

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

DISSERTATION

Molekularbiologische Charakterisierung der murinen Retina nach
bilateraler Okklusion der Arteria carotis communis

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Jim Wu
aus Karlsruhe

Datum der Promotion: 17.09.2021

Vorwort

Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Rahmen der folgenden Arbeit veröffentlicht:

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 (BCCAO). *PLoS One*. 2018;13(3):e0193961. doi:10.1371/journal.pone.0193961

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Tabellenverzeichnis | IV |
| Abbildungsverzeichnis | V |
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| Abstract - Deutsch | X |
| Abstract - Englisch | XI |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Anatomie der Retina | 1 |
| 1.2 Blutversorgung der Retina | 2 |
| 1.3 Retinale Mikroglia | 2 |
| 1.3.1 Mikroglia - Neuroinflammation | 3 |
| 1.3.2 Polarisierung der Mikroglia – M1/M2-Paradigma | 4 |
| 1.4 Angiogenetische Wachstumsfaktoren: VEGF-A, VEGF-B, PIGF, PDGF | 5 |
| 1.4.1 VEGF-A: Ligand von Flt1 und VEGFR2 | 5 |
| 1.4.2 VEGF-B und PIGF: Liganden von Flt1 | 5 |
| 1.4.3 PDGF (Platelet Derived Growth Factor) | 6 |
| 1.4.4 Rezeptoren der angiogenetischen Wachstumsfaktoren (VEGF) | 7 |
| 1.5 Komplementsystem | 8 |
| 1.5.1 Komplementsystem im ZNS und der Retina | 9 |
| 1.5.2 Synaptic Pruning | 9 |
| 1.6 Vascular Remodelling | 10 |
| 1.7 Retinale Hypoperfusion - Ocular Ischemic Syndrome (OIS) | 11 |
| 1.8 Das Tiermodell der bilateralen Stenose der CCA – Bilateral Common Carotid Artery Occlusion (BCCAO) | 12 |
| 1.9 Bisherige Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zur BCCAO | 13 |
| 1.10 Zielsetzung | 15 |
| 2 Methoden | 17 |
| 2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte | 17 |
| 2.2 Tiermodell der Bilateral Common Carotid Artery Occlusion (BCCAO) | 18 |
| 2.3 Versuchsaufbau | 19 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.4 | Methodik der qPCR | 20 |
| 2.4.1 | Isolierung der Retina..... | 20 |
| 2.4.2 | RNA-Isolation..... | 20 |
| 2.4.3 | Analyse der RNA-Menge und Qualität - Nanodrop Massenspektrophotometer | 21 |
| 2.4.4 | cDNA-Synthese (reverse Transkription)..... | 21 |
| 2.4.5 | Primer | 22 |
| 2.4.6 | Quantitative Real-Time-PCR | 23 |
| 2.4.7 | Auswertung..... | 25 |
| 2.4.8 | Statistische Analyse der qPCR-Ergebnisse..... | 26 |
| 2.4.9 | Agarose-Gelelektrophorese | 27 |
| 2.4.10 | Schmelzkurvenanalyse..... | 28 |
| 2.5 | Immunhistochemische Verfahren | 29 |
| 2.5.1 | Morphometrische Analyse der Retina in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung | 29 |
| 2.5.2 | Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz..... | 29 |
| 2.5.3 | Quantifizierung der Mikroglia in der Iba1-Färbung | 31 |
| 3 | Ergebnisse | 33 |
| 3.1 | Gelelektrophorese und Schmelzkurvenanalyse | 33 |
| 3.2 | Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) | 36 |
| 3.2.1 | Einfluss der BCCAO auf die Expression von Genen der Angiogenese..... | 36 |
| 3.2.2 | Einfluss der BCCAO auf die Expression von Genen der Inflammation | 39 |
| 3.2.3 | Einfluss der BCCAO auf die Expression von Genen des Komplementsystems..... | 40 |
| 3.2.4 | Einfluss der BCCAO auf die Expression von Genen der Synaptogenese..... | 41 |
| 3.3 | Strukturveränderungen der Retina nach BCCAO | 42 |
| 3.4 | Infiltration der Retina durch Mikroglia/Makrophagen 6 Wochen nach BCCAO .. | 43 |
| 3.5 | Untersuchungen der Proteinexpression von Renin, C1q, C3 und PIGF mittels indirekter Immunfluoreszenz 6 Wochen nach BCCAO | 46 |
| 4 | Diskussion | 49 |
| 4.1 | BCCAO als Modell der moderaten Hypoperfusion | 49 |
| 4.2 | Morphologische Veränderungen der Retina nach BCCAO | 49 |
| 4.3 | Erhöhte Anzahl an mononukleären Phagozyten nach BCCAO | 51 |
| 4.4 | Genexpressions-Profil nach BCCAO | 52 |
| 4.4.1 | Genexpression von Inflammationsmarkern | 53 |
| 4.4.2 | Genexpression von angiogenetischen Wachstumsfaktoren..... | 53 |
| 4.4.3 | Genexpression von C1q, C3 und Properdin | 56 |
| 4.4.4 | Genexpression von synaptischen Adhäsionsproteinen | 57 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.4.5 | Renin-Angiotensin-System | 57 |
| 4.5 | Diskussion der Methodik | 58 |
| 4.5.1 | Validität der murinen BCCAO | 58 |
| 4.5.2 | Hohe interindividuelle Variabilität der Ergebnisse | 58 |
| 4.5.3 | Diskussion der qPCR..... | 59 |
| 4.5.4 | Weitere Bemerkungen zur Durchführung der qPCR | 60 |
| 4.5.5 | Immunhistochemische Untersuchung der Retina | 61 |
| 4.6 | Ausblick..... | 62 |
| 5 | Literaturverzeichnis | 65 |
| | Eidesstattliche Versicherung | 78 |
| | Anteilerklärung an erfolgten Publikationen..... | 79 |
| | Lebenslauf | 80 |
| | Publikationsliste..... | 82 |
| | Danksagung..... | 83 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Geräte | 17 |
| Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien | 17 |
| Tabelle 3: Puffer und Lösungen | 18 |
| Tabelle 4: Kits | 18 |
| Tabelle 5: Bestandteile des Qiagen RNeasy Mini Kit | 20 |
| Tabelle 6: Primersequenzen der qPCR-Experimente | 23 |
| Tabelle 7: Zusammensetzung der qPCR-Reaktion mit QuantiTect SYBR Green Mastermix..... | 24 |
| Tabelle 8: Zusammensetzung der qPCR-Reaktion mit QuantiNova SYBR Green Mastermix..... | 24 |
| Tabelle 9: Temperaturprofil der qPCR unter Verwendung von QuantiTect SYBR Green | 25 |
| Tabelle 10: Temperaturprofil der qPCR unter Verwendung von QuantiNova SYBR Green | 25 |
| Tabelle 11: Antikörper der Immunfluoreszenz | 30 |
| Tabelle 12: Bestand der Versuchstiere der Genexpressionsanalyse | 36 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines retinalen Sagittalschnittes einer C57/Bl6-Maus | 1 |
| Abbildung 2: Illustration der BCCAO | 12 |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Microcoils (Sawane Spring Company, Japan)..... | 12 |
| Abbildung 4: Schema des Versuchsaufbaus des gesamten Projektes | 14 |
| Abbildung 5: Schema des Versuchsaufbaus dieser Arbeit..... | 19 |
| Abbildung 6: Beispielhafte Messung mit Nanodrop-Spektrometer | 21 |
| Abbildung 7: Auswahl des statistischen Testverfahrens..... | 26 |
| Abbildung 8: Beispielhafte Schmelzkurve einer spezifischen qPCR-Reaktion..... | 28 |
| Abbildung 9: Gelelektrophorese der qPCR-Produkte..... | 34 |
| Abbildung 10: Schmelzkurvenanalyse in Rotorgene Q Series Software (Qiagen, DE). .. | 35 |
| Abbildung 11: Genexpressionsanalyse mittels qPCR von Genen der Angiogenese..... | 38 |
| Abbildung 12: Genexpressionsanalyse mittels qPCR von Genen der Inflammation. | 39 |
| Abbildung 13: Genexpressionsanalyse mittels qPCR von Genen des Komplementsystems. | 40 |
| Abbildung 14: Genexpressionsanalyse mittels qPCR von Genen des Synaptogenese..... | 41 |
| Abbildung 15: Strukturveränderungen 6 Wochen nach BCCAO | 42 |
| Abbildung 16: Verlust der outer plexiform layer in der „schwer betroffenen“ BCCAO-Gruppe nach 6 Wochen..... | 43 |
| Abbildung 17: Beispielhafter Vergleich eines Sham-Tieres (links) und eines „schwer betroffenen“ Tieres (rechts) im Sagittalschnitt. Iba1-Färbung. | 44 |
| Abbildung 18: Mikrogliazelle in ihrer amöboiden Form..... | 45 |
| Abbildung 19: „Schwer betroffene“ Tiere wiesen eine erhöhte Zahl an Mikroglia/Makrophagen im Vergleich zu Sham-Tieren auf..... | 45 |
| Abbildung 20: Immunhistochemische Untersuchung von Renin, C1q, C3 und PIGF. | 48 |
| Abbildung 21: Sämtliche untersuchte Gene dieser Arbeit..... | 52 |
| Abbildung 22: Wirkmechanismen von VEGF..... | 53 |
| Abbildung 23: Potenzielle therapeutische Ansätze im BCCAO-Modell | 62 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|--|
| ACE | angiotensin converting enzyme |
| AMD | altersbedingte Makuladegeneration |
| Ang I/II | Angiopoietin I/II |
| AT1R | Angiotensin-Rezeptor 1 |
| BCCAO | Bilateral Common Carotid Artery Occlusion |
| BM | bone marrow |
| BRB | Blut-Retina-Schranke |
| BSA | bovine serum albumin |
| C | Komplementfaktor |
| CBF | zerebrale Blutflussgeschwindigkeit (engl. cerebral blood flow) |
| CCA | Arteria carotis communis |
| CCL2/MCP-1 | CC-chemokine-ligand-2/monocyte chemoattractant protein-1 |
| CD | cluster of differentiation |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CR | Komplementfaktor-Rezeptor |
| CRVO | central retinal vein occlusion |
| CX3CL1 | chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 |
| CX3CR1 | chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 |
| DAG1 | Dystroglycan |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| ECA | Arteria carotis externa |
| EDTA | ethylenediaminetetraacetic acid |
| EGFP | enhanced green fluorescent protein |
| ELM | äußere Grenzmembran (engl. external limiting membrane) |
| ERG | Elektroretinogramm |
| FAG | Fluoreszenzangiographie (engl. fluorescein angiography) |
| Flt1 (VEGFR1) | fms-related tyrosine kinase 1 |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GCL | Ganglienzellschicht (engl. ganglion cell layer) |

| | |
|------------------|---|
| gDNA | genomische Desoxyribonukleinsäure |
| GOI | Zielgen (engl. gene of interest) |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HIF | hypoxia-inducible factor |
| Iba1 | ionized calcium-binding adapter molecule 1 |
| ICA | Arteria carotis interna |
| IL | Interleukin |
| ILM | innere Grenzmembran (engl. inner limiting membrane) |
| ILR | Interleukin-Rezeptor |
| INL | innere Körnerschicht (engl. inner nuclear layer) |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MHC-II | major histocompatibility complex - II |
| MP | mononukleärer Phagozyt |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| N | Anzahl |
| NFL | Nervenfaserschicht (engl. nerve fiber layer) |
| Nlgn | Neuroigin |
| Nrxn | Neurexin |
| OCT | optical coherence tomography |
| OIS | ocular ischemic syndrome |
| ONH | optic nerve head |
| ONL | äußere Körnerschicht (engl. outer nuclear layer) |
| OPL | äußere plexiforme Schicht (engl. outer plexiform layer) |
| OS | Außensegmente der Photorezeptoren (engl. outer segment) |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline) |
| PDGF-A/B | platelet derived growth factor – A/B |
| PDGFR-A/B | platelet derived growth factor receptor – A/B |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PIGF | placental growth factor |
| qPCR | quantitative polymerase chain reaction |
| RAS | Renin-Angiotensin-System |
| RGC | retinale Ganglienzellen (engl. retinal ganglion cell) |
| RNase | Ribonuklease |

| | |
|-------------------------------|---|
| RPE | retinales Pigmentepithel |
| SEM | standard error of the mean |
| sFlt1 | soluble fms-related tyrosine kinase 1 |
| SLO | scanning laser ophthalmoscopy |
| TBS | tris buffered saline |
| TNFα | Tumornekrosefaktor alpha |
| VEGF-A/B | vascular endothelial growth factor – A/B |
| VEGFR | vascular endothelial growth factor receptor |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

Abstract - Deutsch

Hintergrund: Die vaskuläre Demenz ist eine Folge der chronischen zerebralen Hypoperfusion. Im Gegensatz zur sofortigen Nekrose kommt es zu progressiven neurodegenerativen Schäden. Es ist anzunehmen, dass es in der Retina zu einer ähnlichen Dynamik kommt, welche die Sehfähigkeit beeinträchtigt. Das Mausmodell der BCCAO (Bilateral Common Carotid Artery Occlusion) umfasst die bilaterale Okklusion der Arteria carotis communis mittels Metallfedern mit der Absicht eine chronische Hypoperfusion der Retina und des Gehirns zu bewirken. Schwerpunkt der Arbeit war die histologische und molekularbiologische Charakterisierung der Retina 6 Wochen nach Implantation der Microcoils, um ein Verständnis über die Pathomechanismen zu erlangen.

Methodik: 6 Wochen nach Implantation der Microcoils in C57BL/6J- und MacGreen-Mäusen wurde die Retina entnommen und mittels immunhistochemischer Methoden (HE-Färbung im Sagittalschnitt, Immunfluoreszenz auf Iba1, C1q, C3, PIGF, Renin) und quantitativer PCR analysiert. Untersucht wurden im Rahmen der qPCR Marker der Angiogenese (VEGF-A/B, PIGF, Flt1, sFlt1, Ang I, PDGF-A, PDGFR-A/B), der Inflammation (IL1 β , TNF α , CD68, IL4R, CCL2), Komplementfaktoren (C1q, C3, Properdin) und synaptische Adhäsionsproteine (Nrxn1a/b, Nrxn3a, Nlgn1/2, DAG).

Ergebnisse: 6 Wochen nach BCCAO kam es in der Retina zu einem Verlust der OPL (Synapsen) sowie zu einem erhöhten Vorkommen an Mikrogliazellen/Makrophagen. Es wurde eine Erhöhung der Genexpression von Markern der Angiogenese (VEGF-A, PIGF, Flt1, sFlt1, PDGFR-B), Zytokinen der Inflammation (IL1 β , CD68, CCL2) und Komplementfaktoren (C1q, C3) beobachtet.

Schlussfolgerung: Es bestehen Hinweise, dass die retinalen Schäden nach BCCAO durch Mikroglia/Makrophagen, Komplementfaktoren (C1q, C3) und angiogenetische Wachstumsfaktoren (VEGF-A, PIGF) vermittelt werden.

Abstract - Englisch

Background: Chronic cerebral hypoperfusion commonly results in vascular dementia. In contrast to necrotic cell death, progressive neurodegenerative damage occurs. It is possible that similar dynamics take place in the retina resulting in impaired vision. The mouse model of BCCAO (bilateral common carotid artery occlusion) utilizes metal springs in order to obtain a chronic hypoperfusion of the retina and the brain. The focus of this work was the histological and molecular characterization of the retina 6 weeks after BCCAO in an attempt to understand the pathomechanisms underlying the retinal degeneration.

Methods: 6 weeks after implantation of microcoils in C57BL/6J and MacGreen mice, the retina was removed and analyzed by immunohistochemical methods (HE staining of retinal sagittal sections, immunofluorescence for Iba1, C1q, C3, PIGF, renin) and quantitative PCR. qPCR was used to investigate markers of angiogenesis (VEGF-A/B, PIGF, Flt1, sFlt1, Ang I, PDGF-A, PDGFR-A/B), inflammation (IL1 β , TNF α , CD68, IL4R, CCL2), complement factors (C1q, C3, properdin) and synaptic adhesion proteins (Nrxn1a/b, Nrxn3a, Nlgn1/2/, DAG).

Results: 6 weeks after BCCAO, a loss of the OPL (synapses) and an increased number of microglial cells/macrophages were observed. An increased gene expression of markers of angiogenesis (VEGF-A, PIGF, Flt1, sFlt1, PDGFR-B), cytokines of inflammation (IL1 β , CD68, CCL2) and complement factors (C1q, C3) was detected.

Conclusion: We hypothesize that the retinal damage after BCCAO is mediated by microglial cells/macrophages, complement factors (C1q, C3) and angiogenic growth factors (VEGF-A, PIGF).

1 Einleitung

1.1 Anatomie der Retina

Die innerste Schicht des Auges, die Retina, entsteht aus einer Ausstülpung des Hirnbläschens (Prosencephalon) und ist Teil des zentralen Nervensystems. Sie kann in fünf Schichten unterteilt werden. Von außen (Chorioidea) nach innen (in Richtung Glaskörper): Das Licht wird in der außen liegenden Photorezeptorenschicht (PR) in elektrische Signale umgewandelt. Die Photorezeptoren liegen mit ihren Außensegmenten dem retinalen Pigmentepithel an, welches die Netzhaut von der Chorioidea trennt. Letztere stellt die Blutversorgung der äußeren Netzhaut sicher. Die Zellkerne der Photorezeptoren befinden sich in der äußeren Körnerschicht (engl. outer nuclear layer, ONL). Die Photorezeptoren bilden Synapsen mit Bipolar- und Horizontalzellen aus. Die Synapsenschicht wird als äußere plexiforme Schicht (engl. outer plexiform layer, OPL) bezeichnet. Die Zellkerne der Amakrin-, Bipolar- und Horizontalzellen befinden sich in der inneren Körnerschicht (engl. inner nuclear layer, INL). Bipolar- und Amakrinzellen bilden wiederum Synapsen mit den retinalen Ganglienzellen (engl. retinal ganglion cells, RGC). Diese Synapsen befinden sich in der inneren plexiformen Schicht (engl. inner plexiform layer, IPL). Die retinalen Ganglienzellen liegen in der Ganglienzellschicht (engl. ganglion cell layer, GCL). Die Axone der RGC bilden schließlich den optischen Nerv.

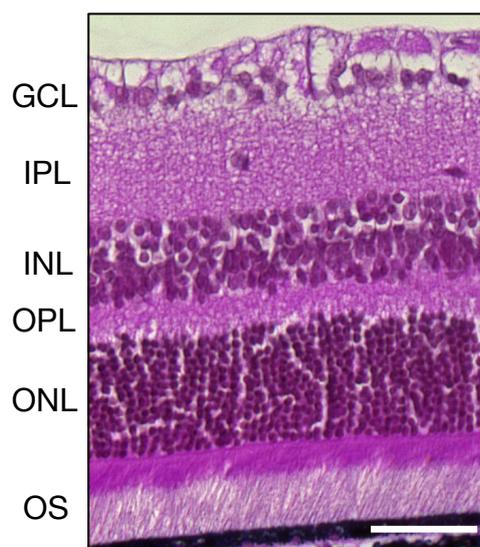


Abbildung 1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines retinalen Sagittalschnittes einer C57/Bl6-Maus
Photorezeptorenschicht (OS), äußere Körnerschicht (ONL), äußere plexiforme Schicht (OPL), innere Körnerschicht (INL), innere plexiforme Schicht (IPL), Ganglienzellschicht (GCL). Skalierungsbalken = 50µm. Das Präparat wurde von der Arbeitsgruppe bereitgestellt [1].

1.2 Blutversorgung der Retina

Die Arteria carotis communis (engl. common carotid artery, CCA) stellt die zerebrale als auch retinale Blutversorgung sicher. Sie teilt sich in die Arteria carotis externa (engl. external carotid artery, ECA) und Arteria carotis interna (engl. internal carotid artery, ICA) auf. Aus letzterer entspringt die Arteria ophthalmica. Diese versorgt die Retina über zwei Systeme: Die innere Retina bezieht ihre Blutversorgung über die retinale Zentralarterie, welche entlang des Nervus opticus verläuft. Versorgt werden GCL, IPL und ein Teil der INL. Die Gefäße sind in drei Ebenen lokalisiert: Der superficial plexus befindet sich in der NFL, der intermediate plexus an der inneren Grenze der INL und der deep plexus an der äußeren Grenze der INL. Die äußere Retina wird aus der Chorioidea versorgt. Deren Versorgung stammt aus der posterioren Ziliararterie. Versorgt werden INL, OPL, ONL und Photorezeptoren [2].

1.3 Retinale Mikroglia

Das Augeninnere unterscheidet sich hinsichtlich seiner streng regulierten Immunabwehr vom Rest des Körpers. Das sogenannte Immunprivileg des Auges bewahrt das empfindliche Gewebe vor überschießenden Immunreaktionen [3]. Daran beteiligt sind unter anderem die Blutretinaschranke (BRB), ein immunsuppressives Milieu und Mikrogliazellen [4]. Die Blutretinaschranke ist eine Barriere, welche den Übertritt bestimmter Substanzen aus der Chorioidea verhindert. Die innere Blut-Retina-Schranke wird von Endothelzellen gebildet, die äußere BRB von retinalen Pigmentepithelzellen (RPE). Bei der Mikroglia handelt sich um lokale mononukleäre Phagozyten (MP), die während der embryologischen Entwicklung in das ZNS einwandern und dort getrennt vom systemischen Immunsystem verbleiben [5,6]. Es existieren verschiedene Subsets von Mikroglia, die sich in ihrer Lokalisation, Morphologie und Proteinexpression unterscheiden [7].

Ihre Aufgaben gehen weit über die Immunabwehr hinaus. Mikrogliazellen sind beteiligt an der Aufrechterhaltung einer Homöostase, Wundheilung und Beseitigung von Zelltrümmern. Sie besitzen Rezeptoren für Chemokine, Zytokine, Komplementfaktoren und Antikörper. Ähnlich dendritischer Zellen können sie Antigene über MHC-II-Rezeptoren präsentieren [8,9].

In der Retina sind Mikrogliazellen physiologisch in zwei Ebenen lokalisiert: oberflächlich in der IPL, RGC und NFL und tiefergelegen in der OPL [10,11]. In der adulten Retina stehen Mikrogliazellen in den beiden plexiformen Schichten (IPL & OPL) in unmittelbarem Kontakt mit Axonen, Dendriten und Synapsen der Neurone [12]. Mikrogliazellen sind unter physiologischen Bedingungen notwendig für den strukturellen und funktionellen Erhalt der Synapsen [13].

1.3.1 Mikroglia - Neuroinflammation

Im unstimulierten Zustand liegen Mikrogliazellen in der ramifizierten Form vor. Sie sind morphologisch durch einen kleinen runden Zellkörper und dünne Ausläufer charakterisiert. Diese Zellen kommunizieren über Ausläufer mit umgebenden Neuronen und anderen Gliazellen, präsentieren für T-Zellen (MHC-II) und überwachen ihre Umgebung permanent [14,15]. Während in der Vergangenheit der Begriff „resting“ (ruhende) Mikroglia für den ramifizierten Zustand verwendet worden ist, wird mittlerweile der Begriff „surveillant“ (überwachende) bevorzugt, um die ständige Aktivität der Mikroglia zu betonen [16].

Nach Aktivierung - etwa durch neuronale Inflammation, LPS, Ischämie, oxidativen Stress, Zytokine oder Thrombin - nehmen die ramifizierten Zellen eine amöboide Form an und migrieren zu betroffenen Arealen. Diese Zellen weisen einen runden Zellkörper auf und sind zur Phagozytose fähig [17,18].

Diese initiale Aktivierung der Mikroglia kann neuroprotektiv wirken und zur Regeneration des Gewebes beitragen. Eine persistierende Aktivierung kann jedoch zur Neurodegeneration führen, indem es zur ständigen Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen kommt. Dieser Prozess wird als Neuroinflammation bezeichnet [19].

Während inflammatorischer Zustände ist eine Infiltration durch systemische Monozyten möglich, welche die Blut-Retina-Schranke überqueren und einen Mikroglia-ähnlichen Phänotypen annehmen (BM (Bone Marrow) derived microglia) [20,21].

Diese Zellen sind von der residenten Mikroglia morphologisch nicht zu unterscheiden und exprimieren ähnliche Marker (Iba1, CD68, CD11b, CD45, etc.) [21,22]. Da in der vorliegenden Arbeit methodisch nicht zwischen den beiden Zellpopulationen unterschieden werden konnte, wird im Folgenden der Begriff mononukleärer Phagozyt (MP) verwendet. Eine Unterscheidung von Mikroglia und Makrophagen ist prinzipiell möglich, jedoch technisch aufwendig [22].

1.3.2 Polarisation der Mikroglia – M1/M2-Paradigma

Phänotypisch lassen sich Makrophagen nach ihrem funktionellen Zustand in M1- oder M2-Makrophagen einordnen. Es existieren klassische, proinflammatorische Zellen, M1-Makrophagen genannt, und alternative, antiinflammatorische Zellen, welche als M2-Makrophagen bezeichnet werden [23].

Der M1-Zustand ist durch Produktion von proinflammatorischen Molekülen gekennzeichnet und M1-Makrophagen sind beispielsweise bei der Immunantwort während akuter Infektionen beteiligt. Es handelt sich unter anderem um Interleukin 1 beta (IL-1 β), Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interleukin 6 (IL-6) und Stickstoffmonoxid (NO). Eine Aktivierung erfolgt unter anderem über TNF α , Interferon alpha (INF α) und LPS. M2-Makrophagen werden unter anderem durch Interleukin 4 (IL-4), Interleukin 10 (IL-10), Interleukin 13 (IL-13) und Glukokortikoide aktiviert. Sie sind durch die Sekretion von antiinflammatorischen Molekülen charakterisiert. Hierzu zählen Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra), IL-4 und Interleukin 10 (IL10). Dieser Phänotyp spielt eine Rolle in der Wundheilung und der Angiogenese und weist eine erhöhte phagozytotische Aktivität auf [24–26].

Es handelt sich bei der Klassifikation in M1- und M2-Makrophagen um eine Vereinfachung, die auf In-vitro-Versuchen basiert und aufgrund seiner Anschaulichkeit herangezogen wird [27]. In vivo gestaltet sich die Aktivierung der Zellen komplexer und das jeweilige Genexpressionsprofil der Zellpopulation ist abhängig vom Kontext und den Signalen aus der Umgebung. Es wird diskutiert, dass Makrophagen einen Zustand auf einem Spektrum zwischen M1 und M2 einnehmen [24,26,28].

Es ist unklar inwieweit sich das M1/M2-Konzept auf Mikrogliazellen übertragen lässt. In der bestehenden Literatur wird die Klassifikation zum Teil auch für Mikrogliazellen übernommen [29]. Es wird jedoch auch versucht Mikrogliazellen stattdessen über ihre Funktion und ihren Aktivierungszustand zu definieren [30].

Weitere Marker der Neuroinflammation/MP sind unter anderem CCL2, CD68 und Iba1. CC-chemokin-ligand-2 (CCL2), auch bekannt als monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), ist ein Teil der CC-Chemokine. Aktivierte Mikroglia stellen eine Hauptquelle von CCL2 im ZNS dar [31,32]. Der Rezeptor CCR2 ist auf den meisten Monozyten exprimiert und initiiert eine Migration in Richtung des Liganden CCL2 [33,34]. CD68 (in Mäusen Macrosialin genannt) ist ein lysosomales Protein, das von mononukleären Phagozyten exprimiert wird [35].

Ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1), auch bekannt als allograft inflammatory factor (AIF), wird im ZNS spezifisch von Mikroglia auf der Membran und im Zytoplasma exprimiert und findet Einsatz bei immunhistochemischen Färbungen [36].

1.4 Angiogenetische Wachstumsfaktoren: VEGF-A, VEGF-B, PlGF, PDGF

Die Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Familie umfasst die angiogenetischen Wachstumsfaktoren VEGF-A/B/C/D und PlGF. Diese VEGF-Isoformen binden an die membranständigen Rezeptoren VEGFR1-3 und den löslichen Rezeptor sVEGFR1 (sFlt1) [37,38]. Im Rahmen dieser Arbeit waren die Isoformen VEGF-A/B und PlGF und die Rezeptoren VEGFR1/2 und sFlt1 von Interesse, da diese an der Angiogenese und der Inflammation beteiligt sind. VEGF-C/D und VEGFR3 sind hingegen bedeutsam für lymphatische Gefäße [39].

1.4.1 VEGF-A: Ligand von Flt1 und VEGFR2

VEGF-A ist der prominenteste angiogenetische Wachstumsfaktor und führt zur Proliferation und Migration von Endothelzellen, Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen, Vasodilatation und Rekrutierung von Makrophagen und Granulozyten [38]. Die Expression von VEGF-A wird induziert durch Hypoxie (abhängig von HIF), Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und Tumorsuppressorgene [40]. VEGF-A bindet an Flt1 und VEGFR2, aber bindet mit höherer Affinität an Flt1. Unabhängig davon ist die Tyrosinkinaseaktivität von VEGFR2 der Hauptmechanismus der proangiogenetischen Wirkung [41,42].

VEGF-A nimmt des Weiteren eine zentrale Rolle in der Entwicklung von vaskulären retinalen Erkrankungen ein, etwa durch Bildung von retinalen und chorioidalen Neovaskularisationen [43].

1.4.2 VEGF-B und PlGF: Liganden von Flt1

1.4.2.1 VEGF-B

VEGF-B ist am Erhalt von Blutgefäßen beteiligt, nicht jedoch an der Neubildung [44]. VEGF-B^{-/-}-Mäuse zeigen keine Auffälligkeiten in der retinalen Vaskulatur [45]. VEGF-B

Einleitung

zeigt einen antiapoptotischen Effekt auf Neurone in der Retina in Mausmodellen von ophthalmologischen Neurodegenerationen und Ischämien [46].

1.4.2.2 PIGF

Placental growth factor (PIGF) wirkt als Mediator der Angiogenese und Inflammation. Es wird physiologisch während der Embryogenese exprimiert und stimuliert das Wachstum und die Reifung von Gefäßen [47]. Im gesunden adulten Zustand ist die Expression von PIGF gering, jedoch kommt es in pathologischen Zuständen wie Inflammation, Wundheilung oder Karzinomen zu einer Hochregulation [48,49].

Eine erhöhte PIGF-Expression konnte bei Patienten mit AMD, diabetischer Retinopathie und retinalem Zentralvenenverschluss beobachtet werden [50–52]. Erhöhte PIGF-Spiegel im Auge führen im Tierexperiment zu pathologischen retinalen Gefäßneubildungen und zum Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke wie es für die diabetische Retinopathie typisch ist [47,53,54].

PIGF bindet spezifisch an Flt1 und kann hierdurch eine Rekrutierung von mononukleären Phagozyten bewirken [55,56]. In chronisch inflammatorischen Zuständen wie der Atherosklerose oder Karzinomen kann PIGF durch Rekrutierung von Makrophagen und T-Zellen zu einem degenerativen Schaden führen [57]. MP exprimieren durch PIGF vermittelt vermehrt pro-inflammatorische Zytokine [58].

In der Therapie von retinalen Erkrankungen stellt PIGF ein potenzielles Target dar, da es durch die Inhibition zu keiner Beeinträchtigung von gesundem Gewebe kommt [59].

1.4.3 PDGF (Platelet Derived Growth Factor)

PDGF ist beteiligt an der Angiogenese, Proliferation von mesenchymalen Zellen, Chemotaxis, Wundheilung und Embryogenese. Die PDGF-Familie ist mit der VEGF-Familie verwandt. Zur PDGF-Familie gehören PDGF-A/B/C/D. PDGF ist ein Dimer und die Untereinheiten bilden verschiedene Isoformen: PDGF-AA (PDGF-A), -BB (PDGF-B) und -AB. Die Rezeptoren sind PDGFRA (bindet PDGF-A/-B) und PDGFRB (bindet PDGF-B). PDGF wird unter anderem von Thrombozyten, Smooth Muscle Cells, Makrophagen und Endothelzellen produziert [60].

1.4.4 Rezeptoren der angiogenetischen Wachstumsfaktoren (VEGF)

1.4.4.1 VEGFR2

VEGF-A übt seine pro-angiogenetische Wirkung primär über eine Bindung an VEGFR2, auch fetal liver kinase 1 (Flk1) genannt, aus. Eine Bindung von VEGF-A an VEGFR2 bewirkt ein starkes pro-angiogenetisches Signal im Vergleich zu Flt1 (VEGFR1). VEGF-B oder PlGF binden nicht an VEGFR2 [38,61].

1.4.4.2 Flt1 (VEGFR1)

VEGFR1, auch fms related tyrosine kinase 1 (Flt1) genannt, bindet VEGF-A, VEGF-B und PlGF [38]. Zur Bedeutung von Flt1 existieren verschiedene Erklärungsansätze. So wird zum einen angenommen, dass Flt1 als Decoy-Rezeptor dient, da die Bindung von VEGF-A nur zu einer geringen Aktivität der Tyrosin-Kinase führt. Eine VEGF-A/Flt1-Bindung führt somit zu einer Reduzierung des pro-angiogenetischen Effekts [62,63].

PlGF oder VEGF-B können durch kompetitive Bindung an Flt1 dazu führen, dass VEGF-A vermehrt an VEGFR2 (bindet nur VEGF-A) bindet, wodurch ein synergistischer, pro-angiogenetischer Effekt entsteht [62,64]. Des Weiteren fördert die PlGF/Flt1-Bindung die Sensibilität von VEGFR2 für VEGF-A [64].

1.4.4.3 Mononukleäre Phagozyten und Flt1

Mononukleären Phagozyten exprimieren Flt1 und eine Bindung durch die Liganden VEGF-A und PlGF führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung [65–67]. Eine Aktivierung von Flt1 ist bedeutend für die Regulation von Inflammation. In einem Tiermodell der rheumatoiden Arthritis kam es nach Deletion der Tyrosinkinase-Domäne von Flt1 zu einer Inhibition der Makrophagenaktivität. Phagozytose und die Sekretion von VEGF-A und IL6 waren verringert [68]. Luttun et al. beschrieben, dass anti-Flt1-Antikörper zu einer geringeren Mobilisierung von myeloischen Stammzellen und einer geringeren Leukozyteninfiltration von entzündetem Gewebe führt. In Tiermodellen der Arthritis und der Atherosklerose konnte somit die Krankheitsprogression reduziert werden [69].

1.4.4.4 sFlt1

sFlt1 (soluble fms related tyrosine kinase) ist die lösliche Variante von Flt1 mit anti-angiogener Wirkung [37]. Er dient als Decoy-Rezeptor und bindet mit hoher Affinität PlGF

Einleitung

und VEGF-A/B und führt zu deren Inhibition [70,71]. Beteiligt ist sFlt1 unter anderem bei der Avaskularität der Cornea [72].

1.5 Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein Teil der angeborenen Immunabwehr und besteht aus über 30 Proteinen im Plasma und auf Zelloberflächen [73,74]. Eine bedeutende Funktion ist die Abwehr von Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, etc.) durch Mechanismen wie Opsonierung, Zellyse und Chemotaxis. Ferner ist das Komplementsystem an degenerierenden sowie regenerierenden Prozessen beteiligt. Aktiviert wird das Komplementsystem durch eine proteolytische Kaskade, die über drei aktivierende Wege initiiert werden kann: den klassischen, den alternativen und den Lektin-Weg. Alle drei Wege führen schließlich zur Aktivierung der C3-Konvertase. Der klassische Weg wird über die Bindung von C1q an einen Antigen-Antikörper-Komplex initiiert und führt über Proteolyse von C4 und C2 zur Aktivierung der C3-Konvertase (C4bC2a-Konvertase). Der alternative Weg läuft über spontane Hydrolyse von C3 ab (C3bBb-Konvertase). Der Lektin-Weg wird über die Bindung von mannose binding lektin (MBL) aktiviert (C4bC2a-Konvertase). Die C3-Konvertase spaltet C3 in C3a und C3b. Die Spaltung von C3 führt außerdem zur Bildung der C5-Konvertase, welche die Bildung des TCC (terminal complement complex oder auch MAC, membrane attack complex) aus C5b-C9 initiiert. Dies führt zur Zellyse der eindringenden Krankheitserreger [73,74].

Zwei wichtige Aktivatorproteine sind C1q und Properdin. C1q ist das initiiierende Protein der klassischen Komplementkaskade und bindet an Immunkomplexe [73]. Das Aktivatorprotein Properdin ist in der Lage die C3-Konvertase des alternativen Pathways (C3bBb) zu stabilisieren. Es fördert die Anlagerung von C3b an den Faktor B und inhibiert die über Faktor H vermittelte Spaltung von C3b durch Faktor I. Des Weiteren kann Properdin direkt auf mikrobiellen Oberflächen binden und somit die Aktivierung des alternativen Komplementsystems fördern [75].

Das Komplementsystem besteht aus einer Vielzahl an Regulator-Proteinen, welche die Zahl der Komplementfaktoren übersteigt. Dies verdeutlicht die Bedeutung eines engmaschig regulierten Komplementsystems, da eine unkontrollierte Aktivierung zu Inflammation und Autoimmunerkrankungen führen kann [74].

1.5.1 Komplementsystem im ZNS und der Retina

Im Gehirn und der Retina werden Komplementfaktoren von Neuronen und Gliazellen exprimiert [76–78]. Wichtige Quellen stellen Mikrogliazellen und Astrozyten dar [79–81]. C3a und C5a werden als Anaphylatoxine bezeichnet und führen zu Vasodilatation, erhöhter Permeabilität der Blutgefäße, Chemotaxis von Immunzellen und Aktivierung von Makrophagen und weiteren Immunzellen. In Makrophagen können sie einen oxidativen Burst auslösen [82]. Anaphylatoxine entfalten ihre Wirkung über Bindung an die Rezeptoren C3a-Rezeptor (C3aR), C5a-Rezeptor (C5aR) und chemoattractant receptor-like protein (C5L2) [81,83].

Die Fragmente C3b und iC3b werden als Opsonine bezeichnet. iC3b ist über Opsonierung in der Lage Phagozytose durch Bindung an Rezeptoren (CR3) auf Mikrogliazellen/Makrophagen zu induzieren [84,85].

C3b fungiert als Ligand für CR1 [86]. In der Alzheimer-Demenz exprimieren aktivierte Mikrogliazellen vermehrt CR1, was mit neuronaler Degeneration durch Sekretion von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und Superoxiden verbunden ist [87].

Die pathologische Rolle des Komplementsystems in der Augenheilkunde ist bekannt. Das Auftreten der altersbedingten Makuladegeneration ist mit bestimmten Varianten diverser Komplementfaktoren wie CFH oder C3 assoziiert [88–90]. Eine hohe Expression an C3 führt zur Neurodegeneration. In der Retina führt die Transfektion eines C3-exprimierenden Adenoviruses zu einer Degeneration der Photorezeptoren und des RPE [91]. Weitere Beispiele für ophthalmologische Erkrankungen, in denen das Komplementsystem eine Rolle spielt, sind unter anderem das Glaukom, die diabetische Retinopathie und ischämische Zustände [77,81,92].

1.5.2 Synaptic Pruning

Zusätzlich ist das Komplementsystem auch an der neuronalen Entwicklung beteiligt. Postnatal kommt es zu einer Aktivitäts-abhängigen Eliminierung von Synapsen durch Mikrogliazellen. Dieser Prozess wird als Synapse Pruning bezeichnet und ist notwendig für die Ausreifung synaptischer Verbindungen durch Entfernung von überschüssig angelegten neuronalen Verknüpfungen [85,93,94]. CX3CR1-defiziente Mäuse weisen ein eingeschränktes Synapse Pruning auf, infolge dessen es zu abgeschwächten synaptischen Übertragungen und Verhaltensstörungen kommt [95].

Synaptic Pruning ist auch für die retinale Entwicklung beschrieben, während der es zur Phagozytose überschüssiger RGC durch Mikroglia kommt [96]. Vermittelt wird Synaptic

Einleitung

Pruning über die Expression von C1q durch Neurone [93,94]. Die Anreicherung von C1q an Synapsen aktiviert die klassische Komplementkaskade und führt zur Generation von C3. Es kommt zur Bildung der Spaltprodukte C3b und iC3b, welche an die Rezeptoren der Mikroglia binden und zur Phagozytose führen [85,93,94].

In einem Mausmodell des Glaukoms konnte C1q vermehrt an retinalen Synapsen festgestellt werden. Es wird die Vermutung aufgestellt, dass es durch Bildung von C3b zu einer Mikroglia-vermittelten Phagozytose der Synapsen kommt [93]. Umgekehrt führten eine C1q-Defizienz oder eine Inhibierung der Mikroglia durch Minocyclin zu Neuroprotektion [97,98].

1.6 Vascular Remodelling

Im ZNS besteht ein vaskuläres Netzwerk aus Arterien und Venen, welche überschneidende Areale versorgen. Kommt es zu einer Stenose einer Arterie, bildet sich ein hoher Druck am Weg des geringsten Widerstandes, wodurch es zu einer hohen Blutflussgeschwindigkeit und hohen Scherspannungen (engl. shear stress) kommt. Shear stress führt zur Arteriogenese, also dem strukturelle Remodelling der Gefäßwand durch Proliferation [99,100]. Vermittelt wird dieser Prozess durch Expression von Zytokinen, welche Monozyten rekrutieren (z.B. CCL2, TNF α) [101]. Makrophagen können ein proinflammatorisches Milieu erzeugen und sekretieren Wachstumsfaktoren und proinflammatorische Zytokine [102–104]. Diese Zellen tragen auf diese Weise zum Gefäßumbau bei. In Folge dessen kommt es zu einer Proliferation von Vascular Smooth Muscle Cells und Endothelzellen, was eine Zunahme des Durchmessers der Kollaterale verursacht [105,106]. Bergmann et al. beobachteten dies in einem Mausmodell der Obstruktion der Femoralisarterie. In der monozytopenischen Maus kam es zu einem verringerten Remodelling [107].

1.7 Retinale Hypoperfusion - Ocular Ischemic Syndrome (OIS)

Das Ocular Ischemic Syndrome (OIS) ist ein seltenes Krankheitsbild, das mit einem Visusverlust einhergehen kann und zumeist als Folge einer hochgradigen Stenose der Arteria carotis interna auftritt [108]. Es handelt sich um eine globale ischämische Retinopathie, die primär Menschen über 65 Jahren betrifft und auf dem Boden arteriosklerotischer Veränderungen entsteht. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein OIS auftritt, ist von dem Ausmaß der Karotisstenose und der Bildung von Kollateralen abhängig. Bei den meisten Patienten liegt der Stenosegrad über 80% [109]. Es kommt zu einer beeinträchtigten Hell-Dunkel-Adaption, die als Folge einer Störung der Photorezeptoren auftritt [110]. Fundoskopisch sind mittelperiphere retinale Hämorrhagien, dilatierte oberflächliche retinale Venen, Mikroaneurysmen, schmale retinale Arterien und Neovaskularisationen der Retina und der Iris zu beobachten [111,112].

Im Auge ist die Versorgungssituation nach Stenose der ICA abhängig von der Ausbildung der jeweiligen Kollateralvarianten. Yamamoto et al. beobachteten in Patienten mit kompletter Stenose der Arteria carotis interna, dass es zu vier Versorgungstypen kommen kann. Im Typ I kommt es über den Circulus arteriosus cerebri zu einem reverse flow der ICA, im Typ IIa kommt es über die ECA zu einem reverse flow in der Arteria ophthalmica, im Typ IIb ebenso, allerdings ohne messbaren Fluss in der Arteria retinae centralis. Im Typ III kommt es zu keinerlei Kollateralbildung [113]. Aufgrund der unterschiedlichen Versorgungsvarianten kommt es zu interindividuellen Unterschieden im Schweregrad der Erkrankung [113].

Die wichtigsten Differentialdiagnosen des OIS sind die diabetische Retinopathie und der chronische Zentralvenenverschluss (CRVO). Insbesondere letzteres Krankheitsbild ist fundoskopisch schwierig vom OIS abzugrenzen. Beim OIS und dem CRVO kommt es im Gegensatz zur diabetischen Retinopathie zu einem meist einseitigen Auftreten [114,115]. Im Gegensatz zur CRVO kommt es beim OIS nicht zum Papillenödem, außerdem befinden sich die Hämorrhagien mittelperipher [116].

Das OIS wird durch panretinale Photokoagulation therapiert [116]. Gegebenenfalls wird ein neovaskuläres Glaukom mit Betablockern oder Carboanhydrasehemmern behandelt [112]. Eine Stenose der Karotiden kann per Endarteriektomie behandelt werden. Klinische Studien ergaben, dass es zu einer Besserung oder Verhinderung der Progression der chronischen okulären Ischämie kommen kann, in dem der Blutfluss wieder zunimmt [117,118].

1.8 Das Tiermodell der bilateralen Stenose der CCA – Bilateral Common Carotid Artery Occlusion (BCCAO)

Die partielle, experimentelle Okklusion der Arteria carotis communis (CCA), bekannt als Bilateral Common Carotid Artery Occlusion (BCCAO), wurde erstmalig von Slakter et al. beschrieben [119]. In der Retina kommt es zu einer moderaten Abnahme des Blutflusses ohne nekrotischen Untergang von Zellen, wie es bei einem vollständigen Erliegen der Durchblutung der Fall wäre [120,121].

Die Durchführung der Okklusion erfolgt häufig unter Anwendung einer chirurgischen Naht zur partiellen Ligatur der CCA [122,123]. Des Weiteren existiert ein Modell, das den Einsatz einer Metallfeder aus Klaviersaite (Microcoil) vorsieht, die beidseits um die CCA gestülpt wird. Dieses Modell wurde erstmalig von Shibata et al. beschrieben [124] und dient unter anderem der Erforschung der vaskulären Demenz [125,126].

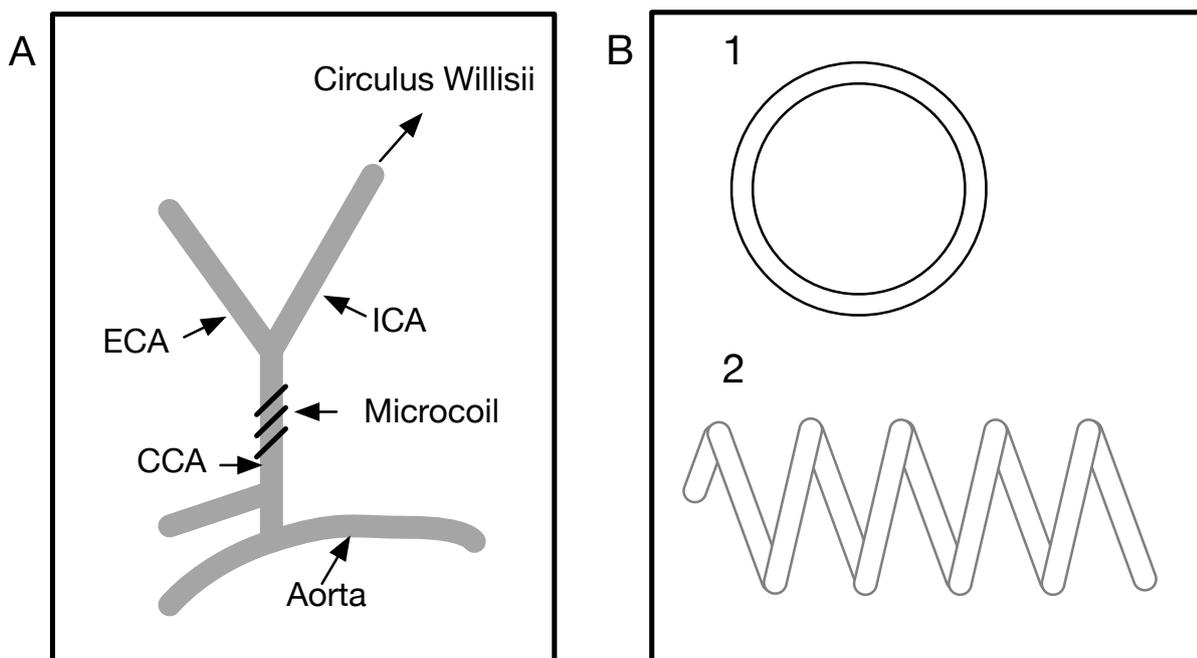


Abbildung 2: (A) Illustration der BCCAO

Schematische Darstellung der Karotisbifurkation mit anatomischer Lokalisation des Microcoils.

Abbildung 3: (B) Schematische Darstellung eines Microcoils (Sawane Spring Company, Japan).

(1) Querschnitt. Innendurchmesser 180µm, (2) Längsansicht

Das Ausmaß der Hypoperfusion ist abhängig von der Wahl des Innendurchmessers der Microcoils. Shibata et al. maßen bei C57/Bl6-Mäusen unter Einsatz von Microcoils mit 180µm Durchmesser eine akute Reduzierung des zerebralen Blutflusses (engl. cerebral blood flow, CBF) auf 70% des Ausgangswertes. Präoperative Werte wurden innerhalb eines Monats erreicht [124]. Der Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit basiert auf den

Experimenten von Füchtemeier et al. und verwendete die gleiche Methode [1,125]. Es ließ sich dabei bei C57/Bl6-Mäusen eine akute Abnahme der CBF auf ca. 50% des Ausgangswertes nach vier Stunden und ca. 70% nach 24 Stunden feststellen (Laser-Doppler-Messung). Nach drei Wochen wurden wieder präoperative Werte erreicht [125]. In den Versuchen von Füchtemeier et al. wurde zudem festgestellt, dass es durch Vascular Remodelling zu einer Zunahme des Circulus arteriosus cerebri kam [125]. Dieser ist an der Kollateralversorgung beteiligt [113]. Füchtemeier et al. stellten die Hypothese auf, dass Shear Stress im Remodelling der Kollateralversorgung eine Rolle spielt (Arteriogenese) und verwiesen auf die Beobachtungen von Buschmann et al. [104,125].

Es ist anzunehmen, dass es nach BCCAO in der Retina zu ähnlichen Veränderungen des Blutflusses kommt. Kobayashi et al. beobachteten mittels Laser-Doppler in der Wistar-Ratte einen Abfall des Blutflusses im Gehirn auf 36% und im Auge auf 26% im Vergleich zur Kontrollgruppe nach drei Stunden [123]. Hypoperfusion von Gehirn und Auge scheinen somit in einer ähnlichen Größenordnung zu liegen. Im Vergleich zum Versuchsaufbau unserer Arbeitsgruppe fällt die Hypoperfusion bei Kobayashi et al. wesentlich stärker aus, was vermutlich der Methodik geschuldet ist (Anwendung einer 3-0 Silk Ligatur ohne Gewährleistung eines Mindestdurchmessers). Trotzdem blieb die Sehfähigkeit der Tiere erhalten [123]. Im Vergleich dazu führt die Anwendung von Microcoils mit 180µm Durchmesser nur zu einer moderaten Abnahme des Blutflusses [124,125]. Dies erlaubt die Untersuchung der Auswirkungen moderater Hypoperfusion auf neuronale, kognitive und ophthalmologische Veränderungen.

Huang et al. maßen mittels Laser-Doppler 21 Tage nach BCCAO (Wistar-Ratten) einen Abfall des okulären Blutflusses auf 65% im Vergleich zur Kontrollgruppe (Nahtligatur-Methode ohne vollständige Okklusion) [127]. Sie beschrieben OIS-ähnliche Veränderungen: Nach drei Wochen kam es zur zunehmenden Dilatation und Tortuosität der retinalen Venen. Außerdem kam es zu einer Zunahme der arteriovenösen Füllungszeit und Hämorrhagien, beides ebenfalls Phänomene des OIS [127].

1.9 Bisherige Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zur BCCAO

Die vorherigen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zu den Versuchen dieser Arbeit stammen von Crespo et al. [1]. Die vorliegende Arbeit ergänzt die bisherigen Ergebnisse um ex-vivo-Methoden.

Einleitung

Abbildung 4 ist der Versuchsaufbau des gesamten BCCAO-Projektes zu entnehmen: Es wurden in wöchentlichen Abständen Elektretinogramme (ERG), Scanning-Laser-Ophthalmoscope-Untersuchungen (SLO) und Fluoreszenzangiographien (FAG) angefertigt. Es wurden zudem Untersuchungen mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) durchgeführt [1].

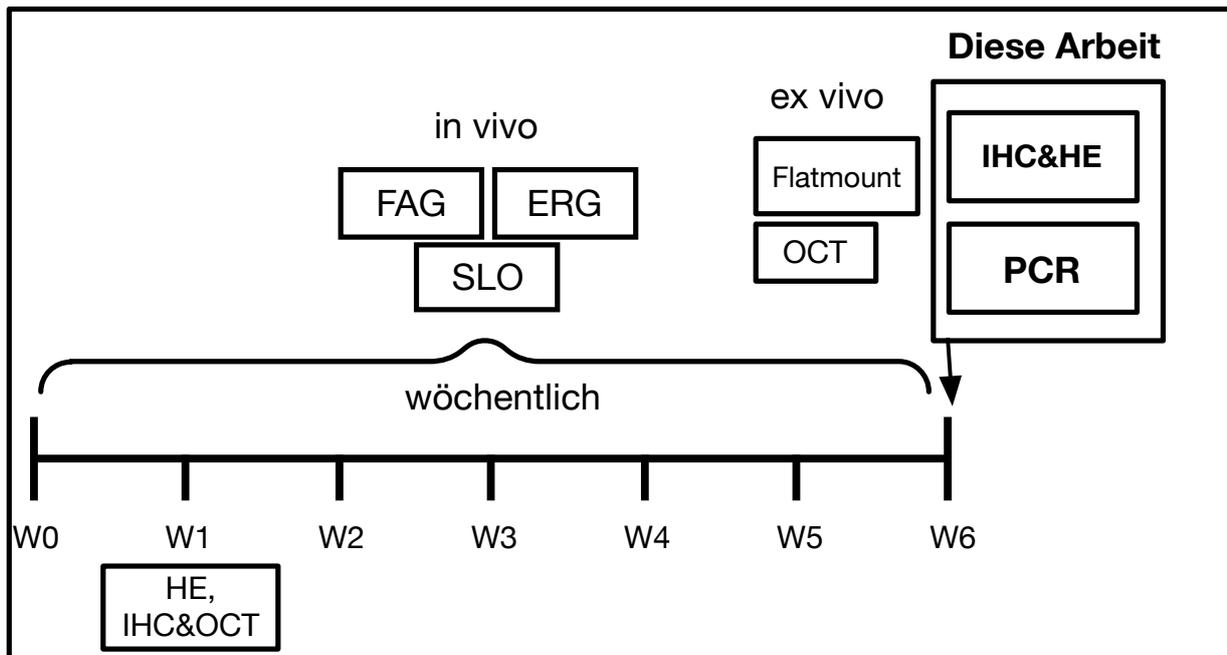


Abbildung 4: Schema des Versuchsaufbaus des gesamten Projektes [1].

Nach Einsetzen der Microcoils wurde wöchentlich mittels ERG (Elektretinogramm) die Funktion der Retina elektrophysiologisch kontrolliert (durchgeführt von Sergej Skosyrski aus unserer Arbeitsgruppe). Auf Grundlage der Ergebnisse wurde eine Einteilung der Tiere in die Betroffenheitsgrade "schwer-", "leicht-" und "nicht"-betroffen durchgeführt, da sich im Phänotyp der Tiere eine hohe Variabilität beobachten ließ. Tiere wurden der Kategorie "nicht betroffen" zugeteilt, wenn sich das ERG nicht von Sham-Tieren unterschied [1].

Die a-Welle spiegelt die Photorezeptorenfunktion wider, die b-Welle die Funktion der Bipolarzellen. „Schwer betroffene“ Tiere waren dabei von einer frühen (Woche 1) und deutlichen Abnahme der a- und b-Wellen-Amplitude gekennzeichnet. „Leicht betroffene“ Tiere zeigten eine spätere Abnahme der Amplitude (Woche 4) [1].

Unsere Arbeitsgruppe visualisierte die retinalen Veränderungen nach BCCAO mittels SLO (Scanning Laser Ophthalmoscopy) in der transgenen MacGreen-Maus (B6N.Cg-

Tg(Csf1r-EGFP)1Hume/J. Dadurch gelang die Darstellung von Csf1r-positiven Zellen in Echtzeit mit hoher Auflösung [1,128,129].

Nach Implantation kam es zu einer Akkumulation der MP um die oberflächlichen retinalen Venen. Der Zeitraum bis zur Entwicklung der Akkumulation reichte von direkt nach Implantation bis zu 3 Wochen danach. Nach 6 Wochen akkumulierten die MP um den Kopf des Sehnervs (ONH) [1]. Des Weiteren beobachtete unsere Arbeitsgruppe 3 Wochen nach BCCAO eine signifikante Erweiterung des Durchmessers der oberflächlichen retinalen Venen, welcher ex vivo (Flatmount) auf einen strukturellen Umbau der Gefäße und nicht auf einen veränderten Gefäßtonus zurückzuführen war [1].

1.10 Zielsetzung

Die BCCAO ist ein Tiermodell der chronischen, moderaten Hypoperfusion, in dessen Folge es zu einer progressiven Neurodegeneration in der Retina und im Gehirn kommt. In der Retina kommt es zu morphologischen und funktionellen Veränderungen. Crespo et al. vermuteten eine Beeinträchtigung der Synapsen, die zu elektrophysiologischen Einschränkungen der Retina führt [1]. Des Weiteren wurde eine dynamische Aktivität der MP beobachtet. Diese Zellpopulation ist an zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt.

Die vorliegende Arbeit ergänzt die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Gen- und Proteinexpression von Markern der Angiogenese, des RAS, der Inflammation, des Komplementsystems und der synaptischen Adhäsionsproteine mit der Absicht Erkenntnisse über die zugrundeliegenden molekularen Prozesse zu gewinnen, welche zu den retinalen Schäden führen. Des Weiteren wurden histologische Schnittbilder untersucht, um die bisherigen Untersuchungen von Crespo et al. zu untermauern.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Welche morphologischen Veränderungen treten in der murinen Retina 6 Wochen nach BCCAO auf?
- Wie wirkt sich die BCCAO nach 6 Wochen auf die Verteilung der mononukleären Phagozyten aus?
- Wie wirkt sich die BCCAO auf die Gen- und Proteinexpression von Markern der Angiogenese, des RAS, der Inflammation, des Komplementsystems und der synaptischen Adhäsionsproteine aus?

2 Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

| | |
|----------------------------|----------------------------|
| Elektrophorese-Vorrichtung | peq-Lab, DE |
| Feinwaage | Sartorius, DE |
| Lichtmikroskop | Carl Zeiss, DE |
| Mikroskop, Axio Imager M2 | Carl Zeiss, DE |
| Nanodrop 2000 | peq-Lab, DE |
| Pipetten | Eppendorf, DE |
| Thermocycler Rotor-Gene Q | Qiagen, DE |
| iCycler | Bio-Rad, DE |
| UV-Kamera | Bio-Rad, DE |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries, USA |
| Zentrifuge | Eppendorf, DE |

Tabelle 1: Geräte

| | |
|------------------------------|-------------------------|
| Agarose | Sigma Aldrich, USA |
| Beta-Mercaptoethanol | Sigma Aldrich, USA |
| BSA (Serumalbumin) | Sigma Aldrich, USA |
| DAPI | Sigma Aldrich, USA |
| Ethanol | J.T. Baker, USA |
| Ethidiumbromid | Sigma Aldrich, USA |
| Gel Loading Dye 6x no SDS | BioLabs, USA |
| Isopropanol | Carl Roth, DE |
| O'GeneRuler 100bp DNA Ladder | Thermo Scientific, USA |
| Primer | Eurofins Scientific, DE |
| RNA-Later | Qiagen, DE |
| RNase-freies Wasser | Qiagen, DE |
| Barrier Pen | Dako, DK |
| Fluorescence Mounting Medium | Dako, DE |
| Triton-X-100 | Carl Roth, DE |

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Methoden

| | |
|---------------------------|--------------------|
| TBS (pH 7,6) | Sigma Aldrich, USA |
| EDTA (pH 8) | Sigma Aldrich, USA |
| Paraformaldehyd in TBS 4% | Sigma Aldrich, USA |

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

| | |
|--------------------------------------|------------|
| Qiashredder | Qiagen, DE |
| Qiagen RNeasy Mini Kit | Qiagen, DE |
| QuantiTect Reverse Transkription Kit | Qiagen, DE |
| QuantiTect SYBR Green PCR Kit | Qiagen, DE |
| QuantiNova SYBR Green PCR Kit | Qiagen, DE |

Tabelle 4: Kits

2.2 Tiermodell der Bilateral Common Carotid Artery Occlusion (BCCAO)

Tierhaltung und Tötung der Versuchstiere wurden in Übereinstimmung mit den ARVO-Richtlinien (Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research) vorgenommen. Eine Genehmigung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin (Lageso Berlin) liegt vor.

Mäuse vom Stamm C57BL/6J (Charles River Erkrath, DE) und MacGreen (B6N.Cg-Tg(Csf1r-EGFP)1Hume/J [130], Eigenzüchtung) wurden eingesetzt. Die transgenen MacGreen-Mäuse exprimieren Enhanced Fluorescent Green Protein (EGFP) unter Kontrolle des Csf1r-Promoters. Das Fluoreszenzsignal wird von der retinalen Mikroglia und anderen mononukleären Phagozyten exprimiert. Dies erlaubt eine In-vivo-Beobachtung in Echtzeit in der Fundusuntersuchung mittels Scanning Laser Ophthalmoskop (SLO) (Nicht Teil dieser Arbeit).

Im Alter von zehn Wochen wurde durch Implantation von Metallfedern (Microcoils) um beide Arteriae carotides communes eine chronische Hypoperfusion induziert. Die Operationen wurden im Zentrum für Schlaganfallforschung Berlin von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ulrich Dirnagl durchgeführt. Die Haltung erfolgte bei einem 12-Stunden-Rhythmus von abwechselnd Dunkelheit und Helligkeit. Den Tieren wurde zudem freier Zugang zu Wasser und Futter gewährt (ad libidum).

2.3 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau basiert auf den Experimenten von Füchtemeier et al. und stellt ein Modell für die chronische zerebrale Ischämie dar, wie sie bei der vaskulären Demenz auftritt [125]. Hierfür wurde bilateral eine Metallfeder aus Klaviersaite (Microcoil, 180µm Innendurchmesser, Sawane Spring Company, Japan) um die Arteria carotis communis auf beiden Seiten implantiert. Bei der Kontrollgruppe (Sham) wurden Scheinoperationen durchgeführt, d.h. es wurde der Eingriff bis zur Präparation der Arteria carotis communis durchgeführt, jedoch keine Implantation des Microcoils vorgenommen. 6 Wochen nach der Intervention (teilweise 7 Tage bei HE-Färbungen) wurden die Tiere getötet, die Augen entnommen und für die quantitative PCR in flüssigem Stickstoff schockgefroren bzw. für die Durchführung der Immunhistochemie in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

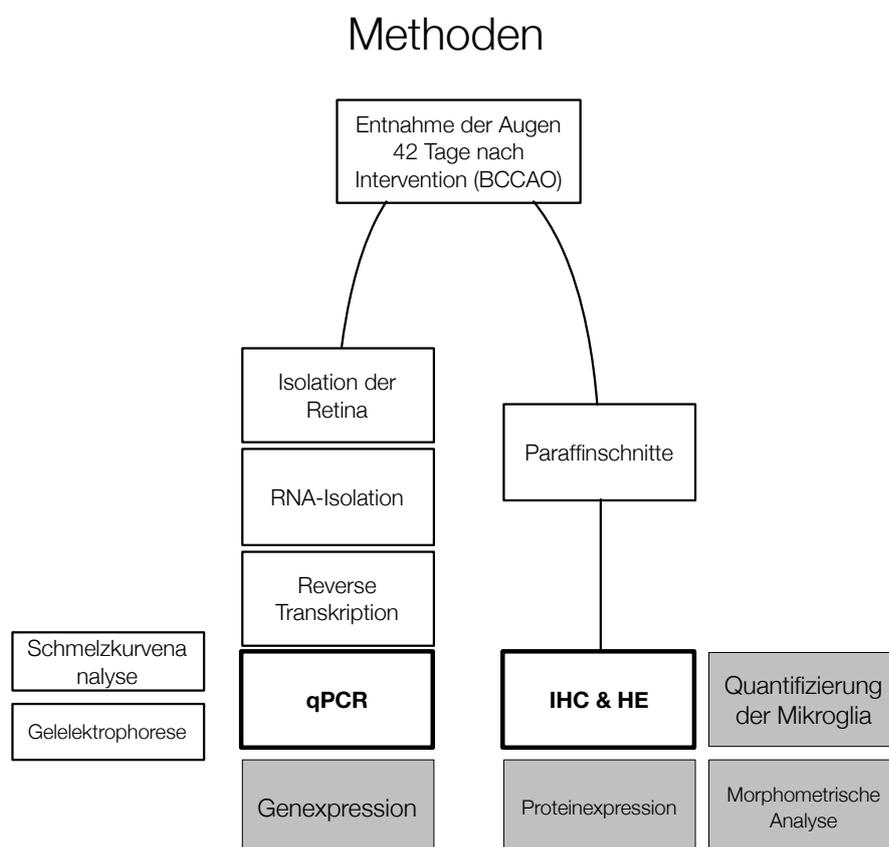


Abbildung 5: Schema des Versuchsaufbaus dieser Arbeit.

Methoden

2.4 Methodik der qPCR

2.4.1 Isolierung der Retina

Nach Entnahme der Augen wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Präparation der aufgetauten Augen erfolgte durch eine Inzision entlang der Ora Serrata und die anschließende Entfernung der Hornhaut. Nach der Entnahme der Linse wurde die Retina mithilfe eines Skalpells entnommen und in RNAlater (ThermoFisher, DE) bei 4°C maximal 48 Stunden aufbewahrt.

2.4.2 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA wurde mithilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, DE) durchgeführt. Verwendete Reagenzien sind der Tabelle zu entnehmen.

Qiashredder
RNeasy Mini Spin Column
Beta-Mercaptoethanol
Ethanol 70%
RLT-Puffer
RW1-Puffer
RPE-Puffer
RNAse-freies Wasser zur Elution

Tabelle 5: Bestandteile des Qiagen RNeasy Mini Kit

Das Gewebe wurde in $350\ \mu\text{l}$ RLT-Puffer gegeben, welcher $3,5\ \mu\text{l}$ Beta-Mercaptoethanol enthält (1%). Die Retina wurde mit Pistillen gemörsert, das Lysat anschließend auf eine Qiashredder Säule pipettiert und bei $9000\ \text{x g}$ für zwei Minuten zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und das Filtrat mit $350\ \mu\text{l}$ (1:1) 70% Ethanol vermengt. Die $700\ \mu\text{l}$ der entstandenen Lösung wurden auf ein RNeasy Mini Spin Column pipettiert und 15 Sekunden bei $9000\ \text{x g}$ zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, auf die Säule wurden $700\ \mu\text{l}$ RW1-Puffer pipettiert und anschließend 15 Sekunden bei $9000\ \text{x g}$ zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit $500\ \mu\text{l}$ RPE-Buffer wiederholt. Schließlich wurden $500\ \mu\text{l}$ RPE-Buffer pipettiert und zwei Minuten bei $9000\ \text{x g}$ zentrifugiert. Zur Elution wurden $50\ \mu\text{l}$ RNAse-freies-Wasser verwendet und bei $9000\ \text{x g}$ eine Minute zentrifugiert. Das Eluat wurde bei -80°C eingefroren.

2.4.3 Analyse der RNA-Menge und Qualität - Nanodrop

Massenspektrophotometer

Die Menge und Qualität der RNA wurden mit einem Nanodrop 2000-Spektrometer (Fisher Scientific, DE) bestimmt. Nukleinsäuren absorbieren bei 260nm. Beurteilt wurden die Verhältnisse 260nm/280nm und 260nm/230nm. Wird bei beiden Verhältnissen ein Wert von etwa 2.0 gemessen, kann von reiner RNA ausgegangen werden, Abweichungen sprechen für Kontaminationen. Zu niedrige Werte bei 260nm/280nm sprechen für Protein- oder Phenolkontamination. Bei 260nm/230nm ist analog von einer Kontamination mit Kohlenstoffen oder Alkohol auszugehen. Unterschritt der Quotient einen Wert von über 1,7, wurde die RNA verworfen. Die gemessene RNA-Konzentration nahm Werte zwischen 50ng/µl und 100ng/µl an, was bei einem Volumen von 50µl einer Gesamtmenge von 2,5µg - 5µg pro Retina entspricht.

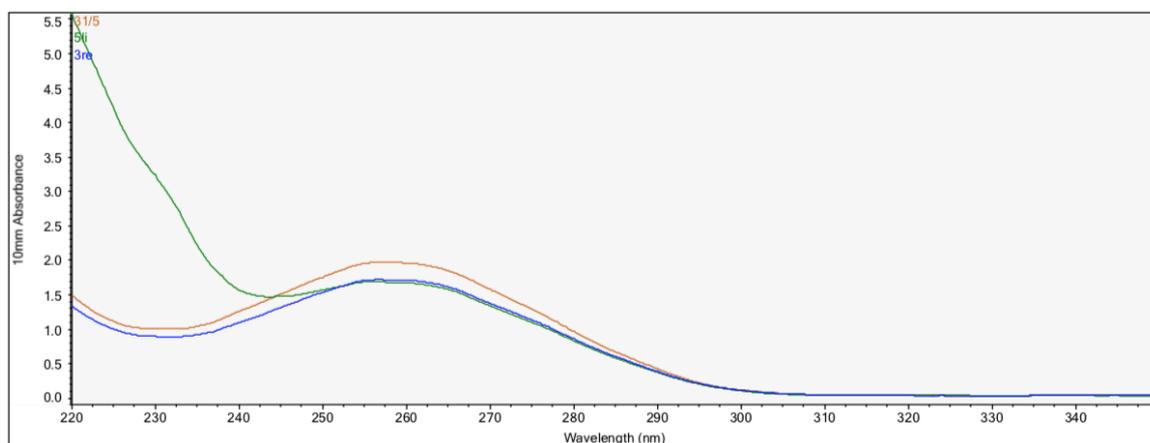


Abbildung 6: Beispielhafte Messung mit Nanodrop-Spektrometer

2.4.4 cDNA-Synthese (reverse Transkription)

Die reverse Transkription der mRNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mithilfe des Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, DE). Hierfür wurden jeweils 12µl mRNA mit 2µl gDNA Wipeout Buffer drei Minuten bei 42°C inkubiert. Hierdurch wird genomische DNA eliminiert. Verwendet wurde der iCycler (Bio-Rad, DE). Anschließend wurden jeweils 6µl Mastermix bestehend aus 1µl Primer Mix, 4µl RT-Buffer und 1µl reverser Transkriptase hinzugefügt. Das Gemisch wurde 15 Minuten bei 42°C und anschließend drei Minuten bei 95°C inkubiert. Die gewonnene cDNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf 10ng/µl verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.4.5 Primer

Die Sequenzen der Primerpaare wurden entweder direkt aus bestehenden Publikationen oder der Primer Bank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) entnommen. Zur Überprüfung der Primerpaare wurde das Programm Primer-Blast verwendet (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Wenn möglich wurden Exon-Exon-Grenzen-überspannende Primer gewählt. Eine Produktgröße des Amplifikats zwischen 100 und 200 Basenpaaren wurde akzeptiert. Bestellt wurden die Primerpaare bei Eurofins Scientific (DE). Die Spezifität der Primer wurde anhand der Amplifikationsprodukte in der Agarose-Gelelektrophorese und der Schmelzkurvenanalyse (Rotorgene Q Series Software, Qiagen DE) geprüft. Tabelle 6 sind die Primersequenzen dieser Arbeit zu entnehmen.

| Abkürzung | Gen | Forward-Sequenz 5'-3' | Reverse-Sequenz 5'-3' |
|-------------------------------------|---|-------------------------|-------------------------|
| Angiogenese | | | |
| PIGF | Placental Growth Factor | AGATCTTGAAGATTCCCCCA | TTCCCCTTGGTTTTCTCCTT |
| Flt1 | Fms Related Tyrosine Kinase 1 | AGGGTGTCTATAGGTGCCGA | ACTTCGGAAGAAGACCGCTT |
| sFlt1 | Soluble Fms Related Tyrosine Kinase 1 | GAAGACTCGGGCACCTATGC | CCGCAGTGCTCACCTCTAAC |
| VEGF-A | Vascular Endothelial Growth Factor A | CAGCTATTGCCGTCGGATTGAGA | TGCTGGCTTTGGTGAAGTTTGAT |
| VEGF-B | Vascular Endothelial Growth Factor B | GCCAGACAGGGTTGCCATAC | GGAGTGGGATGGATGATGTCA |
| PDGF A | Platelet Derived Growth Factor A | GTCCAGGTGAGGTTAGAGG | CACGGAGGAGAACAAGAC |
| PDGFR A | Platelet Derived Growth Factor Receptor A | CAAACCCTGAGACCACAATG | TCCCCAACAGTAACCCAAG |
| PDGFR B | Platelet Derived Growth Factor Receptor B | TGCCTCAGCCAAATGTCACC | TGCTCACCACCTCGTATTCC |
| Ang1 | Angiopoietin 1 | CTGATGGACTGGGAAGGGAACC | CGCAGAAATCAGCACCGTGTAG |
| Microglia & Inflammation | | | |
| IL4R | Interleukin-4 Rezeptor | GAGGGACCTGGCTTCTGATT | CCTTGATGCTCCCAGATCCA |
| CD68 | Macrosialin | AGGGTGAAGAAAGGCTTGG | ACTCGGGCTCTGATGTAGGT |
| IL-1 β | Interleukin 1 β | CATGGAATCCGTGTCTTCCT | GAGCTGTCTGCTCATTACG |
| TNF α | Tumornekrosefaktor α | CACCACCATCAAGGACTCAA | TGAGACAGAGGCAACCTGAC |
| CCL2 | Chemokinligand 2 | TCACCTGCTGCTACTCATTCA | CACTGTCACTGGTCACTCC |
| Komplementsystem | | | |
| C1q | Complement component 1q | AGAGGGGAGCCAGGAGC | CTTTCACGCCCTTCAGTCCT |
| C3 | Complement component 3 | GAGAAAAGCCCAACACCAGC | CTGGGCTGTAGTCAGTTGGG |
| | Properdin | GCCGTACCTTGCCCTGTAAA | TCCTTGAACGTGACTGCTGG |

| Synapsenproteine | | | |
|-------------------------|--|--------------------------------|------------------------------|
| Nrxn1a | Neurexin 1 α | CCCCAGCACAGCCGACCTTC | GCAAGTCGCGATAATTCCAGC CT |
| Nrxn3a | Neurexin 3 α | GCACCATCAAAGTGAAGGCCACTC | GCCCAGATACATGTCCCCTC CA |
| Nrxn1b | Neurexin 1 β | CCATGGCAGCAGCAAGCATCATTCA | CGTGTACTGGGGCGGTCATTG GGA |
| Nlgn1 | Neuroigin 1 | CACAGTCAACTATCGGCTTGGGGTA C | CAAACACAGTGATTGCAAGG GGTC |
| Nlgn2 | Neuroigin 2 | CCATTTCCAGCTGGTCTGTCAACTAC | CCAAAGGCAATGTGGTAGCGG G |
| DAG1 | Dystroglycan | TTAGCAACTGGTGGCTTGAAC | ACAGACAGGAGGAGGAGAAA G |
| Referenzgen | | | |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase | TGAGAAAAGAGTTGTGCAATGG | GGTACTCCAGAAGACCAGAGG |

Tabelle 6: Primersequenzen der qPCR-Experimente

2.4.6 Quantitative Real-Time-PCR

Für die Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR (qPCR) kam der Thermocycler Rotor-Gene Q (Qiagen, DE) zum Einsatz. Als qPCR-Mastermixe wurden Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, DE) und QuantiNova SYBR Green PCR Kit (Qiagen, DE) verwendet. QuantiNova SYBR Green PCR Kit zeigte eine höhere Spezifität und ein stärkeres Signal und wurde bei Zielgenen mit schwacher Expression verwendet. SYBR Green ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, mit dem eine indirekte Erfassung der cDNA-Menge möglich ist. Jede cDNA-Primer-Kombination wurde in Triplets zu je 25 μ l (QuantTect Mastermix) bzw. 20 μ l (QuantiNova Mastermix) aufgetragen, um Pipettierfehler zu minimieren. Die Bestandteile einer einzelnen Reaktion sind Tabelle 7 und Tabelle 8 zu entnehmen.

Methoden

| | Konzentration | Menge pro Reaktion |
|----------------------|---------------|--------------------|
| dH ₂ O | | 3,5 µl |
| Quantitect Mastermix | 2-fach | 12,5 µl |
| cDNA | 1 ng/µl | 4 µl (4 ng) |
| Primer Forward | 10 µM | 2,5 µl |
| Primer Reverse | 10 µM | 2,5 µl |
| Summe | | 25µl |

Tabelle 7: Zusammensetzung der qPCR-Reaktion mit QuantiTect SYBR Green Mastermix

| | Konzentration | Menge pro Reaktion |
|----------------------|---------------|--------------------|
| dH ₂ O | | 4 µl |
| Quantitect Mastermix | 2-fach | 10 µl |
| cDNA | 1 ng/µl | 4 µl (4 ng) |
| Primer Forward | 10 µM | 1 µl |
| Primer Reverse | 10 µM | 1 µl |
| Summe | | 20µl |

Tabelle 8: Zusammensetzung der qPCR-Reaktion mit QuantiNova SYBR Green Mastermix

Die Läufe wurden mit 40 Zyklen durchgeführt. Die Reaktionsschritte (Aktivierung, Annealing, Elongation) sind Tabelle 9 und Tabelle 10 zu entnehmen. Nach Beendigung der Zyklen wurde eine Schmelzkurve von 72°C bis 95°C mit einem Messintervall von 1°C erstellt. Verwendet wurde die gerätespezifische Software Rotor-Gene Q Series Software (Qiagen, DE). Ergab sich mit dem Quantitect Mastermix kein technisch einwandfreies Ergebnis (Primer Dimer oder unzureichendes Signal), wurde der Quantinova Mastermix (Qiagen, DE) eingesetzt. Dieser war in der Lage eine höhere Spezifität und ein intensiveres Signal zu erzielen, was bei der geringen mRNA-Menge der Mausretina und der großen Zahl an untersuchten Genen hilfreich war. Es wurde für jedes Primerpaar eine Negativkontrolle ohne Template (H₂O statt cDNA) per Lauf beigefügt. Dies erlaubte eine Quantifizierung des unspezifischen Signals (z.B. Primer Dimer). Außerdem wurde eine Probe mitlaufen gelassen, die bei der reversen Transkription statt der reversen Transkriptase nur H₂O erhalten hat (non RT Control), um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen.

Bei der Auswertung wurde eine Differenz des CT-Wertes zwischen Template und Kontrolle von mehr als sechs als ausreichend betrachtet (entspricht einem Unterschied von Faktor 64). Standardabweichungen des CT-Wertes innerhalb eines Triplets wurden

unter 0,3 akzeptiert. Die Spezifität der qPCR-Reaktion wurde anhand der Schmelzkurven und der Agarose-Gelelektrophorese beurteilt.

| | Temperatur | Dauer |
|---------------|------------|-------------------------|
| Aktivierung | 95°C | 5 Minuten |
| Denaturierung | 95°C | 15 Sekunden (40 Zyklen) |
| Annealing | 60°C | 15 Sekunden (40 Zyklen) |
| Elongation | 72°C | 15 Sekunden (40 Zyklen) |

Tabelle 9: Temperaturprofil der qPCR unter Verwendung von QuantiTect SYBR Green

| | Temperatur | Dauer |
|------------------------|------------|-------------------------|
| Aktivierung | 95°C | 2 Minuten |
| Denaturierung | 95°C | 5 Sekunden (40 Zyklen) |
| Annealing & Elongation | 60°C | 10 Sekunden (40 Zyklen) |

Tabelle 10: Temperaturprofil der qPCR unter Verwendung von QuantiNova SYBR Green

2.4.7 Auswertung

Zur Auswertung der qPCR ist es notwendig ein Referenzgen (Housekeeping-Gen) zu definieren, dessen Expression sich robust gegenüber äußeren Einflüssen verhält, um die relative Quantifizierung der Zielgene (gene of interest) zu ermöglichen. Für diesen Zweck wurde GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) ausgewählt. Der CT-Wert bezeichnet den Zyklus, an dem eine definierte Signalschwelle überschritten wird. Zur Berechnung der relativen Expression wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode angewandt [131]. Hierzu wurde der ΔCt -Wert durch Subtraktion des GAPDH-CT-Wertes vom Zielgen-CT-Wert bestimmt. Die Differenz der ΔCt -Werte zweier Gruppen (in diesem Fall Interventions- und Kontrollgruppe) ergibt $\Delta\Delta\text{Ct}$, mit dem die n-fache (relative) Expression mit der Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ errechnet werden kann.

2.4.8 Statistische Analyse der qPCR-Ergebnisse

Sämtliche Daten wurden mit GraphPad Prism 7 (La Jolla, CA, USA) ausgewertet. Vor der Auswahl des passenden statistischen Tests wurden die Stichproben auf Normalverteilung und Ähnlichkeit der Standardabweichungen geprüft. Bei dem Vergleich von zwei oder mehr Stichproben wurde entsprechend Abbildung 7 vorgegangen.

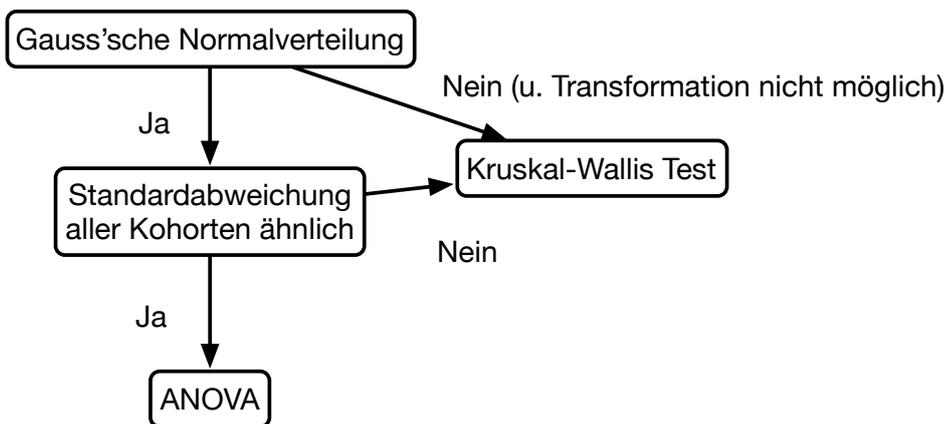


Abbildung 7: Auswahl des statistischen Testverfahrens.

Um zu prüfen, ob eine Gauss'sche Verteilung vorliegt, wurde der Shapiro-Wilk-Test angewendet. Bei einem signifikanten Unterschied dieses Tests ($p < 0.05$) wurde die Normalverteilung nicht angenommen und versucht die Daten mit der Gleichung $y = \log(y)$ zu transformieren, um eine Normalverteilung zu erreichen. War dies nach wie vor nicht möglich wurde ein nicht-parametrischer Test angewandt, in diesem Fall der Kruskal-Wallis-Test. Anschließend wurde auf Ähnlichkeit der Standardabweichungen aller Kohorten mittels Brown-Forsythe-Test geprüft. Waren die Standardabweichungen signifikant unterschiedlich, wurde ebenfalls der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Bei Normalverteilung und ähnlicher Standardabweichung wurde ein One-Way-ANOVA angewandt. Ergab der Test einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte, wurde eine Post-Hoc-Analyse durchgeführt, um die Signifikanz zwischen den Gruppen darzustellen. Hierfür wurde der Dunnett's-Test durchgeführt, der einen Vergleich zwischen einer Experimentalgruppe und einer festgelegten Kontrollgruppe ermöglicht. Die im Einzelfall durchgeführten Tests sind dem Ergebnisteil zu entnehmen. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet, $p < 0,01$ als hochsignifikant. Alle Werte sind als arithmetisches Mittel mit Standard Error of the Mean (SEM) angegeben.

2.4.9 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Sicherstellung der Qualität der qPCR-Reaktionen bzw. der Primer wurden diese zur Gelelektrophorese auf ein Agarosegel aufgetragen. Verwendet wurde ein 2% Agarose-Gel (100ml), zusammengesetzt aus 2g Agarose, 4µl Ethidiumbromid (0,004% Endkonzentration) und 98ml TAE-Buffer. Die Agarose wurde mit dem TAE-Buffer gemischt und erhitzt bis keine Rückstände mehr sichtbar waren. Anschließend wurde das Ethidiumbromid (karzinogen) hinzupipettiert und das Gemisch in eine Form gegossen.

Die Amplifikationsprodukte der qPCR wurden mit einem Marker versetzt (Gel Loading Dye 6x no SDS, BioLabs). Aufgetragen wurden jeweils 10µl pro Reaktion in jede Geltasche (Well). Als Laufbedingung wurden 180V eingestellt. Die Laufzeit war abhängig von der zu erwartenden Größe des Produktes (ca. 30 Minuten). Das Gel wurde laufen gelassen, bis die Banden etwa 80% des Gels durchlaufen hatten. Eine Well wurde jeweils mit einem Ladder (O'GeneRuler 100bp DNA Ladder, ready-to-use, 0,1µg/µL), einem standardisierten Proteingemisch bekannter Proteinmasse, geladen, der als Indikator für die Proteinmasse (Größe des Amplifikats) dient. Ein Primer wurde für die weitere Verwendung akzeptiert, sofern sich in der Agarose-Gelelektrophorese eine spezifische Bande der zu erwartenden Proteinmasse zeigt und keine bedeutende Bande an unspezifischen Produkten (Primer-Dimern) zu beobachten war. Bei Auftreten von unspezifischen Produkten oder Primer Dimern wurden entweder neue Primer bestellt, die Konzentration an Primern verringert oder die eingesetzte Menge an cDNA pro Reaktion erhöht.

2.4.10 Schmelzkurvenanalyse

Zur weiteren Untersuchung der Spezifität der Amplifikationsprodukte wurde in der Software des Thermocyclers (Rotorgene Q Series Software, Qiagen, UK) eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Nur Reaktionen mit einem einzigen Maximum der Schmelzkurve wurden akzeptiert.

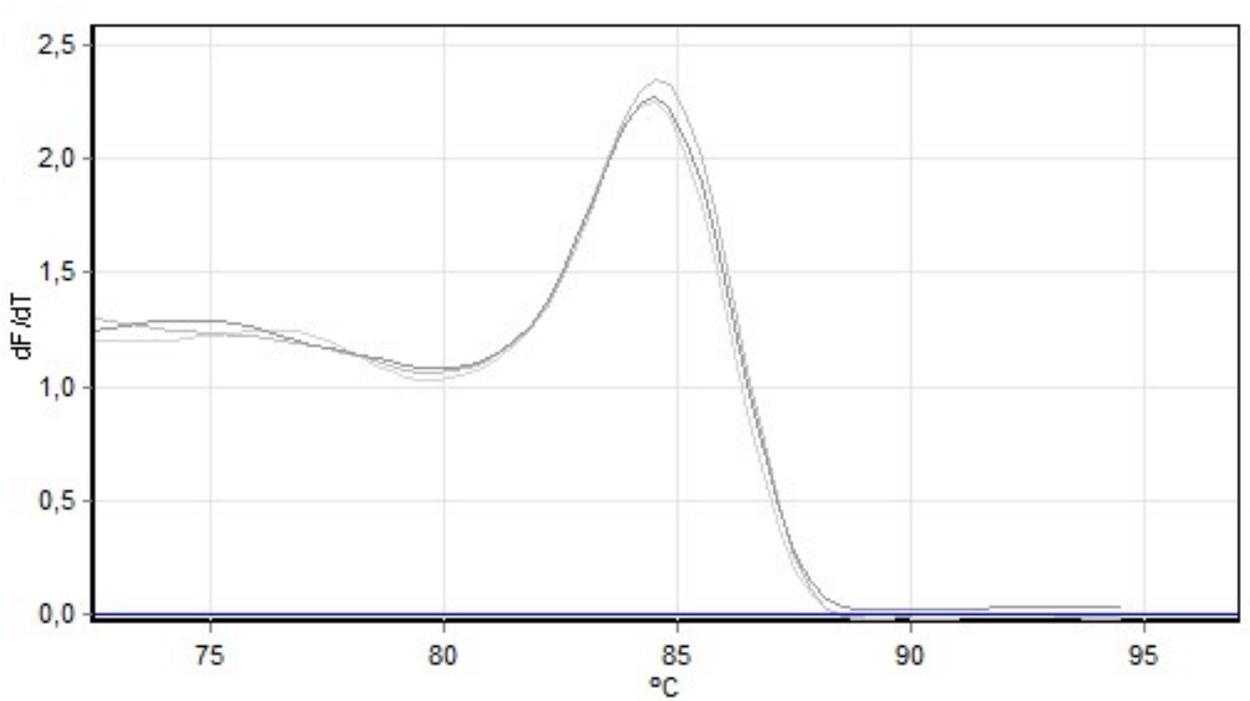


Abbildung 8: Beispielhafte Schmelzkurve einer spezifischen qPCR-Reaktion

dF/dT gibt die Absorption des Fluoreszenzsignals wieder. Auf der X-Achse ist die Dissoziationstemperatur angegeben. Zu sehen ist ein spezifischer Peak bei $85^{\circ}C$. Primer Dimer würden sich durch einen Peak unterhalb von $80^{\circ}C$ sichtbar machen.

2.5 Immunhistochemische Verfahren

2.5.1 Morphometrische Analyse der Retina in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) wurden von der Arbeitsgruppe bereitgestellt. Die Präparate stammten von Woche 6 (W6) nach Durchführung der BCCAO. Es wurden HE-Färbungen der retinalen Sagittalschnitte (5µm Dicke) von schwer betroffenen BCCAO-Tieren (n = 5) und Sham-Tieren (n = 5) verglichen. Diese stammen aus einem Areal in der Nähe des Sehnervs. Bilder wurden in 20-facher Vergrößerung mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axio Imager M2, Carl Zeiss, DE) und der Software ZEN lite 2012 (Carl Zeiss, DE) angefertigt und für den Untersucher verblindet. Analysen wurden in ImageJ durchgeführt.

2.5.2 Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz

In der vorliegenden Arbeit wurde die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt. Der Primärantikörper bindet dabei an das zu untersuchende Antigen, während der Sekundärantikörper, der das Fluoreszenzsignal erzeugt, an eine konstante Region des Primärantikörpers bindet. Die Kompatibilität der Antikörper wird sichergestellt, indem die Antikörper in verschiedenen Tierarten gezüchtet werden, da die konstante Region für die Tierarten jeweils spezifisch ist.

Die Enukleation fand 6 Wochen nach Intervention statt. Die Fixierung der Augen erfolgte über Nacht in 4% Paraformaldehyd. Die in Paraffin eingebetteten Sagittalschnitte (5µm Dicke) wurden von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Das Paraffin wurde in einem Ofen bei 57 °C für 20 Minuten geschmolzen. Die Deparaffinierung erfolgte zweimal 10 Minuten in Xylol, dann bei zweimal 10 Minuten in 2-Propanol. Im Anschluss erfolgte die Rehydrierung in folgender Reihenfolge: 95% Ethanol, 90% Ethanol, 70% Ethanol, 50% Ethanol. Jeder Schritt dauerte fünf Minuten.

Nach der Deparaffinierung wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten in TBS gewaschen. Die Antigendemaskierung erfolgte mittels Hitzeeinwirkung. Hierfür wurden die Präparate in EDTA-Puffer (pH = 8) 2 x 3 Minuten bei 650W in der Mikrowelle erhitzt. Zwischen den Erhitzungsphasen wurde Puffer nachgefüllt, um Verdunstungsverluste auszugleichen. Anschließend wurden die Präparate mit 0,5% Triton-X-100 (Sigma Aldrich, DE) in TBS für 5 Minuten benetzt, um die Zellmembranen zu permeabilisieren. Danach wurde wieder 3 x 5 Minuten mit TBS gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Proben mit TBS-BSA 5% (Bovine Serum Albumin) für 60 Minuten bei

Methoden

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper in TBS, 0,8% BSA und 0,1% Triton-X-100 gelöst. Nach Applikation wurde über Nacht in Dunkelheit inkubiert. Die optimale Konzentration der Antikörper wurde in einer vorhergehenden Titration bestimmt. Bei jedem Präparat wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die statt Primärantikörper nur mit Puffer inkubiert wurde, um das Hintergrundsignal des Sekundärantikörpers abschätzen zu können. Nach der Inkubation wurde 3 x 5 Minuten mit TBS gewaschen, anschließend der Sekundärantikörper aufgetragen. Dessen Lösung entspricht der des Primärantikörpers. Inkubation erfolgte über eine Stunde in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren 5-minütigen Waschschrritten wurden die Proben 5 Minuten mit DAPI zur Visualisierung der Zellkerne (4', 6-Diamidin-2-phenylindol, 1:2000, Sigma Aldrich, DE) inkubiert, wieder gewaschen und schließlich mit einem Einbettmedium (Fluorescence Mounting Medium, DAKO, DE) betropft und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4°C. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss Axio Imager, Zeiss, DE) mit ApoTome.2 (Zeiss, DE) mithilfe der Zen-Lite-2012-Software (Zeiss, DE) am Folgetag untersucht.

| Primärantikörper | Konzentration | Sekundärantikörper | Konzentration |
|---|---------------|--|---------------|
| Anti-C1q, Rabbit polyclonal (Santa Cruz, USA) | 1:200 | Alexa Fluor 488, donkey anti-rabbit (Life Technologies, USA) | 1:2500 |
| Anti-PIGF (Abcam, UK) | 1:100 | Cy3 Goat Anti-Rat (Abcam, UK) | 1:1000 |
| Anti-Renin (R&D Systems, USA) | 1:100 | CF 594 Donkey Anti-Goat (Biotium, USA) | 1:2500 |
| Anti-C3 (MP Biomedicals, DE) | 1:100 | Red Donkey Anti-Goat (Invitrogen, DE) | 1:5000 |
| Anti-Iba1 (Wako Chemicals, USA) Rabbit polyclonal | 1:250 | Green Donkey Anti-Rabbit (Invitrogen, DE) | 1:5000 |

Tabelle 11: Antikörper der Immunfluoreszenz

2.5.3 Quantifizierung der Mikroglia in der Iba1-Färbung

Von den Retina-Schnitten eines Auges wurden mehrere nicht überlappende Bilder in 200-facher Vergrößerung angefertigt. Anschließend wurde das Bildmaterial verblendet und erst nach erfolgter Quantifizierung wieder entblendet. Die Zählung der Zellen erfolgte manuell durch zwei Untersucher. Zur Vergleichbarkeit der verschiedenen Proben wurde die Zahl der Mikroglia auf die mittlere Retinalänge skaliert (3000 μm). Verglichen wurde die Kohorte der „schwer betroffenen“ Augen mit scheinoperierten Tieren (Sham).

$$\text{Zahl der Mikroglia pro Retina (3000 } \mu\text{m)} = \frac{\text{Zellen pro Retina} \times 3000}{\text{Länge der Retina}}$$

2.5.3.1 Statische Auswertung der Mikroglia-Quantifizierung

Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel mit SEM angegeben. Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert von <0.05 angenommen. Verwendet wurde der t-Test.

3 Ergebnisse

3.1 Gelelektrophorese und Schmelzkurvenanalyse

Grundvoraussetzung für die Validität der quantitativen PCR ist die Spezifität der Amplifikationsreaktion. Mithilfe der Gelelektrophorese als auch der Schmelzkurvenanalyse konnte die Spezifität der Primerpaare bestimmt werden. In Abbildung 9 und Abbildung 10 befinden sich die Gelspuren und Schmelzkurven der Primerpaare, die in dieser Arbeit inkludiert wurden. Die Proteingröße der Bande entspricht der in Primer-Blast errechneten Größe. Als Zeichen der Spezifität findet sich in der Gelelektrophorese eine einzige Bande. Korrespondierend dazu befindet sich in der Schmelzkurvenanalyse ein einziges Maximum. Weitere Maxima würden für unspezifische Amplifikationsprodukte wie Primer Dimer (unter 100bp) sprechen und stellten ein Ausschlusskriterium dar.

Es ist von jedem Zielgen demonstrativ eine Gelbahn dargestellt (Abbildung 9). Alle angegebenen Reaktionen wurden für spezifisch befunden und in der weitergehenden Untersuchung inkludiert.

Ergebnisse

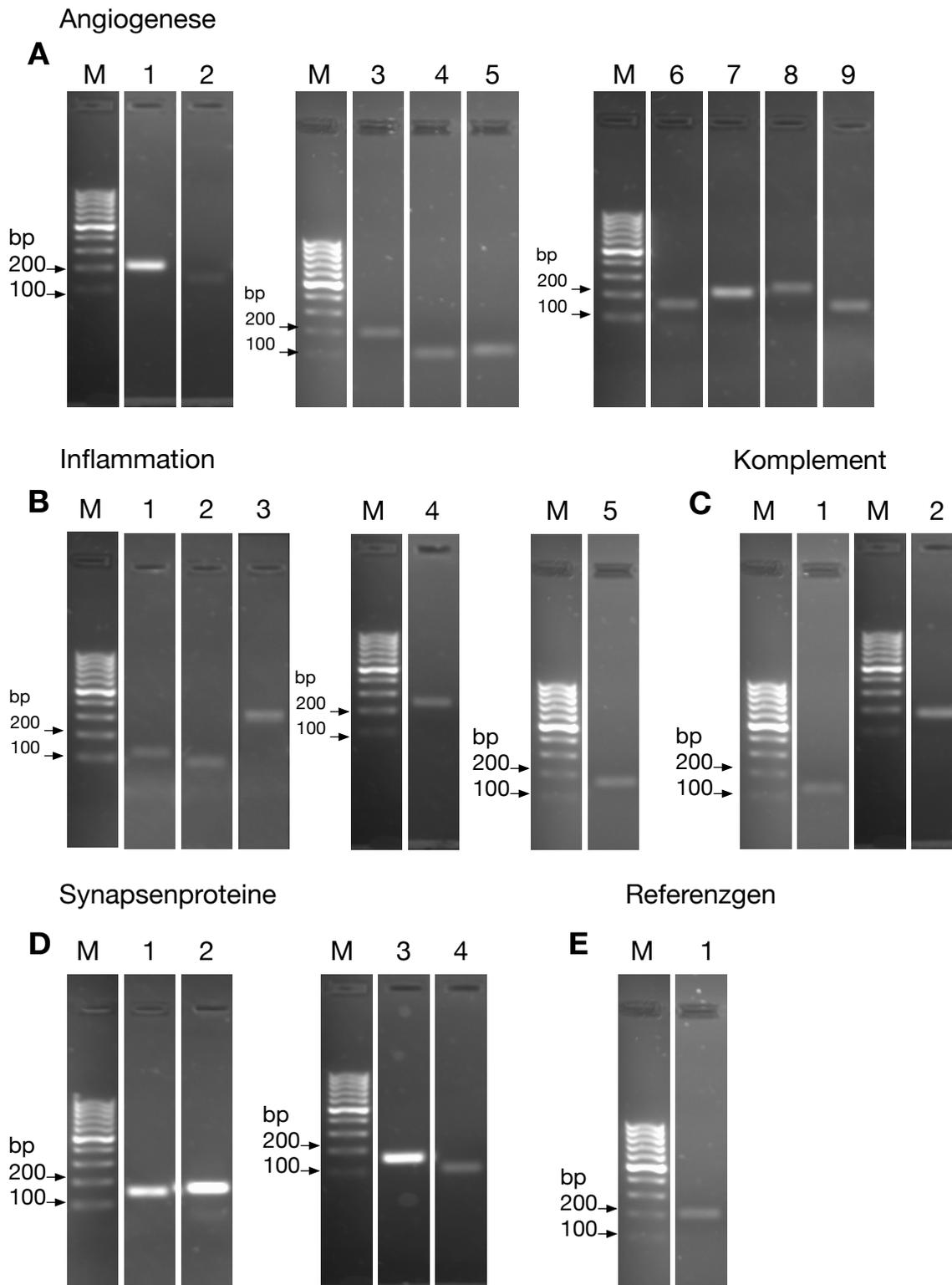


Abbildung 9: Gelelektrophorese der qPCR-Produkte.

Sämtliche abgebildete Gele zeigen eine spezifische Bande. Dies ist eine Grundbedingung für die Validität der qPCR-Ergebnisse. In der Spur M befindet sich der Ladder. Zuordnung:

A: 1 VEGFA, 2 VEGFB, 3 PlGF, 4 Flt1, 5 sFlt1, 6 Ang1, 7 PDGFA, 8 PDGFRA, 9 PDGFRB

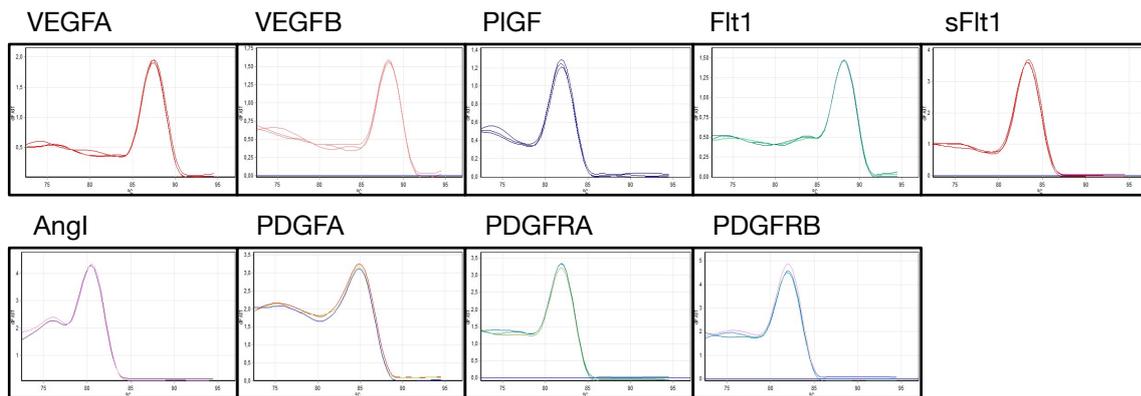
B: 1 IL-1 β , 2 IL4R, 3 TNF α , 4 CCL2, 5 CD68

C: 1 C1q, 2 C3

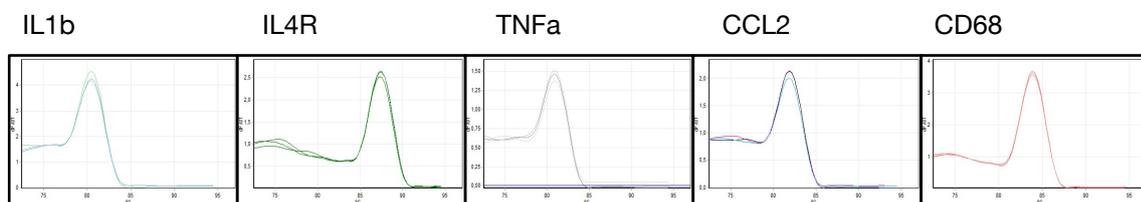
D: 1 Nrnx1a, 2 Nrnx3a, 3 Nrnx1b, 4 Nlgn1

E: 1 GAPDH

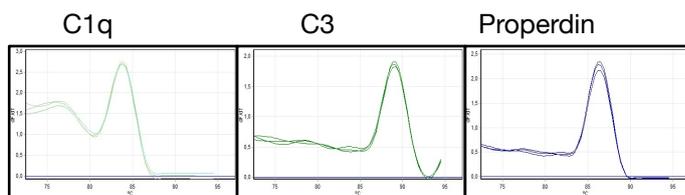
Angiogenese



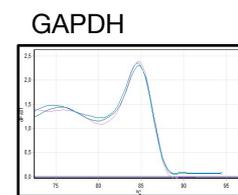
Inflammation



Komplement



Referenzgen



Synapsen

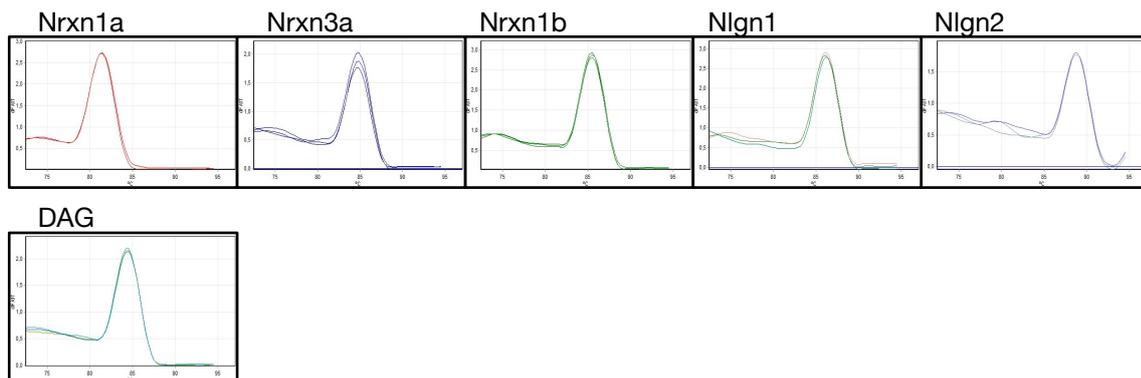


Abbildung 10: Schmelzkurvenanalyse in Rotorgene Q Series Software (Qiagen, DE). Die aufgeführten Zielgene zeigten ein spezifisches Maximum der Schmelzkurve und wurden für die weitere Auswertung akzeptiert.

3.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

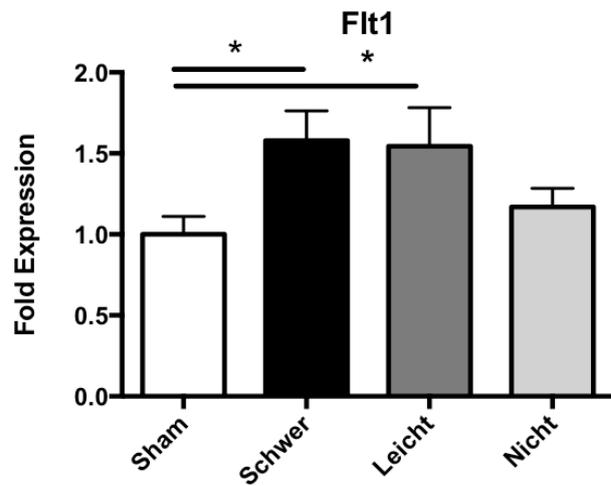
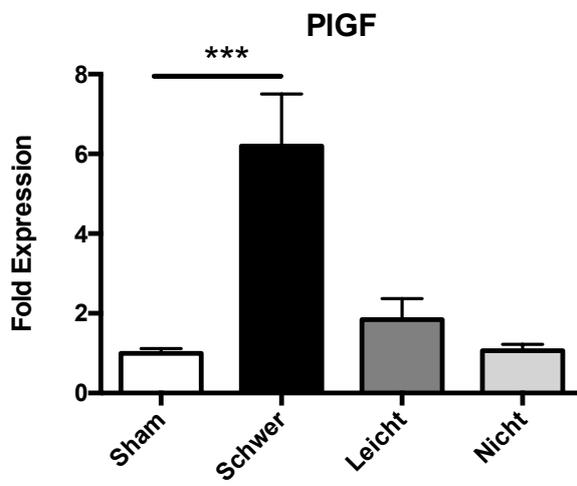
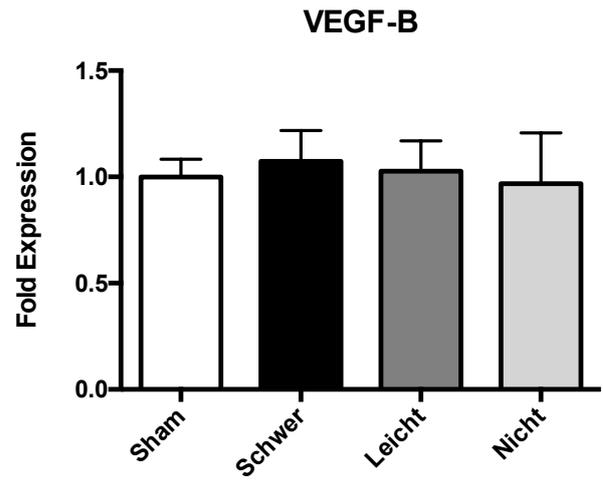
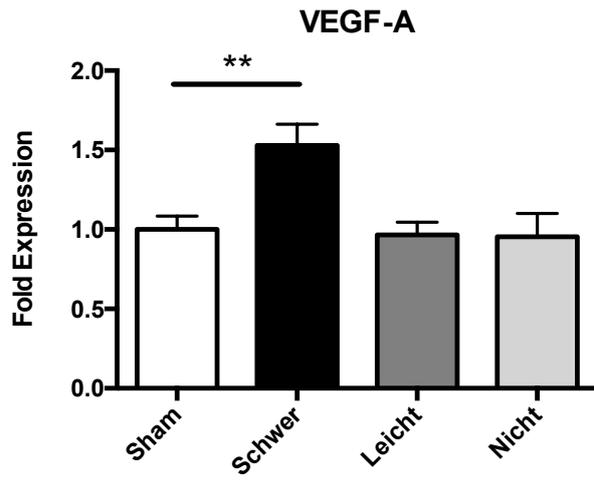
Tabelle 12 ist der Gesamtbestand der Versuchstiere der qPCR zu entnehmen.

| Betroffenheitsgrad | Bezeichnung | Definition | N |
|--------------------|-------------|------------------------|----|
| Schwer betroffen | Schwer | Stark verändertes ERG | 7 |
| Leicht betroffen | Leicht | Leicht verändertes ERG | 7 |
| Nicht betroffen | Nicht | Unauffälliges ERG | 3 |
| Sham | Sham | Sham Operation | 10 |

Tabelle 12: Bestand der Versuchstiere der Genexpressionsanalyse

3.2.1 Einfluss der BCCAO auf die Expression von Genen der Angiogenese

Es wurden VEGF-A (vascular endothelial growth factor A), VEGF-B (vascular endothelial growth factor B), PlGF (placental growth factor), Flt1 (fms related tyrosine kinase 1), sFlt1 (soluble fms related tyrosine kinase 1), Ang I (Angiopietin 1), PDGF A (platelet derived growth factor A), PDGFR A (platelet derived growth factor receptor a) und PDGFR B (platelet derived growth factor receptor b) 6 Wochen nach BCCAO untersucht. Bei Tieren mit einem „schwer betroffenen“ Phänotyp zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sham) bei den folgenden Genen eine signifikant höhere Expression: VEGF-A ($p < 0.01$), PlGF ($p < 0.001$), Flt1 ($p < 0.05$), sFlt1 ($p < 0.01$), PDGFR B ($p < 0.05$). Bei den übrigen Targets ergab sich keine signifikante Differenz. Bei „leicht betroffenen“ Tieren zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Flt1 ($p < 0.05$) eine signifikant höhere Expression. Bei den übrigen Targets ergab sich keine signifikante Differenz. Zwischen „nicht betroffenen“ Tieren und der Kontrollgruppe zeigte sich in sämtlichen Genen keine signifikante Differenz.



Ergebnisse

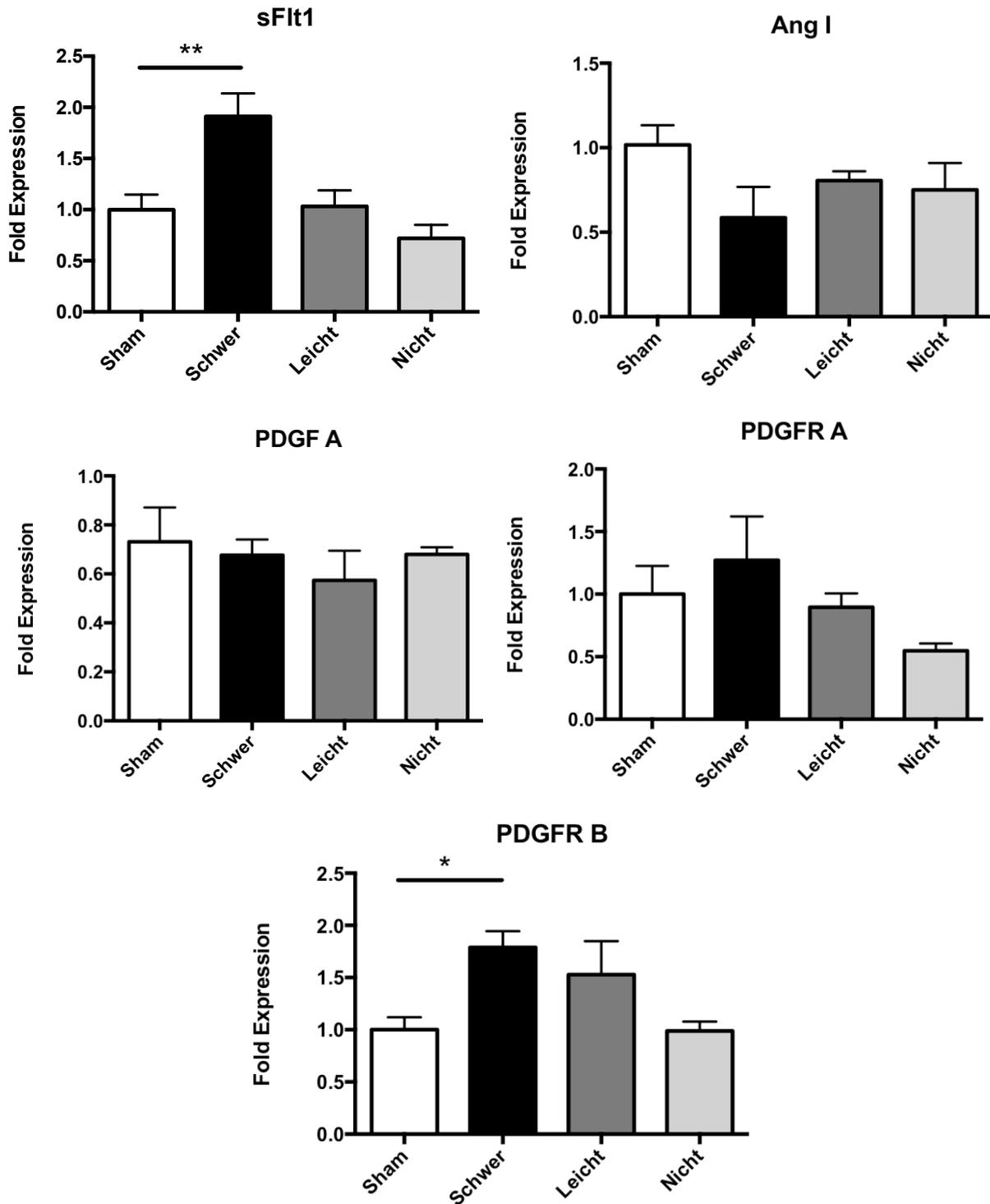


Abbildung 11: Genexpressionsanalyse mittels qPCR von Genen der Angiogenese.

Quantifizierung der relativen Genexpression in der murinen Retina nach 6 Wochen. Daten sind angegeben als Vielfaches (fold expression) der scheinoperierten Kontrolle (Sham). Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die BCCAO-Tiere wurden in drei Kategorien eingeteilt: „schwer betroffen“, „leicht betroffen“ und „nicht betroffen“. Diese wurden jeweils mit der Sham-Kontrolle verglichen. Der statistische Vergleich erfolgte mittels One-Way ANOVA und einem anschließenden Dunnett'-Test (Post-Hoc-Test). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2.2 Einfluss der BCCAO auf die Expression von Genen der Inflammation

Es wurden Macrosialin (CD68), Interleukin-4-Rezeptor (IL4R), chemokin-ligand-2 (CCL2), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) 6 Wochen nach BCCAO untersucht. Die Genexpression von CD68 ($p < 0.01$), CCL2 ($p < 0.01$) und IL-1 β ($p < 0.05$) war in „schwer betroffenen“ Tieren gegenüber der Sham-Kontrolle signifikant erhöht. Die Genexpression von IL4R und TNF α war nicht verändert. „Leicht betroffene“ und „nicht betroffene“ Tiere zeigten in sämtlichen Genen keinen Unterschied im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

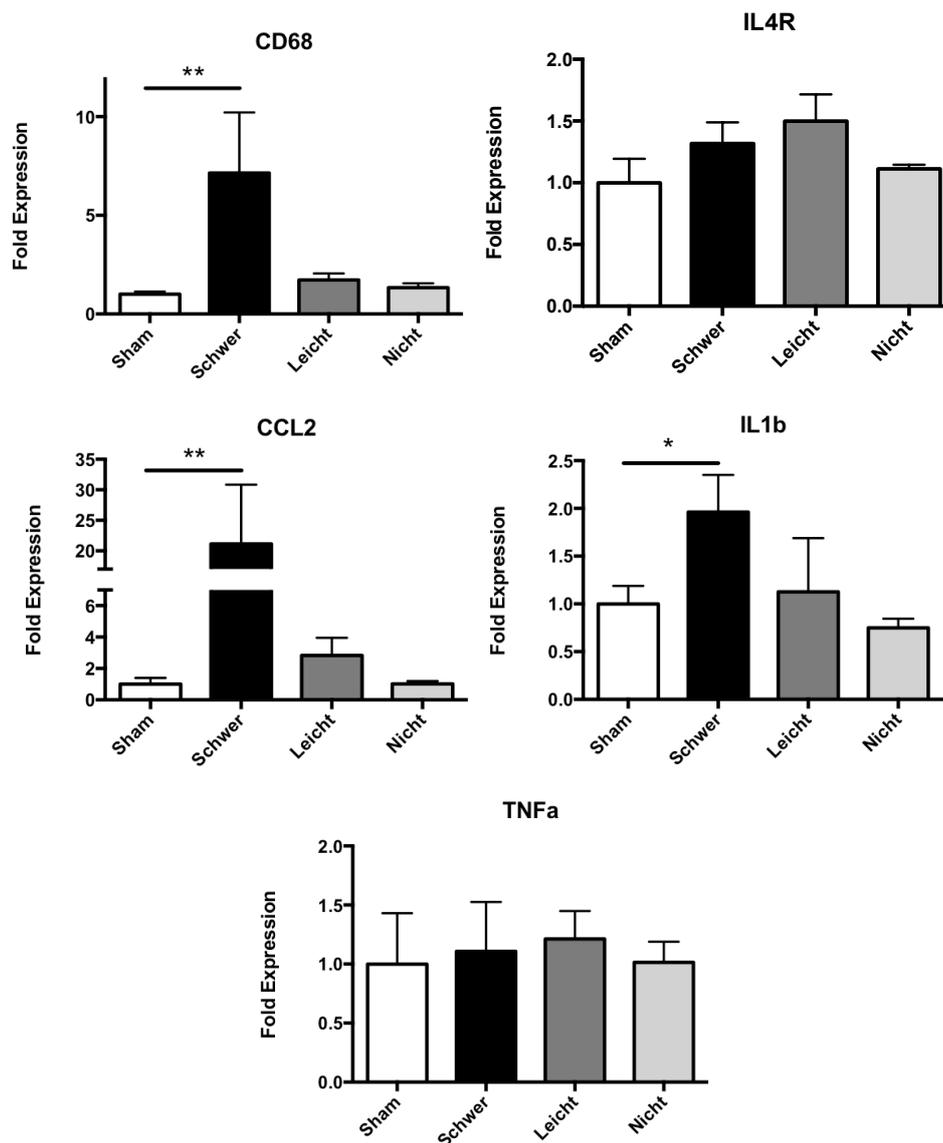


Abbildung 12: Genexpressionsanalyse mittels qPCR von Genen der Inflammation.

Quantifizierung der relativen Genexpression in der murinen Retina nach 6 Wochen. Daten sind angegeben als Vielfaches (Fold Expression) der scheinoperierten Kontrolle (Sham). Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die Microcoil-behandelten Tiere wurden in drei Kategorien eingeteilt: „schwer betroffen“, „leicht betroffen“ und „nicht betroffen“. Diese wurden jeweils mit der Sham-Kontrolle verglichen. Der statistische Vergleich erfolgte mittels One-Way ANOVA und einem anschließenden Dunnett'-Test (Post-Hoc-Test). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2.3 Einfluss der BCCAO auf die Expression von Genen des Komplementsystems

Es wurden C1q, C3 und Properdin 6 Wochen nach der Intervention untersucht. C1q und ist ein Protein des klassischen Weges des Komplementsystems. Properdin ist ein Marker des alternativen Aktivierungsweges. Die Genexpression von C1q ($p < 0.01$) und C3 ($p < 0.05$) war in „schwer betroffenen“ Tieren gegenüber der Sham-Kontrolle signifikant erhöht. Die Genexpression von Properdin zeigt sich nicht signifikant verändert. „Leicht betroffene“ und „nicht betroffene“ Tiere zeigten in sämtlichen Genen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

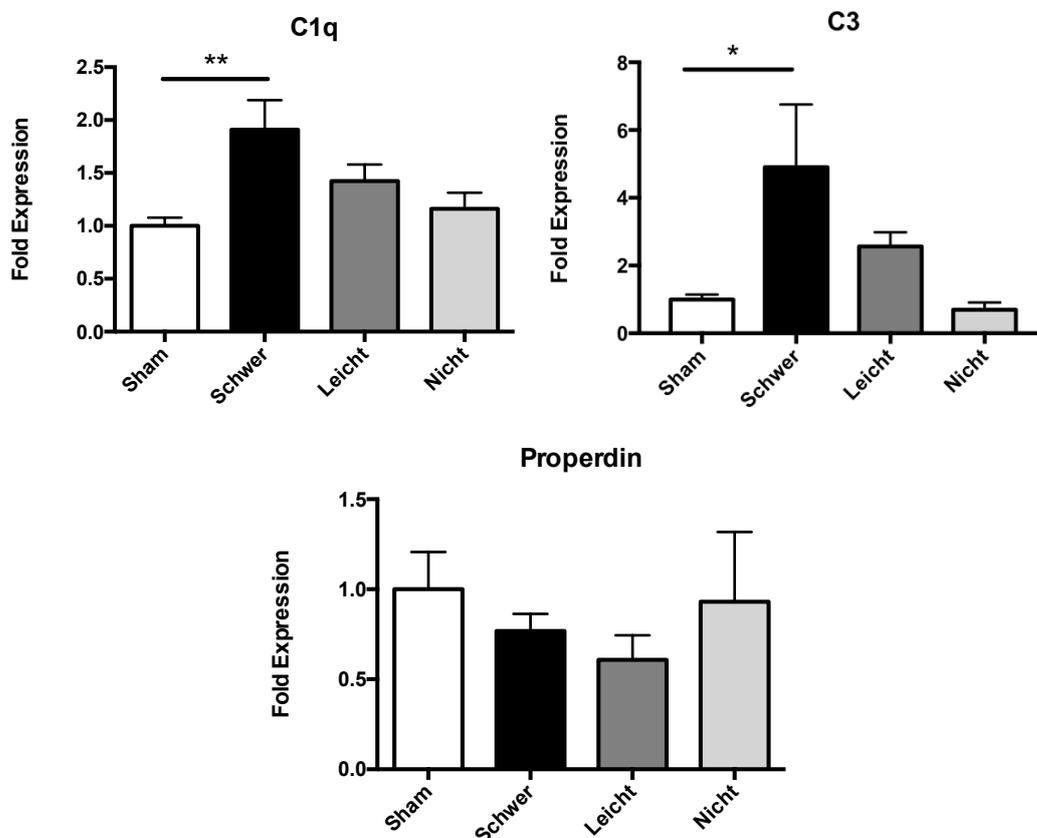


Abbildung 13: Genexpressionsanalyse mittels qPCR von Genen des Komplementsystems.

Quantifizierung der relativen Genexpression in der murinen Retina nach 6 Wochen. Daten sind angegeben als Vielfaches (Fold Expression) der scheinoperierten Kontrolle (Sham). Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwerts. Die Microcoil-behandelten Tiere wurden in drei Kategorien eingeteilt: „schwer betroffen“, „leicht betroffen“ und „nicht betroffen“. Diese wurden jeweils mit der Sham-Kontrolle verglichen. Der statistische Vergleich erfolgte mittels One-Way ANOVA und einem anschließenden Dunnett'-Test (Post-Hoc-Test). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2.4 Einfluss der BCCAO auf die Expression von Genen der Synaptogenese.

Es wurden Nrnx1a (Neurexin 1 alpha), Nrnx1b (Neurexin 1 beta), Nrnx3a (Neurexin 3 alpha), Nlgn1 (Neuroigin 1), Nlgn 2 (Neuroigin 2) und DAG (Dystroglycan) 6 Wochen nach der Intervention untersucht. Es zeigte sich zwischen sämtlichen Kohorten und der Kontrollgruppe in sämtlichen Genen keine signifikante Differenz.

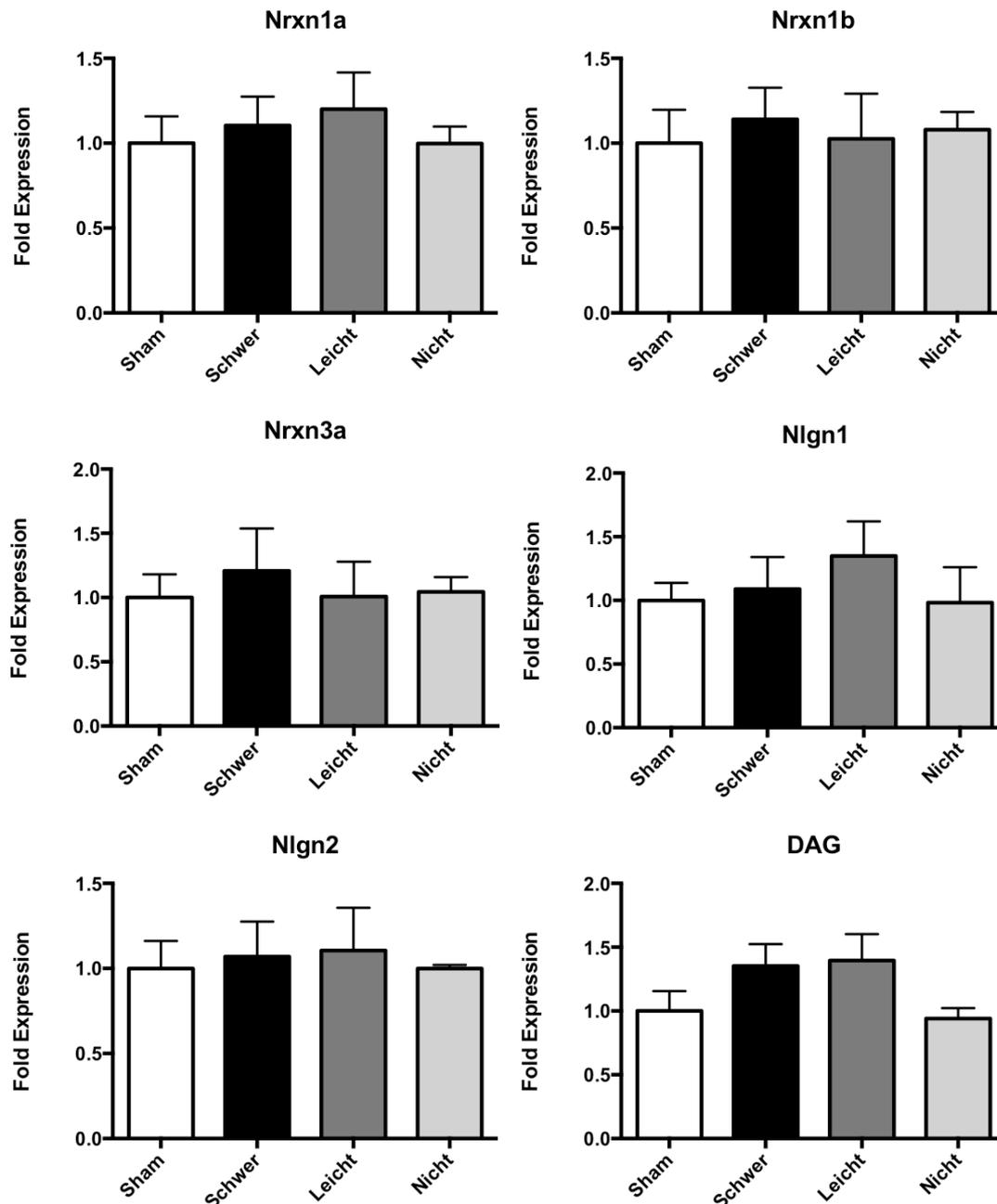


Abbildung 14: Genexpressionsanalyse mittels qPCR von Genen des Synaptogenese.

Quantifizierung der relativen Genexpression in der murinen Retina nach 6 Wochen. Daten sind angegeben als Vielfaches (Fold Expression) der scheinoperierten Kontrolle (Sham). Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwerts. Die Microcoil-behandelten Tiere wurden in drei Kategorien eingeteilt: „schwer betroffen“, „leicht betroffen“ und „nicht betroffen“. Diese wurden jeweils mit der Sham-Kontrolle verglichen. Der statistische Vergleich erfolgte mittels One-Way ANOVA und einem anschließenden Dunnett'-Test (Post-Hoc-Test). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3 Strukturveränderungen der Retina nach BCCAO

Es wurden Sagittalschnitte von „schwer betroffenen“ BCCAO-Tieren und Sham-Tieren 6 Wochen nach BCCAO verglichen. Morphologisch lässt sich eine deutliche Abnahme der outer plexiform layer (OPL) in der Interventionsgruppe beobachten. In der OPL befinden sich die Synapsen zwischen den Photorezeptorzellen und den Horizontal- und Bipolarzellen. Teilweise besteht zudem ein Verlust der anliegenden inner nuclear layer (INL). Die Zellverbände der outer nuclear layer (ONL) erscheinen aufgelockert. Sham-Tiere zeigen regelmäßige, deutlich abgrenzbare Zellschichten und sind nicht von gesunden Tieren zu unterscheiden.

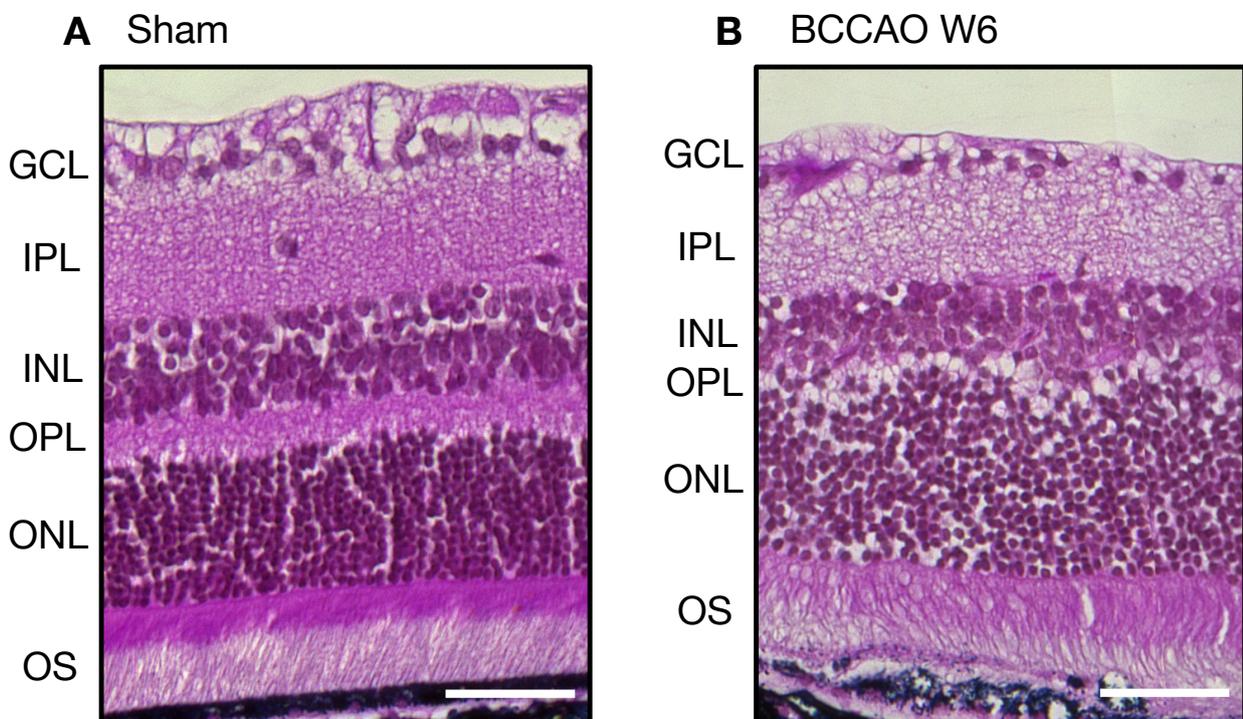


Abbildung 15: Strukturveränderungen 6 Wochen nach BCCAO

Lichtmikroskopische Aufnahme der murinen Retina. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. A: Sham; B: BCCAO („schwer betroffen“) nach 6 Wochen. Der Skalierungsbalken entspricht 50 µm. Es zeigte sich ein signifikanter Verlust der OPL in der BCCAO-Gruppe. GCL = Ganglienzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, INL = innere nukleäre Schicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere nukleäre Schicht, OS = Außensegmente der Photorezeptoren.

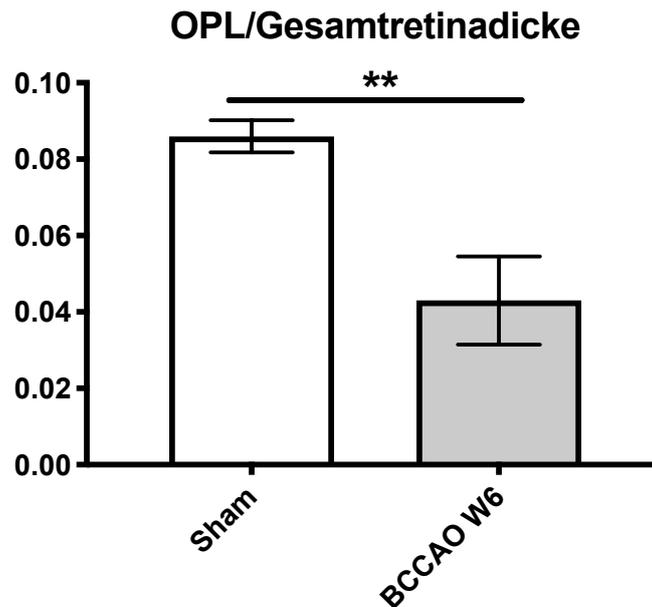


Abbildung 16: Verlust der outer plexiform layer in der „schwer betroffenen“ BCCAO-Gruppe nach 6 Wochen.

Verglichen wurden 5 Sham-Tiere mit 5 „schwer betroffenen“ BCCAO-Tieren. Dargestellt ist der Quotient aus OPL und Gesamtretnadicke. Der Quotient ist für „schwer betroffene“ BCCAO-Tiere nach 6 Wochen signifikant erniedrigt. Der statistische Vergleich erfolgte mittels T-Test. ** $p < 0.01$.

Wurden „schwer betroffene“ BCCAO-Tiere mit der Kontrollgruppe verglichen, offenbarte sich nach 6 Wochen eine signifikante Verringerung des Quotienten aus OPL-Dicke und Gesamtretnadicke (Abbildung 16). Innerhalb der BCCAO-Gruppe bestand ein heterogenes Bild an Veränderungen zwischen den Tieren.

3.4 Infiltration der Retina durch Mikroglia/Makrophagen 6 Wochen nach BCCAO

Retinasagittalschnitte von jeweils 3 „schwer betroffenen“ Tieren und 3 Sham-Tieren wurden auf Iba1 (ionized calcium binding adapter molecule 1) gefärbt, um den Umfang und die Lokalisation der Mikroglia/Makrophagen-Infiltration zu bestimmen. Iba1 wird spezifisch von mononukleären Phagozyten exprimiert [132]. Die Zellen wurden anhand der Iba1-Expression und ihrer Zellmorphologie identifiziert. Aktivierte Phagozyten sind durch ihren vergrößerten, runden Zellkörper und die kurzen, astförmigen Ausläufer erkennbar.

In der Sham-Gruppe waren wenige bis keine MP vorhanden (4,4/3000 μm). In den „schwer betroffenen“ Tieren der Interventionsgruppe fanden sich signifikant mehr Zellen (34,1/3000 μm) (Abbildung 17). Teilweise nahmen die Zellen in der BCCAO-Gruppe einen

Ergebnisse

amöboiden Phänotyp an (Abbildung 18). Die Zellen befanden sich primär in der inner plexiform layer (IPL), outer plexiform layer (OPL) und der Ganglienzellschicht (GCL).

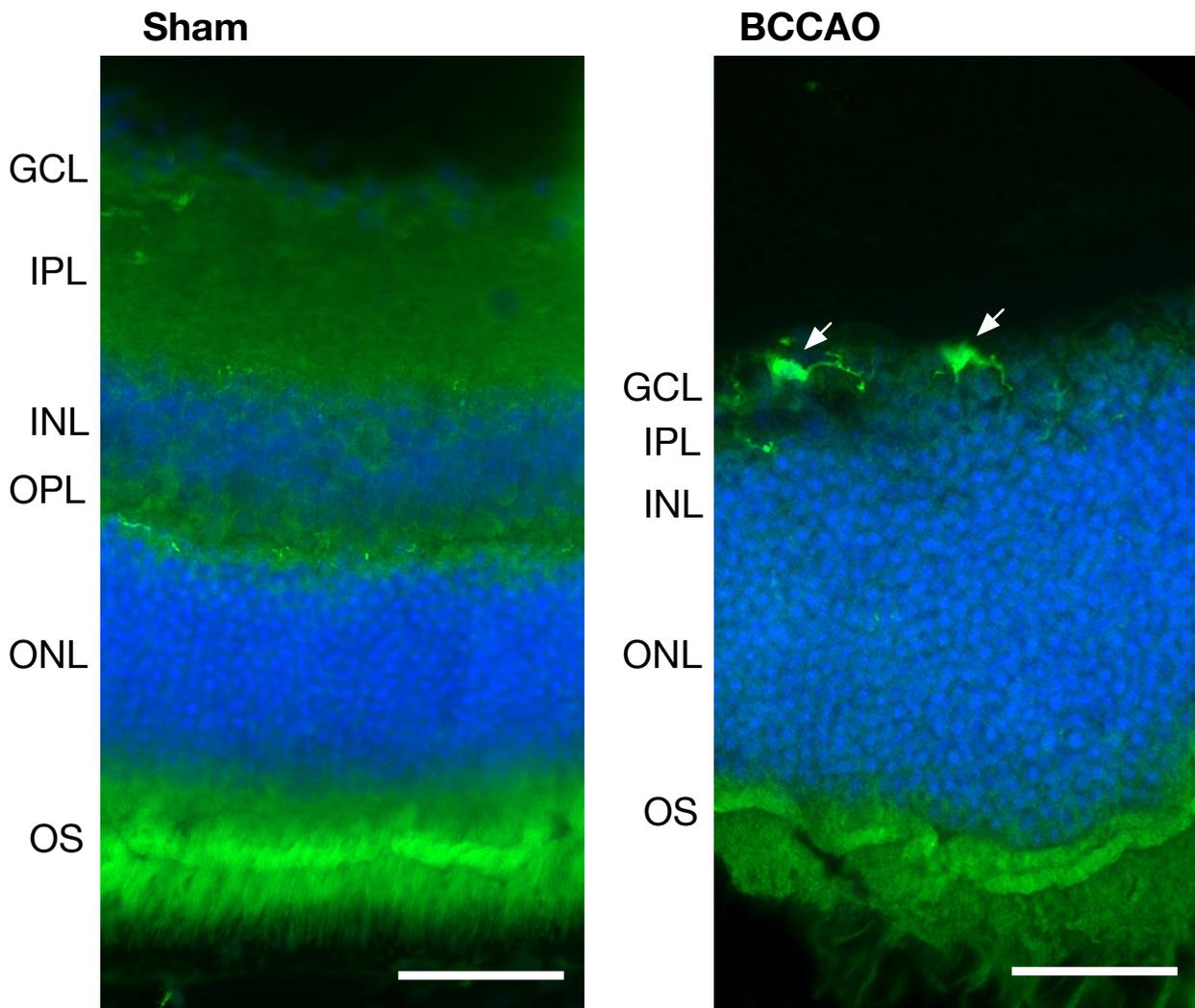


Abbildung 17: Beispielhafter Vergleich eines Sham-Tieres (links) und eines „schwer betroffenen“ Tieres (rechts) im Sagittalschnitt. Iba1-Färbung.

Links: Immunfluoreszenz eines scheinoperierten Kontrolltieres (Sham). Die Retina ist weitgehend frei von reaktiven Mikroglia/Makrophagen. Rechts: Immunfluoreszenz eines „schwer betroffenen“ Tieres (BCCAO). MP sind mit einem weißen Pfeil markiert. Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (blau).

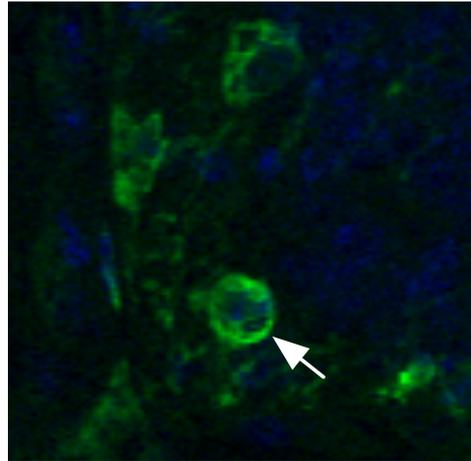


Abbildung 18: Mikrogliazelle in ihrer amöboiden Form in der Retina eines „schwer betroffenen“ Tieres.

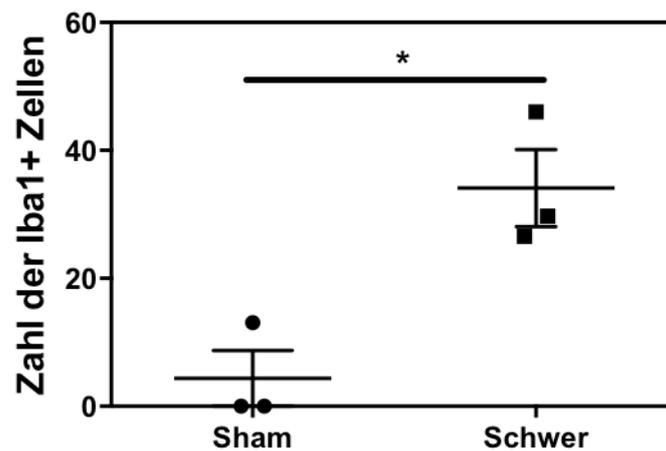


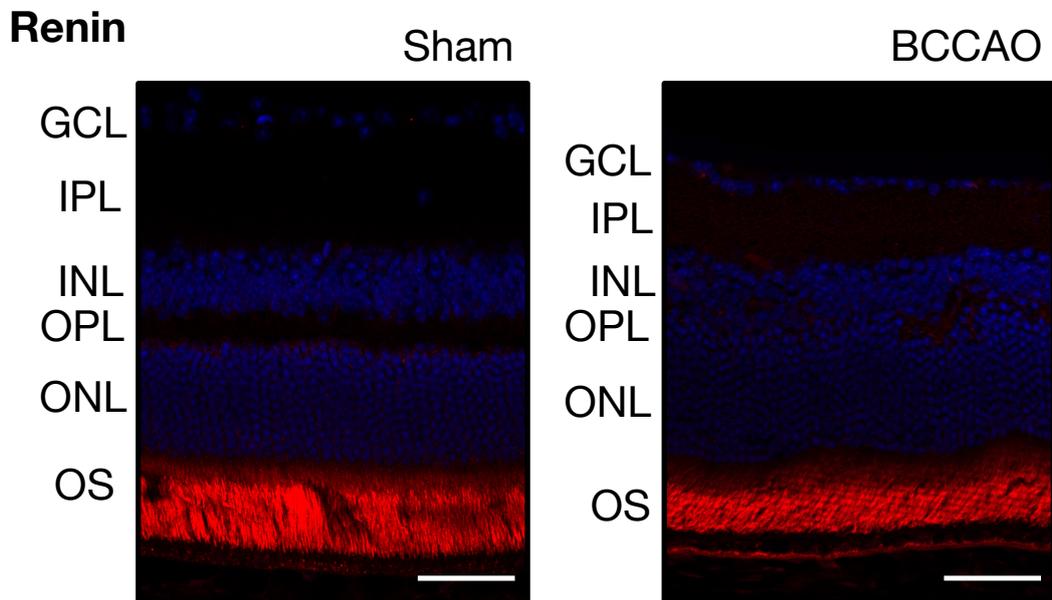
Abbildung 19: „Schwer betroffene“ Tiere wiesen eine erhöhte Zahl an Mikroglia/Makrophagen im Vergleich zu Sham-Tieren auf.

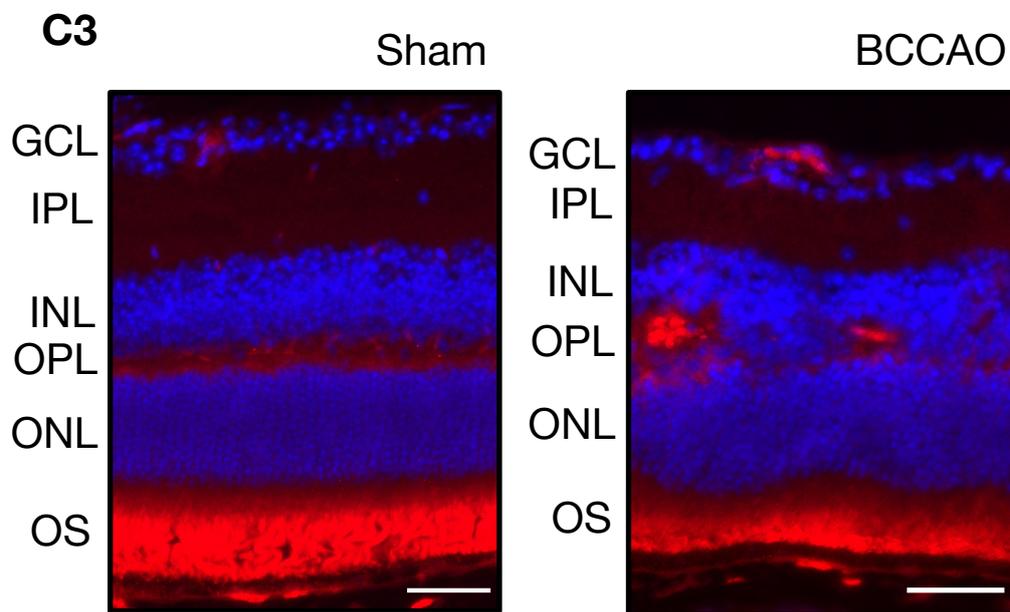
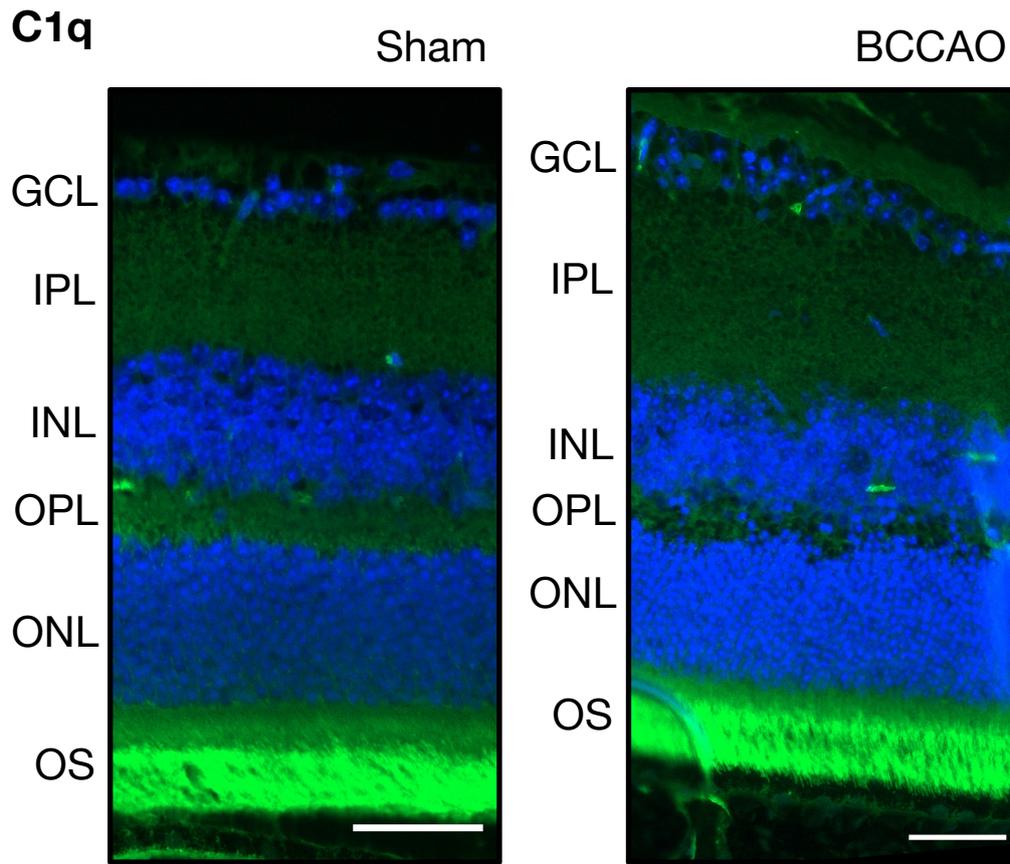
Zur Vergleichbarkeit der verschiedenen Proben wurde die Zahl der Mikroglia/Makrophagen auf eine gewöhnliche Retinalänge skaliert (3000 μm). Die Zählung erfolgte im Sagittalschnitt der Retina. Verglichen wurden „schwer betroffene“ Tiere ($n = 3$) mit Sham-Tieren ($n = 3$). In „schwer betroffenen“ BCCAO-Tieren fanden sich signifikant mehr reaktive Mikrogliazellen/Makrophagen. Der statistische Vergleich erfolgte mittels T-Test. * $p < 0,05$.

Ergebnisse

3.5 Untersuchungen der Proteinexpression von Renin, C1q, C3 und PIGF mittels indirekter Immunofluoreszenz 6 Wochen nach BCCAO

Es wurde mittels indirekter Immunhistochemie die Proteinexpression von Renin, C1q, C3 und PIGF nach 6 Wochen untersucht. Verglichen wurden „schwer betroffene“ Tiere mit Sham-Tieren. Zwischen „schwer betroffenen“ BCCAO-Tieren und Sham-Tieren ließ sich kein Unterschied feststellen. Die Sagittalschnitte der Sham-Gruppe unterschieden sich außerdem nicht von den Negativkontrollen. Das Signal ist somit als unspezifisches Hintergrundsignal zu betrachten.





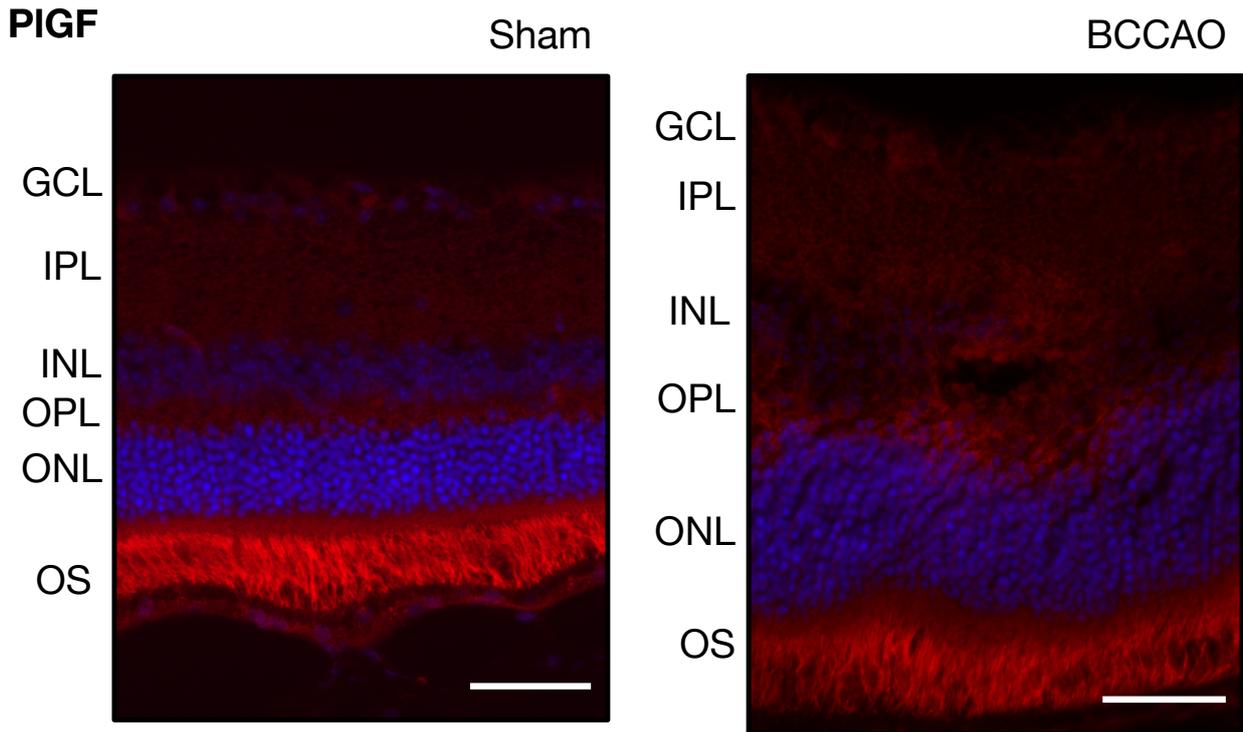


Abbildung 20: Immunhistochemische Untersuchung von Renin, C1q, C3 und PIGF.

Verglichen wurden „schwer betroffene“ BCCAO-Tiere mit Sham-Tieren. Zellkerne sind mit DAPI gefärbt und erscheinen blau. Zwischen Sham-Tieren und BCCAO-Tieren ließ sich kein Unterschied feststellen. Der Skalierungsbalken entspricht 50µm.

4 Diskussion

4.1 BCCAO als Modell der moderaten Hypoperfusion

Es ist essentiell zu verstehen, dass die anhaltende Hypoperfusion als Folge der BCCAO moderat ausfällt und zu keiner Nekrose führt [120,121]. Das BCCAO-Modell unterscheidet sich damit von konventionellen Modellen, bei denen es zu einer sofortigen, stark ausgeprägten Ischämie mit sofortigem Zelltod kommt [133].

Füchtemeier et al., auf deren Versuchsaufbau unsere Arbeit basiert, stellten fest, dass sich die zerebrale Durchblutung aufgrund von Vascular Remodelling der größeren Arterien innerhalb von 3 Wochen erholt [125]. Trotz der Normalisierung des Blutflusses beobachtete unsere Arbeitsgruppe eine progrediente Einschränkung der elektrophysiologischen Funktion der Retina, welche über den gesamten Zeitraum des Experiments (6 Wochen) anhielt [1].

Nach Induktion der BCCAO entsteht eine ersatzweise Blutversorgung durch den Circulus arteriosus cerebri. Diese Gefäße sind bei jedem Individuum unterschiedlich ausgeprägt, was die großen interindividuelle Unterschiede im Betroffenheitsgrad der jeweiligen Augen erklären könnte [114].

4.2 Morphologische Veränderungen der Retina nach BCCAO

In „schwer betroffenen“ BCCAO-Tieren zeigte sich in HE-Sagittalschnitten nach 6 Wochen ein deutlicher Verlust der OPL. Teilweise kam es außerdem zu einem Verlust der INL. Sham-Tiere zeigten hingegen regelmäßige, deutlich abgrenzbare Zellschichten und waren nicht von gesunden Tieren zu unterscheiden.

Wurden „schwer betroffene“ Tiere aus Woche 1 mit Tieren aus Woche 6 verglichen, fiel bei letzterer Gruppe eine höhere Quote an betroffenen Tieren auf. Dies spricht für eine langanhaltende, progressive Zunahme des OPL-Verlustes [1].

Ein Rückgang der OPL wurde auch in vergangenen BCCAO-Versuchen beschrieben [123,134,135]. In der OPL befinden sich die Synapsen zwischen Horizontal- und Bipolarzellen der INL und den Photorezeptorzellen der ONL. Ein Rückgang dieser Schicht legt einen Synapsenverlust nahe, der mit einem Visusverlust einhergehen kann [1].

Diskussion

Ein Verlust der INL, der in unserer Arbeit eine geringe Zahl an Tieren betraf, wurde auch von Yamamoto et al. beschrieben [134]. Dies spricht für einen Verlust von Bipolar-, Horizontal- und Amakrinzellen.

Manouchehrian et al. verwendeten ebenfalls C57Bl/6-Mäuse und stellten nach 4 Monaten einen Verlust der OPL und IPL fest [136]. Ein häufig beschriebener Verlust der IPL wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet [122,123,135]. Auf der anderen Seite beschrieben Lavinsky et al. keinen Verlust der OPL, der in unserer Arbeit jedoch die eindrücklichste Veränderung darstellte [122]. Yamamoto beschrieben eine Degeneration der INL-Neurone nach 2 Monaten und der Photorezeptoren nach 4 Monaten [134]. Es ist entsprechend möglich, dass in unserer Arbeit weitere Veränderungen nach einer längeren Dauer als 6 Wochen entstanden wären.

Die weiteren Untersuchungen, welche von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt worden sind, zeigten sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zur bisherigen Literatur. Crespo et al. beobachteten in der optischen Kohärenztomographie (OCT) einen Rückgang der Retinadicke [1]. Ein Rückgang der Gesamtreinadicke wurde auch von zahlreichen vergangenen Studien nach BCCAO beschrieben [122,134,135].

Manoucherian et al. stellten bei ihren Versuchen mit der C57-Bl/6-Maus einen Verlust von retinalen Ganglienzellen (RGC) fest, der in der vorliegenden Arbeit nicht auszumachen war [1]. Es handelt sich bei RGC um Hypoxie-empfindliche Zellen, deren Verlust in vielen BCCAO-Studien beschrieben worden ist [121,123,134]. Osborne et al. maßen nach 2 Monaten jedoch keinen RGC-Verlust [120]. Es besteht die Möglichkeit, dass es in unserer Arbeit zu einer geringeren Abnahme des retinalen Blutflusses kam, als es in den meisten Arbeiten der Fall war. Gegebenenfalls ist zu evaluieren, ob es zu methodischen Problemen gekommen ist, etwa bei der Zählung der Zellen.

Ein Ausbleiben des RGC-Verlustes kann jedoch eine wünschenswerte Eigenschaft darstellen: Es könnte darauf hinweisen, dass die initiale Hypoxie nicht ausgeprägt genug gewesen ist, um einen RGC-Verlust zu verursachen. Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit nicht die initiale Hypoxie nach Implantation ist, sondern die chronische Hypoperfusion, ist die Aussagefähigkeit dieser Studie vermutlich nicht beeinträchtigt.

Es lässt sich feststellen, dass zwischen den bisherigen Studien teils Unterschiede in den morphologischen Veränderungen nach BCCAO auftraten. Diese sind möglicherweise auf den Grad der Hypoperfusion, das Tiermodell und den Zeitpunkt der Untersuchung zurückzuführen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es nach BCCAO zu einem progressiven Schaden der Retina kommt, der sich über einen längeren Zeitraum erstreckt

und in unserer Arbeit primär die Synapsen zwischen Photorezeptoren und Bipolar- und Horizontalzellen betraf.

4.3 Erhöhte Anzahl an mononukleären Phagozyten nach BCCAO

Wir beobachteten 6 Wochen nach BCCAO in Sagittalschnitten von „schwer betroffenen“ Tieren eine erhöhte Anzahl an Iba1-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die MP waren vor allem in der OPL, der IPL und der GCL lokalisiert. Dies entspricht der physiologischen Verteilung der Mikroglia [10,11].

Yamamoto et al. beschrieben in der Retina von Ratten eine Akkumulation von Mikrogliazellen in der inneren Retina (INL, IPL), die unmittelbar nach Intervention auftrat (6 und 24 Stunden) und nach einer Woche einen Höhepunkt erreichte. Nach zwei Monaten waren nur noch wenige Mikrogliazellen zu verzeichnen [134].

Abraham et al. beobachteten im Gehirn von Ratten eine Aktivierung der Mikroglia nach transienter, milder Ischämie im Gehirn. Sie bezeichneten Mikrogliazellen als sensiblen Indikator für milde Ischämien, welche keinen direkten neuronalen Zelltod zur Folge haben [137].

Es ist möglich, dass es im Rahmen von retinalen Schädigungen zu einer Einwanderung von systemischen Monozyten (bone marrow derived cells) über die retinale Vaskulatur kommt, welche einen Mikroglia-ähnlichen Phänotypen annehmen [20,21,138]. Methodisch war jedoch keine Unterscheidung zwischen eingewanderten systemischen Makrophagen und lokalen Mikrogliazellen möglich, da Iba1 sowohl von Makrophagen als auch Mikrogliazellen exprimiert wird [132].

Die meisten MP in „schwer betroffenen“ Augen waren ramifiziert, wobei sich teils reaktive/amöboide Zellen vorfanden, während sich in der Kontrollgruppe keine solche Zellen befanden.

4.4 Genexpressions-Profil nach BCCAO

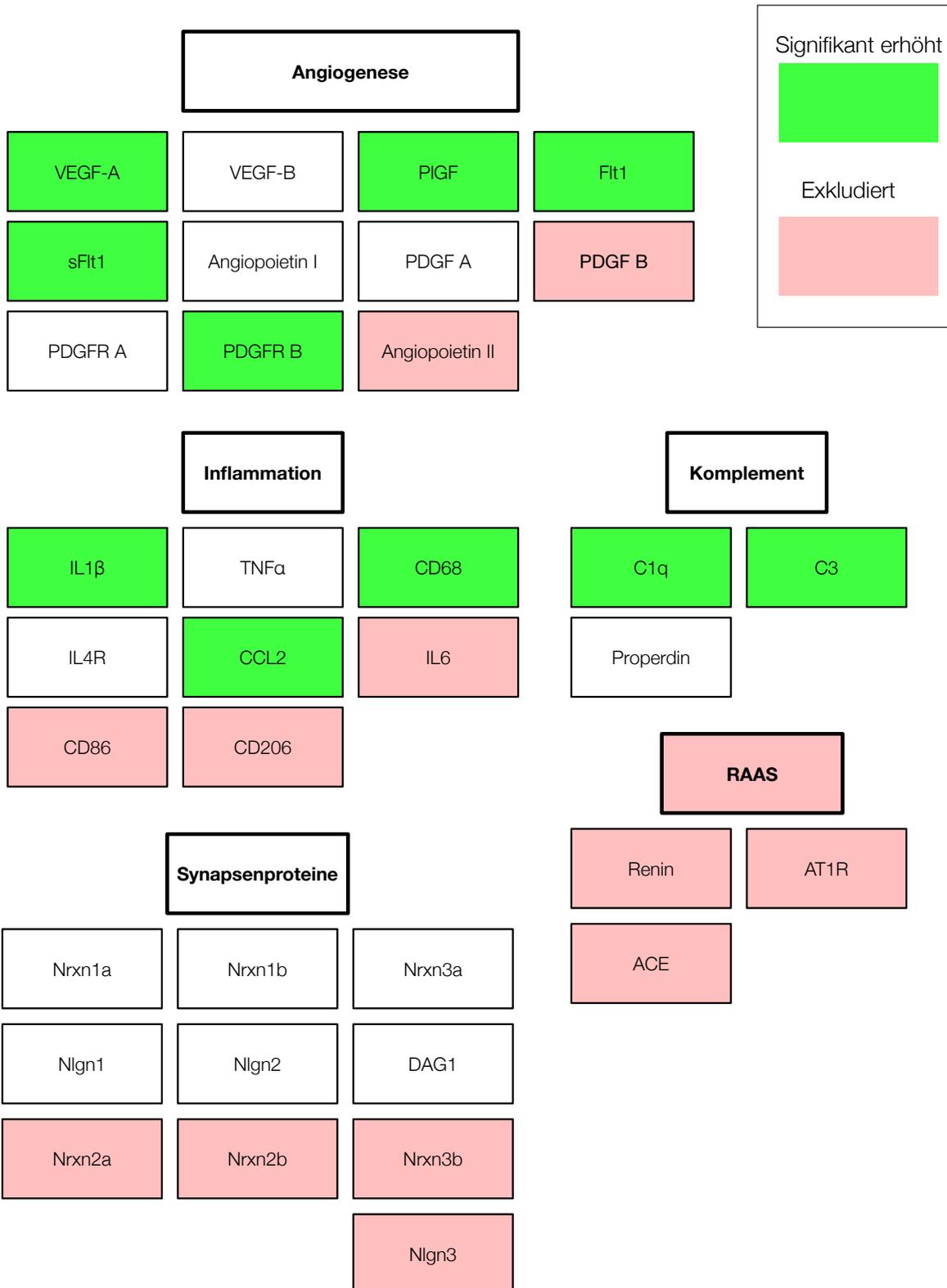


Abbildung 21: Sämtliche untersuchte Gene dieser Arbeit.

Die Farblegende bezieht sich auf den Vergleich von „schwer betroffenen“ Augen und der Kontrollgruppe. Rot hinterlegte Gene wurden aus methodischen Gründen exkludiert. Grün hinterlegte Gene zeigten sich signifikant hochreguliert. Weiße Gene zeigten keine signifikante Veränderung. Eine Messung des Renin-Angiotensin-Systems (als RAAS in der Abbildung abgekürzt) konnte nicht realisiert werden (siehe Kapitel 4.5.3 Diskussion der qPCR)

4.4.1 Genexpression von Inflammationsmarkern

Wir stellten 6 Wochen nach BCCAO in „schwer betroffenen“ Augen eine erhöhte Genexpression von IL-1 β , CCL2 und CD68 fest. TNF α und IL4R zeigten sich unverändert. Zwischen „leicht betroffenen“ oder „nicht betroffenen“ Augen und der Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

IL-1 β , CCL2 und CD68 sprechen für ein inflammatorisches Geschehen und die Präsenz von mononukleären Phagozyten. Das Chemokin CCL2 ist in der Lage durch Bindung an CCR2 auf MP eine Rekrutierung zu bewirken [34]. CD68 wird von mononukleären Phagozyten exprimiert [35]. Die Expression des M2-Markers IL4R zeigte sich nicht erhöht. Insgesamt spricht das Expressionsprofil 6 Wochen nach BCCAO somit für ein proinflammatorisches Geschehen in „schwer betroffenen“ Augen. Diese Ergebnisse korrelieren mit der Beobachtung, dass sich in den histologischen Sagittalschnitten vermehrt Iba1-positive MP befinden.

4.4.2 Genexpression von angiogenetischen Wachstumsfaktoren

Im Vergleich mit der Kontrollgruppe konnten wir in „schwer betroffenen“ Tieren nach 6 Wochen eine erhöhte Genexpression von VEGF-A, PlGF, Flt1, sFlt1 und PDGFRB feststellen. PDGFRA, PDGFA, VEGF-B und Angiopoietin I zeigten sich nicht signifikant verändert.

4.4.2.1 VEGF und Aktivierung/Rekrutierung von mononukleären Phagozyten (MP)

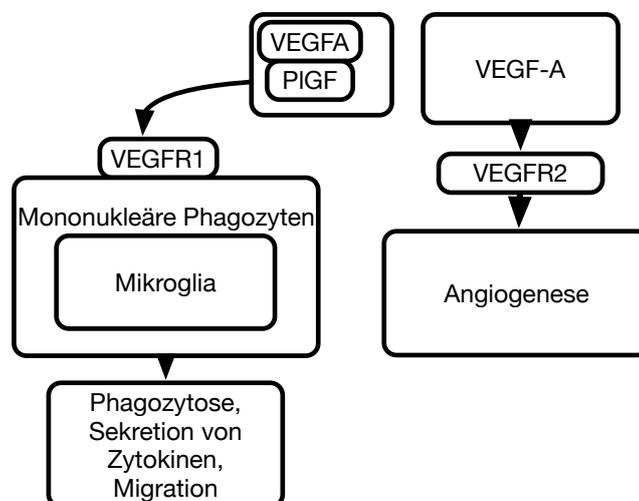


Abbildung 22: Wirkmechanismen von VEGF

Diskussion

MP exprimieren Flt1 und eine Bindung durch die Liganden VEGF-A oder PlGF führt zu einer Aktivierung und Rekrutierung [65]. In dieser Arbeit waren PlGF, VEGF-A und Flt1 in „schwer betroffenen“ Tieren hochreguliert.

Eine Beteiligung des PlGF/Flt1-Pathways wurde für chronisch inflammatorische ophthalmologische Erkrankungen beschrieben. Crespo et al. beschrieben, dass es in einem Tiermodell der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) zu einer Akkumulation von MP und einer erhöhten Expression von VEGF-A und PlGF kommt. Nach Applikation von Anti-PlGF oder Aflibercept (VEGF-A/PlGF-Trap) kam es zu einer geringeren Rekrutierung von MP, wobei Aflibercept einen größeren Effekt aufwies [128]. Balsler et al. beobachteten nach Aflibercept-Applikation eine verminderte Rekrutierung von sowohl retinaler Mikroglia als auch Makrophagen. Anti-VEGF-A führte zu keiner Veränderung. Aflibercept führte außerdem zu einer geringeren Sekretion von VEGF-A und PlGF durch MP und geringeren Proteinkonzentrationen an IL-1 β und IL6 [139].

Im Krankheitsbild der diabetischen Retinopathie wurden in Augen von Patienten erhöhte PlGF-Spiegel beobachtet [140]. Van Bergen et al. zeigten, dass die intravitreale Anwendung von anti-PlGF oder Aflibercept im Streptozotocin-Mausmodell (Modell der diabetischen Retinopathie) zu einer Abnahme der Mikroglia/Makrophagen-Akkumulation führte. Anti-VEGFR2 zeigte keinen vergleichbaren Effekt [141].

Vor dem Hintergrund dieser Studien besteht die Möglichkeit, dass im BCCAO-Modell eine Aktivierung von Flt1 über PlGF und VEGF-A zur Rekrutierung und Aktivierung von MP geführt hat. Die erhöhte Zahl an MP 6 Wochen nach BCCAO könnte damit in einem Zusammenhang stehen.

4.4.2.2 Vascular Remodelling nach BCCAO

Im Rahmen dieser Arbeit wurden molekulare Marker untersucht, welche mit einem Vascular Remodelling assoziiert sind. Zu diesen zählen Wachstumsfaktoren wie Angiopoietin I/II, PDGF-A/B, PDGFR-A/B, VEGFA, VEGFR1/2 und Chemokine wie CCL2 [100,105].

Nach BCCAO kommt es durch Vascular Remodelling im verterobasilären Stromgebiet zu einer Normalisierung des zerebralen Blutflusses [142]. Eine Bildung von Kollateralen und eine Erhöhung des Durchmessers sind auch für weitere große zerebraler Arterien beschrieben [143]. Es stellt sich folglich die Frage, ob es analog in der Retina zu einem Vascular Remodelling kommt.

Unsere Arbeitsgruppe beobachtete funduskopisch und histologisch eine Zunahme des Durchmessers der großen oberflächlichen retinalen Venen sowie eine Zunahme der Tortuosität. Die großen oberflächlichen Arterien zeigten sich jedoch nicht verändert [1]. Die Hypothese des Vascular Remodellings war deshalb von Interesse, da unsere Arbeitsgruppe eine Assoziation mit MP beobachtete, welche um die oberflächlichen großen Venen akkumulierten [1].

Ein Beitrag von Monozyten/Makrophagen zum Vascular Remodelling der Arterien ist bekannt [144]. Vermittelt durch Shear Stress kommt es durch Expression von Zytokinen durch Endothelzellen und Vascular Smooth Muscle Cells zur Rekrutierung von Monozyten (z.B. CCL2, TNF α) [101]. Makrophagen können ein proinflammatorisches Milieu erzeugen und sekretieren Wachstumsfaktoren und proinflammatorische Zytokine [102–104]. Diese Zellen tragen auf diese Weise zum Gefäßumbau bei. Vascular Smooth Muscle Cells und Endothelzellen proliferieren, wodurch es zu einer Zunahme des Durchmessers der Kollaterale kommt [105,106].

In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Zytokinen und angiogenetischen Wachstumsfaktoren sowie eine erhöhte Zahl an MP beobachtet. An diesem Punkt ist es jedoch nicht möglich von der Genexpression auf ein Vascular Remodelling im Sinne einer Arteriogenese zu schließen, zumal es in unseren Versuchen zu keinem entsprechenden Umbau der Arterien kam [1]. Warum es zu einer Zunahme des Venendurchmessers kam, ist unklar. Die Veränderungen der retinalen Gefäßstruktur, welche unsere Arbeitsgruppe beobachtete, sind jedoch vereinbar mit der funduskopischen Manifestation der vaskulären Demenz. Diese ist assoziiert mit einer Zunahme des retinalen Venendurchmessers, des arteriovenösen Quotienten und der Tortuosität der oberflächlichen großen Venen [145,146].

Sowohl der vaskulären Demenz als auch den retinalen vaskulären Veränderungen scheint eine moderate Hypoperfusion zugrunde zu liegen. Potenziell ist es somit möglich anhand einer funduskopischen Beurteilung der Gefäße auf den vaskulären Zustand des Gehirns zu schließen [147].

Weitere Studien sind zur Abklärung notwendig. So wäre es denkbar die Aktivität und Rekrutierung der MP zu inhibieren, mit der Frage, ob die Zunahme des Venendurchmessers weiterhin persistiert. Dies würde klären, ob die MP an einem Umbau der Gefäße beteiligt waren (Siehe Kapitel Ausblick).

4.4.3 Genexpression von C1q, C3 und Properdin

In der vorliegenden Arbeit wurde 6 Wochen nach BCCAO eine Hochregulation der Genexpression von C1q und C3 in der „schwer betroffenen“ BCCAO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen. Properdin zeigte sich hingegen unverändert (alternativer Weg). Zwischen „nicht betroffenen“ oder „leicht betroffenen“ Augen und der Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. C1q spricht für eine erhöhte Expression des klassischen Weges, C3 für eine allgemeine erhöhte Expression des Komplementsystems (bzw. jeden der drei Pfade) [73].

Die Bedeutung des Komplementsystems in der Retina nach moderater Hypoperfusion mittels BCCAO ist bislang nicht erforscht. Wir stellten die Hypothese auf, dass es nach BCCAO zu einer Wiederaufnahme des Synapse Pruning kommt, also der postnatalen Aktivitäts-abhängigen Aussortierung von Synapsen [85,93,94]. Durch eine dysregulierte Hochregulation von C1q und C3 könnte es zu einem ausgeprägten Verlust von Synapsen kommen, welcher sich im Verlust der OPL widerspiegelt. Folge sind Einschränkungen der elektrophysiologischen Funktion, wie sie unsere Arbeitsgruppe beobachten konnte [1]. Vermittelt wird die Phagozytose über eine Bindung von C3-Spaltprodukten an den Complement Receptor 3 (CR3) der Mikroglia [85,93,94]. Dafür spricht die Zunahme der Anzahl an MP und eine räumliche Assoziation mit den Synapsen, da sich die MP 6 Wochen nach BCCAO in der OPL und IPL befinden.

In verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wird Synapse Pruning bereits als Ursache von Synapsenuntergängen und folglich kognitiven Veränderungen diskutiert. Im Glaukom und in der Alzheimer-Demenz ist eine erhöhte Aktivität des Komplementsystems mit einem Synapsenuntergang assoziiert, noch bevor es zu einem Zellverlust kommt [93,148].

Die erhöhte C3-Expression könnte des Weiteren über Aktivierung von C3aR, die erhöhte Zahl an MP verursacht haben. C1q initiiert den klassischen Weg des Komplementsystems, der zur Expression von C3 führt. Die Anaphylatoxine C3a und C5a werden als Teil dieser Kaskade freigesetzt und führen zu Vasodilatation, erhöhter Permeabilität der Blutgefäße, Chemotaxis von Immunzellen und Aktivierung von Makrophagen. Anaphylatoxine entfalten ihre Wirkung über Bindung an die Rezeptoren C3a-Rezeptor (C3aR), C5a-Rezeptor (C5aR) und chemoattractant receptor-like protein C5L2 [77,83,149]. C3aR und C5aR werden von Mikrogliazellen/Makrophagen exprimiert [76,150].

Das Opsonin C3b fungiert als Ligand für CR1 auf Mikrogliazellen und eine Bindung führt zur Sekretion von TNF α , IL-1 β und Superoxiden [86,87]. 6 Wochen nach BCCAO kam es in dieser Arbeit ebenfalls zu einer Hochregulation von IL-1 β , sodass auch dieser Pathway einen potenziellen Mechanismus darstellt.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass das Komplementsystem einen möglichen Mediator für die retinale Degeneration nach BCCAO darstellt und sich als potenzieller Ansatzpunkt für künftige Therapien erweisen könnte.

4.4.4 Genexpression von synaptischen Adhäsionsproteinen

Da wir in der BCCAO-Gruppe einen Verlust von Synapsen in der OPL vermutet haben, wurde erörtert, ob Veränderungen in der Expression von synaptischen Adhäsionsproteinen einen Beitrag geleistet haben. Die Genexpression der Neurexine und Neuroligine zeigte sich jedoch durch die BCCAO unbeeinträchtigt. Eine Untersuchung dieser Gene war deshalb von Interesse, da es in neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimerdemenz zu einem Synapsenverlust kommt, der mit Erniedrigung der Expression von Neurexinen und Neuroliginen in Zusammenhang gebracht wird [151,152].

4.4.5 Renin-Angiotensin-System

Eine Untersuchung des Renin-Angiotensin-Systems mittels qPCR und Immunhistochemie konnte aus methodischen Gründen nicht realisiert werden (siehe Kapitel 4.5.3 Diskussion der qPCR).

In gesunden Mausaugen ist es an sich möglich Komponenten des RAS mittels PCR zu detektieren [153,154]. Das okuläre RAS, dessen Komponenten lokal exprimiert werden und nachgewiesen werden können, existiert getrennt vom systemischen RAS [153]. Es ist unter anderem an der Regulation der okulären Perfusion und des Augeninnendrucks beteiligt [155].

Eine erhöhte Expression der RAS-Komponenten wird mit inflammatorischen Krankheitsbildern der Retina wie der diabetischen Retinopathie und der Retinopathia praematurorum in Zusammenhang gebracht [156].

Es wird zudem angenommen, dass das Renin-Angiotensin-System einen Beitrag zu neurologischen Schäden nach zerebraler Hypoperfusion leistet. Dong et al. stellten in C57BL/6J-Mäusen nach BCCAO fest, dass es zu einer erhöhten Aktivität von Renin und Angiotensinogen im Gehirn kam, was auf eine erhöhte Expression durch Astrozyten und

Diskussion

Gefäße zurückgeführt wurde [157]. Der Renin-Antagonist Aliskiren war in der Lage oxidativen Stress, Gliazellaktivierung, White Matter Lesions und kognitive Einschränkungen zu reduzieren [157]. Zur Retina existieren diesbezüglich bislang keine Studien.

4.5 Diskussion der Methodik

Es handelt sich bei dieser Arbeit um eine Querschnittsuntersuchung, die den Zustand zu einem einzelnen Zeitpunkt widerspiegelt. Die Dynamik der gemessenen Parameter zu früheren Zeitpunkten oder zu theoretischen späteren Zeitpunkten ist somit nicht einsehbar und es ist möglich, dass nach 6 Wochen viele Prozesse bereits abgeschlossen sind. Des Weiteren konnte diese Arbeit in erster Linie nur eine Korrelation zwischen veränderten Biomarkern und der Krankheitsprogression feststellen.

4.5.1 Validität der murinen BCCAO

In den bisherigen Studien wurden bevorzugt Wistar-Ratten eingesetzt [122,123,127,134], da Ratten eine große Ähnlichkeit zur menschlichen Vaskulatur aufweisen [158]. In dieser Arbeit wurden hingegen C57/Bl6- und MacGreen-Mäuse (B6N.Cg-Tg(Csf1r-EGFP)) verwendet. Der Vorteil von Mausmodellen liegt in den vielfältigeren bestehenden Möglichkeiten der genetischen Manipulation [159]. Im Gegensatz zu Ratten bilden Mäuse kein oder nur ein schwaches Kollateral mit Verbindung zur Basilarisarterie aus, da die Arteria communicans posterior im Vergleich schwach ausgeprägt ist [160,161]. Eine Folge ist eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber hypoxischen Zuständen im Gehirn [161]. Bisherige Studien deuten allerdings darauf hin, dass es unter Einsatz von C57/Bl6-Mäusen ebenfalls zur einer moderaten, persistierenden Hypoperfusion des Gehirns kommt [124,125,162].

4.5.2 Hohe interindividuelle Variabilität der Ergebnisse

Vergleicht man "nicht betroffene" Tiere, die sich sowohl im ERG, als auch in molekularbiologischen Untersuchungen, nicht von Sham-Tieren unterscheiden lassen, mit "schwer betroffenen" Tieren, stellt sich die Frage, wie nach dem gleichen Eingriff derart große Unterschiede entstehen können. „Leicht betroffene“ Tiere wiesen im Vergleich mit „schwer betroffenen“ Tieren deutlich mildere Veränderungen auf.

Es ist möglich, dass Unterschiede in der Handhabung der Tiere und der Operation eine Rolle gespielt haben. Es wäre eine Messung des Blutflusses mittels Laser-Doppler notwendig, um dies genauer zu untersuchen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass "leicht betroffene" Tiere einen verzögerten Beginn der retinalen Veränderungen aufweisen und nach längerer Liegedauer einen ähnlichen Phänotyp wie "schwer betroffene" Tiere annehmen würden. Diese Frage könnte durch weitere Experimente mit längerer Liegedauer beantwortet werden.

Eine weitere mögliche Ursache für die interindividuellen Unterschiede könnte die Gefäßversorgung darstellen. Nach Induktion der BCCAO entsteht eine ersatzweise Blutversorgung durch den Circulus arteriosus cerebri. Diese Gefäße sind bei jedem Individuum unterschiedlich ausgeprägt [114].

Da man in der klinischen Praxis ebenfalls mit einer großen Variabilität der Krankheitsbefunde konfrontiert wird, stellt diese Heterogenität eine wünschenswerte Eigenschaft im Sinne der translationalen Forschung dar. Diese basiert auf der Identifikation von Pathomechanismen in vivo und der Beobachtung der Krankheitsentwicklung mit der Absicht eine bessere Abbildung der klinischen Realität zu schaffen.

4.5.3 Diskussion der qPCR

Die quantitative PCR stellt eine zuverlässige Methode dar, vorausgesetzt die Durchführung erfolgt technisch einwandfrei. Die Expression mancher Gene konnte in dieser Arbeit nicht detektiert werden, weshalb diese aus der Arbeit ausgeschlossen wurden.

So war ursprünglich eine Untersuchung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) als Teil dieser Arbeit beabsichtigt. Es gelang jedoch weder eine Quantifizierung der RAS-Komponenten (Renin, ACE, AT1R) in der qPCR noch ein Nachweis in der Immunhistochemie. Des Weiteren konnten folgende Gene ebenfalls nicht in der qPCR detektiert werden: Angiopoietin II, PDGF-B, CD86, CD206, Nrnx2a, Nrnx2b, Nrnx3b, Nlgn3 (siehe Abbildung 21).

Unter anderem könnte dies durch technische Limitationen bedingt sein, da sich aus der murinen Retina nur eine begrenzte Menge an mRNA gewinnen lässt, sodass nicht ausreichend Template pro Reaktion verwendet werden konnte. Im Rahmen weiterer Experimente wäre es denkbar höhere Mengen an mRNA zu verwenden. Von einem

Versagen der Primerpaare ist nicht auszugehen, da in der Etablierung der PCRs mehrere Primerpaare erprobt worden sind.

Bei der Auswertung der Genexpression ist zu beachten, dass das Template jeweils aus der gesamten Retina stammt und viele untersuchte Gene von unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden. Beispielsweise werden viele M1- und M2-Gene nicht nur von MP exprimiert, sondern auch von anderen Zellen des ZNS [163]. Entsprechend ist es nicht möglich nachzuweisen, welche Zelltypen für eine veränderte Expression verantwortlich sind. Des Weiteren kann es durch die Vielfalt an Zellen zu einem „Verdünnungseffekt“ gekommen sein, der die Expression einer Zellpopulation weniger deutlich ausfallen lässt.

4.5.4 Weitere Bemerkungen zur Durchführung der qPCR

Teilweise wurde neben einem spezifischen Signal ein unspezifisches Primer-Dimer Signal detektiert. In vielen Fällen ließ sich das Problem durch eine Anwendung neuer Primer, Erniedrigung der Primer-Konzentration, Pipettieren auf Eis, Erhöhung der cDNA-Menge oder durch Umstellung des Mastermixes lösen. Wichtig ist selbstverständlich, dass die Einstellungen für alle Reaktionen eines Primerpaars gleich gehalten wurden. Trotz Angabe des Herstellers, dass ein Pipettieren bei Raumtemperatur aufgrund der Hitzestart-Reaktion möglich ist, sollte dennoch auf Eis pipettiert werden, da es insbesondere bei schwächer exprimierten Genen zu dramatischen Unterschieden kam, da es bei Raumtemperatur zur exzessiven Bildung von Primer-Dimern kommt. Bestanden die Primer-Dimer nach Optimierung weiterhin wurde das Zielgen aus der Untersuchung ausgeschlossen. Für das Erreichen einer geringen Standardabweichung innerhalb eines Triplets einer cDNA-Primer-Kombination ist die ausreichende Homogenisierung der Reaktion von größter Bedeutung. Da die Durchführung einer qPCR mittels Rotorgene Q nur eine maximale Anzahl an 72 Reaktionen pro Lauf zulässt, war es aufgrund der hohen Anzahl an Reaktionen für ein einziges Primerpaar notwendig die Reaktionen auf mehrere Platten zu verteilen. In diesen Fällen ist es ratsam eine Referenzreaktion aus einer bekannten cDNA-Primer-Kombination auf allen Platten mitlaufen zu lassen, um Variationen zwischen den Läufen festzustellen. In dieser Arbeit fielen diese Unterschiede nicht ins Gewicht. Trotzdem ist es ratsam innerhalb einer Platte die unterschiedlichen Betroffenheitsgrade der Augen gleichmäßig zu verteilen, sodass eine mögliche technische Variabilität sich auf alle Gruppen gleichermaßen auswirkt. Zielgene mit signifikantem Unterschied wurden zur Evaluation der Reliabilität wiederholt.

4.5.5 Immunhistochemische Untersuchung der Retina

Anhand immunhistochemischer Versuche wurde das Vorkommen von Renin, C1q, C3 und PIGF geprüft. Ein Unterschied zwischen BCCAO-Tieren und Sham-Tieren ließ sich auf diese Weise nicht feststellen. Ein Erklärungsansatz hierfür ist eine technische Limitation der Untersuchung. Es könnte sein, dass der Deparaffinierungsprozess die Detektion der Epitope durch den Primärantikörper erschwert hat. In weiteren Versuchen wäre somit die Anwendung alternativer Fixantien oder die Wahl von Gefrierschnitten zu erwägen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Wahl des Untersuchungszeitraumes. So ist es möglich, dass nach 6 Wochen die molekularen Prozesse bereits abgeschlossen sind und sich die Proteinexpression bereits wieder normalisiert hat.

Eine mögliche Ursache der Abwesenheit von detektierbaren Proteinen in der Immunfluoreszenz ist zudem die teils niedrige Korrelation zwischen mRNA-Expression und Proteinexpression. Die Korrelation lag in diversen Studien mitunter bei nur 0,4 zwischen Transkript und Protein [164–166]. Nach der Entstehung von mRNA wird die tatsächliche Expression von Proteinen von post-transkriptionalen Prozessen beeinflusst. Des Weiteren spielt die Degradation von Proteinen eine Rolle [167,168].

Weitere Untersuchungen sind entsprechend notwendig, bevor eindeutige Schlüsse gezogen werden können.

4.6 Ausblick

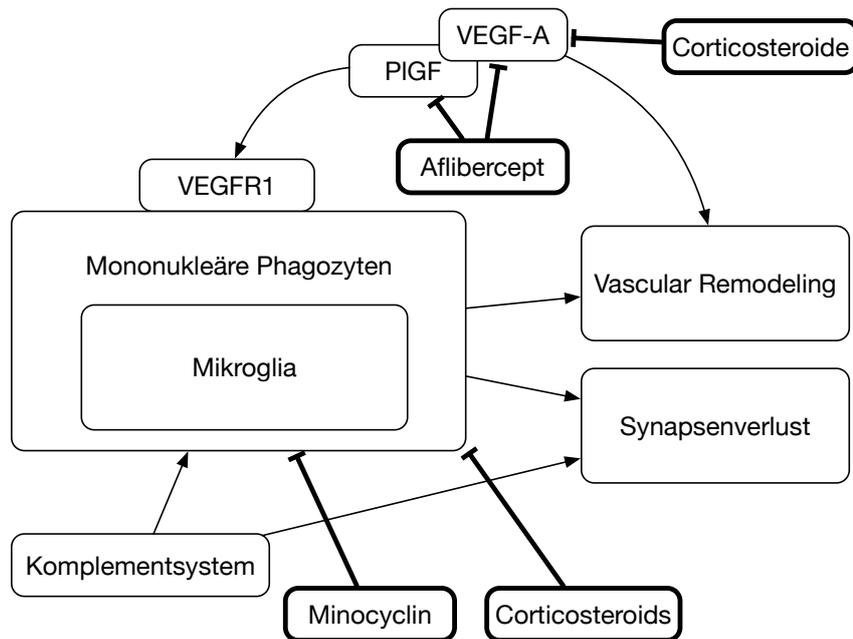


Abbildung 23: Potenzielle therapeutische Ansätze im BCCAO-Modell

Die BCCAO erlaubt uns die flexible Untersuchung der chronischen retinalen Hypoperfusion zu beliebigen Zeitpunkten mittels In-vivo- und Ex-vivo-Methoden. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht potenzielle molekulare Vorgänge zu identifizieren, die mit den zellulären Veränderungen zusammenhängen. Es wäre denkbar weitere BCCAO-Experimente mit unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten durchzuführen. Eine Untersuchung der Gen- und Proteinexpression zu früheren Zeitpunkten könnte den Zustand während akuter Prozesse wiedergeben, die nach 6 Wochen womöglich bereits abgeschlossen sind.

Ein weiterer naheliegender Schritt wäre die Durchführung von Interventionsstudien mit Applikation eines Medikaments, mit der Frage, ob es zu einer Verhinderung der retinalen Veränderungen kommt. In ischämischen Krankheitsbildern der Retina wie dem retinalen Venenverschluss hat sich unter anderem die Applikation von Kortikosteroiden und Anti-VEGF als Therapie etabliert [169,170]. Kortikosteroide sind in der Lage die Expression von VEGF-A zu reduzieren, was zu einer Abnahme der vaskulären Permeabilität führt [171,172]. Des Weiteren kommt es zu einer antiinflammatorischen Wirkung und einer reduzierten Migration von Leukozyten [173]. Darüber hinaus ist die Anwendung von antiangiogenen Therapeutika von Interesse. Bei Aflibercept handelt es sich um ein rekombinantes Fusionsprotein, das aus den Domänen der Rezeptoren Flt1 (VEGFR1) und VEGFR2 besteht (VEGF-Trap). Im Vergleich zu Bevacizumab (Anti-VEGF-A) ist

Aflibercept in der Lage neben VEGF-A auch PlGF zu blockieren. In vergangenen Studien konnte auf diese Weise die Rekrutierung von Mikrogliazellen abgeschwächt werden [56,128,139].

Ein weiterer potenzieller therapeutischer Angriffspunkt stellt die Mikroglia dar. Potenzielle Therapeutika sind spezifische Inhibitoren der Mikroglia wie Minozyklin oder Modulatoren des Komplementsystems [174,175].

5 Literaturverzeichnis

1. Crespo-Garcia S, Reichhart N, Skosyrski S, Foddiss M, Wu J, Figura A, Herrspiegel C, Fächtemeier M, Sassi C, Dirnagl U, Jousseaume AM, Strauss O. *Individual and Temporal Variability of the Retina after Chronic Bilateral Common Carotid Artery Occlusion (BCCAO)*. Vol 13. Public Library of Science; 2018. doi:10.1371/journal.pone.0193961
2. Caprara C, Grimm C. From oxygen to erythropoietin: Relevance of hypoxia for retinal development, health and disease. *Prog Retin Eye Res*. 2012;31(1):89-119. doi:10.1016/j.preteyeres.2011.11.003
3. Streilein JW. Ocular immune privilege: Therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(11):879-889. doi:10.1038/nri1224
4. Zhou R, Caspi RR. Ocular immune privilege. *F1000 Biol Rep*. 2010;2(1). doi:10.3410/B2-3
5. Arnold T, Betsholtz C. The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. *Vasc Cell*. 2013;5(1). doi:10.1186/2045-824X-5-4
6. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FMV. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*. 2007;10(12):1538-1543. doi:10.1038/nn2014
7. O'Koren EG, Yu C, Klingeborn M, Wong AYW, Prigge CL, Mathew R, Kalnitsky J, Msallam RA, Silvin A, Kay JN, Bowes Rickman C, Arshavsky VY, Ginhoux F, Merad M, Saban DR. Microglial Function Is Distinct in Different Anatomical Locations during Retinal Homeostasis and Degeneration. *Immunity*. 2019;50(3):723-737.e7. doi:10.1016/j.immuni.2019.02.007
8. Helms K, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011;91(2):461-553. doi:10.1152/physrev.00011.2010
9. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Neuroscience: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (80-)*. 2005;308(5726):1314-1318. doi:10.1126/science.1110647
10. Hume DA, Perry VH, Gordon S. Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: Phagocytosis of dying neurons and differentiation in microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J Cell Biol*. 1983;97(1):253-257. doi:10.1083/jcb.97.1.253
11. Boya J, Calvo J, Carbonell AL. Appearance of Microglial Cells in the Postnatal Rat Retina. *Arch Histol Jpn*. 1987;50(2):223-228. doi:10.1679/aohc.50.223
12. Lee JE, Liang KJ, Fariss RN, Wong WT. Ex vivo dynamic imaging of retinal microglia using time-lapse confocal microscopy. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(9):4169-4176. doi:10.1167/iovs.08-2076
13. Wang X, Zhao L, Zhang J, Fariss RN, Ma W, Kretschmer F, Wang M, Qian HH, Badea TC, Diamond JS, Gan WB, Roger JE, Wong WT. Requirement for microglia for the maintenance of synaptic function and integrity in the mature retina. *J Neurosci*. 2016;36(9):2827-2842. doi:10.1523/JNEUROSCI.3575-15.2016
14. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*. 2007;10(11):1387-1394. doi:10.1038/nn1997
15. Karlstetter M, Ebert S, Langmann T. Microglia in the healthy and degenerating retina: Insights from novel mouse models. *Immunobiology*. 2010;215(9-10):685-691. doi:10.1016/j.imbio.2010.05.010

16. Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*. 2010;468(7321):253-262. doi:10.1038/nature09615
17. Langmann T. Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol*. 2007;81(6):1345-1351. doi:10.1189/jlb.0207114
18. Chen M, Xu H. Parainflammation, chronic inflammation, and age-related macular degeneration. *J Leukoc Biol*. 2015;98(5):713-725. doi:10.1189/jlb.3ri0615-239r
19. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*. 2010;140(6):918-934. doi:10.1016/j.cell.2010.02.016
20. Yang P, De Vos AF, Kijlstra A. Macrophages in the retina of normal Lewis rats and their dynamics after injection of lipopolysaccharide. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(1):77-85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8550337>. Accessed April 3, 2020.
21. Kaneko H, Nishiguchi KM, Nakamura M, Kachi S, Terasaki H. Characteristics of bone marrow-derived microglia in the normal and injured retina. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(9):4162-4168. doi:10.1167/iovs.08-1738
22. O'Koren EG, Mathew R, Saban DR. Fate mapping reveals that microglia and recruited monocyte-derived macrophages are definitively distinguishable by phenotype in the retina. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep20636
23. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008;13(2):453-461. doi:10.2741/2692
24. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-969. doi:10.1038/nri2448
25. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013;229(2):176-185. doi:10.1002/path.4133
26. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13. doi:10.12703/P6-13
27. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-6173. doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166
28. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14-20. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008
29. Ransohoff RM. A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist. *Nat Neurosci*. 2016;19(8):987-991. doi:10.1038/nn.4338
30. Gomez-Nicola D, Perry VH. Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: A paradigm of functional plasticity. *Neuroscientist*. 2015;21(2):169-184. doi:10.1177/1073858414530512
31. Deng YY, Lu J, Ling EA, Kaur C. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) produced via NF- κ B signaling pathway mediates migration of amoeboid microglia in the periventricular white matter in hypoxic neonatal rats. *Glia*. 2009;57(6):604-621. doi:10.1002/glia.20790
32. Zhou Y, Ling E-A, Dheen ST. Dexamethasone suppresses monocyte chemoattractant protein-1 production via mitogen activated protein kinase phosphatase-1 dependent inhibition of Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in activated rat microglia. *J Neurochem*. 2007;102(3):667-678. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04535.x
33. Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in

- CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(22):12053-12058. doi:10.1073/pnas.94.22.12053
34. Ransohoff RM. Chemokines and Chemokine Receptors: Standing at the Crossroads of Immunobiology and Neurobiology. *Immunity*. 2009;31(5):711-721. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.010
 35. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev Y V. CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Lab Invest*. 2017;97(1):4-13. doi:10.1038/labinvest.2016.116
 36. Hendrickx DAE, van Eden CG, Schuurman KG, Hamann J, Huitinga I. Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *J Neuroimmunol*. 2017;309:12-22. doi:10.1016/j.jneuroim.2017.04.007
 37. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(22):10705-10709. doi:10.1073/pnas.90.22.10705
 38. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004;25(4):581-611. doi:10.1210/er.2003-0027
 39. Karkkainen MJ, Mäkinen T, Alitalo K. Lymphatic endothelium: A new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol*. 2002;4(1):E2-E5. doi:10.1038/ncb0102-e2
 40. Dvorak HF. Angiogenesis: Update 2005. In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Vol 3. John Wiley & Sons, Ltd; 2005:1835-1842. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01361.x
 41. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci*. 2005;109(3):227-241. doi:10.1042/CS20040370
 42. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - In control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(5):359-371. doi:10.1038/nrm1911
 43. Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol*. 2000;184(3):301-310. doi:10.1002/1097-4652(200009)184:3<301::AID-JCP3>3.0.CO;2-H
 44. Zhang F, Tang Z, Hou X, et al. VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(15):6152-6157. doi:10.1073/pnas.0813061106
 45. Reichelt M, Shi S, Hayes M, Kay G, Batch J, Gole GA, Browning J. Vascular endothelial growth factor-B and retinal vascular development in the mouse. *Clin Exp Ophthalmol*. 2003;31(1):61-65. doi:10.1046/j.1442-9071.2003.00602.x
 46. Li Y, Zhang F, Nagai N, et al. VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. *J Clin Invest*. 2008;118(3):913-923. doi:10.1172/JCI33673
 47. Carmeliet P, Moons L, Lutun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*. 2001;7(5):575-583. doi:10.1038/87904
 48. Lutun A, Tjwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PLGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med*. 2002;8(8):831-840. doi:10.1038/nm731
 49. Dewerchin M, Carmeliet P. PIGF: A multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(8).

doi:10.1101/cshperspect.a011056

50. Rakic JM, Lambert V, Devy L, Luttun A, Carmeliet P, Claes C, Nguyen L, Foidart JM, Noël A, Munaut C. Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(7):3186-3193. doi:10.1167/iovs.02-1092
51. Ando R, Noda K, Namba S, Saito W, Kanda A, Ishida S. Aqueous humour levels of placental growth factor in diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol.* 2014;92(3):e245-e246. doi:10.1111/aos.12251
52. Noma H, Mimura T, Yasuda K, Shimura M. Role of soluble vascular endothelial growth factor receptor signaling and other factors or cytokines in central retinal vein occlusion with macular edema. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(2):1122-1128. doi:10.1167/iovs.14-15789
53. Miyamoto N, De Kozak Y, Normand N, Courtois Y, Jeanny JC, BenEzra D, Behar-Cohen F. PIGF-1 and VEGFR-1 pathway regulation of the external epithelial hemato-ocular barrier: A model for retinal edema. *Ophthalmic Res.* 2008;40(3-4):203-207. doi:10.1159/000119877
54. Kowalczyk L, Touchard E, Omri S, Jonet L, Klein C, Valamanes F, Berdugo M, Bigey P, Massin P, Jeanny JC, Behar-Cohen F. Placental growth factor contributes to micro-vascular abnormalization and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *PLoS One.* 2011;6(3). doi:10.1371/journal.pone.0017462
55. Incio J, Tam J, Rahbari NN, et al. PIGF/VEGFR-1 signaling promotes macrophage polarization and accelerated tumor progression in obesity. *Clin Cancer Res.* 2016;22(12):2993-3004. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1839
56. Huang H, Parlier R, Shen J kui, Luttu GA, Vinoses SA. VEGF Receptor Blockade Markedly Reduces Retinal Microglia/Macrophage Infiltration into Laser-Induced CNV. *PLoS One.* 2013;8(8):e71808. doi:10.1371/journal.pone.0071808
57. Roncal C, Buyschaert I, Gerdes N, Georgiadou M, Ovchinnikova O, Fischer C, Stassen JM, Moons L, Collen D, De Bock K, Hansson GK, Carmeliet P. Short-term delivery of anti-PIGF antibody delays progression of atherosclerotic plaques to vulnerable lesions. *Cardiovasc Res.* 2010;86(1):29-36. doi:10.1093/cvr/cvp380
58. Perelman N, Selvaraj SK, Batra S, Luck LR, Erdreich-Epstein A, Coates TD, Kalra VK, Malik P. Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity. *Blood.* 2003;102(4):1506-1514. doi:10.1182/blood-2002-11-3422
59. Augustin AJ. Plazenta-Wachstumsfaktor (PIGF) und retinale Gefäßerkrankungen - experimentelle und klinische Datenlage. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2016;233(1):57-65. doi:10.1055/s-0041-108679
60. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999;79(4):1283-1316. doi:10.1152/physrev.1999.79.4.1283
61. Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(16):7533-7537. doi:10.1073/pnas.90.16.7533
62. Kdr F-L/, Park JE, Chen HH, Winer J, Houcks KA, Ferrarao N, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* 1994;269(41):25646-25654. doi:10.1016/s0021-9258(18)47298-5
63. Gille H, Kowalski J, Yu L, Chen H, Pisabarro MT, Davis-Smyth T, Ferrara N. A repressor sequence in the juxtamembrane domain of Flt-1 (VEGFR-1)

- constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3'-kinase activation and endothelial cell migration. *EMBO J.* 2000;19(15):4064-4073. doi:10.1093/emboj/19.15.4064
64. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med.* 2003;9(7):936-943. doi:10.1038/nm884
 65. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marmé D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood.* 1996;87(8):3336-3343. doi:10.1182/blood.v87.8.3336.bloodjournal8783336
 66. Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Röckl W, Waltenberger J, Risaut W. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem.* 1996;271(30):17629-17634. doi:10.1074/jbc.271.30.17629
 67. Ribatti D. The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: A historical review. *Angiogenesis.* 2008;11(3):215-221. doi:10.1007/s10456-008-9114-4
 68. Murakami M, Iwai S, Hiratsuka S, Yamauchi M, Nakamura K, Iwakura Y, Shibuya M. Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood.* 2006;108(6):1849-1856. doi:10.1182/blood-2006-04-016030
 69. Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): Novel therapeutic targets for angiogenic disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;979(1):80-93. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04870.x
 70. Clark DE, Smith SK, He Y, Day KA, Licence DR, Corps AN, Lammoglia R, Charnock-Jones DS. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod.* 1998;59(6):1540-1548. doi:10.1095/biolreprod59.6.1540
 71. Leonard F, Devaux Y, Vausort M, Ernens I, Rolland-Turner M, Wagner DR. Adenosine modifies the balance between membrane and soluble forms of Flt-1. *J Leukoc Biol.* 2011;90(1):199-204. doi:10.1189/jlb.0910505
 72. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature.* 2006;443(7114):993-997. doi:10.1038/nature05249
 73. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010;20(1):34-50. doi:10.1038/cr.2009.139
 74. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(10):729-740. doi:10.1038/nri2620
 75. Spitzer D, Mitchell LM, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin Can Initiate Complement Activation by Binding Specific Target Surfaces and Providing a Platform for De Novo Convertase Assembly. *J Immunol.* 2007;179(4):2600-2608. doi:10.4049/jimmunol.179.4.2600
 76. Davoust N, Nataf S, Holers VM, Barnum SR. Expression of the murine complement regulatory protein Crry by glial cells and neurons. *Glia.* 1999;27(2):162-170. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199908)27:2<162::AID-GLIA6>3.0.CO;2-K
 77. Anderson DH, Radeke MJ, Gallo NB, Chapin EA, Johnson PT, Curletti CR, Hancox LS, Hu J, Ebright JN, Malek G, Hauser MA, Bowes Rickman C, Bok D, Hageman GS, Johnson L V. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: Hypothesis re-visited. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29(2):95-112. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.11.003

78. Luo C, Chen M, Xu H. Complement gene expression and regulation in mouse retina and retinal pigment epithelium/choroid. *Mol Vis*. 2011;17:1588-1597.
79. Barnum SR. *Complement Biosynthesis in the Central Nervous System*. Vol 6.; 1995:132-146. doi:10.1177/10454411950060020301
80. Veerhuis R, Nielsen HM, Tenner AJ. Complement in the brain. *Mol Immunol*. 2011;48(14):1592-1603. doi:10.1016/j.molimm.2011.04.003
81. Xu H, Chen M. Targeting the complement system for the management of retinal inflammatory and degenerative diseases. *Eur J Pharmacol*. 2016;787:94-104. doi:10.1016/j.ejphar.2016.03.001
82. Barnum SR. Complement: A primer for the coming therapeutic revolution. *Pharmacol Ther*. 2017;172:63-72. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.11.014
83. Haas PJ, Van Strijp J. Anaphylatoxins: Their role in bacterial infection and inflammation. *Immunol Res*. 2007;37(3):161-175. doi:10.1007/BF02697367
84. Holers VM. Complement and its receptors: New insights into human disease. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:433-459. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120154
85. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*. 2012;74(4):691-705. doi:10.1016/j.neuron.2012.03.026
86. Liu D, Niu ZX. The structure, genetic polymorphisms, expression and biological functions of complement receptor type 1 (CR1/CD35). *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2009;31(4):524-535. doi:10.3109/08923970902845768
87. Crehan H, Hardy J, Pocock J. Blockage of CR1 prevents activation of rodent microglia. *Neurobiol Dis*. 2013;54:139-149. doi:10.1016/j.nbd.2013.02.003
88. Edwards AO, Ritter R, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science (80-)*. 2005;308(5720):421-424. doi:10.1126/science.1110189
89. Spencer KL, Olson LM, Anderson BM, Schnetz-Boutaud N, Scott WK, Gallins P, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA, Haines JL. C3 R102G polymorphism increases risk of age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2008;17(12):1821-1824. doi:10.1093/hmg/ddn075
90. Yates JRW, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Hayward C, Morgan J, Wright AF, Armbrecht AM, Dhillon B, Deary IJ, Redmond E, Bird AC, Moore AT. Complement C3 Variant and the Risk of Age-Related Macular Degeneration. *N Engl J Med*. 2007;357(6):553-561. doi:10.1056/nejmoa072618
91. Cashman SM, Desai A, Ramo K, Kumar-Singh R. Expression of complement component 3 (C3) from an adenovirus leads to pathology in the murine retina. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(6):3436-3445. doi:10.1167/iovs.10-6002
92. Kuehn MH, Kim CY, Jiang B, Dumitrescu A V., Kwon YH. Disruption of the complement cascade delays retinal ganglion cell death following retinal ischemia-reperfusion. *Exp Eye Res*. 2008;87(2):89-95. doi:10.1016/j.exer.2008.04.012
93. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AMM, Lambris JD, Smith SJ, John SWM, Barres BA. The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell*. 2007;131(6):1164-1178. doi:10.1016/j.cell.2007.10.036
94. Stephan AH, Barres BA, Stevens B. The complement system: An unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu Rev Neurosci*. 2012;35(1):369-389. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113810
95. Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, Vyssotski

- AL, Bifone A, Gozzi A, Ragozzino D, Gross CT. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci.* 2014;17(3):400-406. doi:10.1038/nn.3641
96. Bodeutsch N, Thanos S. Migration of phagocytotic cells and development of the murine intraretinal microglial network: An in vivo study using fluorescent dyes. *Glia.* 2000;32(1):91-101. doi:10.1002/1098-1136(200010)32:1<91::AID-GLIA90>3.0.CO;2-X
 97. Bosco A, Inman DM, Steele MR, Wu G, Soto I, Marsh-Armstrong N, Hubbard WC, Calkins DJ, Horner PJ, Vetter ML. Reduced retina microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(4):1437-1446. doi:10.1167/iovs.07-1337
 98. Howell GR, Macalinao DG, Sousa GL, Walden M, Soto I, Kneeland SC, Barbay JM, King BL, Marchant JK, Hibbs M, Stevens B, Barres BA, Clark AF, Libby RT, John SWM. Molecular clustering identifies complement and endothelin induction as early events in a mouse model of glaucoma. *J Clin Invest.* 2011;121(4):1429-1444. doi:10.1172/JCI44646
 99. Van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hoefler I, Voskuil M, Schaper W. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res.* 2001;49(3):543-553. doi:10.1016/S0008-6363(00)00206-6
 100. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6(4):389-395. doi:10.1038/74651
 101. Shyy YJ, Wickham LL, Hagan JP, Hsieh HJ, Hu YL, Telian SH, Valente AJ, Paul Sung KL, Chien S. Human monocyte colony-stimulating factor stimulates the gene expression of monocyte chemotactic protein-1 and increases the adhesion of monocytes to endothelial monolayers. *J Clin Invest.* 1993;92(4):1745-1751. doi:10.1172/JCI116762
 102. Polverini PJ, Cotran RS, Gimbrone MA, Unanue ER. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature.* 1977;269(5631):804-806. doi:10.1038/269804a0
 103. van Royen N, Hoefler I, Buschmann I, Heil M, Kostin S, Deindl E, Vogel S, Korff T, Augustin H, Bode C, Piek JJ, Schaper W. Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. *FASEB J.* 2002;16(3):432-434. doi:10.1096/fj.01-0563fje
 104. Buschmann IR, Busch HJ, Mies G, Hossmann KA. Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation.* 2003;108(5):610-615. doi:10.1161/01.CIR.0000074209.17561.99
 105. Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, Busse R, Schaper J, Schaper W. Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch.* 2000;436(3):257-270. doi:10.1007/s004280050039
 106. Hillmeister P, Lehmann KE, Bondke A, Witt H, Duelsner A, Gruber C, Busch HJ, Jankowski J, Ruiz-Noppinger P, Hossmann KA, Buschmann IR. Induction of cerebral arteriogenesis leads to early-phase expression of protease inhibitors in growing collaterals of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(11):1811-1823. doi:10.1038/jcbfm.2008.69
 107. Bergmann CE, Hoefler IE, Meder B, Roth H, van Royen N, Breit SM, Jost MM, Aharinejad S, Hartmann S, Buschmann IR. Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice.

- J Leukoc Biol.* 2006;80(1):59-65. doi:10.1189/jlb.0206087
108. GORDON N. Ocular manifestations of internal carotid artery occlusion. *Br J Ophthalmol.* 1959;43(5):257-267. doi:10.1136/bjo.43.5.257
 109. Mendrinis E, Machinis TG, Pournaras CJ. Ocular Ischemic Syndrome. *Surv Ophthalmol.* 2010;55(1):2-34. doi:10.1016/j.survophthal.2009.02.024
 110. Havelius U, Bergqvist D, Falke P, Hindfelt B, Krakau T. I. Impaired dark adaptation in symptomatic carotid artery disease. *Neurology.* 1997;49(5):1353-1359. doi:10.1212/WNL.49.5.1353
 111. McCrary JA. Venous stasis retinopathy of stenotic or occlusive carotid origin. *J Clin Neuroophthalmol.* 1989;9(3):195-199.
 112. Mizener JB, Podhajsky P, Hayreh SS. Ocular ischemic syndrome. *Ophthalmology.* 1997;104(5):859-864. doi:10.1016/S0161-6420(97)30221-8
 113. Yamamoto T, Mori K, Yasuhara T, Tei M, Yokoi N, Kinoshita S, Kamei M. Ophthalmic artery blood flow in patients with internal carotid artery occlusion. *Br J Ophthalmol.* 2004;88(4):505-508. doi:10.1136/bjo.2003.025809
 114. Terelak-Borys B, Skonieczna K, Grabska-Liberek I. Ocular ischemic syndrome - A systematic review. *Med Sci Monit.* 2012;18(8). doi:10.12659/MSM.883260
 115. Brown GC, Magargal LE. The ocular ischemic syndrome - Clinical, fluorescein angiographic and carotid angiographic features. *Int Ophthalmol.* 1988;11(4):239-251. doi:10.1007/BF00131023
 116. Dugan JD, Green WR. Ophthalmologic manifestations of carotid occlusive disease. *Eye.* 1991;5(2):226-238. doi:10.1038/eye.1991.38
 117. Cohn J, Sandager GP, Benjamin ME, Lilly MP, Hanna DJ, Flinn WR. Assessment of ocular perfusion after carotid endarterectomy with color-flow duplex scanning. *J Vasc Surg.* 1999;29(4):665-671. doi:10.1016/s0741-5214(99)70312-5
 118. Ishikawa K, Kimura I, Shinoda K, Eshita T, Kitamura S, Inoue M, Mashima Y. In situ confirmation of retinal blood flow improvement after carotid endarterectomy in a patient with ocular ischemic syndrome. *Am J Ophthalmol.* 2002;134(2):295-297. doi:10.1016/S0002-9394(02)01531-3
 119. Slakter JS, Spertus AD, Weissman SS, Henkind P. An experimental model of carotid artery occlusive disease. *Am J Ophthalmol.* 1984;97(2):168-172. doi:10.1016/S0002-9394(14)76086-6
 120. Osborne NN, Safa R, Nash MS. Photoreceptors are preferentially affected in the rat retina following permanent occlusion of the carotid arteries. *Vision Res.* 1999;39(24):3995-4002. doi:10.1016/S0042-6989(99)00127-3
 121. Stevens WD, Fortin T, Pappas BA. Retinal and optic nerve degeneration after chronic carotid ligation: Time course and role of light exposure. *Stroke.* 2002;33(4):1107-1112. doi:10.1161/01.STR.0000014204.05597.0C
 122. 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;244(2):199-204. doi:10.1007/s00417-005-0006-7
 123. Kobayashi M, Kuroiwa T, Shimokawa R, Okeda R, Tokoro T. Nitric oxide synthase expression in ischemic rat retinas. *Jpn J Ophthalmol.* 2000;44(3):235-244. doi:10.1016/S0021-5155(99)00220-8
 124. Shibata M, Ohtani R, Ihara M, Tomimoto H. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke.* 2004;35(11):2598-2603. doi:10.1161/01.STR.0000143725.19053.60
 125. Füchtmeier 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 Perinatol.* 2015;35(3):476-

484. doi:10.1038/jcbfm.2014.221
126. Khan MB, Hoda MN, Vaibhav K, Giri S, Wang P, Waller JL, Ergul A, Dhandapani KM, Fagan SC, Hess DC. Remote Ischemic Postconditioning: Harnessing Endogenous Protection in a Murine Model of Vascular Cognitive Impairment. *Transl Stroke Res.* 2015;6(1):69-77. doi:10.1007/s12975-014-0374-6
 127. Huang Y, Fan S, Li J, Wang YL. Bilateral common carotid artery occlusion in the rat as a model of retinal ischaemia. *Neuro-Ophthalmology.* 2014;38(4):180-188. doi:10.3109/01658107.2014.908928
 128. Crespo-Garcia S, Corkhill C, Roubex C, Davids AM, Kociok N, Strauss O, Joussem AM, Reichhart N. Inhibition of placenta growth factor reduces subretinal mononuclear phagocyte accumulation in choroidal neovascularization. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(12):4997-5006. doi:10.1167/iovs.16-21283
 129. Crespo-Garcia S, Reichhart N, Hernandez-Matas C, Zabulis X, Kociok N, Brockmann C, Joussem AM, Strauß O. In vivo analysis of the time and spatial activation pattern of microglia in the retina following laser-induced choroidal neovascularization. *Exp Eye Res.* 2015;139:13-21. doi:10.1016/j.exer.2015.07.012
 130. Sasmono RT, Williams E. Generation and characterization of MacGreen mice, the Cfs1r-EGFP transgenic mice. *Methods Mol Biol.* 2012;844:157-176. doi:10.1007/978-1-61779-527-5_11
 131. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
 132. Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;224(3):855-862. doi:10.1006/bbrc.1996.1112
 133. Rosenbaum DM, Rosenbaum PS, Singh M, Gupta G, Gupta H, Li B, Roth S. Functional and morphologic comparison of two methods to produce transient retinal ischemia in the rat. *J Neuro-Ophthalmology.* 2001;21(1):62-68. doi:10.1097/00041327-200103000-00015
 134. 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):767-779. doi:10.1016/j.exer.2005.09.019
 135. Szabadfi K, Danyadi B, Kiss P, Tamas A, Fabian E, Gabriel R, Reglodi D. Protective effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) in ischemic retinal degeneration. *J Mol Neurosci.* 2012;48(3):501-507. doi:10.1007/s12031-012-9774-9
 136. Manouchehrian 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;12(1):92. doi:10.1186/s12974-015-0312-x
 137. Ábrahám H, Lázár G. Early microglial reaction following mild forebrain ischemia induced by common carotid artery occlusion in rats. *Brain Res.* 2000;862(1-2):63-73. doi:10.1016/S0006-8993(00)02072-2
 138. Simard AR, Rivest S. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J.* 2004;18(9):998-1000. doi:10.1096/fj.04-1517fje
 139. Balsler C, Wolf A, Herb M, Langmann T. Co-inhibition of PGF and VEGF blocks their expression in mononuclear phagocytes and limits neovascularization and leakage in the murine retina. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):26. doi:10.1186/s12974-019-1419-2
 140. Spirin KS, Saghizadeh M, Lewin SL, Zardi L, Kenney MC, Ljubimov A V. Basement

- membrane and growth factor gene expression in normal and diabetic human retinas. *Curr Eye Res.* 1999;18(6):490-499. doi:10.1076/ceyr.18.6.490.5267
141. Van Bergen T, Hu TT, Etienne I, Reyns GE, Moons L, Feyen JHM. Neutralization of placental growth factor as a novel treatment option in diabetic retinopathy. *Exp Eye Res.* 2017;165:136-150. doi:10.1016/j.exer.2017.09.012
 142. Busch HJ, Buschmann IR, Mies G, Bode C, Hossmann KA. Arteriogenesis in hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23(5):621-628. doi:10.1097/01.WCB.0000057741.00152.E4
 143. Choy M, Ganesan V, Thomas DL, Thornton JS, Proctor E, King MD, Van Der Weerd L, Gadian DG, Lythgoe MF. The chronic vascular and haemodynamic response after permanent bilateral common carotid occlusion in newborn and adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26(8):1066-1075. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600259
 144. La Sala A, Pontecorvo L, Agresta A, Rosano G, Stabile E. Regulation of collateral blood vessel development by the innate and adaptive immune system. *Trends Mol Med.* 2012;18(8):494-501. doi:10.1016/j.molmed.2012.06.007
 145. De Jong FJ, Schrijvers EMC, Ikram MK, Koudstaal PJ, De Jong PTVM, Hofman A, Vingerling JR, Breteler MMB. Retinal vascular caliber and risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology.* 2011;76(9):816-821. doi:10.1212/WNL.0b013e31820e7baa
 146. Cavallari M, Stamile C, Umeton R, Calimeri F, Orzi F. Novel method for automated analysis of retinal images: Results in subjects with hypertensive retinopathy and CADASIL. *Biomed Res Int.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/752957
 147. Dumitrascu OM, Qureshi TA. Retinal Vascular Imaging in Vascular Cognitive Impairment: Current and Future Perspectives. *J Exp Neurosci.* 2018;12. doi:10.1177/1179069518801291
 148. Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, Merry KM, Shi Q, Rosenthal A, Barres BA, Lemere CA, Selkoe DJ, Stevens B. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science (80-).* 2016;352(6286):712-716. doi:10.1126/science.aad8373
 149. Sacks SH. *Complement Fragments C3a and C5a: The Salt and Pepper of the Immune Response.* Vol 40. John Wiley & Sons, Ltd; 2010:668-670. doi:10.1002/eji.201040355
 150. Song D, Sulewski ME, Wang C, Song J, Bhuyan R, Sterling J, Clark E, Song WC, Dunaief JL. Complement C5a receptor knockout has diminished light-induced microglia/macrophage retinal migration. *Mol Vis.* 2017;23:210-218. <http://www.molvis.org/molvis/v23/210>. Accessed March 12, 2021.
 151. Sindi IA, Tannenberg RK, Dodd PR. A role for the neurexin-neuroligin complex in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2014;35(4):746-756. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.032
 152. Brito-Moreira J, Lourenco M V., Oliveira MM, Ribeiro FC, Ledo JH, Diniz LP, Vital JFS, Magdesian MH, Melo HM, Barros-Aragão F, De Souza JM, Alves-Leon S V., Gomes FCA, Clarke JR, Figueiredo CP, De Felice FG, Ferreira ST. Interaction of amyloid- β (A β) oligomers with neurexin 2 α and neuroligin 1 mediates synapse damage and memory loss in mice. *J Biol Chem.* 2017;292(18):7327-7337. doi:10.1074/jbc.M116.761189
 153. Strain WD, Chaturvedi N. The renin-angiotensin-aldosterone system and the eye in diabetes. *JRAAS - J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* 2002;3(4):243-246. doi:10.3317/jraas.2002.045
 154. Wagner J, Danser AHJ, Derkx FHM, De Jong PTVM, Paul M, Mullins JJ,

- Schalekamp MADH, Ganten D. Demonstration of renin mRNA, angiotensinogen mRNA, and angiotensin converting enzyme mRNA expression in the human eye: Evidence for an intraocular renin-angiotensin system. *Br J Ophthalmol.* 1996;80(2):159-163. doi:10.1136/bjo.80.2.159
155. Funatsu H, Yamashita H. Pathogenesis of diabetic retinopathy and the renin-angiotensin system. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2003;23(6):495-501. doi:10.1046/j.1475-1313.2003.00134.x
 156. Wilkinson-Berka JL, Agrotis A, Deliyanti D. The retinal renin-angiotensin system: Roles of angiotensin II and aldosterone. *Peptides.* 2012;36(1):142-150. doi:10.1016/j.peptides.2012.04.008
 157. Dong YF, Kataoka K, Toyama K, Sueta D, Koibuchi N, Yamamoto E, Yata K, Tomimoto H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Attenuation of brain damage and cognitive impairment by direct renin inhibition in mice with chronic cerebral hypoperfusion. *Hypertension.* 2011;58(4):635-642. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.173534
 158. *Manual of Stroke Models in Rats.*; 2008. doi:10.1201/9781420009521
 159. Abbott A. The Renaissance rat. *Nature.* 2004;428(6982):464-466. doi:10.1038/428464a
 160. Yang G, Kitagawa K, Matsushita K, Mabuchi T, Yagita Y, Yanagihara T, Matsumoto M. C57BL/6 strain is most susceptible to cerebral ischemia following bilateral common carotid occlusion among seven mouse strains: Selective neuronal death in the murine transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 1997;752(1-2):209-218. doi:10.1016/S0006-8993(96)01453-9
 161. Kim BJ, Braun TA, Wordinger RJ, Clark AF. Progressive morphological changes and impaired retinal function associated with temporal regulation of gene expression after retinal ischemia/reperfusion injury in mice. *Mol Neurodegener.* 2013;8(1). doi:10.1186/1750-1326-8-21
 162. Ling Y, Fu Z, Wang Y. Surgical model for ocular ischemic syndrome in mice. *Biomed Res.* 2017;28(14):6314-6318. <https://www.alliedacademies.org/articles/surgical-model-for-ocular-ischemic-syndrome-in-mice-7980.html>. Accessed December 25, 2019.
 163. Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y, Chen J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2012;43(11):3063-3070. doi:10.1161/STROKEAHA.112.659656
 164. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet.* 2012;13(4):227-232. doi:10.1038/nrg3185
 165. De Sousa Abreu R, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst.* 2009;5(12):1512-1526. doi:10.1039/b908315d
 166. Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 2009;583(24):3966-3973. doi:10.1016/j.febslet.2009.10.036
 167. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell.* 2016;165(3):535-550. doi:10.1016/j.cell.2016.03.014
 168. McManus J, Cheng Z, Vogel C. Next-generation analysis of gene expression regulation-comparing the roles of synthesis and degradation. *Mol Biosyst.* 2015;11(10):2680-2689. doi:10.1039/c5mb00310e
 169. Kornhauser T, Schwartz R, Goldstein M, Neudorfer M, Loewenstein A, Barak A. Bevacizumab treatment of macular edema in CRVO and BRVO: long-term follow-

- up. (BERVOLT study: Bevacizumab for RVO long-term follow-up). *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2016;254(5):835-844. doi:10.1007/s00417-015-3130-z
170. Haller JA, Bandello F, Belfort R, Blumenkranz MS, Gillies M, Heier J, Loewenstein A, Yoon YH, Jiao J, Li XY, Whitcup SM. Dexamethasone intravitreal implant in patients with macular edema related to branch or central retinal vein occlusion: Twelve-month study results. *Ophthalmology*. 2011;118(12):2453-2460. doi:10.1016/j.ophtha.2011.05.014
 171. Fischer S, Renz D, Schaper W, Karliczek GF. In vitro effects of dexamethasone on hypoxia-induced hyperpermeability and expression of vascular endothelial growth factor. *Eur J Pharmacol*. 2001;411(3):231-243. doi:10.1016/S0014-2999(00)00915-8
 172. Edelman JL, Lutz D, Castro MR. Corticosteroids inhibit VEGF-induced vascular leakage in a rabbit model of blood-retinal and blood-aqueous barrier breakdown. *Exp Eye Res*. 2005;80(2):249-258. doi:10.1016/j.exer.2004.09.013
 173. Whitcup SM, Cidlowski JA, Csaky KG, Ambati J. Pharmacology of corticosteroids for diabetic macular edema. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(1):1-12. doi:10.1167/iovs.17-22259
 174. Alawieh A, Farris Langley E, Tomlinson S. Targeted complement inhibition salvages stressed neurons and inhibits neuroinflammation after stroke in mice. *Sci Transl Med*. 2018;10(441). doi:10.1126/scitranslmed.aao6459
 175. Scholz R, Sobotka M, Caramoy A, Stempf T, Moehle C, Langmann T. Minocycline counter-regulates pro-inflammatory microglia responses in the retina and protects from degeneration. *J Neuroinflammation*. 2015;12(1). doi:10.1186/s12974-015-0431-4

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jim Wu, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Molekularbiologische Charakterisierung der murinen Retina nach bilateraler Okklusion der Arteria carotis communis

(Molecular characterization of the mouse retina after bilateral common carotid artery occlusion)

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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe. 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 erfolgten Publikationen

Jim Wu hatte folgenden Anteil an folgender Publikation:

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 (BCCAO). *PLoS One*. 2018;13(3):e0193961. doi:10.1371/journal.pone.0193961

Beitrag im Einzelnen:

- Quantitative PCR: Etablierung, Durchführung und Auswertung der Daten; siehe Abbildung 1 (D-H), Abbildung 2 (B-G)
- Untersuchung der histologischen Veränderungen im retinalen Sagittalschnitt (HE-Färbung)

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Lebenslauf

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

Publikationsliste

- 2020 Jörg Scheffel, Niklas A Mahnke, Zonne Hofman, Steven de Maat, Jim Wu, Hanna Bonnekoh, Reuben Pengelly, Sarah Ennis, John Holloway, Martin Church, Marcus Maurer, Coen Maas, Karoline Krause. Cold-induced urticarial autoinflammatory syndrome related to factor XII activation. *Nature Communications*. 2020. 11(1):179. PMID: 31924766
- 2019 Hanna Bonnekoh, Jörg Scheffel, Jim Wu, Sheila Hoffmann, Marcus Maurer, Karoline Krause. Skin and systemic inflammation in Schnitzler's syndrome are associated with neutrophil extracellular trap formation. *Frontiers in Immunology*. 2019. 10:546. PMID: 30967871
- 2018 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 (BCCAO). *PLoS ONE*. 2018. 13(3):e0193961. PMID: 29547662

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Olaf Strauß und Dr. med. Nadine Reichhart für die stetige Unterstützung und Geduld bei der Betreuung dieser Arbeit.