

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

DISSERTATION

**Neuroprotektion und Gefäßmodulation in einem organotypischen
Kulturmodell der Retina**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Elisabeth Christina Maria Thein

aus Mainz

Datum der Promotion: 14. Februar 2014

INHALT

1. EINLEITUNG	6
1.1. Überblick über die Epidemiologie ischämischer und degenerativer Retinaerkrankungen	6
1.2. Exzitotoxische Schädigung der Ganglienzellschicht durch Glutamatfreisetzung	7
1.3. Ein organotypisches Kulturmodell der Retina	8
1.4. Neuroprotektive Therapieoptionen	9
1.4.1. Erythropoietin	9
1.4.2. Simvastatin	11
1.5. Zielstellung	13
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. Tierschutzrichtlinien für die Organentnahme	14
2.2. Präparation und Kultivierung der Retina	14
2.3. Pharmakologische Interventionen	15
2.3.1. Erythropoietin	15
2.3.2. Simvastatin	15
2.3.3. Glutamat-induzierte Schädigung der Ganglienzellschicht	15
2.4. Fixieren, Einbetten und Schneiden der Kulturen	16
2.5. Histologie und Immunhistochemie	16
2.5.1. Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung	17
2.5.2. von Willebrand Faktor	17
2.5.3. Fluoreszenz-Färbungen	18
2.6. Schadensquantifizierung	20
2.7. Angewandte statistische Verfahren	20
2.8. Materialien	21
3. ERGEBNISSE	23
3.1. Erythropoietin ist neuroprotektiv im organotypischen Kulturmodell	23
3.2. Vaskuläre Strukturen im organotypischen Kulturmodell	25
3.3. Erythropoietin erhält Gefäße in der organotypischen Retinakultur	25

3.4. Erythropoietin fördert Gefäß-assoziierte Zellproliferationen	28
3.5. Erythropoietin ist vasoprotektiv gegen Glutamatergische Toxizität	31
3.6. Simvastatin schützt dosisabhängig vor Glutamat	33
4. DISKUSSION	36
4.1. Glutamatergische Toxizität und retinale Ganglienzellen	36
4.2. Neuroprotektion durch Erythropoietin	38
4.3. Gefäßmodulation durch Erythropoietin	39
4.3.1. Evaluationsmethoden	39
4.3.2. Erythropoietin fördert das Überleben von (geschädigten) Gefäßstrukturen	39
4.3.3. Gefäß-assoziierte Proliferationen	40
4.4. Neuroprotektion durch Simvastatin	41
4.5. Limitationen der gewählten Methodik	42
4.6. Ausblick	43
5. ZUSAMMENFASSUNG	45
6. LITERATURANGABEN	46
7. ANHANG	56
7.1. Eidesstattliche Erklärung	56
7.2. Lebenslauf	57
7.3. Publikationsliste	59
7.4. Danksagung	60
7.5. Abkürzungsverzeichnis	61

Zusammenfassung

Degenerative und ischämische Retinaerkrankungen, wie zum Beispiel die diabetische Retinopathie, die altersabhängige Makuladegeneration und das Glaukom, zählen in Westeuropa und Nordamerika zu den Hauptursachen einer Erblindung. Ihnen gemeinsam ist eine progressive Schädigung der retinalen Ganglienzellschicht (GCL) durch Glutamatergische Zytotoxizität. Bislang existiert keine kausale neuroprotektive Therapie. Mithilfe eines organotypischen Kulturmodells der adulten Rattenretina, in dem die neurovaskuläre Zytoarchitektur erhalten bleibt, wurden Erythropoietin (EPO) und Simvastatin auf ihre Wirkung gegen einen Glutamat-induzierten Schaden in der GCL untersucht. EPO (1-25 U/ml, täglich appliziert) erwies sich dosisabhängig als neuroprotektiv. Simvastatin (0,1 μ M) war sowohl im Rahmen einer Langzeitbehandlung ab dem zweiten Kultivierungstag, als auch als einmalige Ko-Applikation am sechsten Kultivierungstag mit Glutamat protektiv. Weiterhin wurde EPOs Effekt auf die Morphologie und die Vitalität von vaskulären Strukturen in den Retinakulturen untersucht. Es zeigten sich weniger apoptotische Gefäßstrukturen in der TUNEL-Färbung. Überdies wurden vermehrt Gefäß-assoziierte Proliferationen, visualisiert durch den Einbau der Thymidinanaloga 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin (EdU) und 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU), beobachtet.

Unsere Experimente zeigen eine neuroprotektive Wirkung von Erythropoietin und Simvastatin gegen Glutamatergische Zytotoxizität im organotypischen Retinamodell, sowie angioprotektive und – proliferative Effekte von Erythropoietin auf vaskuläre Strukturen. Die beiden zytoprotektiven Substanzen stellen eine Option in der Behandlung von Retinaerkrankungen, die mit Glutamatergischer Zytotoxizität einhergehen, dar.

Schlagwörter: Neuroprotektion, Glutamatergische Zytotoxizität, Erythropoietin, Simvastatin, organotypisches Kulturmodell, Angioproliferation.

Abstract

Degenerative and ischemic diseases of the eye, such as diabetic retinopathy, age-related macular degeneration and glaucoma, are major causes for visual impairment and blindness in the western world. They are characterized by progressive damage to the retinal ganglion cell layer (GCL) due to glutamate excitotoxicity. So far, neuroprotective therapies are not available. Using an organotypic retinal culture model, we tested the effect of two potential neuroprotective drugs, Simvastatin and Erythropoietin (EPO), against glutamate excitotoxicity in the GCL. EPO (1-25 U/ml, applied daily) proved to be neuroprotective in a dose dependent manner. Simvastatin (0.1 μ M) was neuroprotective in retinas pretreated for 5 days but also when co-applied with glutamate on the sixth day of culture. We further characterized the effect of EPOs on vascular morphology and survival in retinal cultures by analyzing the number of TUNEL⁺ vascular cells as well as the degree of vessels associated with DNA synthesis. EPO preserved vascular structures and increased the integration of the thymidine analogs 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) and 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) in the DNA of vessels, indicating angioproliferation. We conclude that Erythropoietin and Simvastatin should be further investigated as potential therapeutics in retinal diseases involving excitotoxicity.

Key words: neuroprotection, glutamate excitotoxicity, Erythropoietin, Simvastatin, organotypic retinal cultures, angioproliferation.

1. EINLEITUNG

Diese Arbeit untersucht die Wirkung zweier neuroprotektiver Substanzen, Erythropoietin und Simvastatin, gegen Glutamatergische Toxizität in einem organotypischen Kulturmodell der adulten Retina. Außerdem wird die Gefäßentwicklung in den Retinakörperchen charakterisiert und der Effekt von Erythropoietin auf diese beobachtet.

Das Kapitel beginnt mit einem kurzen Überblick über die Epidemiologie ischämischer und degenerativer Netzhauterkrankungen und der Erläuterung eines Erklärungsmodells der Glutamatergischen Toxizität. Die Notwendigkeit kausaler Therapiemöglichkeiten, die vor dem Untergang neuronaler Zellen schützen, wird hergeleitet. Hiernach wird das in den Experimenten verwendete organotypische Retinakulturmodell der adulten Ratten vorgestellt und sein Stellenwert bei der Erforschung der neuronalen und vaskulären Zellinteraktionen begründet.

1.1 Überblick über die Epidemiologie ischämischer und degenerativer Retinaerkrankungen

Weltweit ist mit 47,8 % die Katarakt die Hauptursache einer Erblindung (siehe Abbildung 1). Eine Katarakt ist in den meisten Fällen durch eine Operation heilbar. In Westeuropa und Nordamerika dagegen sind Sehbehinderung und Erblindung zu 85 % durch ischämische und degenerative Erkrankungen, wie das Glaukom, die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) und die diabetische Retinopathie, bedingt (Resnikoff, et al., 2004). Für diese Erkrankungen existiert bislang keine kausale Therapie.

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind 65 % der Sehbehinderten 50 Jahre und älter. 2002 waren 20 % der Weltbevölkerung betroffen. In Anbetracht der immer älter werdenden Gesellschaft ist mit einer stetigen Zunahme der Sehschädigungen zu rechnen (Resnikoff et al., 2004). Bislang ist nur eine symptomatische Therapie möglich, wie z.B. eine intraokuläre Drucksenkung beim Glaukom, oder die Inhibition von Neovaskularisationen durch monoklonale Antikörper gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) bei der proliferativen diabetischen Retinopathie. Eine neuroprotektive oder -regenerative Behandlung ohne relevante Nebenwirkungen fehlt jedoch und ist aufgrund der Zunahme dieser Erkrankungen und der epidemiologischen Entwicklung dringend erforderlich.

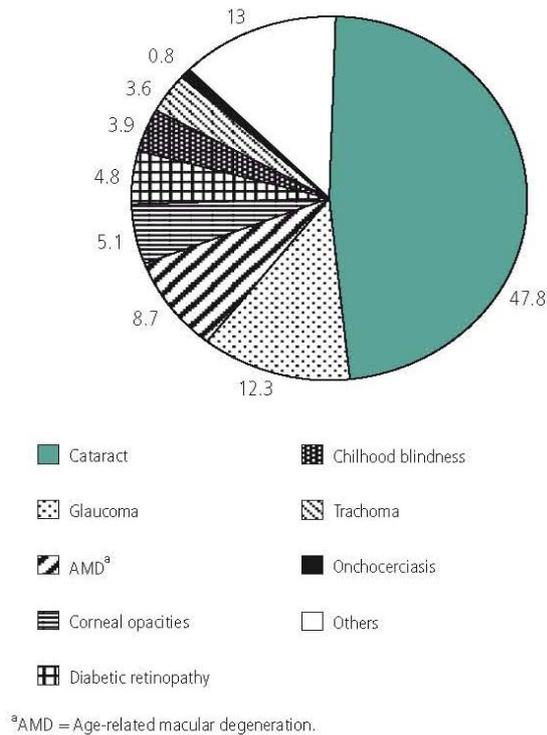


Abbildung 1: Erblindungsursachen weltweit und ihr prozentualer Anteil im Jahre 2002. Resnikoff et al., WHO Bulletin 2004.

1.2 Exzitotoxische Schädigung der Ganglienzellschicht durch Glutamat

Viele Retinaerkrankungen, wie z.B. die altersabhängige Makuladegeneration und das Glaukom, haben eine fortschreitende Schädigung der Axone der retinalen Ganglienzellschicht (GCL) gemeinsam. Als pathogenetische Mechanismen werden eine exzessive Glutamatfreisetzung und weitere Signalkaskaden, die die Ganglienzellschicht exzitotoxisch schädigen und zum Zelltod sowie pathologischen Gefäßneubildungen führen, diskutiert (Harada et al., 2007; Ray und Mookherjee, 2009; Seki und Lipton, 2008). Neovaskularisationen können ihrerseits durch intraokuläre Blutungen und Netzhautödem eine zusätzliche Sehverschlechterung bedingen. Auch für das frühe Stadium einer diabetischen Retinopathie gibt es Hinweise auf eine Korrelation von neuronalem Zelltod und Glutamatexzitotoxizität (Ambati et al., 1997; Gowda et al., 2011).

Mithilfe eines organotypischen Retinakulturmodells, in dem die Ganglienzellschicht durch Glutamatexposition geschädigt wird, sollen in der vorliegenden Arbeit Neuroprotektion und Angiogenese studiert werden.

1.3 Ein organotypisches Kulturmodell der Retina

Organotypische Kulturen zeichnen sich durch den Erhalt der den Geweben eigenen dreidimensionalen komplexen Zytoarchitektur und zellulären Interaktionen aus. Sie kommen damit den Bedingungen *in vivo* erheblich näher als dissoziierte Zell- bzw. Ko-Kulturen von Astrozyten und Endothelzellen. Mit ihrer Hilfe wird die Erforschung vieler grundlegender Fragestellungen, z.B. zu neurovaskulären und neuroglialen Wechselwirkungen oder zur axonalen Regeneration nach einer Axotomie, ermöglicht. Mit der organotypischen Kultivierungsmethode können auch pharmakologische und toxikologische Studien durchgeführt werden, z.B. zur Modulation mit Wachstumsfaktoren und Neuroprotektiva. Von Vorteil sind dabei die Möglichkeit einer breit angelegten Dosistestung, geringere Kosten für Pilotstudien, eine leichtere Applizierbarkeit von Substanzen, ein geringerer Substanzmetabolismus und fehlende pharmakokinetische bzw. -dynamische Effekte. In unserem Labor wurde eine organotypische Langzeitkultur der Retina adulter Ratten etabliert, bei der die vom Sehnerv axotomisierten Ganglienzellen überleben und bis zu 90 Tage in Kultur erhalten bleiben (Rzeczinski et al., 2006). Erst nach einigen Wochen zeigt sich eine Degeneration und Auflockerung der retinalen Schichten. Die Experimente zur Neuroprotektion und Angiogenese der vorliegenden Doktorarbeit wurden mehrheitlich innerhalb einer Kultivierungswoche durchgeführt. Während dieser Zeit entwickelt sich das nach der Präparation noch flache Retinafragment in der rotierenden Kultivierung auf einem Wälzroller zu einer kugelförmigen Struktur, im Folgenden als Retinakörperchen bezeichnet. Die retinale Architektur bleibt erhalten. Im Inneren des Retinakörperchens findet sich die Ganglienzellschicht, außen die Fotorezeptorschicht. Eine zu Beginn vorhandene innere Kavität füllt sich nach und nach nahezu vollständig. Abbildung 2 zeigt den Schichtaufbau organotypischer Retinas zu verschiedenen Kulturzeitpunkten innerhalb der ersten Woche.

Kontrovers diskutiert wird, ob der Neurodegeneration eine Störung der vaskulären Funktion vorausgeht, oder ob letzteres eine Folge von neuronalem Zelltod und Dysfunktion ist (Whitmire et al., 2011). Zum Verständnis der Pathophysiologie von Neurodegeneration und Gefäßkomplifikationen ist eine integrierte Sicht auf das neuronale und vaskuläre Kompartiment nötig, die ein organotypisches Kultursystem ermöglicht (Morin-Brureau et al., 2013).

Obwohl die organotypischen Retinakulturen zum einen durch die Durchtrennung des Nervus opticus während der Präparation und zum anderen durch die anschließende Teilung in 1 mm² große Fragmente zu Beginn der Versuche geschädigt werden, zeigen sie per se nur einen

geringen Anteil an apoptotischen Zellen in der GCL nach einer Kultivierungswoche. Für Neuroprotektionsexperimente wurde daher von Rzczinski und Kollegen eine Schädigung der Ganglienzellschicht durch eine 24-stündige Glutamatexposition mit 5 mM etabliert (Ruscher et al., 2007; Rzczinski et al., 2006).

Das organotypische Retinakulturmodell kann somit helfen, die Wechselwirkungen zwischen Neuronen und Gefäßen zu studieren und den Einfluss von neuro- und angioprotektiven Substanzen auf sie zu erforschen. Die Erkenntnisse könnten die Übertragung in *in vivo* Modelle erleichtern.

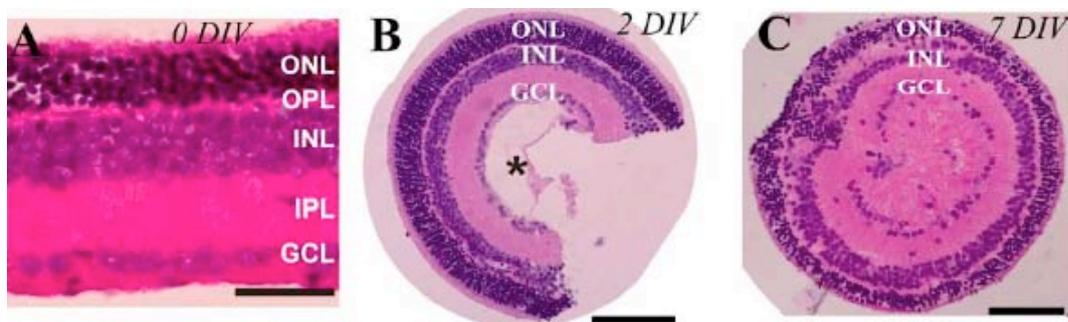


Abbildung 2: Aufbau der Netzhautschichten der Retinakörperchen. (A) Flaches Retinafragment nach der Präparation. (B) Retinakörperchen nach 2 Kultivierungstagen (days in vitro, DIV), die zentrale Kavität * beginnt sich zu füllen. (C) 7 DIV Retinakörperchen. ONL = äußere Körnerschicht; INL = innere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = retinale Ganglienzellschicht. Der Skalierungsbalken in (A) entspricht 50 µm und in (B-C) 100 µm. Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung. Fotos: Stefan Rzczinski „Etablierung und Charakterisierung eines neuen organotypischen Retina-Kulturmodells der adulten Ratte“, Dissertation 2007.

1.4 Neuroprotektive Therapieoptionen

Bislang sind keine protektiven Therapien, die der neuronalen Schädigung bei degenerativen und ischämischen Retinaerkrankungen entgegenwirken, verfügbar. Zu vielversprechenden Kandidaten zählen Erythropoietin und Simvastatin, auf die nachfolgend eingegangen wird.

1.4.1 Erythropoietin (EPO)

Das hämatopoietische Zytokin EPO findet seit über 20 Jahren Anwendung in der Behandlung von Anämien. EPO verfügt darüber hinaus über zahlreiche nicht-erythropoietische Eigenschaften, z.B. neuroprotektive, antiinflammatorische und regenerative Funktionen

(Sakanaka et al., 1998; Katz et al. 2007; Grimm et al., 2006).

Das Erythropoietin / EPO-Rezeptor-System könnte daher über endogene Signalwege die Netzhaut schützen und ebenso die axonale Regeneration von ZNS-Läsionen fördern (Grimm et al., 2006). Erstmals berichteten Sakanaka und seine Kollegen 1998 über EPOs neuroprotektive Effekte in einem Mausmodell zerebraler Ischämie (Sakanaka et al., 1998). In zahlreichen *in vitro* and *in vivo* Studien hat sich EPO seitdem als neuroprotektiv erwiesen. In diversen präklinischen Studien zur Therapie retinaler Erkrankungen hat EPO ebenfalls einen Nutzen gezeigt (Colella et al., 2011; Grimm et al., 2004; Junk et al., 2002; Kilic et al., 2005; King et al., 2007; Maiese et al., 2008; Rex et al., 2004; Rong et al., 2011; Tsai et al., 2005; Wang et al., 2011; Weishaupt et al., 2004; Zhong et al., 2007). Allerdings stehen klinische Studien zur Behandlung retinaler Erkrankungen durch EPO weitgehend aus.

Verschiedene Vorstudien zur Neuroprotektion bei Schlaganfällen durch EPO fielen sehr vielversprechend aus (Siren et al., 2009; Tseng et al., 2009; Wustenberg et al., 2011). Jedoch musste eine multizentrische Phase-II-Studie (Ehrenreich et al., 2002; Ehrenreich et al., 2009) aufgrund einer erhöhten Mortalität der Patienten, die zusätzlich zur Thrombolysetherapie mit gewebspezifischem Plasminogenaktivator eine EPO-Behandlung erhielten, vorzeitig abgebrochen werden (Zechariah et al., 2010).

Als angiogenetisches Zytokin kommt EPO eine wesentliche Bedeutung bei der Proliferation, Reifung und dem Überleben von Vorläufern der roten Blutzellen im Knochenmark zu (Gregory et al., 1978). Eine (dauerhaft) höhere endogene oder exogene EPO-Konzentration im Blut kann einen Anstieg des Hämatokrits bewirken und die Gefahr einer Thrombose und anderer kardiovaskulärer Ereignisse erhöhen (Besarab et al., 1988; Jelkmann 2004; Lombadero et al. 2011).

Zu den gefürchteten Nebenwirkungen einer EPO-Behandlung bei Retinopathien zählen besonders seine proliferationsfördernden Effekte auf Endothelzellen (Anagnostou et al., 1990; McVicar et al., 2010). Dies könnte zu pathologischen Neovaskularisationen mit vulnerablen Gefäßen, Blutungen und Gefäßeinsprossung in die Makula führen (Jo und Kim, 2010). Watanabe und Kollegen konnten bei Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie (PDR) einen deutlich erhöhten EPO-Spiegel in der Glaskörperflüssigkeit messen und durch eine therapeutische Inhibition von EPO *in vitro* und *in vivo* retinale Neovaskularisationen und Endothelzellproliferation hemmen (Watanabe et al. 2005 und 2007). Dagegen erwiesen sich in tierexperimentellen Versuchen zur diabetischen Retinopathie geringe

„suberythropoietische“ Dosen langfristig applizierten EPOs als neuroprotektiv (Wang et al., 2011) und sicher in Bezug auf Toxizität und Angioproliferation (Zhang et al., 2008). Auch in der Behandlung von Diabetikern mit schwerer Anämie konnte eine sechsmonatige EPO-Therapie ein Makulaödem und harte Exsudate reduzieren (Berman und Friedman, 1994). Neben der geeigneten Erythropoietindosis kommt dem Erkrankungsstadium und dem Applikationszeitpunkt große Bedeutung zu.

Aufgrund des proangiogenetischen Effektes von EPO wird seit einigen Jahren an der Entwicklung eines „Neuro-EPOs“ ohne hämatopoietische Wirkung gearbeitet (McVicar et al., 2010). Vielversprechender Kandidat ist ein carbamyliertes EPO (Leist et al., 2004).

EPOs Potenzial wird auch für die Therapie anderer neurodegenerativer Erkrankungen, wie Alzheimer und Morbus Parkinson, untersucht (Ehrenreich et al., 2004). Daher könnten die Erkenntnisse, die bei der Behandlung von Retinaerkrankungen mit EPO gewonnen werden, auch bei weiteren degenerativen und ischämischen Erkrankungen Anwendung finden.

1.4.2 Simvastatin

In der Therapie von Myokardinfarkten und Schlaganfällen sind HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) seit Jahren fest etabliert, da durch die Cholesterinsenkung eine Reduktion des kardio- und zerebrovaskulären Risikos belegt werden konnte (Scandinavian Simvastatin Survival Study Group 1994). Zum Wirkungsspektrum der Statine zählen auch cholesterinunabhängige, sogenannte pleiotrope Eigenschaften, wie antiinflammatorische, plaquestabilisierende und neuroprotektive Effekte (Dimmeler et al., 2001, Endres et al., 2004, Zhou und Liao, 2010). Hierdurch werden Statine zu einer wichtigen therapeutischen Option neurodegenerativer und ischämischer Retinaerkrankungen, wie z.B. der proliferativen diabetischen Retinopathie, der altersabhängigen Makuladegeneration und dem Glaukom.

Das Offenwinkelglaukom ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, die infolge des Verlustes der retinalen Ganglienzellen zu einem Gesichtsfeldausfall führt. Es ist häufig mit einem erhöhten intraokulären Augendruck assoziiert, allerdings kann eine drucksenkende Therapie allein den weiteren Fortschritt meist nicht aufhalten. Eine prospektive populationsbasierte Studie untersuchte die Inzidenz von Offenwinkelglaukomen unter einer Therapie mit Statinen und anderen Cholesterin-Hemmern. Sie zeigte, dass eine Langzeitbehandlung mit Statinen unabhängig vom Augeninnendruck zu einer Risikoreduktion von Offenwinkelglaukomen führte (Marcus et al., 2012). Die Autoren folgerten, dass die

Risikoreduktion auf die neuroprotektiven Eigenschaften von Statinen zurückzuführen sei. In einem murinen Ischämie / Reperfusion-Modell zur Untersuchung des Offenwinkelglaukoms förderte post-ischämisch appliziertes Simvastatin das Überleben der retinalen Ganglienzellen und belegte so die Wirksamkeit einer Statinbehandlung *nach* Schadenseintritt (Krempler et al., 2011). Verschiedene weitere tierexperimentelle Studien zeigen an, dass Statine vor einer Ganglienzelldegeneration infolge transienter Erhöhung des Augeninnendrucks nach einer Opticusaxotomie schützen (Kawaji et al., 2007; Kretz et al., 2005; Schmeer, et al., 2008).

Bei der diabetischen Retinopathie konnte die Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD)- Eye Beobachtungsstudie unter einer dualen Lipid-Therapie mit Fenofibraten und Simvastatin eine Prävention des weiteren Krankheitsprogresses belegen (Chew et al., 2010). Diese intensiviertere Therapie konnte allerdings im Gegensatz zu einer Statin-Monotherapie nicht die kardiovaskulären Ereignisse und Komplikationen reduzieren (Ginsberg et al., 2010). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Simvastatins protektive Wirkung gegen ein weiteres Fortschreiten der PDR cholesterolumabhängig ist.

Neben protektiven könnten antiinflammatorische Effekte der Statine bei der AMD wirksam sein (Gehlbach et al., 2009; Penfold et al., 2001).

In unseren Experimenten wurde Simvastatin auf seine neuroprotektive Wirkung zu unterschiedlichen Applikationszeitpunkten (vor und mit Glutamatexposition) untersucht.

1.5 Zielstellungen der Doktorarbeit

Im Rahmen meiner Doktorarbeit habe ich Erythropoietin und Simvastatin hinsichtlich ihrer neuroprotektiven Wirkung auf Glutamat-geschädigte retinale Ganglienzellen in einem organotypischen Kulturmodell untersucht. Ein weiteres Ziel war die Charakterisierung der Dynamik vaskulärer Strukturen im organotypischen Retinamodell und der Einfluss von EPO auf Gefäße. Folgende Fragestellungen wurden formuliert:

1. Ist EPO neuroprotektiv gegen Glutamat-induzierten Schaden in der GCL?
2. Innerhalb welches Konzentrationsbereichs ist Simvastatin protektiv bzw. toxisch?
3. Zu welchem Zeitpunkt um die Schadenssetzung schützt Simvastatin vor Glutamat?
4. Wie ist die Dynamik vaskulärer Strukturen im organotypischen Kulturmodell?
5. Kann EPO die Gefäßentwicklung im organotypischen Kulturmodell beeinflussen?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tierschutzrichtlinien für die Organentnahme

Alle Tiere wurden nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes und LAGESO (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin und Landesamt für Gesundheit und Soziales) behandelt. Adulte, männliche Wistar-Ratten (Charles River) mit einem Gewicht von 220 - 240 g erhielten eine Isoflurannarkose. Nach der Dekapitation erfolgte die Entnahme beider Augen.

2.2 Präparation und Kultivierung der Retina

Die empfindliche Netzhaut wurde vorsichtig von ihren benachbarten Schichten, der Sklera und dem retinalen Pigmentepithel, abgelöst und in einer sterilen Kulturschale entfaltet. Mit einem Skalpell konnte die Retina in ca. 1 mm² große Fragmente geschnitten werden (ca. 20 Fragmente/ Netzhaut). Die quadratischen Fragmente einer Retina wurden in jeweils eine Kulturflasche mit 3 ml Nährmedium transferiert. Das Retina-Nährmedium besteht aus Minimum Essential Medium mit 10 % fötalem Kälberserum, 2 % B 27-Supplement, 25 mM HEPES, 0,8 % D-Glukose, 2 mM L-Glutamin, 100 IE/ 100 µg/ml Penicillin / Streptomycin (Rzeczinski et al., 2006).

Für die Kultivierung verwendeten wir einen Inkubator mit einem integrierten Wälzroller (Medizinisch-technische Labore der Charité - Universitätsmedizin Berlin, modifiziert nach Victorov et al., 2001, siehe Abbildung 3). Während der Kultivierung drehten sich die im Medium flottierenden Retinafragmente in den Flaschen kontinuierlich auf dem Wälzroller (60 Umdrehungen pro Minute, Temperatur 36,5 °C). Innerhalb einer Woche nahmen die ursprünglich flachen Netzhautfragmente eine Ballform an und werden daher im Folgenden Retinakörperchen (RB) genannt.



Abbildung 3: Wälzroller mit Kulturflaschen (Foto aus: „Etablierung und Charakterisierung eines neuen organotypischen Retina-Kulturmodells der adulten Ratte“, Dissertation von Stefan Rzeczinski 2007).

2.3 Pharmakologische Interventionen

2.3.1 Erythropoietin

Humanrekombinantes EPO (2,5 µg/ml; 250 U, Roche, Mannheim) wurde in den entsprechenden Einheiten (1 - 25 U/ml) zum Nährmedium zugesetzt und bis zum Gebrauch in Form von 1 ml Teilportionen bei -20 °C tiefgefroren. Nach der Präparation erfolgte der Transfer aller Fragmente einer Netzhaut (ca. 25 Fragmente/ Retina) in eine Kulturflasche mit 3 ml EPO-haltigem Nährmedium. Ab dem 2. bis zum 6. Kultivierungstag wurde täglich 1 ml des Mediums in gleicher Menge mit frischem EPO-Medium ausgewechselt.

2.3.2 Simvastatin

Simvastatin wurde chemisch aktiviert durch eine alkalische Hydrolyse. Hierzu wurden 4 mg Simvastatin in 100 µl Ethanol (99%) gelöst, 150 µl von 0,1 N Natriumhydroxid hinzugefügt und bei einer Temperatur von 50 °C für zwei Stunden inkubiert. Die Lösung wurde mit Salzsäure zu einem pH-Wert von 7,4 neutralisiert und bis zu einem Volumen von 1 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt, sodass sich eine Konzentration von 4 mg/ml ergibt (Sadeghi et al., 2000). Eine 10 mM Stammlösung wurde in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ verdünnt und in Teilportionen bei -20 °C aufbewahrt. Simvastatin wurde am 2. (Langzeitbehandlung) oder am 6. Kultivierungstag (Kurzzeitbehandlung) den Retinakulturen zugefügt.

2.3.3 Glutamat-induzierte Schädigung der Ganglienzellschicht

Am 6. Kultivierungstag wurden die Retinakörperchen aller Kulturflaschen in jeweils zwei gleich große Gruppen aufgeteilt, sodass sich die Zahl der Flaschen verdoppelte. Einer Hälfte der beiden gleich vorbehandelten Gruppen wurde für 24 Stunden Glutamat in einer Endkonzentration von 5 mM zugesetzt, danach erfolgte die Fixierung (Ruscher et al., 2007). Abbildung 4 veranschaulicht die Aufteilung der Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt der Schädigung durch Glutamat am 6. Kultivierungstag.

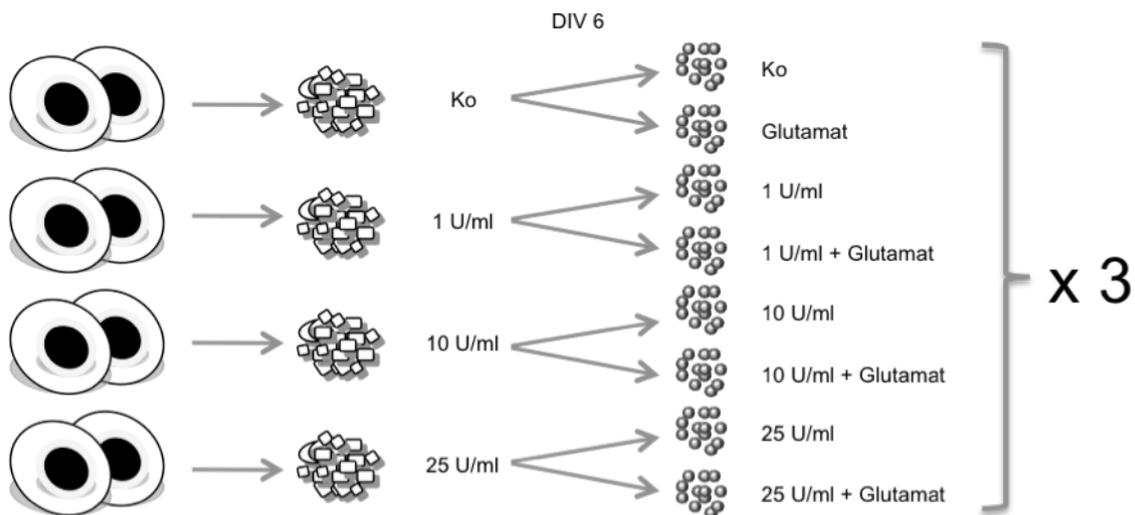


Abbildung 4: Versuchsaufbau: 8 Netzhäute wurden 4 adulten Ratten entnommen. Die Retinas wurden in 1 mm^2 große Fragmente geschnitten und mit EPO (1 - 25 U/ml) behandelt. Am 6. Kultivierungstag (days in vitro, DIV) erhielt die Hälfte 5 mM Glutamat. RBs wurden an DIV 7 fixiert und zur Auswertung histochemisch gefärbt. Die Experimente wurden bis zu dreimal durchgeführt. Ko = Kontrolle. Abbildung nach S. Rzczinski, Dissertation 2007.

2.4 Fixieren, Einbetten und Schneiden des Retinagewebes

Die Retinakörperchen wurden am 7. Kultivierungstag aus den Flaschen entnommen und in PBS gewaschen. Es folgte eine 10-minütige Formalinfixierung in Davidson Fixativ. Davidson Fixativ setzt sich aus 70 % Ethanol (96%ig), 20 % Formaldehyd (39%ig) und 10 % Eisessig zusammen. Anschließend wurden die Retinakörperchen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und in Propanol entwässert (2-Propanol 90 % für 30 min, danach dreimalige Dehydratation in 2-Propanol 99,9 % für jeweils 30 min). Um die 1 mm^2 kleinen und weißlich-transparenten Retinakörperchen besser erkennen zu können, erfolgte eine kurze Anfärbung mit 1 % Eosin Y. Der Fixierung schloss sich die Einbettung in Paraffin an, das nach einer Stunde einmal gewechselt wurde. Die Retinakörperchen wurden danach eine Nacht im Paraffinbad bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ belassen. Nach dem Aushärten konnten die Paraffinblöcke an einem Mikrotom mit einer Schichtdicke von $8 \text{ }\mu\text{m}$ geschnitten und die Schnitte auf Objektträger gebracht werden (Rzczinski et al., 2006).

2.5 Histologie und Immunhistochemie

Nachfolgend werden die angewandten Färbungen beschrieben, dabei sind einige Verfahren

zur besseren Übersicht aufgelistet. Alle Paraffinschnitte wurden aus dem Zentrum des runden Retinakörperchens gewählt und initial für 5 Minuten in Rotihistol deparaffiniert. Die Rehydratation erfolgte in der absteigenden 2-Propanol-Reihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %) für je 30 Sekunden.

2.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung (Abbildung 5A)

1. Waschen in destilliertem Wasser
2. Färben mit Gill N1 Hämatoxylin für 5 Minuten
3. Waschen in destilliertem Wasser
4. Bläuen in 1 % Natriumhydrogencarbonat für 3 Minuten
5. Waschen in destilliertem Wasser
6. Färben mit Kresylviolett (0,2 % Kresylviolett in 0,1 M Acetatpuffer; pH-Wert 3,5) für 30 Sekunden
7. Waschen in destilliertem Wasser
8. Färben mit Eosin für 15 Sekunden
9. Waschen in destilliertem Wasser
10. Dehydratation in aufsteigender Ethanolreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 %)
11. Fixierung in Rotihistol für 3 Minuten
12. Eindeckeln der Schnitte mit dem Einschlussmittel Vitro-Clud.

2.5.2 Immunhistochemie mit von Willebrand Faktor (vWF)

Der vWF ist ein auf Endothelzellen exprimiertes Glykoprotein. Die entparaffinierten Retinaschnitte wurden nach dem Protokoll des Herstellers (LSAB 2 System-HRP, Dako Hamburg) weiterbehandelt. Als primärer Antikörper gegen vWF wurde ein gebrauchsfertiger polyklonaler, anti-humaner Antikörper aus dem Kaninchen (Dako) und als Substratchromogen 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) verwendet. Die Schnitte wurden in Glycerin eingeschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet (Abbildung 5B).

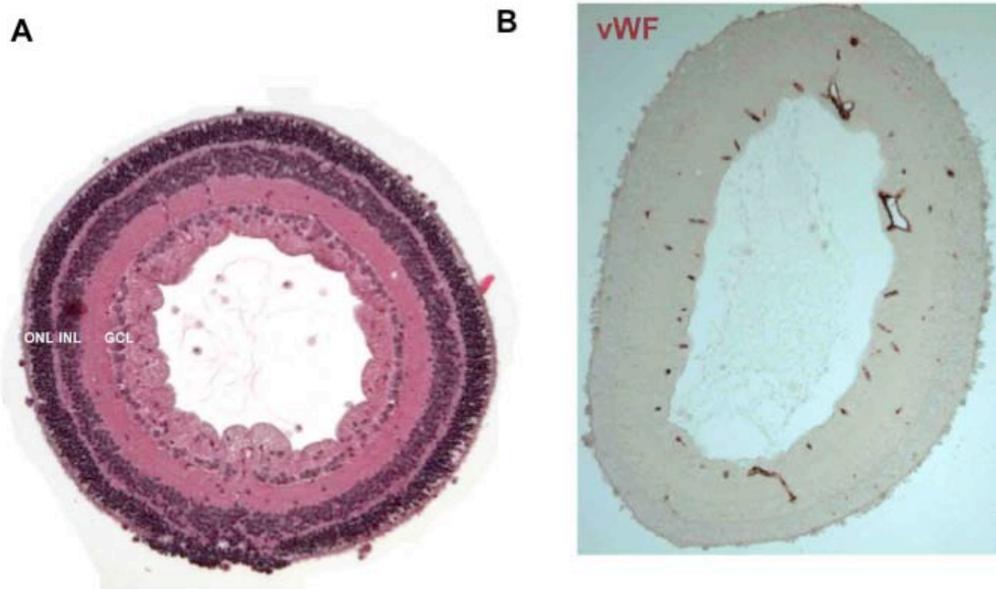


Abbildung 5: Einwöchige Retinakörperchen (Paraffinschnitte). (A) Hämatoxylin-Eosin-Nissl- und (B) von Willebrand Faktor (vWF)-Färbung. ONL = äußere Körnerschicht, INL = innere Körnerschicht, GCL = retinale Ganglienzellschicht.

2.5.3 Fluoreszenz-Färbungen

Die Retinaschnitte wurden wie beschrieben deparaffiniert, in der absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %) rehydriert, zweifach in Tris-Puffer gewaschen und die Bindungsstellen eine Stunde in einer Lösung aus PBS mit 3 % Eselserum und 0,1 % Triton-X geblockt. Die Inkubation des primären, beziehungsweise sekundären Antikörpers erfolgte in der Blockierungslösung bei 4 °C. Mehrfache Waschschrte mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) wurden dazwischen durchgeführt.

Um vaskuläre Strukturen darzustellen wurden der primäre anti-vWF-Antikörper (gebrauchsfertig, Dako) und der sekundäre Antikörper Alexa 488 in einer Verdünnung von 1:500 verwendet.

EdU (5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin) und **BrdU** (5-Bromo-2'-Deoxyuridin) sind Thymidinanaloga, die im Rahmen der DNA- Synthese in Zellkerne eingebaut werden. EdU wurde während des gesamten Kultivierungszeitraums täglich und BrdU am 5. und 6. Kultivierungstag mit dem Mediumwechsel ersetzt, beide in einer Konzentration von 10 µM. Mit EdU markierte Zellen wurden nach den Angaben des Herstellers visualisiert (Click-iT™ EdU Imaging Kit), Rinderserumalbumin wurde durch 3% Eselserum ersetzt. Für die BrdU-

Färbung musste das Retinagewebe zunächst bei 37 °C in 2 N Salzsäure für 20 Minuten denaturiert werden. Anschließend wurden die Schnitte in 0,1 M Boratpuffer gespült und in TBS gewaschen. Der primäre Anti-BrdU-Antikörper (1:500) und sekundäre Antikörper (RhodRedX, 1:250) wurden in einer Blockierungslösung bestehend aus TBS mit 0,1 % Triton X-100 und 3 % Eselserum verdünnt.

Um geschädigte Kerne darzustellen, wendeten wir die **TUNEL-Färbung** (Terminale-Desoxynukleotidyl-Transferase-vermitteltes dUTP-Biotin „nick end labeling“) nach den Angaben des Herstellers an (In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein, Roche).

Den immunhistochemischen Färbungen schloss sich stets eine Gegenfärbung mit **DAPI** (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) an, um die Kerne der GCL darzustellen. DAPI ist ein blauer Fluoreszenzfarbstoff, der an Adenosin/Thymidin-Regionen von Desoxyribonukleinsäure (DNS) bindet. Die Fluoreszenzschnitte wurden in Immu-Mount (Thermo Scientific) oder ProLong[®] Gold mit DAPI (Invitrogen) eingedeckelt.

Es folgt ein Protokoll für eine Mehrfachfärbung aus vWF, den Thymidinanaloga BrdU und EdU, sowie DAPI-Kerndarstellung. Die Blockierungslösung für die Antikörperinkubation setzt sich aus TBS mit 3 % Ziegen Serum und 0,3 % Triton X 100 zusammen.

VWF- BrdU- EdU- DAPI- Färbung:

1. Entfernung des Paraffins in Rotihistol für 10 Minuten
2. Hydrierung in der absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %), jeweils 2-3 Minuten
3. zweimaliges Waschen in TBS, jeweils 5 Minuten
4. EdU-Färbung nach Angaben des Herstellers
5. dreimaliges Waschen in TBS, jeweils 5 Minuten
6. BrdU-Färbung
7. dreimaliges Waschen in TBS, jeweils 5 Minuten
8. vWF-Färbung nach Angaben des Hersteller für 15 Minuten
9. dreimaliges Waschen in TBS, jeweils 5 Minuten
10. sekundärer Antikörper Alexa 488 (Ziege - anti Kaninchen, 1: 500) für 45 Minuten in Blockierungslösung
11. dreimaliges Waschen in TBS, jeweils 5 Minuten
12. Eindeckeln.

2.6 Schadensquantifizierung

Um die GCL optimal darzustellen, wurde ein Schnitt aus dem Zentrum des Retinakörperchens gewählt. Die gefärbten Schnitte wurden digital fotografiert (100- 400fache Vergrößerung) und die Gruppen verblindet.

Die Auswertung vWF⁺- Gefäßstrukturen im gesamten Retinakörperchen erfolgte anhand folgender Parameter: (a) Gefäßlängsschnitte, (b) Querschnitte, (c) Verzweigungen, sowie (d) Vorhandensein eines Gefäßlumens (siehe Abbildung 7A, 8B). Die Daten wurden in Bezug zur Gesamtfläche des jeweiligen Retinaschnittes gesetzt. Die Flächenbestimmung erfolgte mithilfe des Programms SigmaScan Pro 5.0 (Statcon, Witzenhausen, Germany).

TUNEL-, EdU-, oder BrdU- markierte Kerne wurden in der GCL gezählt und in Bezug zu allen Kernen dieser Schicht gesetzt (visualisiert durch eine DAPI-DNS-Gegenfärbung). VWF⁺- Gefäßstrukturen wurden ausgewertet, in dem der ihnen zugehörige DAPI⁺-Zellkern gezählt wurde (siehe Abbildung 7B, 8A).

Für die Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung wurden kernmorphologische Kriterien angewendet: (a) vitale, (b) pyknotische, (c) geschwollene und (d) fragmentierte Zellkerne (Rzeczinski et al., 2006; Ruscher et al., 2007; siehe Abbildung 12C).

Es wurden ungefähr 100 - 130 Zellen innerhalb der GCL pro Schnitt und circa 10 Schnitte pro Behandlungsgruppe bewertet. Neuroprotektionsexperimente mit EPO wurden dreifach durchgeführt, d.h. ungefähr 31200 Zellen in der GCL ausgewertet. Experimente zur Gefäßmorphologie, Angioproliferation und Apoptose der Gefäßstrukturen wurden zweifach wiederholt. Simvastatinstudien wurden zweifach durchgeführt. Alle Experimente erfolgten jeweils mit vier Ratten, das entspricht zwei Retinas pro Kulturgruppe (siehe Abbildung 4). Die Daten der Experimente wurden zur statistischen Analyse zusammengefasst.

2.7 Angewandte statistische Verfahren

Alle Daten werden als Streudiagramm mit Mittelwerten \pm 95% Konfidenzintervall (rote Linien in den Graphiken) dargestellt. Jedes Dreieck repräsentiert einen Paraffinschnitt eines Retinakörperchens.

Um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen herauszufinden, wurde paarweise mehrfach getestet. Ein p-Wert $<$ 0,05 wurde als signifikant gewertet. Eine zweifaktorielle Varianzanalyse und nachfolgend ein Post-hoc-Test (Tukey-Test, Duncan-Test) wurden

angewandt, um signifikante Interaktionen zwischen EPO-Behandlung und Glutamatexposition zu ermitteln, oder um signifikante Interaktionen einer Kurz- bzw. Langzeitbehandlung mit Simvastatin zu finden.

Verschiedene p-Werte für die Unterschiede zwischen den Gruppen werden in den Abbildungen angezeigt.

2.8 Materialien

Antikörper und Seren

anti-BrdU-Antikörper, aus der Ratte	Harlan Sera Lab, Indianapolis, IN
anti-humaner von-Willebrand-Faktor Antikörper, aus dem Kaninchen	Dako, Hamburg
anti-Kaninchen Alexa 488, hergestellt im Esel	Molecular Probes, Invitrogen
anti-Kaninchen Alexa 594, hergestellt im Esel	Molecular Probes, Invitrogen
anti-Kaninchen RhodRedX, hergestellt im Esel	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA
biotinylierter anti-Kaninchen-IgG, hergestellt im Esel	Dianova, Hamburg
biotinylierter anti-Meerschweinchen-IgG, aus dem Esel	Dianova, Hamburg
BrdU (5-Bromo-2'-Deoxyuridin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eselserum (Normal Donkey Serum)	Dianova, Hamburg
Sytox Green	Invitrogen, Karlsruhe
Ziegenserum (Normal Goat Serum)	Dianova, Hamburg

Kits

Click-iT™ EdU Imaging Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA
LSAB2-System HRP	Dako, Hamburg
TUNEL In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein	Roche Applied Science, Mannheim

Zellkulturmedien

B27-Supplement	Life Technologies, Karlsruhe
D-Glukose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM	Biochrom, Berlin
HEPES	Biochrom, Berlin
Kälberserum, fötales	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Minimum Essential Medium Earle (MEM Earle)	Biochrom, Berlin
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phosphate buffered saline ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Life Technologies, Karlsruhe

Chemikalien und Reagenzien

2-Propanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
------------	----------------------------

Ammoniak	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aquatex (Einschlussmittel)	Merck Millipore, Darmstadt
DAPI (4,6-Diaminidino-2-Phenylindol)	Molecular Probes, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eosin Y 1 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Erythropoietin, humanrekombinant	Roche, Mannheim
Essigsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Baker, Deventer, Niederlande
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gill N1 Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutamat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ImmuMount	ICN, Eschwege
Isofluran	Hoechst AG, Frankfurt/Main
Kresylviolett-Acetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ProLong [®] Gold mit DAPI	Invitrogen, Carlsbad, CA
Rotihistol	Roth, Karlsruhe
Simvastatin	Gödecke AG, Freiburg
Tris-Puffer	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Vitro-Clud (Einschlussmittel)	R. Langenbrück GmbH, Emmendingen
Wasserstoffperoxid	Roche Applied Science, Mannheim

Geräte

Digitalkamera	Eclipse E2000, Nikon, Japan
Fluoreszenzmikroskop	Leica, Heerbrueg, Schweiz
Inkubator	Bio-Rad Laboratories, München
Lichtmikroskop (Histologie)	Nikon, Japan
Lichtmikroskop (Präparation)	Leica Zoom 2000, Leitz, Wetzlar
Mikrotom	Leica, Bensheim
Sterilwerkbank	Nuaire, Plymouth, MM, USA
Wälzvorrichtung	Med.-technische Labore der Charité Berlin
Zentrifuge	Biofuge pico, Heraeus, Hanau

Sonstige Materialien

AL Deckgläser 21 x 26 mm	AL
Laborflaschen, 25 ml	VWR International GmbH, Darmstadt
Menzel-Deckgläser 24 x 2,6 mm	
Paraffin	Paraplast Plus, Sigma, Deisenhofen
Paraffin-Einbettform	Electron Microscopical Science, München
Pinzetten	Electron Microscopical Science, München
Super Frost Plus Objektträger	R. Langenbrinck Emmendingen

3. ERGEBNISSE

Erythropoietin und Simvastatin wurden in Dosis-Wirkungsstudien hinsichtlich ihrer neuroprotektiven Effekte gegen Glutamatexzitotoxizität in der Ganglienzellschicht organotypischer Retinakulturen untersucht. Die Testung von Simvastatin erfolgte *vor* und *mit* Glutamatschädigung. Die vaskulären Strukturen der Retinakörperchen wurden charakterisiert und die Wirkung von EPO auf diese beobachtet.

3.1 Erythropoietin ist neuroprotektiv im organotypischen Retinakulturmodell

Die organotypischen Retinakulturen wurden eine Woche kontinuierlich mit EPO (1 - 25 U/ml), entsprechend der Beschreibung im Methodenteil, vorbehandelt. Am 6. Kultivierungstag erfolgte eine Schädigung mit 5 mM Glutamat. Apoptotische Kerne wurden durch eine TUNEL-Färbung visualisiert und ins Verhältnis zu allen DAPI⁺-Kernen der Ganglienzellschicht gesetzt. Die Anzahl der TUNEL⁺-Zellen reduzierte sich signifikant und dosisabhängig durch eine Vorbehandlung mit EPO im Vergleich zur reinen Glutamatgruppe (Glutamatgruppe *versus* EPO 1, 10, 25 U/ml in Mittelwert \pm Standardabweichung = $32,4 \pm 14,7\%$ *vs.* $20,8 \pm 9,7\%$; $9,8 \pm 3,7\%$; $6,1 \pm 3,2\%$ TUNEL⁺-Zellen, Anzahl (n) der Retinakörperchen = 23-29, *p < 0,001 gegenüber Glutamat).

Der basale Schaden ohne Glutamatexposition war in Kontrollen und EPO-Gruppen vergleichbar gering (5-6 %). Der neuroprotektive Effekt von Erythropoietin kam erst nach einer Schadenssetzung durch das Exzitotoxin Glutamat zum Ausdruck und erreichte sein Maximum bei 25 U/ml EPO (Abbildung 6).

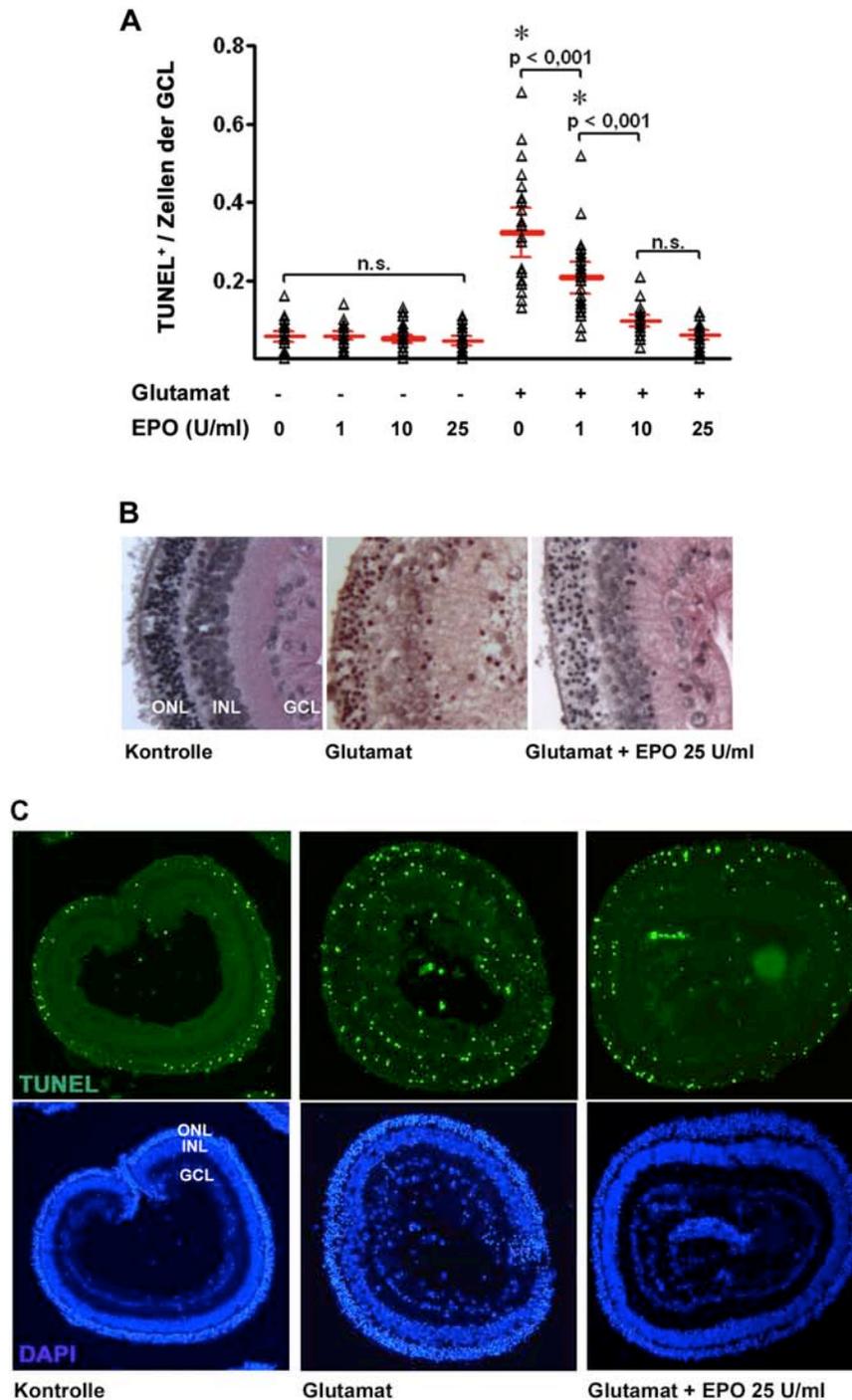


Abbildung 6: EPO ist neuroprotektiv gegen Glutamatschaden. (A) Kontinuierliche EPO-Behandlung schützt die GCL in organotypischen Retinakulturen dosisabhängig gegen Glutamatexzitotoxizität. Angabe in Mittelwert \pm 95% Konfidenzintervall (rote Linien). Jedes Dreieck stellt ein Retinakörperchen dar. Eckige Klammern geben einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen an, ein * einen zur korrespondierenden Kultur ohne Glutamatbehandlung (* $p < 0,01$); $n = 23 - 29$. N.s. = nicht signifikant. (B) Zytoarchitektur der Retinakörperchen in der HE- Nissl- Färbung, 200fache Vergrößerung. Glut = Glutamat. (C) Apoptotische Zellen in der TUNEL- und DAPI-Kern-Färbung, 100fache Vergrößerung. ONL = äußere Körnerschicht, INL = innere Körnerschicht, GCL= Ganglienzellschicht. Behandlungsgruppen in der Abbildung angegeben.

3.2 Vaskuläre Strukturen im organotypischen Kulturmodell

Vaskuläre Strukturen der Retinakörperchen wurden mit von Willebrand Faktor (vWF), einem auf Endothelzellen exprimierten Glykoprotein, immunhistochemisch angefärbt. In einwöchigen Kulturen waren Gefäßstrukturen vor allem im Zentrum des Retinakörperchens, d.h. überwiegend in der GCL anzufinden. Die Quantität vWF⁺-Strukturen nahm von der ersten bis zur zweiten Woche stark ab. Nach 14 Kultivierungstagen waren nur noch wenig vaskuläre Strukturen vorhanden, die vor allem in der Ganglienzellschicht lokalisiert waren. Eine kontinuierliche EPO-Behandlung führte zu einer Zunahme der Gefäßstrukturen (siehe Kapitel 3.3). Um die vaskuläre Dynamik weiter zu charakterisieren, wurden den Kulturen zwei Thymidinanaloga zugesetzt (Kapitel 3.4). Die Vitalität einwöchiger vaskulärer Strukturen wurde mithilfe der TUNEL-vWF-Färbung untersucht (siehe Kapitel 3.5).

3.3 Erythropoietin erhält Gefäße in der organotypischen Retinakultur

Eine Woche mit EPO kultivierte Retinakörperchen zeigten mehr vWF⁺- Gefäßstrukturen als ihre unbehandelten Kontrollen. Evaluiert wurden zum einen der Anteil vWF⁺- Strukturen in der Ganglienzellschicht bezogen auf alle in dieser Schicht vorhandenen DAPI⁺- Kerne (Abbildung 7B, 8A) und zum anderen gefäßmorphologische Parameter innerhalb eines gesamten Retinakörperchens bezogen auf seine Fläche (Abbildung 7A, 8B).

In Abbildung 8A ist der signifikante 1,8-fache Anstieg der vWF⁺- Strukturen nach Vorbehandlung mit 25 U/ml EPO dargestellt ($F_{(1,139)} = 7,6$; $p < 0,001$, 25 U/ml EPO vs. Kontrolle). Glutamat hatte keinen Einfluss auf die Gesamtzahl der vWF⁺- Strukturen ($F_{(1,139)} = 0,233$; $p = 0,63$).

Abbildung 8B zeigt die Auswertung von gefäßmorphologischen Parametern, wie Quer- und Längsschnitte, Gefäßverzweigungen und sichtbarem Gefäßlumen. Die Quantität der Gefäßparameter nahm signifikant und dosisabhängig in mit 10 und 25 U/ml EPO behandelten Gruppen im Vergleich zu 1 U/ml EPO zu ([#] $p < 0,05$, einfaktorielle Varianzanalyse, Tukey Post-hoc-Test).

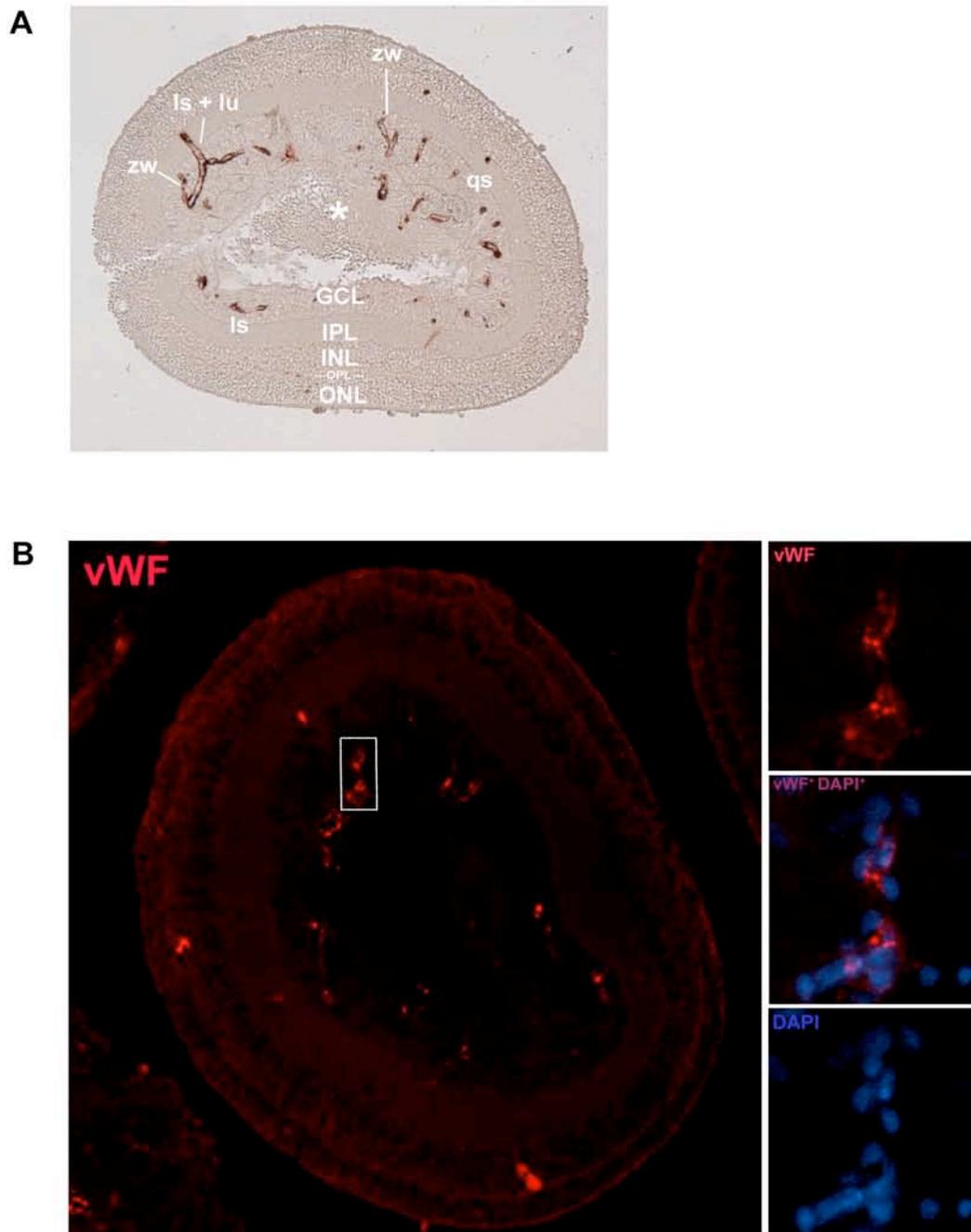


Abbildung 7: Vaskuläre Strukturen nach 7 Kultivierungstagen. (A) VWF-Substratchromogen-Färbung mit Darstellung der Gefäßmorphologie. ONL = äußere Körnerschicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, GCL = retinale Ganglienzellschicht, qs = Querschnitte, ls = Längsschnitte, zw = Zweige, lu = sichtbares Lumen, * innere Kavität. 100fache Vergrößerung. (B) Fluoreszenzfärbung mit Veranschaulichung Gefäß-assoziiierter Strukturen. Die Endothelzellen wurden mit vWF visualisiert und ihrem DAPI⁺-Kern zugeordnet (vWF⁺ DAPI⁺-Zellen). Die rechte Spalte stellt eine Vergrößerung des Ausschnittes (weißer Rahmen) dar, in der Mitte wird eine Überlagerung der vWF- und DAPI-Färbung gezeigt.

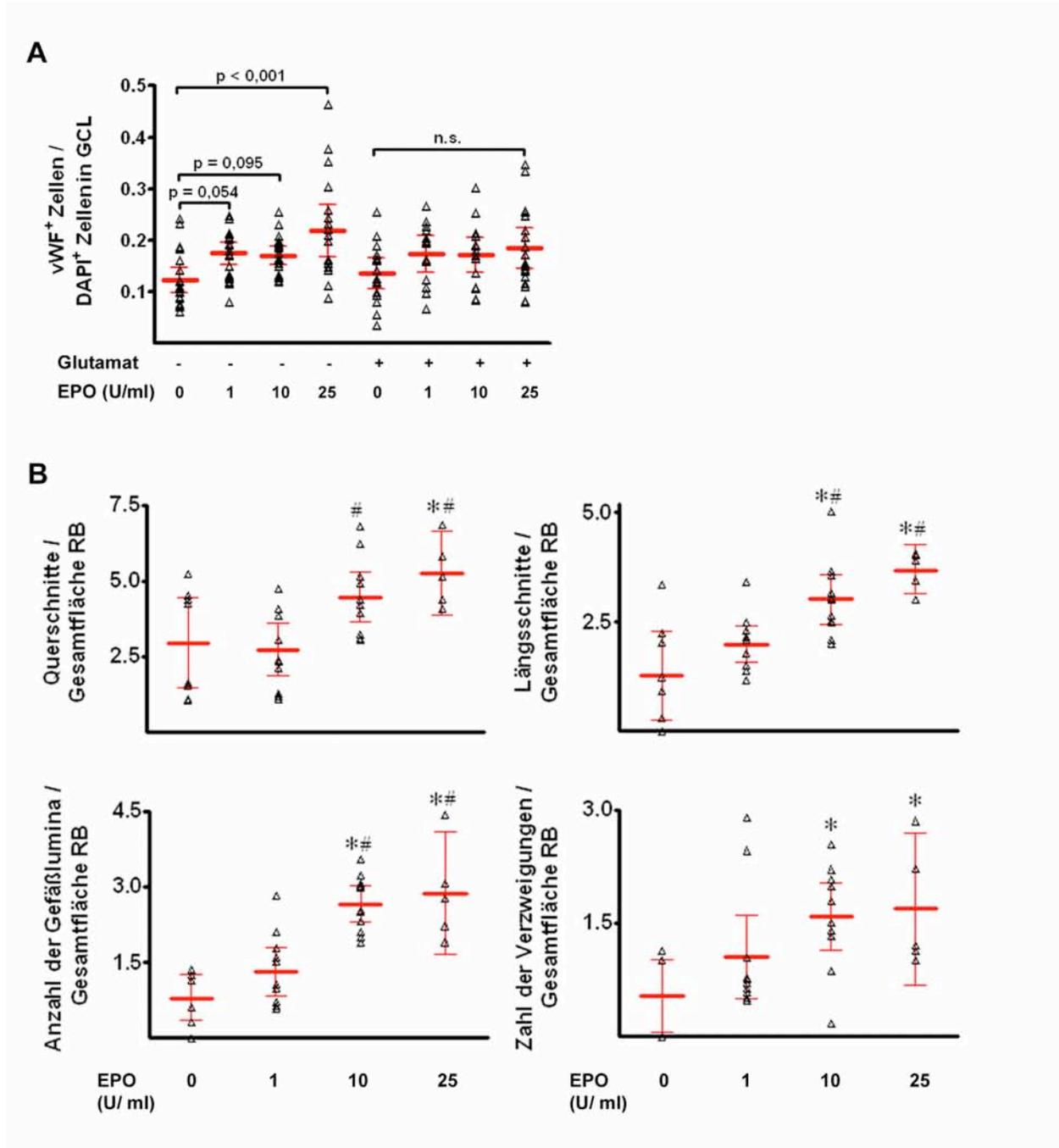


Abbildung 8: Gefäßevaluation nach 7 Kultivierungstagen. (A) Auswertung nach zellulären Parametern in der Ganglienzellschicht. Eine kontinuierliche EPO-Behandlung erhöhte den Anteil vWF⁺-Strukturen an allen DAPI⁺-Zellen dieser Schicht. Eine Dosis von 25 U/ml EPO führte zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. (B) Auswertung nach morphologischen Kriterien bezogen auf die Gesamtfläche der Retinakörperchen. EPO zeigte einen dosisabhängigen Effekt auf die Gefäßgestalt, wobei eine Konzentration von 10-25 U/ml insbesondere mehr Längsschnitte, Verzweigungen und sichtbares Lumen bewirkte. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) werden gegenüber der unbehandelten Kontrolle (*) und der 1 U/ml EPO (#) dargestellt. N.s. = nicht signifikant. N = 8 - 11 RB aus 2 Experimenten.

3.4 Erythropoietin fördert Gefäß-assoziierte Zellproliferationen

Eine Behandlung mit EPO führte zu einer Zunahme der Gefäß*quantität* in der GCL. Weitere Experimente sollten helfen herauszufinden, ob dies auf Erythropoietins proangiogenetische oder zytoprotektive Wirkung auf Endothelzellen zurückzuführen ist.

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Thymidinanaloga zu den Kulturen gegeben, die im Rahmen der DNS-Synthese in Zellkerne eingebaut werden. Die Applikation von EdU erfolgte kontinuierlich von Beginn an und die von BrdU am 5. und 6. Kultivierungstag (Abbildung 9). Proliferierte vaskuläre Strukturen innerhalb der gesamten Kultivierungszeit ($vWF^+ EdU^+$) und in einem reifen Retinakörperchen ($vWF^+ BrdU^+$) wurden in Relation zur Gesamtheit der Gefäßstrukturen, sowie aller Zellkerne in der GCL gesetzt.

Es zeigte sich zunächst eine allgemeine Stimulation der DNS-Synthese in der Ganglienzellschicht durch EPO, dargestellt durch EdU^+ - Zellen (Kontrollgruppe *versus* EPO 1, 10, 25 U/ml in Mittelwert \pm Standardabweichung = $12,7 \pm 4,5$ % *vs.* $*17,4 \pm 4,7$; $*17,9 \pm 4,4$; $*20,9 \pm 8,8$ % EdU^+ - Zellen, $n = 27-32$, $* p < 0,05$ gegenüber Vehikel). Eine Glutamatexposition hatte keinen signifikanten Einfluss auf die gesamte Proliferation ($F_{(1,222)} = 0,4$; $p = 0,42$).

Nach einwöchiger EPO - Behandlung reichte der proliferierte Anteil der Gefäße in der GCL von 37 bis 53 % (Kontrolle *versus* 10 U/ml EPO), d.h. EPO führte zu keiner signifikanten Erhöhung ($EdU^+ vWF^+ / vWF^+$ - Zellen, zweifaktorielle Varianzanalyse $F_{(1,82)} = 2,4$; $p < 0,08$; Teststärke ($\alpha = 0,05$) = 0,34; Abbildungen 9 und 10).

Gemessen an allen Zellen der retinalen Ganglienzellschicht ($DAPI^+$) zeigte sich nach einwöchiger Kultivierung mit 10 U/ml EPO eine Verdopplung der Gefäß-assoziierten Proliferationen ($EdU^+ vWF^+$ - Zellen) von 5 auf 10% im Vergleich zur Kontrollgruppe ($F_{(1,82)} = 3,6$; $p = 0,017$). Glutamat hatte wiederum keinen Einfluss auf die Angioproliferation ($F_{(1,82)} = 1$; $p = 0,31$; Teststärke ($\alpha = 0,05$) = 0,05; Abbildungen 9 links unten und 10 zweite und letzte Spalte).

Genaueren Einblick in die Proliferationsdynamik der Gefäße in der GCL zum Ende der Kultivierung ermöglichte die Auswertung der BrdU-Inkorporation (ab dem 5. Kultivierungstag): Der proliferierte Anteil der Gefäße ($BrdU^+ vWF^+$) betrug ungefähr die Hälfte der Proliferation der gesamten einwöchigen Kulturzeit ($EdU^+ vWF^+$; Abbildung 9 erste Reihe). Zum Ende der Kultivierungszeit nahm also die Proliferationsdynamik der Gefäß-

assoziierten Zellen zu. Eine Dosis von 10 U/ml EPO hatte wiederum die größte Wirkung ($F_{(1,82)} = 3,8$; $p = 0,014$; Abbildung 9 erste Reihe). Auch auf die DNS-Synthese der vaskulären Strukturen im reifen Retinakörperchen hatte Glutamat keinen wesentlichen Effekt ($F_{(1,82)} = 2,7$; $p = 0,1$; Teststärke ($\alpha = 0,05$) = 0,24; Abbildungen 9 zweite Reihe rechts und 10).

Der Anteil proliferierter Gefäße der GCL im reifen Retinakörperchen (**BrdU**⁺ vWF⁺ / DAPI⁺) erreichte nach Vorbehandlung mit 10 U/ml EPO einen signifikanten Anstieg von 2,5 auf 6,4 % ($F_{(1,82)} = 4,5$; $p = 0,006$; Abbildungen 9 zweite Reihe rechts und 10 dritte Spalte).

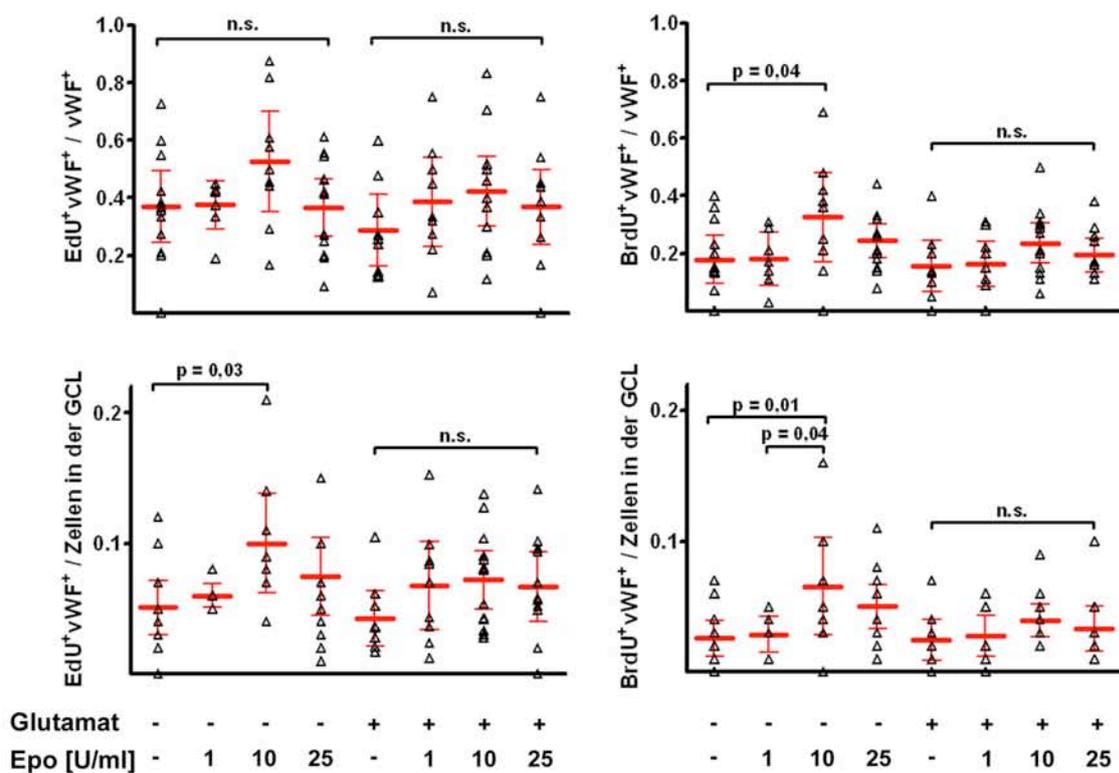


Abbildung 9: EPO fördert die Proliferation von vaskulären Strukturen in der GCL. Erste Reihe links: Anteil proliferierter Gefäßstrukturen (EdU⁺ vWF⁺-Zellen) an allen Gefäßen (vWF⁺-Zellen) in der GCL. Die 10 U/ml EPO- Gruppe zeigte den größten Effekt, der allerdings nicht signifikant im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ausfiel. Erste Reihe rechts: Die Proliferationsdynamik der vaskulären Strukturen nahm ab dem 5. Kultivierungstag zu (BrdU⁺ vWF⁺). In der 10 U/ml EPO- Gruppe wiesen Gefäßstrukturen signifikant mehr assoziierte Proliferationen auf als die 1 U/ml EPO- Kultur bzw. Kontrollen. Zweite Reihe links: Prolifizierte Gefäße der Ganglienzellschicht während der gesamten einwöchigen Kultivierungszeit. In den Kontrollen lag der Anteil Gefäß-assoziiierter Proliferationen an allen (DAPI⁺-) Zellen der GCL bei ca. 5 %. Eine Behandlung mit 10 U/ml EPO verdoppelte sie auf ca. 10 %. Zweite Reihe rechts: Während der letzten Kultivierungstage kam es nach einer EPO- Behandlung mit 10 U/ml zu einem signifikanten Anstieg Gefäß-assoziiierter Proliferationen in der GCL im Vergleich zur Kontrolle. N.s. = nicht signifikant.

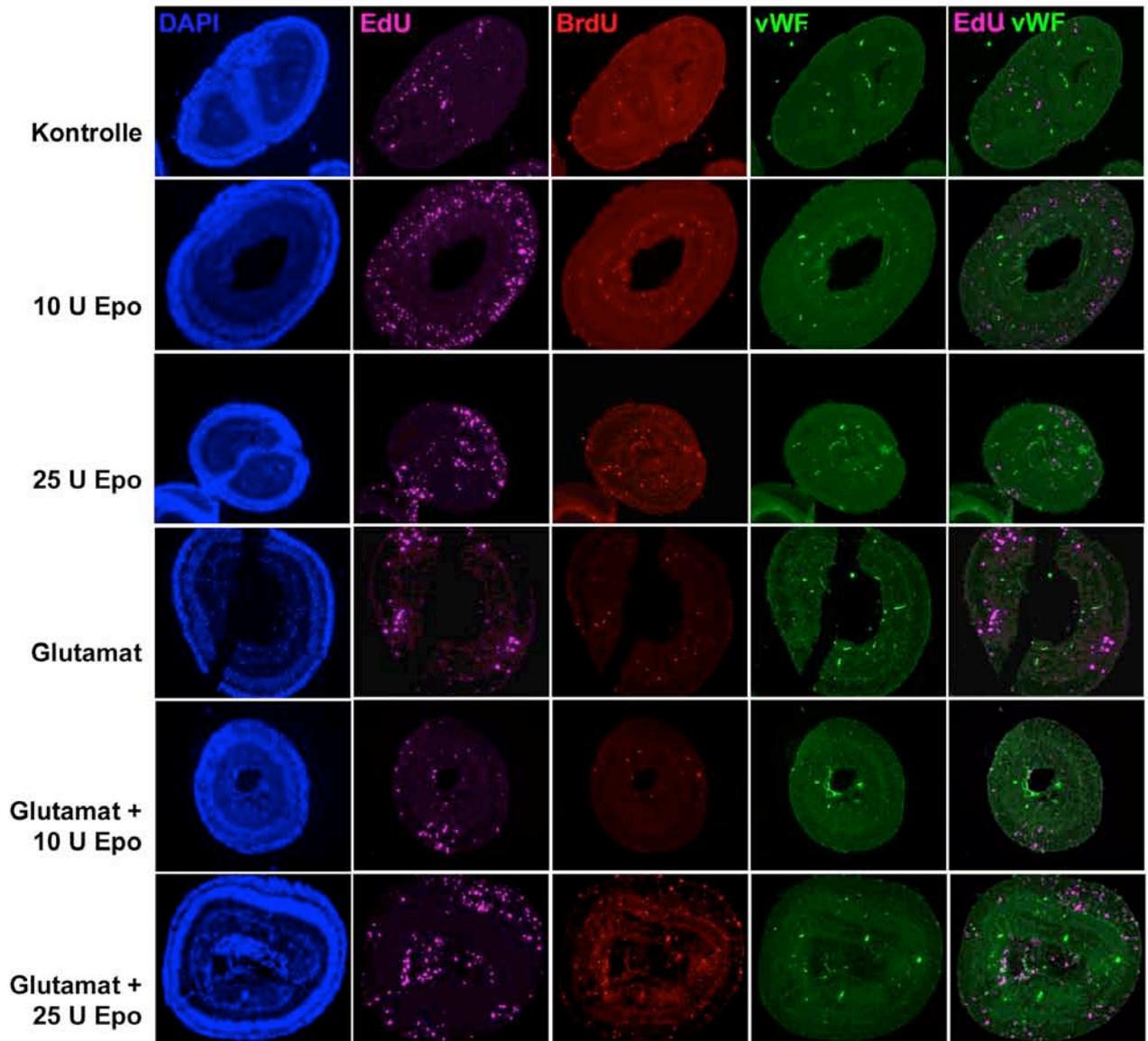
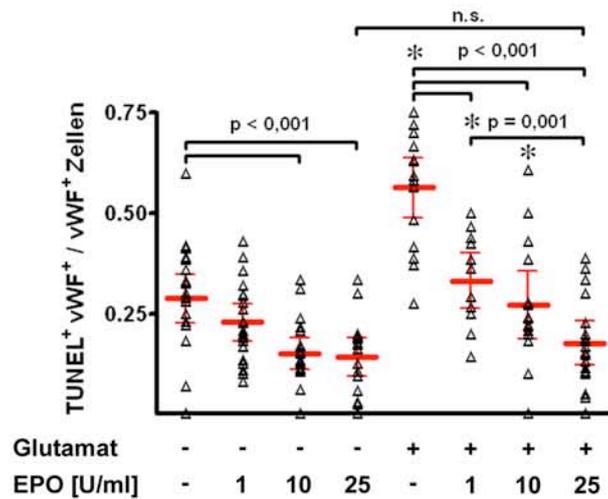


Abbildung 10: EPO fördert die Gefäß-assoziierte Zellproliferation in der GCL. Immunhistochemie der Retinakörperchen, die mit EPO ± Glutamat, sowie den Thymidinanaloga BrdU (am 5. und 6. Kultivierungstag) und EdU (gesamter Kultivierungszeitraum) behandelt wurden. Behandlungsgruppen in der Abbildung angegeben. 100fache Vergrößerung repräsentativer Retinakörperchen.

3.5 EPO ist vasoprotektiv gegen Glutamatergische Zytotoxizität

Apoptotische Gefäßstrukturen in der GCL wurden mit einer Dreifachfärbung, bestehend aus vWF, TUNEL und DAPI, dargestellt und die Anzahl geschädigter Gefäße ins Verhältnis zu allen in der GCL befindlichen vWF⁺-Strukturen gesetzt. Gefäßstrukturen unbehandelter, einwöchiger Retinakörperchen wiesen eine 28 %-ige TUNEL-Positivität auf (Abbildung 11A-B), die sich durch eine Behandlung mit EPO (10 und 25 U/ml) signifikant reduzierte ($F_{(1,139)} = 35,4$; $p < 0,001$). Nach einer Glutamaterexposition stieg die Anzahl vWF⁺ TUNEL⁺-Zellen allerdings auf das Zweifache der unbehandelten Gruppe an ($F_{(1,139)} = 456$; $p = 0,001$). Durch eine EPO-Vorbehandlung wurde der Anstieg apoptotischer Gefäßstrukturen nach Glutamat-induzierter Schädigung dosisabhängig ($25 > 10 > 1$ U/ml) wieder aufgehoben. Dies lässt auf einen angioprotektiven Effekt durch EPO schließen ($F_{(1,139)} = 6,8$; $p < 0,001$), der in der Dosis von 25 U/ml am stärksten ausfiel. Die Anzahl apoptotischer Gefäße war in dieser Dosis mit der unbehandelten Kontrolle vergleichbar (Abbildung 11).

A



B

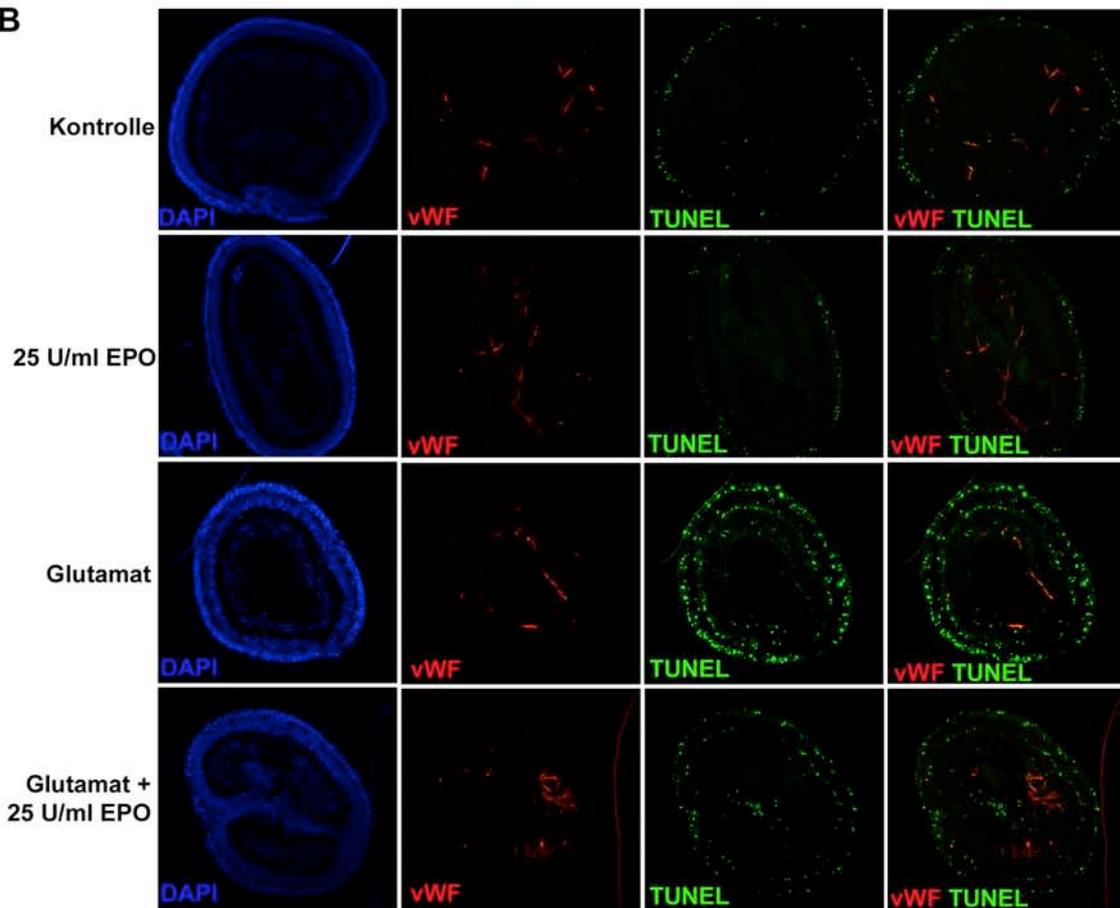


Abbildung 11: EPO erhält Gefäßstrukturen in Kultur und wirkt angioprotektiv gegen Glutamatschädigung.

(A) Kontinuierlich mit 10 und 25 U/ml EPO kultivierte RBs wiesen weniger apoptotische Gefäßstrukturen auf als unbehandelte Kontrollen. Endothelzellen, die am 6. Kultivierungstag mit Glutamat geschädigt wurden, waren durch eine EPO-Vorbehandlung (1 - 25 U/ml) dosisabhängig vor Apoptose geschützt. Ein * zeigt einen signifikanten Unterschied zur korrespondierenden Kultur ohne Glutamatbehandlung an (* $p < 0,01$). (B) Geschädigte Gefäße wurden mit einer vWF-TUNEL-DAPI- Färbung dargestellt (100fache Vergrößerung).

3.6 Simvastatin schützt dosisabhängig vor Glutamat

Rzeczinski und Kollegen konnten nach Etablierung des organotypischen Retinakulturmodells der adulten Ratte bereits zeigen, dass eine Vorbehandlung mit Simvastatin nach dem 2. bzw. 3. Kultivierungstag in einer Dosis von 0,1 μM die Glutamat-induzierte Schädigung in der GCL reduziert (Stefan Rzeczinski „Etablierung und Charakterisierung eines neuen organotypischen Retina-Kulturmodells der adulten Ratte“, Dissertation 2007). In den nachfolgenden Experimenten wurde Simvastatin auf seine protektiven Effekte im Rahmen einer Langzeit- und einer Kurzzeitbehandlung geprüft.

Für die Langzeitbehandlung erhielten die Retinakörperchen zunächst ab dem 2. Kultivierungstag eine viertägige Vorbehandlung mit Simvastatin (0,1 - 100 μM). Eine Behandlung mit 100 μM Simvastatin erwies sich als toxisch ($7,8 \pm 2,3\%$ vs. $2,8 \pm 2,1\%$ TUNEL⁺- Zellen in der unbehandelten Kontrolle, Werte \pm Standardabweichung, $p < 0,001$; T-test). Die Zahl TUNEL⁺- Zellen in den anderen Simvastatingruppen war vergleichbar gering wie in den unbehandelten Kontrollen (Daten nicht gezeigt). Nach Glutamatschädigung am 6. Kultivierungstag zeigte sich durch eine Simvastatinvorbehandlung in einer Dosis von 0,1 bis 10 μM eine signifikante und dosisabhängige Reduktion apoptotischer Zellen in der Ganglienzellschicht, wobei eine Konzentration von 0,1 μM wiederum am wirksamsten war ($10,2 \pm 4,9\%$ vs. $28,1 \pm 6,3\%$ TUNEL⁺- Zellen in der Glutamatkontrolle, $p < 0,001$; Abbildung 12A,C).

Diese Dosis testeten wir auf ihre neuroprotektive Wirkung im Rahmen einer Ko-Applikation mit Glutamat (Kurzzeitbehandlung). Interessanterweise erwies sich diese akute Behandlung als vergleichbar protektiv gegen Glutamatschaden wie die chronische ($11,5 \pm 6,4\%$ vs. $10,2 \pm 4,9\%$ TUNEL⁺- Zellen in der GCL, Akutbehandlung *versus* Langzeitbehandlung, Abbildung 12B).

Kulturen, die mit einer in unseren Experimenten per se toxischen Dosis von 100 μM Simvastatin behandelt worden waren, erlitten durch eine Glutamatexposition noch eine zusätzliche Schädigung: Abbildung 12C (rechts unten: Glutamat und 100 μM Simvastatin) zeigt eine starke Beeinträchtigung der GCL und auch der äußeren Zellschichten der Retinakörperchen, die in diesem Ausmaß in 100 μM Simvastatin-Kulturen ohne Glutamat nicht beobachtet wurde (letztere Gruppe ist nicht abgebildet).

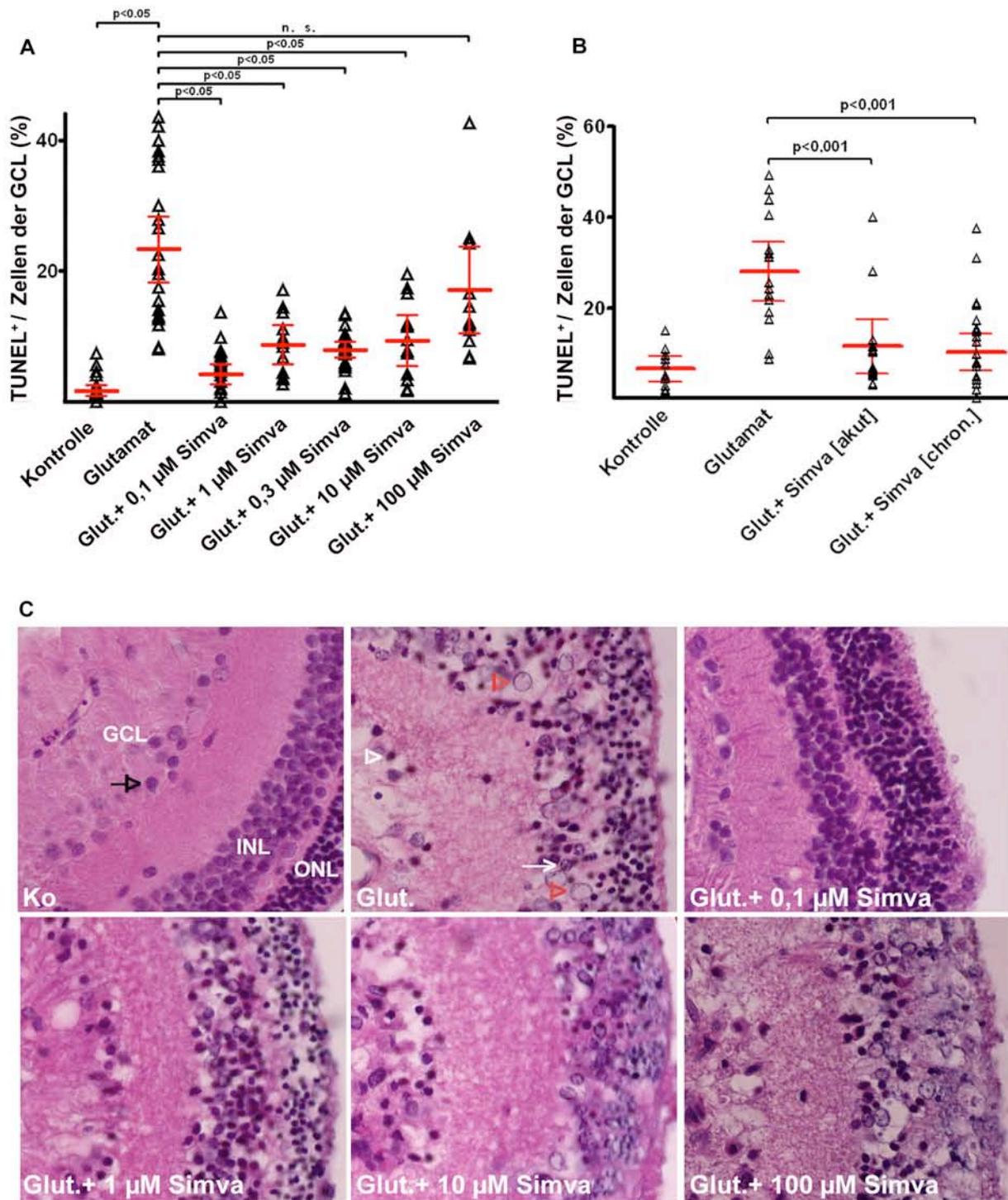


Abbildung 12: Neuroprotektion durch Simvastatin. (A) Eine 24-stündige Glutamatbehandlung (5 mM) führte zu einer deutlichen Schädigung in der Ganglienzellschicht. Simvastatin verringerte dosisabhängig den Glutamat-induzierten Schaden. Die Graphik fasst die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 4-6 Ratten zusammen. Angabe in Prozent. (B) Vergleich der neuroprotektiven Wirkung von 0,1 µM Simvastatin nach einer Vorbehandlung ab dem 2. Kultivierungstag (days in vitro, DIV) und nach einer Ko-Applikation mit Glutamat an DIV 6. Angabe in Prozent. (C) Repräsentative Schnitte einwöchiger Kulturen in der

Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung veranschaulichen die Zytoarchitektur und Kernmorphologie der organotypischen Retinakulturen. Alle Behandlungsgruppen wurden mit Simvastatin ab DIV 2 vorbehandelt, Dosis wie in der Abbildung angegeben. Apoptotische Kerne stellen sich in der Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung fragmentiert (weißer Pfeil) oder pyknotisch (weiße Pfeilspitze) infolge einer irreversiblen Chromatinkondensation, sowie geschwollen (rote Pfeilspitze) als Zeichen eines Ungleichgewichtes in der Ionenhomöostase, dar. Vitale Kerne (schwarzer Pfeil) sind dagegen gut abzugrenzen. Der protektive Effekt von 0,1 μ M Simvastatin gegenüber einer Glutamatschädigung wurde sowohl an der Zahl vitaler Kerne in der GCL, als auch an der erhaltenen Integrität der Zellschichten der Retina (äußere, innere Körner- und Ganglienzellschicht) deutlich. Die mikroskopische Abbildung lässt auch einen Schutz der ONL und INL mit den ganz außen befindlichen Photorezeptoren in der 0,1 μ M Simvastatin-Gruppe erkennen. Glut. = Glutamat, Simva = Simvastatin, chron. = chronisch, n.s. = nicht signifikant, ONL = äußere Körnerschicht, INL = innere Körnerschicht, GCL = Ganglienzellschicht.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden zwei potenzielle Neuroprotektiva, Erythropoietin und Simvastatin, auf ihre Wirkung gegen Glutamatergische Exzitotoxizität in einem organotypischen Kulturmodell der Retina untersucht. Außerdem wurden Erythropoietins Effekte auf vaskuläre Strukturen geprüft. Die Ergebnisse der in der Einleitung formulierten Fragestellungen werden zu Beginn dieses Kapitels im Kern kurz zusammengefasst.

1. Erythropoietin (1 - 25 U/ml) ist dosisabhängig neuroprotektiv gegen Glutamat-induzierte Exzitotoxizität in der retinalen GCL.
2. Vaskuläre Strukturen werden durch EPO geschützt: EPO hat antiapoptotische und angioproliferative Effekte auf Gefäßstrukturen und schützt sie (indirekt) durch eine Vorbehandlung vor Glutamatschaden.
3. Simvastatin (0,1 - 10 μ M) ist dosisabhängig neuroprotektiv gegen eine Glutamat-induzierte Schädigung der retinalen GCL, sowohl im Rahmen einer Prä-/ als auch Ko-Applikation mit Glutamat.

Nachfolgend werden die Ergebnisse diskutiert.

4.1 Glutamatergische Exzitotoxizität und retinale Ganglienzellen

Glutamatergische Exzitotoxizität ist eine pathologische Überaktivierung von exzitatorischen Glutamaterezeptoren und wird durch ionotropische Glutamaterezeptoren, inklusive N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) - und nicht- NMDA-Rezeptoren vermittelt (Dirnagl et al., 1999; Nehls, et al., 1989). Es wird weithin angenommen, dass Glutamatergische Exzitotoxizität ein Schadensmechanismus neurodegenerativer und ischämischer Erkrankungen der Retina ist, zum Untergang der retinalen Ganglienzellen führt (Dreyer et al., 1996; Lipton, 2001; Naskar and Dreyer, 2001; Osborne et al., 1999; Osborne et al., 2004) und außerdem eine Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Schlaganfall (Dirnagl et al., 1999), Morbus Parkinson (Sonsalla et al., 1998) oder Huntington Erkrankung (Sieradzan et al., 2001) spielt.

Zahlreiche Experimente mit primären Ganglienzell- oder Retinakulturen zeigten eine Glutamat-induzierte Schädigung der retinalen GCL (Ritch, 2000; Wax und Tezel, 2002). Es gibt aber auch konträre Ansichten. Hama und Kollegen stellten in Frage, ob und in welchem

Ausmaß retinale Ganglienzellen vulnerabel gegenüber Glutamat und NMDA sind (Hama et al., 2008). Ullian und Mitarbeiter zeigten, dass isolierte retinale Ganglienzellen oder Mischkulturen auch durch hohe Glutamat-, oder NMDA-Konzentrationen (0,5 mM versus 0,5 - 10 mM) nicht geschädigt werden konnten (Ullian et al., 2004).

Dagegen wendeten Duncan und Kollegen für Neuroprotektionsstudien mit einwöchigen organotypischen Retinakulturen der adulten Maus Glutamatkonzentrationen im millimolar-Bereich (0,1 mM) über 24 h an. Unsere Arbeitsgruppe verwendete ebenfalls eine Glutamatdosis im millimolar-Bereich, um eine ausreichende Schädigung in der Ganglienzellschicht zu verursachen.

Rzeczinski et al. stellten 2006 das organotypische Kulturmodell der Retina vor, in dem neuroprotektive Studien an Glutamatexzitotoxizität durchgeführt werden können. Einwöchige Retinakörperchen weisen per se kaum geschädigte Zellen auf, obwohl die Retina bei der Präparation vom Nervus opticus getrennt und in 1 mm² große Fragmente geteilt wurde. Durch eine 24-stündige Behandlung mit 0,5 mM Glutamat zeigte sich bereits ein signifikanter Schaden in der GCL ($17,0 \pm 6,7$ % TUNEL⁺-Zellen), der allerdings nicht hoch genug ausfiel, um den Effekt neuroprotektiver Substanzen testen zu können. Erst eine Dosis von 5 mM Glutamat führte zu einer robusten Schädigung von über einem Drittel der Zellen in der GCL (Rzeczinski et al., 2006, Ruscher et al. 2007).

Unserer Meinung nach gibt es hierzu folgende Erklärungsansätze: Die im Zentrum der Retinakörperchen liegende GCL erreicht mutmaßlich eine geringere Glutamatkonzentration als die außen liegende Körnerschicht durch den Konzentrationsgradienten von außen nach innen. ONL und INL werden daher durch die hohe Glutamatkonzentration stärker geschädigt (neuroprotektive Effekte auf die INL wurden nicht quantifiziert, konnten jedoch in der histologischen Betrachtung beobachtet werden). Außerdem wird ein Großteil des Glutamats über Glutamattransporter der Astrozyten und Müllerglia aus dem extrazellulären Raum metabolisiert. Bei der Metabolisation und Entfernung von Neurotransmittern in der Retina haben Gliazellen eine wichtige Aufgabe, indem sie Glutamat über Glutamat-Aspartat-Transporter aufnehmen und zum Antioxidanz Glutathion umwandeln. Gliazellen wirken so u.a. Glutamatexzitotoxizität durch Aufnahme von Glutamat und oxidativem Stress durch Synthese von Glutathion entgegen (Derouiche et al., 1995; Matsui et al., 1999; Harada et al., 2007 und 1998; Bringmann, et al., 2009 und 2001).

Für die Schadensauswertung wurde auf die retinale Ganglienzellschicht fokussiert, da diese für das Verständnis der Pathophysiologie degenerativer Retinaerkrankungen, wie z.B. dem Glaukom oder der altersabhängigen Makuladegeneration, maßgeblich ist. In der GCL finden sich aber auch Gliazellen (Astroglia, Müllerzellen) und in geringerer Anzahl displazierte amakrine Zellen (Perry, 1981). Die Schadensquantifizierung mittels TUNEL- und Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung ermöglicht keine eindeutige Differenzierung dieser Zelltypen (Rzeczinski et al., 2006, Ruscher et al. 2007). Nach Linden und Esberard besteht indes die Mehrzahl der Kerne in der GCL aus Ganglienzellen (Linden und Esberard, 1987).

4.2 Neuroprotektion durch Erythropoietin

Wir testeten EPO-Konzentrationen von 0,1 - 25 U/ml im organotypischen Kulturmodell. Ein dosisabhängiger neuroprotektiver Effekt zeigte sich nach einer Vorbehandlung ab 1 U/ml aufwärts. Auch in anderen Studien wurde lokal appliziertes EPO in diesem Konzentrationsbereich eingesetzt (King et al., 2007; Kretz et al., 2005; Zhong et al., 2007). In einem *in vivo* Modell mit Transsektion des Nervus opticus verdoppelte eine Vorbehandlung mit EPO mit 2 U/Auge die Anzahl überlebender retinaler Ganglienzellen. Die Wirkungskurve für EPO in den Dosen 0 - 8 U/Auge stellte sich glockenförmig dar. Toxische Effekte wurden nicht festgestellt (Weishaupt et al., 2004). Auf unsere organotypischen Retinakulturen wirkte EPO in der höchsten applizierten Konzentration ebenfalls nicht toxisch, sondern führte im Gegenteil weiterhin zu Zellproliferationen. Während Kretz et al. zum Zeitpunkt der Nervus opticus- Transsektion, sowie dreimalig danach 7 U/ Auge EPO applizierten, beobachteten King et al. bereits nach einmaliger intravitrealer EPO-Gabe (5 - 50 U/ml) sowohl Neuroprotektion als auch Neuroregeneration (Kretz et al., 2005; King et al., 2007).

EPO wirkte auch nach systemischer Applikation (256 U/ kg Körpergewicht) protektiv bei Ratten mit diabetischer Retinopathie (Brines et al., 2000; Wang et al., 2011). Bei Erkrankungen, die *nicht* mit einer erhöhten Permeabilität der Bluthirn- / Blutretinaschranke einhergehen, könnte eine höhere Dosis bzw. andere Applikationsform erforderlich sein (Boado et al., 2010; Zhou et al., 2011).

4.3 Gefäßmodulation durch Erythropoietin im organotypischen Retinamodell

4.3.1 Evaluationsmethoden

Es konnte gezeigt werden, dass EPO einerseits per se gefäßprotektive Eigenschaften in Kultur hat und andererseits Gefäßstrukturen vor Glutamatschädigung schützt. Der Effekt von EPO auf Gefäße wurde anhand von morphologischen sowie zellulären Kriterien untersucht.

Eine Auswertung nach morphologischen Parametern wird zum Beispiel auch in der Gefäßevaluation beim Dottersack von Hühnerembryonen angewendet (le Noble et al., 2004). In eine Woche mit EPO behandelten Retinakörperchen fanden sich insbesondere mehr Verzweigungen und Gefäße mit einem Lumen (Abbildung 7B,C), was wir als Zeichen einer vitalen Gefäßstruktur interpretieren.

Die gefäßprotektiven Eigenschaften von EPO spiegeln sich auch in einer zellulären Auswertung in der GCL wieder (Abbildung 7A). Die Endothelzellen wurden mit von Willebrand Faktor visualisiert und ihrem DAPI⁺-Kern zugeordnet (vWF⁺ DAPI⁺). Die Mehrzahl der Experimenten wurde mit dieser Methode ausgewertet, da dies die Quantität der Gefäßstrukturen und somit die Auswertung dreidimensionaler Gefäße mit den Möglichkeiten zweidimensionaler Gewebsschnitte genauer abbildet. Beispielsweise zählt nach morphologischen Kriterien ein langer Gefäßanschnitt in einem Retinakörperchen genauso viel wie ein kurzer. Eine Differenzierung von Endothelzellen und sie z.B. dicht umgebenden Perizyten und Astrozyten (Kim et al. 1999; Bringmann et al., 2001; Pereira et al., 2012) wurde anhand von Zellkontur und Kernform vorgenommen (Joussen et al., 2009). Es kann dennoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass aufgrund der engen Nachbarschaft auch andere Zellkerne in die Zählung mit einfließen. Es wurde deshalb der Begriff „Gefäß-assoziierte Strukturen bzw. Proliferationen“ analog zu „(vWF)-assoziierte BrdUrd⁺-Zellen“ (Gertz et al., 2006) eingeführt (Abbildung 7A). Die Etablierung eines nukleären Gefäßmarkers, wie CD 31 oder ki-67, gelang bei den organotypischen Retinakörperchen leider nicht.

4.3.2 Erythropoietin fördert das Überleben von (geschädigten) Gefäßstrukturen

EPO hat angioprotektive Eigenschaften (Grimm et al. 2006; Santhanam et al., 2006; Ghezzi et al., 2004). Zur Klärung, ob EPO den Anteil apoptotischer Gefäße in den organotypischen Kulturen reduzieren kann, wendeten wir eine vWF-TUNEL-DAPI-Färbung an. Vaskuläre

Strukturen in einwöchigen Retinakulturen wiesen eine 28 % TUNEL-Positivität auf, die durch Vorbehandlung mit 10 und 25 ml/U EPO dosisabhängig reduziert werden konnte. Nach Glutamatexposition stieg die Anzahl apoptotischer Gefäßstrukturen in der GCL noch auf das Zweifache an. Hier konnte eine EPO-Vorbehandlung die Schädigung dosisabhängig reduzieren ($25 > 10 > 1$ U/ml) und in der wirksamsten Dosis auf das Niveau der unbehandelten Kontrollen bringen (Abbildung 9A), was auf einen angioprotektiven Effekt schließen lässt.

Die neuro- und angioprotektive Wirkung auf die organotypischen Retinakörperchen durch eine EPO-Vorbehandlung mit 1 - 10 U/ml war annähernd linear und dosisabhängig. Dies kann dafür sprechen, dass neuro- und angioprotektive Effekte miteinander korrelieren. Die Netzhaut ist ein hoch differenziertes Gewebe mit komplexen neurovaskulären Zellinteraktionen (Sá-Pereira et al., 2012). Kapillaren im ZNS sind eng umgeben von Gliazell-, Perizyten- und Neuronenfortsätzen und reagieren empfindlich auf lokale neuronale Aktivierung (Iadecola et al., 1993). Das Konzept einer „neurovaskulären Einheit“ mit komplizierten biochemischen und molekularen Mechanismen, die alle Zelltypen mit einbeziehen, findet in den letzten Jahren zunehmend Bestätigung in der Schlaganfallforschung (Dirnagl 2012; Keogh et al., 2007; Kim et al., 2006; Sá-Pereira 2012). Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass Proteine wie das Tie/Ang System, die in der Angiogenese eine wichtige Rolle spielen, auch in der Neurogenese involviert sind (Ohab et al., 2006; Zhang et al., 2007; Keogh et al., 2007). In einem Schlaganfallmodell mit neonatalen Ratten zeigten Keogh und Kollegen, dass EPO sowohl Endothelzellen schützt, als auch zu einer Proliferation von Endothelzellen und Neuronen führt und so die Reparatur neurovaskulärer Einheiten fördert (Keogh et al., 2007). Ältere Arbeiten zeigten bereits, dass Astrozyten, die mit Endothelzellen zusammen kultiviert werden, weniger empfindlich gegen Hypoxie sind (Fischer et al., 2000). Wie oben erläutert, wiesen Glutamat-exponierte Kulturen unseres organotypischen Retinamodells neben einer Schädigung der Ganglienzellen auch eine der Gefäßstrukturen auf. Unsere Daten legen die Vermutung nahe, dass dieser Effekt indirekt durch die Beeinträchtigung der GCL und anderer Zellen im Verband hervorgerufen sein könnte.

4.3.3 Gefäß-assozierte Proliferationen

Neben angioprotektiven verfügt EPO über angioproliferative Eigenschaften. Anagnostou und

Kollegen stellten fest, dass rekombinantes EPO dosisabhängig zu einem Anstieg der Endothelzellproliferation führt, wobei der größte Effekt bei 5 U/ml beobachtet wurde (Anagnostou et al., 1990). McVicar und Kollegen untersuchten drei Erythropoese-stimulierende Substanzen, Epoetin beta und delta, sowie Darbepoetin alfa. Sie fanden, dass beide Epoetins in hohen Konzentrationen (≥ 20 U/ml), jedoch Darbepoetin alfa in niedrigen Dosen (1-20 U/ml), Angiogenese in menschlichen mikrovaskulären Endothelzellen induzierten (McVicar et al., 2010). Ein Erklärungsansatz für die konzentrationsabhängigen Effekte ist eine unterschiedlich hohe Affinität von Rezeptoren, die für die Differenzierung von hämatopoietischen Zellen bzw. proliferative Funktionen zuständig sind (Sawyer et al., 1989).

Ab dem 5. Kultivierungstag ereignete sich fast die Hälfte der gesamten Gefäßproliferationen in der Ganglienzellschicht. Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, dass sich innerhalb der letzten Kultivierungstage die innere Kavität des Retinakörperchens zunehmend verschließt.

Während in unseren Experimenten der neuroprotektive EPO-Effekt dosisabhängig (1 - 25 U/ml) weiter zunahm, wurde bei 25 U/ml ein Nachlassen der Gefäß-assoziierten Proliferationen beobachtet. Neuere Studien zeigen, dass EPO neben der Förderung der Angiogenese und Protektion der Gefäße die Integrität der Endothelzellen schützt (Santhanam et al., 2006; Wang et al., 2011). Wang und seine Kollegen beobachteten in Experimenten mit diabetischen Ratten einen Verlust von Perizyten und degenerierte, azelluläre Kapillaren. Eine sechsmonatige Langzeitbehandlung mit EPO konnte beidem vorbeugen (Wang et al., 2011). Perizyten wirken auch auf Endothelzellen unter hypoglykämischen Konditionen protektiv (Hammes et al. 2005). Es kann daher der Schluss gezogen werden, dass EPO auch im organotypischen Kulturmodell vaskuläre Strukturen sowohl durch Protektion und Stabilisierung des dreidimensionalen Gefäßnetzwerkes, als auch durch Förderung der Angiogenese schützt.

4.4 Neuroprotektion durch Simvastatin

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass eine 3-4 tägige Vorbehandlung mit Simvastatin organotypische Retinakulturen vor Glutamatexzitotoxizität schützt. Nun konnte gezeigt werden, dass Simvastatin auch durch eine Ko-Applikation mit Glutamat am 6. Kultivierungstag vor Glutamat-induziertem Schaden schützt.

Simvastatin wurde im Dosisbereich von 0,1-100 μM getestet, wobei eine Konzentration von 0,1 μM am wirksamsten gegen Glutamatexzitotoxizität war und die Anzahl TUNEL⁺- Zellen um mehr als 80 % reduzierte (Abbildung 10A). Eine Konzentration von 100 μM Simvastatin hatte bereits für sich allein eine toxisch Wirkung. In einer *in vivo* Studie mit Nervus opticus-Axotomie verwendeten Kretz und Kollegen 30 μM Simvastatin, eine im organotypischen Kulturmodell schädigende Konzentration (Kretz et al., 2006). Dagegen beeinträchtigten bereits 25 μM Lovastatin in anderen Experimenten die Zytoarchitektur der adulten Retina *in vivo* (Pittler et al., 1995). Insgesamt besteht in der Beobachtung, dass sehr hohe Simvastatinkonzentrationen toxisch sind, weitgehend Konsens (Schulz et al., 2004; Miron et al., 2007, Miron et al., 2009, Xiang und Reeves, 2009; Takanaka et al., 2000). Hierdurch könnte sich auch das Versagen einer hochdosierten Therapie mit Simvastatin bei der AMD erklären lassen (Gehlbach et al., 2009). Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit protektiven Statinkonzentrationen im nanomolaren Bereich anderer Studien (Bösel et al., 2005; Ma et al., 2009; Ponce et al., 2008; Zacco et al., 2003).

Unsere Experimente zeigten, dass auch eine Ko-Applikation von Simvastatin mit Glutamat protektiv ist. Dies ist von hoher klinischer Relevanz, da bei akut aufgetretenen degenerativen und ischämischen Erkrankungen, zum Beispiel einer retinalen Ischämie oder einem Glaukomanfall, eine Vorbehandlung nicht möglich ist. Unlängst zeigten Krempler und Kollegen in einem Mausmodell transienter retinaler Ischämie, dass die Applikation von Simvastatin eine Stunde nach Schädigung neuroprotektiv auf die retinale Ganglienzellschicht wirkte (Krempler et al., 2012). Die Ergebnisse weichen ab von Vorstudien, in denen eine mindestens 2-tägige Vorbehandlung mit Statinen notwendig war (Bösel et al., 2005; Ponce et al., 2008).

4.5 Limitationen der gewählten Methodik

Die Experimente dieser Arbeit wurden mit einem organotypischen Retinakulturmodell der adulten Ratte durchgeführt. Eine organotypische Kultur bietet im Gegensatz zu isolierten Endothelzellen- oder Neuronenkulturen den erheblichen Vorteil, dass die komplexe retinale Zytoarchitektur u.a. mit Nerven-, Glia-, Endothelzellen, sowie Perizyten erhalten bleibt. Es lassen sich so *in vitro* neurovaskuläre Einheiten erforschen oder mit Substanzen beeinflussen (Morin-Brureau et al., 2013). Dennoch hat das experimentelle Potenzial eines *ex vivo* Modells natürlich seine Grenzen. Beispielsweise fehlen der Blutfluss und der Einfluss von

Scherkräften. Auch führt die Kultivierung als solche zu spontanem Zelltod in Kontrollen und behandelten Gruppen. Bereits durch den Präparationsvorgang mit Axotomie vom N. opticus und die Teilung in kleine Fragmente wird die Retina geschädigt. Möglicherweise werden hierdurch unphysiologische Signalkaskaden initiiert. Auch lassen sich die im Modell gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Dosis, oder der erwünschten bzw. unerwünschten Wirkung der Substanzen nicht direkt auf einen lebendigen Organismus übertragen, da man nicht weiß, in wieweit sie intravenösen oder intravitrealen Applikationen entsprechen und wie sie metabolisiert werden.

Eine organotypische Kultur schlägt eine Brücke vom *ex vivo* zum *in vivo* Modell. Es kann Tierexperimente nicht ersetzen, aber vorab wichtige Erkenntnisse geben. Der lange Weg vor der Anwendung am Menschen muss über den Zwischenschritt *in vivo* am intakten Auge in Krankheitsmodellen erfolgen.

4.6 Ausblick

Aus den beschriebenen Experimenten ergeben sich weitere interessante Fragen und Forschungsansätze. Beispielsweise sind Versuche mit einer EPO-Applikation unmittelbar um den Schädigungszeitpunkt (zeitgleich und kurz darauf) von klinischer Relevanz. Parallel arbeiten wir an der Entwicklung und Dosisfindung eines carbamylierten, nicht-hämatopoietischen Erythropoietins, das auf seine protektive und proliferative Wirkung untersucht werden soll.

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass neben der Protektion und Regeneration von Neuronen, die der Endothelzellen als „neurovaskuläre Einheit“ wesentlicher Bestandteil einer Therapie sein sollte. EPO wäre aufgrund seiner protektiven und proliferativen Eigenschaften auf Neurone und Gefäße ein idealer Kandidat. Von Relevanz sind seine proangiogenetischen und hämatopoetischen Funktionen als potentielle Nebenwirkungen. So wären z.B. schädliche Neovaskularisationen bei der Behandlung einer Retinaerkrankung kontraproduktiv. Indessen stellt sich die Frage, ob ein nicht-hämatopoietisches Erythropoietin in Hinblick auf ein neurovaskuläres Konzept über ausreichend Potenzial verfügt, bzw. ob Nebenwirkungen nicht auch in Abhängigkeit der applizierten Dosis und des Zeitpunktes vermieden werden könnten. Denkbar wäre auch eine individuell angepasste Behandlung mit unterschiedlichen EPO-Varianten je nach Erkrankung.

Simvastatin hat neben neuroprotektiven auch antiinflammatorische Eigenschaften. Daher

könnte es vorteilhaft bei der Therapie von Retinaerkrankungen sein, bei denen eine entzündliche Komponente diskutiert wird, wie z.B. der altersabhängigen Makuladegeneration (Penfold, 2001). Das Versagen einer Studie mit hochdosierter Statineinnahme bei der AMD (Gehlbach et al., 2009) lässt sich durch die *in vitro* gemachte Beobachtung, dass hohe Statindosen keine neuroprotektive Wirkung bzw. sogar toxische Effekte haben, nachvollziehen. In weiteren Experimenten mit organotypischen Retinakulturen untersuchen wir derzeit, inwieweit Simvastatin protektiver Wirkungsmechanismus über cholesterolreduzierende oder pleiotrope Effekte vermittelt wird.

Schließlich stellt sich auch die Frage, ob eine kombinierte neuroprotektive Therapie bestehend aus EPO und Simvastatin einen Vorteil in der Behandlung von degenerativen und ischämischen Retinaerkrankungen bieten könnte. Ältere Patienten mit Retinaerkrankungen, die von einer EPO-Behandlung profitieren würden, erhalten aufgrund von vaskulären Ereignissen, wie Schlaganfall oder Myokardinfarkt, oft bereits eine Therapie mit Simvastatin. Daher ist die Untersuchung auf Interaktionen einer Kombinationstherapie wichtig und *in vitro* Experimente können hierzu erste Ansatzpunkte liefern.

Das organotypische Retinakulturmodell mit seiner erhaltenen neurovaskulären Zytoarchitektur kann auf dem langen Weg von *ex vivo* über *in vivo* Versuche hin zu klinischen Studien helfen, Substanzen auf ihre neuro- und gefäßprotektive, sowie angioproliferative Wirkung zu testen. Da Exzitotoxizität ebenfalls eine Ursache degenerativer und ischämischer ZNS-Erkrankungen und die Netzhaut ontogenetisch betrachtet ein Teil des Hirns ist, könnten die Erkenntnisse auch der Behandlung von Erkrankungen des Nervensystems zugute kommen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit untersuchte die protektive Wirkung von Erythropoietin und Simvastatin auf glutamatgeschädigte Ganglienzellen und den Einfluss von Erythropoietin auf vaskuläre Strukturen in einem organotypischen Kulturmodell der adulten Rattenretina.

EPO (1 – 25 U/ml) schützte dosisabhängig vor Glutamatschädigung in der retinalen Ganglienzellschicht und zeigte in einer Dosis von 25 U/ml die größte neuroprotektive Wirkung. Eine einwöchige Kultivierung mit EPO führte außerdem zu einem Anstieg von vWF⁺-Strukturen in den Retinakörperchen, der ebenfalls am stärksten bei 25 U/ml ausfiel. EPO erwies sich bereits per se als gefäßprotektiv und schützte nach Glutamatschädigung vaskuläre Strukturen vor Apoptose. EPOs Einfluss auf die Proliferation von Endothelzellen wurde mithilfe zweier Thymidinanaloga, EdU und BrdU, die zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten appliziert wurden, studiert. Eine Behandlung mit 10 U/ml EPO führte nach einwöchiger Kultivierung zu einer Verdopplung der Gefäß-assoziierten Proliferationen von 5 auf 10 % in der GCL im Vergleich zu unbehandelten Kulturen. Fast die Hälfte der Gefäßproliferationen ereignete sich in den letzten Kultivierungstagen.

Simvastatin wurde in einem Dosisbereich von 0,1 -100 µM gegen Glutamatoxizität getestet. Dabei erwies sich eine Dosis von 0,1 µM nicht nur im Rahmen einer täglichen Vorbehandlung ab dem 2. Kultivierungstag, sondern auch in Form einer einmaligen Ko-Applikation mit Glutamat an 6. Kultivierungstag als vergleichbar protektiv in der retinalen GCL.

In unseren Experimenten mit organotypischen Retinakulturen konnte gezeigt werden, dass EPO und Simvastatin neuroprotektiv gegen Glutamatoxizität in der Ganglienzellschicht wirken und EPO außerdem protektive und -proliferative Effekte auf vaskuläre Strukturen hat. Das organotypische Kulturmodell der adulten Retina kann dazu beitragen, neurovaskuläre Interaktionen zu verstehen und therapeutische Strategien zu entwickeln, die auch auf andere exzitotoxisch bedingte Erkrankungen des Nervensystems übertragbar sind.

6 LITERATURANGABEN

Ambati J, Chalam KV, Chawla DK, et al. Elevated gamma-aminobutyric acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1161-6.

Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5978-82.

Besarab A, Bolton WK, Browne JK, et al. The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin. *N Engl J Med* 1998;339:584-90.

Besarab A, Jarrell BE, Burke JF, Francos G, Caro J, Mallon E. "Erythrocytosis" in renal transplantation patients treated with cyclosporine. *Transplant Proc* 1988;20:945-7.

Boado RJ, Hui EK, Lu JZ, Pardridge WM. Drug targeting of erythropoietin across the primate blood-brain barrier with an IgG molecular Trojan horse. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;333:961-9.

Bösel J, Gandor F, Harms C, et al. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J Neurochem* 2005;92:1386-98.

Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10526-31.

Bringmann A, Pannicke T, Biedermann B, et al. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int* 2009;54:143-60.

Bringmann A, Reichenbach A. Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci* 2001;6:E72-92.

Chew EY, Ambrosius WT, Davis MD, et al. Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2010;363:233-44.

Colella P, Iodice C, Di Vicino U, Annunziata I, Surace EM, Auricchio A. Non-erythropoietic erythropoietin derivatives protect from light-induced and genetic photoreceptor degeneration. *Hum Mol Genet* 2011;20:2251-62.

Dehouck MP, Vigne P, Torpier G, Breittmayer JP, Cecchelli R, Frelin C. Endothelin-1 as a mediator

of endothelial cell-pericyte interactions in bovine brain capillaries. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:464-9.

Derouiche A, Rauen T. Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J Neurosci Res* 1995;42:131-43.

Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001;108:391-7.

Dirnagl U. Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1268:21-5.

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22:391-7.

Dreyer M, Nugroho BW, Bohnenstengel FI, et al. New insecticidal rocaglamide derivatives and related compounds from *Aglaia oligophylla*. *J Nat Prod* 2001;64:415-20.

Duncan RS, Xin H, Goad DL, Chapman KD, Koulen P. Protection of neurons in the retinal ganglion cell layer against excitotoxicity by the N-acylethanolamine, N-linoleoylethanolamine. *Clin Ophthalmol*;5:543-8.

Ehrenreich H, Aust C, Krampe H, et al. Erythropoietin: novel approaches to neuroprotection in human brain disease. *Metab Brain Dis* 2004;19:195-206.

Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002;8:495-505.

Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, et al. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke* 2009;40:e647-56.

Endres M, Biniszkiwicz D, Sobol RW, et al. Increased postischemic brain injury in mice deficient in uracil-DNA glycosylase. *J Clin Invest* 2004;113:1711-21.

Fischer S, Wobben M, Kleinstuck J, Renz D, Schaper W. Effect of astroglial cells on hypoxia-induced permeability in PBMEC cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C935-44.

Gehlbach P, Li T, Hatef E. Statins for age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev*

2009:CD006927.

Gertz K, Priller J, Kronenberg G, et al. Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow. *Circ Res* 2006;99:1132-40.

Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ* 2004;11 Suppl 1:S37-44.

Ginsberg HN, Elam MB, Lovato LC, et al. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2010;362:1563-74.

Gowda K, Zinnanti WJ, LaNoue KF. The influence of diabetes on glutamate metabolism in retinas. *J Neurochem* 2011;117:309-20.

Gregory CJ, Eaves AC. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* 1978;51:527-37.

Grimm C, Wenzel A, Acar N, Keller S, Seeliger M, Gassmann M. Hypoxic preconditioning and erythropoietin protect retinal neurons from degeneration. *Adv Exp Med Biol* 2006;588:119-31.

Hama Y, Katsuki H, Suminaka C, Kume T, Akaike A. Chloride-dependent acute excitotoxicity in adult rat retinal ganglion cells. *Neuropharmacology* 2008;55:677-86.

Hammes HP. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Horm Metab Res* 2005;37 Suppl 1:39-43.

Harada T, Harada C, Nakamura K, et al. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest* 2007;117:1763-70.

Harada T, Harada C, Watanabe M, et al. Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:4663-6.

Hayes RL, Jenkins LW, Lyeth BG. Neurotransmitter-mediated mechanisms of traumatic brain injury: acetylcholine and excitatory amino acids. *J Neurotrauma* 1992;9 Suppl 1:S173-87.

Iadecola C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci* 1993;16:206-14.

Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 2004;43:649-59.

Jelkmann W, Wagner K. Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Ann Hematol* 2004;83:673-86.

Jo DH, Kim JH. How to overcome retinal neuropathy: the fight against angiogenesis-related blindness. *Arch Pharm Res* 2010;33:1557-65.

Joussen AM, Doehmen S, Le ML, et al. TNF-alpha mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations. *Mol Vis* 2009;15:1418-28.

Junk AK, Mammis A, Savitz SI, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:10659-64.

Katz O, Gil L, Lifshitz L, et al. Erythropoietin enhances immune responses in mice. *Eur J Immunol* 2007;37:1584-93.

Kawaji T, Inomata Y, Takano A, et al. Pitavastatin: protection against neuronal retinal damage induced by ischemia-reperfusion injury in rats. *Curr Eye Res* 2007;32:991-7.

Keogh CL, Yu SP, Wei L. The effect of recombinant human erythropoietin on neurovasculature repair after focal ischemic stroke in neonatal rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:521-8.

Kilic U, Kilic E, Soliz J, Bassetti CI, Gassmann M, Hermann DM. Erythropoietin protects from axotomy-induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK-1/-2. *FASEB J* 2005;19:249-51.

Kim JH, Park JA, Lee SW, Kim WJ, Yu YS, Kim KW. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:339-45.

King CE, Rodger J, Bartlett C, Esmaili T, Dunlop SA, Beazley LD. Erythropoietin is both neuroprotective and neuroregenerative following optic nerve transection. *Exp Neurol* 2007;205:48-55.

Krempler K, Schmeer CW, Isenmann S, Witte OW, Lowel S. Simvastatin improves retinal ganglion cell survival and spatial vision after acute retinal ischemia/reperfusion in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*;52:2606-18.

Kretz A, Happold CJ, Marticke JK, Isenmann S. Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via Jak2/Stat3 and PI3K/AKT pathway activation. *Mol Cell Neurosci* 2005;29:569-79.

Kretz A, Schmeer C, Tausch S, Isenmann S. Simvastatin promotes heat shock protein 27 expression and Akt activation in the rat retina and protects axotomized retinal ganglion cells in vivo. *Neurobiol Dis* 2006;21:421-30.

le Noble F, Moyon D, Pardanaud L, et al. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development* 2004;131:361-75.

Leist M, Ghezzi P, Grasso G, et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 2004;305:239-42.

Linden R, Esberard CE. Displaced amacrine cells in the ganglion cell layer of the hamster retina. *Vision Res* 1987;27:1071-6.

Lipton SA. Retinal ganglion cells, glaucoma and neuroprotection. *Prog Brain Res* 2001;131:712-8.

Lombardero M, Kovacs K, Scheithauer BW. Erythropoietin: a hormone with multiple functions. *Pathobiology*;78:41-53.

Maiese K, Chong ZZ, Li F, Shang YC. Erythropoietin: elucidating new cellular targets that broaden therapeutic strategies. *Prog Neurobiol* 2008;85:194-213.

Marcus MW, Muskens RP, Ramdas WD, et al. Cholesterol-lowering drugs and incident open-angle glaucoma: a population-based cohort study. *PLoS One*;7:e29724.

Matsui K, Hosoi N, Tachibana M. Active role of glutamate uptake in the synaptic transmission from retinal nonspiking neurons. *J Neurosci* 1999;19:6755-66.

McVicar CM, Colhoun LM, Abrahams JL, et al. Differential modulation of angiogenesis by erythropoiesis-stimulating agents in a mouse model of ischaemic retinopathy. *PLoS One* 2010;5:e11870.

Miron VE, Rajasekharan S, Jarjour AA, Zamvil SS, Kennedy TE, Antel JP. Simvastatin regulates oligodendroglial process dynamics and survival. *Glia* 2007;55:130-43.

Miron VE, Zehntner SP, Kuhlmann T, et al. Statin therapy inhibits remyelination in the central nervous system. *Am J Pathol* 2009;174:1880-90.

Morin-Brureau M, De Bock F, Lerner-Natoli M. Organotypic brain slices: a model to study the neurovascular unit micro-environment in epilepsies. *Fluids Barriers CNS*;10:11.

- Naskar R, Dreyer EB. New horizons in neuroprotection. *Surv Ophthalmol* 2001;45 Suppl 3:S250-5; discussion S73-6.
- Nehls SM, Bittar EE. Urethane as an inhibitor of the firefly light reaction. *Life Sci* 1989;45:2225-31.
- Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* 2006;26:13007-16.
- Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 2004;23:91-147.
- Osborne NN, Ugarte M, Chao M, et al. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol* 1999;43 Suppl 1:S102-28.
- Osborne NN, Wood JP, Chidlow G, Bae JH, Melena J, Nash MS. Ganglion cell death in glaucoma: what do we really know? *Br J Ophthalmol* 1999;83:980-6.
- Park CK, Nehls DG, Teasdale GM, McCulloch J. Effect of the NMDA antagonist MK-801 on local cerebral blood flow in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:617-22.
- Penfold PL, Madigan MC, Gillies MC, Provis JM. Immunological and aetiological aspects of macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2001;20:385-414.
- Perry VH. Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience* 1981;6:931-44.
- Petzold GC, Einhaupl KM, Dirnagl U, Dreier JP. Ischemia triggered by spreading neuronal activation is induced by endothelin-1 and hemoglobin in the subarachnoid space. *Ann Neurol* 2003;54:591-8.
- Pittler SJ, Fliesler SJ, Fisher PL, Keller PK, Rapp LM. In vivo requirement of protein prenylation for maintenance of retinal cytoarchitecture and photoreceptor structure. *J Cell Biol* 1995;130:431-9.
- Ponce J, de la Ossa NP, Hurtado O, et al. Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection. *Stroke* 2008;39:1269-75.
- Ray K, Mookherjee S. Molecular complexity of primary open angle glaucoma: current concepts. *J Genet* 2009;88:451-67.
- Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ* 2004;82:844-51.

Rex TS, Allocca M, Domenici L, et al. Systemic but not intraocular Epo gene transfer protects the retina from light-and genetic-induced degeneration. *Mol Ther* 2004;10:855-61.

Ritch R. Neuroprotection: is it already applicable to glaucoma therapy? *Curr Opin Ophthalmol* 2000;11:78-84.

Rong X, Mo X, Ren T, et al. Neuroprotective effect of erythropoietin-loaded composite microspheres on retinal ganglion cells in rats. *Eur J Pharm Sci* 2011;43:334-42.

Ruscher K, Freyer D, Karsch M, et al. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci* 2002;22:10291-301.

Ruscher K, Rzezzinski S, Thein E, Freyer D, Victorov IV, Lam T, Dirnagl U. Neuroprotective effects of the beta-carboline abecarnil studied in cultured cortical neurons and organotypic retinal cultures. *Neuropharmacology* 2007;52:1488-95.

Rzezzinski S, Victorov IV, Lyjin AA, et al. Roller culture of free-floating retinal slices: a new system of organotypic cultures of adult rat retina. *Ophthalmic Res* 2006;38:263-9.

Sadeghi MM, Collinge M, Pardi R, Bender JR. Simvastatin modulates cytokine-mediated endothelial cell adhesion molecule induction: involvement of an inhibitory G protein. *J Immunol* 2000;165:2712-8.

Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:4635-40.

Santhanam AV, Katusic ZS. Erythropoietin and cerebral vascular protection: role of nitric oxide. *Acta Pharmacol Sin* 2006;27:1389-94.

Sa-Pereira I, Brites D, Brito MA. Neurovascular unit: a focus on pericytes. *Mol Neurobiol*;45:327-47.

Sawyer ST, Krantz SB, Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood* 1989;74:103-9.

Scandinavian Simvastatin Survival Study. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. *Lancet* 1994;344:1383-9.

Schmeer C, Gamez A, Tausch S, Witte OW, Isenmann S. Statins modulate heat shock protein expression and enhance retinal ganglion cell survival after transient retinal ischemia/reperfusion in

vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:4971-81.

Schulz JG, Bosel J, Stoeckel M, Megow D, Dirnagl U, Endres M. HMG-CoA reductase inhibition causes neurite loss by interfering with geranylgeranylpyrophosphate synthesis. *J Neurochem* 2004;89:24-32.

Seki M, Lipton SA. Targeting excitotoxic/free radical signaling pathways for therapeutic intervention in glaucoma. *Prog Brain Res* 2008;173:495-510.

Sieradzan KA, Mann DM. The selective vulnerability of nerve cells in Huntington's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001;27:1-21.

Siren AL, Fasshauer T, Bartels C, Ehrenreich H. Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system. *Neurotherapeutics* 2009;6:108-27.

Sonsalla PK, Albers DS, Zeevalk GD. Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism. *Amino Acids* 1998;14:69-74.

Tanaka T, Tatsuno I, Uchida D, et al. Geranylgeranyl-pyrophosphate, an isoprenoid of mevalonate cascade, is a critical compound for rat primary cultured cortical neurons to protect the cell death induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibition. *J Neurosci* 2000;20:2852-9.

Tsai JC, Wu L, Worgul B, Forbes M, Cao J. Intravitreal administration of erythropoietin and preservation of retinal ganglion cells in an experimental rat model of glaucoma. *Curr Eye Res* 2005;30:1025-31.

Tseng MY, Hutchinson PJ, Richards HK, et al. Acute systemic erythropoietin therapy to reduce delayed ischemic deficits following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a Phase II randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical article. J Neurosurg* 2009;111:171-80.

Ullian EM, Barkis WB, Chen S, Diamond JS, Barres BA. Invulnerability of retinal ganglion cells to NMDA excitotoxicity. *Mol Cell Neurosci* 2004;26:544-57.

Wang Q, Gorbey S, Pfister F, et al. Long-term Treatment with Suberythropoietic Epo is Vaso- and Neuroprotective in Experimental Diabetic Retinopathy. *Cell Physiol Biochem* 2011;27:769-82.

Watanabe D. [Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* 2007;111:892-8.

Watanabe D, Suzuma K, Matsui S, et al. Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2005;353:782-92.

Wax MB, Tezel G. Neurobiology of glaucomatous optic neuropathy: diverse cellular events in neurodegeneration and neuroprotection. *Mol Neurobiol* 2002;26:45-55.

Weishaupt JH, Rohde G, Polking E, Siren AL, Ehrenreich H, Bahr M. Effect of erythropoietin axotomy-induced apoptosis in rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1514-22.

Welch KM. Review of the SPARCL trial and its subanalyses. *Curr Atheroscler Rep* 2009;11:315-21.

Whitmire W, Al-Gayyar MM, Abdelsaid M, Yousufzai BK, El-Remessy AB. Alteration of growth factors and neuronal death in diabetic retinopathy: what we have learned so far. *Mol Vis* 2011;17:300-8.

Wustenberg T, Begemann M, Bartels C, et al. Recombinant human erythropoietin delays loss of gray matter in chronic schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2011;16:26-36, 1.

Xiang Z, Reeves SA. Simvastatin induces cell death in a mouse cerebellar slice culture (CSC) model of developmental myelination. *Exp Neurol* 2009;215:41-7.

Zacco A, Togo J, Spence K, et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci* 2003;23:11104-11.

Zechariah A, ElAli A, Hermann DM. Combination of tissue-plasminogen activator with erythropoietin induces blood-brain barrier permeability, extracellular matrix disaggregation, and DNA fragmentation after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 2010;41:1008-12.

Zhang F, Wang S, Cao G, Gao Y, Chen J. Signal transducers and activators of transcription 5 contributes to erythropoietin-mediated neuroprotection against hippocampal neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 2007;25:45-53.

Zhang JF, Wu YL, Xu JY, et al. Pharmacokinetic and toxicity study of intravitreal erythropoietin in rabbits. *Acta Pharmacol Sin* 2008;29:1383-90.

Zhong L, Bradley J, Schubert W, et al. Erythropoietin promotes survival of retinal ganglion cells in DBA/2J glaucoma mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:1212-8.

Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives. *Circ J*

2010;74:818-26.

Zhou QH, Hui EK, Lu JZ, Boado RJ, Pardridge WM. Brain penetrating IgG-erythropoietin fusion protein is neuroprotective following intravenous treatment in Parkinson's disease in the mouse. *Brain Res* 2011;1382:315-20.

7 ANHANG

7.1 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Elisabeth Thein, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Neuroprotektion und Gefäßmodulation in einem organotypischen Kulturmodell der Retina“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an der erfolgten Publikation

Elisabeth Thein hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Ruscher K, Rzczinski S, Thein E, Freyer D, Victorov IV, Lam T, Dirnagl U: Neuroprotective effects of the β -carboline abecarnil studied in cultured cortical neurons and organotypic retinal cultures. Neuropharmacology, 2007. 52, 1488-95.

Beitrag: Dosis-Wirkungsversuche zu Abecarnil, CNQX, MK-801 im organotypischen Kulturmodell (3 unabhängige Experimente, jeweils Retinapräparation, Kultivierung und Behandlung, Fixierung, Anfertigung histologischer Schnitte und Färben).

Unterschrift der Doktorandin

7.2 Lebenslauf

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

7.3 Publikationsliste

Teile dieser Arbeit erscheinen in folgenden Publikationen:

Ruscher K, Rzczinski S*, *Thein E*, Freyer D, Victorov IV, Lam T, Dirnagl U: Neuroprotective effects of the β -carboline abecarnil studied in cultured cortical neurons and organotypic retinal cultures. *Neuropharmacology*, 2007. 52, 1488-95.

Thein E, Freyer D, Datwyler A L, Kronenberg G, Endres M, Dirnagl U, Harms C: Modulation of Angiogenesis and Neuroprotection by Erythropoietin in the Ganglion Cell Layer of Long-Term Organotypic Cultures of Adult Rat Retina, in Vorbereitung.

Thein E, Freyer D*, Rzczinski S, Datwyler A L, Kronenberg G, Przesdzing I, Dirnagl U, Endres M, Harms C: Simvastatin protects against glutamate toxicity in adult rat organotypic retinal cultures, in Vorbereitung.

* gleichberechtigte Erstautoren.

7.4 Danksagung

In erster Linie möchte ich sehr meinem Doktorvater, Herrn Professor Ulrich Dirnagl, für die Unterstützung und Supervision bei den verschiedenen Arbeitsphasen danken.

Für die Einarbeitung in die Zellkultur der Retina und die Begleitung der Experimente möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. Dorette Freyer herzlichen Dank aussprechen.

Ich danke Herrn Dr. Stefan Rzczinski für die Einweisung in die Techniken und Besonderheiten der organotypischen Retinakultur.

Besonderer Dank gilt Herrn Juniorprofessor Christoph Harms für die Betreuung, konstruktiven Diskussionen und Anregungen.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Golo Kronenberg für die Hilfe bei histologischen Arbeiten.

Ich danke der Arbeitsgruppe der Experimentellen Neurologie für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung, insbesondere den Mitarbeitern der Abteilungen für Zellkultur und Histologie.

Finanzielle Unterstützung erfuhr ich im Rahmen der Studentischen Forschungsförderung der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Herzlichen Dank möchte ich schließlich meiner Familie aussprechen, die mich in allen Phasen der Freude über Fortschritte, aber auch des Zweifelns bei Rückschlägen, die experimentelle Arbeiten mit sich bringen, begleitet hat.

7.5 Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol, Zellkern-Marker
DIV	days in vitro, Tage in Kultur
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EdU	5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin
EPO	Erythropoietin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GCL	ganglion cell layer, Ganglienzellschicht
GLAST	Glutamat-Aspartat Transporter
h	Stunden
HE-Nissl-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
IE	Internationale Einheiten
INL	inner nuclear layer, innere Körnerschicht
IPL	inner plexiform layer, innere plexiforme Schicht
ls	Längsschnitte
lu	Lumen
M	Molar
min	Minuten
n	Anzahl
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
n.s.	nicht signifikant

ONL	outer nuclear layer, äußere Körnerschicht
OPL	outer plexiform layer, äußere plexiforme Schicht
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pc	Photorezeptorschicht
PDR	proliferative diabetische Retinopathie
qs	Querschnitte
RB	retina body, Retinakörperchen
RGC	retinal ganglion cell layer, retinale Ganglienzellschicht
Simva	Simvastatin
SD	standard deviation, Standardabweichung
TBS	Tris buffered saline, Tris-gepufferte Salzlösung
t-PA	tissue-type plasminogen activator, gewebspezifischer Plasminogenaktivator
TUNEL	Terminale-Desoxynukleotidyl-Transferase-vermitteltes d-Uridin-Triphosphat-Biotin „nick end labeling“
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, endothelialer Wachstumsfaktor
vs.	versus
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
zw	Verzweigungen