. Hypoxia in the Pathogenesis of Retinal Disease In *Retinal Vascular Disease*, ed. AM Joussen, TW Gardner, B Kirchhof, SJ Ryan, pp. 121–38.
 Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. ISBN: 978-3-540-29541-9.
- Provis JM, Leech J, Diaz CM, Penfold PL, Stone J, Keshet E. 1997. Development of the human retinal vasculature: cellular relations and VEGF expression. *Exp Eye Res* 65: 555-68
- Provis JM, Penfold PL, Edwards AJ, van Driel D. 1995. Human retinal microglia: expression of immune markers and relationship to the glia limitans. *Glia* 14: 243-56
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30: 77-105
- Raivich G, Jones LL, Kloss CU, Werner A, Neumann H, Kreutzberg GW. 1998. Immune surveillance in the injured nervous system: T-lymphocytes invade the axotomized mouse facial motor nucleus and aggregate around sites of neuronal degeneration. J Neurosci 18: 5804-16
- Ransohoff RM, Perry VH. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. Annu Rev Immunol 27: 119-45
- Rao NA, Kimoto T, Zamir E, Giri R, Wang R, et al. 2003. Pathogenic role of retinal microglia in experimental uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 22-31
- Reichenbach A, Bringmann A. 2010. *Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina*. New York: Springer.
- Renno T, Krakowski M, Piccirillo C, Lin JY, Owens T. 1995. TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J Immunol* 154: 944-53

Literaturverzeichnis

- Repka MX, Tung B, Good WV, Shapiro M, Capone A, et al. 2006. Outcome of eyes developing retinal detachment during the Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Study (ETROP). *Arch Ophthalmol* 124: 24-30
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11: 785-97
- Ritter MR, Banin E, Moreno SK, Aguilar E, Dorrell MI, Friedlander M. 2006. Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *J Clin Invest* 116: 3266-76
- Rittirsch D, Flierl MA, Nadeau BA, Day DE, Huber-Lang M, et al. 2008. Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat Med* 14: 551-7
- Rivera JC, Sitaras N, Noueihed B, Hamel D, Madaan A, et al. 2013. Microglia and interleukin-1β in ischemic retinopathy elicit microvascular degeneration through neuronal semaphorin-3A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 1881-91
- Rohan RM, Fernandez A, Udagawa T, Yuan J, D'Amato RJ. 2000. Genetic heterogeneity of angiogenesis in mice. *FASEB J* 14: 871-6
- Romay-Penabad Z, Liu XX, Montiel-Manzano G, Papalardo De Martínez E, Pierangeli SS. 2007. C5a receptor-deficient mice are protected from thrombophilia and endothelial cell activation induced by some antiphospholipid antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 1108: 554-66
- Roque RS, Imperial CJ, Caldwell RB. 1996. Microglial cells invade the outer retina as photoreceptors degenerate in Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 196-203
- Ross GD. 2000. Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein. *Crit Rev Immunol* 20: 197-222
- Roth AM. 1977. Retinal vascular development in premature infants. *Am J Ophthalmol* 84: 636-40
- Rungger-Brändle E, Dosso AA, Leuenberger PM. 2000. Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 1971-80
- Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Ahn BJ, Fang S, Parsa AT. 2010. The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration. *Inflamm Res* 59: 897-905
- Sachsenweger M. 2003. *Duale Reihe Augenheilkunde*. 2. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. ISBN: 3-13-1283122.
- Saint-Geniez M, D'Amore PA. 2004. Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol* 48: 1045-58
- Salhia B, Angelov L, Roncari L, Wu X, Shannon P, Guha A. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor by reactive astrocytes and associated neoangiogenesis. *Brain Res* 883: 87-97

- Santos AM, Calvente R, Tassi M, Carrasco MC, Martín-Oliva D, et al. 2008. Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 506: 224-39
- Sapieha P, Joyal JS, Rivera JC, Kermorvant-Duchemin E, Sennlaub F, et al. 2010. Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *J Clin Invest* 120: 3022-32
- Sapieha P, Sirinyan M, Hamel D, Zaniolo K, Joyal JS, et al. 2008. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nat Med* 14: 1067-76
- Sato T, Wada K, Arahori H, Kuno N, Imoto K, et al. 2012. Serum concentrations of bevacizumab (avastin) and vascular endothelial growth factor in infants with retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol* 153: 327-33.e1
- Schaffer DB, Palmer EA, Plotsky DF, Metz HS, Flynn JT, et al. 1993. Prognostic factors in the natural course of retinopathy of prematurity. The Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Ophthalmology* 100: 230-7
- Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101-8
- Schnorr B, Kressin M. 2006. *Embryologie der Haustiere*. 5. Auflage. Stuttgart: Enke Verlag. ISBN: 3-8304-1061-1.
- Scholl HP, Charbel Issa P, Walier M, Janzer S, Pollok-Kopp B, et al. 2008. Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One* 3: e2593
- Scola AM, Johswich KO, Morgan BP, Klos A, Monk PN. 2009. The human complement fragment receptor, C5L2, is a recycling decoy receptor. *Mol Immunol* 46: 1149-62
- Shah PK, Prabhu V, Karandikar SS, Ranjan R, Narendran V, Kalpana N. 2016. Retinopathy of prematurity: Past, present and future. *World J Clin Pediatr* 5: 35-46
- Shen J, Xie B, Dong A, Swaim M, Hackett SF, Campochiaro PA. 2007. In vivo immunostaining demonstrates macrophages associate with growing and regressing vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 4335-41
- Shinjyo N, Ståhlberg A, Dragunow M, Pekny M, Pekna M. 2009. Complement-derived anaphylatoxin C3a regulates in vitro differentiation and migration of neural progenitor cells. *Stem Cells* 27: 2824-32
- Shushakova N, Skokowa J, Schulman J, Baumann U, Zwirner J, et al. 2002. C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory FcgammaRs in immune complex-induced lung disease. *J Clin Invest* 110: 1823-30
- Singer D, Mühlfeld C. 2007. Perinatal adaptation in mammals: the impact of metabolic rate. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 148: 780-4
- Sivaprasad S, Chong NV. 2006. The complement system and age-related macular degeneration. *Eye (Lond)* 20: 867-72

Smith LE. 2002. Pathogenesis of retinopathy of prematurity. Acta Paediatr Suppl 91: 26-8

- Smith LE. 2004. Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Growth Horm IGF Res* 14 Suppl A: S140-4
- Smith LE, Shen W, Perruzzi C, Soker S, Kinose F, et al. 1999. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat Med* 5: 1390-5
- Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, et al. 1994. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 101-11
- Solovjov DA, Pluskota E, Plow EF. 2005. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *J Biol Chem* 280: 1336-45
- Sorokin SP, Hoyt RF, Blunt DG, McNelly NA. 1992. Macrophage development: II. Early ontogeny of macrophage populations in brain, liver, and lungs of rat embryos as revealed by a lectin marker. *Anat Rec* 232: 527-50
- Spitzer D, Mitchell LM, Atkinson JP, Hourcade DE. 2007. Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol* 179: 2600-8
- Springer T, Galfré G, Secher DS, Milstein C. 1979. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 9: 301-6
- Stahl A, Chen J, Sapieha P, Seaward MR, Krah NM, et al. 2010a. Postnatal weight gain modifies severity and functional outcome of oxygen-induced proliferative retinopathy. *Am J Pathol* 177: 2715-23
- Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Chen J, Dennison RJ, et al. 2010b. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 2813-26
- Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Willett KL, Krah NM, et al. 2009. Computer-aided quantification of retinal neovascularization. *Angiogenesis* 12: 297-301
- Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouché A, et al. 2002. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest* 109: 327-36
- Stence N, Waite M, Dailey ME. 2001. Dynamics of microglial activation: a confocal timelapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33: 256-66
- Stephan AH, Barres BA, Stevens B. 2012. The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu Rev Neurosci* 35: 369-89
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, et al. 2007. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131: 1164-78
- Stoecker K, Weigelt K, Ebert S, Karlstetter M, Walczak Y, Langmann T. 2009. Induction of STAP-1 promotes neurotoxic activation of microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 121-6

- Stoll G, Jander S. 1999. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 58: 233-47
- Stoll G, Jander S, Schroeter M. 1998. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 56: 149-71
- Stone J, Chan-Ling T, Pe'er J, Itin A, Gnessin H, Keshet E. 1996. Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the genesis of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 290-9
- Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, et al. 1995. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci* 15: 4738-47
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. 1999. Reactive microgliosis. Prog Neurobiol 57: 563-81
- Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, Tudoran R, Spruce LA, et al. 2003. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med* 198: 913-23
- Sun S, Wang H, Zhao G, An Y, Guo Y, et al. 2011. Complement inhibition alleviates paraquat-induced acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 834-42
- Sunderkötter C, Goebeler M, Schulze-Osthoff K, Bhardwaj R, Sorg C. 1991. Macrophagederived angiogenesis factors. *Pharmacol Ther* 51: 195-216
- Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. 1994. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 55: 410-22
- Sweigard JH, Yanai R, Gaissert P, Saint-Geniez M, Kataoka K, et al. 2014. The alternative complement pathway regulates pathological angiogenesis in the retina. *FASEB J* 28: 3171-82
- Talos. 2008. Schema eines Längsschnitts durch Augapfel und Sehnerv. ed. colorized by Jakov. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Eye_scheme_mulitlingual.svg -/media/File:Auge.png Abgerufen am: 21.03.2017 um 19.15 Uhr
- Tenner AJ, Fonseca MI. 2006. The double-edged flower: roles of complement protein C1q in neurodegenerative diseases. *Adv Exp Med Biol* 586: 153-76
- Thompson RA, Winterborn MH. 1981. Hypocomplementaemia due to a genetic deficiency of beta 1H globulin. *Clin Exp Immunol* 46: 110-9
- Thurman JM, Renner B, Kunchithapautham K, Ferreira VP, Pangburn MK, et al. 2009. Oxidative stress renders retinal pigment epithelial cells susceptible to complementmediated injury. *J Biol Chem* 284: 16939-47
- Tretiach M, Madigan MC, Wen L, Gillies MC. 2005. Effect of Müller cell co-culture on in vitro permeability of bovine retinal vascular endothelium in normoxic and hypoxic conditions. *Neurosci Lett* 378: 160-5

- Treuting PM, Wong R, Tu DC, Phan I. 2012. Special Senses: Eye In *Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas*, ed. PM Treuting, SM Dintzis, pp. 395–418.
 London/ Waltham/ San Diego: Academic Press Elsevier Inc. ISBN: 978-0-12-381361-9.
- van Beek J, Elward K, Gasque P. 2003. Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 992: 56-71
- van Wijngaarden P, Coster DJ, Williams KA. 2005. Inhibitors of ocular neovascularization: promises and potential problems. *JAMA* 293: 1509-13
- Veerhuis R, Janssen I, De Groot CJ, Van Muiswinkel FL, Hack CE, Eikelenboom P. 1999. Cytokines associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain stimulate human glial and neuronal cell cultures to secrete early complement proteins, but not C1-inhibitor. *Exp Neurol* 160: 289-99
- Veerhuis R, Nielsen HM, Tenner AJ. 2011. Complement in the brain. *Mol Immunol* 48: 1592-603
- Vessey KA, Wilkinson-Berka JL, Fletcher EL. 2011. Characterization of retinal function and glial cell response in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *J Comp Neurol* 519: 506-27
- Vilhardt F. 2005. Microglia: phagocyte and glia cell. Int J Biochem Cell Biol 37: 17-21
- Walport MJ. 2001a. Complement. First of two parts. N Engl J Med 344: 1058-66
- Walport MJ. 2001b. Complement. Second of two parts. N Engl J Med 344: 1140-4
- Wang CC, Wu CH, Shieh JY, Wen CY, Ling EA. 1996. Immunohistochemical study of amoeboid microglial cells in fetal rat brain. *J Anat* 189 (Pt 3): 567-74
- Wang J, Xu X, Elliott MH, Zhu M, Le YZ. 2010. Müller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage. *Diabetes* 59: 2297-305
- Wangsa-Wirawan ND, Linsenmeier RA. 2003. Retinal oxygen: fundamental and clinical aspects. *Arch Ophthalmol* 121: 547-57
- Ward PA. 2008. Sepsis, apoptosis and complement. Biochem Pharmacol 76: 1383-8
- Ward PA. 2009. Functions of C5a receptors. J Mol Med (Berl) 87: 375-8
- Watanabe T, Raff MC. 1988. Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* 332: 834-7
- Weinberger B, Watorek K, Strauss R, Witz G, Hiatt M, Hegyi T. 2002. Association of lipid peroxidation with hepatocellular injury in preterm infants. *Crit Care* 6: 521-5
- West H, Richardson WD, Fruttiger M. 2005. Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes. *Development* 132: 1855-62

- Wiesner E, Ribbeck R. 2000. *Lexikon der Veterinärmedizin*. 4. Auflage. Stuttgart: Enke im Hippokrates Verlag GmbH. ISBN: 3-7773-1459-5.
- Wirthmueller U, Dewald B, Thelen M, Schäfer MK, Stover C, et al. 1997. Properdin, a positive regulator of complement activation, is released from secondary granules of stimulated peripheral blood neutrophils. *J Immunol* 158: 4444-51
- Woodruff TM, Ager RR, Tenner AJ, Noakes PG, Taylor SM. 2010. The role of the complement system and the activation fragment C5a in the central nervous system. *Neuromolecular Med* 12: 179-92
- World Health Organisation (WHO). 2012. Born too soon: The Global Action Report on Preterm Birth, http://www.who.int/pmnch/media/news/2012/201204_borntoosoonreport.pdf Abgerufen am 28.03.2017 um 20.24 Uhr
- Wu F, Zou Q, Ding X, Shi D, Zhu X, et al. 2016. Complement component C3a plays a critical role in endothelial activation and leukocyte recruitment into the brain. J Neuroinflammation 13: 23
- Xu H, Chen M. 2016. Targeting the complement system for the management of retinal inflammatory and degenerative diseases. *Eur J Pharmacol* 787: 94-104
- Xu H, Chen M, Mayer EJ, Forrester JV, Dick AD. 2007. Turnover of resident retinal microglia in the normal adult mouse. *Glia* 55: 1189-98
- Xu HZ, Le YZ. 2011. Significance of outer blood-retina barrier breakdown in diabetes and ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 2160-4
- Yanai R, Thanos A, Connor KM. 2012. Complement Involvement in Neovascular Ocular Diseases In *Current Topics in Innate Immunity II*, ed. JD Lambris, G Hajishengallis, pp. 161–83. New York: Springer Science+Business Media. ISBN: 978-1-4614-0105-6.
- Yao J, Harvath L, Gilbert DL, Colton CA. 1990. Chemotaxis by a CNS macrophage, the microglia. *J Neurosci Res* 27: 36-42
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134
- Zhang C, Lam TT, Tso MO. 2005a. Heterogeneous populations of microglia/macrophages in the retina and their activation after retinal ischemia and reperfusion injury. *Exp Eye Res* 81: 700-9
- Zhang SX, Ma JX, Sima J, Chen Y, Hu MS, et al. 2005b. Genetic difference in susceptibility to the blood-retina barrier breakdown in diabetes and oxygen-induced retinopathy. *Am J Pathol* 166: 313-21
- Zhou W. 2012. The new face of anaphylatoxins in immune regulation. *Immunobiology* 217: 225-34

Zin A, Gole GA. 2013. Retinopathy of prematurity-incidence today. *Clin Perinatol* 40: 185-200 Zipfel PF, Skerka C. 2009. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 9: 729-40

Anhang



Ergänzende Abbildung aus einer Pilotuntersuchung

Ergänzende Abb. 33 Verteilung der aktivierten CD11b-positiven Zellen in mm² in retinalen Flachpräparaten von in Umgebungsluft gehaltenen Mauswelpen.

Vergleich der drei Zonen der Netzhaut (*central, mid-peripheral* und *peripheral*) von in Umgebungsluft gehaltenen Mäusen (*normoxia*) zum Untersuchungszeitpunkt P14, P17 und P21 (v.l.n.r.) (N = 1 für P14, N = 2 für P17 und P21). MW ± SEM; *p < 0,05. *normoxia*, Normoxia (Umgebungsluft mit normalem Sauerstoffgehalt von ca. 21%); *Activated CD11b*+ *Cells*, aktivierte CD11b-positive Zellen; P, postnataler Tag; *central*, zentraler Netzhautbereich (= Sehnervenkopf-nah); *peripheral*, peripherer Netzhautbereich (= Ora serrata-nah); *mid-peripheral*, mittel-peripherer Netzhautbereich (Bereich zwischen zentralem und peripheren Netzhautbereich); N, Anzahl der ausgewertete Retinae pro Zeitpunkt; MW, Mittelwert; SEM (*Standard error of the mean*), Standardfehler des Mittelwertes.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung des Wirbeltier-Auges in der Medianebene modifiziert nach
Talos (Talos 2008)4
Abb. 2 Schematische Darstellung der Schichten und Zelltypen der Säugetier-Retina
modifiziert nach Hartmann (Hartmann 2013)7
Abb. 3 Histologische Darstellung der Schichten der Säugetier-Retina am Beispiel der Maus
im retinalen Paraffinschnitt (4 µm Schichtdicke) nach Hämatoxilin-Eosin-Färbung8
Abb. 4 Schematische Darstellung des Mausmodells der Sauerstoff-induzierten Retinopathie
(OIR) modifiziert nach Connor et al. (oberer Teil) und Sweigard et al. (unterer Teil der
Abbildung) (Connor et al 2009, Sweigard et al 2014)17
Abb. 5 Beispiel für die Entwicklung der zentralen avaskulären Zone von P14 bis P21 und
des Ausmaßes der Gesamt-Tuftfläche an P17 im retinalen Flachpräparat der Maus der
Kontrollgruppe nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von
P7 bis P12)
Abb. 6 Histomorphologische Darstellung der Netzhaut einer Maus der Kontrollgruppe am
postnatalen Tag (P)17 nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75%
Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) im retinalen Paraffinschnitt (4 μ m Schichtdicke)
nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung19
Abb. 7 Schematische Darstellung der Komplement-Aktivierung und Immunregulierung nach
Xu et al. (Xu & Chen 2016)24
Abb. 8 Schematische Darstellung der Komplement-vermittelten Ausreifung der synaptischen
Verschaltungen (Synapse elimination) während der Entwicklungsphase des zentralen
Nervensystems modifiziert nach Ricklin et al. (Ricklin et al 2010)
Abb. 9 Beispiel für die morphologischen Veränderungen der retinalen CD11b-positiven
Mikroglia-Zellen im Rahmen des Aktivierungsprozesses ausgelöst durch ein
Aktivierungssignal
Abb. 10 Projektskizze
Abb. 11 Die zur Umsetzung des Mausmodells der Sauerstoff-induzierten Retinopathie
genutzte Sauerstoffbox Simatic C7-613 V 2.01 (Siemens, Berlin und München)
Abb. 12 Messwertanzeige der Sauerstoffbox Simatic C7-613 V 2.01 (Siemens, Berlin und
München) zu Beginn der Versuchsdurchführung des Mausmodells der Sauerstoff-
induzierten Retinopathie
Abb. 13 Schema zur Quantifizierung der CD11b-positiven Zellen im retinalen Flachpräparat
der Maus

Abb. 14 Anteil der avaskulären Fläche an der Gesamtfläche der Netzhaut der Maus in
Prozent nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis
P12)
Abb. 15 Anteil der Gesamt-Tuftfläche an der Gesamtfläche der Netzhaut der Maus in
Prozent nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis
P12)
Abb. 16 Verteilung der Gesamtzahl CD11b-positiver Zellen pro mm ² in retinalen
Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75%
Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) in den einzelnen Injektionsgruppen
Abb. 17 Verteilung der Gesamtzahl CD11b-positiver Zellen pro mm^2 in der avaskulären Zone
von retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75%
Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12)72
Abb. 18 Verteilung der Gesamtzahl CD11b-positiver Zellen pro mm ² in der Tuft-Zone von
retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75%
Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12)73
Abb. 19 Verteilung der Gesamtzahl CD11b-positiver Zellen pro mm ² in retinalen
Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75%
Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) in den einzelnen Injektionsgruppen unterteilt nach
Schichtzugehörigkeit77
Abb. 20 Verteilung der aktivierten CD11b-positiven Zellen pro mm ² in retinalen
Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75%
Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) in den einzelnen Injektionsgruppen
Abb. 21 Zeitlicher Verlauf der Verteilung der aktivierten CD11b-positiven Zellen pro mm ² in
retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75%
Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) in den einzelnen Injektionsgruppen
Abb. 22 Beispiel für die räumliche Ansammlung aktivierter CD11b-positiver Zellen (weißes
Oval) in der avaskulären Zone des retinalen Flachpräparats einer mit C5a-Injektionen
behandelten Maus zum Zeitpunkt P17 nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75%
Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12)81
Abb. 23 Beispiel für die räumliche Ansammlung aktivierter CD11b-positiver Zellen (weißer
Kasten) in der vaskulären Zone des retinalen Flachpräparats einer mit PBS-Injektionen
behandelten Maus zum Zeitpunkt P21 nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75%
Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12)82
Abb. 24 Verteilung der aktivierten CD11b-positiven Zellen pro mm ² in der avaskulären Zone
von retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75%

 Abb. 25 Verteilung der aktivierten CD11b-positiven Zellen pro mm² in der Tuft-Zone von retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12).
 Abb. 26 Verteilung des relativen Anteils aktivierter an der Gesamtmenge CD11b-positiver Zellen in Prozent in retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) in den einzelnen
Injektionsgruppen
Abb. 27 Vergleich des relativen Anteils aktivierter an der Gesamtmenge CD11b-positiver
Zellen in Prozent in der avaskulären Zone von retinalen Flachpräparaten der Maus nach
Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12)
Abb. 28 Vergleich des relativen Anteils aktivierter an der Gesamtmenge CD11b-positiver
Zellen in Prozent in der Tuft-Zone von retinalen Flachpräparaten der Maus nach
Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12)
Abb. 29 Vergleich der Größe der ausgemessenen Auszählungsareale der Tuft-Zone zur
Quantifizierung der aktivierten CD11b-positiven Zellen in μm^2 in retinalen
Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75%
Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12)90
Abb. 30 Zeitlicher Verlauf der Größe der ausgemessenen Auszählungsareale der Tuft-Zone
zur Quantifizierung der aktivierten CD11b-positiven Zellen in μm^2 in retinalen
Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75%
Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) innerhalb den einzelnen Injektionsgruppen91
Abb. 31 Vergleich der Aktivierung von GFAP- und Vimentin-exprimierenden Glia-Zellen
(Astrozyten und Müller-Zellen) im retinalen Paraffinschnitt (4 µm Schichtdicke) der Maus
nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12)
zwischen der C5a- und PBS-Gruppe zum Untersuchungszeitpunkt P14 und P1792
Abb. 32 Vergleich der relativ quantifizierten mRNA-Expression verschiedener
Komplementproteine in der Retina der Maus zwischen den einzelnen
Versuchstiergruppen (Sauerstoff-induzierter Retinopathie mit und ohne intraperitoneale
Injektion) und der unbehandelten Gruppe bzw. den Versuchstiergruppen untereinander
zum Untersuchungszeitpunkt P1794
Ergänzende Abb. 33 Verteilung der aktivierten CD11b-positiven Zellen in mm ² in retinalen

Flachpräparaten von in Umgebungsluft gehaltenen Mauswelpen......

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Studiendesign 55
Tab. 2 Reaktionsansatz für die Elimination genomischer Desoxyribonukleinsäure (gDNA)
modifiziert nach Qiagen Protokoll62
Tab. 3 Reaktionsansatz für die reverse Transkription modifiziert nach Qiagen Protokoll63
Tab. 4 Reaktionsansatz für die Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
modifiziert nach Qiagen Protokoll64
$\textbf{Tab. 5} \ \ddot{\textbf{U}} bersicht: Vergleich \ der \ Gesamtzahl \ der \ CD11b-positiven \ Zellen \ pro \ mm^2 \ in \ retinalen$
Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoff
von P7 bis P12) zwischen den verschiedenen Vaskularisierungszonen (avaskuläre, Tuft-
und vaskuläre Zone) innerhalb der einzelnen Injektionsgruppen C5a (oberer Abschnitt
der Tabelle), PBS (mittlerer Abschnitt der Tabelle) bzw. NOX (unterer Abschnitt der
Tabelle) zum Untersuchungszeitpunkt P14, P17 und P2170
Tab. 6 Übersicht: Vergleich der Gesamtzahl der CD11b-positiven Zellen der inneren Schicht
pro mm ² in retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie
(75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) zwischen den verschiedenen
Vaskularisierungszonen (avaskuläre, Tuft- und vaskuläre Zone) innerhalb der einzelnen
Injektionsgruppen C5a (oberer Abschnitt der Tabelle), PBS (mittlerer Abschnitt der
Tabelle) bzw. NOX (unterer Abschnitt der Tabelle) zum Untersuchungszeitpunkt P14,
P17 und P2175
Tab. 7 Übersicht: Vergleich der Gesamtzahl der CD11b-positiven Zellen der äußeren Schicht
pro mm ² in retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie
(75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) zwischen den verschiedenen
Vaskularisierungszonen (avaskuläre, Tuft- und vaskuläre Zone) innerhalb der einzelnen
Injektionsgruppen C5a (oberer Abschnitt der Tabelle), PBS (mittlerer Abschnitt der
Tabelle) bzw. NOX (unterer Abschnitt der Tabelle) zum Untersuchungszeitpunkt P14,
P17 und P2176
Tab. 8 Übersicht: Vergleich der aktivierten CD11b-positiven Zellen pro mm ² in retinalen
Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75%
Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) zwischen den verschiedenen
Vaskularisierungszonen (avaskuläre, Tuft- und vaskuläre Zone) innerhalb der einzelnen
Injektionsgruppen C5a (oberer Abschnitt der Tabelle), PBS (mittlerer Abschnitt der
Tabelle) bzw. NOX (unterer Abschnitt der Tabelle) zum Untersuchungszeitpunkt P14,
P17 und P2179

- Tab. 9 Übersicht: Vergleich des relativen Anteils der aktivierten CD11b-positiven Zellen an der Gesamtmenge CD11b-positiver Zellen in Prozent in retinalen Flachpräparaten der Maus nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (75% Luftsauerstoffgehalt von P7 bis P12) zwischen den verschiedenen Vaskularisierungszonen (avaskuläre, Tuft- und vaskuläre Zone) innerhalb der einzelnen Injektionsgruppen C5a (oberer Abschnitt der Tabelle), PBS (mittlerer Abschnitt der Tabelle) bzw. NOX (unterer Abschnitt der Tabelle) zum Untersuchungszeitpunkt P14, P17 und P21.
- - Unterschiede im Vergleich mit der PBS-Gruppe......98

Publikationsverzeichnis

Publikationen

[Brockmann C*, **Dege S***, Crespo-Garcia S, Kociok N, Brockmann T, Strauß O, Joussen AM. Spatial distribution of CD115⁺ and CD11b⁺ cells and their temporal activation during oxygen-induced retinopathy in mice. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, eingereicht: 28.06.2017]

In Arbeit:

Brockmann C*, **Dege S***, Kociok N, Crespo-Garcia S, Reichhart N, Brockmann T, Strauß O, Joussen AM. Complement factor C5a reduces retinal vaso-obliteration, neovascularisation and number of mononuclear phagocytes in the mouse model of oxygen-induced retinopathy. Veröffentlichung angestrebt in: *Experimental Eye Research* *geteilte Erstautorenschaft

Präsentationen

Brockmann C, **Dege S**, Kociok N, Brockmann T, Strauß O, Joussen AM. Influence of systemic C5a on CD11b positive cells and their activation during oxygen-induced retinopathy. Jahrestagung der *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) 2015, Denver/ USA

Brockmann C., **Dege S**, Brockmann T, Kociok N, Strauß O, Joussen AM. Komplementsystem und Frühgeborenenretinopathie. Wintertagung der *Berlin-Brandenburgischen Augenärztlichen Gesellschaft* (BBAG) 2015, Berlin

Hausinterne Präsentationen

Brockmann C., **Dege S**, Kociok N, Brockmann T, Strauß O, Joussen AM. C5a und Neovaskularisation im Tiermodell – CNV versus OIR. Forschungstag der *Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Charité – Universitätsmedizin Berlin* 2016, Berlin

Brockmann C., **Dege S**, Kociok N, Strauß O, Joussen AM. Distribution of CD11b⁺ cells and their activation during oxygen-induced retinopathy. *Forschungstag der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Charité – Universitätsmedizin Berlin* 2014, Berlin

Danksagung

An dieser Stelle möchte mich bei allen bedanken, die an der erfolgreichen Umsetzung dieses für mich sehr großen Projekts beteiligt gewesen sind.

Zunächst gilt mein Dank Frau **Prof. Dr. med. Antonia Joussen**, der Direktorin der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Charité – Universitätsmedizin Berlin, für die Möglichkeit zur Promotion innerhalb ihrer Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas, die gute Betreuung über den gesamten Zeitraum und die Nutzung der Laboreinrichtung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau **Prof. Dr. med. vet. Corinna Eule**, Leiterin der Abteilung für Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU Berlin, für die konstruktive Betreuung und Zusammenarbeit und die vielen hilfreichen Korrekturhinweise zur Dissertation bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß** für seine permanente Ansprechbarkeit bei Fragen und Problemen bezüglich der vorliegenden Arbeit, die hilfreichen Ergebnisdiskussionen und vor allem für die Unterstützung zur erfolgreichen Antragstellung des *Elsa-Neumann Stipendiums* des Landes Berlin.

Ein besonders großer Dank gilt meiner Betreuerin **Dr. med. Claudia Brockmann** für die immerwährende Unterstützung in der theoretischen und praktischen Umsetzung der Arbeit und bei der Verfassung der zahlreichen Anträge, Berichte und natürlich der Dissertationsschrift selbst.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors der experimentellen Ophthalmologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Mein Dank gilt besonders **Dr. rer. medic. Sergio Crespo-Garcia** für die grenzenlose Unterstützung in allen Fragen zu dieser Arbeit und die tiefe Freundschaft, die sich über die Jahre entwickelt hat. Ein herzlicher Dank ebenfalls an **Dr. med. Nadine Reichhart** für das immerwährende offene Ohr und die immerwährende helfende Hand während der Umsetzung der Experimente und dem Schreiben der Dissertation. Danke ebenfalls an **Dr. rer. nat. Norbert Kociok** für die große Hilfestellung bei den qPCR-Untersuchungen und an **Dr. med. Tobias Brockmann**, der in vielerlei Hinsicht wertvolle Unterstützung geleistet hat.

Aus tiefstem Herzen möchte ich mich bei meiner lieben Familie bedanken: **Meinen Eltern** für die Ermöglichung des Studiums und dieser Arbeit gleichermaßen; nur durch ihre

Unterstützung – in guten und in schwierigen Zeiten – war es mir möglich dieses Projekt erfolgreich abzuschließen. **Meiner Schwester** dafür, dass sie ausnahmslos immer an mich geglaubt hat und immer für mich da ist.

Nicht zuletzt danke ich allen meinen einzigartigen Freunden, insbesondere **Ina**, **Sophia**, **Natascha**, **Anna-Lena** und **Klaus**, die für den nötigen Ausgleich gesorgt haben, mich immer und immer wieder motiviert haben, an mich geglaubt haben und ohne die ich die kräftezehrenden Zeiten insbesondere zum Ende der Arbeit niemals durchgehalten hätte. Ein besonderer Dank geht zudem an **André** für die wichtige und große Unterstützung bei der Formatierung der Arbeit. Ohne euch alle hätte ich es nicht geschafft!

Mein liebevoller Dank gilt **Ivy**, die nicht nur in den unzähligen Stunden des Tippens immer an meiner Seite war. Sie hat zu allen Zeiten für die nötige mentale Ruhe in mir gesorgt.

Abschließend möchte ich die **Sonnenfeld-Stiftung**, die **Ernst und Berta Grimmke-Stiftung** und das **Land Berlin** nicht unerwähnt lassen und mich bei allen dreien für das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung recht herzlich bedanken. Vielen Dank!

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Folgende Arbeitsschritte wurden nicht eigenständig von mir durchgeführt:

Herstellung der Paraffinschnitte (vgl Abschnitte 3.2.6.1 und 3.2.7.2.1)

Die für die histologischen (vgl. Abschnitt **3.2.6**) und immunhistochemischen Untersuchungen (vgl. Abschnitt **3.2.7.2**) benötigten enukleierten Augen wurden in einem separaten Labor der Charité (Charité Campus Benjamin Franklin, CBF, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin) von einer medizinisch-technischen Assistentin in Paraffin eingebettet, komplett zu Serienschnitten verarbeitet und dann zur Färbung durch meine Person zurückgeschickt.

Quantifizierung der avaskulären Fläche mittels ImageJ (vgl. Abschnitt 3.2.7.1.4)

Die Ausmessungen und Berechnungen zur *Quantifizierung der avaskulären Fläche* erfolgten verblindet durch eine mit der Methodik vertraute, erfahrene zweite Person der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Joussen.

Verblindung der retinalen Flachpräparate (vgl. Abschnitte 3.2.7.1.5 und 3.2.7.1.6)

Vor Beginn der Untersuchung zur *Quantifizierung der Gesamt-Tuftfläche* (vgl. Abschnitt **3.2.7.1.5**) und zur *Quantifizierung der Gesamt-CD11b-positiven Zellen und aktivierten CD11b-positiven Zellen* (vgl. Abschnitt **3.2.7.1.6**) wurden die einzelnen Übersichtsaufnahmen bzw. die immunhistologischen Präparate der retinalen Flachpräparate von einer zweiten Person der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Joussen verblindet.

Berlin, den 10.07.2017

Sabrina Dege
