

Aus der Klinik für Augenheilkunde  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung zur Neurodegeneration in Ratten mit Diabetes  
mellitus, Hypertonie und Mäusen mit chronisch zerebraler  
Hypoperfusion

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christina Herrspiegel

aus Bielefeld

Datum der Promotion: 07.12.2018

## VORWORT

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in Clinical Science(London) sowie in Diabetologia wie folgt veröffentlicht:

Reichhart N, Haase N, Crespo-Garcia S, Skosyrski S, Herrspiegel C, Kociok N, Fuchshofer R, Dillinger A, Poglitsch M, Müller DN, Jousen AM, Luft FC, Strauß O. Hypertensive retinopathy in a transgenic angiotensin-based model. Clin Sci (Lond) 2016;130(13):1075-88.

Reichhart N, Crespo-Garcia S, Haase N, Golic M, Skosyrski S, Rübsam A, Herrspiegel C, Kociok N, Alenina N, Bader M, Dechend R, Strauss O, Jousen AM. The TetO rat as a new translational model for type 2 diabetic retinopathy by inducible receptor knockdown. Diabetologia 2017; 60(1):202-211.

Ferner wurden Teilergebnisse dieser Arbeit bei PlosOne zur Veröffentlichung akzeptiert: Sergio Crespo-Garcia, Nadine Reichhart, Sergej Skosyrski, Marco Foddis, Jim Wu, Aleksandar Figura, Christina Herrspiegel, Martina Füchte-meier, Celeste Sassi, Ulrich Dirnagl, Antonia M Jousen, Olaf Strauß. "Individual and temporal variability of the retina after chronic bilateral common carotid artery occlusion". PlosOne (2018).

# INHALT

<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	6
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	6
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	7
<b>Zusammenfassung Deutsch/English</b> .....	9
<b>1. Einleitung und Fragestellung</b> .....	11
1.1. Diabetes und Retina .....	12
1.2. Hypertonie und Retina .....	15
1.3. Arteriosklerose und Retina .....	18
1.3.1. Retinale Venenverschlüsse: Zentralvenenverschluss und Venenastverschluss .....	18
1.3.2. Retinale Arterienverschlüsse: Zentralarterienverschluss und Arterienastverschluss .....	19
1.3.3. Anteriore ischämische Optikusneuropathie (AION) .....	20
1.4. Fragestellung .....	21
<b>2. Methodik</b> .....	22
2.1. Tiermodelle .....	22
2.1.1. Rattenmodell für diabetische Retinopathie bei Typ 2 Diabetes mellitus: Tetrazyklin induzierte Insulinrezeptor-Knockdown-Ratte (TetO) .....	22
2.1.2. Rattenmodell für hypertensive Retinopathie: doppelt transgene Ratte (dTGR) .....	22
2.1.3. Mausmodell für chronisch zerebrale Hypoperfusion .....	22
2.2. Quantitative Analyse .....	23
2.2.1. Optimierung der RGC-Quantifizierung .....	23
2.2.2. Quantifizierung der RGC-Zahl .....	24
2.2.3. Statistische Analyse .....	24
2.3. Immunhistologie .....	24
2.3.1. Optimierung ausgewählter immunhistologischer Färbungen .....	24
2.3.1.1. Anti-GFAP-Vimentin .....	24
2.3.1.2. Anti-Caspase-3 und anti-Cleaved Caspase-3 .....	26
2.3.2. Optimiertes Standardprotokoll der immunhistologischen Färbungen .....	27
2.4. Material .....	30
<b>3. Ergebnisse</b> .....	33

3.1.	Rattenmodell für diabetische Retinopathie bei Typ 2 Diabetes mellitus: Tetrazyklin induzierte Insulinrezeptor-Knockdown-Ratte .....	33
3.1.1.	RGC-Verlust in der Retina von TetO-Ratten .....	33
3.1.2.	Veränderung der Gliazellreaktivität in der Retina von TetO-Ratten .....	35
3.1.3.	Veränderungen des RAS und des Komplementsystems in der Retina von TetO-Ratten .....	35
3.1.4.	Zusammenfassung TetO-Modell .....	35
3.2.	Rattenmodell für hypertensive Retinopathie: doppelt transgene Ratte (dTGR) .....	37
3.2.1.	RGC-Verlust in der Retina von dTGR .....	37
3.2.2.	Veränderung der Gliazellreaktivität in der Retina von dTGR .....	38
3.2.3.	Erhöhte VEGF-A Expression in der Retina von dTGR .....	39
3.2.4.	Veränderung des RAS und des Komplementsystems in der Retina von dTGR .....	40
3.2.5.	Zusammenfassung dTGR-Modell .....	40
3.3.	Mausmodell für chronisch zerebrale Hypoperfusion .....	40
3.3.1.	Veränderungen der Retinamorphologie bei Mäusen mit zerebraler Hypoperfusion .....	40
3.3.2.	Synapsenverlust in der Retina von Mäusen mit chronisch zerebraler Hypoperfusion .....	41
3.3.3.	Veränderungen der Gliazellreaktivität in der Retina von Mäusen mit zerebraler Hypoperfusion .....	43
3.3.4.	Zusammenfassung Mausmodell der chronisch zerebralen Hypoperfusion .....	46
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>47</b>
4.1.	Methodik .....	47
4.1.1.	Quantifizierung der RGC-Zahl in Retinasagittalschnitten .....	47
4.1.2.	Immunhistologische Analyse von Retinasagittalschnitten .....	48
4.2.	Rattenmodell für diabetische Retinopathie bei Typ 2 Diabetes mellitus: Tetrazyklin induzierte Insulinrezeptor-Knockdown-Ratte .....	49
4.2.1.	Morphologische Veränderungen in der Retina von TetO-Ratten .....	49
4.2.2.	Veränderungen der Gliazellreaktivität in der Retina von TetO-Ratten .....	49
4.2.3.	Das RAS in der Retina von TetO-Ratten .....	50
4.2.4.	Das Komplementsystem in der Retina von TetO-Ratten .....	51

4.2.5.	Pathomechanismus der diabetischen Retinopathie im TetO-Modell.....	53
4.3.	Rattenmodell für hypertensive Retinopathie: doppelt transgene Ratte (dTGR) .....	54
4.3.1.	Morphologische Veränderungen in der Retina von dTGR .....	54
4.3.2.	Veränderungen der Gliazellreaktivität in der Retina von dTGR .....	54
4.3.3.	Das RAS in der Retina von dTGR .....	55
4.3.4.	Das Komplementsystem in der Retina von dTGR .....	55
4.3.5.	Vermehrte VEGF-A Expression in der Retina von dTGR .....	56
4.3.6.	Pathomechanismus der hypertensiven Retinopathie im dTGR-Modell ...	56
4.4.	Mausmodell für chronisch zerebrale Hypoperfusion .....	57
4.4.1.	Morphologische Veränderungen in der Retina von Mäusen mit chronisch zerebraler Hypoperfusion .....	57
4.4.2.	Synapsenverlust in der Retina von Mäusen mit zerebraler Hypoperfusion .....	58
4.4.3.	Veränderungen der Gliazellreaktivität in der Retina von Mäusen mit zerebraler Hypoperfusion .....	59
4.4.4.	Pathomechanismus im Modell von Mäusen mit zerebraler Hypoperfusion .....	60
4.5.	Fazit .....	61
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>63</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>71</b>
	<b>Anteilerklärung</b> .....	<b>72</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>74</b>
	<b>Vollständige Publikationsliste</b> .....	<b>75</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>76</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Keith-Wagener-Barker-Klassifikation für hypertensive Retinopathie (Grad I – IV), basierend auf dem Schweregrad der funduskopischen Veränderungen.....	16
<b>Tabelle 2:</b> Klassifikation der hypertensiven Retinopathie nach Wong und Mitchell.....	17
<b>Tabelle 3:</b> Übersicht über die Färbung mit anti-GFAP-Vimentin für verschiedene Fixative.....	25
<b>Tabelle 4:</b> Übersicht über die Färbungen mit anti-Caspase 3 und anti-Cleaved-Caspase 3 für verschiedene Fixative.....	26
<b>Tabelle 5:</b> Primärantikörper für TetO-Ratten.....	28
<b>Tabelle 6:</b> Primärantikörper für dTGR.....	29
<b>Tabelle 7:</b> Primärantikörper für Mäuse mit chronisch zerebraler Hypoperfusion .....	30
<b>Tabelle 8:</b> Instrumente und Zubehör.....	31
<b>Tabelle 9:</b> Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	31
<b>Tabelle 10:</b> Antikörper.....	32

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Degeneration von RGC in der Retina von TetO-Ratten.....	34
<b>Abb. 2:</b> RGC mit anti-Brn3a-Färbung .....	34
<b>Abb. 3:</b> Veränderung der Gliazellreaktivität in der Retina von TetO-Ratten....	36
<b>Abb. 4:</b> Degeneration von RGC in der Retina von dTGR.....	37
<b>Abb. 5:</b> Veränderung der Gliazellreaktivität in der Retina von dTGR.....	38
<b>Abb. 6:</b> Färbung mit anti-VEGF-A.....	39
<b>Abb. 7:</b> Degeneration von Ganglienzellen in der Retina von Mäusen mit chronisch zerebraler Hypoperfusion .....	41
<b>Abb. 8:</b> Synapsenverlust in der Retina von Mäusen mit chronisch zerebraler Hypoperfusion.....	42
<b>Abb. 9:</b> Kein Synapsenverlust durch apoptosebedingten Zelltod .....	44
<b>Abb. 10:</b> Veränderungen der Gliazellreaktivität in der Retina von Mäusen mit chronisch zerebraler Hypoperfusion.....	45

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AION</b>	anteriore ischämische Optikusneuropathie
<b>aktivAtr1</b>	aktivierter Angiotensin II Rezeptortyp 1
<b>Ang II</b>	Angiotensin II
<b>AQP</b>	Aquaporin
<b>AR-Blocker</b>	Angiotensinrezeptorblocker
<b>ATP</b>	Adenosin 5'-Triphosphat
<b>Atr1</b>	Angiotensin II Rezeptortyp 1
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>Ccl2</b>	C-C motif chemokine ligand 2
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DME</b>	diabetisches Makulaödem
<b>DR</b>	diabetische Retinopathie
<b>dTGR</b>	doppelt transgene Ratte
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>ERG</b>	Elektroretinographie
<b>ETDRS</b>	Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Scale
<b>Gal-3</b>	Galectin-3
<b>GCL</b>	Ganglienzellschicht
<b>GFAP</b>	Glial Fibrillary Acidic Protein
<b>GFP</b>	green fluorescent protein
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>HR</b>	hypertensive Retinopathie
<b>INL</b>	innere nukleäre Schicht
<b>Icam1</b>	intercellular adhesion molecule 1
<b>IOP</b>	intraokulärer Druck
<b>IPL</b>	innere plexiforme Schicht
<b>IRMA</b>	intraretinale mikrovaskuläre Anomalien
<b>Itgb2</b>	integrin subunit beta 2
<b>IVOM</b>	intravitreale operative Medikamentengabe
<b>IVT</b>	intravitreale Injektion
<b>Kir</b>	einwärtsgerichteter Kaliumionenkanal

<b>LO</b>	Losartan
<b>mRNA</b>	messenger ribonucleic acid
<b>NAION</b>	nicht-arteriitische anteriore ischämische Optikusneuropathie
<b>NO</b>	Nervus opticus
<b>NPDR</b>	nicht-proliferative diabetische Retinopathie
<b>OCT</b>	optische Kohärenztomografie
<b>ONL</b>	äußere nukleäre Schicht
<b>OPL</b>	äußere plexiforme Schicht
<b>OS</b>	Fotorezeptoraußensegmente
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PDR</b>	proliferative diabetische Retinopathie
<b>PKC<math>\alpha</math></b>	Protein Kinase C alpha
<b>qPCR</b>	quantitative polymerase chain reaction
<b>RAS</b>	Renin-Angiotensin-System
<b>RGC</b>	retinale Ganglienzelle(n)
<b>RPE</b>	retinales Pigmentepithel
<b>SHR</b>	spontan-hypertensive Ratte
<b>shRNA</b>	small hairpin ribonucleic acid
<b>siRNA</b>	small interfering ribonucleic acid
<b>STZ</b>	Streptozotocin
<b>TBS</b>	Tris-buffered saline
<b>TetO</b>	Tetrazyklin induzierter Insulinrezeptor-Knockdown
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor-alpha
<b>Vcam1</b>	vascular cell adhesion molecule 1
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor
<b>VGLUT1</b>	vesikulärer Glutamatttransporter 1
<b>WT</b>	Wildtyp

## Zusammenfassung – Abstract

### Deutsch

**Hintergrund:** Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von morphologischen Veränderungen der Retina bei systemischen metabolischen Erkrankungen im Tiermodell zu Diabetes mellitus, Hypertonie sowie zu zerebraler Hypoperfusion. Darüber hinaus wurden die lokalen Pathomechanismen betrachtet, die diesen Veränderungen möglicherweise zugrunde liegen.

**Methodik:** Untersucht wurden Sprague-Dawley-Ratten mit Tetrazyklin induziertem Insulinrezeptor-Knockdown (TetO), doppelt transgene Sprague-Dawley-Ratten (dTGR) sowie C57/Black- und MacGreen-Mäuse mit beidseits in der Arteria carotis interna implantiertem Micro Coil. Die Quantifizierung der retinalen Ganglienzellen erfolgte manuell in HE gefärbten Paraffinschnitten in verblendeter Form. Der Ganglienzellverlust wurde pro 100 µm als arithmetisches Mittel erfasst. Die immunhistologischen Färbungen erfolgten am Retinasagittalparaffinschnitt mit den Antikörpern anti-aktivAtr1, anti-Atr1, anti-Brn3a, anti-C1q, anti-GFAP, anti-GFAP-Vimentin bzw. anti-Glutaminsynthetase, anti-Properrin, anti-Renin und anti-VEGF-A für das TetO und dTGR-Modell sowie mit anti-Caspase-3, anti-Cleaved-Caspase-3, anti-GFAP, anti-GFAP-Vimentin, anti-PKCα und anti-VGLUT1 für das Mausmodell.

**Ergebnisse:** Sowohl im TetO- als auch im dTGR-Modell kommt es zu einem deutlichen RGC-Verlust. In beiden Modellen zeigt sich eine Astrozytose sowie eine vermehrte Reaktivität von Müllerzellen, die im TetO-Modell durch die Applikation von Losartan reduziert wird. Im dTGR-Modell konnte immunhistologisch VEGF-A detektiert werden, das primär in der GCL, IPL und INL lokalisiert war. Im Mausmodell zur chronisch zerebralen Hypoperfusion sind ein Verlust der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und ein isolierter Synapsenverlust in der vormals vorhandenen OPL erkennbar. Diese sind sehr wahrscheinlich auf einen apoptosebedingten Zelltod zurückzuführen. Weiterhin zeigt sich auch im Mausmodell eine Astrozytose und eine Aktivierung von Müllerzellen.

**Schlussfolgerung:** Systemische Erkrankungen führen lokal in allen drei Tiermodellen zu neurodegenerativen Veränderungen in der Netzhaut. Im TetO- und im dTGR-Modell scheint dabei das RAS ein pathogenetischer Faktor zu sein.

## English

**Background:** The purpose of this work was to examine the morphological changes in the retina during systemic diseases such as diabetes, hypertension and cerebral hypoperfusion in animal models. Furthermore, the local pathological alterations, presumably responsible for the morphological changes, were analysed.

**Methods:** For the analysis Sprague-Dawley rats with a tetracycline induced insulin receptor knockdown (TetO), double transgenic Sprague-Dawley rats (dTGR) and C57/Black- and MacGreen mice with an implanted microcoil on both sides of their carotid arteries were used. The quantification of retinal ganglion cells was carried out manually and in a masked manner in H&E stained paraffin sections. Retinal ganglion cell counts were normalised to 100  $\mu\text{m}$ . Immunohistochemistry with a panel of anti-aktivAtr1, anti-Atr1, anti-Brn3a, anti-C1q, anti-GFAP, anti-GFAP-vimentin resp. anti-glutamine synthetase, anti-properdin, anti-renin and anti-VEGF-A served to examine the TetO- and dTGR model. For immunohistochemical staining in the mouse model anti-Caspase-3, anti-Cleaved-Caspase-3, anti-GFAP, anti-GFAP-vimentin, anti-PKC $\alpha$  and anti-VGLUT1 were utilised.

**Results:** Both in TetO rats and in dTGR a distinct RGC-degeneration was notable. Both models show an astrocytosis and an increased Müller cell reactivity which is reduced by application of Losartan treatment in TetO rats. In dTGR a strong VEGF-A immunolabelling was visible and mainly concentrated in GCL, IPL and INL. The mouse model of bilateral cerebral hypoperfusion displays a loss of the OPL and an isolated loss of synapses in the former OPL area which is very likely to be caused by apoptotic cell death. Moreover, the mouse model also reveals an astrocytosis and an activation of Müller cells.

**Conclusion:** In all three animal models systemic diseases locally lead to neurodegenerative alterations in the retina. In TetO rats and dTGR the renin-angiotensin-system seems to have a pathogenetic impact.

## 1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Diabetes mellitus, Hypertonie und Arteriosklerose sind systemische Erkrankungen, die dem Symptomkomplex des metabolischen Syndroms zugeordnet werden. Sie sind unter anderem Folge veränderter Ernährungsgewohnheiten und eine Begleiterscheinung einer zunehmenden Urbanisierung der Gesellschaft [1][2]. Waren diese „modernen Zivilisationskrankheiten“ in früheren Hochkulturen nahezu unbekannt, so stellen sie heute ein globales Problem dar [1]. Schätzungen der WHO zufolge waren im Jahr 2014 weltweit circa 422 Millionen Menschen an Diabetes erkrankt [3]. Demgegenüber waren es im Jahr 1980 lediglich 108 Millionen [3]. Weitere Erhebungen der WHO zeigen, dass neben Diabetes auch die Hypertonie eine erhebliche Krankheitslast in der Gesellschaft darstellt. So war sie 2008 weltweit für schätzungsweise 45 % der Todesfälle in Folge von Herzerkrankungen und für 51 % der Todesfälle in Folge eines Schlaganfalls verantwortlich [4]. Die Erkrankungen selbst und die sich daraus entwickelnden Folgeleiden stellen neben den medizinischen Problemen auch eine hohe gesundheitsökonomische Belastung dar [3][4]. Der finanzielle kumulative Verlust durch nicht übertragbare Erkrankungen über den Zeitraum von 2011 bis 2025 in Ländern mit geringem und mittlerem Einkommen wird dabei auf 7,28 Billionen US-Dollar geschätzt [4].

Ferner wirken sich alle eingangs aufgeführten Systemerkrankungen in ihren Endorganschäden, insbesondere auf das Herz, die Nieren und das zentrale Nervensystem aus [5][6]. Am Auge spiegeln dabei die gefäßpathologischen Anomalien der Netzhaut spezifische Endorganschäden dieser Systemerkrankungen wider. Der genaue Zusammenhang und die in diesem Kontext spezifischen retinalen Erkrankungen werden in den nachfolgenden Abschnitten näher betrachtet.

## 1.1. Diabetes und Retina

Diabetes mellitus (DM) führt im Krankheitsverlauf zu einer Schädigung der kleinen Blutgefäße, den sogenannten Mikroangiopathien. [7][8] An der Netzhaut führen diese pathologischen Prozesse in ihrer Summe zum Krankheitsbild der diabetischen Retinopathie (DR). Dabei betrifft sie eine von drei Personen mit DM [7]. Laut dem „International Council of Ophthalmology“ [7] ist die DR zudem die führende Ursache für einen Visusverlust in der erwerbstätigen Bevölkerung und schränkt die Lebensqualität der Betroffenen folglich in beträchtlichem Maße ein [7].

Bei der DR unterscheidet man zwei Formen, und zwar die nicht proliferative DR (NPDR) und die proliferative DR (PDR).

Im Wesentlichen kommt es bei der NPDR zu einer Schädigung der Endothelien der inneren Retinagefäße [9]. Eine lokale zelluläre Entzündung und ein Verlust der Barrierefunktion der Blut-Retina-Schranke sind die Folge [9]. Das wiederum führt schließlich zu einer gestörten Perfusionsregulation, atrophen Gefäßen oder zur Ausbildung von Aneurysmen der Netzhautgefäße [8][10]. Um den Schweregrad der NPDR zu bestimmen, macht man sich die funduskopischen Veränderungen zunutze. Treten lediglich einzelne Mikroaneurysmen am Augenhintergrund auf, spricht man von einer Background-Retinopathie, was dem Schweregrad einer leichten NPDR zuzuordnen ist [8][10]. Ist das Bild noch um intraretinale Blutungen und perlschnurartige Venen in einem Quadranten erweitert, so liegt eine mäßige NPDR vor [8][10]. Zeigen sich am Augenhintergrund mehr als 20 Mikroaneurysmen plus intraretinale Blutungen in allen vier Quadranten der Netzhaut oder perlschnurartige Venen in mindestens 2 Quadranten oder intraretinale mikrovaskuläre Anomalien (IRMA) in mindestens einem Quadranten, so wird dieser Befund als schwere NPDR definiert [8][10].

Die zweite Form der DR, die PDR, ist im Wesentlichen durch eine Neubildung von irregulären und stark fragilen Gefäßen charakterisiert [8]. Sie können den Glaskörper penetrieren und dadurch zu Glaskörper- und Netzhautblutungen führen [10]. Außerdem können durch die Proliferation von Gefäßbindegewebe und eine nachfolgende Kontraktion traktive Netzhautablösungen evoziert werden [10].

Eine wesentliche Komplikation der DR ist die Ausbildung eines Makulaödems [10]. Es kann bei beiden Formen der DR auftreten und ist die primäre Ursache des Visusverlustes bei Patienten mit DM [9][10]. Es führt ohne eine rasche Behandlung unmittelbar zur Erblindung [10]. Der Auslöser ist eine starke Permeabilitätsstörung oder eine Kapillarokklusion von perimakulären Gefäßen mit der Folge eines Ödems in der Makula [9][10].

Ätiogenetisch stehen primär zwei Dinge im Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen: die Neurodegeneration sowie die Mikroangiopathie der inneren Retina [11][12]. Bei der Mikroangiopathie geht man davon aus, dass Arteriolen und Venolen atrophieren [10][14]. Konsekutiv kommt es zu einer pathologisch gesteigerten Kapillarpermeabilität, was wiederum eine Reihe biochemischer und metabolischer Veränderungen induziert [15]. Das umfasst beispielsweise eine erhöhte Expression von Faktoren wie des „Vascular endothelial growth factor A“ (VEGF-A) oder des Tumor-Nekrose-Faktors-alpha (TNF- $\alpha$ ) sowie die lokale Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) [13][14][15]. Bei der Neurodegeneration weiß man, dass sie durch eine Apoptose herbeigeführt wird [12]. Zudem wird sie von einem Verlust retinaler Ganglienzellen (RGC) und einer reaktiven Gliose der Astrozyten und Müllerzellen begleitet [12].

Bei der Therapie der DR gilt die Vermeidung und Reduzierung eines für den Patienten spürbaren Sehverlustes als hauptsächliches Behandlungsziel [10]. Von entscheidender Bedeutung für das Behandlungsergebnis ist dabei die rechtzeitige Diagnosestellung noch im Frühstadium, da die Aussicht auf eine erfolgreiche Therapie abnimmt, je größer der Netzhautschaden ist [10]. Die Basis der Therapie stellen hierbei eine normnahe Blutglukoseeinstellung, gemessen am HbA1c, eine Blutdrucknormalisierung sowie die ophthalmologische Therapie dar [10][16]. Letztere umfasst eine stadiengerechte Überwachung und Behandlung von diabetischer Retino- und Makulopathie [10]. Dabei stehen für die Behandlung zwei Optionen zur Verfügung. Zum einen gibt es die Möglichkeit einer Laserbehandlung und zum anderen die Option einer intravitrealen Medikamentengabe [10][16].

Die Laserbehandlung wird in den Leitlinien für Patienten mit einer fokalen Makulopathie und/oder mit einer PDR empfohlen [17], wodurch das Risiko einer schweren Sehverschlechterung, einer Progression der DR und einer Glaskörperblutung deutlich verringert werden kann [10]. Auch kann sie bei schweren Verlaufsformen der NPDR wie z.B. für bestimmte Risikopatienten wie Schwangere und Betroffene mit ausgedehnten

Kapillarverschlussgebieten in der Fluoreszenzangiografie erforderlich werden [10][17]. In Einzelfällen ist eine Laserbehandlung auch bei einem diffusen Makulaödem zu erwägen [17].

Die intravitreale operative Medikamentengabe (IVOM) hingegen, die primär mit VEGF-Inhibitoren durchgeführt werden sollte, wird für Patienten mit einem diabetischen Makulaödem mit fovealer Beteiligung angeraten, sofern ein vom Patienten erlebter Sehverlust vorliegt und eine Verbesserung der Sehfähigkeit noch möglich erscheint [10] [17]. Für die IVOM-Behandlung mit VEGF-Inhibitoren beim diabetischen Makulaödem sind derzeit Aflibercept (Eylea®) und Ranibizumab (Lucentis®) sowie Bevacizumab (Avastin®) im Off-Label-Use zugelassen [10]. In der Regel erhalten die Patienten initial drei Injektionen im monatlichen Abstand. In der Erhaltungsphase wird sie dann lediglich bei einer Verschlechterung wiederholt. Dabei dienen der bestkorrigierte Visus, der OCT- und Fundusbefund sowie ggf. das Ergebnis aus der Fluoreszenzangiografie als Maßstab [10]. Durchschnittlich sind im ersten Jahr 5–8 Injektionen erforderlich [18]. Eine längere Wirkdauer haben demgegenüber intravitreal verabreichte Steroide. Derzeit sind hierfür die Wirkstoffe Triamcinolonacetonid, Fluocinolonacetonid (Retisert®, Iluvien®) sowie Dexamethason (Ozurdex®) in Verwendung. Die Wirkdauer liegt zwischen 2–4 Monaten für Triamcinolonacetonid, zwischen 4–6 Monaten für Ozurdex® und bei 3 Jahren für Retisert® und Iluvien® [18]. Durch die längere Wirkdauer können die Anzahl der Injektionen und das damit assoziierte Endophthalmitisrisiko reduziert werden [18]. Der Nachteil der IVOM mit Kortikosteroiden sind häufige Nebenwirkungen wie die Erhöhung des intraokulären Drucks (IOP) und die Entwicklung bzw. die Verschlechterung einer Katarakt [10][18]. Daher kommen Kortikosteroidpräparate hauptsächlich bei einem persistierenden, therapierefraktären diabetischen Makulaödem (DME) und vor allem bei Patienten mit pseudophaken Augen zum Einsatz [18].

Trotz der Vielzahl der Behandlungsmöglichkeiten bei einer DR kann lediglich einer Gefäßneubildung entgegengewirkt und die Rückbildung eines Makulaödems begünstigt werden. Irreversibel geschädigte Netzhautzellen können dadurch jedoch weder wiederhergestellt noch ersetzt werden. Die Neurodegeneration schreitet sogar weiter fort [19]. Auch eine Insulintherapie des DM kann die Langzeitkomplikationen an der Retina nicht verhindern. Sie scheint im Gegenteil eher einen toxischen Effekt auf die Netzhaut zu haben [20]. So zeigten Sugimoto et al beispielsweise, dass der Wechsel von einer

oralen antidiabetischen Therapie auf Insulin bei Patienten mit einem insulinunabhängigen Typ 2 DM mit einem signifikant erhöhten Risiko einer Progression der DR und einer Visusverschlechterung assoziiert war [20]. Es gibt somit bisher keine kausal wirksame Therapie der DR.

## **1.2. Hypertonie und Retina**

Hypertonie ist der primäre Risikofaktor für eine erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität [4]. Sie induziert eine Reihe pathophysiologischer okulärer Veränderungen, die signifikant die Blutversorgung der Retina, Chorioidea und des Sehnervs beeinträchtigen. [21]

Die bisherigen Erkenntnisse zur Pathophysiologie der hypertensiven Retinopathie (HR) sind sehr begrenzt. Bislang sind die Hyperglykämie, die Dyslipidämie sowie das Rauchen als Risikofaktoren für die Entstehung einer HR definiert [22][23]. Außerdem weiß man, dass die Manifestation der HR sowohl durch eine akute als auch durch eine chronische systemische Hypertonie ausgelöst werden kann [22][23].

Kommt es zu einem akuten Anstieg des systemischen Blutdrucks, so reagieren die retinalen Gefäße mit einer Vasokonstriktion [22][23]. Dies zeigt sich klinisch als fokale oder generalisierte Verengung der retinalen Arteriolen [22][23]. Das Ausmaß der Verengung hängt jedoch von der Rigidität der Gefäße ab, sodass dieses Phänomen meist nur bei jüngeren Patienten zu sehen ist. [22][23]

Ist der systemische Blutdruck chronisch erhöht, verursacht das eine zunehmende Sklerosierung der Gefäße mit Endothelzellhyperplasie, Intimahyalinisierung und Mediahypertrophie [23]. Die betroffenen Arterien fallen dabei in der Funduskopie durch einen breiteren und helleren Lichtreflex auf und werden daher als Kupferdrahtarterien beziehungsweise Silberdrahtarterien bezeichnet [23]. Darüber hinaus bilden sich arteriovenöse Kreuzungsstellen aus [23]. Sie werden durch den Druck der verdickten Arterien über den Venen verursacht [23]. Dies erfolgt an Stellen, an denen sich beide eine gemeinsame Adventitia teilen [23]. Wenn nun die Hypertonie weiter unkontrolliert persistiert, führt das zu einer Disruption der Blut-Retina-Schranke, die Gefäßpermeabilität nimmt zu und es kommt zu einem Austritt von Plasmamaterial, das in den multiplen Retinazellschichten akkumuliert [24]. Das klinische Korrelat dazu stellen Netzhautblutungen in Form von Mikroaneurysmen und flammförmigen Blutungen sowie harte Exsudate, also Lipidablagerungen, dar. [24] Nachfolgend kommt es zu Ischämien in der

Netzhaut, die sich in der Ausbildung von Cotton-Wool-Herden widerspiegeln [24]. Sie sind als Infarktherde der unmyelinisierten Ganglienzellaxone in der Nervenfaserschicht zu verstehen [24]. Bei schweren Verlaufsformen und einer lang bestehenden oder malignen Hypertonie können sich die initial in der Peripherie entstandenen Schäden auf die zentrale Netzhaut ausweiten, was sich als Papillenschwellung zeigt. [24]

Zur Einteilung der Schweregrade der HR existiert eine Vielzahl von Klassifikationen, die sich alle an den retinalen Gefäßschäden orientieren. [25][26] Die wohl bekannteste ist die Einteilung nach Keith-Wagener-Barker (Tab. 1). Sie unterteilt die HR in vier Schweregrade. Grad 1 liegt demnach vor, wenn eine generalisierte Verengung der Netzhautgefäße erkennbar ist [25]. Fokale Verengungen und das Auftreten von arteriovenösen Kreuzungsstellen ist Grad 2 zuzuordnen [25]. Grad 3 ist erreicht, wenn zu der Klinik von Grad 2 harte Exsudate und Cotton-Wool-Herde hinzutreten [25]. Bei Grad 4 sind die funduskopischen Veränderungen von Grad 3 noch um eine Papillenschwellung erweitert [25][26].

Tabelle 1. Keith-Wagener-Barker-Klassifikation für hypertensive Retinopathie (Grad I-IV), basierend auf dem Schweregrad der funduskopischen Veränderungen. Modifiziert nach Grosso et al. [25]	
Schweregrad	Klassifikation
Grad I (milde Hypertonie)	Milde generalisierte retinale arterioläre Vasokonstriktion und Sklerosierung
Grad II (stärker ausgeprägte Retinopathie)	Ausgeprägte fokale Gefäßengstellung und arteriovenöse Kreuzungsstellen; moderate bis ausgeprägte Sklerose der retinalen Arteriolen; gesteigerter arterieller Lichtreflex
Grad III (milde angiospastische Retinopathie)	Retinale Blutungen, Exsudate und Cotton-Wool-Herde; Sklerose der retinalen Arteriolen
Grad IV	Schwerer Grad III und Papillenödem

Diese Einteilung wird allerdings im klinischen Alltag zunehmend durch eine von Mitchell-Wong modifizierte Klassifikation ersetzt (Tab. 2) [25]. Sie kombiniert die ersten zwei Schweregrade miteinander, da sie klinisch kaum voneinander abgrenzbar sind [26]. Ansonsten ist die Klassifikation identisch [26] und unterscheidet zwischen einer milden, moderaten und malignen HR [26]. Der starke Fokus auf die Gefäße bei der Einteilung der HR liegt darin begründet, dass der Gefäßschaden der Netzhaut für viele Jahre traditionell als prognostisches Maß für den Verlauf und die Schwere des Endorganschadens der inneren Organe galt [26]. Zum Beispiel konnte in der Blue Mountains Eye Studie, die über

einen Zeitraum von 12 Jahren durchgeführt wurde, gezeigt werden, dass Patienten mit einer hypertensiven Retinopathie ein ebenso hohes Mortalitätsrisiko durch kardiovaskuläre Erkrankungen aufwiesen wie Patienten mit Diabetes (Mortalitätsrate pro Person und Jahr 0,015 für Patienten mit Diabetes vs. 0,016 für Patienten mit HR) [26]. Ferner ist auch belegt, dass das Auftreten einer HR einen Risikofaktor eines kongestiven Herzversagens und einer Nierenschädigung darstellt [26].

Tabelle 2. Klassifikation der hypertensiven Retinopathie nach Wong und Mitchell. Modifiziert nach Grosso et al. [25]	
Schweregrad	Beschreibung
Keine Retinopathie milde Retinopathie (lediglich retinale arterioläre Zeichen)	Keine erkennbaren retinalen Veränderungen. Ein oder mehr der folgenden arteriolären Zeichen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• generalisierte arterioläre Gefäßengstellung</li> <li>• fokale arterioläre Gefäßengstellung</li> <li>• arteriovenöse Kreuzungszeichen</li> <li>• Silberdrahtarteriolen</li> </ul>
Moderate Retinopathie	Ein oder mehr der folgenden retinalen Zeichen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Blutung (punkt-, fleck- oder flammförmig)</li> <li>• Mikroaneurysmen</li> <li>• Cotton-Wool-Herde</li> <li>• Harte Exsudate</li> </ul>
Maligne Retinopathie	Moderate Retinopathie plus Schwellung Papillenschwellung

Die wesentlichen Behandlungsstrategien der HR beruhen derzeit lediglich auf der Einstellung des erhöhten systemischen Blutdrucks mit regelmäßigen Blutdruckkontrollen, einschließlich einer Lebensstiländerung mit Gewichtsreduktion, Salz- und fettarmer Ernährung, regelmäßiger Bewegung, Stressabbau und der Aufgabe des Rauchens [23]. Bisherige Studien zur intravitrealen Injektion von anti-VEGF Medikamenten zum Management der akuten hypertensiven Retinopathie zeigen zwar eine Reduktion der retinalen Blutungen und des Makulaödems, dennoch ist deren Nutzen bislang noch nicht ausreichend bestätigt und damit deren Verwendung für diese Indikation nicht gebräuchlich [23]. Außerdem führt interessanterweise auch bei der HR die Therapie der Gefäßpathologien nicht zwangsläufig zu einem Visusanstieg oder gar einem mildereren Krankheitsverlauf [24]. Ferner stellt ein systemisch erhöhter Blutdruck auch einen Risikofaktor für weitere Augenerkrankungen dar [26]. Dazu gehören retinale Gefäßverschlüsse und nicht arteriitische anteriore ischämische Optikusneuropathien [26].

Außerdem kann er eine Exazerbation der diabetischen Retinopathie bewirken und scheint auch einen Einfluss auf die Pathogenese der altersabhängigen Makuladegeneration zu haben [26]. Es fehlen also auch bei der HR bislang noch Therapien, die eine kausale Behandlung ermöglichen.

### **1.3. Arteriosklerose und Retina**

Arteriosklerose verursacht Gefäßverschlüsse auch in der Netzhaut. Dies kann sowohl die venösen als auch die arteriellen Gefäße betreffen. Ist primär ein zentrales Netzhautgefäß verschlossen, spricht man von einem Zentralvenen- bzw. Zentralarterienverschluss. Manifestiert sich die Arteriosklerose hingegen an einem Ast des Zentralgefäßes, so bezeichnet man dies als Venen- bzw. Arterienastverschluss. Über den Gefäßverschluss wird eine okuläre Ischämie verursacht und kann darüber auch zum Krankheitsbild der anterioren ischämischen Optikusneuropathie (AION) führen. [27]

#### **1.3.1. Retinale Venenverschlüsse: Zentralvenenverschluss und Venenastverschluss**

Retinale Venenverschlüsse sind nach der DR die zweithäufigste Erkrankung der Netzhaut und damit als wichtige Ursache für einen Sehverlust zu betrachten. [27][28]

Dabei staut sich durch eine arteriosklerotisch bedingte Abflussbehinderung das Blut in den venösen retinalen Gefäßen und führt so zu einer Minderversorgung der Netzhaut mit Sauerstoff [27][28]. Es kommt zur Ausbildung eines Makulaödems, vitrealen Blutungen, retinalen Neovaskularisationen bis hin zur Netzhautablösung [27][28]. Bemerkbar macht sich dies durch eine rasche und schmerzlose Abnahme der Sehkraft [27][28].

Bekannte Einflussfaktoren auf die Ausbildung eines retinalen Venenverschlusses sind – der HR ähnlich – Hypertonie, kardiovaskuläre Erkrankungen und DM. [27][28]

Therapeutisch werden zunächst die Einflussfaktoren behandelt [27][28]. Sind die Makula und die Netzhautperipherie durchblutet und ist die Sehkraft nicht eingeschränkt, erfolgen lediglich monatliche Nachuntersuchungen mittels Funduskopie, OCT und Fluoreszenzangiografie mit dem Ziel der Beurteilung eines potenziellen Makulaödems und weiterer Folgekomplikationen [27][28]. Ist das Sehvermögen bereits eingeschränkt und besteht schon ein Makulaödem, wird medikamentös mit VEGF-Inhibitoren behandelt

[27][28]. Alternativ kann auch eine intravitreale Gabe von Kortikosteroiden entweder mittels intravitrealer Injektion (IVT) oder Dexamethasonimplantat veranlasst werden [27][28]. Bei Versagen der Therapie erfolgt die Laserfotokoagulation [27][28]. Ähnlich wird bei einer Minderdurchblutung der Makula oder der Netzhautperipherie und der Ausbildung peripherer Neovaskularisationen vorgegangen. [27][28]

### **1.3.2. Retinale Arterienverschlüsse: Zentralarterienverschluss und Arterienastverschluss**

Bei retinalen Arterienverschlüssen unterscheidet man nach der Ursache, der Ausprägung und der Persistenz der Obstruktion [28].

Ätiologisch kann ein retinaler Arterienverschluss thrombembolisch oder arteriitisch verursacht sein. In 95 % der Fälle ist er jedoch nicht arteriitisch bedingt [28].

Als Maß der Ausprägung dient die Größe der von dem Gefäßverschluss betroffenen Netzhautfläche und ist abhängig davon, welches Gefäß verschlossen ist [28]. So kann nur eine zilioretinale Arterie verschlossen sein, ein Arterienastverschluss vorliegen, ein Hemi-Zentralarterienverschluss, aber auch die komplette Zentralarterie kann verschlossen sein [28]. Ein retinaler Arterienverschluss kann sich in einer Amaurosis fugax äußern, bei der in der Funduskopie keine Zeichen eines retinalen Verschlusses vorliegen [28]. Der Verschluss kann transient mit spontaner und kompletter Rekanalisierung in der Fluoreszenzangiografie auftreten oder in Form eines persistierenden Verschlusses mit verzögerter oder ohne Rekanalisierung vorkommen [28].

Klinisch treten eine plötzliche, schmerzlose, einseitige und meist ausgeprägte Sehverschlechterung mit Gesichtsfeldausfall auf [28]. In der Fundusuntersuchung sind die Arterien im betroffenen Areal typischerweise dünn [28]. Eventuell sind zusätzlich Fibrinklumpen, stehende Blutsäulen oder Embolien sichtbar [28]. Innerhalb weniger Stunden nach dem Gefäßverschluss entwickelt sich eine weißliche, intrazelluläre Schwellung der Nervenfaserschicht, was als für dieses Krankheitsbild typischer „kirschroter Fleck“ in der Fovea in Erscheinung tritt [28]. Prodromal geht dem retinalen Arterienverschluss dabei in 15 % der Fälle eine Amaurosis fugax voraus. [28]

Das Zeitfenster, in der eine mögliche Therapie sinnvoll wäre, ist sehr klein [28]. Aus Untersuchungen an Rhesus-Affen ist bekannt, dass bereits 4,5 Stunden nach einem

Zentralarterienverschluss eine ausgeprägte und irreversible Ischämie der inneren Netzhautschichten entsteht [28]. Eine experimentelle Gefäßobstruktion bis zu ungefähr 100 Minuten hingegen hinterlässt noch keine Dauerschäden [28]. Folglich müssten bereits dauerhafte Schäden vermutet werden, wenn ein „kirschröter Fleck“ in der Fovea erkennbar ist [28]. Demzufolge müssten durch eine frühe Rekanalisation funktionelle Dauerschäden reduziert werden können [28]. Gegenwärtig sind jedoch noch keine Therapieansätze bekannt, deren Nutzen in Studien hinreichend nachgewiesen werden konnten. [28]

### **1.3.3. Anteriore ischämische Optikusneuropathie (AION)**

Bei der ischämischen Optikusneuropathie wird ätiogenetisch zwischen einer nicht arteriitischen Form (NAION) bei Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren und einer Form, die durch Arteriitis temporalis verursacht wird (AION), unterschieden [29][30]. Zu den Risikofaktoren der NAION zählen Hypertonie, DM, Hyperlipidämie und Rauchen [29][30].

Die NAION, wird durch einen akuten Verschluss einer den Sehnerven versorgenden retinalen Arterien verursacht, wodurch es zu einer Ischämie des Sehnervenkopfes kommt [29][30]. Sie äußert sich als plötzliche, meist schmerzlose einseitige Visusverschlechterung mit einem Gesichtsfeldausfall im Nervenfaserverlauf kombiniert mit einem Papillenödem, wobei die Symptome vorwiegend am Morgen auftreten [29][30].

Derzeit gibt es keine allgemein akzeptierten, evidenzbasierten Behandlungsoptionen für die NAION [29][30]. Empfehlungen basieren auf einer Behandlung der Grunderkrankungen und der Risikofaktoren [29][30]. Weiterhin gibt es Ansätze zur Behandlung der NAION mittels isovolämischer Hämodilution in der Akutphase und Acetylsalicylsäure zur Sekundärprophylaxe [29][30]. Beide sind jedoch in ihrer Wirksamkeit für die NAION bisher nicht ausreichend bestätigt. [29][30]

Zur Behandlung der NAION wurden außerdem Studien mit Kortikosteroiden durchgeführt [30]. Sie zeigen aber bislang keinen Vorteil [30]. Weiterhin wurde auch das Outcome der NAION nach Behandlung mit Levodopa bestimmt, womit kein Vorteil gezeigt werden konnte [30]. Im Gegenteil birgt die Therapie mit Levodopa erhebliche Nebenwirkungen [30]. Zur Behandlung mit VEGF-Inhibitoren gibt es ebenfalls noch keine ausreichende Datenlage, die eine Therapie rechtfertigen würde [30]. Neuroprotektive Medikamente mit

potenzieller Anwendungsmöglichkeit für die NAION sind noch in der Entwicklung oder befinden sich in der Frühstapphase [30]. Ein Ansatz ist die Anwendung einer kleinen interferierenden Ribonukleinsäure (siRNA), die die Caspase-2-Expression inhibieren soll, um so einer Apoptose vorzubeugen [30]. Ein weiterer in der Forschung befindlicher Ansatz ist der Effekt von intravitrealem Fasudil, einem Rho-Kinaseinhibitor, auf das visuelle Outcome nach einer akuten NAION [30]. Dabei scheint Fasudil eine hemmende Wirkung auf inflammatorische Prozesse zu haben, den Blutfluss zum Sehnerven wieder ansteigen zu lassen und darüber hinaus neuroprotektiv auf die Netzhaut zu wirken. [30]

#### **1.4 Fragestellung**

Die drei aufgeführten Erkrankungen Diabetes mellitus, Hypertonie und Arteriosklerose sind primär systemische Erkrankungen des Menschen, die sich aber alle lokal in einer Schädigung der Endorgane niederschlagen. Am Auge führen sie zum Krankheitsbild der Retinopathie. Obwohl bereits einige Versuche unternommen worden sind, die Kausalkette einer Retinopathie zu verstehen, ist noch nicht genug über die spezifischen Mechanismen bekannt, die ihr zugrunde liegen und die es ermöglichen, den Verlust des Sehvermögens zu verhindern. Derzeit ist man erfolgreich in der Lage, einen erhöhten Blutzuckerspiegel, einen zu hohen Blutdruck sowie erhöhte Blutfette auf ein physiologisches Niveau zu senken. Auch ist es möglich den Blutfluss in den durch Arteriosklerose verlegten Gefäßen zu verbessern. Dennoch schreitet der durch systemische Erkrankungen verursachte Schaden auf lokaler Ebene, bekannt aus Untersuchungen am Herz, der Niere und am Auge weiter fort [5][19][20]. Daraus lässt sich schließen, dass auch in der Retina spezielle lokale Mechanismen induziert werden und durch systemische Faktoren unabhängig vom ursprünglichen Stimulus aktiv bleiben müssen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit folgenden Fragestellungen nachgegangen:

1. Wie wirken sich Diabetes mellitus, Hypertonie und eine Hypoperfusion auf die Retinamorphologie im Tiermodell aus?
2. Welches sind mögliche Signalkaskaden, die in der Pathophysiologie der lokalen Mechanismen in der Retina involviert sind?

## **2. METHODIK**

### **2.1. Tiermodelle**

#### **2.1.1. Rattenmodell für diabetische Retinopathie bei Typ 2 Diabetes mellitus: Tetrazyklin induzierte Insulinrezeptor-Knockdown-Ratte (TetO)**

Für die Untersuchungen wurden weibliche transgene Sprague-Dawley-Ratten 4–6 Wochen nach Manifestation eines Diabetes mellitus (Blutglucose  $\geq$  300 mg/dl) verwendet. Als Vergleichstiere dienten gleichaltrige Wildtypen (WT). Die transgenen TetO-Ratten exprimieren Tetrazyklin induziert eine shRNA, die die Expression von Insulinrezeptoren reduziert. Nachdem diese Tiere über 4 Tage 2 mg/ml Doxycyclin, einem zur Klasse der Tetrazykline gehörenden Antibiotikum, mit dem Trinkwasser erhalten hatten, wurden sie innerhalb weniger Tage hyperinsulinämisch mit einem Anstieg des Blutzuckers auf  $>$  300 mg/dl. Eine Gruppe von 5 TetO-Ratten erhielt zusätzlich oral den Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp1-Antagonisten Losartan (10 mg/kg pro Tag) ab Auftreten des DM [31][32]. Alle Tiere wurden vom Experimental and Clinical Research Center am Charité-Campus Berlin-Buch durch die Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Ralf Dechend zur Verfügung gestellt.

#### **2.1.2. Rattenmodell für hypertensive Retinopathie: doppelt transgene Ratte (dTGR)**

Als Grundlage der Untersuchungen dienten 7 Wochen alte transgene Sprague-Dawley-Ratten, die zusätzlich zum ratteneigenen auch das Gen für das menschliche Renin und Angiotensinogen exprimieren (dTGR). Verglichen wurden diese Tiere mit gleichaltrigen WT. So entwickeln dTGR unbehandelt eine schwere Hypertonie mit signifikanten Endorganschäden u.a. an Herz und Nieren, was innerhalb von 7–8 Wochen zum Tod führt. [5] Bereitgestellt wurden die Tiere in Kooperation mit dem Experimental and Clinical Research Center am Charité-Campus Berlin-Buch durch die Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Ralf Dechend.

#### **2.1.3. Mausmodell für chronisch zerebrale Hypoperfusion**

Für dieses Modell wurden C57/Black- und MacGreen-Mäuse (B6N.Cg-Tg(Csflr-EGFP)) (Hume/J mice) verwendet, welche in systemischen und lokalen Makrophagen GFP exprimieren. Den Tieren wurde im Alter von ungefähr 3 Monaten an der Arteria carotis interna beidseits ein Micro Coil mit einem Durchmesser von 180  $\mu$ m implantiert.

Dies führte zu einer permanenten beidseitigen Reduktion der Blutzufuhr von 10–20 %. Gleichaltrige Kontrolltiere wurden Sham-operiert, d. h. sie erhielten eine äquivalente Operation jedoch ohne Implantation eines Mikro Coils. [6] Zur Verfügung gestellt wurden die Tiere vom Zentrum für Schlaganfallforschung Berlin durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Dirnagl.

Alle Tierversuche erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien und Bestimmungen über die Pflege und den Gebrauch von Labortieren der Charité-Universität Berlin und mit den Richtlinien der American Physiology Society nach Zulassung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo).

## **2.2. Quantitative Analyse**

### **2.2.1. Optimierung der RGC-Quantifizierung**

Die Quantifizierung der retinalen Ganglienzellen (RGC) erforderte eine mehrmalige Optimierung der Vorgehensweise, bevor valide Ergebnisse erzielt werden konnten.

Als entscheidender Parameter erwies sich dabei die Qualität des untersuchten mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnittes. Ein Qualitätskriterium war dabei, dass die Länge der Schnitte vergleichbar sein musste. So wurden lediglich Sagittalschnitte ausgewählt, bei denen es möglich war, mindestens zehn überschneidungsfreie Bildausschnitte am Axio Imager M2 bei 10-facher Vergrößerung aufzunehmen. Weiterhin durften die Sagittalschnitte nicht schräg angeschnitten sein und mussten ein gleichmäßiges HE-Färbemuster aufweisen.

Ein weiterer Faktor, der das Ergebnis beeinflusste, war die Wahl der Zählmethode. Als Option stand eine automatisierte Zählung mittels „Image J“ und eine manuelle Zählung zur Verfügung. Es zeigte sich schnell, dass die manuelle Zählweise der automatisierten aufgrund fehlender geeigneter Algorithmen stark überlegen war.

Auf diesen Erkenntnissen aufbauend wurden dann wie unter 2.2.2 dargestellt die RGC quantifiziert, womit ein aussagekräftiges und valides Resultat erzielt werden konnte.

### **2.2.2. Quantifizierung der RGC-Zahl**

Für die quantitative Analyse wurden 5 µm dicke in Paraffin eingebettete Retinasagittalschnitte mit HE gefärbt. Diese wurden durch Karin Oberländer bereitgestellt. Alle HE-Schnitte wurden mittels Axio Imager M2 für Fluoreszenzmikroskopie und ZEN lite 2012 Software unter Verwendung eines 10er-Objektivs untersucht und aufgenommen.

Für die quantitative Analyse des RGC-Verlustes wurden je 10 sehnervennahe Retinasagittalschnitte von 5 unterschiedlichen TetO-Ratten und WT sowie von 4 unterschiedlichen dTGR berücksichtigt. Als RGC wurden lediglich solche Zellen klassifiziert, die in der Ganglienzellschicht (GCL) lokalisiert waren und runde Zellkörper mit einer homogenen basophilen Eosin-Färbung aufwiesen. Die Zahl der RGC wurde dann für jedes Gesichtsfeld pro 100 µm in verblendeter Form durch vier unabhängige Untersucher quantifiziert. Ebenso erfolgte ein Vergleich zwischen der RGC-Zahl in der GCL zwischen graviden und nicht graviden Ratten sowie zwischen der Peripherie und des Zentrums eines Retinasagittalschnittes.

### **2.2.3. Statistische Analyse**

Der Ganglienzellverlust pro 100 µm wurde als arithmetisches Mittel +/- SEM erfasst. Statistische Abweichungen wurden mittels ANOVA getestet und die Aussagekraft des Mittelwertes durch den t-Test überprüft. Das Ergebnis wurde als statistisch signifikant angesehen, wenn  $p < 0,05$  entsprach.

## **2.3. Immunhistologie**

### **2.3.1. Optimierung ausgewählter immunhistologischer Färbungen**

#### **2.3.1.1. Anti-GFAP-Vimentin**

Die GFAP-Vimentin-Ko-Färbung wurde für Retinasagittalschnitte für die Ratten-Modelle, das Mausmodell und drei unterschiedliche Fixiermethoden getestet.

Für mit in 4 % Paraformaldehyd-(PFA)-fixierte Sagittalschnitte eignet sich zur Demaskierung der spezifischen Antigene Proteinase K am besten. Die optimale Verdünnung des Primärantikörpers entspricht 1:250 für anti-GFAP und 1:100 für anti-Vimentin. Für einen besseren Strukturerhalt der Netzhaut empfiehlt sich eine nur kurze Fixierzeit.

Bei einer Fixierung mit Methacarn sollte eine Demaskierung mit Proteinase K vermieden werden, da dies das Netzhautgewebe durch die proteolytische Wirkung des Enzyms zerstört. Stattdessen eignet sich eine Demaskierung mit (feuchter) Hitze. Da Methacarn die Sagittalschnitte verstärkt austrocknet, gilt es während des gesamten Färbevorgangs, verstärkt auf eine Feuchthaltung der Präparate zu achten.

Eine Fixierung mit Davidson-Lösung erhält die Strukturen der Retinasagittalschnitte am besten. Zu berücksichtigen ist, dass das Gewebe sich durch Davidson-Fixativ zusammenzieht und daher bei der mikroskopischen Betrachtung kleiner ist als vergleichbare Proben, die mit 4 % PFA oder Methacarn fixiert worden sind. Die Färbung gegen anti-Vimentin von mit Davidson-Lösung fixierten Geweben erreicht nicht die gleiche Qualität wie das von mit 4 % PFA fixierten. Deshalb sollte anstelle von anti-Vimentin ein anderer Primärantikörper wie zum Beispiel anti-Glutaminsynthetase gewählt werden.

Insgesamt kann die GFAP-Vimentin-Ko-Färbung sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen angewandt werden. Die nachfolgende Tabelle gibt eine zusammenfassende

<b>Tabelle 3. Übersicht über die Färbung mit anti-GFAP-Vimentin für verschiedene Fixative</b>			
	<b>4% PFA</b>	<b>Methacarn-Fixativ</b>	<b>Davidson-Fixativ</b>
<b>Verdünnung Primärantikörper</b>	1:250 (GFAP) 1:100 (Vimentin)	1:250 (GFAP) 1:100 (Vimentin)	1:500 (GFAP) 1:100 (Vimentin)
<b>Antigen-demaskierung/ Inkubationszeit</b>	Proteinase K/10min	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH6)/2x5min	Proteinase K/10min
<b>Blocking buffer/ Konzentration</b>	BSA in TBS/5%	BSA in TBS/5%	BSA in TBS/5%
<b>Sekundärantikörper</b>	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit
<b>Verdünnung Sekundärantikörper</b>	1:2500	1:2500	1:2500

Übersicht der optimierten Methoden bei der Anwendung von anti-GFAP-Vimentin für die jeweilige Fixierlösung (Tab 3).

### 2.3.1.2. Anti-Caspase-3 und anti-Cleaved Caspase-3

Der Caspase-3-Antikörper wurde für Retinasagittalschnitte von Ratten- sowie von Mausgewebe und zwei verschiedene Fixiermethoden getestet.

Eine Fixierung mit 4 % PFA erwies sich als die beste Methode für die Färbung mit anti-Caspase-3. Auf das Blocken der unspezifischen Bindungsstellen sollte dabei verzichtet werden. Der Primär- und der Sekundärantikörper dürfen nicht in 5 %igem BSA (bovines Serumalbumin) verdünnt werden. Stattdessen sollte man zu einer speziellen Antikörperversdünnungslösung greifen.

Von einer Verwendung von Methacarn-Lösung zur Fixierung sollte abgesehen werden, da dadurch nur wenig Kontrast bei der Fluoreszenzfärbung erreicht wird.

Analog verhielt es sich bei der Färbung mit anti-Cleaved-Caspase-3. Beide Antikörper eignen sich nicht für Rattengewebe. Eine Übersicht über die getesteten Methoden bei der

<b>Tabelle 4. Übersicht über die Färbungen mit anti-Caspase 3 und anti-Cleaved-Caspase 3 für verschiedene Fixative</b>		
	<b>4% PFA</b>	<b>Methacarn-Fixativ</b>
<b>Verdünnung Primärantikörper</b>	1:250 (in Antibody diluent)	1:250 (in Antibody diluent)
<b>Antigen-demaskierung/ Inkubationszeit</b>	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH6)/2x5min	Proteinase K/10min
<b>Blocking buffer/ Konzentration</b>	kein Blocking	kein Blocking
<b>Sekundärantikörper</b>	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit
<b>Verdünnung Sekundärantikörper</b>	1:2500 (in Antibody diluent)	1:2500 (in Antibody diluent)

Anwendung von anti-Caspase-3 und anti-Cleaved-Caspase-3 für die jeweilige Fixierlösung gibt Tabelle 4.

### **2.3.2. Optimiertes Standardprotokoll der immunhistologischen Färbungen**

Für die immunhistologischen Färbungen wurden die Retinasagittalschnitte zunächst für eine Stunde bei 60 °C inkubiert und anschließend in den nachfolgenden Lösungen in genannter Reihenfolge rehydriert: in Xylol und 2-Propanol in beiden jeweils für 2x10 Minuten, in 96 %iger, 90 %iger, 70 %iger und in 50 %iger Ethanolösung in allen jeweils für 1x5 Minuten und in destilliertem Wasser für 2x5 Minuten. Zur Demaskierung der spezifischen Antigene wurde entweder eine hitzeinduzierte oder eine enzymatische Denaturierung angewandt (siehe dazu Tabelle 5 bis 7). Anschließend wurden die Schnitte für 2x5 Minuten mit TBS (Tris-buffered saline) gewaschen, die Gewebemembranen dann mithilfe von Triton-X-100 (0,25 % in TBS) für 1x10 Minuten permeabilisiert und schließlich erneut für 2x10 Minuten mit TBS gewaschen. Nach dem Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit BSA (0,5 % in TBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur, wurden die Schnitte über Nacht mit den Primärantikörpern (siehe Tabelle 3 bis 5) in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Schnitte im Anschluss 4x10 Minuten mit TBS gewaschen wurden, wurden sie dann für 45 Minuten bei Raumtemperatur mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (siehe Tabelle 5 bis 7) inkubiert. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte durch 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) (1:100 in TBS) für 5 Minuten und anschließendem zweimaligen Waschen mit TBS für 5 Minuten. Zum Schluss erfolgte die Fixierung der Schnitte mit Fluorescent Mounting Medium auf Objektträgern.

Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind zusammen mit ihrer bestmöglichen Anwendung in Tabelle 5 bis 7 in alphabetischer Reihenfolge dargestellt.

**Tabelle 5. Primärantikörper für TetO-Ratten**

Primär-antikörper	Verdünnung Primär-antikörper	Fixierung	Antigend-maskierung/ Inkubationszeit	Blocking buffer/ Konzentration	Sekundär-antikörper	Verdünnung Sekundär-antikörper
<b>anti-aktivAtr1</b>	1:250	Davidson	Proteinase K/10min	BSA in TBS/5%	Texas Red®, goat anti-rabbit	1:1000
<b>anti-Atr1</b>	1:200	4% PFA	Proteinase K/10min	BSA in TBS/5%	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit	1:2500
<b>anti-Brn3a</b>	1:100	Methacarn	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH6)/2x5min	BSA in TBS/5%	Alexa Fluor® 546, goat anti-mouse	1:2500
<b>anti-C1q</b>	1:100 und 1:200	4% PFA und Methacarn	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH6)/2x5min	BSA in TBS/5%	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit	1:2500
<b>anti-GFAP</b>	1:250	4% PFA	Proteinase K/10min	BSA in TBS/5%	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit	1:2500
<b>anti-Glutamin-synthetase</b>	1:500	Davidson	Proteinase K/5min	BSA in TBS/5%	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit	1:10 000
<b>anti-Propertin</b>	1:250	4% PFA	Proteinase K/10min	BSA in TBS/5%	Texas Red®, goat anti-rabbit	1:10 000
<b>anti-Renin</b>	1:100	4% PFA	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH6)/ 2x5min <b>oder</b> Proteinase K/10min	BSA in TBS/5%	CF 594, donkey anti-goat	1:2500
		Methacarn	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH6)/2x5min	BSA in TBS/5%	CF 594, donkey anti-goat	1:2500
		Davidson	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH6)/ 2x5min <b>oder</b> Proteinase K/10min	BSA in TBS/5%	CF 594, donkey anti-goat	1:2500

**Tabelle 6. Primärantikörper für dTGR**

Primär-antikörper	Verdünnung Primär-antikörper	Fixierung	Antigend-maskierung/ Inkubationszeit	Blocking buffer/ Konzentration	Sekundär-antikörper	Verdünnung Sekundär-antikörper
<b>anti-aktivAtr1</b>	1:250	Davidson	Proteinase K/10min	BSA in TBS/5%	Texas Red®, goat anti-rabbit	1:1000
<b>anti-Atr1</b>	1:200	4% PFA	Proteinase K/10min	BSA in TBS/5%	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit	1:2500
<b>anti-C1q</b>	1:100 und 1:200	4% PFA und Methacarn	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH6)/2x5min	BSA in TBS/5%	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit	1:2500
<b>anti-GFAP</b>	1:250	4% PFA	Proteinase K/10min	BSA in TBS/5%	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit	1:2500
<b>anti-GFAP-Vimentin</b>	1:250 (GFAP) 1:100 (Vimentin)	4% PFA	Proteinase K/5min	BSA in TBS/5%	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit Alexa Fluor® 546	1:2500 1:2500
<b>anti-Propertin</b>	1:250	4% PFA	Proteinase K/10min	BSA in TBS/5%	Texas Red®, goat anti-rabbit	1:10 000
<b>anti-Renin</b>	1:100	4% PFA	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH6)/ 2x5min <b>oder</b> Proteinase K/10min	BSA in TBS/5%	CF 594, donkey anti-goat	1:2500
		Methacarn	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH6)/2x5min	BSA in TBS/5%	CF 594, donkey anti-goat	1:2500
		Davidson	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH6)/ 2x5min <b>oder</b> Proteinase K/10min	BSA in TBS/5%	CF 594, donkey anti-goat	1:2500
<b>VEGF-A</b>	1:250	4% PFA	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH6)/2x5min	BSA in TBS/5%	Texas Red®, goat anti-rabbit	1:10 000

**Tabelle 7. Primärantikörper für Mäuse mit chronisch zerebraler Hypoperfusion**

Primär-antikörper	Verdünnung Primär-antikörper	Fixierung	Antigend-maskierung/ Inkubationszeit	Blocking buffer/ Konzentration	Sekundär-antikörper	Verdünnung Sekundär-antikörper
<b>anti-Caspase 3</b>	1:250 (in Antibody diluent)	4% PFA	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH6)/2x5min	kein Blocking	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit	1:2500 (in Antibody diluent)
<b>anti-Cleaved Caspase 3</b>	1:250 (in Antibody diluent)	4% PFA	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH6)2x5min	kein Blocking	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit	1:2500 (in Antibody diluent)
<b>anti-GFAP</b>	1:250	4% PFA	Proteinase K/10min	BSA in TBS/5%	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit	1:2500
<b>anti-GFAP-Vimentin</b>	1:250 (GFAP) 1:100 (Vimentin)	4% PFA	Proteinase K/5min	BSA in TBS/5%	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit Alexa Fluor® 546, goat anti-mouse	1:2500 1:2500
<b>anti-PKCα</b>	1:100	4% PFA	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH6)/2x5min	BSA in TBS/5%	Texas Red®, goat anti-rabbit	1:1000
<b>anti-VGLUT1</b>	1:250	4% PFA	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH6)/2x5min	BSA in TBS/5%	Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit	1:2500

## 2.4. Material

Nachfolgend ist das für alle Experimente verwendete Material in alphabetischer Reihenfolge in tabellarischer Form mit den zugehörigen Herstellern aufgelistet.

Tabelle 8. Instrumente und Zubehör			
Instrument	Hersteller	Zubehör	Hersteller
<b>ApoTome.2</b>	Zeiss, Jena, DE	<b>Deckgläser</b>	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
<b>Fluoreszenzlampe</b>	LEJ, EBQ100 isolated, Jena, DE	<b>Pipetten</b>	Eppendorf, Hamburg, DE
<b>Inkubator</b>	Binder, Tuttlingen, DE	<b>Pipettenspitzen</b>	Sarstedt, Nümbrecht, DE
<b>Mikroskop für Histologie und Immunhistologie</b>	Zeiss, Axio Imager.M2, Jena, DE	<b>Reagenzgläser</b>	Carl Roth, Karlsruhe, DE
<b>Vortex Genie 2</b>	Model No.G560E, Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y, USA	<b>SuperFrost Plus Objektträger</b>	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
<b>Waage</b>	Sartorius, Göttingen, DE		

Tabelle 9. Chemikalien, Puffer und Lösungen				
Chemikalien	Hersteller	Puffer und Lösungen	Bestandteile	Menge bzw. Konzentration
Antikörperverdünnung	Zyostemed Systems, Berlin, DE	Antikörperlösung	BSA in TBS	0,8%
Barrier Pen	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK			
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	BSA-Blocking-Lösung	BSA in TBS	5%
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Fixierlösung I (PFA)	Paraformaldehyd in TBS	4%
Eosin G 0,5% aqueous solution	Carl Roth, Karlsruhe, DE	Fixierlösung II (Methacarn)	Methanol Chloroform Eisessig	60% 30% 10%
Ethanol	J.T. Baker, Center Valley, USA			
Fluorescent Mounting Medium	Dako North America, Inc., Carpinteria, Californien, USA	Fixierlösung III (Davidson)	Destilliertes Wasser  Eisessig Ethanol Formaldehyd	Für 100ml Fixierlösung III:  33ml  12ml 33ml (95%) 23ml (37%)
Hämalaunlösung nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, DE			
Isopropanol (>99,8%, 2-Proanol)	Carl Roth, Karlsruhe, DE			
Proteinase K	Dako, Santa Cruz, USA	Permeabilisationsmittel	Triton-X-100	0,25% resp.0,5%
Richard-Allan™ Scientific Cytoseal™ XYL Mounting media	Thermo Fisher Scientific, Massachussetts, USA			
Sodium Citrat Dihydrate (C6H5Na3O7 · 2H2O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	TBS, 10x, pH = 7,6	TrisAcid TrisBase Sodium chlorid in destilliertem Wasser	24g 5,6g 88g  900ml
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA			

**Tabelle 10. Antikörper**

Name	Typ	Hersteller
Anti-aktiv Atr1	P	Hergestellt von der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Ralf Dechend am Experimental and Clinical Research Center am Charité-Campus Berlin-Buch
Anti-Atr1, rabbit polyclonal IgG, LS-B4614 [33]	P	LSBioSciences, Seattle, USA
Anti-Brn3a, mouse monoclonal IgG, MAB1585 [34]	P	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Anti-C1q, rabbit polyclonal IgG, sc-25856 [35]	P	Santa Cruz, Dallas, USA
Anti-Caspase 3, rabbit polyclonal IgG, #9662 [36]	P	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Cleaved Caspase, rabbit monoclonal IgG, #9664 [36]	P	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
Anti-GFAP, rabbit polyclonal IgG, Z0334 [37]	P	Dako, Santa Clara, USA
Anti-Glutaminsynthetase, rabbit polyclonal IgG, ab49873 [38]	P	Abcam, Cambridge, UK
Anti-PKCa, rabbit polyclonal IgG, sc-208 [39]	P	Santa Cruz, Dallas, USA
Anti-Propertin, rabbit polyclonal, bs-8306R	P	Bioss, Woburn, USA
Anti-Renin, goat polyclonal IgG, AF4277 [40]	P	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-VEGF-A, rabbit polyclonal, ab46154 [41]	P	Abcam, Cambridge, UK
Anti-VGLUT1, rabbit polyclonal IgG, ab104898 [42]	P	Abcam, Cambridge UK
Anti-Vimentin, rabbit polyclonal IgG, sc-32322 [43]	P	Santa Cruz, Dallas, USA
Alexa Fluor® 488, donkey anti-rabbit, A-21206 [44]	S	Life Technologies, Carlsbad, USA
Alexa Fluor® 546, goat anti-mouse, A-11003 [45]	S	Life Technologies, Carlsbad, USA
Cf594, donkey anti-goat, #20116 [46]	S	Biotium, Hayward, USA
Texas Red™, goat anti-rabbit, #2767 [47]	S	Life Technologies, Carlsbad, USA

### **3. ERGEBNISSE**

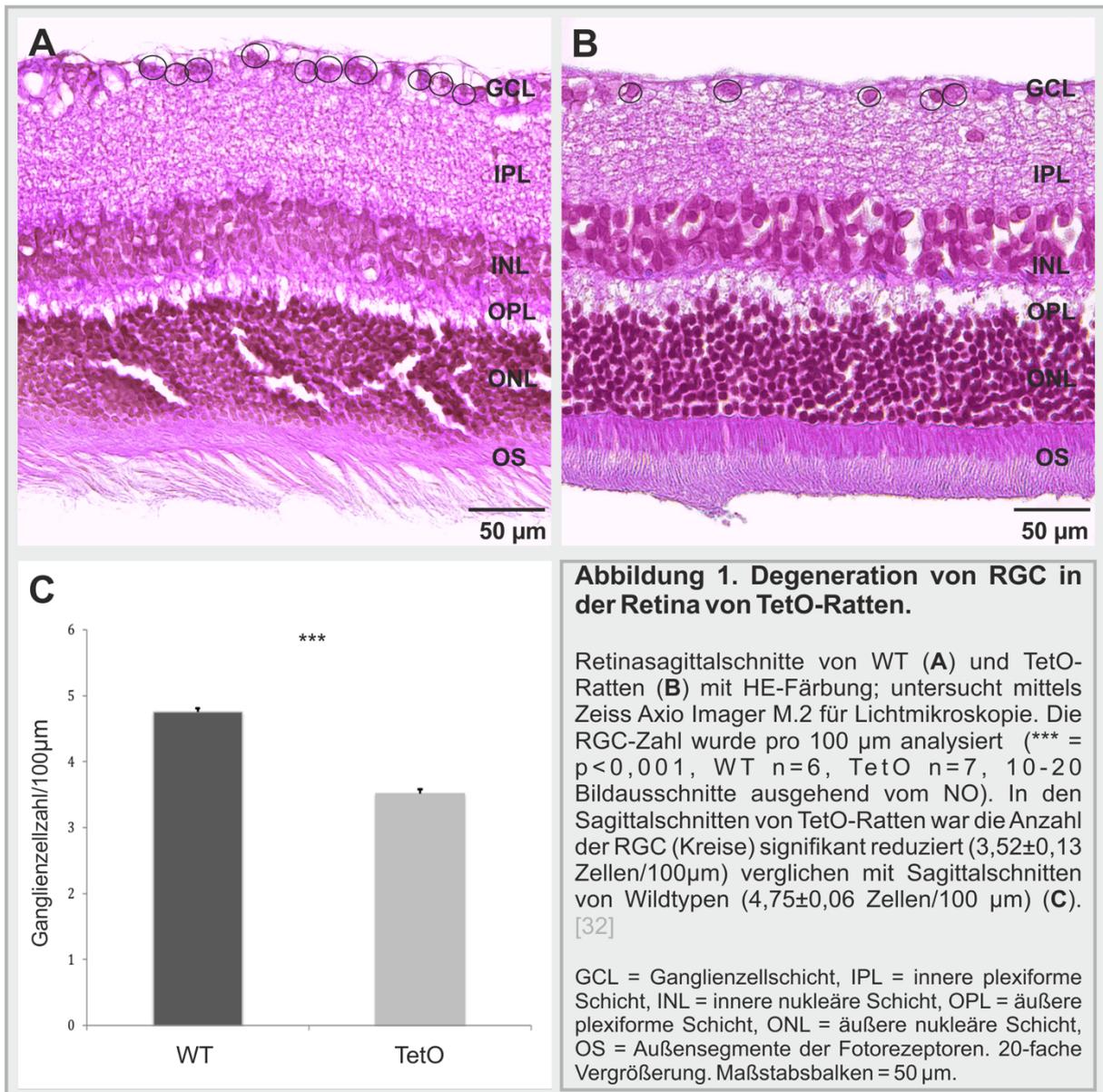
#### **3.1. Rattenmodell für diabetische Retinopathie bei Typ 2 Diabetes mellitus: Tetrazyklin induzierte Insulinrezeptor-Knockdown-Ratte**

##### **3.1.1. RGC-Verlust in der Retina von TetO-Ratten**

Es wurden HE gefärbte Retinasagittalschnitte von TetO-Ratten 4 bis 6 Wochen nach Auftreten eines DM histologisch untersucht. Sie wiesen keine strukturellen Veränderungen der äußeren Retinaschichten auf. Dabei waren die Fotorezeptor-außensegmente (OS) unverändert, ebenso wie die äußere nukleäre Schicht (ONL), und die äußere plexiforme Schicht (OPL). Auch die inneren Retinaschichten wie die innere nukleäre Schicht (INL) und die innere plexiforme Schicht (IPL) erschienen unauffällig. Jedoch zeigte sich in der GCL ein signifikanter Verlust von RGC in TetO-Retinasagittalschnitten ( $3,52 \pm 0,13$  Zellen/100  $\mu\text{m}$ ;  $n = 7$ ; 10–20 Bildausschnitte ausgehend vom N.opticus;  $p=0,001$ ) im Vergleich zu Retinasagittalschnitten von WT ( $4,75 \pm 0,06$  Zellen/100  $\mu\text{m}$ ,  $n = 6$ ; 10–20 Bildausschnitte ausgehend vom N.opticus (NO);  $p=0,001$ ) (Abb.1). Zwischen graviden und nicht graviden TetO-Ratten sowie zwischen peripheren und zentralen Netzhautabschnitten lagen keine Unterschiede vor, sodass in allen nachfolgenden Experimenten keine gesonderte Betrachtung erfolgte.

Um dieses Ergebnis zu bekräftigen und die RGC in der GCL deutlicher darstellen zu können, wurde eine immunhistologische Färbung mit anti-Brn3a durchgeführt. Brn3a ist ein Transkriptionsfaktor, der u.a. in retinalen Ganglienzellen vorkommt und als verlässlicher und effizienter ex vivo Marker zur Identifizierung und Quantifizierung retinaler Ganglienzellen genutzt werden kann [48].

Mit anti-Brn3a ließ sich jedoch aus methodischen Gründen lediglich eine einmalige, nicht reproduzierbare Färbung erzielen. Zudem fehlt eine valide WT-Kontrolle. Nur bei einem Retinasagittalschnitt einer TetO-Ratte färbte der Primärantikörper zellkernartige Strukturen in der GCL an, die in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der HE-Färbungen als retinale Ganglienzellen identifiziert wurden (Abb.2).



### **3.1.2. Veränderung der Gliazellreaktivität in der Retina von TetO-Ratten**

Bei der immunhistologischen Färbung der Retinasagittalschnitte gegen Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), einem Gliazellmarker aktivierter Astrozyten und Müllerzellen, sah man ein schwaches GFAP-Signal entlang der Ganglienzellschicht (GCL) der WT-Sagittalschnitte (Abb. 3A). In TetO-Sagittalschnitten war dagegen eine Zunahme des anti-GFAP-Signals erkennbar (Abb. 3B). GFAP erschien dabei vereinzelt in der GCL mit Fortsätzen in Richtung der äußeren Retinaschichten. Sagittalschnitte von TetO-Ratten, die eine Behandlung mit Losartan erhalten hatten (Abb. 3C), zeigten den WT-Sagittalschnitten ähnliche anti-GFAP-Signale.

Die Färbung gegen Glutaminsynthetase (Abb. 3D bis F), einem Enzym, das am Recycling des Neurotransmitters Glutamat beteiligt ist und spezifisch die Müllerzellen anfärbt, erscheint in Retinasagittalschnitten von WT-Ratten diffus und unspezifisch in allen Retinaschichten (Abb. 3 D). Dagegen zeigt die gleiche Färbung bei Sagittalschnitten von TetO- und TetO+LO-Ratten (Abb. 3E und F) zellkörperartige Strukturen in der INL, welche die Retina nach innen bis zur GCL und nach außen bis zur ONL durchspannen.

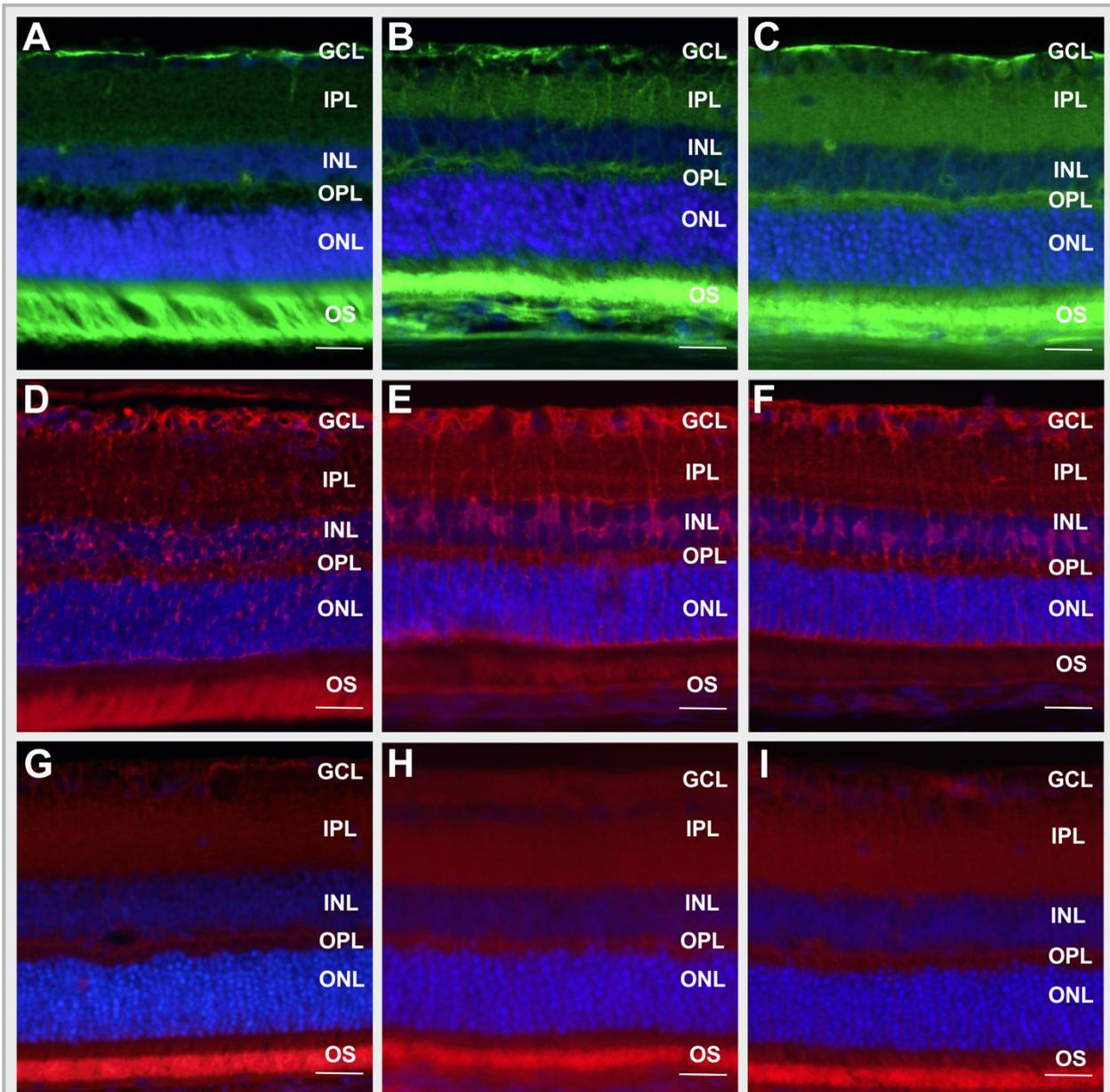
### **3.1.3. Veränderungen des RAS und des Komplementsystems in der Retina von TetO-Ratten**

Weiterhin wurde das TetO-Modell auf Veränderungen im Renin-Angiotensin-System untersucht. Dafür wurden Färbungen mit anti-Renin, anti-Atr1 (Angiotensin II Rezeptortyp 1) und anti-aktivAtr1 (aktivierter Angiotensin II Rezeptortyp 1) durchgeführt, die alle negativ ausfielen.

Auch Veränderungen im Komplementsystem konnten nicht nachgewiesen werden, da Färbungen gegen C1q, das die aktivierende Komponente des klassischen Reaktionsweges des Komplementsystems darstellt, und gegen Properdin, einem Plasmaprotein, das den alternativen Weg des Komplementsystems aktiviert, negativ waren.

### **3.1.4. Zusammenfassung TetO-Modell**

Die Retinasagittalschnitte von TetO-Ratten wiesen im Vergleich zum WT eine reduzierte RGC-Zahl sowie eine Aktivierung von Müllerzellen auf. Eine Beteiligung des RAS und des Komplementsystems bestand nicht.



**Abbildung 3. Veränderung der Gliazellreaktivität in der Retina von TetO-Ratten.**

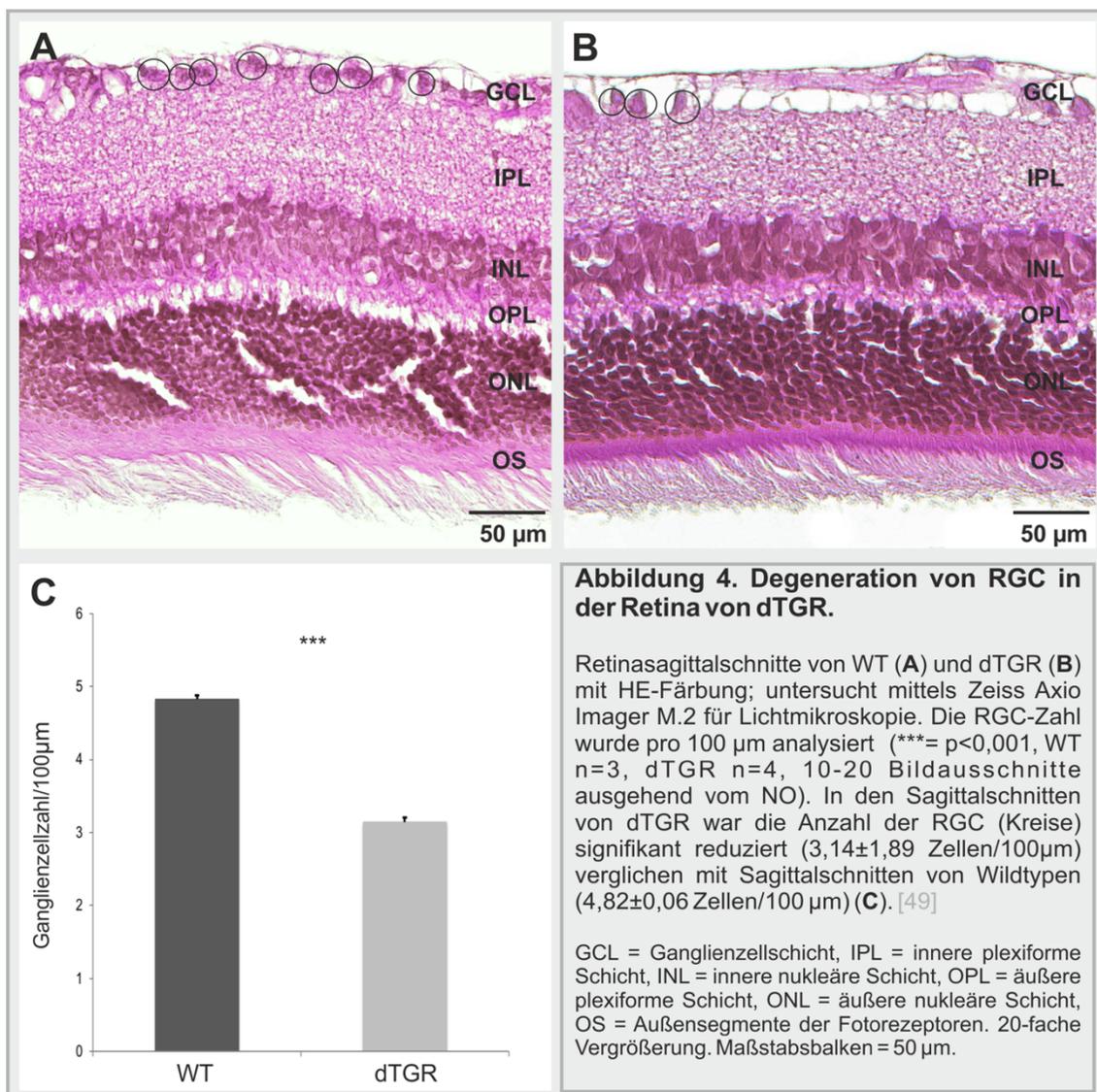
Retinasagittalschnitte von WT (**A**, **D** und **G**), von TetO-Ratten (**B**, **E** und **H**) und von mit Losartan behandelten TetO-Ratten (TetO+LO) (**C**, **F** und **I**) mit anti-GFAP (grün) (**A** bis **C**), anti-Glutaminsynthetase (rot) (**D** bis **F**), und DAPI (blau) zur Kernfärbung; Negativkontrollen **G** bis **I**; untersucht mittels Zeiss ApoTome für Fluoreszenzmikroskopie. [32]  
 Die Färbung mit anti-GFAP ließ eine Aktivierung von Astrozyten in Retinasagittalschnitten von TetO-Ratten (**B**) erkennen. Das anti-GFAP Signal in Sagittalschnitten von mit Losartan behandelten TetORatten (**C**) entspricht dem des WT (**A**). Die Färbung gegen Glutaminsynthetase in Retinasagittalschnitten von TetO- und TetO+LO-Ratten (**E** und **F**) zeigte zellkörperartige Strukturen in der INL, die die anderen Retinaschichten von der GCL bis zur ONL durchspannen. In WT-Sagittalschnitten (**D**) erscheint Glutaminsynthetase hingegen diffus und unspezifisch in allen Retinaschichten.

GCL = Ganglienzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, INL = innere nukleäre Schicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere nukleäre Schicht, OS = Außensegmente der Fotorezeptoren. 20-fache Vergrößerung. Maßstabsbalken = 50 µm.

### 3.2. Rattenmodell für hypertensive Retinopathie: doppelt transgene Ratte (dTGR)

#### 3.2.1. Ganglienzellverlust in der Retina von dTGR

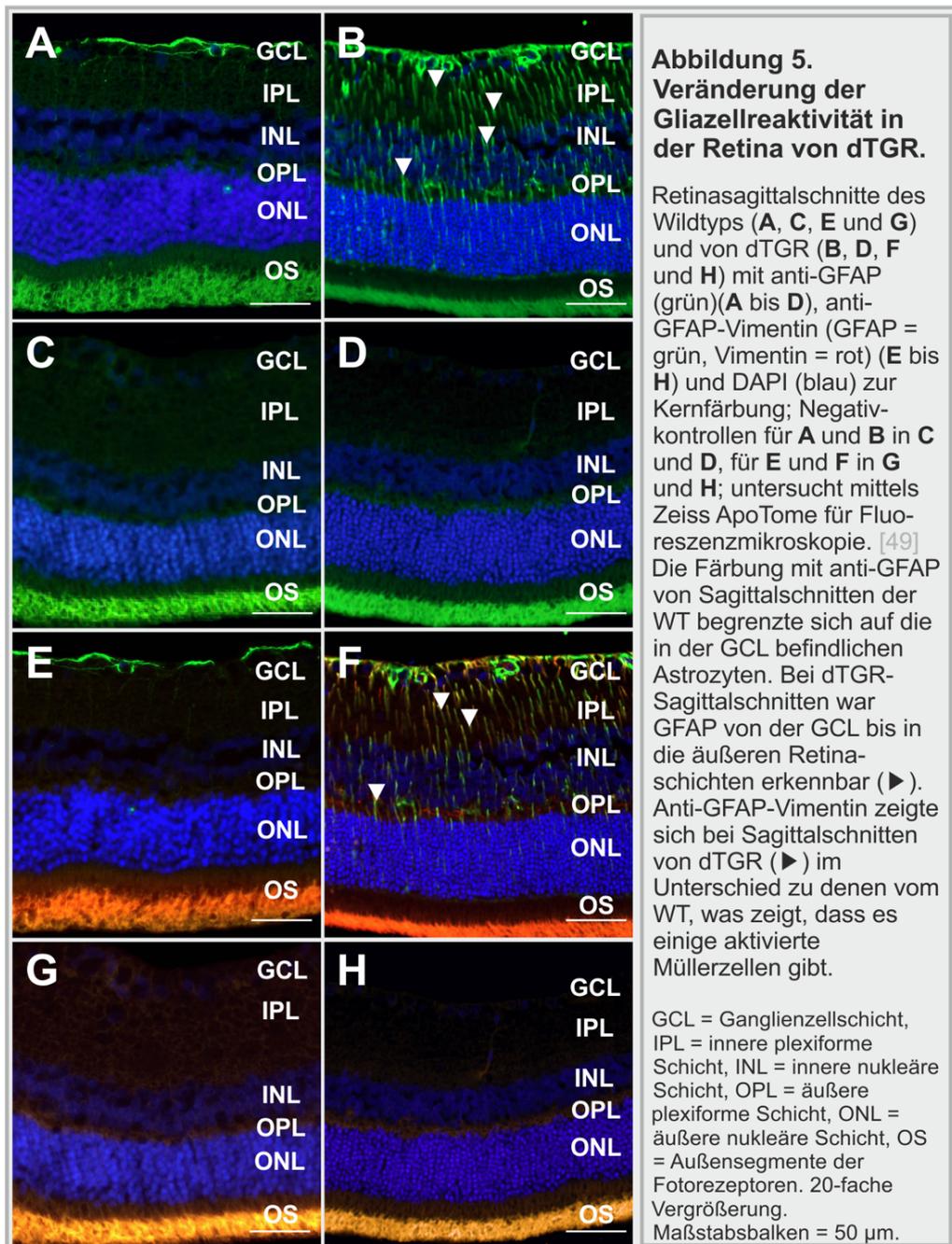
Für die Untersuchung des dTGR-Modells wurden HE gefärbte Retinasagittalschnitte sieben Wochen alter dTGR und WT-Ratten als Kontrolle verwendet. Der mittlere Blutdruck der dTGR betrug  $206 \pm 3$  mmHg systolisch und  $89 \pm 4$  mmHg diastolisch. Die Morphologie der äußeren Retinazellschichten der dTGR entsprach derer der WT-Ratten. Die Außensegmente waren intakt. Die innere und äußere Körnerzellschicht war erhalten. Es lagen keine Veränderungen an der OPL oder IPL vor. Ein Unterschied bestand jedoch in einer verminderten Anzahl an Ganglienzellen in der GCL der dTGR-Sagittalschnitte ( $3,14 \pm 1,89$  Zellen/100  $\mu\text{m}$ ,  $n = 4$ ; 10–20 Bildausschnitte durch den NO;  $p < 0,001$ ) im Vergleich zu der RGC-Zahl von WT-Sagittalschnitten ( $4,82 \pm 0,06$  Zellen /100  $\mu\text{m}$ ,  $n = 3$ ; 10–20 Bildausschnitte durch den NO  $p < 0,001$ ) (Abb. 4).



### 3.2.2. Veränderung der Gliazellreaktivität in der Retina von dTGR

Bei der immunhistologischen Färbung von dTGR-Sagittalschnitten gegen GFAP war das Protein in allen Retinaschichten von der GCL bis in die äußeren Retinaschichten deutlich erkennbar (Abb. 5B). In Retinasagittalschnitten von WT-Ratten begrenzte sich GFAP hingegen auf die in der GCL befindlichen Astrozyten (Abb 5A).

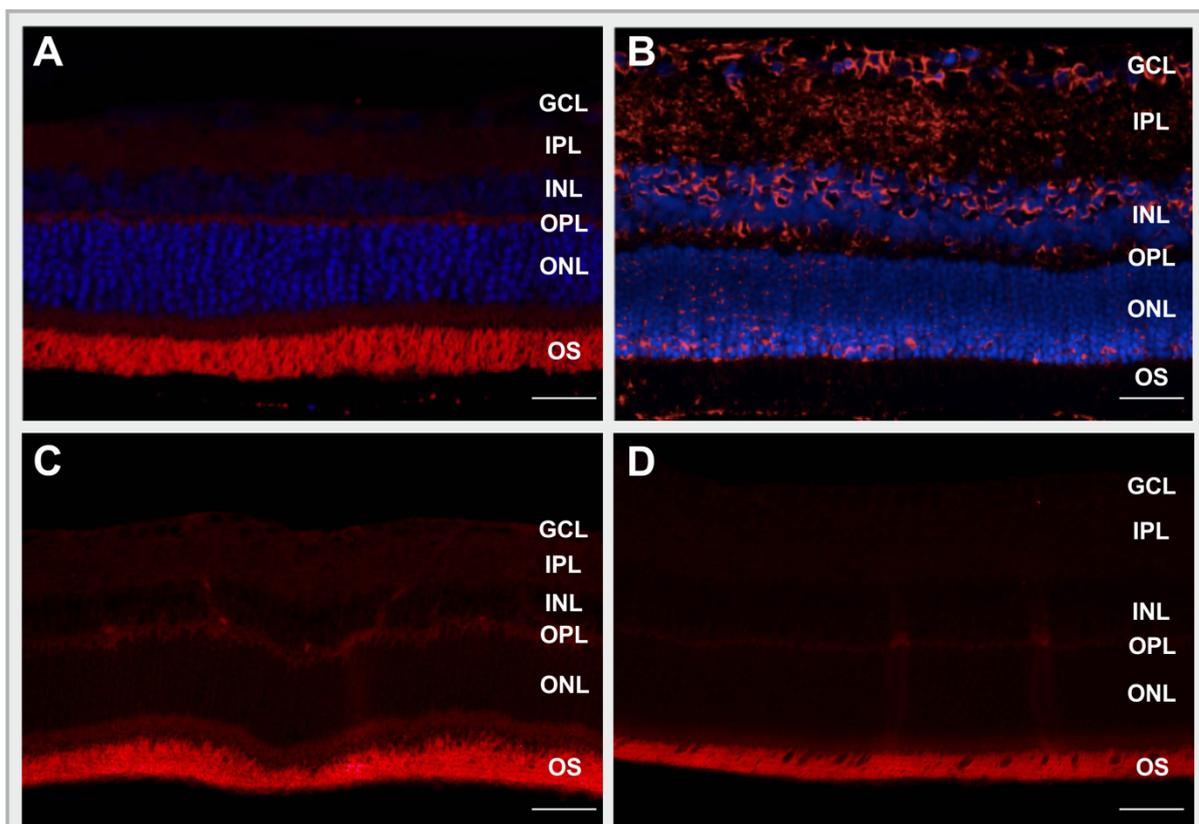
Bei der Färbung von dTGR-Sagittalschnitten mit anti-GFAP und anti-Vimentin – einem Marker für Müllerzellen – zeigte sich eine Ko-Färbung (Abb. 5F). Das lässt erkennen, dass es einige aktivierte Müller-zellen gibt.



### 3.2.3. Erhöhte VEGF-A Expression in der Retina von dTGR

Darüber hinaus wurden die Sagittalschnitte von dTGR mit anti-VEGF-A, einem Signalmolekül, das an der Angiogenese beteiligt ist und im vaskulären Gewebe auftritt, immunhistologisch gefärbt.

Bei dTGR-Sagittalschnitten war ein diffuses VEGF-A-Signalmuster über der gesamten Retina erkennbar. Anti-VEGF-A zeigte sich vor allem in der GCL, der IPL und der INL. Bei WT-Sagittalschnitten trat lediglich ein schwaches anti-VEGF-A-Signal im retinalen Pigmentepithel (RPE) auf (Abb.6).



**Abbildung 6. Färbung mit anti-VEGF-A.**

Retinasagittalschnitte von WT (A) und dTGR (B) mit anti-VEGF-A (rot); DAPI zur Gegenfärbung der Zellkerne (blau); Negativkontrollen in C und D; untersucht mittels Zeiss ApoTome für Fluoreszenzmikroskopie. [49]

Die WT-Sagittalschnitte (A) zeigen lediglich ein schwaches anti-VEGF-A-Signal im RPE (hier nicht dargestellt). Bei dTGR-Sagittalschnitten (B) war VEGF-A diffus über der gesamten Retina erkennbar.

GCL = Ganglienzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, INL = innere nukleäre Schicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere nukleäre Schicht, OS = Außensegmente der Fotorezeptoren. 20-fache Vergrößerung. Maßstabsbalken = 50 µm.

### **3.2.4. Veränderung des RAS und des Komplementsystems in der Retina von dTGR**

Auch das dTGR-Modell wurde auf Veränderungen des RAS und des Komplementsystems geprüft. Die Färbungen mit anti-Renin, anti-Atr1 und anti-aktivAtr1 sowie gegen anti-C1q und anti-Propdin waren in dieser Arbeit methodisch bedingt negativ. Eine positive Färbung für den aktivierten Atr1 konnte jedoch im Rahmen einer anderen Arbeit erzielt werden [49].

### **3.2.5. Zusammenfassung dTGR-Modell**

Die Retinasagittalschnitte von dTGR waren durch eine verminderte RGC-Zahl, eine Astrozytose und eine vermehrte Müllerzellaktivität gekennzeichnet. Zudem waren sie immunhistologisch positiv für VEGF-A.

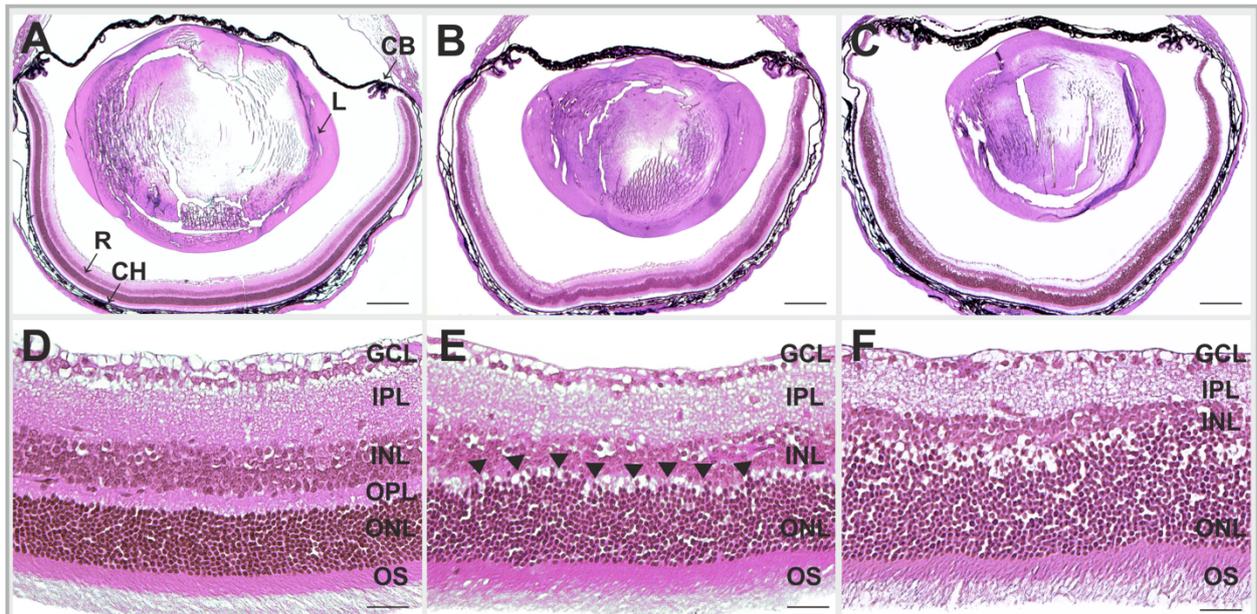
## **3.3. Mausmodell für chronisch zerebrale Hypoperfusion**

Als Grundlage der Untersuchungen dienten Retinasagittalschnitte von Mäusen mit okklusionsbedingter chronischer, zerebraler Hypoperfusion. Die Untersuchungen erfolgten an Tag 42 postoperativ.

Da das Mausmodell für zerebrale Hypoperfusion sehr heterogen ist, wurden die Mäuse für die histologischen und immunhistologischen Untersuchungen eingeteilt in solche mit leichter und solche mit schwerer Funktionseinschränkung der Netzhaut. Für die Einteilung wurden Daten aus Ganzfeld-Elektroretinografie(ERG)-Messungen verwendet, die von Sergej Skosyrski, Mitglied unserer Arbeitsgruppe, durchgeführt worden sind.

### **3.3.1. Veränderungen der Retinamorphologie bei Mäusen mit zerebraler Hypoperfusion**

Bei der strukturellen Analyse HE gefärbter Retinasagittalschnitte (Abb. 7) von Mäusen mit zerebraler Hypoperfusion (Abb. 7B, C, E und F) wird ein heterogenes Bild deutlich. Im Vergleich zu Sham-operierten Mäusen (Abb. 7A und D) wiesen sie vor allem einen partiellen Verlust der OPL auf. An einigen Stellen fehlt die OPL gänzlich, an anderen wiederum ist sie erhalten. Dabei ist an diesen Stellen jedoch die Dicke der OPL verringert.



**Abbildung 7. Degeneration von Ganglienzellen in der Retina von Mäusen mit chronisch zerebraler Hypoperfusion.**

Retinasagittalschnitte von Sham-operierten Mäusen (A und D) und Mäusen mit chronisch zerebraler Hypoperfusion mit leichter (B und E) und starker Funktionseinschränkung (C und F) der Netzhaut; HE-Färbung; untersucht mittels Zeiss Axio Imager M.2 für Lichtmikroskopie. [80]

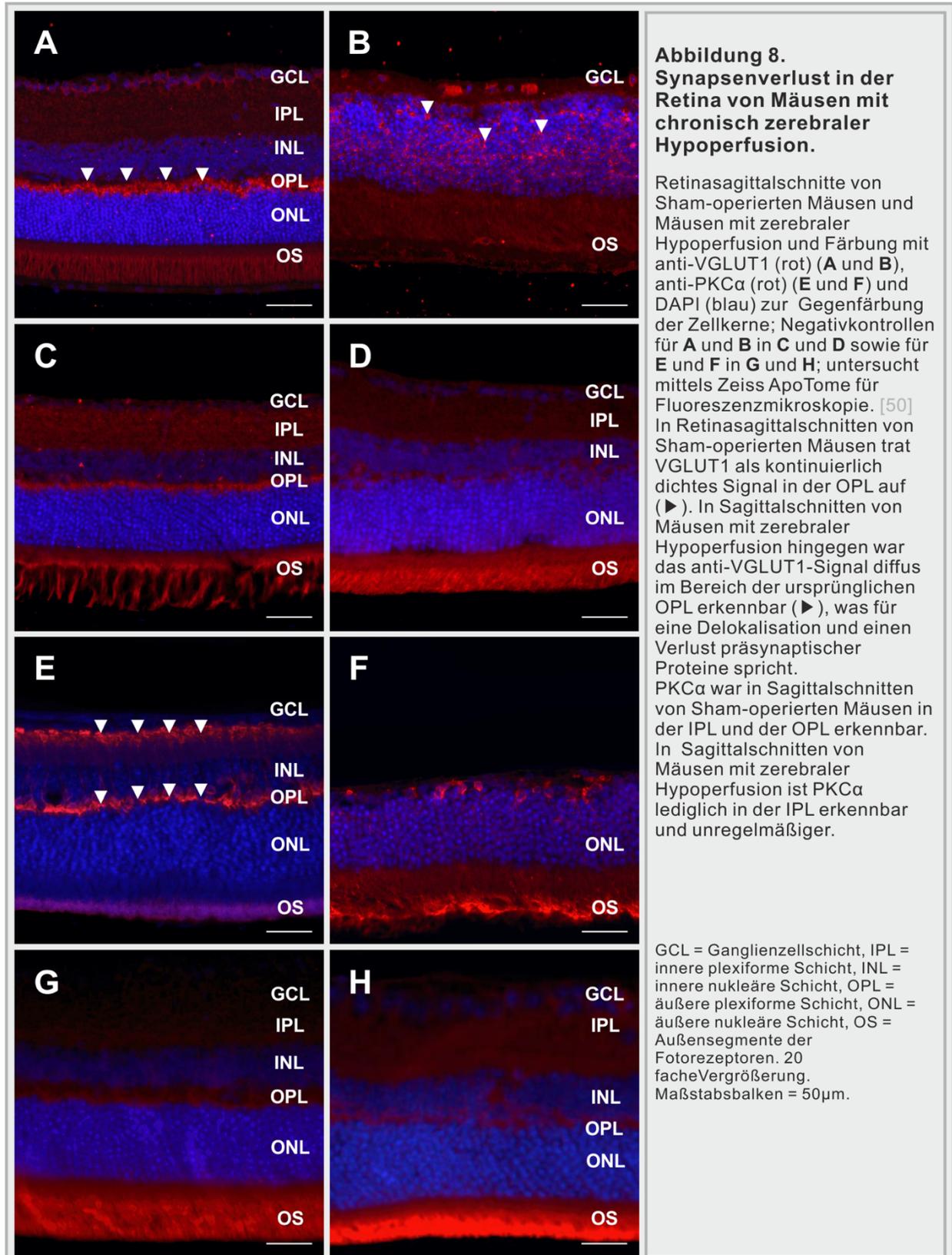
Die einzelnen Netzhautschichten sind bei Mäusen mit zerebraler Hypoperfusion (B, C, E und F) im Vergleich zu Sham-operierten Mäusen (A und D) zwischen der INL und ONL schlechter voneinander abgrenzbar. Bei stärkerer Vergrößerung (D bis F) wird der Verlust der OPL in den Sagittalschnitten von Mäusen mit leichter (E) und starker (F) Funktionseinschränkung der Netzhaut deutlich (▶).

CB = Ziliarkörper, CH = Chorioidea, L = Linse, R = Retina, GCL = Ganglienzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, INL = innere nukleäre Schicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere nukleäre Schicht, OS = Außensegmente der Fotorezeptoren.  
10-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 500 µm in den Abbildungen A bis C; 20-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken 50µm in den Abbildungen D bis F.

### 3.3.2. Synapsenverlust in der Retina von Mäusen mit chronisch zerebraler Hypoperfusion

Der Verlust der OPL, in der anatomisch die Synapsen zwischen Fotorezeptoren, Horizontal- und Bipolarzellen lokalisiert sind, legt die Vermutung nahe, dass diese im Verlauf einer chronischen, zerebralen Hypoperfusion in der Retina degenerieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese erfolgte eine Färbung mit anti-VGLUT1 (vesicular glutamate transporter 1) (Abb. 8A und B), der für das Beladen synaptischer Vesikel mit Glutamat für die vesikuläre exzitatorische glutamaterge Transmission verantwortlich ist [51] und als Präsynapsenmarker diente, und anti-PKC $\alpha$  (Protein Kinase C alpha), die als Bipolarzellmarker genutzt wurde und spezifisch in den ON-Bipolarzellen der Stäbchen vorkommt (Abb 8 E und F).

Während VGLUT1 in Sagittalschnitten von Sham-operierten Mäusen als kontinuierlich dichtes Signal entlang der OPL auf der Seite der Fotorezeptoren erschien, war in Sagittalschnitten von Mäusen mit zerebraler Hypoperfusion ein breites Band an



Zellkernen mit vereinzelt, diffus auftretendem VGLUT1 erkennbar, was für einen Verlust und eine Delokalisation präsynaptischer Proteine spricht.

In Retinasagittalschnitten von Sham-operierten Mäusen war PKC $\alpha$  entlang der IPL und der OPL am deutlichsten. In Sagittalschnitten von Mäusen mit zerebraler Hypoperfusion ist die Färbung lediglich in der IPL erkennbar und weniger kontinuierlich, was auf eine morphologische Veränderung der Bipolarzellen schließen lässt.

Um festzustellen, ob es eventuell durch Apoptose zum Zelluntergang kommt, wurden die Retinasagittalschnitte im nächsten Schritt mit anti-Caspase-3 einem Proenzym, das eine zentrale Rolle in der Caspase-abhängigen Apoptose einnimmt (Abb. 9A-C) sowie mit anti-Cleaved Caspase-3 (Abb. 9D-F) einem Marker der aktiven Caspase-3-Form immunhistologisch gefärbt.

Caspase-3 war in der GCL und der OPL in Retinasagittalschnitten von Sham-operierten Mäusen erkennbar (Abb. 9A). In Retinasagittalschnitten von Mäusen mit leichter retinaler Funktionseinschränkung war das anti-Caspase-3-Signal mit dem von Sham-operierten Mäusen vergleichbar (Abb. 9B). In Sagittalschnitten von Mäusen mit schwerer Funktionseinschränkung der Netzhaut war Caspase-3 immunhistologisch hingegen nicht nachweisbar (Abb. 9C).

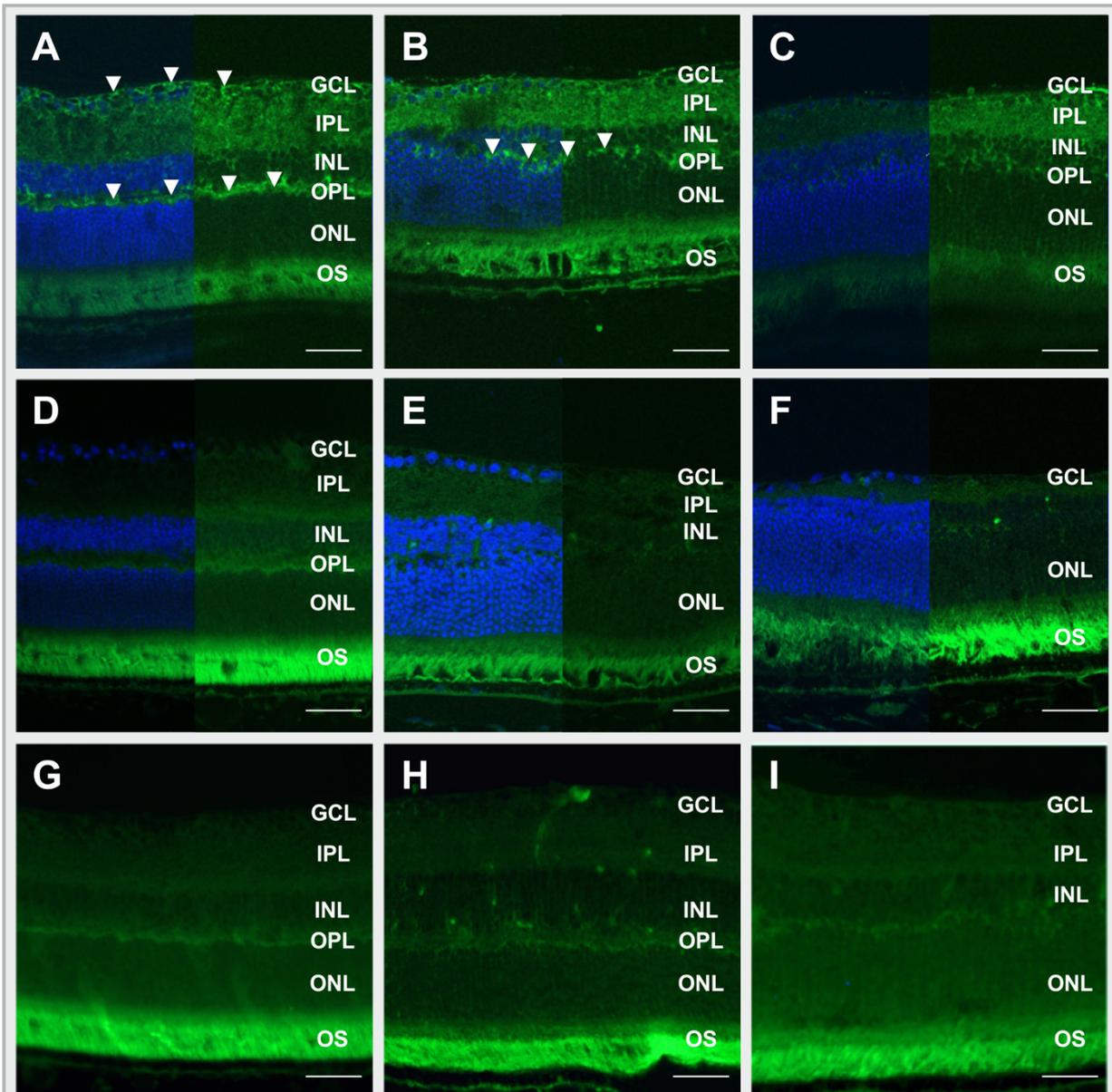
Eine positive Färbung gegen Cleaved-Caspase-3 ließ sich für keines der Tiere zeigen.

### **3.3.3. Veränderungen der Gliazellreaktivität in der Retina von Mäusen mit zerebraler Hypoperfusion**

Um den Einfluss chronischer, zerebraler Hypoperfusion auf Astrozyten und Müllerzellen zu untersuchen, wurden immunhistologische Färbungen mit anti-GFAP und mit anti-Vimentin durchgeführt (Abb. 10).

GFAP war in Retinasagittalschnitten von Sham-operierten Mäusen vereinzelt in der IPL, INL und OPL erkennbar (Abb.10A). Deutlicher war GFAP hingegen in Sagittalschnitten von Mäusen mit leichter und starker Funktionseinschränkung der Netzhaut (Abb.10B und C). GFAP war dabei vorwiegend entlang der GCL mit Fortsätzen bis in die OPL lokalisierbar.

Bei der Färbung mit anti-GFAP und anti-Vimentin (Abb.10G-I) für Sagittalschnitte des Mausmodells mit zerebraler Hypoperfusion zeigte sich eine Ko-Färbung von GFAP und Vimentin, jedoch lediglich bei Tieren mit starker Funktionseinschränkung (Abb. 10I), was eine Aktivierung von Müllerzellen anzeigt.

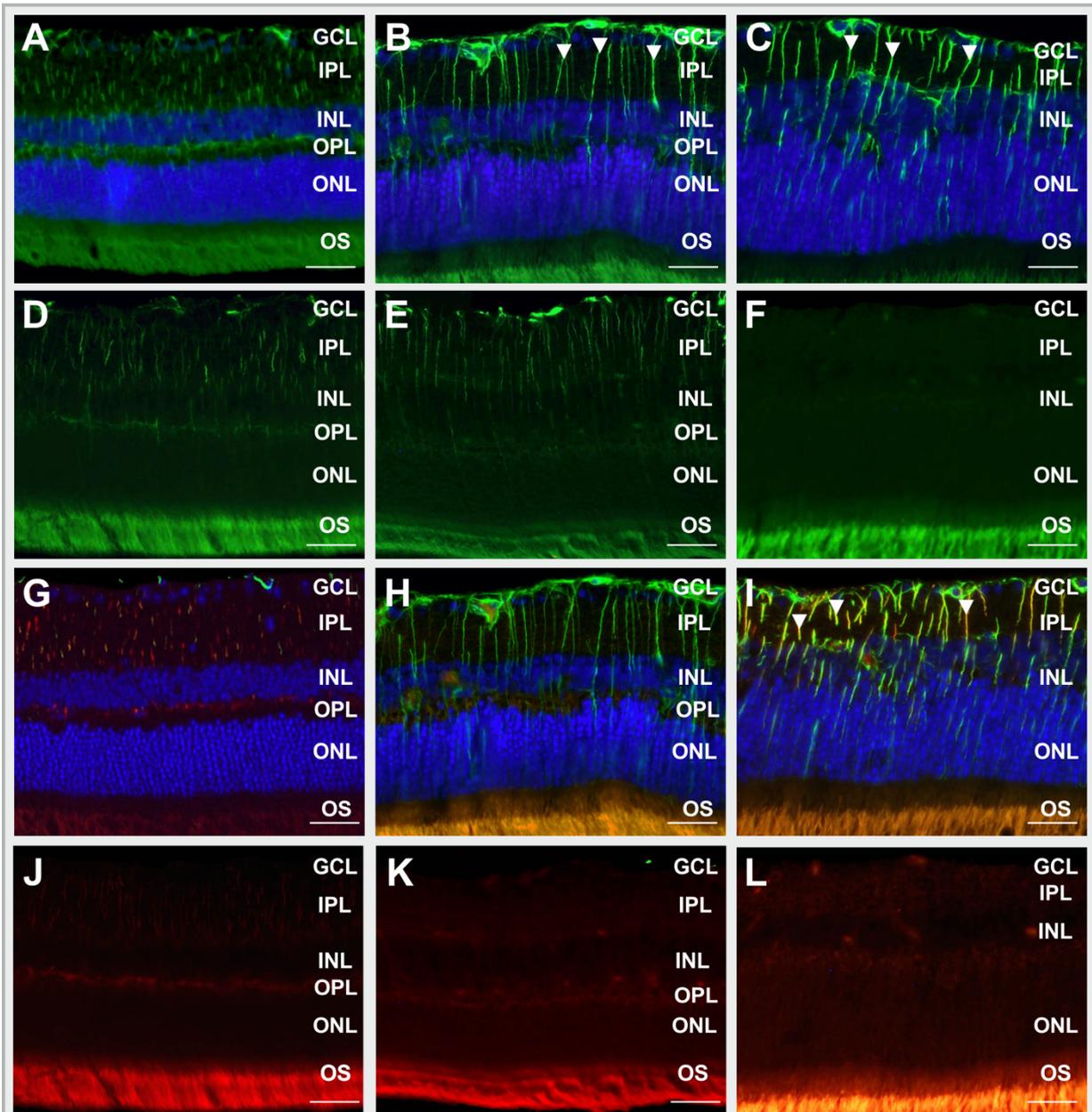


### Abbildung 9. Kein Synapsenverlust durch apoptosebedingten Zelltod.

Retinasagittalschnitte von Sham-operierten Mäusen (A, D und G) und Mäusen mit leichter (B, E und H) und schwerer Funktionseinschränkung der Retina (C, F und I) durch zerebrale Hypoperfusion mit anti-Caspase-3- (grün) (A bis C) und anti-Cleaved-Caspase-3-Färbung (grün) (D bis F); DAPI zur Gegenfärbung der Zellkerne; Negativkontrollen in G bis I; untersucht mittels Zeiss ApoTome für Fluoreszenzmikroskopie. Der linke Bildabschnitt in A bis F zeigt die jeweilige Färbung mit, der rechte Bildabschnitt zeigt sie ohne DAPI-Gegenfärbung. [80]

In Sagittalschnitten von Sham-operierten Mäusen war Caspase-3 hauptsächlich entlang der GCL und der OPL (▶) erkennbar. Ein ähnliches Bild in abgeschwächter Intensität zeigte sich auch in Sagittalschnitten von Mäusen mit zerebraler Hypoperfusion mit leichter Funktionseinschränkung der Netzhaut (▶). In Sagittalschnitten von Mäusen mit schwerer Funktionseinschränkung hingegen war Caspase-3 nicht sichtbar. Cleaved-Caspase-3 war in keiner der Färbungen erkennbar.

GCL = Ganglienzellschicht, INL = innere nukleäre Schicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere nukleäre Schicht, OS = Außensegmente der Fotorezeptoren. 20-fache Vergrößerung. Maßstabsbalken = 50µm.



**Abbildung 10. Veränderung der Gliazellreaktivität in der Retina von Mäusen mit chronisch zerebraler Hypoperfusion.**

Retinasagittalschnitte von Sham-operierten Mäusen (A, D, G und J) und Mäusen mit leichter (B, E, H und K) und starker Funktionseinschränkung der Netzhaut (C, F, I und L) durch chronisch zerebrale Hypoperfusion mit anti-GFAP (grün) (A bis C), anti-GFAP-Vimentin (GFAP = grün, Vimentin = rot) (C bis E) und DAPI (blau) zur Gegenfärbung der Zellkerne (in A bis C sowie G bis I); Negativkontrollen für A bis C in D bis F sowie für G bis I in J bis L; untersucht mittels Zeiss ApoTome für Fluoreszenzmikroskopie. [50]

GFAP ist in Sagittalschnitten von Sham-operierten Mäusen vereinzelt in der IPL, INL und OPL erkennbar. Deutlicher dagegen ist GFAP in Sagittalschnitten von Mäusen mit zerebraler Hypoperfusion. Es ist in der GCL lokalisierbar und setzt sich bis in die OPL fort (▶). GFAP-Vimentin war am deutlichsten in Sagittalschnitten von Mäusen mit starker Funktionseinschränkung der Netzhaut erkennbar (▶).

GCL = Ganglienzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, INL = innere nukleäre Schicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere nukleäre Schicht, OS = Außensegmente der Fotorezeptoren. 20-fache Vergrößerung. Maßstabsbalken = 50 µm.

#### **3.3.4. Zusammenfassung Mausmodell der chronisch zerebralen Hypoperfusion**

Im Mausmodell für zerebraler Hypoperfusion war morphologisch ein Verlust der OPL erkennbar, der von einem isolierten Synapsenverlust begleitet war. Immunhistologisch war dafür kein Apoptose bedingter Zelltod ursächlich nachweisbar. Darüber hinaus war auch eine Astrozytose bei Tieren mit leichter und starker Funktionseinschränkung der Retina infolge einer zerebralen Hypoperfusion erkennbar. Gleichzeitig weisen die Tiere mit starker Einschränkung der Netzhautfunktion auch eine Aktivierung von Müllerzellen auf.

## **4. DISKUSSION**

### **4.1. Methodik**

#### **4.1.1. Quantifizierung der RGC-Zahl in Retinasagittalschnitten**

Zur Quantifizierung wurden die RGC auf HE gefärbten Retinasagittalschnitten des jeweiligen Tiermodells manuell ausgezählt.

Eine manuelle Zählung erscheint auf den ersten Blick mit einem erheblich größeren Zeitaufwand verbunden zu sein als eine automatisierte. Untersuchungen dazu zeigen aber auch, dass die Differenz der aufgebrauchten Zeit für die Quantifizierung der von wie in unserem Modell betrachteten vergleichbaren Strukturen zwischen manueller und automatisierter Zählung äußerst gering ist, sofern das Untersuchungsmaterial die notwendige Qualität aufweist [52].

Werden Zellstrukturen manuell ausgezählt, birgt das die Gefahr für vermehrte Zählfehler, wodurch sich die Ergebnisse nicht reproduzieren lassen. Auch in den untersuchten Modellen erschwerten zahlreiche pyknotische Zellen, die nicht mit in die Analyse eingehen sollten, die korrekte Durchführung. Weitere Einflussfaktoren waren schräge Anschnitte des Netzhautgewebes und eine nur schwer mögliche Abgrenzung der als Ganglienzelle identifizierten Strukturen vom Parenchym. Außerdem war auch keine Vergleichbarkeit der ausgewerteten Sagittalschnitte gegeben, da zwar Sagittalschnitte mit einem großen Radius ausgewählt wurden, aber dennoch eine große Schwankungsbreite in der Lokalisation der verglichenen Schnitte auftrat. Aufgrund dieser Tatsachen gingen nur ausgewählte Gewebeschnitte mit hoher Qualität und einer definierten Retinagröße in die Analyse ein. Die Zählungen wurden mehrmalig in verblendeter Form durch voneinander unabhängige Untersucher durchgeführt, sodass davon auszugehen ist, dass damit ein valides Zählergebnis erzielt werden konnte.

Des Weiteren wurde versucht, das Ergebnis der manuellen RGC-Zählung mit einer immunhistologischen Färbung mit anti-Brn3a zu untermauern. Brn3a, der als Transkriptionsfaktor in den retinalen Ganglienzellen vorkommt, wurde hierbei als Marker zur Identifizierung und Quantifizierung der RGC genutzt. Das Ergebnis der Brn3a-Färbung sollte zeigen, ob es eine Korrelation mit dem Ergebnis aus der HE-Färbung gibt. Das Ziel war zum einen die Ergebnisse aus den HE-Färbungen mit einer weiteren Methode zu bestätigen und zum anderen eine eventuell bessere Methode zur Darstellung der Ganglienzellen zu finden. Allerdings gelang die Färbung lediglich ein Mal und ließ

sich nicht reproduzieren. Erklären ließe sich dieses Ergebnis durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die sehr anfällig für Epitopmodifikationen zum Beispiel durch ein nicht kompatibles Fixiermedium sind [53]. In der Folge werden die Epitope nicht mehr von den monoklonalen Antikörpern erkannt, wodurch die Färbung falsch negativ ausfällt [53]. Denkbar wäre hier der Austausch der monoklonalen Antikörper gegen polyklonale, die in der Regel weniger anfällig gegenüber Epitopveränderungen sind [48]. Allerdings muss auch in Betracht gezogen werden, dass durch die Brn3a-Färbung nicht alle Ganglienzellen erfasst werden, wodurch 30 % der Zellen für die Analyse verloren gehen. Zudem regulieren Ganglienzellen im Verlauf pathologischer Veränderungen die Brn3a-Expression herunter, wodurch dieser Effekt noch weiter verstärkt wird und die RGC somit eventuell gar nicht mehr nachweisbar sind. [34]

#### **4.1.2. Immunhistologische Analyse von Retinasagittalschnitten**

Für die Analyse von Veränderungen des neuronalen Gewebes in der Netzhaut und dabei insbesondere der Gliazellen wurde mit den Antikörpern anti-GFAP, anti-Glutaminsynthetase sowie anti-Vimentin gearbeitet.

Zur immunhistologischen Färbung wurden validierte polyklonale Antikörper verwendet. Die Validierung der Antikörper hinsichtlich Qualität und Verwendung erfolgte durch den Abgleich des jeweiligen Antikörpers in Publikationen [37][38][43], durch die Herstellervalidierung sowie im eigenen Labor.

Polyklonale Antikörper neigen, aufgrund ihrer Variabilität Epitope zu erkennen, zum einen dazu Kreuzreaktionen hervorzurufen. Zum anderen sind polyklonale Antikörper anfällig für falsch positive Färbungen. Ein weiteres häufiges Problem von immunhistologischen Färbungen sind unspezifische Hintergrundfärbungen, die durch den Sekundärantikörper verursacht werden. Dies zeigte sich bei der Färbung gegen GFAP und Vimentin in einer starken unspezifischen Färbung der retinalen Außensegmente. Testweise wurde aus diesem Grund anti-Vimentin im TetO-Rattenmodell durch anti-Glutaminsynthetase ersetzt und mit Davidson-Lösung fixiert, wodurch die unspezifische Hintergrundfärbung und die unspezifische Färbung der retinalen Außensegmente deutlich verringert war. Daher sollte in einem nächsten Schritt dieses Erkenntnis sowohl auf das dTGR-Modell übertragen als auch für das Mausmodell der chronisch bilateralen zerebralen Hypoperfusion getestet werden.

## **4.2. Rattenmodell für diabetische Retinopathie bei Typ 2 Diabetes mellitus: Tetrazyklin induzierte Insulinrezeptor-Knockdown-Ratte**

### **4.2.1. Morphologische Veränderungen in der Retina von TetO-Ratten**

Mit Ausnahme einer reduzierten RGC-Zahl waren bei der histologischen Untersuchung keine Veränderungen der Netzhautarchitektur im TetO-Rattenmodell erkennbar.

Auch Lai et al [54] beschreiben für das db/db-Mausmodell, das einen spontanen Typ II Diabetes entwickelt, einen RGC-Verlust bei der DR. In diesem Modell entwickeln die Mäuse infolge einer Genmutation im Leptin-Rezeptor eine Fettleibigkeit mit der Folge eines Typ 2 Diabetes mellitus [54]. Zudem konnten Kern et al [55] auch beim Menschen in immunhistologischen Untersuchungen von Retinasagittalschnitten von Diabetespatienten ein vermehrtes Auftreten von Bax, Caspase-3 und Caspase-9 in den RGC finden. Sie schlussfolgerten, dass bei Diabetespatienten die RGC-Zahl durch Apoptose reduziert wird. Ebenfalls korrelieren die RGC-Verluste mit Ergebnissen aus OCT-Untersuchungen bei Typ 2 Diabetikern. So untersuchten Ng et al [56] in einer Fall-Kontrollstudie mittels OCT die durchschnittliche RGC-Zahl in der Netzhaut von Typ 2 Diabetikern. Sie fanden heraus, dass ein RGC-Verlust auftritt. Dieser zeigt sich bei Diabetikern bereits ohne eine klinisch manifeste DR und ist bei moderater und schwerer DR progredient [56].

### **4.2.2. Veränderungen der Gliazellreaktivität in der Retina von TetO-Ratten**

Am TetO-Modell zeigte sich ein starkes GFAP- ebenso wie ein starkes Glutaminsynthetase-Signal, was auf eine vermehrte Aktivität der Müllerzellen zurückzuführen ist.

Ähnliche Beobachtungen machten auch Agardh et al [57]. Sie untersuchten die Retina von Streptozotocin(STZ)-Ratten im Paraffinschnitt mit anti-GFAP. Dabei zeigte sich, dass das GFAP-Signal einen Monat nach STZ-Injektion nur gering erkennbar war, hingegen 6 Monate nach STZ-Injektion bei 5 von 5 diabetischen Ratten deutlich sichtbar wird. Rungger-Brändle et al [58] fanden in STZ-Ratten 4 Wochen nach STZ-Injektion in Immunfluoreszenzuntersuchungen von Flatmountpräparaten und im Immunoblot keine vermehrte Expression von GFAP in den Müllerzellen und ebenfalls keine Astrozytose. Jedoch treten diese Veränderungen bei den Tieren ab 12 Wochen nach STZ-Injektion auf [58]. Weiterhin konnte diese Arbeitsgruppe in den Flatmountpräparaten zeigen, dass

die Astrozytendichte in der peripapillären und der äußeren Netzhautperipherie 4 Wochen nach STZ-Injektion signifikant abnimmt [58].

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Applikation des selektiven AT1-Rezeptorantagonisten Losartan den Verlust der Ganglienzellen signifikant reduziert und außerdem zu einer Verringerung der retinalen Gliose im TetO-Modell führt [32]. Zudem kam es durch die Gabe von Losartan im ERG zu einer Zunahme der skotopischen a- und b-Wellen, zu einer geringeren b/a-Wellen-Ratio sowie einer Zunahme der fotopischen b-Welle und der oszillatorischen Potenziale [32]. Das bedeutet, dass sich durch die Losartangabe sowohl die Funktion der Zapfen als auch der Stäbchen verbesserte [32]. Auch in einer von Sjølie et al. durchgeführten randomisierten, multizentrischen Doppelblindstudie konnte gezeigt werden, dass der selektive AT1-Rezeptorantagonist Candesartan bei DM Typ-2 Patienten mit leichter und mittelschwerer DR zu einer Abschwächung der Retinopathie führt [19]. Diese Studie wurde an weltweit 309 Zentren durchgeführt. Dazu wurden 1905 Teilnehmer mit Normalalbuminämie, Normotension oder behandelte Hypertension und mit Typ 2 DM sowie begleitender leicht- und mittelgradiger DR untersucht [19]. Im ersten Monat erhielten alle Probanden 1 Mal täglich 16 mg Candesartan oder ein Placebo [19]. Nach einem Monat wurde die Dosis auf 1 Mal täglich 32 mg Candesartan erhöht [19]. Die Behandlung mit dem aktiven Wirkstoff führte dabei im Vergleich zur Placebogruppe zu einer Regression der DR um 34 % [19]. Die Regression wurde dabei als eine Reduktion von mindestens drei oder mehr Stufen in der ETDRS-Skala (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Scale) (siehe dazu Tabelle 1 in der Arbeit von Sjølie AK [19]) vom Beginn der Studie bis zu einer beliebigen Nachfolgeuntersuchung oder als gleichbleibende Reduktion von zwei oder mehr Stufen in der ETDRS-Skala in zwei aufeinanderfolgenden Nachkontrollen definiert. [19]

#### **4.2.3. Das RAS in der Retina von TetO-Ratten**

Immunhistologisch konnten im TetO-Modell kein Renin, aktivAtr1 und Atr1 nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis erscheint insbesondere für die Färbung mit anti-Atr1, sehr unwahrscheinlich. So belegt zum einen die Arbeit von Wheeler-Schilling et al [59] eine physiologische Expression von AT1 in den Ganglienzellen. Zum anderen zeigen auch die Daten am TetO-Modell, dass die Blockade des AT1-Rezeptors mit dem selektiven AT1-Rezeptorantagonisten Losartan einem Ganglienzellverlust entgegenwirkt [32]. Ferner ist für kommerziell erhältliche ATR1-Antikörper bekannt, dass sie nur sehr unspezifisch

binden und damit wenig zuverlässig in ihrer Aussagekraft sind. [60] Darüber hinaus zeigen auch die qPCR-Untersuchungen am TetO-Modell eine vermehrte Genexpression von Atr1 [32]. Dies bedeutet, dass zwar vermehrt Atr1-mRNA synthetisiert wird, die dann jedoch nicht weiter zur Proteinbiosynthese gelangt. Weiterhin ist eine vermehrte mRNA-Synthese von Atr1 nicht gleichzusetzen mit vermehrt aktiviertem Atr1, sodass der Rezeptor womöglich trotz erhöhter Atr1-mRNA für die immunhistologische Testung nicht detektierbar ist.

Für das AngII ist beschrieben, dass es via Apoptose der Endothelzellen und vaskulärem Remodelling sowie durch Inflammation für die mikroangiopathischen Veränderungen der Retina bei DM mitverursachend ist [61][62]. So lösen hohe AngII-Spiegel über den AT1-Rezeptor getriggert eine Apoptose der Endothelzellen aus [62]. Zuerst gehen dabei die Perizyten in eine Apoptose über [62]. Perizyten bilden zusammen mit einer Endothelzellschicht die Retinakapillaren [62]. Beide Zelltypen beeinflussen sich wechselseitig [62]. Perizyten haben unter anderem die Fähigkeit den Gefäßdurchmesser zu regulieren und sie sind an der Regulation der Angiogenese beteiligt, indem sie anti-angiogene Faktoren freisetzen, aber sie verleihen den Kapillaren auch ihre strukturelle Integrität [62]. Daher führt der Zelltod der Perizyten im Verlauf zu einer pathologisch erhöhten Gefäßdurchlässigkeit mit dem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke, zur Apoptose der Endothelzellen sowie über eine Hypoxie zur Angiogenese in der Retina [62]. Ghattas et al [61] beschreiben außerdem, dass diabetesinduziert über den AT1-Rezeptor eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den retinalen Endothelzellen erfolgt. Dies wiederum setzt Zytokine frei und führt zu einer Inflammation [61].

#### **4.2.4. Das Komplementsystem in der Retina von TetO-Ratten**

Die Untersuchungen am TetO-Modell lassen mit der verwendeten Methode nicht auf eine Aktivierung des Komplementsystems schließen, da weder C1q noch Properdin immunhistologisch nachweisbar waren.

Jedoch wurden, um die allgemeine Inflammation der Retina im TetO-Modell zu untersuchen, im Rahmen einer anderen Arbeit [32] mittels qPCR erneut mehrere Marker getestet. Hierbei zeigte sich, dass TetO-Ratten im Vergleich zu WT-Ratten signifikant höhere mRNA-Level für Tnf, Itgb2, Ccl2 und Icam1 hatten. Die Vcam1- und Tgfb1-Expression hingegen waren nicht signifikant verändert. Neben den bereits oben

genannten Ergebnissen von Ghattas et al [61] stützt auch eine von Gustavsson et al [63] durchgeführte klinische Studie die Hypothese, dass eine intraokuläre Inflammation an der Entstehung einer DR beteiligt ist. Für die Studie wurden der Interleukin-6-Spiegel im Glaskörper mittels ELISA und der TNF-alpha-Spiegel im Serum von 26 DM-Patienten mit aktiver PDR und von 27 Nicht-Diabetikern gemessen. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass IL-6 im Glaskörper von Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern höher war (157,5 pg/ml versus 44,0 pg/ml). Zudem konnten höhere TNF-alpha-Spiegel im Serum von Diabetikern nachgewiesen werden (9,0 pg/ml versus 6,7 pg/ml). [63]

#### **4.2.5. Pathomechanismus der diabetischen Retinopathie im TetO-Modell**

Am TetO-Modell wurden bisher zum einen diabetisch bedingte neuronale und zum anderen vaskuläre Veränderungen der Netzhaut sowie inflammatorische Prozesse untersucht.

Auf Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen und im Kontext bestehender Erkenntnisse zur DR im Nagetiermodell lässt sich schließen, dass im TetO-Modell bereits sehr früh, 4–5 Wochen nach der Downregulation der Insulinrezeptoren [32], zunächst das neuronale System pathologische Veränderungen durchläuft. In Erscheinung treten diese Veränderungen zum einen in Form eines RGC-Verlustes, was zu einer herabgesetzten Sehleistung führt. Des Weiteren verursacht der TetO-induzierte Insulinrezeptorknockdown nach 6 Wochen als Reaktion auf eine Schädigung des Nervengewebes eine Gliose. Darüber hinaus verändert der Kaliumkanal in den Müllerzellen, der Kir 4.1, seine ursprüngliche Lokalisation in den basolateralen und apikalen Endfüßen sowie in den die Gefäße umfassenden Strukturen der Müllerzellen und tritt stattdessen ubiquitär in der Retina auf [32]. Die Aufgabe des Kir 4.1 ist die Elimination von Wasser aus der Retina und die Elektrolythomöostase [64]. Unter physiologischen Bedingungen akkumuliert Wasser in der Neuroretina und im subretinalen Raum [63]. Das angesammelte Wasser resultiert aus einem Influx aus dem Blut der inneren Retinagefäße und aus der oxidativen Synthese von Adenosin 5'-Triphosphat (ATP), bei der Kohlenstoffdioxid und Wasser entstehen [63]. Das überschüssige Wasser wird durch einen transzellulären Wassertransport durch die Müllerzellen und das RPE wieder in das Blut zurückbefördert [63]. Der Transport wird dabei durch Aquaporine (AQP) erleichtert [63]. In den Müllerzellen erfolgt dies über AQP4 [63]. Dabei ist der transzelluläre Wassertransport osmotisch an den Transport von

Elektrolyten, insbesondere von Kalium und Chlorid, gekoppelt [63]. In den Müllerzellen wird der Kaliumtransport durch die Kaliumionenkanäle Kir2.1 und Kir 4.1 ermöglicht [63]. Kir 2.1-Kanäle vermitteln lediglich den Kaliumioneneinstrom in die Müllerzellen, wohingegen Kir 4.1-Kanäle den bidirektionalen Kaliumionenstrom zwischen dem extraretinalen Gewebe und dem inneren der Müllerzellen erlauben [63]. Wenn nun infolge der pathophysiologischen Veränderungen bei der DR der Kir 4.1 dysfunktional wird, so können die Müllerzellen via Kir 4.1 zwar Kaliumionen in die Müllerzellen aufnehmen, aber das überschüssige Kalium in den Müllerzellen kann dann nicht mehr in den extraretinalen Raum abgegeben werden [63]. Der intrazelluläre Kaliumüberschuss würde zu einem erhöhten osmotischen Druck im Inneren der Müllerzellen führen [63]. Das bewirkt ein Ödem der Müllerzellen, was klinisch der Ausbildung eines Makulaödems entspricht [63]. Daher ist zu vermuten, dass die pathophysiologischen Veränderungen am Kir 4.1 auch im TetO-Modell für die Ausbildung des retinalen Ödems verantwortlich sind.

Weiterhin treten im TetO-Modell neben den Veränderungen im neuronalen System auch vaskuläre Veränderungen an der Netzhaut in Erscheinung. Erkennbar werden bei den TetO-Ratten hier eine zunehmende Stenosierung der retinalen Kapillaren sowie das Auftreten von Venen mit abnormem Gefäßkaliber im tiefen mikrovaskulären Gefäßplexus [32]. Zu vermuten ist, dass dadurch die Hämodynamik der retinalen Gefäße beeinflusst wird und möglicherweise in einer Reduktion der Blutzufuhr in die Neuropile resultiert, was wiederum eine Konsequenz für die ausreichende Versorgung mit Sauer- und Nährstoffen der Retina hätte, die physiologisch einen hohen metabolischen Bedarf aufweist. [12] Was allerdings zuerst geschieht, ob nun der Gefäßdegeneration im TetO-Modell eine Degeneration der Neurone vorausgeht oder umgekehrt und wie genau die neurovaskuläre Unit im TetO-Modell zusammenspielt bleibt ungeklärt. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass pathologische Prozesse auf neuronaler Ebene durch die Gabe des AT1-Antagonisten Losartan blockiert wird [32]. Dies zeigt sich darin, dass die Degeneration der Ganglienzellen nach Gabe von Losartan gehemmt wird, wohingegen die Gefäßdegenerationen im TetO-Modell durch die Gabe von Losartan unbeeinflusst bleiben. [32]

Anhand der Untersuchungen wird deutlich, dass das RAS eine wichtige Rolle in der Pathogenese der diabetischen Veränderungen im TetO-Modell einnimmt. In den RGC, den endothelialen Zellen und sehr wahrscheinlich auch in den Müllerzellen, und somit

vorwiegend in der inneren Retina findet man vermehrt aktivierten Atr1. Zu überprüfen gilt an dieser Stelle über welche genaue Kausalkette die weiteren Pathomechanismen ablaufen. Ansatzpunkte wären beispielsweise apoptotische und inflammatorische Prozesse sowie durch oxidativen Stress verursachte Mechanismen [12][32], zumal durch die weiterführenden Untersuchungen am TetO-Modell bereits beschrieben ist, dass Tnf, Itgb2, Ccl2 und Icam1 in Folge des Insulinrezeptor-Knockdowns hochreguliert werden [32].

#### **4.3. Rattenmodell für hypertensive Retinopathie: doppelt transgene Ratte (dTGR)**

##### **4.3.1. Morphologische Veränderungen in der Retina von dTGR**

Bei den Untersuchungen am dTGR-Modell stellte sich ein RGC-Verlust in der GCL dar. Die übrige Netzhautmorphologie blieb hingegen unverändert. Der RGC-Verlust korreliert dabei mit herabgesetzten Parametern im Pattern-ERG [49], was für eine reduzierte Aktivität der RGC spricht. Dieses Ergebnis ist im Hinblick auf die bisher existierenden Tiermodelle für die HR einmalig, da der RGC-Verlust wie z. B. bei spontan-hypertensiven Ratten (SHR-Modell) bislang auf einen erhöhten IOP und damit auf eine okuläre Hypertonie zurückgeführt wurde [49]. Im Unterschied dazu bleibt der IOP im dTGR-Modell jedoch durchschnittlich bei 12 mmHg und steigt bei dTGR im Vergleich zu WT-Ratten lediglich um 0,9 mmHg an [49], was nicht genügt, um einen RGC-Verlust zu bewirken und zudem bei Ratten als nicht-pathologischer IOP-Anstieg anzusehen ist [65]. Das deutet darauf hin, dass im dTGR-Modell andere Mechanismen an der RGC-Degeneration beteiligt sein müssen als eine Erhöhung des IOP [49]. In diesem Zusammenhang zeigten immunhistologische Färbungen gegen GFAP an Sagittalschnitten des NO eine Astrozytose [49], was die Vermutung nahelegt, dass aktivierte Astrozyten einen relevanten Faktor in der Kausalkette des RGC-Degenerationsprozesses darstellen.

##### **4.3.2. Veränderungen der Gliazellreaktivität in der Retina von dTGR**

Immunhistologisch konnten im dTGR-Modell eine Astrozytose und eine Ko-Aktivierung von Müllerzellen gezeigt werden.

Ein vergleichbares Ergebnis wurde für die bestehenden Modelle zur HR bisher noch nie beschrieben. So fanden beispielsweise Batenburg et al [66] keine erhöhte Anzahl aktivierter Astrozyten in nicht diabetischen (mREN2)27-Ratten. Auch Sabbatini et al [66]

konnten bei 12–15 Monate alten SHR lediglich eine Aktivierung von Astrozyten nachweisen.

Neben der Astrozytose der Retina und der Aktivierung der Müllergliazellen konnten Reichhart et al [49] am dTGR-Modell außerdem eine Gliose des NO nachweisen, was als klinisch-histologisches Korrelat der HR gilt.

#### **4.3.3. Das RAS in der Retina von dTGR**

Die immunhistologischen Färbungen mit anti-Renin, anti-Atr1 und anti-aktivAtr1 fielen negativ aus.

Auch an dieser Stelle ist wieder anzumerken, dass vermutlich die fehlende Spezifität des anti-Atr1 wie auch beim TetO-Modell zu diesem negativen Resultat geführt hat. Überdies zeigen erneute Färbungen mit anti-aktivAtr1 wie sie in der Arbeit von Reichhart et al [49] dargestellt sind, ein positives Staining in der GCL von dTGR. Anzunehmen ist, dass die Abweichung methodisch begründet ist.

Weiterhin sind die Ergebnisse auch im Zusammenhang mit Messungen von Angiotensinmetaboliten in der Retina von dTGR zu betrachten. Hierbei steigt das lokale Angiotensin II (AngII) bei dTGR um das 4-fache an, wohingegen andere Angiotensinmetabolite unter der Nachweisgrenze des Quantifizierungsassays bleiben [49]. Da die lokale Reninproduktion in der Retina bei diesen Messungen nicht detektierbar ist, ist davon auszugehen, dass die hohen AngII-Spiegel möglicherweise aus einer Atr1-rezeptorabhängigen Aufnahme aus dem Plasma resultieren wie es bereits für verschiedene andere Organe wie z.B. für das Herz und die Nieren beschrieben wurde [49][67–69]. Die Nieren von dTGR zeigen dementsgegen nur einen geringen Anstieg der AngII-Spiegel im Vergleich zu deren Kontrollen [49]. Somit unterscheiden sich die Niere und die Retina in ihrer lokalen RAS-Aktivität, was die besondere Bedeutung von AngII für die Retina widerspiegelt [62][70].

#### **4.3.4. Das Komplementsystem in der Retina von dTGR**

Die immunhistologischen Färbungen mit anti-Properdin und mit anti-C1q waren negativ.

Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass eine Hypertonie zu Endorganschäden führt, die unter anderem durch inflammatorische Prozesse ausgelöst werden [71][72]. Außerdem

wurde am Modell für arterielles Remodelling bei Hypertonie eine Verbindung zwischen Komplementfaktor C1q und dem Umbau von Arterien gezeigt [73].

#### **4.3.5. Vermehrte VEGF-A Expression in der Retina von dTGR**

Im dTGR-Modell konnte immunhistologisch VEGF-A nachgewiesen werden. Weiterhin wurde in den von Reichhart et al [49] durchgeführten q-PCR-Analysen keine verstärkte Genexpression von pro-angiogenen Genen wie Flk-1, Flt-1 und sFlt-1 gefunden. Die Rezeptoren für VEGF werden also nicht verstärkt exprimiert, aber auch nicht herunterreguliert, wobei gleichzeitig mehr VEGF-A gebildet wird. Ergänzend dazu finden sich im dTGR-Modell vaskuläre Veränderungen [49]. Es zeigen sich atrophie Gefäße in der Retinaperipherie [49]. In der zentralen Retina weisen die Gefäße eine verstärkte Tortuosität der Arterien auf [49]. Außerdem lassen sich in der FAG nicht perfundierte Areale und eine Leckage der Blutgefäße erkennen. [49]

#### **4.3.6. Pathomechanismus der hypertensiven Retinopathie im dTGR-Modell**

Im dTGR-Modell tritt die hypertensive Retinopathie zum einen in Form neuronaler Veränderungen an der Netzhaut in Erscheinung. Die RGC in der inneren Retina degenerieren, was eine herabgesetzte Sehleistung nach sich zieht. Begleitet wird der RGC-Untergang von einer Astrozytose des NO sowie einer Ko-Aktivierung der Müllerzellen. Die Frage, die sich dabei stellt ist, ob nun die Aktivierung der Gliazellen zur Degeneration der RGC führt oder, ob sie eine Reaktion ist, um den Untergang der RGC zu bekämpfen. Zum anderen verursacht ein hypertensives Milieu auch vaskuläre Anomalien im dTGR-Modell [49]. In der zentralen Retina ist die Papille in ihrem Durchmesser verringert [49]. In der Netzhautperipherie bilden sich Exsudate und irreguläre oder atrophe Blutgefäße aus [49]. Befunde die dem Erscheinungsbild bei Patienten mit einer HR entsprechen. [74–76]

Auf molekularer Ebene ist das Komplementsystem im dTGR-Modell auf Grundlage der durchgeführten Untersuchungen als ätiologischer Faktor auszuschließen. Eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der HR scheint hingegen dem RAS zuzukommen. Man weiß bereits, dass ein erhöhter Blutdruck wesentlich zur Schädigung der retinalen Gefäße bei einer HR beiträgt [77]. Intakte retinale Gefäße sind jedoch die Voraussetzung für die Versorgung des Nervengewebes der Netzhaut mit Metaboliten und Sauerstoff.

Wenn diese Gefäße nun im Zuge der HR ihre Integrität verlieren, so müsste das im Umkehrschluss zum neuronalen Tod führen. Des Weiteren entspricht die Aktivierung des Atr1 in der GCL einer vermehrten Stimulation der RGC durch AngII [77]. Dies könnte eine Erklärung für den RGC-Verlust sein, zumal bereits von der DR bekannt ist, dass hohe AngII-Spiegel das Nervengewebe in Form einer Desintegration von Synapsen pathologisch verändern [77].

#### **4.4. Mausmodell für chronisch zerebrale Hypoperfusion**

##### **4.4.1. Morphologische Veränderungen in der Retina von Mäusen mit chronisch zerebraler Hypoperfusion**

Das untersuchte Modell der bilateralen zerebralen Hypoperfusion war phänotypisch durch einen Verlust der OPL gekennzeichnet. Andere strukturell lichtmikroskopisch sichtbare Veränderungen konnten nicht festgestellt werden.

Der Verlust der OPL wurde gleichfalls von anderen Arbeitsgruppen in ähnlichen Modellen für Ratten und Mäuse beschrieben [74][75][78]. So sahen Barnett et al [74], dass die Dicke der OPL 7 Tage nach Reduktion der retinalen Blutzufuhr durch eine bilaterale Obstruktion der A. carotis communis bei Wistar-Ratten geringfügig zunimmt. Diese Veränderung wurde dabei nicht durch eine Bildung von pyknotischen Zellen oder einer Zellschwellung begleitet. Farkas et al [75] beschreiben insbesondere eine Veränderung der Synapsenbereiche, wobei neben der INL, in der im untersuchten Modell keine Veränderungen zu sehen waren, vor allem auch die OPL betroffen ist. Manocherian et al [78], die die Auswirkungen von chronisch zerebraler Hypoperfusion durch bilaterale Obstruktion der Arteria carotis communis auf die Retina von Mäusen untersuchten, sahen einen nahezu kompletten Untergang der OPL und eine Ausdünnung der INL. Die retinalen Zellschichten waren dünner und hochgradig ungeordnet mit pyknotischen Zellen zwischen den einzelnen Zellschichten [78]. Abweichend von diesen Befunden sind lediglich die Ergebnisse von Lavinsky et al [76]. Ratten mit 1-monatiger bilateraler zerebraler Hypoperfusion und mit durch den Eingriff erloschenem Pupillenreflex zeigten keine Veränderung der OPL wider den vorherrschend beschriebenen Veränderungen im Hypoperfusionsmodell [74][75][78].

Morphologisch werden in allen Nagetiermodellen dieser Art immer wieder Veränderungen in der GCL diskutiert. Farkas et al [75] beschreiben einen Verlust der

RGC bei Ratten mit chronischer Hypoperfusion, der bei diesen Tieren gleichzeitig mit einem Verlust des Pupillenreflexes gekoppelt war. Beobachtet wurde diese Veränderung ab einer Woche nach Hypoperfusion, die 90 Tage nach Hypoperfusion am offensichtlichsten wurde. Yamamoto et al [79] betrachteten die Veränderungen in der Zellzahl in der RGCL zu verschiedenen Zeitpunkten und kamen zu dem Erkenntnis, dass es 3, 6 und 25 Stunden nach Drosselung der zerebralen Blutzufuhr keine Veränderung in der Zellzahl gibt. Jedoch ist die Zahl der RGC eine Woche nach verringerter zerebraler Blutzufuhr reduziert [79]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Veränderung der RGC nicht betrachtet, da der Fokus auf der Betrachtung von Veränderungen synaptischer Verbindungen lag. Vorangehende Untersuchungen an diesem Modell zeigen jedoch ausbleibende Veränderungen in der Zahl der RGC [80]. Da allerdings die RGC die am meisten vulnerablen Strukturen für ischämische Zustände sind [81] und Veränderungen im Stratum ganglionare nachweislich in ähnlichen Nagetiermodellen auftreten [75][76][79], sollte auch das hier untersuchte Modell genauer auf diese Veränderungen, gegebenenfalls mit optimierter Methodik, geprüft werden.

Relevant für die morphologischen Veränderungen in Tiermodellen mit bilateraler zerebraler Hypoperfusion scheinen vor allem der Untersuchungszeitpunkt und die Kontinuität der Minderdurchblutung zu sein. In den Untersuchungen von Yamamoto et al [79] werden strukturelle Veränderungen erst nach einer Woche Hypoperfusion evident. Die Exposition einer Minderdurchblutung mit der Dauer von einem Tag genügt in diesem Modell nicht, um mikroskopisch sichtbare Veränderungen erkennen zu können. Des Weiteren betrachteten Barnett et al [74] in ihrem Rattenmodell zur bilateralen zerebralen Hypoperfusion zum einen die Veränderungen an der Netzhaut nach 7-tägiger Hypoperfusion und zum anderen Tiere mit transienter Obstruktion der Carotiden für 45 Minuten. Dabei zeigten sich lediglich Veränderungen bei den Tieren, die einer permanenten Hypoperfusion exponiert waren [74].

#### **4.4.2. Synapsenverlust in der Retina von Mäusen mit zerebraler Hypoperfusion**

Da auf den ersten Blick auffällig war, dass die untersuchten Mäuse v.a. solche, die durch die zerebrale Hypoperfusion eine starke visuelle Funktionseinschränkung aufwiesen, einen Verlust der OPL zeigten, lag der Fokus dieser Arbeit insbesondere auf der genaueren Betrachtung der Veränderung der Areale mit hoher Synapsendichte. Im Rahmen dessen konnten eine Delokalisation präsynaptischer Proteine sowie eine Bipolarzelldegeneration nachgewiesen werden.

Diese Beobachtungen spiegeln sich auch in der Arbeit von Manocherhrian et al [78] wider. Die zerebrale Hypoperfusion in ihrem Mausmodell führte zu einer Verkürzung der Bipolarzellen mit ungeordneten Zellkörpern, -endungen und -fortsätzen, was sie als Hinweis auf eine Fotorezeptordegeneration deuteten. Zwar zeigen die Untersuchungen von Barnett et al [74] keine Veränderung der anti-PKC $\alpha$ -Immunantwort in Ratten mit zerebraler Hypoperfusion, allerdings führen die Autoren selbst auf, dass der Schaden, der durch die Hypoperfusion erzeugt wurde, geringer auszufallen scheint als in anderen Modellen.

Weiterhin konnte im Mausmodell mit chronisch bilateraler zerebraler Hypoperfusion immunhistologisch keine Cleaved Caspase-3, jedoch Caspase-3 nachgewiesen werden. Allerdings nicht in der Mausretina von funktionell stark eingeschränkten Tieren, sondern lediglich bei Mäusen, die eine geringe funktionelle Einschränkung aufwiesen. Bei ihnen ließ sich Caspase-3 in der GCL und OPL erkennen. Bei Yamamoto et al [79] zeigte sich keine Immunoreaktivität von Cleaved Caspase-3 bei Sham-operierten Ratten. Ratten mit bilateraler zerebraler Hypoperfusion hingegen wiesen ein anti-Caspase-3 positives Signal in den RGC in den äußeren retinalen Zellschichten, einschließlich der Fotorezeptoren, an Tag 1 nach Verringerung der zerebralen Blutzufuhr auf [79]. In Tieren, die eine Woche und zwei Monate nach Coil-Implantation untersucht wurden, konnten weniger anti-Caspase-3 positive Zellen in der GCL, INL oder ONL nachgewiesen werden [79]. Die meisten anti-Cleaved-3 positiven Zellen wurden 24 Stunden nach der Coil-Implantation verzeichnet [79]. Diese Beobachtungen zusammen mit den Befunden am untersuchten Mausmodell und auch die Übersichtsarbeit von Farkas et al [75] zeigen erhebliche Unterschiede in den Daten zu Antikörperfärbungen mit Apoptosemarkern. Außerdem lässt sich davon ableiten, dass auch der Untersuchungszeitpunkt ein bedeutender Einflussfaktor für das Endergebnis ist.

Trotz der hohen Variabilität in den Ergebnissen ist anzunehmen, dass die Zellen durch Apoptose untergehen. Es scheint jedoch eine bestimmte Episode zu geben, die für jedes Tier individuell unterschiedlich ist, in der Apoptose stattfindet.

#### **4.4.3. Veränderungen der Gliazellreaktivität in der Retina von Mäusen mit zerebraler Hypoperfusion**

Im untersuchten Mausmodell zeichnete sich eine deutliche Astrozytose sowie eine Aktivierung von Müllerzellen bei Mäusen ab, die eine verringerte bilaterale zerebrale

Blutzufuhr hatten. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den bisherigen Erkenntnissen im Nagetiermodell zur bilateralen zerebralen Hypoperfusion [75][76][78][79]. Ein interessanter Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass die gliale Expression von GFAP im Hippocampus direkt proportional zur Entwicklung einer neuronalen Nekrose in der CA1-Region ist [74], was einen Hinweis darauf sein könnte, dass die beobachteten zellulären Veränderungen im untersuchten Modell durch eine Nekrose gleichfalls den Prozessen im Hippocampus verursacht sein können. Andererseits sind eine aktivierte Glia kein zwingender Hinweis für eine Nekrose. Wahrscheinlicher ist es, dass auch im untersuchten Modell die Glia durch apoptotische Prozesse aktiviert werden wie es bereits für die Mausmodelle in den Arbeiten von Manochterian et al [78] und Yamamoto et al [79] beschrieben wurde.

#### **4.4.4. Pathomechanismus im Modell von Mäusen mit zerebraler Hypoperfusion**

Im untersuchten Mausmodell lag der Untersuchungsfokus auf den neuronalen Veränderungen. In der Netzhaut zeigt sich ein Verlust der OPL, der sich bei genauerer Betrachtung als isolierter Verlust von Synapsen darstellt. Man erkennt eine Caspase-3 Aktivierung, die scheinbar auf bestimmte Episoden und Zellen beschränkt ist. Außerdem sind eine Astrozytose und eine Aktivierung von Müllerzellen nachweisbar.

Analog dazu ist bekannt, dass pathologische Ereignisse, die einen ischämischen Zustand im ZNS erzeugen, die Freisetzung von exzitotoxischem Glutamat aus den Neuronen und Gliazellen verursachen [81]. Im Auge konnten erhöhte Glutamatspiegel während ischämischer Zustände im Glaskörper nachgewiesen werden [82]. Überschüssiges Glutamat wird physiologisch von Müllerzellen durch Glutaminsynthetase beseitigt [83]. In der post-ischämischen Retina ist die homöostatische Funktion der Müllerzellen wie die Glutamataufnahme, die Pufferung von Ionen und die Wasserhomöostase jedoch eingeschränkt, was zu einem neuronalen Schaden führt [81][84]. Die anhaltende Aktivierung von Gliazellen nach einer Ischämie und der Verlust einer physiologischen metabolischen Aktivität werden sekundär für den neuronalen Zelltod verantwortlich gemacht [78][81].

Es gibt Hinweise darauf, dass es eine Beteiligung des klassischen Aktivierungsweges des Komplementsystems im untersuchten Mausmodell gibt. So war bei der immunhistologischen Färbung gegen C1q die OPL stärker angefärbt als die der Kontrolltiere. [80] In einem ähnlichen Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass das

Fehlen von Gal-3 bei durch eine hypoperfusionsinduzierte Retinadegeneration signifikant die Gliazellreaktivität reduziert und ebenfalls die Fotorezeptoren, Gliazellen und die retinale Zellschichtenmorphologie vor einem Schaden schützt [78]. Über Gal-3 ist bisher bekannt, dass es als proinflammatorischer Mediator fungiert und an zahlreichen inflammatorischen Erkrankungen beteiligt ist [78]. Die Hochregulation von Gal-3 wurde bereits für mehrere retinale Pathologien beschrieben [85][86] und man nimmt an, dass es die Voraussetzung für eine Mikrogliaaktivierung infolge einer Hirnischämie ist [78]. Es bleibt jedoch weiterhin fraglich, ob und inwieweit inflammatorische Prozesse an der Entstehung der im untersuchten Modell vorgefundenen neuronalen Schäden beteiligt sind.

Ungeklärt bleibt auch, welche Rolle das RAS in der Kausalkette der Veränderungen bei bilateraler zerebraler Hypoperfusion spielt. Voruntersuchungen beruhend auf in vivo Fluoreszenzmessungen sowie in situ Flatmountuntersuchungen am in dieser Arbeit betrachteten Mausmodell zeigen eine Venendilatation und stark verkleinerte Arterien [80] und lassen darauf schließen, dass sich im Zuge einer Minderperfusion auch Veränderungen im vaskulären System herausbilden, die dem Phänotyp, der für das okuläre ischämische Syndrom beim Menschen beschrieben ist, entsprechen [76] und deuten darauf hin, dass das untersuchte Modell zumindest einige pathophysiologische Korrelate mit dem menschlichen Auge teilt.

#### **4.5. Fazit**

Diabetes mellitus führt im TetO-Modell im Vergleich zu den bisher existierenden Modellen zur DR zu frühen neuronalen Veränderungen. Diese zeigen sich in Form eines retinalen RGC-Verlustes, einer Astrozytose sowie einer Aktivierung von Müllerzellen. Diese Mechanismen unterliegen sehr wahrscheinlich Veränderungen des RAS sowie inflammatorischen Prozessen. Die ARB-Behandlung führte zu einer Verbesserung der Neurodegeneration, weshalb eine Anwendung des TetO-Modells zur Durchführung von Interventionsstudien denkbar wäre.

Hypertonie bewirkt gleich dem TetO-Modell neurodegenerative Veränderungen im dTGR-Modell. Diese umfassen ebenfalls einen RGC-Verlust, eine Astrozytose sowie eine Müllerzellaktivierung. Es gibt wiederum Hinweise auf eine Beteiligung des RAS an diesen pathologischen Veränderungen. Als Teilkomponente in der Ätiologie der im dTGR-Modell

beobachteten Veränderungen wird das Komplementsystem auf Grundlage der erhobenen Daten ausgeschlossen.

Auch eine Minderperfusion der Retina im Modell der chronisch zerebralen Hypoperfusion ist mit Veränderungen des retinalen Nervengewebes assoziiert. Im Modell kommt es zu einem Verlust der OPL, der Präsynapsen und Bipolarzellen, was sehr wahrscheinlich auf einen Apoptose bedingten Zelltod zurückzuführen ist. Ferner treten auch in diesem Modell eine Astrozytose sowie eine Aktivierung von Müllergliazellen auf. Das Modell der chronisch bilateralen zerebralen Hypoperfusion ist in seinen phänotypischen Veränderungen mit konkurrierenden Nagetiermodellen vergleichbar. Es stellt eine mögliche Grundlage zur Erforschung hypoxiebedingter retinaler Schäden z. B. als Folge einer retinalen Arterienstenose dar.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

[1] Betlejewski S. Social diseases, civilization diseases or lifestyle disease?. *Wiad Lek* 2007;60(9-10):489-92.

[2] Poh S, Mohamed Abdul RB, Lamoureux EL, Wong TY, Sabanayagam C. Metabolic syndrome and eye diseases. *Diabetes Res Clin Pract* 2016 Mar;113:86-100.

[3] World Health Organization. Global Report on Diabetes. 2016 [zitiert am 23.12.2017 von <http://www.who.int/diabetes/global-report/en/>].

[4] World Health Organization. A global brief on hypertension 2013 [zitiert am 23.12.2017 von [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/publications/global\\_brief\\_hypertension/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/en/)].

[5] Luft FC, Mervaala E, Müller DN, Gross V, Schmidt F, Park JK, Schmitz C, Lippoldt A, Breu V, Dechend R, Dragun D, Schneider W, Ganten D, Haller H. Hypertension-induced end-organ damage: A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension* 1999 Jan;33(1 Pt 2):212-8.

[6] Füchtemeier M, Brinckmann MP, Foddiss M, Kunz A, Po C, Curato C, Dirnagl U, Farr TD. Vascular change and opposing effects of the angiotensin type 2 receptor in a mouse model of vascular cognitive impairment. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015 Mar;35(3):476-84.

[7] International Council of Ophthalmology. ICO Guidelines for Diabetic Eye Care-Updated 2017. 2017 [zitiert am 14.02.2017 von <http://www.icoph.org/downloads/ICOGuidelinesforDiabeticEyeCare.pdf>].

[8] Lang GE, Lang SJ. Nicht-proliferative diabetische Retinopathie. In: Jousseaume AM. *Retinale Gefäßerkrankungen*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012:100.

[9] Jousseaume AM, Smyth N, Niessen C. Pathophysiology of diabetic macular edema. *Dev Ophthalmol* 2007;39:1-12.

[10] Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Prävention und Therapie von Netzhautkomplikationen bei Diabetes – Langfassung, 2. Auflage. Version 1. 2015 [zitiert am 14.02.2017 von [www.netzhautkomplikationen.versorgungsleitlinien.de](http://www.netzhautkomplikationen.versorgungsleitlinien.de)].

[11] Simó R, Hernández C, European Consortium for the Early Treatment of Diabetic Retinopathy (EUROCONDOR). Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. *Trends Endocrinol Metab* 2014 Jan;25(1):23-33.

[12] Stitt AW, Curtis TM, Chen M, Medina RJ, McKay GJ, Jenkins A, Gardiner TA, Lyons TJ, Hammes HP, Simó R, Lois N. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res* 2016 Mar;51:156-86.

[13] Jousseaume AM, Doehmen S, Le ML, Koizumi K, Radetzky S, Krohne TU, Poulaki V, Semkova I, Kociok N. TNF-alpha mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations. *Mol Vis* 2009 Jul 25;15:1418-28.

[14] Semeraro F, Cancarini A, dell'Omo R, Rezzola S, Romano MR, Costagliola C. Diabetic Retinopathy: Vascular and Inflammatory Disease. *J Diabetes Res* 2015;2015:582060.

[15] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001 Dec;414(6865):813-20.

[16] Kakkassery V, Winterhalter S, Jousseaume AM. Anti-VEGF inhibitors and their role in the treatment of diabetic macular oedema. *Klin Monbl Augenheilkd* 2010 Sep;227(9):701-11.

[17] Bundesverband der Augenärzte Deutschlands e.V (BVA), Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft e.V. (DOG). Leitlinie Nr. 20 Diabetische Retinopathie. 22. September 2011 [zitiert am 22.01.2018 von [www.dog.org/Leitlinie-Nr.-20-Diabetische-Retinopathie\\_.pdf](http://www.dog.org/Leitlinie-Nr.-20-Diabetische-Retinopathie_.pdf)].

[18] Bandello F, Preziosa C, Querques G, Lattanzio R. Update of intravitreal steroids for the treatment of diabetic macular edema. *Ophthalmic Res* 2014;52(2):89-96.

[19] Sjølie AK, Klein R, Porta M, Orchard T, Fuller J, Parving HH, Bilous, Chaturvedi N, DIRECT Programme Study Group. Effect of candesartan on progression and regression of retinopathy in type 2 diabetes (DIRECT-Protect 2): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2008 Oct;372(9647):1385-93.

[20] Sugimoto M, Cutler A, Shen B, Moss SE, Iyengar SK, Klein R, Folkman J, Anand-Apte B. Inhibition of EGF signaling protects the diabetic retina from insulin-induced vascular leakage. *Am J Pathol* 2013 Sep;183(3):987-95.

[21] Konstantinidis L, Guex-Crosier Y. Hypertension and the eye. *Curr Opin Ophthalmol* 2016 Nov;27(6):514-21.

[22] Bhargava M, Ikram MK, Wong TY. How does hypertension affect your eyes?. *J Hum Hypertens* 2012 Feb;26(2):71-83.

[23] Harjasouliha A, Raiji V, Garcia Gonzalez JM. Review of hypertensive retinopathy. *Dis Mon* 2017 Mar;63(3): 63-69.

[24] Wong TY, Mitchell P. The eye in hypertension. *Lancet* 2007 Feb 3;369(9559):425-35.

[25] Grosso A, Veglio F, Porta M, Grignolo FM, Wong TY. Hypertensive retinopathy revisited: some answers, more questions. *Br J Ophthalmol* 2005 Dec;89(12):1646-54.

[26] Fraser-Bell S, Symes R, Vaze A. Hypertensive eye disease: a review. *Clin Exp Ophthalmol* 2017 Jan;45(1):45-53.

[27] Chatziralli IP, Jaulim A, Peponis VG, Mitropoulos PG, Moschos MM. Brach retinal vein occlusion: treatment modalities: an update of the literature. *Semin Ophthalmol* 2014 Mar;29(2):85-107.

[28] Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft e.V. (DOG), Retinologische Gesellschaft e.V. (RG), Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e.V. (BVA). S2e-Leitlinie: Retinale arterielle Verschlüsse (RAV). 23.11.2016 [zitiert am 14.02.2017 von [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/045-013l\\_S2e\\_Retinale\\_Arterienverschluesse\\_2017-08.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/045-013l_S2e_Retinale_Arterienverschluesse_2017-08.pdf)].

[29] Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e.V. (BVA), Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG). Leitlinie Nr. 29: Anteriore ischämische Optikusneuropathie (AION). 25.07.2001 [zitiert am 14.02.2017 von <http://augeninfo.de/leit/leit29.htm>].

[30] Gaier ED, Torun N. The enigma of nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy: an update for the comprehensive ophthalmologist. *Curr Opin Ophthalmol* 2016 Nov;27(6):498-504.

[31] Kotnik K, Popova E, Todiras M, Mori MA, Alenina N, Seibler J, Bader M. Inducible transgenic rat model for diabetes mellitus based on shRNA-mediated gene knockdown. *PLoS One* 2009;4(4):e5124.

[32] Reichhart N, Crespo-Garcia S, Haase N, Golic M, Skosyrski S, Rübsam A, Herrspiegel C, Kociok N, Alenina N, Bader M, Dechend R, Strauss O, Jousen AM. The TetO rat as a new translational model for type 2 diabetic retinopathy by inducible receptor knockdown. *Diabetologia* 2017 Jan; 60(1):202-211.

[33] Day RT, Cavaglieri RC, Feliers D. Apelin retards the progression of diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013 Mar;304(6):F788-800.

[34] Xiang M, Zhou L, Macke JP, Yoshioka T, Hendry SH, Eddy RL, Shows TB, Nathans J. The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. *J Neurosci* 1995 Jul;15(7 Pt 1):4762-85.

[35] Tsai IJ, Chou CH, Yang YH, Lin WC, Lin YH, Chow LP, Lee HH, Kao PG, Liao WT, Jou TS, Tsau YK. Inhibition of Rho-associated kinase relieves C5a-induced proteinuria in murine nephrotic syndrom. *Cell Mol Life Sci* 2015 Aug;72(16):3157-71.

[36] Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al. Identification of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995 Jul;376(6535):37-43.

[37] Tardito S, Oudin A, Ahmed SU, Fack F, Keunen O, Zheng L, Miletic H, Sakariassen PØ, Weinstock A, Wagner A, Lindsay SL, Hock AK, Barnett SC, Ruppin E, Mørkve SH, Lund-Johansen M, Chalmers AJ, Bjerkvig R, Niclou SP, Gottlieb E. Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. *Nat Cell Biol* 2015 Dec;17(12):1556-68.

[38] Zhang S, Li L, Kendrick SL, Gerard RD, Zhu H. TALEN-mediated somatic mutagenesis in murine models of cancer. *Cancer Res* 2014 Sep 15; 74(18): 5311-21.

[39] Yang W, Xia Y, Cao Y, Zheng Y, Bu W, Zhang L, You MJ, Koh MY, Cote G, Aldape K, Li Y, Verma IM, Chiao PJ, Lu Z. EGFR-induced and PKC $\epsilon$  monoubiquitylation-dependent NF- $\kappa$ B activation upregulates PKM2 expression and promotes tumorigenesis. *Mol Cell* 2012 Dec 14;48(5):771-84.

[40] Pohl J, Kaminski H, Castrop H, Bader M, Himmerkus N, Bleich M, Bachmann S, Theilig F. Intrarenal renin angiotensin system revisited: role of megalin-dependent endocytosis along the proximal nephron. *J Biol Chem* 2010 Dec 31;285(53):41935-46.

[41] Whiteus C, Freitas C, Grutzendler J. Perturbed neural activity disrupts cerebral angiogenesis during a postnatal critical period. *Nature* 2014 Jan;505(7483):407-11.

[42] Zhang A, Yu H, He Y, Shen Y, Pan N, Liu J, Fu B, Miao F, Zhang J. The spatio-temporal expression of MHC class I molecules during human hippocampal formation development. *Brain Res* 2013 Sep;1529:26-38.

[43] Kueper T, Grune T, Prah S, Lenz H, Welge V, Biernoth T, Vogt Y, Muhr GM, Gaemlich A, Jung T, Boemke G, Elsässer HP, Wittern KP, Wenck H, Stäb F, Blatt T. Vimentin is the specific target in skin glycation. Structural prerequisites, functional consequences, and role in skin aging. *J Biol Chem* 2007 Aug 10;282(32):23427-36.

[44] Leung BK, Balleine BW. Ventral pallidal projections to mediodorsal thalamus and ventral tegmental area play distinct roles in outcome-specific Pavlovian-instrumental transfer. *J Neurosci* 2015 Mar 25;35(12):4953-64.

- [45] Kapuralin K, Curlin M, Mitrečić D, Kosi N, Schwarzer C, Glavan G, Gajovic S. STAM2, a member of the endosome-associated complex ESCRT-0 is highly expressed in neurons. *Mol Cell Neurosci* 2015 Jul;67:104-15.
- [46] Takenaka N, Yasuda N, Nihata Y, Hosooka T, Noguchi T, Aiba A, Satoh T. Role of the guanine nucleotide exchange factor in Akt2-mediated plasma membrane translocation of GLUT4 in insulin-stimulated skeletal muscle. *Cell Signal* 2014 Nov;26(11):2460-9.
- [47] Amerik A, Sindhi N, Hochstrasser M. A conserved late endosome-targeting signal required for Doa4 deubiquitylating enzyme function. *J Cell Biol* 2006 Dec;175(5):825-35.
- [48] Nadal-Nicolás, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martinéz I, Salinas-Narvarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009 Aug;50(8):3860-8.
- [49] Reichhart N, Haase N, Crespo-Garcia S, Skosyrski S, Herrspiegel C, Kociok N, Fuchshofer R, Dillinger A, Poglitsch M, Müller DN, Jousen AM, Luft FC, Strauß O. Hypertensive retinopathy in a transgenic angiotensin-based model. *Clin Sci (Lond)* 2016 Jul 1;130(13):1075-88.
- [50] Sergio Crespo-Garcia, Nadine Reichhart, Sergej Skosyrski, Marco Foddis, Jim Wu, Aleksandar Figura, Christina Herrspiegel, Martina Füchtemeier, Celeste Sassi, Ulrich Dirnagl, Antonia M Jousen, Olaf Strauß. "Individual and temporal variability of the retina after chronic bilateral common carotid artery occlusion". Akzeptiert bei *PlosOne* (2018).
- [51] Sherry DM, Wang MM, Bates J, Frishman LJ. Expression of vesicular glutamate transporter 1 in the mouse retina reveals temporal ordering in development of rod vs. cone and ON vs. OFF circuits. *J Comp Neurol* 2003 Oct 27;465(4):480-98.
- [52] Dordea AC, Bray MA, Allen K, Logan DJ, Fei F, Malhotra R, Gregory MS, Carpenter AE, Buys ES. An open-source computational tool to automatically quantify immunolabeled retinal ganglion cells. *Exp Eye Res* 2016 Jun;147:50-6.
- [53] Stradleigh TW, Ishida AT. Fixation strategies for retinal immunohistochemistry. *Prog Retin Eye Res* 2015 Sep;48:181-202.
- [54] Lai AK, Lo AC. Animal models of diabetic retinopathy: summary and comparison. *J Diabetes Res* 2013;2013:106594.

- [55] Kern TS, Barber AJ. Retinal ganglion cells in diabetes. *J Physiol* 2008 Sep 15;586(18):4401-8.
- [56] Ng DS, Chiang PP, Tan G, Cheung CG, Cheng CY, Cheung CY, Wong TY, Lamoureux EL, Ikram MK. Retinal ganglion cell neuronal damage in diabetes and diabetic retinopathy. *Clin Exp Ophthalmol* 2016 May;44(4):243-50.
- [57] Agardh E, Bruun A, Agardh CD. Retinal glial cell immunoreactivity and neuronal cell changes in rats with STZ-induced diabetes. *Curr Eye Res* 2001 Oct;23(4):276-84.
- [58] Rungger-Brändle, Dosso AA, Leuenberger PM. Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000 Jun; 41(7):1971-80.
- [59] Wheeler-Schilling TH, Kohler K, Sautter M, Guenther E. Angiotensin II receptor subtype gene expression and cellular localization in the retina and non-neuronal ocular tissues of the rat. *Eur J Neurosci* 1999 Oct;11(10):3387-94.
- [60] Benicky J, Hafko R, Sanchez-Lemus E, Aguilera G, Saavdera JM. Six commercially available angiotensin II AT1 receptor antibodies are non-specific. *Cell Mol Neurobiol* 2012 Nov;32(8):1353-65.
- [61] Ghattas A, Lip PL, Lip GY. Renin-angiotensin blockade in diabetic retinopathy. *Int J Clin Pract* 2011 Feb; 65(2):113-6.
- [62] Wilkinson-Berka JL. Angiotensin and diabetic retinopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38(5-6):752-65.
- [63] Reichenbach A, Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Wiedemann P, Bringmann A. Müller cells as players in retinal degeneration and edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007 May;245(5):627-36.
- [64] Schey KL, Wang Z, L Wenke J, Qi Y. Aquaporins in the eye: Expression, function, and roles in ocular disease. *Biochim Biophys Acta* 2014 May;1840(5):1513-1523.
- [65] Cabrera CL, Wagner LA, Schork MA, Bohr DF, Cohan BE. Intraocular pressure measurement in the conscious rat. *Acta Ophthalmol Scand* 1999 Feb; 77(1):33-6.
- [66] Batenburg WW, Verma A, Wang Y, Zhu P, van den Heuvel M, van Veghel R, Danser AH, Li Q. Combined renin inhibition/(pro)renin receptor blockade in diabetic retinopathy-a study in transgenic (mREN2)27 rats. *PLoS One* 2014 Jun 26;9(6):e100954.
- [67] de Lannoy LM, Danser AH, Bouhuizen AM, Saxena PR, Schalekamp MA. Localization and production of angiotensin II in the isolated perfused rat heart. *Hypertension* 1998 May;31(5):1111-7.

[68] Zou LX, Imig JD, Hymel A, Navar LG. Renal uptake of circulating angiotensin II in Val5-angiotensin II infused rats is mediated by AT1 receptor. *Am J Hypertens* 1998 May;11(5):570-8.

[69] Li XC, Zhuo JL. In vivo regulation of AT1a receptor-mediated intracellular uptake of [125I]Val5-ANG II in the kidneys and adrenals of AT1a receptor-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008 Feb;294(2):F293-302.

[70] Wilkinson-Berka JL, Agrotis A, Deliyanti D. The retinal renin-angiotensin system: roles of angiotensin II and aldosterone. *Peptides* 2012 Jul;36(1):142-50.

[71] Karpha M, Lip GV. The pathophysiology of target organ damage in hypertension. *Minerva Cardioangiol* 2006 Aug;54(4):417-29.

[72] Coban E, Nizam I, Topal C, Akar Y. The association of low-grade systemic inflammation with hypertensive retinopathy. *Clin Exp Hypertens* 2010;32(8):528-31.

[73] Sumida T, Naito AT, Nomura S, Nakagawa A, Higo T, Hashimoto A, Okada K, Sakai T, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee JK, Minamino T, Offermanns S, Noda T, Botto M, Kobayashi Y, Morita H, Manabe I, Nagai T, Shiojima I, Komuro I. Complement C1q-induced activation of  $\beta$ -catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling. *Nat Commun* 2015 Feb 26;6:6241.

[74] Barnett NL, Osborne NN. Prolonged bilateral carotid artery occlusion induces electrophysiological and immunohistochemical changes to the rat retina without causing histological damage. *Exp Eye Res* 1995 Jul;61(1):83-90.

[75] Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 2007 Apr;54(1):162-80.

[76] Lavinsky D, Arterni NS, Achaval M, Netto CA. Chronic bilateral common carotid artery occlusion: a model for ocular ischemic syndrome in the rat. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006 Feb;244(2):199-204.

[77] Kurihara T, Ozawa Y, Nagai N, Shinoda K, Noda K, Imamura Y, Tsubota K, Okano H, Oike Y, Ishida S. Angiotensin II type 1 receptor signaling contributes to synaptophysin degradation and neuronal dysfunction in the diabetic retina. *Diabetes* 2008 Aug;57(8):2191-8.

[78] Manoucherian O, Arnér K, Deierborg T, Taylor L. Who let the dogs out?: detrimental role of Galectin-3 in hypoperfusion-induced retinal degeneration. *J Neuroinflammation* 2015 May14;12:92.

- [79] Yamamoto H, Schmidt-Kastner R, Hamasaki DI, Yamamoto H, Parel JM. Complex neurodegeneration in retina following moderate ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion in Wistar rats. *Exp Eye Res* 2006;82(5):767-79.
- [80] Figura AE. Retinale Gefäßveränderungen im Modell der bilateralen cerebralen Hypoperfusion. Bachelorarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Bachelor of Science. Klinik für Augenheilkunde, Abteilung Experimentelle Ophthalmologie Campus Virchow Klinikum Berlin 2014;2014:20.
- [81] Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 2004 Jan;23(1):91-147.
- [82] Izumi Y, Hammerman SB, Kirby CO, Benz AM, Olney JW, Zorumski CF. Involvement of glutamate in ischemic neurodegeneration in isolated retina. *Vis Neurosci* 2003 Mar-Apr;20(2):97-107.
- [83] Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 2006 Jul;25(4):397-424.
- [84] Wang QP, Jammoul F, Duboc A, Gong J, Simonutti M, Dubus E, Craft CM, Ye W, Sahel JA, Picaud S. Treatment of epilepsy: the GABA-transaminase inhibitor, vigabatrin, induces neuronal plasticity in the mouse retina. *Eur J Neurosci* 2008 Apr;27(8):2177-87.
- [85] Uehara F, Ohba N, Ozawa M. Isolation and characterization of galectins in the mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 Sep;42(10):2164-72.
- [86] Canning P, Glenn JV, Hsu DK, Liu FT, Gardiner TA, Stitt AW. Inhibition of advanced glycation and absence of galectin-3 prevent blood-retinal barrier dysfunction during short-term diabetes. *Exp Diabetes Res* 2007;2007:51837.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christina Herrspiegel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung zur Neurodegeneration in Ratten mit Diabetes mellitus, Hypertonie und Mäusen mit chronisch cerebraler Hypoperfusion“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Christina Herrspiegel hatte folgenden Anteil an den unten aufgeführten Publikationen:

**Publikation 1:** Reichhart N, Crespo-Garcia S, Haase N, Golic M, Skosyrski S, Rübsam A, Herrspiegel C, Kociok N, Alenina N, Bader M, Dechend R, Strauss O, Jousen AM. The TetO rat as a new translational model for type 2 diabetic retinopathy by inducible receptor knockdown. *Diabetologia* 2017; 60(1):202-211.

### Beitrag im Einzelnen:

- Strukturelle Analyse der Retina von TetO-Ratten und Wildtypen
- Quantifizierung der retinalen Ganglienzellen bei TetO-Ratten und Wildtypen, Neufärbung der WT-, TetO- und TetO+LO-Sagittalschnitte mit HE und Aufnahme der Bilder zur Abbildung in der Publikation; daraus haben sich die Abbildungen sowie das Balkendiagramm in 1f entwickelt.
- Etablierung der immunhistologischen Färbungen zur Untersuchung der Gliazellreaktivität mit anti-GFAP, anti-Glutaminsynthetase für TetO, TetO+LO und den WT; Durchführung der immunhistologischen Färbungen sowie Aufnahme der Bilder mittels ApoTome; daraus sind die Abbildungen in 3b und c entstanden.

**Publikation 2:** Reichhart N, Haase N, Crespo-Garcia S, Skosyrski S, Herrspiegel C, Kociok N, Fuchshofer R, Dillinger A, Poglitsch M, Müller DN, Jousen AM, Luft FC, Strauß O. Hypertensive retinopathy in a transgenic angiotensin-based model. *Clin Sci (Lond)* 2016;130(13):1075-88.

### Beitrag im Einzelnen:

- Morphologische Analyse von HE gefärbten Retinasagittalschnitten von dTGR und WT
- Etablierung der Zählmethode zur Erhebung der retinalen Ganglienzellzahl und Quantifizierung der RGC-Zahl bei dTGR und WT; teilweise Neueinfärbung der Sagittalschnitte mit HE und Aufnahme der Bilder; daraus resultierten die Abbildungen in 2A und das Balkendiagramm in 2B.
- Etablierung der immunhistologischen Färbung mit anti-GFAP und anti-GFAP-Vimentin für Sagittalschnitte des Nervus opticus und der Netzhaut von dTGR und Sprague-Dawley-Ratten; Durchführung der immunhistologischen Färbungen und Aufnahme der Bilder mittels ApoTome; daraus entstand das Bildmaterial für die Abbildungen in 3.

- Testung des VEGF-A-Antikörpers zur immunhistologischen Anwendung an Paraffinschnitten der Retina von dTGR und von Sprague-Dawley-Ratten und Testaufnahmen mit dem ApoTome; die Ergebnisse dieser Experimente und Analysen sind in die Abbildungen in 5A eingeflossen.
- Testung von anti-aktiviertem AT1-R zur immunhistologischen Anwendung an Paraffinschnitten der Retina von dTGR und von Sprague-Dawley-Ratten und Testaufnahmen mit dem ApoTome; die Ergebnisse dieser Experimente und Analysen sind in die Abbildungen in 7C eingegangen.

**Publikation 3:** Sergio Crespo-Garcia, Nadine Reichhart, Sergej Skosyrski, Marco Foddis, Jim Wu, Aleksandar Figura, Christina Herrspiegel, Martina Fächtemeier, Celeste Sassi, Ulrich Dirnagl, Antonia M Jousen, Olaf Strauß. "Individual and temporal variability of the retina after chronic bilateral common carotid artery occlusion". Akzeptiert bei PlosOne (2018).

Beitrag im Einzelnen:

- Analyse der Retinaarchitektur hinsichtlich morphologischer Veränderungen an HE-gefärbten Retinasagittalschnitten
- Durchführung der immunhistologischen Färbungen mit anti-VGLUT1 und anti-PKC-alpha sowie mit anti-GFAP-Vimentin; die Ergebnisse zu den genannten Färbungen finden sich im Bildmaterial der Publikation wieder, was im Manuskript den Abbildungen 4E sowie 5A und C entspricht.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Vollständige Publikationsliste**

Sergio Crespo-Garcia, Nadine Reichhart, Sergej Skosyrski, Marco Foddis, Jim Wu, Aleksandar Figura, Christina Herrspiegel, Martina Füchtemeier, Celeste Sassi, Ulrich Dirnagl, Antonia M Jousen, Olaf Strauß. "Individual and temporal variability of the retina after chronic bilateral common carotid artery occlusion". Akzeptiert bei PlosOne (2018).

Shalchi Z, Okada M, Bruynseels A, Palethorpe D, Yusuf A, Hussain R, Herrspiegel C, Scazzarriello A, Habib A, Amin R, Rajendram R. Effect of glycosylated hemoglobin on response to ranibizumab therapy in diabetic macular edema: real-world outcomes in 321 patients. Online publiziert im Can J Ophthalmol am 16 Dezember 2017.

Reichhart N, Crespo-Garcia S, Haase N, Golic M, Skosyrski S, Rübsam A, Herrspiegel C, Kociok N, Alenina N, Bader M, Dechend R, Strauss O, Jousen AM. The TetO rat as a new translational model for type 2 diabetic retinopathy by inducible receptor knockdown. Diabetologia 2017; 60(1):202-211.

Reichhart N, Haase N, Crespo-Garcia S, Skosyrski S, Herrspiegel C, Kociok N, Fuchshofer R, Dillinger A, Poglitsch M, Müller DN, Jousen AM, Luft FC, Strauß O. Hypertensive retinopathy in a transgenic angiotensin-based model. Clin Sci (Lond) 2016;130(13):1075-88.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen meinen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danke ich Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe das Thema erarbeiten zu dürfen sowie für die gute Betreuung und Unterstützung während meiner gesamten Zeit als Doktorandin.

Herzlichst danke ich Dr. med. Nadine Reichhart für die Mitbetreuung und Begleitung meiner Promotion und ihre unermüdliche Hilfe.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die ich während meiner Promotion kennengelernt habe.

Zudem gilt auch ein großer Dank meiner Familie, Freunden und all denjenigen, denen ich in diesen Jahren begegnet bin und die mich auf meinem Weg begleitet haben.