

Biologie

Dissertationsthema

Die Rolle der Mikroglia bei der Pathogenese
der altersbedingten Makuladegeneration

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Daniel Niekämper

aus Essen

-2015-

Dekan: Prof. Dr. Wolf-Michael Weber

Erster Gutachter: PD Dr. Peter Heiduschka

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Joachim Kurtz

Tag der mündlichen

Prüfung(en):01.02.2016.....

Tag der Promotion:12.02.2016.....

Für meine Frau Julia

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abbildungsverzeichnis.....	IV
III.	Tabellenverzeichnis.....	VI
IV.	Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1.	Einleitung.....	1
1.1.	Altersbedingte Makuladegeneration.....	1
1.1.1.	Anatomischer Überblick.....	1
1.1.1.1.	Die Makula.....	2
1.1.1.2.	Die Retina.....	2
1.1.2.	Die Pathogenese der AMD.....	5
1.1.2.1.	Geografische Atrophie.....	6
1.1.2.2.	Choroidale Neovaskularisation.....	8
1.1.3.	Epidermiologie.....	9
1.1.4.	Risikofaktoren.....	9
1.1.5.	Therapeutische Ansätze.....	10
1.2.	Mikroglia.....	12
1.2.1.	Ursprung der Mikroglia.....	13
1.2.2.	Mikroglia in der Netzhaut.....	15
1.2.3.	Oberflächenmarker und Rezeptoren.....	17
1.2.4.	„aktivierte“ Mikroglia.....	19
1.2.5.	Mikroglia und AMD.....	22
1.2.6.	Modell der laserinduzierten CNV.....	23
2.	Ziel der Arbeit.....	24
3.	Material.....	25
3.1.	Geräte.....	25
3.2.	Verbrauchsmaterial.....	26
3.3.	Chemikalien und Reagenzien.....	26
3.4.	Puffer und Lösungen.....	27
3.5.	Kits.....	27
3.6.	Primer.....	27
3.7.	Antikörper.....	28
3.8.	Computerprogramme.....	28
3.9.	Versuchstiere.....	28
3.10.	Wirkstoffe zur Inhibition der Mikroglia.....	29

3.10.1. Minocyclin.....	29
3.10.2. TKP.....	29
3.10.3. RGDS.....	29
3.10.4. Cortisol.....	29
4. Methoden.....	30
4.1. Model der laserinduzierten choroidalen Neovaskularisation.....	30
4.2. Gruppierung und Behandlung.....	30
4.3. <i>in-vivo</i> -Bildgebung.....	32
4.3.1. Infrarot-Scanning-Laser-Ophthalmoskopie.....	32
4.3.2. Fluoreszenzangiographie.....	32
4.4. Auswertungsmethode der <i>in-vivo</i> Bildgebung.....	33
4.4.1. Statistische Auswertung.....	33
4.5. Retina-Präparation.....	34
4.6. RNA-Extraktion.....	35
4.7. Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA.....	35
4.8. Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	36
4.9. RT-PCR.....	36
4.10. Relative Quantifizierung.....	39
4.11. Next-Generation-Sequencing.....	39
4.12. Paraffin-Histologie.....	40
4.12.1. Formalin-Fixierung.....	40
4.12.2. Paraffineinbettung.....	40
4.12.3. Schnitte-Anfertigung.....	41
4.13. Kryostat-Histologie.....	41
4.14. Immunhistologie.....	41
4.14.1. Immunhistochemie für Paraffinschnitte.....	41
4.14.1. Immunhistochemie für Kryoschnitte.....	42
5. Ergebnisse.....	43
5.1. Migration der Mikroglia-Zellen nach der laserinduzierten CNV.....	43

5.2.	Expression von proangiogenen Faktoren und puringeren Rezeptoren.....	47
5.3.	Modulation der Mikroglia-Migration.....	49
5.4.	Modulation des Ausmaßes der Neovaskularisation.....	53
5.5.	Ergebnisse der RT-PCR.....	56
5.6.	Ergebnisse des Next-Generation-Sequencing.....	57
6.	Diskussion.....	59
7.	Zusammenfassung/Summary.....	66
8.	Literaturverzeichnis.....	68
9.	Anhang.....	84
9.1.	Lebenslauf.....	84
9.2.	Danksagung.....	85
9.3.	Versicherung.....	86
9.4.	Eidesstattliche Versicherung.....	87

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.01: Der Aufbau des Auges.....	2
Abb. 1.02: Aufbau der Retina.....	4
Abb. 1.03: Übersichtsschema der Altersabhängigen Makuladegeneration.....	6
Abb. 1.04: Spätform der AMD: Geografische Atrophie.....	7
Abb. 1.05: Geografische Atrophie.....	7
Abb. 1.06: Spätform der AMD: choroidale Neovaskularisation.....	8
Abb. 1.07: Choroidale Neovaskularisation.....	9
Abb. 1.08: Die Interaktion der Mikroglia-Zellen mit anderen Bestandteilen der Retina.....	12
Abb. 1.09: Zeichnung und Mikrofotografie von Mikroglia.....	13
Abb. 1.10: Verbindung der Mikroglia zum ZNS.....	15
Abb. 1.11: Lage der Mikroglia-Zellen in der Retina.....	16
Abb. 1.12: Ruhende und aktivierte Mikroglia-Zellen.....	17
Abb. 1.13: Morphologie der Mikroglia-Zellen in Paraffinschnitten.....	21
Abb. 4.01: Auswertung der Mikroglia-Migration zu den Laserherden.....	34
Abb. 4.02: Prinzip der Real-time PCR.....	37
Abb. 4.03: Delta-Ct-Methode zur relativen Quantifizierung.....	39
Abb. 5.01: Infrarot-SLO-Bild einer laserbehandelten Retina und die transiente Anreicherung von Mikroglia-Zellen im Autofluoreszenzbild	43
Abb. 5.02: OCT-Aufnahme eines Laserherdes.....	44
Abb. 5.03: Hämatoxylin-Eosin-gefärbter Paraffin-Schnitt eines Mauseuges	44
Abb. 5.04: Transiente Anreicherung von Mikroglia-Zellen über einen längeren Untersuchungszeitraum	46
Abb. 5.05: 4 Tage nach Laserbehandlung (FGF-2).....	47
Abb. 5.06: 4 Tage nach Laserbehandlung (VEGF).....	48
Abb. 5.07: 4 Tage nach Laserbehandlung (P2x4).....	48
Abb. 5.08: Übersicht über die Mikroglia-Migration zu den Laserherden	50
Abb. 5.09: Größe der Schädigungsgebiete aufgrund der Laserbehandlung	51
Abb. 5.10: Verhältnis der Helligkeit der Mikroglia im Bereich der Laserherde.....	52
Abb. 5.11: Größe der Mikroglia-Areale.....	53
Abb. 5.12: Unterschied in der Größe der Leckage.....	54
Abb. 5.13: Verhältnis der Helligkeit der Leckage im Bereich der Laserherde.....	54
Abb. 5.14: Größe der Leckage.....	55
Abb. 5.15: Übersicht der RT-PCR-Ergebnisse.....	56
Abb. 5.16: Übersicht der NGS-Ergebnisse.....	57

Abb. 5.17: Übersicht weiterer NGS-Ergebnisse.....58

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.01: Übersicht der Oberflächenmarker und Rezeptoren.....	19
Tab. 3.01: Übersicht der verwendeten Geräte.....	25
Tab. 3.02: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	26
Tab. 3.03: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....	26
Tab. 3.04: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen.....	27
Tab. 3.05: Übersicht über die verwendeten Kits.....	27
Tab. 3.06: Übersicht über die für die RT-PCR-Amplifikationen verwendeten Primer	27
Tab. 3.07: Übersicht über die verwendeten unkonjugierten Antikörper.....	28
Tab. 3.08: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper.....	28
Tab. 3.09: Übersicht über die verwendeten Computerprogramme.....	28
Tab. 4.01: Übersicht über die injizierte Menge des Anästhetikums.....	30
Tab. 4.02: Übersicht über die gemessenen C57BL/6J- und CX3CR1GFP/+ -Mäuse	31
Tab. 4.03: Übersicht über den Reaktionsansatz einer PCR.....	36
Tab. 4.04: Übersicht über den Reaktionsansatz der RT-PCR.....	38
Tab. 4.05.: Übersicht über den Ablauf der PCR.....	39

IV. Abkürzungsverzeichnis

AMD	altersbedingte Makuladegeneration
BM	Bruch's Membran
CCL2	CC-cytokine ligand 2
CNV	choroidale Neovaskularisation
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
FA	Fluoreszenzangiographie
FGF	fibroblast growth factor
GA	geografische Atrophie
GCL	Ganglienzellschicht
GFP	green fluorescent protein
INL	innere Körnerschicht
IPL	innere plexiforme Schicht
Isolectin B4	Griffonia Simplicifolia isolectin
MMP9	matrix metalloproteinase 9
OLM	äußere Grenzmembran
ONL	äußere Körnerschicht
OPL	äußere plexiforme Schicht
PBS	phosphate buffered saline
PDGF- β	platelet-derived growth factor beta
PR IS	innere Segmente der Photorezeptoren
PR OS	äußere Segmente der Photorezeptoren
RGDS	Arg-Gly-Asp-Ser
RPE	retinales Pigmentepithel
SNP	single nucleotide polymorphism
TGF- β	transforming growth factor beta
TKP	Thr-Lys-Pro
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF	vascular endothelial growth factor
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Altersbedingte Makuladegeneration

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist die Hauptursache für Erblindungen von Personen über 50 Jahren in der westlichen Welt (Friedman, 2004; Schrader, 2006). Die Erkrankung zerstört die für das Lesen oder das Erkennen von Gesichtern notwendige zentrale Sehfähigkeit, bis dem Patienten im Endstadium nur noch ein orientierendes Sehvermögen bleibt. 1874 fand erstmalig eine Erwähnung der AMD in der medizinischen Literatur statt. Damals wurde sie unter der Bezeichnung: „symmetrische, zentrale choroidal-retinale Erkrankung, die bei älteren Menschen auftritt“ geführt (Hutchinson, 1874). Der Begriff der „senilen Makuladegeneration“ fand 1885 das erste Mal Verwendung (Haab, 1885) und 1903 verwendete Oeller erstmalig in einem offiziellen Rahmen den Begriff „disciform“, um das Krankheitsbild zu beschreiben, welches heute als exsudative oder „feuchte“ AMD bekannt ist (Ryan, 1980). Auf Grund der Erkenntnisse auf den Gebieten der Pathogenese und zur weiteren Abgrenzung gegenüber anderen Krankheitsbildern, hat sich in den 1980er Jahren die Bezeichnung „altersabhängige Makulopathie“ durchgesetzt. Dieser Begriff war der Vorläufer der heutigen Bezeichnung des Krankheitsbildes „altersbedingte Makuladegeneration“, kurz: „AMD“ (de Jong, 2006). Um die Pathogenese der AMD zu beschreiben, muss zunächst im folgenden Abschnitt auf die Anatomie des Auges eingegangen werden.

1.1.1. Anatomischer Überblick

Wie man in Abbildung 1.01 erkennt, besteht die Hülle des menschlichen Auges aus drei konzentrischen Schichten (Grehn, 2008). Außen befindet sich die gefäßarme Lederhaut (Sklera), mittig das Gefäßnetzwerk der Aderhaut (Choroidea) und innen liegt die fotorezeptive Netzhaut (Retina). Die für den weiteren Verlauf der Arbeit wichtigen Bereiche des menschlichen Auges werden in den folgenden Unterpunkten beschrieben.

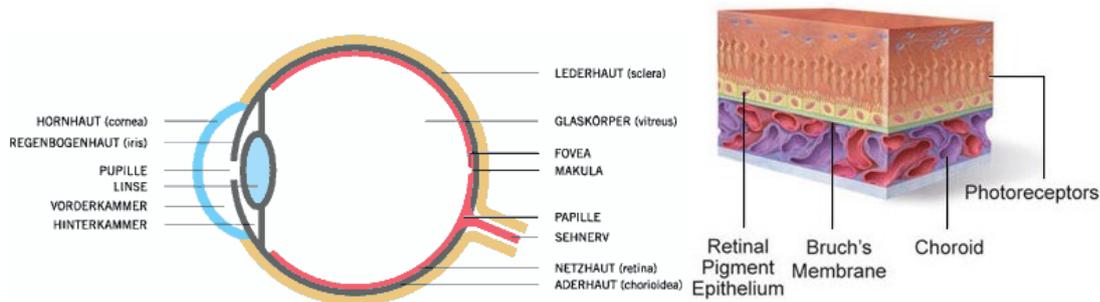


Abbildung 1.01: Der Aufbau des Auges

Von außen nach innen wird das menschliche Auge von der Sklera, der Chorioidea und der Retina umhüllt. Das Licht trifft durch die Hornhaut und die Pupille auf die Linse, wird dort gebündelt und fällt durch den Glaskörper auf die Retina. In der Retina werden die optischen Signale in neuronale Signale umgewandelt und über den Sehnerv an das Gehirn geleitet (linke Abbildung). Apikal werden die Fotorezeptorzellen von dem einschichtigen retinalen Pigmentepithel umschlossen, um Nährstoffe sowie Abbauprodukte über die Bruchsche Membran von bzw. zu den Gefäßen der Choriocapillaris zu transportieren (rechte Abbildung) (übernommen von <http://lasikaugen.com> und <http://studydroid.com>)

1.1.1.1. Die Makula

Die *Macula lutea* (kurz: Makula) oder auch „Gelber Fleck“ genannt, befindet sich zentral am hinteren Pol der Retina, temporal des Sehnervenkopfes (*Papilla nervioptica*) und innerhalb der großen Gefäßarkaden, bestehend aus den *Venulae temporales retinae inferioris* und *superioris* (Abb. 1.01). Sie hat einen Durchmesser von etwa 4 mm (Kolb, 1995). In der Mitte der Makula liegt die *Fovea centralis* (kurz: Fovea) mit einem Durchmesser von etwa 1 mm. Sie ist verantwortlich für feinste Ortsauflösung und räumlich differenzierte Wahrnehmung (Holz, 2004). Nur mit der Makula wird die größte Sehschärfe erreicht, die etwa beim Lesen benötigt wird. Der Grund dafür ist die höchste retinale Konzentration an Fotorezeptoren, mehr als eine Schicht an Ganglienzellen und eine starke Anhäufung des Pigments Xanthophyll. Eine Schädigung der Makula führt demnach nicht nur zum Verlust der zentralen Sehschärfe, sondern auch zu einer verminderten Kontrastwahrnehmung, einem eingeschränkten Farbsehen und der Unfähigkeit, sich an veränderte Lichtverhältnisse anzupassen (Tolentino, 1994; Frennesson, 1995; Augustin, 2007; Kanski, 2007).

1.1.1.2. Die Retina

Die Retina (Netzhaut) ist die innerste Schicht des menschlichen Auges. Sie hat eine Dicke von 200 µm und besteht aus 3 Neuronenschichten (NS) und 8 verschiedenen

Gewebsschichten. Außen grenzt die Retina an das retinale Pigmentepithel (RPE) und innen an den Glaskörper (Abb. 1.02).

Ausgehend von dem retinalen Pigmentepithel (RPE), welches die Retina nach außen hin abschirmt, wird die Retina durch die äußere limitierende Membran (outer limiting membrane, OLM) begrenzt. Die OLM besteht aus Zellverbindungen (*Zonulae adherentes*) zwischen Müllerzellen und den inneren Segmenten der Photorezeptoren (inner segments, PR IS). Die Müllerzellen gehören zu den Gliazellen und sorgen dafür, das einfallende Licht an die Photorezeptoren weiterzuleiten (Franze, 2007). Eine weitere Funktion der Müllerzellen ist die Bildung von Zellfortsätzen, die sich bis zu den Mikrovilli des RPE erstrecken und die Photorezeptoren untereinander verbindet (Kellner, 2008). Von den zwei Photorezeptortypen, den Zapfen und Stäbchen, sind die Stäbchen mit einer Anzahl von 110-125 Millionen (Kolb, 1995) am zahlreichsten in der Retina vorhanden. Sie ermöglichen durch die Aufnahme von kurzwelligem Licht das Dunkel- und Schwarz-Weiß-Sehen (skotopisches Sehen). Die 6,4 Millionen Zapfen hingegen ermöglichen das Tag- und Farb-Sehen (photopisches Sehen). Die Stäbchen und Zapfen bestehen aus äußeren und inneren Segmenten. Die äußeren Segmente (outer segments; PR OS) der Stäbchen bestehen aus Membranscheiben und die OS der Zapfen aus großflächigen Einfaltungen der Membran. In den äußeren Segmenten findet die Phototransduktion statt, da hier das Rhodopsin (Stäbchen) bzw. das Opsin (Zapfen) eingelagert ist. Das anliegende RPE phagozytiert die abgeschnürten äußeren Membranscheiben der OS beider Photorezeptoren und baut den Inhalt der Phagosomen mit Hilfe von lysomalen Enzymen ab (Anderson, 1978; Boulton, 1994). In den PR IS befinden sich die Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum (ER), welche für die Neubildung der Membranscheiben der OS verantwortlich sind (Augustin, 2007). In der darauf folgenden äußeren Körnerschicht (outer nuclear layer, ONL), der 1. Neuronenschicht, befinden sich die Zellkörper der Photorezeptoren. Auf die ONL folgt die äußere plexiforme Schicht (*outer plexiform layer*, OPL) mit Fasern und Synapsen der Photorezeptoren, sowie der Bipolar- und Horizontalzellen. Durch sogenannte *Feedback*-Signale vermitteln die Horizontalzellen die Signalweiterleitung zwischen den Photorezeptoren in der OPL. In der inneren Körnerschicht (*inner nuclear layer*, INL), der 2. Neuronenschicht der Retina, befinden sich die Zellkörper der Amakrin- und Bipolar-, sowie der Horizontal- und Müllerzellen. Die Lichtsignale in die innere plexiforme Schicht (*inner plexiform layer*, IPL) werden durch die Bipolarzellen

übermittelt und bilden dort Verbindungen mit den Amakrin- und Ganglienzellen aus. Zum Glaskörper hin liegt die Ganglienzellschicht (*ganglion cell layer*; GCL), welche die Zellkörper der Ganglienzellen beinhaltet und die 3. Neuronenschicht der Retina ist. Die registrierten und verarbeiteten optischen Signale der Photorezeptoren werden in Form von elektrischen Impulsen von den Axonen der Ganglienzellen über den *Nervus opticus* an höhere visuelle Zentren des Gehirns weitergeleitet. Die Dendriten der Ganglienzellen erstrecken sich in die IPL und bilden über ihre Synapsen Kontakte zu den dort lokalisierten Axonen der Amakrin- und Bipolarenzellen aus.

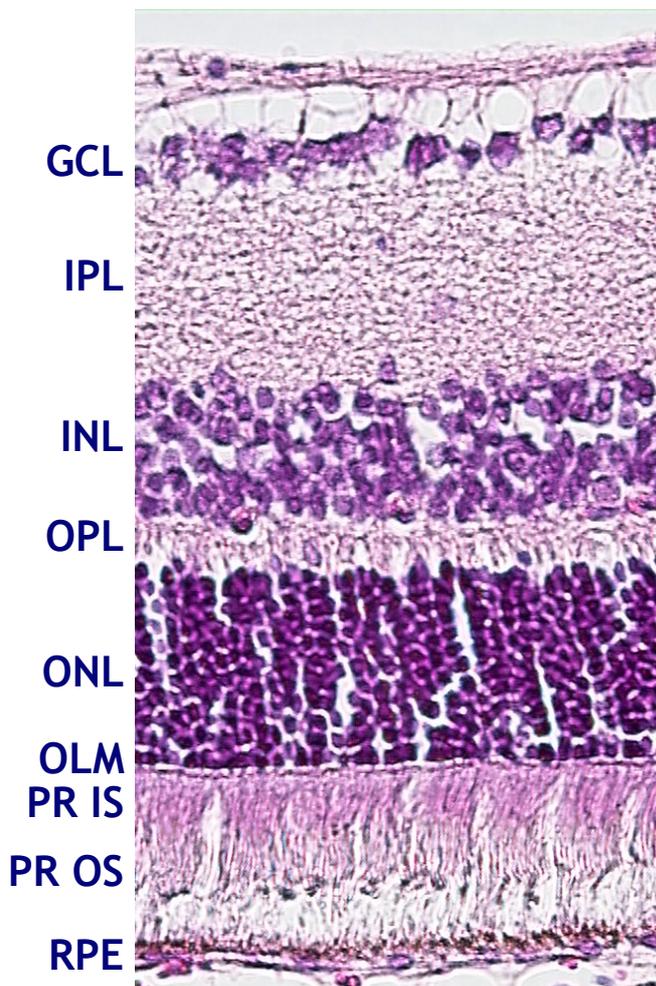


Abbildung1.02: Aufbau der Retina

Horizontaler Schnitt durch die Retina, Choroidea (Aderhaut) und Sklera (Lederhaut). (HE)-Färbung der Retina; GCL, Ganglienzellschicht; INL, innere Körnerschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; OLM, äußere Grenzmembran; ONL, äußere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; PR IS, innere Segmente der Photorezeptoren; PR OS, äußere Segmente der Photorezeptoren; RPE, retinales Pigmentepithel

1.1.2. Die Pathogenese der AMD

Bei der Pathogenese der AMD spielen zahlreiche Faktoren eine tragende Rolle. Die Grundlage für die Entstehung der AMD bilden altersbedingte Veränderungen in der RPE-BM-Choriocapillaris-Struktur.

Das RPE hat neben der Phagozytose der Membranscheiben noch weitere Funktionen. Es versorgt die Photorezeptoren mit Nährstoffen und Sauerstoff (Steinberg, 1985), es hält die Blut-Retina-Schranke durch *tight junctions* aufrecht (Rizzolo, 2011) und sorgt für die Regeneration von Rhodopsin (Baehr, 2003). Die kollagenhaltige Bruch'sche Membran (BM) liegt basal des RPE und hat als Hauptaufgabe den Stofftransport zwischen RPE und der Choriocapillaris (Booij, 2010). Die Choriocapillaris ist ein Teil der Choroidea und mit für die Versorgung der inneren retinalen Schichten und damit der Photorezeptoren verantwortlich.

Aufgrund des Alters wird die kontinuierliche Phagozytose der abgeschnürten äußeren Membranscheiben der OS beider Photorezeptoren durch das RPE immer ineffektiver und es kommt zu einer Akkumulation von nicht weiter abbaubaren Stoffwechselprodukte in Form von Lipofuszin (Delori, 2001). Lipofuszin findet sich in den Lysosomen der RPE-Zellen (Kohno, 1982), der Bruch'schen Membran (Marmorstein, 2002) und in Mikroglia des Sub-RPE-Raumes. Unter Einwirkung von Licht erzeugt Lipofuszin freie Radikale, schädigt Zellen und beschleunigt den natürlichen Alterungsprozess (Boulton, 2001; Bergmann 2004). Durch die Einlagerung von Lipiden in die BM kommt es zum einen zu einer Verdickung durch Phospholipid-einlagerungen und infolgedessen zu einer Diffusionsbarriere und zum anderen zu der Entstehung von Drusen (Bird 1991). Ob es im späteren Verlauf zu einer AMD kommt, ist von den Risikofaktoren eines jeden Einzelnen abhängig. Wenn es aber zu einer AMD kommen sollte, dann geht man davon aus, dass die Entstehung der AMD durch eine chronische Entzündungsreaktion ausgelöst wird (Anderson, 2002; Chen, 2008; de Jong, 2006). Drusen sind Ablagerungen bestehend aus Stoffwechselendprodukten und abgestoßenen Zellmembranbestandteilen. Sie werden mit dem frühen Stadium der AMD assoziiert (Sarks, 2007).

Wie in Abbildung 1.03 zu sehen, sind bei der frühen Form der AMD einige Drusen zu erkennen (Sarks, 1999), Des Weiteren lassen sich Alterationen des RPE in Form von Hyper-, aber auch Hypopigmentationen beobachten, Durch die Zunahme der Drusen in Größe, Zahl und Konfluenz und die Zunahme der pigmentveränderten Areale der

Makula kann sich die späte Form der AMD entwickeln (Klein, 2002; Pauleikhoff, 1990).

Die späte Form der AMD wird in eine atrophe „trockene“ und eine exsudative „feuchte“ Form unterteilt, wobei es zwischen beiden Formen einen fließenden Wechsel gibt. Meist kommt es durch die atrophe Form zu einer exsudativen Form aber die Reihenfolge kann auch andersrum sein. Es kann auch dazu kommen, dass beide Formen innerhalb eines Auges zu finden sind (de Jong, 2006).

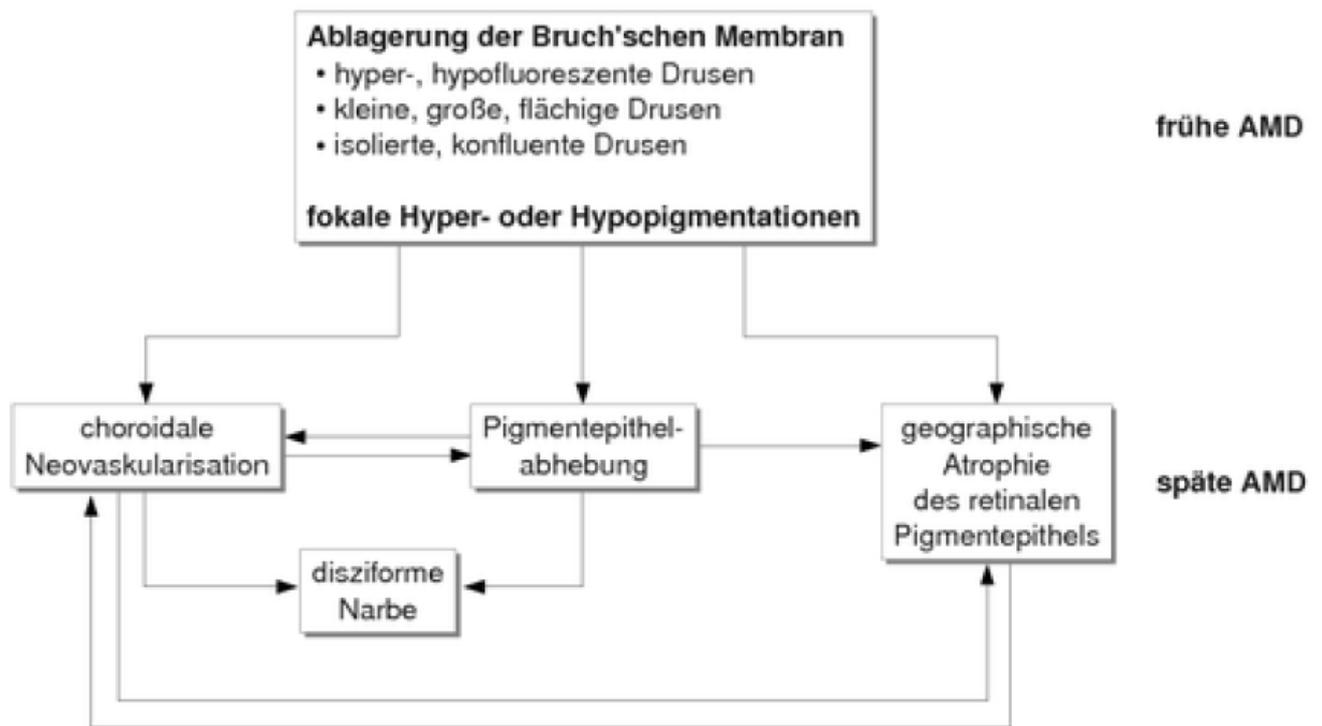


Abbildung 1.03: Übersichtsschema der Altersabhängigen Makuladegeneration
(nach Schmitz-Valckenberg, 2002)

1.1.2.1. Geografische Atrophie

Die geografische Atrophie (GA) ist gekennzeichnet durch größere Drusen (Sunness, 1997). Ihre Größe liegt im Gegensatz zu der frühen Form der AMD (unter 100 µm) nun bei mindestens 125 µm. Weitere Merkmale für die GA sind der kontinuierliche Verlust von RPE-Zellen und die Entstehung von atrophischen Arealen. Dadurch kommt es zu einer Degeneration der Photorezeptoren. Diese werden durch das Absterben der RPE-Zellen nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Wie man in Abbildung 1.05 sehen kann, kommt es schlussendlich zu einem immer stetigeren Verlust des zentralen Sehvermögens (Coleman,

2008). Die GA macht ca. 90% der AMD-Patienten aus, jedoch kommt es nur bei ca. 10% zu einer Erblindung (Jager, 2008).

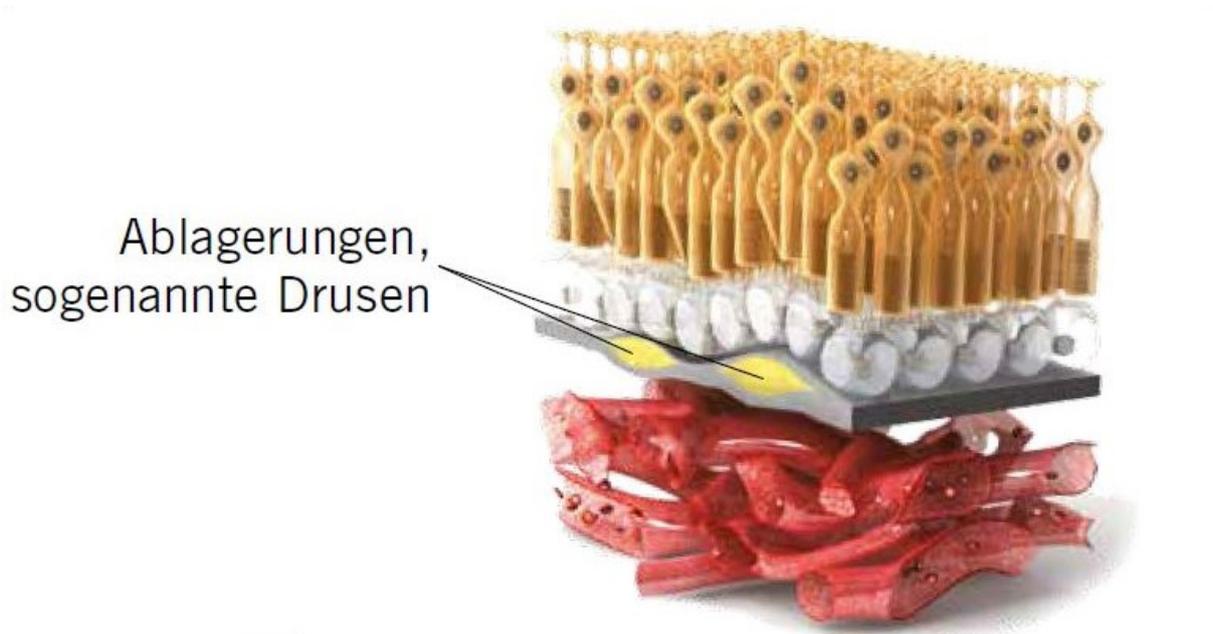


Abbildung1.04: Spätform der AMD: Geografische Atrophie

Ein Merkmal für die GA ist die vermehrte Anzahl von Drusen, wodurch der Sauerstoff-, und Nährstofftransport von der Aderhaut zum RPE beeinträchtigt ist. Die Folge ist das Absterben der RPE-Zellen und der darüber liegenden Photorezeptoren (übernommen von <http://amd-diagnosen.ch>).



Abbildung1.05: Geografische Atrophie

(aus der Datenbank der Klinik für Augenheilkunde Münster)

1.1.2.2. Choroidale Neovaskularisation

Bei der choroidale Neovaskularisation (CNV) kommt es zur Einsprossung von neugebildeten Blutgefäßen aus der Choroidea in den subretinalen Raum (Abbildung 1.06). Dies wird möglich durch Risse in der Bruch'schen Membran. Wie in Abbildung 1.07 zu erkennen ist, können die neugebildeten Blutgefäße porös sein und sorgen dann im subretinalen Raum für Blutungen, Exsudationen, Ablösungen retinaler Schichten, Lipidablagerungen und die Ausbildung disziformer Narben (Grossniklaus 2004; Zarbin, 2004). Die Blutgefäße können über einen längeren Zeitraum im subretinalen Raum profilieren, bevor die die RPE-Schicht reißt und es zu einer Flüssigkeitsansammlung kommt. Bei dieser Form läuft der Verlust des Sehvermögens viel schneller ab. Zwar liegt die Anzahl der Betroffenen dieser Form bei den AMD-Patienten nur bei 15%, jedoch ist die CNV für 90% der schweren Sehbeeinträchtigungen verantwortlich (Ferris, 1984).

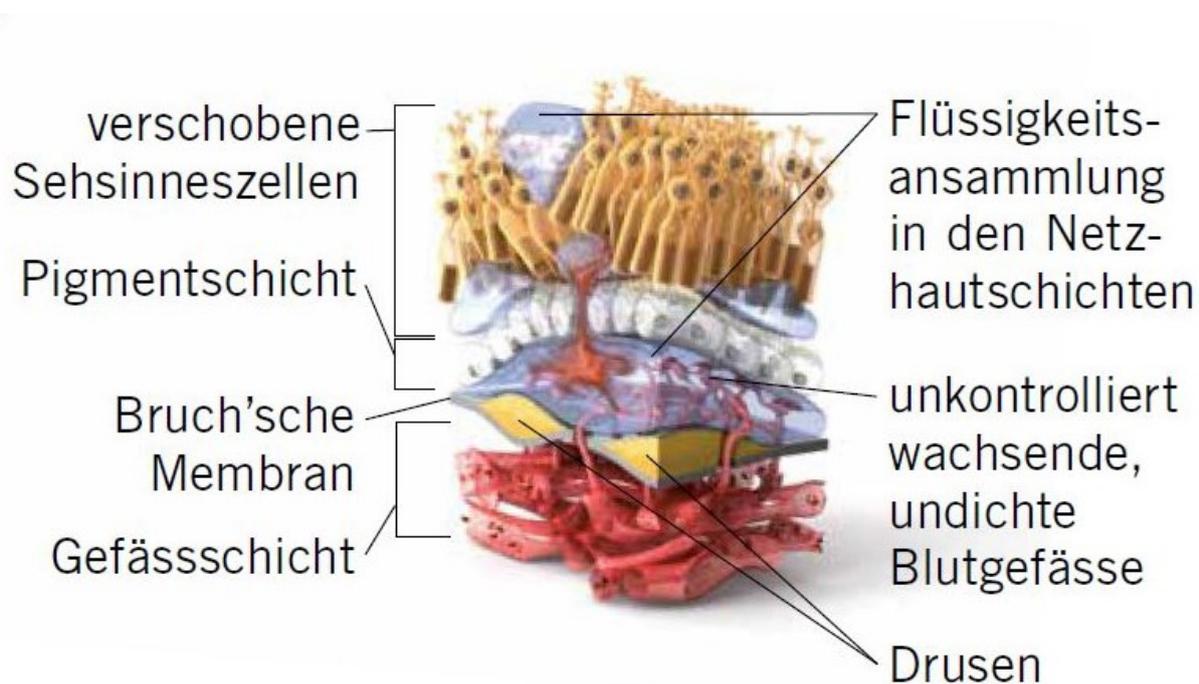


Abbildung 1.06: Spätform der AMD: choroidale Neovaskularisation

Bei der CNV kommt es zum Einwachsen von Kapillaren in den subpigmentepithelialen Raum. Aus porösen Blutgefäßen treten Blut und Gewebsflüssigkeiten aus und zerstören so die Netzhaut (übernommen von <http://amd-diagnosen.ch>).



Abbildung 1.07: Choroidale Neovaskularisation

(aus der Datenbank der Klinik für Augenheilkunde Münster)

1.1.3. Epidemiologie

Die AMD ist in den Industrieländern die häufigste Ursache für Erblindungen bei Menschen über 50 Jahren (Jager, 2008). Laut AMD Alliance International sind weltweit bis zu 30 Millionen Menschen an AMD erkrankt. In Deutschland sind es ca. 4-5 Millionen und die AMD wird für 50% aller Erblindungen in Deutschland verantwortlich gemacht (Finger, 2011). 2006 zeigte Schrader in einer Studie, dass 2020 alleine in Deutschland 1 Mio Patienten an einer späten Form der AMD erkrankt sein werden und die Zunahme bei den über 60 jährigen Patienten gegenüber 2001 um 32% steigen soll (Schrader, 2006). Auch in den USA sind ca. 10 Mio Menschen betroffen und bis zum Jahr 2050 soll sich die Zahl auf 20 Mio verdoppeln (Rein, 2009). Die Prävalenz der AMD ist bei verschiedenen ethnischen Gruppen unterschiedlich groß. So liegt sie bei den 45-85 Jährigen bei Afroamerikanern bei 2%, bei Lateinamerikanern bei 4% und bei weissen Menschen bei 5% (Klein, 2006).

1.1.4. Risikofaktoren

Wie der Name schon sagt, ist das Alter der größte Risikofaktor zur Entstehung der AMD (Klein, 2007), jedoch existieren noch weitere Risikofaktoren. Raucher haben ein 3 mal so hohes Risiko an der neovaskulären Form der AMD zu erkranken als Nichtraucher. Dabei gibt es viele Möglichkeiten, um die AMD zu begünstigen: Sauerstoffradikale werden freigesetzt, welche auf Dauer die Retina schädigen; Rauchen verringert die Antioxidantien im Körper; die Pigmentierung der Makula wird verringert; das Immunsystem wird aktiviert; der choroidale Blutfluss wird reduziert

und die Angiogenese gefördert (Delcourt, 1998; Khan, 2006; Klein, 2010; Pryor, 1983; Thornton, 2005). Als weitere Beispiele für bekannte Faktoren für die Entstehung der AMD lassen sich Bluthochdruck, Übergewicht sowie eine zu geringe Aufnahme von Antioxidantien oder Zink aufzählen (Hyman, 2000; Klein, 2004; Seddon, 1994). Wie in 1.1.3. schon aufgezeigt wurde, ist auch die ethnische Herkunft ein Risikofaktor für die AMD-Entstehung. Zur Untersuchung genetischer Faktoren auf die Entstehung der AMD wurden einige großangelegte Studien durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass ein SNP (*single nucleotide polymorphism*) im *Faktor H*, dem wichtigsten Regulator des alternativen Komplementweges, eine wichtige Rolle spielt (Haines, 2005). Durch diesen Aminosäureaustausch erhöht sich das Risiko einer AMD bei den heterozygoten Trägern um 200-400% und bei den homozygoten Trägern um 300-700% (Klein, 2005). Damit sind 20-50% des gesamten Risikos an der AMD zu erkranken auf diesen SNP-Polymorphismus zurückzuführen. Weitere Polymorphismen, die signifikant mit der Entstehung der AMD assoziiert werden können, wurden in den Hilfsfaktoren B, C2 und C3 entdeckt (Gold, 2006; Yates, 2007). Zusätzlich wird der Polymorphismus des *ARMS2*-Gens (*age-related maculopathy susceptibility gene 2*) mit einem erhöhten Risiko für AMD in Verbindung gebracht (Fritsche, 2008).

1.1.5. Therapeutische Ansätze

Zurzeit gibt es keine Heilungsmethode für die AMD. Durch die Kontrolle der Risikofaktoren wie Rauchen, Bluthochdruck und Ernährung kann man das Risiko, an der AMD zu erkranken, halbieren (Tomany, 2004).

Die heute gängigen therapeutischen Methoden basieren darauf, den Krankheitsverlauf zu verlangsamen und die Effekte der AMD zu reduzieren.

Da bei der Pathogenese der AMD mit hoher Wahrscheinlichkeit freie Sauerstoffradikale beteiligt sind, wurden Patienten in verschiedenen Studien Antioxidantien appliziert. Als ein Beispiel sei die multi-zentrische *Age Related Eye Disease Study* (AREDS) zu nennen. Ergebnis der Applikation war eine Reduzierung des Auftretens eines Sehverlustes um 19% (Fletcher, 2010; Kassoff, 2001). Die Ergebnisse anderer Studien dieser Form der AMD-Behandlung weisen jedoch starke Schwankungen auf (Beatty, 2000; Kassoff, 2001; SanGiovanni, 2007).

Eine Methode zur Behandlung der neovaskulären Form der AMD ist die Verwendung von Lasern. Mit Hilfe eines Argon-Lasers können Neovaskularisationen zerstört

werden. Jedoch gerät durch diese Art der Anwendung auch gesundes retinales Gewebe in Mitleidenschaft, weshalb nicht im Bereich der Makula gelasert werden darf (Maguire, 1994). Bei der photodynamischen Therapie (PDT) werden den Patienten intravenös photosensible Substanzen appliziert, welche sich im neovaskulären Gewebe akkumulieren und mittels eines Lasers aktiviert werden. Durch diese Aktivierung wird eine Thrombosierung der choroidalen, neovaskulären Strukturen verursacht. Vorteil dieser Variante ist Minimierung der Schäden für die Retina und keine Begrenzung der Behandlung im Bereich der Makula. Studien zeigten bei dieser Form der Therapie eine Verlangsamung des Krankheitsverlaufes, aber keine Verbesserung der Sehfähigkeit (Bressler, 1999; Kaiser, 2006).

Für die neovaskuläre Form der AMD ist die heute gängigste Methode die intravitreale Injektion von VEGF-Inhibitoren. VEGF steht für *vascular endothelial growth factor*, und dieser Wachstumsfaktor sorgt bei AMD-Patienten für eine unkontrollierte ablaufende Angiogenese (Das, 2003; Kannan, 2006). Durch die intravitreale Injektion von VEGF-Inhibitoren wie Ranibizumab, Aflibercept oder Bevacizumab kann die Angiogenese gehemmt werden (Dias, 2011). Studien mit beiden VEGF-Antagonisten zeigten eine Verzögerung in der Ausbreitung der neovaskulären Form der AMD. In manchen Fällen konnte sogar eine verbesserte Sehfähigkeit nachgewiesen werden (Algvere, 2008; Regillo, 2008; Rosenfeld, 2006; Spaide, 2006).

In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass auch das Immunsystem an der Pathogenese der AMD beteiligt ist. Dies betrifft zum einen das Komplementsystem, dessen erbliche Defekte einen erheblichen Risikofaktor für die Entstehung der AMD darstellen. Zum anderen hat sich gezeigt, dass sich an den Läsionsstellen eine erhöhte Anzahl von Immunzellen befindet und dass eine vermehrte Produktion von Entzündungsmarkern stattfindet. Solange die Blut-Retina-Schranke noch intakt ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den beteiligten Immunzellen um residente Mikroglia-Zellen handelt, die immunkompetenten Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS), die auch in der Retina intrinsisch vorhanden sind. Das Ziel dieser Dissertation war es, die Rolle der Mikroglia-Zellen im alternden Auge, sowie bei der Entstehung und dem Fortschreiten der AMD zu untersuchen. Im folgenden Abschnitt sollen die Mikroglia-Zellen beschrieben werden.

1.2. Mikroglia

Mikroglia-Zellen (MG), die immunkompetenten Zellen des ZNS, üben viele Funktionen im Nervensystem aus und reagieren auf vielfältige Art und Weise auf Veränderungen (Hanisch, 2007). Sie machen 5-20% der gesamten Gliazellpopulation des ZNS aus (Lawson, 1992). In der Retina wechselwirken sie mit Neuronen, Photorezeptoren und Blutgefäßen sowie mit dem RPE (Abbildung 1.08).

Erst in den letzten Jahren konnten durch bessere Möglichkeiten in der Immunhistologie, Zellkultur und Analyseverfahren neue Erkenntnisse in der Rolle und dem Verhalten der Mikroglia-Zellen gewonnen werden. In den folgenden Abschnitten soll auf den Ursprung der Mikroglia-Zellen, ihr Verhalten im gesunden Auge und bei Augenerkrankungen eingegangen werden.

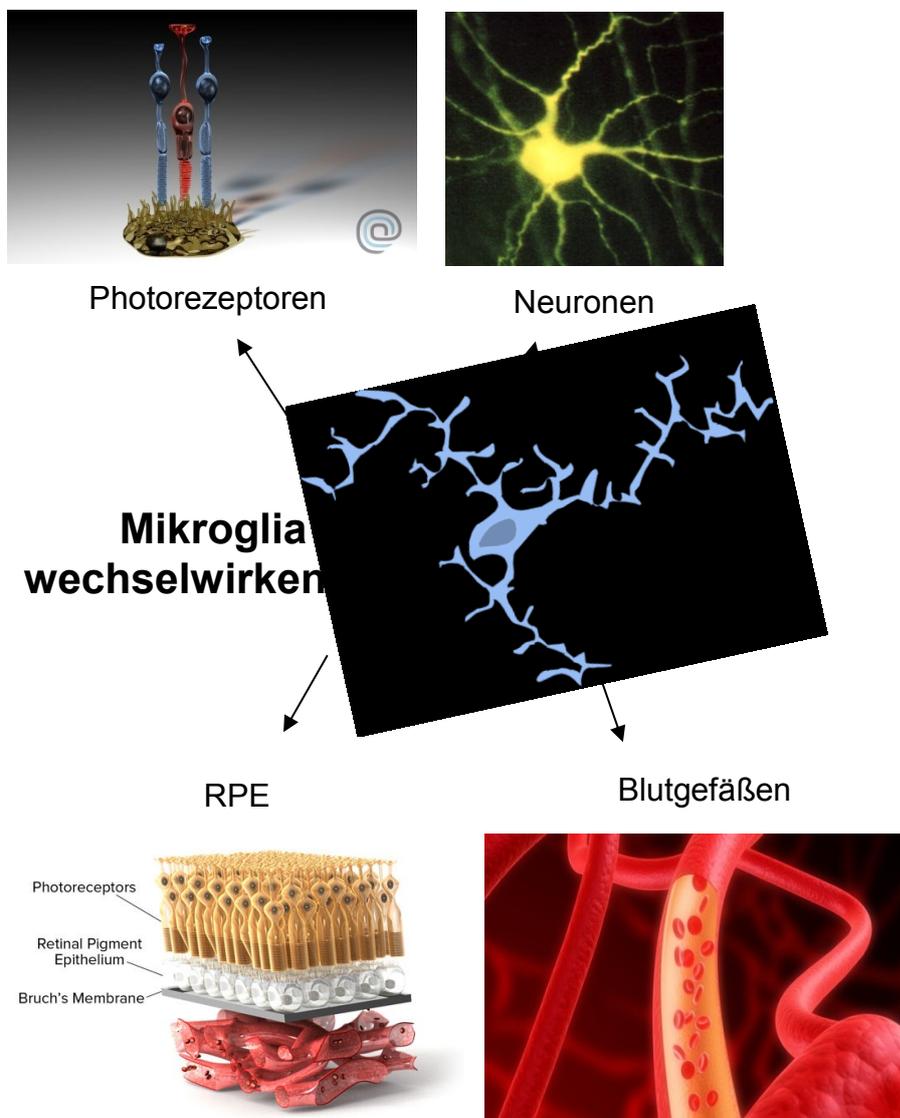


Abbildung 1.08: Die Interaktion der Mikroglia-Zellen mit anderen Bestandteilen der Retina

Mikroglia wurden zunächst ausführlich von Del Rio Hortega beschrieben (Hortega, 1919) (Abbildung 1.09). Er war der Erste, der die Mikroglia als eine eigenständige Zellpopulation neben den Neuronen und Astrozyten sah und nannte sie *bodyguards* „die ihre Tentakeln überall verbreiten und alles verschrecken, was ihnen Schaden zufügen könnte“ (Hortega, 1933). Marchesani nutzte Hortegas Färbetechnik, um die Mikroglia im Sehnerv und den inneren Schichten der Netzhaut von Kaninchen, Affen, Katzen und Menschen anzufärben (Marchesani, 1926).

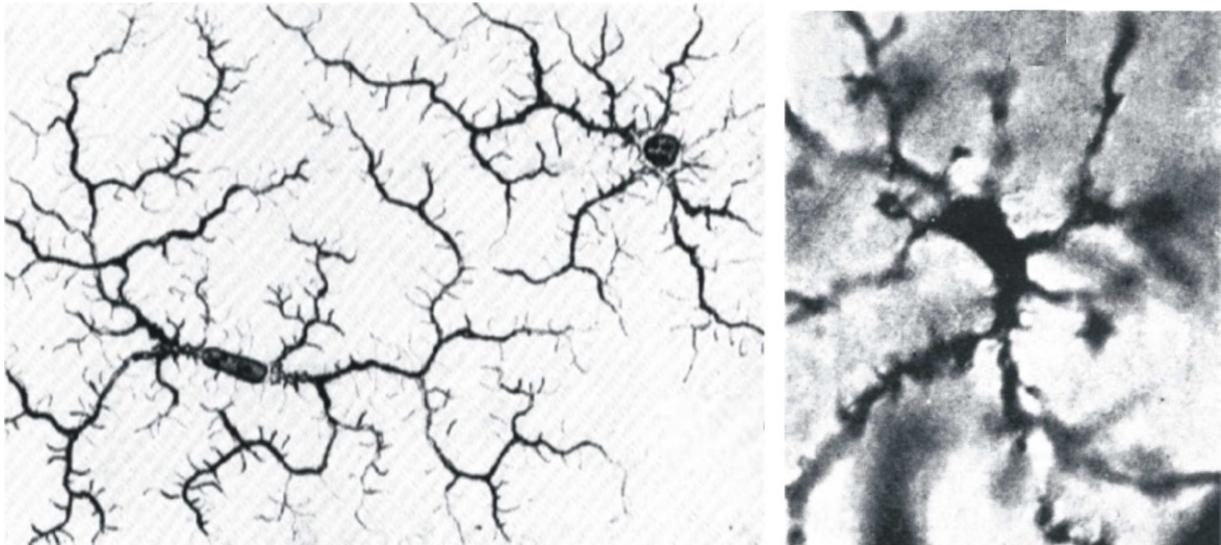


Abbildung 1.09: Zeichnung (links) und Mikrofotografie (rechts) von Mikroglia
(Hortega, 1919 und 1932)

1.2.1. Ursprung der Mikroglia

Über die Herkunft der Mikroglia wurde lange Zeit wissenschaftlich diskutiert. Es wurde angenommen, dass die Mikroglia-Zellen mesodermalen Ursprungs sein, wie ursprünglich von Del Rio Hortega im Jahre 1919 angenommen. Diese Ansicht teilten weitere Wissenschaftler (Ashwell, 1991; Boya, 1979; Cammermeyer, 1970; Eyo, 2013). Dalmau zeigte, dass Vorläufer der Mikroglia aus verschiedenen mesodermalen Quellen und aus unterschiedlichen embryonalen Altern stammen können und sich dann in Mikroglia-Zellen umwandeln (Dalmau, 1997). Bis heute hat diese Hypothese immer noch keine konkreten Beweise und ist umstritten (Chan et al., 2007).

Andere Autoren verknüpften die Ontogenese der Mikroglia-Zellen mit der Entwicklung des Nervensystems. Es wurde suggeriert, dass die Mikroglia-Zellen aus

der germinalen Matrix stammen oder sich aus Glioblasten entwickeln und somit neuroektodermalen Ursprungs sind (Hutchins, 1990; Kitamura, 1984). Zu denselben Erkenntnissen kam Alliot, die aus *in vitro* Experimenten schlussfolgerte, dass Mikroglia-Zellen aus dem Parenchym verschiedener Teile des Gehirns abgeleitet werden (Alliot, 1991). Es wurde für möglich gehalten, dass Mikroglia-Zellen wie Makroglia und Neuronen aus neuroektodermaler Herkunft entstehen (Fedoroff, 1997).

Über einen Ursprung aus Monozyten oder Makrophagen wurde ebenfalls viel diskutiert. Kolloidale Kohlenstoffpartikel wurden als ein intrazellulärer Marker verwendet, um zu zeigen, dass Monozyten in das sich entwickelnde Rattenhirn eindringen können und sich in Mikroglia-Zellen transformieren können (Ling, 1980). Es gibt viele Gemeinsamkeiten der Mikroglia-Zellen mit Monozyten/Makrophagen, wie z.B. Effektorfunktionen (Phagozytose), Produktion von Cytokinen und Chemokinen sowie die Freisetzung von zytotoxischen Sauerstoffradikalen (Hausler, 2002; Nguyen, 1998). Eine starke Vaskularisierung des ZNS bildet dabei die Grundlage für die Einwanderung von myeloiden Zellen sowie für eine verbreitete Mikroglia-Kolonisation (Chugani, 1991; Ling, 1980; Perry, 1995). Während der Infiltration der Makrophagen durch die Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1), spielt das Gefäßendothel des ZNS eine entscheidende Rolle (Dalmau, 1997). Ginhoux stellte sich die Frage, ob postnatale hämatopoetische Vorläuferzellen als Ursprung der Mikroglia-Zellen zu sehen sein. In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass postnatale hämatopoetische Vorläuferzellen, einschließlich Monozyten, nicht wesentlich zur Homöostase der Mikroglia-Zellen im Gehirn beitragen und sich Mikroglia wahrscheinlich aus primitiven Makrophagen ableiten (Ginhoux, 2010).

Während der letzten Jahre zeigten sich immer mehr Beweise, dass Mikroglia-Zellen aus primitiven Dottersack Makrophagen, abgeleitet von hämatopoetischen Stammzellen über einen myeloischen Vorläufer, entstehen (Abbildung 1.10) (Alliot, 1999; Ginhoux, 2010; Ransohoff, 2010).

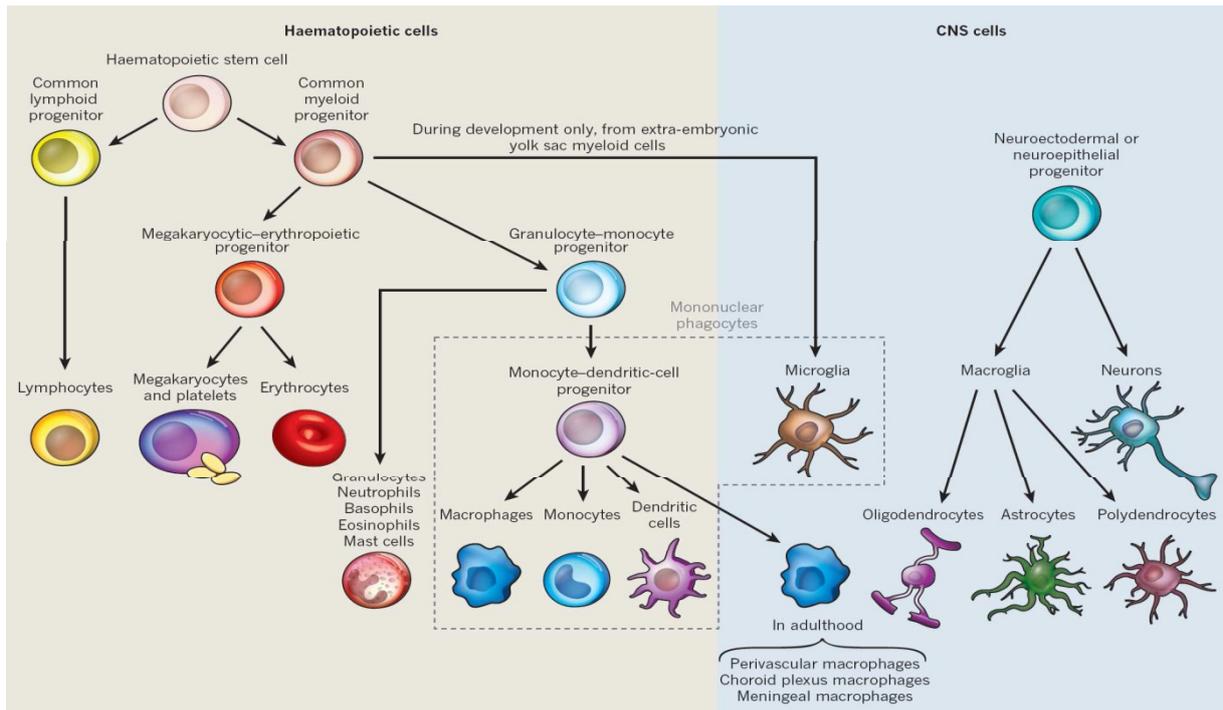


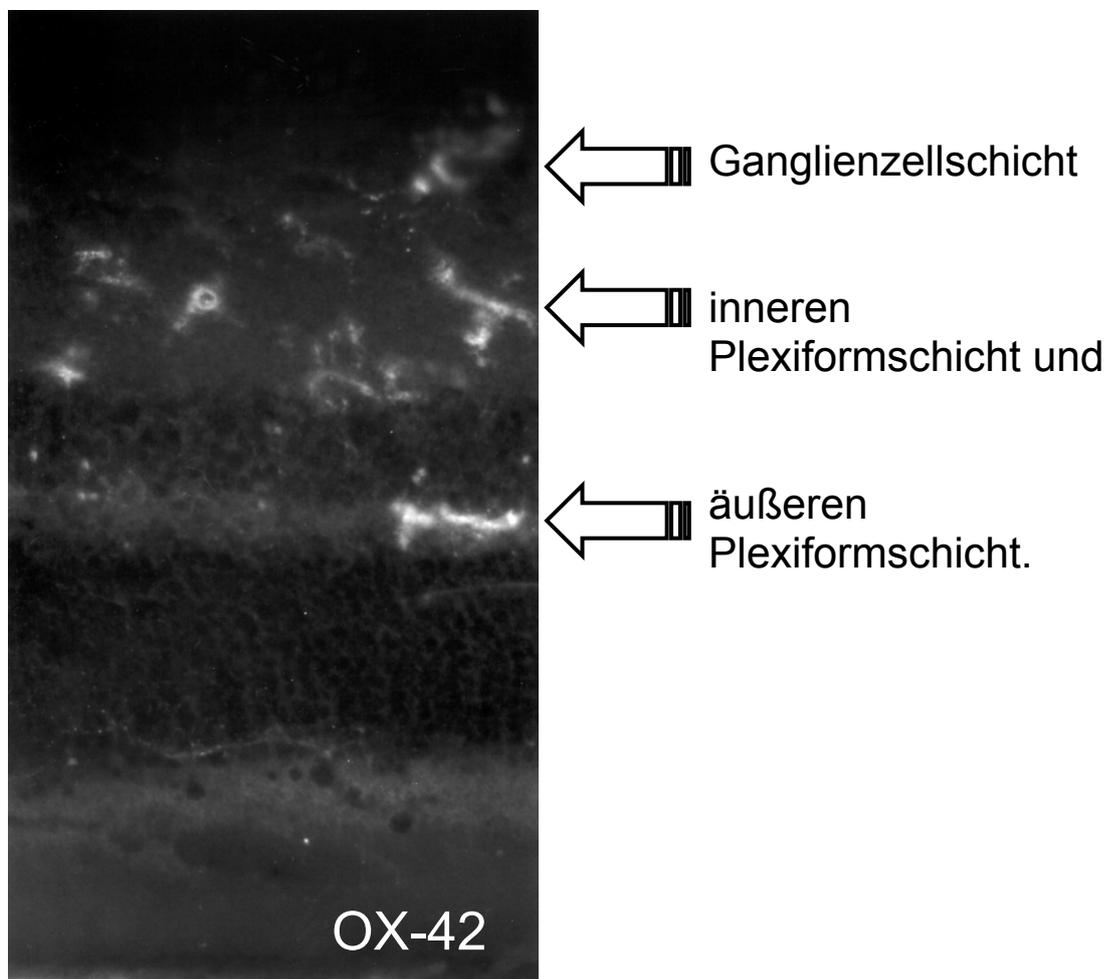
Abbildung 1.10: Verbindung der Mikroglia zum ZNS

Mikroglia sind die einzigen Zellen hämatopoetischen Ursprungs in dem Parenchym des ZNS und wandern während der Entwicklung dorthin (Ransohoff, 2010)

1.2.2. Mikroglia in der Netzhaut

Im gesunden Auge ist der subretinale Raum zwischen den Photorezeptoren und dem RPE immunprivilegiert und somit halten sich dort keine MG-Zellen auf (Abbildung 1.11) (Lee, 2008; Streilein, 2002). Mikroglia spielen eine zentrale Rolle bei der Immunregulation des ZNS und der Netzhaut. Hierbei ist grundsätzlich zwischen „ruhenden“ ramifizierten und „aktivierten“ amöboiden Mikroglia-Zellen (siehe 1.2.4.) zu unterscheiden. Die ruhenden Mikroglia-Zellen formen viele Zellausläufer, die kontinuierlich ihre Umgebung auf Zellschädigungen kontrollieren (Nimmerjahn, 2005). Unter normalen physiologischen Bedingungen setzen Mikroglia-Zellen neuroprotektive und entzündungshemmende Faktoren frei und überprüfen Neurone auf ihren Gesundheitszustand (Hanisch, 2002). Sie sezernieren Cytokine und Chemokine, die von entscheidender Bedeutung für das Überleben von Neuronen sind (Linnartz, 2010). Dieser „Ruhezustand“ wird über immunsuppressive Mediatoren, wie Interleukin (IL) 10 oder den transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β), in der Interstitialflüssigkeit geregelt (Ransohoff, 2009). Weiterhin spielt die Wechselwirkung der Mikroglia-Zellen mit Astrozyten und Neuronen durch Neurotransmitter-Rezeptoren eine wichtige Rolle für den Zustand der Mikroglia-

Zellen (Graeber, 2010; Hanisch, 2007). Besonders der CX3 chemokine Ligand 1 (CX3CL1), sezerniert von Neuronen, ist bei der Aufrechterhaltung des Ruhezustandes der Mikroglia-Zellen involviert. Dieser wird von dem CX3C-Rezeptor 1 (CX3CR1), exprimiert von den Mikroglia-Zellen, wahrgenommen. In der Retina können Mikroglia-Zellen sowohl Eigenschaften von dendritischen antigenpräsentierenden Zellen als auch eine ähnliche Rolle von Makrophagen haben (Provis, 1996). Mikroglia-Zellen können also zwei Hauptfunktionen ausführen: Die Präsentation von Antigenen und die Phagozytose von Zelltrümmern. Diese Erkenntnisse zeigen, dass sogenannte „ruhende“ Mikroglia-Zellen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des physiologischen Zustandes der Netzhaut spielen.



**Abbildung 1.11 : Lage der Mikroglia-Zellen in der Retina
(aus Heiduschka, 2004)**

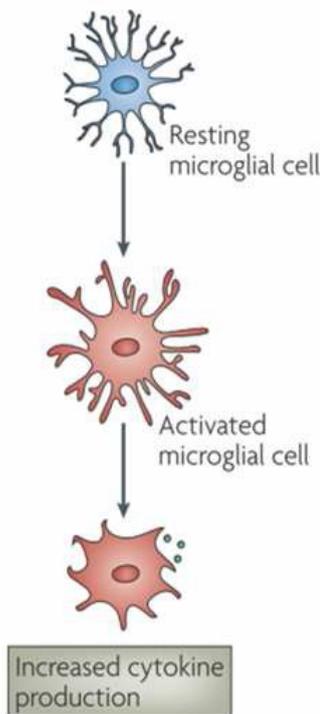


Abbildung 1.12 : Ruhende und aktivierte Mikroglia-Zellen

(Perry, 2007)

1.2.3. Oberflächenmarker und Rezeptoren

Auf der Oberfläche der Mikroglia-Zellen befinden sich viele Oberflächenmarker und Rezeptoren, die zur Identifizierung verwendet werden können. Als Beispiele sind CD11b, Iba1, F4 /80, CD45 und CD11c zu nennen (Chen, 2002). *Griffonia Simplicifolia* Isolectin (Isolectin B4), ein pflanzliches Lektin, wurde auch zur Markierung von Mikroglia-Zellen verwendet (Bejarano-Escobar, 2012; Lewis, 2005; Suzuki, 1988). Da Isolectin B4 aber auch Blutgefäße anfärbt, ist die Spezifität dieser Methode in Frage zu stellen. Als immunkompetente, antigenpräsentierende Zellen besitzen die Mikroglia, entsprechend peripherer immunkompetenter Zellen, verschiedene Oberflächenrezeptoren und -antigene. Zur Antigenpräsentation besitzen sie MHC I und II, β 2-Integrin, Immunglobulin-Fc γ -Rezeptoren und das B7-Antigen (de Simone, 1995; Kim, 2005; Williams, 1992). Zusätzlich zu diesen, gibt es auch viele Rezeptoren auf Mikroglia-Zellen, die bei der Initiierung und / oder Modulation der physiologischen und pathologischen Wirkung eine entscheidende Rolle spielen (Hanisch, 2002; Möller, 2002; van Rossum, 2004). Ein bekanntes Beispiel ist TLR4, ein Mitglied der Toll-like Rezeptor (TLR) –Familie. Durch die Freisetzung von Cytokinen, Chemokinen, Stickstoffmonoxid (NO) und Proteasen vermittelt dieser die Antwort zwischen Mikroglia-Zellen und Lipopolysacchariden

(Takeda, 2003). Mikroglia-Zellen exprimieren auch TLR1-TLR9, was sie für fast jede Art von bakteriellen und viralen Infektionen sensitiv macht (Garden, 2006). Weitere Rezeptoren, die während den physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen sind CCR1-CCR8, CXCR1/2/3 und CX3CR1 (Columba Cabezas, 2002, 2003; Flynn, 2003; Galasso, 2000; Harrison, 1998; Janabi, 1999; Power, 2001; Simpson, 2000). Die Mikroglia-Zellen exprimieren darüber hinaus Rezeptoren speziell für die Mikroglia-ausgeschütteten Chemokine, um im Fall einer Schädigung weitere Mikroglia zum Ort der Schädigung zu rekrutieren (Garden, 2006). Witting konnte mit ihren Experimenten zeigen, dass Mikroglia-Zellen einen asialoglycoproteinartigen Lektin-Rezeptor, einen Vitronectin-Rezeptor und einen Phosphatidylserin-Rezeptor exprimieren, um apoptotische Neurone zu erkennen (Witting, 2000). Weitere Rezeptoren sind Komplement-Rezeptoren, toll like Rezeptoren, Scavenger-Rezeptoren und Purine-Rezeptoren (Neumann, 2009). In Tabelle 1.01 sind einige der bekannten Oberflächenmarker und Rezeptoren aufgelistet.

	ruhende ramifizierte Mikroglia	aktivierte amöboide Mikroglia
Oberflächenmarker	Isolectin (Isolectin B4)	Isolectin (Isolectin B4)
		OX41
	OX42	OX42
		ED1, ED2, ED3
	F4/80	F4/80
	Mac-1	Mac-1
	Iba1	Iba1
		MHC II
	MHC I	MHC I
	CD45	CD45
	CD68	CD68
	CD11a, CD11b, CD11c	CD11a, CD11b, CD11c
	CD18	CD18
		B ₇₋₁
	B ₇₋₂	B ₇₋₂
	RMG-1	RMG-1
	RMG-2	
		LAMP-1
	LN-1	LN-1
	OX6, OX3, OX18	OX6, OX3, OX18
Rezeptoren	TLR1-TLR9	
	CCR1-CCR8	
	CXCR1/2/3	
	CX3CR1	
	asialoglycoproteinartigen Lektin-Rezeptor	
	Vitronectin-Rezeptor	
	Phosphatidylserin-Rezeptor	
	Komplement-Rezeptoren	
Purine-Rezeptoren		

Tab. 1.01.: Übersicht der Oberflächenmarker und Rezeptoren

Es gibt nur wenige Marker, die Unterschiede zwischen ruhenden und aktivierten Mikroglia-Zellen aufweisen. Jedoch ist das Ausmaß der Expression einiger Marker bei diesen beiden Stufen unterschiedlich z.B. F4 / 80 und CD45

1.2.4. „aktivierte“ Mikroglia

Kreutzberg postulierte 1996 als Erster, dass kaum eine Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) ohne Beteiligung der Mikroglia-Zellen denkbar ist (Kreutzberg, 1996). In der gesunden Retina überprüfen Mikroglia-Zellen ihre Mikroumgebung. In diesem Überwachungsmodus zeigen sie eine verzweigte Morphologie mit vielen Zellausläufern. Auf Veränderung des physiologischen Milieus reagieren sie mit der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle und morphologischen Veränderungen (Saijo.2011). „Aktivierte“ Mikroglia-Zellen spielen eine wichtige Rolle während

verschiedener pathologischer Zustände. Zahlreiche Studien konnten belegen, dass die meisten Erkrankungen des ZNS, sowie retinale Dystrophien, mit einer Aktivierung der Mikroglia einhergehen und Mikroglia somit direkt an der Degeneration von Neuronen und Photorezeptoren beteiligt sein könnten (Langmann, 2007, Schuetz and Thanos, 2004). Im Fall einer Schädigung des ZNS kann die Aktivität der Mikroglia-Zellen das Entfernen von Zellabfällen und entarteten Zellen und die Sekretion von neuronalen Überlebensfaktoren zur Begrenzung weiterer Schäden fördern (Rivest, 2009; Streit, 2002). Die Mikroglia-Aktivität kann aber auch, durch die anhaltende Aktivierung und Rekrutierung von zusätzlichen Mikroglia-Zellen, schädliche Wirkung haben (Rivest, 2009). Eine Vielzahl von Reizen, die zu einer Aktivierung der Mikroglia-Zellen führen, sind z.B. Virushüllen, bakterielle Zellwandkomponenten, pathologische Proteine oder Serumfaktoren, die die Blut-Hirn-Schranke (BBB) überqueren (Adams, 2007, Heppner, 2001). Mit Hilfe von TLR1-9 oder dem Komplement-Rezeptor-Makrophagen-Antigen 1 (MAC-1) sind Mikroglia-Zellen in der Lage, diese Reize zu identifizieren (Lehnardt, 2010). Ausgelöst durch beschädigte oder nichtfunktionelle Zellen migrieren Mikroglia-Zellen zu den betroffenen Arealen und agieren als Fresszelle (Abbildung 1.12). Bei Zellschädigung tritt neben Kalium auch Intrazellulärsubstanz in den Extrazellulärraum aus. Zellmembranlipide, intrazelluläre Purine (ATP, ADP, UTP) strömen aus und leiten die Mikroglia-Zellen direkt zu den verletzten Gebieten (Davalos, 2005; Nimmerjahn, 2005). Zudem produzieren geschädigte Nervenzellen Substanzen wie TNF- α , NO, IL-6, IL-1 β und weitere Cytokine in stark erhöhter Konzentration und aktivieren die entsprechenden Rezeptoren der Mikroglia-Zellen (Fawcett, 1999; Polazzi, 2002). Die Hauptfunktionen von aktivierten Mikroglia-Zellen ähneln denen von Makrophagen und beinhalten Phagozytose, Antigenpräsentation und die Produktion von proinflammatorischen, antiinflammatorischen und immunmodulierenden Cytokinen, oxidative Radikale oder NO (Benveniste, 2001). Beispielhaft seien hier Interleukine (z. B. 1 β , 6, 8, 10, 12, 13, 15), Interferone (IFN), TNF- α (Tumornekrosefaktor) und CSF (Kolonie-stimulierender Faktor) zur Regelung von Wachstum, Differenzierung und Aktivitäten zu nennen (Hanisch, 2002; Kim, 2005; Shin, 2004). Die Transkription von Cytokinen wird von Lipopolysacchariden (LPS) oder Interferon (IFN) γ induziert. Die Freisetzung von Cytokinen, wie dem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) α , hat einen autokrinen Effekt auf die weitere Cytokineexpression. Zum Schluss werden die aktivierten Mikroglia-Zellen durch

Apoptose der Makrophagen gestoppt (Gehrmann, 1995). Durch eine Schädigung der Retina kann es zu einer erhöhten Bildung von Radikalen (NO, TNF- α , Superoxid) kommen, oder es fehlen antiinflammatorische Stoffe (IL-10, IL-13), wodurch die Aktivität der Mikroglia-Zellen nicht gestoppt werden kann. Die Folge ist eine Überaktivierung der Mikroglia-Zellen, was zu einer unkontrollierten Phagozytose von Photorezeptoren und Neuronen führen kann (Kreutzberg, 1996). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der aktivierte Zustand der Mikroglia-Zellen sehr dynamisch und vielfältig ist und mit verschiedenen funktionalen Eigenschaften einhergeht, die von neuroprotektiven zu neurotoxischen Auswirkungen reichen (Biber, 2007; Hanisch, 2007; Nimmerjahn, 2005).

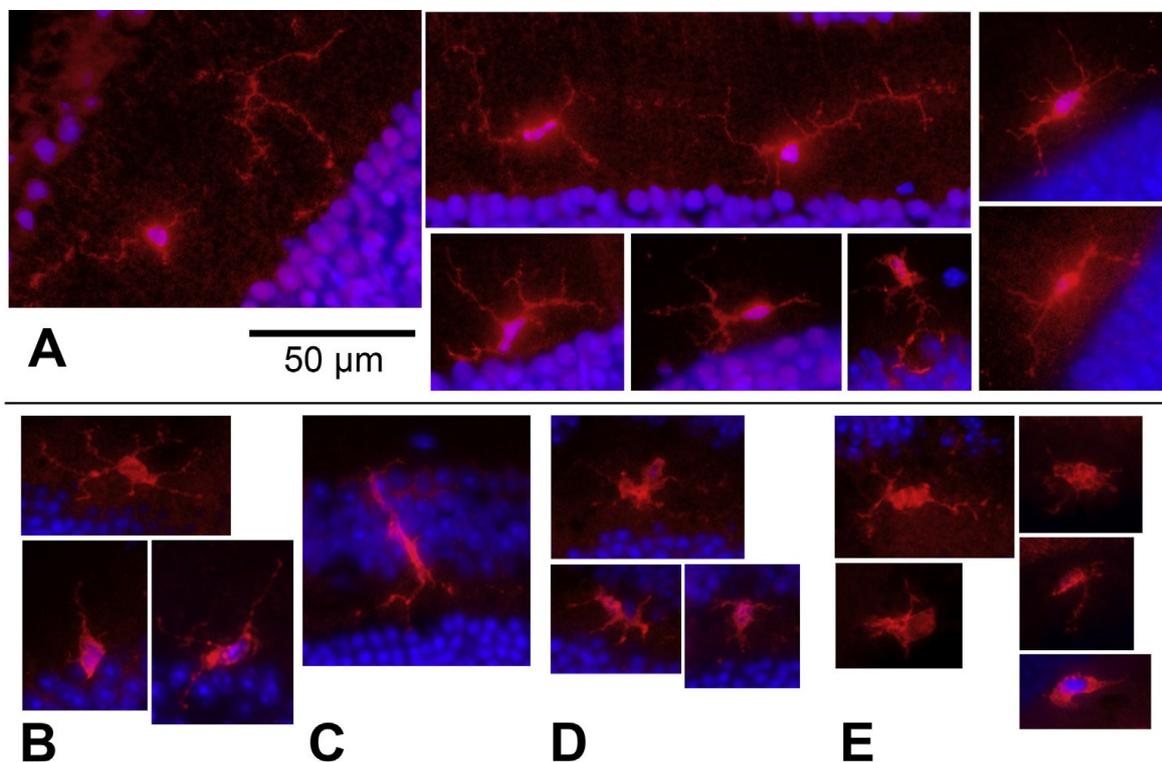


Abbildung 1.13: Morphologie der Mikroglia-Zellen in Paraffinschnitten

Gefärbt gegen Iba1. A) „ruhende“ Mikroglia-Zellen in der inneren plexiformen Schicht mit einem kleinen Soma und verzweigten Ausläufern B-E) „aktivierte“ Mikroglia-Zellen eine Woche nach der Laserbehandlung zeigen größere Soma und eine reduzierte Anzahl, Länge und Verzweigung der Zellausläufer. Durch die Laserbehandlung migrieren viele Mikroglia-Zellen in den subretinalen Raum B) Mikroglia-Zellen in der inneren Plexiformschicht, von denen einige in die innere Körnerschicht migrieren C) Eine Mikroglia-Zelle durchquert die innere Körnerschicht D) „aktivierte“ Mikroglia-Zelle in der äußeren plexiformen Schicht E) und im subretinalen Raum (Li, 2015)

1.2.5. Mikroglia und AMD

Beim normalen Alterungsprozess der Retina führt erhöhter oxidativer Stress zur Bildung von oxidierten Lipiden, Proteinen und DNA (Medzhitov, 2008). Mit zunehmendem Alter migrieren Mikroglia-Zellen aus der inneren Netzhaut in den subretinalen Raum (Xu, 2007). Die Immunzellen, wie Mikroglia und Makrophagen, Komplementfaktoren und andere Elemente des Immunsystems, reagieren auf den anhaltenden Stress und erzeugen eine „low-grade“ Entzündung. Aufgrund der neuen Bedingungen wird der homöostatische Sollwert verändert, um auf die Wiederherstellung und Aufrechterhaltung der Gewebe-Homöostase abzielen (Medzhitov, 2008). Die Entzündungsreaktionen, die in AMD-Patienten und Tiermodellen beobachtet wurden, sind ähnlich denen, die in der alternden Netzhaut zu finden sind. Die Entzündungsreaktionen verlaufen in der „gesunden“ Netzhaut nur milder (Buschini, 2011). Alternde Netzhaut und AMD sind in einigen Mechanismen vergleichbar, jedoch ist das Ausmaß unterschiedlich. Bei der AMD ist die Migration der Mikroglia-Zellen in den subretinalen Raum für die Entfernung extrazellulärer Ablagerungen und die Verhinderung der Drusenbildung notwendig. Durch die Nähe aktivierter Mikroglia-Zellen zum RPE können die Funktionen der RPE-Zellen beeinflusst werden, was wiederum die RPE-Zellen dazu veranlassen könnte, verschiedene Substanzen zu sezernieren, die weitere Mikroglia-Zellen aktivieren (Xu, 2009). Bei der Pathogenese der AMD kann die subretinale Akkumulation und die proinflammatorische Aktivität der retinalen Mikroglia-Zellen zu einer Störung der Immunprivilegien der Retina führen. Aktivierte Mikroglia-Zellen produzieren in diesem Fall unter anderem Komplement-Komponenten, proinflammatorische Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Wachstumsfaktoren. All diese Faktoren können zu einer chronischen Entzündung führen, die zu weiterem Schaden führt (Buschini, 2011). Daraus lässt sich ableiten, dass durch den Zelltod Mikroglia-Zellen zu dem Ort der Verletzung migrieren und Zelltrümmer phagozytieren und Modulatoren sezernieren, die benachbarten Photorezeptoren zerstören (Gupta, 2003). CCL2 (CC-Zytokin-Ligand 2) Knockout-Mäuse (CCL2^{-/-}) entwickeln Drusen und phänotypische Merkmale ähnlich der AMD, einschließlich einer erhöhten Anfälligkeit für eine choroidale Neovaskularisation (CNV) (Ambati, 2003). Auch Knockout-Mäuse für CX3CR1 entwickeln Drusen-ähnliche Läsionen, progressive Akkumulation von subretinalen Mikroglia-Zellen und Photorezeptor-Degeneration (Combadiere, 2007). Jedoch zeigten sich in einer Studie mit CCL2^{-/-}, CX3CR1^{-/-} und

CCL2^{-/-}/CX3CR1^{-/-} Knockout-Mäusen auch nach 14 Monaten keine Anzeichen von retinaler Degeneration oder Verlust der Photorezeptorzellen. Obwohl die Mängel an CCL2 und CX3CR1 die Migration der Mikroglia-Zellen im Alter beeinflussen, waren sie nicht ausreichend, um eine AMD auszulösen (Luhmann, 2013).

1.2.6. Modell der laserinduzierten CNV

Das Modell der laserinduzierten CNV ist eine anerkannte Methode zur Simulation der choroidalen Neovaskularisation. Dabei werden mit Hilfe eines Argonlasers das RPE und die Bruch's-Membran zerstört (Tobe, 1998). Der Schaden führt zu einer fibrovaskulären Proliferation, die mit Merkmalen der CNV vergleichbar ist (Grossniklaus, 2010). Am Ort des „Laserherdes“ migrieren und proliferieren Endothelzellen, Fibrozyten, Perizyten und inflammatorische Zellen von der Aderhaut in den subretinalen Raum (Grossniklaus, 2010). Zusätzlich kann die Laserkoagulation eine Thrombose choroidaler Gefäße induzieren gefolgt von einer erneuten Endothelialisierung und dem Wachstum neuer Gefäße in den subretinalen Raum (Ishibashi et al., 1987). Auch die Mikroglia-Zellen akkumulieren sich nach der Laserbehandlung im subretinalen Raum (Combadiere, 2007; Damani, 2011; Huang, 2013). In *in-vivo*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation der Mikroglia-Zellen an Tag 4 nach der Laserbehandlung ihr Maximum erreicht (Eter, 2008

2. Ziel der Arbeit

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist eine Hauptursache für Erblindungen bei älteren Bürgern in den westlichen Ländern, mit zunehmendem Ausmaß. In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass auch das Immunsystem an der Pathogenese der AMD beteiligt ist. Dies betrifft zum einen das Komplementsystem, dessen erbliche Defekte einen erheblichen Risikofaktor für die Entstehung der AMD darstellen. Zum anderen hat sich gezeigt, dass sich an den Läsionsstellen eine erhöhte Anzahl von Immunzellen befindet und dass eine vermehrte Produktion von Entzündungsmarkern stattfindet. Solange die Blut-Retina-Schranke noch intakt ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den beteiligten Immunzellen um residente Mikroglia-Zellen handelt. Mikroglia, die immunkompetenten Zellen des ZNS, sind an pathologischen Prozessen der choroidalen Neovaskularisation (CNV) bei der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) beteiligt. Allerdings gibt es nur begrenzte Kenntnisse über ihre spezifische Rolle bei dieser Erkrankung.

Das Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, die Rolle der Mikroglia-Zellen im alternden Auge sowie bei der Entstehung und dem Fortschreiten der AMD zu untersuchen. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit sollen anhand der laser-induzierte choroidale Neovaskularisation im Tiermodell bei Mäusen durchgeführt werden. Es soll untersucht werden, ob und inwieweit sich durch immunmodulierende Substanzen die Größe der Laserherde, die Migration der Mikroglia-Zellen zu den Laserherden, die Größe der Mikroglia-Areale und das Ausmaß der Neovaskularisation eindämmen lässt. Ebenso soll untersucht werden, ob die immunmodulierende Substanzen einen Einfluss auf die Genexpression von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und die Produktion anderer Signalmoleküle der Mikroglia-Zellen haben. Die Auswirkungen auf das Auge sollen durch immunhistologische Färbungen, die in-vivo-Bildgebung und RT-PCR bestimmt werden.

3. Material

3.1. Geräte

Tab. 3.01.: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Argonlaser	OcuLightGL	IRIS Medical
Brutschrank	INB 200	Memmert
Einbettstation	Histostar	Thermo Scientific
Feinwaage	PCB	Kern
Feinwaage	ACS 120-4	Kern
Flockeneisbereiter	AF 80	Scotsman
Heizplatte	HP-3	Kunz Instruments
Homogenisator	Polytron PT 1200 E	Kinematica
Kryotom	CryoStar NX70	Thermo Scientific
Kühlschrank	KGN36XW31	Bosch
Kühlschrank	SN-ST	Liebherr
Mikroskop	EVOS fl	AMG
Mikrotome	HM 355S	Thermo Scientific
Pipetten	Research plus	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus junior	Hirschmann
Retina Angiograph	HRA 2	Heidelberg Engineering
Rotator	2-1175	neolab
RT-PCR Gerät	CFX96	Bio Rad
Schwebewanne	HIR-3	Kunz Instruments
Sicherheitswerkbank	Airone PCR-640	Safelabs Systems
Spektralphotometer	Nano Drop 2000c	Thermo Scientific
Stereomikroskop	M165 C	Leica
Thermocycler	peqStar	peqlab
Ultraschallbad	S 30	Elmasonic
Ultra-Tiefkühlschrank	MDF-193-PE	Panasonic
Vortexmischer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasseraufbereitungssystem	USF Purelab plus UV/UF	Labexchange
Zentrifuge	Sprout	Heathrow Scientific
Zentrifuge	5417R	Eppendorf

3.2. Verbrauchsmaterial

Tab. 3.02.: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Zusatzbezeichnung	Hersteller
10 µl Spritze	901 N	Hamilton
100 µl Spritze	710 NR	Hamilton
Bechergläser	800 ml, 1000 ml	chemoLine
Deckgläschen	13 mm	StarFrost
Einbettformen	verschiedene Größen	Fisher Scientific
Einbettkassetten	5253002	Marienfeld-Superior
Glasflaschen	250 ml, 500 ml, 1000 ml	Fisherbrand
Mauskäfige	Einzelbelüftete IVC Käfige	Sealsafe
Mikrotiterplatten	HSP 9601	Bio-Rad
Nitrile Handschuhe	verschiedene Größen	Braun
Objekträger	adhäsive	StarFrost
Pipettenspitzen	2,5 µl, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt
Polypropylen-Röhrchen	15 ml, 50 ml	Thermo scientific
QiaShredder Spin Column	2 ml	Qiagen
qPCR Folien	AB-1170	Thermo scientific
Reaktionsgefäße	1,5 ml; 2 ml	Eppendorf/Sarstedt
RNeasy Mini Spin Column	2 ml	Qiagen
Stabpipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Costar

3.3. Chemikalien und Reagenzien

Tab. 3.03.: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
BSA	Sigma
destilliertes Wasser	AppliChem
Ethanol	AppliChem
Fluoreszein	Alcon
Formaldehyd 37%	Roth
Gefrierschnittmedium NEG-50	Richard-Allan Scientific
Hydrocortison	Sigma
Indocyaningrün	Pfaltz & Bauer
Methanol	Emsure
Methocel 2%	OmniVision
Minocyclin	Sigma
Mydriaticum	Stulln UD
Neosynephrin-POS 5%	Ursapharm
Novesine 0,4 %	OmniVision
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
PBS	life technologies
PBS-Tabletten	Gibco
Power Block	BioGenex
RGDS	Sigma
RNase-freie DNase I	Qiagen
RNase-freies Wasser	Qiagen
TaqMan Gene Expression Mastermix	life technologies
TKP	JPT
Viscotears	Novartis
Xylol	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

3.4. Puffer und Lösungen

Tab. 3.04.: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Citratpuffer (pH 6,0)	4,5 ml Zitronensäure; 20,5 ml Na-Citrat; 225 ml Aqua dest
DNase I Lösung	10 µl Dnase I in 70 µl RDD-Puffer
Fluorescein	10%ige Lösung von ALCON
Formalin 4%	Formaldehyd 37% in PBS
Ketamin 10%	1 ml Xylazin in 10 ml Ketaminhydrochlorid
Lysepuffer	10 µl β-Mercaptoethanol in 1 ml RLT-Puffer
Na-Citrat (0,1 M)	Citrat Trisodiumsalz (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x H ₂ O) 7,35 g Na-Citrat in 250 ml Aqua dest
Novesine	4mg/ml Oxybuprocainhydrochlorid von OmniVision
Paraformaldehydlösung	8% PFA in PBS; pH 7,4
PBS pH 7,4 0,05 M	14,03 g NaCl; 2,76 g NaH ₂ PO ₄ ; 10,88 g K ₂ HPO ₄ ; Thimerosal; 500 ml Aqua dest
RPE-Waschpuffer	44 ml 100% Ethanol in 11 ml RPE-Pufferkonzentrat
Waschpuffer	RW1-Puffer von Qiagen
Zitronensäure (0,1 M)	Citratmonohydrat (C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O) 5,25 g Citrat in 250 ml Aqua dest

3.5. Kits

Sämtliche Kits wurden ausschließlich mit den mitgelieferten Lösungen und Puffern sowie nach beiliegenden Protokollen benutzt.

Tab. 3.05.: Übersicht über die verwendeten Kits

Bezeichnung	Hersteller
Illumina Indexing Primer Set	Clontech
iScript cDNA Synthese Kit	Bio-Rad
QIAshredder	Qiagen
Rnase-Free Dnase Set	Qiagen
Rneasy Mini Kit	Qiagen

3.6. Primer

Tab. 3.06.: Übersicht über die für die RT-PCR-Amplifikationen verwendeten Primer

Gen	Bestellnummer	Firma
CCL-2	Mm00441242_m1	life technologies
FGF-2	Mm00433287_m1	life technologies
GAPDH	Mm99999915_S1	life technologies
P2rx4	Mm00501787_m1	life technologies
PDGF-β	Mm00440677_m1	life technologies
PECAM-1	Mm01242584_m1	life technologies
TGF-β1	Mm01178820_m1	life technologies
VEGF-α	Mm01281449_m1	life technologies
β-Actin	Mm02619580_g1	life technologies

3.7. Antikörper

Tab. 3.07.: Übersicht über die verwendeten unkonjugierten Antikörper

Spezifität	Anwendung/Verdünnung	Herkunft	Hersteller
PDGF-β	ICC 1:50	rabbit	Santa Cruz
FGF-2	ICC 1:200	goat	Santa Cruz
TGF-β1	ICC 1:200	rabbit	Santa Cruz
VEGF	ICC 1:25	rabbit	abcam
CD 11b	ICC 1:100	rat	Serotec
P2x4	ICC 1:10	goat	Santa Cruz

Tab. 3.08.: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper

Spezifität	Anwendung/Verdünnung	Hersteller
donkey anti goat-594	ICC -intra 1:200	life technologies
donkey anti goat-Cy3	ICC -intra 1:200	abcam
goat anti rabbit-Cy3	ICC -intra 1:200	life technologies
goat anti rat-488	ICC -intra 1:200	life technologies

3.8. Computerprogramme

Tab. 3.09.: Übersicht über die verwendeten Computerprogramme

Programm	Hersteller
Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems Incorporated
EndNote X1	Thomson ResearchSoft
Excel	Microsoft Corporation
Heidelberg Eye Explorer	Heidelberg Engineering
Prism 6	Graph Pad Software

3.9. Versuchstiere

Es wurden 8-12 Wochen alte C57BL/6J- und CX3CR1^{GFP/+}-Mäuse für die Experimente verwendet. Alle Tiere wuchsen unter IVC-Bedingungen auf. Futter und Wasser war den Tieren frei zugänglich. Der Tag-Nacht Rhythmus war 12 h/12 h. Die Experimente folgten dem Tierethikverfahren und wurden von der Ethikkommission genehmigt. Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit der ARVO-Erklärung für die Nutzung von Tieren in der Augenheilkunde, Sehforschung und der EU-Richtlinie 2010/63/EU durchgeführt.

3.10. Wirkstoffe zur Inhibition der Mikroglia

3.10.1. Minocyclin

Minocyclin ist ein halbsynthetisches Tetracyclin-Derivat, welches vor allem als Antibiotikum bei Hautkrankheiten Verwendung findet. Es ist in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Yong, 2004). Minocyclin hat eine anti-inflammatorische und eine durch die Inhibition der Mikroglia-Aktivität neuroprotektive Wirkung. Diese neuroprotektive Wirkung zeigt sich in Versuchsmodellen wie beispielsweise dem ischämischen Schlaganfall (Yrjänheikki., 1998), Multiple Sklerose (Brundula, 2002), Rückenmarksverletzung (Stirling, 2004), Morbus Parkinson (Wu, 2002), Huntington-Krankheit (Chen, 2000), amyotrophe Lateralsklerose (Zhu, 2002), und dem osmotischen Demyelinisierungs-Syndrom (Suzuki, 2010).

3.10.2. TKP

TKP ist ein Tripeptid aus den Aminosäuren Threonin, Lysin und Prolin. Es entsteht während der Bildung von Immunglobulin G und kann die Aktivierung von Zellen monozytären Ursprungs hemmen, einschließlich der Mikroglia-Zellen (Auriault, 1983).

3.10.3. RGDS

RGDS ist ein synthetisches Tetrapeptid aus den Aminosäuren Arginin, Glycin, Asparaginsäure und Serin. RGDS ist auf Fibronectin, Fibrinogen- α und von Willebrand Faktor, nicht jedoch auf Vitronectin oder Kollagen zu finden.

3.10.4. Cortisol

Das natürliche Glucocorticoid Cortisol zeigt anti-inflammatorische und immunsuppressive Wirkungen. Es muss untersucht werden, inwieweit es für die Inhibition der Mikroglia verwendet werden kann.

4. Methoden

4.1. Model der laserinduzierten CNV

Die Mäuse wurden zu Beginn durch eine intraperitoneale Injektion einer Mischung aus 130 mg/kg Ketamin und 2,7 mg/kg Xylazin narkotisiert (Tabelle 3.11). Die Pupillen der Tiere wurden mit Neosynephrin 5 % und Mydriaticum 1 % dilatiert und die Augen mit Novesine 0,4 % lokal narkotisiert. Die Mäuse wurden danach vor eine Spaltlampe gelegt und beide Augen mit einem Argonlaser (532 nm) behandelt. Durch den Laserpuls (160 mW, 100 ms und 75 µm Durchmesser) wurde mit einem aufgelegten Objektträger mit Methocel 2 % im Augenhintergrund das RPE zerstört. Diese sogenannten „Laserherde“ wurden um den Sehnervkopf zwischen den großen Blutgefäßen platziert. Pro Auge wurden 4-6 Laserherde gesetzt.

Tab. 4.01.: Übersicht über die injizierte Menge des Anästhetikums

Gewicht [g]	Ketamin/Xylazin
4	5
6	7
8	10
10	13
12	15
14	18
16	21
18	23
20	26
22	30
24	32
26	35
28	39
30	42
32	45
34	49
36	52
38	55

4.2. Gruppierung und Behandlung

Unmittelbar nach der Laserbehandlung wurden den Tieren die verschiedenen Mikroglia-inhibierenden Wirkstoffe einmalig intravitreal injiziert. Jeweils 2 µl der Substanzen wurden bei einer Konzentration von 1 mg/ml pro Auge injiziert. Die Kontrolltiere wurden mit PBS behandelt. Bei der Injektion wurde mit einer 30-Gauge-Nadel eine 1 mm große Apertur hinter dem superotemporalen Limbus erzeugt. Dann wurde eine stumpfe 32-Gauge-Nadel durch diese Öffnung eingeführt und die Mikroglia-hemmenden Substanzen oder PBS langsam injiziert. Die Nadel verblieb für

weitere 3-4 Sekunden im Inneren des Auges um einen Rückfluss zu minimieren und für die Diffusion der Flüssigkeit zu sorgen. Neben der intravitrealen Injektion wurden die Substanzen auch in Form von Augentropfen verabreicht. Dabei wurden die Tiere direkt nach der Laserbehandlung und im Anschluss jeden 2. Tag behandelt. Nach dem Eingriff wurden die Augen der Versuchstiere mit Viscotears versorgt und die Tiere zurück in die Käfige gelegt.

Tab. 4.02.: Übersicht über die gemessenen C57BL/6J- und CX3CR1^{GFP/+}-Mäuse

injizierte Substanzen	Versuchstiere
PBS	179-2
	207-1
	213-1
	252-1
	253-4
	302-4
	306-5
	213-2
Minocyclin	214-1
	214-2
	302-1
	302-2
	302-3
	211-2
TKP	253-1
	253-2
	253-3
	254-1
	254-2
	306-1
	306-2
	306-3
PBS topisch	304-1
	304-2
	304-3
Minocyclin topisch	303-1
	303-2
	303-3
TKP topisch	305-1
	305-2
	305-3

4.3. *in-vivo*-Bildgebung

Während der gesamten Versuchsdauer wurden der Gesamtzustand des Auges und insbesondere des hinteren Augenabschnitts (Retina, RPE, Aderhaut) überwacht und charakterisiert. Vor den *in-vivo*-Untersuchungen, die 2, 4 und 7 Tage nach der Laserbehandlung durchgeführt wurden, wurden die Tiere narkotisiert und die Pupillen, wie in 4.1. beschrieben, vorbehandelt. Die Versuchstiere wurden vor die Linse des Retina Angiograph der Firma Heidelberg Engineering positioniert und die *in-vivo*-Bildgebung erfolgte mittels Infrarot-Scanning Laser Ophthalmoskopie (IR-SLO) und Fluoreszenzangiographie (FA). Die Bilder wurden mit Hilfe des Computerprogramms Heidelberg Eye Explorer aufgenommen und gespeichert.

4.3.1. Scanning-Laser-Ophthalmoskopie

Webb und Hughes (1981; 1987) entwickelten die konfokale Scanning-Laser-Ophthalmoskopie, das optische Prinzip des Heidelberg Retina Angiographen. Der Augenhintergrund wird dabei punktweise mit einem monochromatischen Laserstrahl abgetastet und das von der Netzhaut reflektierte Licht mit Hilfe eines lichtempfindlichen Detektors an jedem Punkt registriert. Das Laserlicht läuft zunächst durch einen Modulator, über den die Beleuchtungsintensität gesteuert werden kann. Das Licht wird mit Hilfe von zwei Spiegeln (x-y-Ablenkung) auf den Fundus gelenkt. Für die schnelle horizontale Ablenkung wird ein Polygonspiegel und für die langsamere vertikale Ablenkung ein oszillierender Planspiegel verwendet. Das Drehzentrum für Ablenkung und Abtastbewegung liegt in der Pupille (Jean, 1990; Plesch, 1986; Webb, 1987). Das emittierte Fluoreszenzlicht passiert erneut die beiden Spiegel und erreicht durch eine Blende, die nur reflektiertes Licht einer konfokalen Ebene scharf abbildet, einen lichtempfindlichen Detektor. Auf diese Weise kann die reflektierte Lichtmenge einzelnen Netzhautpunkten zugeordnet werden und es entsteht ein Analogsignal auf einem Monitor. Das Bild kann abgespeichert und digital verarbeitet werden.

4.3.2. Fluoreszenzangiographie

Bei Fluoreszenzangiographie-Aufnahmen (FA) wird Natriumfluoreszein, ein wasserlöslicher Farbstoff, intraperitoneal appliziert. Der Farbstoff breitet sich mit dem Blut im Organismus aus. Da das Absorptionsspektrum zwischen 465-490 nm liegt, wird durch einen Festkörperlaser blaues Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm zur Anregung des Farbstoffes generiert. Das Emissionsspektrum liegt

zwischen 520 und 530 nm. Ein Sperrfilter von 500 nm sorgt demnach für die Darstellung des emittierten langwelligeren Lichtes und lässt hier nur grünes Licht entsprechend einer Wellenlänge von 520-530 nm durch (Lang, 2008). Somit wird der Durch- und Abfluss des Farbstoffes am Augenhintergrund aufgenommen und elektronisch gespeichert.

Der ICG-Farbstoff ist ein wasserlösliches Tricarbocyaninfarbstoff, welches als fluoreszierender Farbstoff in vielen unterschiedlichen medizinischen Disziplinen zur Darstellung von Gefäßen, Geweben und zur Beurteilung der Perfusion von Organen angewandt wird. Das Absorptionsspektrum und das Emissionsspektrum liegen im Infrarotbereich (Absorptionsspektrum: 790-805 nm, Emissionsspektrum: 825-835 nm). Er wird mit einem Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 790 nm angeregt. Zur Trennung des angeregten Lichtes vom emittierten Fluoreszenzlicht wird ein Sperrfilter von 830 nm verwendet. Die ICG-Angiographie ist besonders gut zur Untersuchung der Aderhautzirkulation geeignet (Lang, 2008).

4.4. Auswertungsmethode der *in-vivo*-Bildgebung

Die Mikroglia-Migration zu den Laserherden wurde 2, 4 und 7 Tage nach der Laserbehandlung mit Hilfe von CX3CR1^{GFP/+}-Mäusen untersucht. Die gespeicherten Bilder wurden mit Adobe Photoshop CS6 analysiert. Zunächst wurden die Bilder in Grauwerte umgewandelt und das Infrarotbild und Fluoreszenzbild überlagert. Als nächstes wurden der Bereich des Laserherdes im Infrarotbild und als Referenzwert ein genauso großer Bereich nahe des Laserherdes ausgewählt. Die eingegrenzten Bereiche wurden auf das Fluoreszenzbild übertragen. Da CX3CR1^{GFP/+}-Mäuse, bei denen retinale Mikroglia-Zellen das gekoppelte GFP exprimieren, verwendet wurden, konnte die mittlere Fluoreszenzintensität des GFP gemessen werden, was ein Maß für die Anzahl der im gewählten Bereich anwesenden Mikroglia-Zellen war. Der Referenzwert diente dabei als Kontrolle (Abbildung 4.01). Um das Ausmaß der CNV zu bestimmen, wurden die Bilder der ICG-Angiographie verwendet. Dabei wurde ebenfalls die mittlere Fluoreszenzintensität von dem Bereich des Laserherdes und eines Referenzbereiches gemessen (siehe 5.2).

4.4.1. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde unter Verwendung des Statistikprogramms Prism 6 und des nichtparametrischen *one-way analysis of variance* (ANOVA, Kruskal-Wallis-Test) durchgeführt. Beim Vergleich der Daten der Kontrollgruppe zu den

medikamentös-behandelten Gruppen wurde ein Niveau von $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

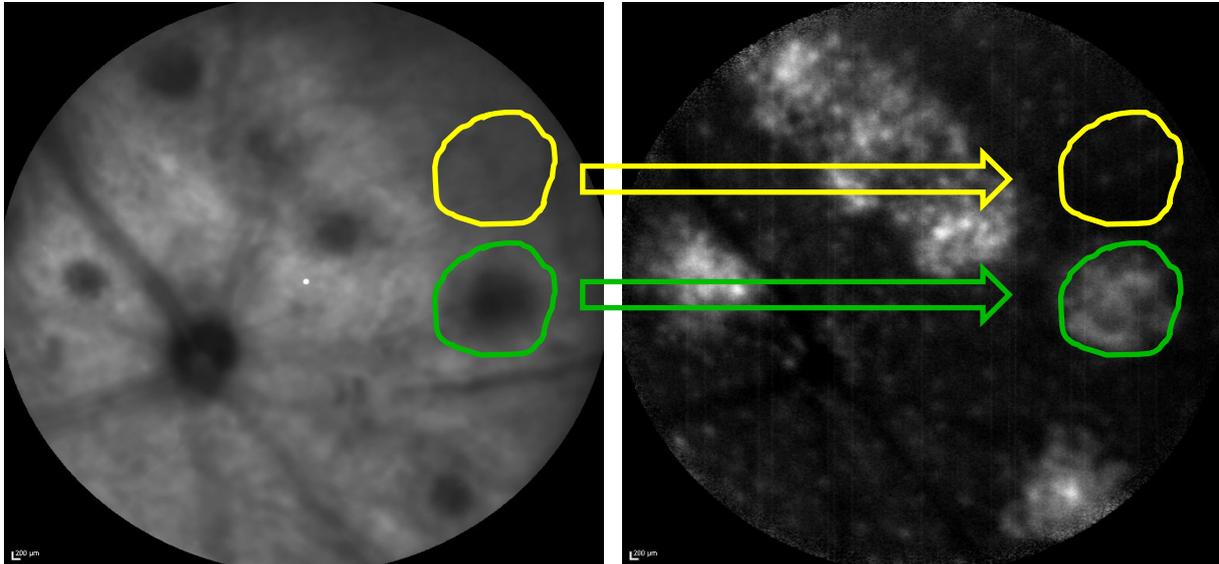


Abbildung 4.01: Auswertung der Mikroglia-Migration zu den Laserherden

Die Region des Laserherdes wurde im IR-Bild umschlossen (links, grün) und am Laserherd anliegend eine Region als Referenz ausgewählt (links, gelb). Die ausgewählten Bereiche wurden in das Fluoreszenzbild übertragen (rechts) und die Helligkeitsverhältnisse zwischen den Bereichen bestimmt

4.5. Retina-Präparation

Zur Entnahme der Augen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Bulbi nach Durchtrennung der äußeren Augenmuskulatur und des *Nervus opticus* entnommen. Die Freipräparation der Retina erfolgte unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops in PBS-Lösung. Mit Hilfe einer Mikroschere wurde an der Grenze zwischen Kornea und Sklera eine Inzision gesetzt und danach entlang der *Ora serrata* geschnitten, um die Kornea, Linse und Glaskörper zu entfernen. Durch die Verwendung einer in der Spitze leicht gebogenen Pinzette wurde die gesamte Retina von Sklera und retinalem Pigmentepithel getrennt und in ein mit Lysepuffer gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Die Netzhäute konnten bei -80°C zwischengelagert werden.

4.6. RNA-Extraktion

Zur Isolierung der gesamt RNA aus der Retina wurde das RNeasy Mini Kit von QIAGEN verwendet. Die Eppendorfgefäße mit der Retina, die mit 350 µl Lysepuffer aufgefüllt wurden, tauten auf Eis auf. Die nachfolgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Das Gemisch wurde mit einem Homogenisator für 30 sek homogenisiert, in ein *Qiashreder Spin Column* pipettiert und für 2 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Vor jeder Probe wurde der Homogenisator mit 70% Ethanol und Aqua dest. gespült. Der Überstand wurde abgenommen und das erhaltene Lysat wurde mit 70% Ethanol gemischt. Der Ansatz wurde dann auf eine RNeasy Säule, die in ein 2 ml Reaktionsgefäß gestellt wurde, gegeben und für 15 sek bei 12.000 RPM zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 15 sek bei 12.000 RPM und nach Verwerfen des Durchflusses wurden 10 µl DNase mit 70 µl RDD-Puffer vermischt, auf die Säulenmembran gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Die Inkubation wurde mit 350 µl RW1-Puffer gestoppt. Nach erneuter Zentrifugation für 15 sek bei 12.000 RPM wurde der Durchfluss verworfen und zum Waschen 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und wieder für 15 sek bei 12.000 RPM zentrifugiert. Danach wurden 500 µl 80% Ethanol auf die Membran pipettiert und für 2 min bei 12.000 RPM zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt bevor die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt wurde und zur Elution 30 µl RNase-freies H₂O direkt auf die Säulenmembran gegeben wurde. Zum Schluss wurde die Säule für 1 min bei 16.000 RPM zentrifugiert. Das Eluat befand sich nun im Reaktionsgefäß und die RNA-Konzentration konnte anhand der optischen Dichte gemessen werden.

4.7. Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Um die Konzentration der RNA photometrisch zu bestimmen, wurde das Spektralphotometer Nano Drop 2000c der Firma Thermo Scientific verwendet. Dabei konnte die Extinktion der RNA bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm aufgrund der aromatischen Basen bestimmt werden. Bei einem Wert von 1 bei der Extinktion entspricht dieser Wert einer Konzentration der RNA von 50 µg/ml. Die anderen beiden Extinktionswerte von 280 nm und 320 nm ließen Aussagen über die Reinheit der RNA zu. Bei einer Wellenlänge von 280 nm konnten Proteinverunreinigungen und bei 320 nm Salzverunreinigungen festgestellt werden. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte bei einer sauberen Nukleinsäurepräparation zwischen 1,9 - 2,0 liegen,

wohingegen der Extinktionswert bei 320 nm kleiner als 0,01 sein sollte (Green M, Sambrook J, 2012).

4.8. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die zuvor extrahierte Gesamt-RNA ist ein Gemisch aus ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA) und nur zu 2% *messenger* RNA (mRNA). Um die RNA in der Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) einsetzen zu können, muss sie zunächst in komplementäre DNA, sogenannte *complementary* DNA (cDNA), umgeschrieben werden. Da die cDNA in dieser Arbeit als Ausgangsmaterial in einer RT-PCR eingesetzt werden sollte und somit die anschließende Amplifikationsrate sehr hoch war, reichte die Gesamt-RNA trotz ihres geringen Anteils an mRNA aus. Die gewonnene Gesamt-RNA wurde zur Synthese der cDNA mittels des *iScript cDNA Synthese Kit* von Bio-Rad verwendet. Auf Eis wurden die in Tabelle 4.03. aufgelisteten Komponenten in ein 0,2 ml PCR-Gefäße pipettiert:

Tab. 4.03.: Übersicht über den Reaktionsansatz einer PCR

Menge (in μ l)	Komponenten
15 μ l	500 ng Gesamt-RNA + dH ₂ O
4 μ l	5x iScript select reaction mix
1	iScript reverse transcriptase
20 μ l	Gesamt

Mit Hilfe des Thermozyklers *peqStar* von peqlab wurden die Proben zunächst für 5 min bei 25°C inkubiert, um die reverse Transkriptase zu aktivieren. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt für 30 min bei 42°C, um die Anlagerung der Primer zu ermöglichen. Zur Hitze-Inaktivierung der reversen Transkriptase wurden die Proben für 5 min bei 85°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente eine zusätzliche Probe ohne die Zugabe der reversen Transkriptase. Abschließend wurden die Proben 1:5 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

4.9. RT-PCR

Die PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) ist eine Methode, um die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten zu ermöglichen. Dabei dient ein Teil der DNA als Vorlage. Dieser wird begrenzt durch die beiden Oligonukleotide (Primer), die als Startpunkte für die DNA-Synthese dienen. Mit Hilfe von thermostabilen Polymerasen und

Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) wird das begrenzte DNA-Fragment amplifiziert (Mullis, Faloona et al. 1986). Die Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Region beruht auf einem mehrfach wiederholten Zyklus aus drei Einzelschritten: Denaturierung, Anlagerung (Annealing) und Verlängerung (Elongation). Unter optimalen Bedingungen würde sich die Anzahl an DNA-Molekülen pro Zyklus verdoppeln.

Eine Methode, die ermöglicht, die Anzahl der gebildeten DNA-Moleküle schon während der Reaktion zu erfassen, stellt die sogenannte quantitative real-time PCR dar. Das Prinzip beruht auf der Kombination eines PCR-Geräts mit Fluoreszenz-Detektion mit spezifischem Oligonukleotid und Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Zusätzlich zu den beiden Primern einer klassischen PCR wird ein drittes, als Sonde bezeichnetes sequenzspezifisches Oligonukleotid verwendet (Abbildung 4.02). Die Sonde wird so gewählt, dass sie zwischen den beiden Primern hybridisiert und am 3'-Ende mit einer Phosphatgruppe blockiert ist, um zu verhindern, dass sie selbst durch die Polymerase verlängert wird. Am 5'-Ende der Sonde ist ein Fluorochrom 1, der sogenannte Reporter, am 3'-Ende ein Fluorochrom 2, der sogenannte Quencher gekoppelt.

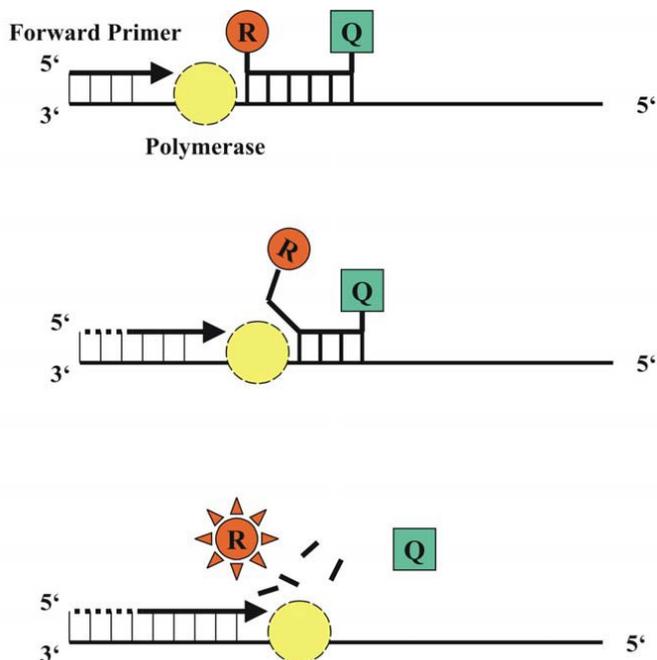


Abbildung 4.02: Prinzip der Real-time PCR

R: reporter, Q: quencher. (nach Bustin 2000)

Wird der Fluoreszenzfarbstoff 1 mit der Wellenlänge A1 angeregt, emittiert er Energie in Form von Licht der Wellenlänge E1. Durch die räumliche Nähe der beiden Fluorochrome zueinander wird diese jedoch direkt an das zweite Fluorochrom weitergegeben, das, dadurch angeregt, seinerseits Licht der Wellenlänge E2 abstrahlt. Befindet sich im PCR-Ansatz DNA der gesuchten Sequenz, so binden sowohl die spezifischen Primer als auch die Sonde, und die Polymerase beginnt die Primer zu verlängern. Hierbei stößt sie auf die ebenfalls gebundene fluoreszenzmarkierte Sonde. Da die Taq-Polymerase neben der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität über eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität verfügt, beginnt sie die Sonde abzubauen, so dass das Reporter- und das Quencher-Molekül räumlich voneinander getrennt werden. Nach Anregung durch Licht der Wellenlänge A1 wird nun durch den Reporter Licht der Wellenlänge E1 frei, welches durch die optische Detektionseinheit des PCR-Geräts gemessen wird (Abbildung 4.01) (Bustin, 2000).

Für die quantitative real-time PCR wurde die aus 4.7 gewonnene cDNA verwendet. Der Reaktionsansatz für die RT-PCR wurde entsprechend der Angaben in Tabelle 4.04 zusammengesetzt und mit Hilfe des *CFX96 RT-PCR Detection Systems* der Firma Bio-Rad, wie in Tabelle 4.05 beschrieben, durchgeführt. Als Negativkontrolle diente die Negativkontrolle der cDNA-Synthese. Für die Untersuchung der Expression verschiedener proangiogener und proinflammatorischer Gene wurden bereits beschriebene Primer und Sonden für diese Gene und die *housekeeping* Gene bei der Firma life technologies bestellt. Als Referenzgene (*housekeeping genes*) bezeichnet man Gene, die ubiquitär synthetisiert werden, da sie zum Überleben der Zellen notwendig sind und konstant exprimiert werden. Für diese Arbeit wurden β -Actin und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgene ausgewählt (Livak, 2001).

Tab. 4.04.: Übersicht über den Reaktionsansatz der RT-PCR

Menge (in μ l)	Komponenten
3 μ l	15 ng cDNA
7,5 μ l	TaqMan Gene Expression Mastermix
0,75 μ l	Primer
3,75 μ l	dH ₂ O
15 μ l	Gesamt

Tab. 4.05.: Übersicht über den Ablauf der PCR

Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
50°C	2 min	1 x
95°C	10 min	1 x
95°C	15 sek	40x
60°C	1 min	
4°C	∞	

4.10. Relative Quantifizierung

Ein Ziel dieser Arbeit war einen möglichen quantitativen Unterschied in der Expression bestimmter Gene festzustellen. Mit Hilfe der Delta- C_t -Methode wurde die Expression eines Zielgens auf die Expression eines nicht regulierten, konstant exprimierten Referenzgens (housekeeping gene) bezogen. Zur besseren Kontrolle wurden 2 Referenzgene verwendet und der Mittelwert beider für die Berechnung eingesetzt. Die Delta- C_t Werte der unterschiedlich behandelten Gruppen wurden anschließend in die Formel $2^{-\Delta C_t}$ eingesetzt (Abbildung 4.03) und mit den resultierten Werten und Excel wurden Diagramme angefertigt (Livak, 2001; Schmittgen, 2008).

$$\Delta C_t = C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ Referenzgen}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta C_t}$$

Abbildung 4.03: Delta- C_t -Methode zur relativen Quantifizierung

Der C_t -Wert (Cycle of threshold) ist definiert als der Zeitpunkt bzw. dem Zyklus der PCR, wenn sich das Fluoreszenzsignal deutlich von der Hintergrundstrahlung abhebt. Die Threshold-Werte für jedes Gen wurden zu Beginn der Messungen festgelegt und als fester Wert für weitere Untersuchungen definiert (Livak, 2001; Schmittgen, 2008).

4.11. Next-Generation-Sequencing

In den letzten Jahren sind Methoden zur DNA-Sequenzierung aufgekommen, mit denen Sequenzen bis zu 100-mal schneller und wesentlich preiswerter generiert werden können als die Sequenzierung durch Sanger. Diese Methoden werden unter

dem Sammelbegriff des „Next Generation Sequencing“ (NGS) zusammengefasst. Die Herangehensweise bei den unterschiedlichen NGS-Methoden ist teilweise sehr verschieden. Jedoch gibt es aber zwei Gemeinsamkeiten, durch die sie sich vom Sanger-Sequencing unterscheiden. Beim NGS wird keine Klonierung *in vivo* durchgeführt. Dieses ist beim Sanger-Sequenzieren unerlässlich für die Vereinzelung der Klone und stellt einen materiellen und zeitlichen Engpass dar. Bei den unterschiedlichen NGS-Methoden wird diese Klonierung bzw. Vereinzelung *in vitro* durchgeführt oder erst gar nicht benötigt (single molecular sequencing). Außerdem wird beim NGS im Gegensatz zum Sanger-Sequencing das Sequenzieren selber, also der Vorgang des Nukleotideinbaus, analysiert und ausgewertet.

Die RNA-Proben wurden in der Core Facility Genomik für Hochdurchsatzgenetik und -genomik der Medizinischen Fakultät Münster untersucht. Die Primärdaten wurden freundlicherweise von Dr. Grassmann ausgewertet und die 22.000 Gene und ihre Varianzen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen in Exceltabellen dargestellt.

4.12. Paraffin-Histologie

4.12.1. Formalin-Fixierung

Der Tod der Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation. Die Augen wurden entnommen und in 2 ml Reaktionsgefäßen mit wässriger Formalinlösung mit 4 % Formaldehyd für 24 Stunden fixiert.

4.12.2. Paraffineinbettung

Die Paraffineinbettung betrug 4 Tage. Die Augen wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in dem Intermediärmedium Xylol inkubiert und in Paraffin eingebettet:

Tag	Substanz	Wiederholungen
1	Ethanol, 70%, in aqua dest.	3 x
2	Ethanol, 70%, in aqua dest.	1 x 30 min
	Ethanol, 80%, in aqua dest.	3 x 30 min
	Ethanol, 90%, in aqua dest.	2 x 30 min
	Ethanol, 96%, in aqua dest.	2 x 30 min
	Ethanol, 100%, in aqua dest.	3 x 30 min
3	Xylol	3 x 2 Std
	Paraffin	ün
4	Paraffin	1 x 1 Std

Danach wurden die Augen in Paraffin eingebettet und bei 4°C gelagert.

4.12.3. Schnitte-Anfertigung

Zum Anfertigen der Schnitte wurde das HM 355S Mikrotom verwendet. Die Paraffinblöcke wurden in die vorgesehene Halterung gespannt und Schnitte mit einer Dicke von 4 μm angefertigt. Die enthaltenen Schnitte wurden zuerst von einem Kaltwasserbad (ca. 20°C) aufgefangen und dann in einem Heisswasserbad (ca. 45°C) gestreckt, um glatt auf einem Objektträger aufgezo-gen werden zu können. Die aufgezo-genen Schnitte wurden auf einer Wärmeplatte für ca. 30 min getrocknet und konnten am nächsten Tag für histologische Untersuchungen verwendet werden.

4.13. Kryostat-Histologie

Der Tod der Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation. Die Augen wurden entnommen und in Einbettformen gefüllt mit Gefrierschnittmedium überführt. Direkt im Anschluss wurden die Augen in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren und bei -80°C zwischengelagert. Eine Fixierung der Augen vor dem Schneiden erfolgte bei dieser Methodik nicht. Mit dem Kryostaten wurden 10 μm dicke Schnitte angefertigt, auf einen Objektträger aufgezo-gen und getrocknet. Die Schnitte konnten bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

4.14. Immunhistologie

Mit Hilfe der Methode der Immunhistologie gelingt der Nachweis von Antigenen im Schnitt. Hierzu werden Antikörper eingesetzt, die spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichtet sein müssen und dadurch an diesen Strukturen im Schnitt haften. Bei der von uns verwendeten indirekten Methode erfolgt der Nachweis mit einem weiteren Antikörper, dem so genannten Sekundärantikörper. Dieser bindet an den ersten und ist selbst mit einem Marker versehen.

4.14.1. Immunhistochemie für Paraffinschnitte

Zu Beginn wurden die Paraffinschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Bei Xylol und Ethanol 100% wurden zwei Bäder von je 5 min, bei den weiteren Schritten ein Bad in dieser Reihenfolge durchgeführt: Xylol, Ethanol 100%, Ethanol 96%, Ethanol 90%, Ethanol 80%, Ethanol 70%, fließendes Leitungswasser, destilliertes Wasser (Lang, 2013). Durch die FFPE-Behandlung werden einige Epitope aufgrund der Quervernetzungen (Maskierung) von den zugehörigen Antikörpern nicht mehr erkannt. Zur Epitop-Demaskierung wurden die Paraffinschnitte 4 mal je 5 min in Citratpuffer gekocht (Shi, 2011). Am Ende der Prozedur verblieben die Schnitte zum Abkühlen für 10-15 min in der Lösung.

Zwischen allen nun folgenden Schritten wurden die Schnitte 3 mal 5 Minuten in PBS gewaschen. Um die endogene Peroxidase-Aktivität zu blocken, wurden die Paraffinschnitte für 6 min in einer Power Block Verdünnung Inkubiert. Nach weiteren Waschsritten in PBS wurden die Primärantikörper in verschiedenen Verdünnungen mit BSA auf die Schnitte aufgetragen und über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Jeder Objektträger beinhaltete eine Negativkontrolle, bei der nur BSA aufgetragen wurde. Am nächsten Tag erfolgten weitere Waschschrirte mit PBS und anschließend wurden die Paraffinschnitte für 1 Stunden mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Zellkerne zu markieren wurden die Objektträger für 8 min mit DAPI (*4',6-Diamidin-2-phenylindol*) gegengefärbt. Zum Schluss wurden die Schnitte gewaschen, getrocknet und mit einem wässrigen Eindeckmedium eingedeckelt. Bis zur Analyse der immunhistologischen Färbungen mit Hilfe des *EVOS fl* wurden die Objektträger bei 4°C gelagert.

4.14.2. Immunhistochemie für Kryoschnitte

Die tiefgefrorenen Schnitte wurden zunächst bei -20°C in Methanol fixiert, um eine zu starke Zersetzung des nativen Gewebes zu verhindern. Analog zu den Paraffinschnitten wurden die Kryoschnitte nach der Fixierung 3 mal 5 min in PBS gewaschen, der Peroxidaseblock zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität durchgeführte und die weiteren Schritte wie in 4.10.1 beschrieben vollzogen. Die Lagerung bis zur mikroskopischen Untersuchung erfolgte ebenfalls bei 4°C.

5. Ergebnisse

5.1. Migration der Mikroglia-Zellen nach der laserinduzierten CNV

Die Laserbehandlung dient als Modell für die neovaskuläre Form der AMD. Zunächst wurde die korrekte Ausführung dieser Methodik von meiner Person erlernt, bevor weitere Untersuchungen durchgeführt wurden. Bei dem Modell der laserinduzierten CNV wird mit einem Laserpuls (100 ms, 160 mW) an mehreren Stellen am Augenhintergrund das RPE zerstört. Die einzelnen „Laserherde“ haben einen Durchmesser von 75 μm . Dadurch beginnt ein Einwachsen von neuen Blutgefäßen aus der darunter liegenden Aderhaut in den subretinalen Raum, begleitet von einer Narbenbildung und Proliferation von umliegendem Gewebe.

Die Ergebnisse in Abbildung 5.01 zeigen das typische Aussehen der Laserherde im Infrarot-SLO-Bild (links). Für die Untersuchung der Migration der Mikroglia-Zellen zu den Bereichen der Laserherde wurden die bereits erwähnten $\text{CX3CR1}^{\text{GFP}/+}$ -Mäuse verwendet. Bei diesen Tieren wurde ein Allel des Fraktalkin-Rezeptor-Gens durch das Gen für das *green fluorescent protein* (GFP) ersetzt, so dass die Mikroglia-Zellen die grüne Autofluoreszenz des GFP aufweisen (rechts). Die Migration der Mikroglia-Zellen zu den Bereichen der Laserherde erreichte am Tag 4 ihr Maximum.

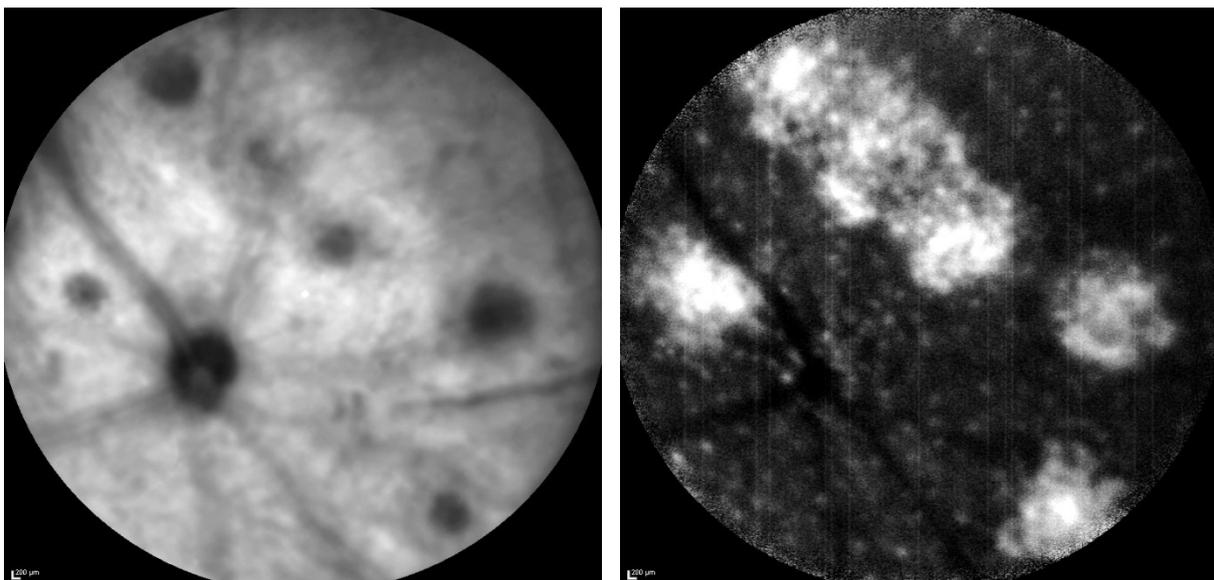


Abbildung 5.01: Infrarot-SLO-Bild einer laserbehandelten Retina (links) und die transiente Anreicherung von Mikroglia-Zellen im Autofluoreszenzbild (rechts)

Als weiteres *in-vivo*-Verfahren wurde die laserinduzierten choroidalen Neovaskularisation mit Hilfe der optische Kohärenztomographie (OCT) untersucht. Wie in Abbildung 5.02 zu sehen, ist der Verlust der retinalen Schichtung, insbesondere des RPE, zu erkennen.



Abbildung 5.02: OCT-Aufnahme eines Laserherdes (Pfeil)

Als eine zusätzliche Kontrolle, inwiefern die Positionierung der Laserherde gelungen war, wurden die Augen von laserbehandelten Mäusen entnommen und Paraffinschnitte angefertigt. In Abbildung 5.03 sind zwei Laserherde zu sehen (Pfeile), in denen das RPE und die Photorezeptoren fehlen. Stattdessen ist eine starke Proliferation z.T. pigmentierten Gewebes neben den Herden zu sehen (2 Wochen nach Laserbehandlung).

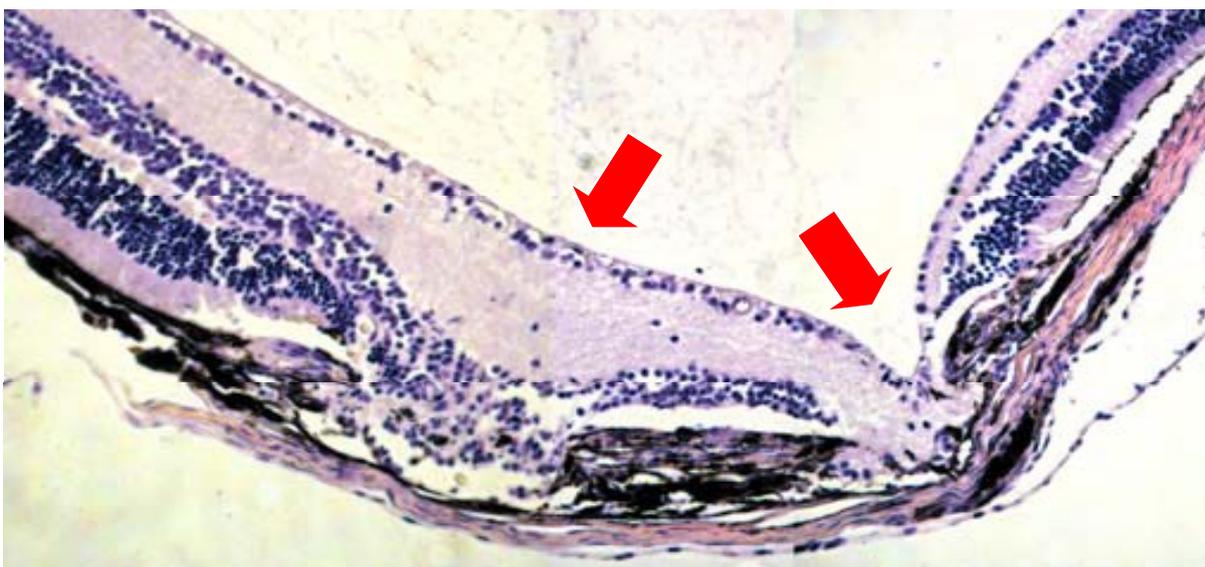


Abbildung 5.03: Hämatoxylin-Eosin-gefärbter Paraffin-Schnitt eines Mauseuges

Die Migration der Mikroglia-Zellen zu den Laserherden nach der laserinduzierten CNV sollte über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Bei den Ergebnissen in Abbildung 5.04 sind zu unterschiedlichen Zeitpunkten das Infrarotbild gegen das Fluoreszenzbild gestellt. 1 Stunde nach der Laserkoagulation wanderten die fluoreszierenden Mikroglia-Zellen in Richtung der Laserherde. Die höchste Akkumulation von fluoreszierenden Mikroglia-Zellen in den Laserherden wurde 4 Tage nach der Laserbehandlung gemessen. Danach nahm die Fluoreszenzintensität im Bereich der Laserherde langsam ab, jedoch konnte eine Ansammlung von fluoreszierenden Mikroglia-Zellen noch 5 Wochen nach der Laserbehandlung detektiert werden.

Ergebnisse

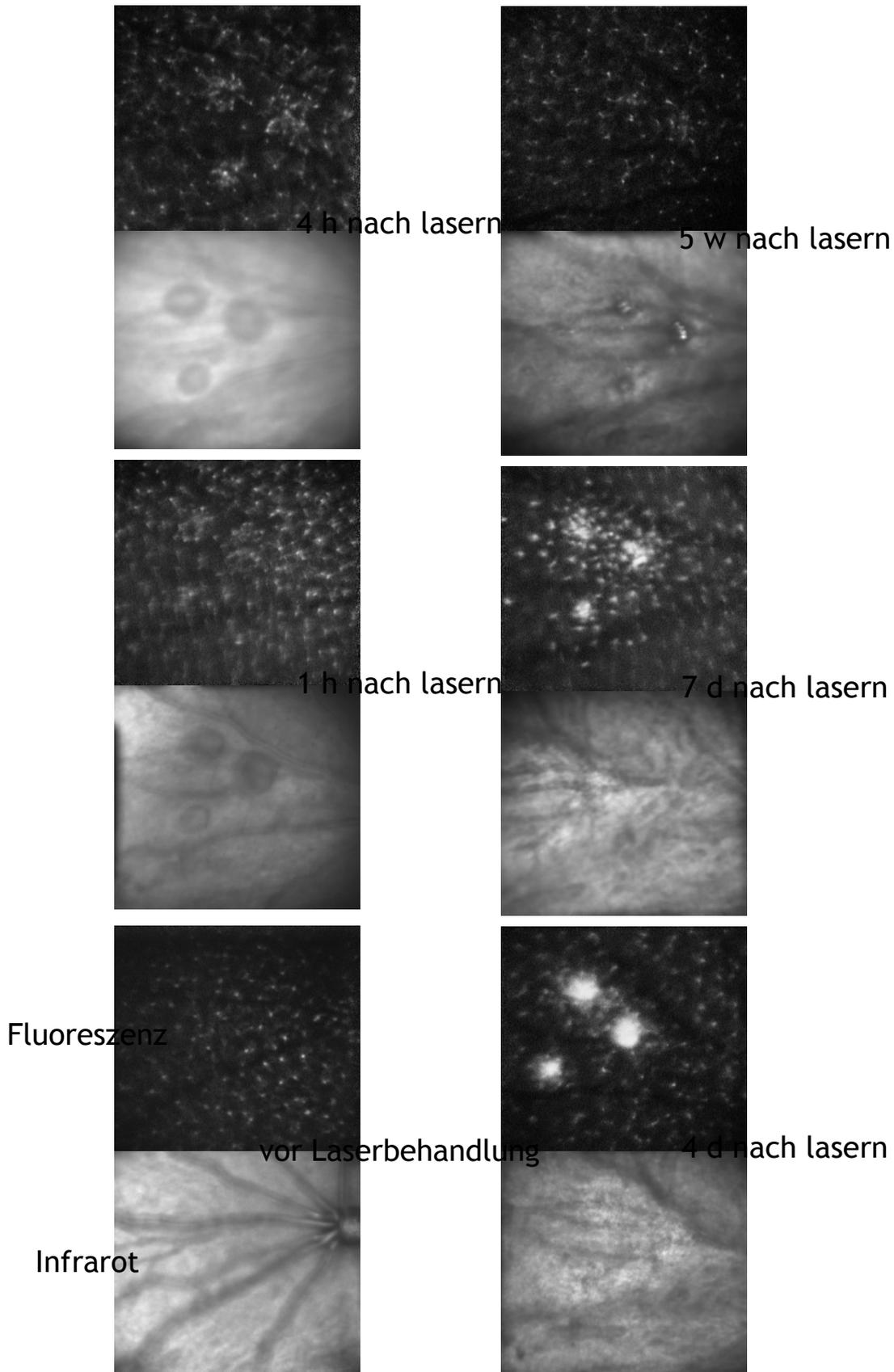


Abbildung 5.04: Transiente Anreicherung von Mikroglia-Zellen über einen längeren Untersuchungszeitraum (Eter, 2008)

5.2. Expression von proangiogenen Faktoren und purinergen Rezeptoren

Als ein Beispiel sollen die Ergebnisse von immunhistochemischen Doppelfärbungen gegen CD11b und den proangiogenen Faktor FGF-2 in Abbildung 5.05 dargestellt. Bei unbehandelten Augen konnte keine Co-Lokalisation zwischen CD11b exprimierenden Zellen und FGF-2 exprimierenden Zellen detektiert werden (nicht gezeigt). 4 Tage nach der Laserbehandlung exprimierten CD11b positive Mikroglia-Zellen auch FGF-2 (siehe Abbildung 5.05). Die Expression von proangiogenen Faktoren der Mikroglia-Zellen war an Tag 4 nach der Laserbehandlung am höchsten und nahm an Tag 7 und Tag 14 nach der Laserbehandlung ab. Dieses Ergebnis zeigt auch Abbildung 5.06 bei der Expression von VEGF.

In Abbildung 5.07 sind beispielhaft die Ergebnisse von immunhistochemischen Doppelfärbungen gegen CD11b und den purinergen Rezeptor P2x4 dargestellt. Wie bei den proangiogenen oder auch den proinflammatorischen Faktoren werden auch die purinergen Rezeptoren von Mikroglia-Zellen in der gesunden Retina nicht exprimiert (nicht gezeigt). Nach der Laserbehandlung exprimieren CD11b positive Mikroglia-Zellen auch den purinergen Rezeptor P2x4 (Abbildung 5.07). Ebenso, wie bei dem Beispiel FGF-2, steigt die Expression von P2x4 bis Tag 4 an und nahm an den folgenden Untersuchungstagen ab.

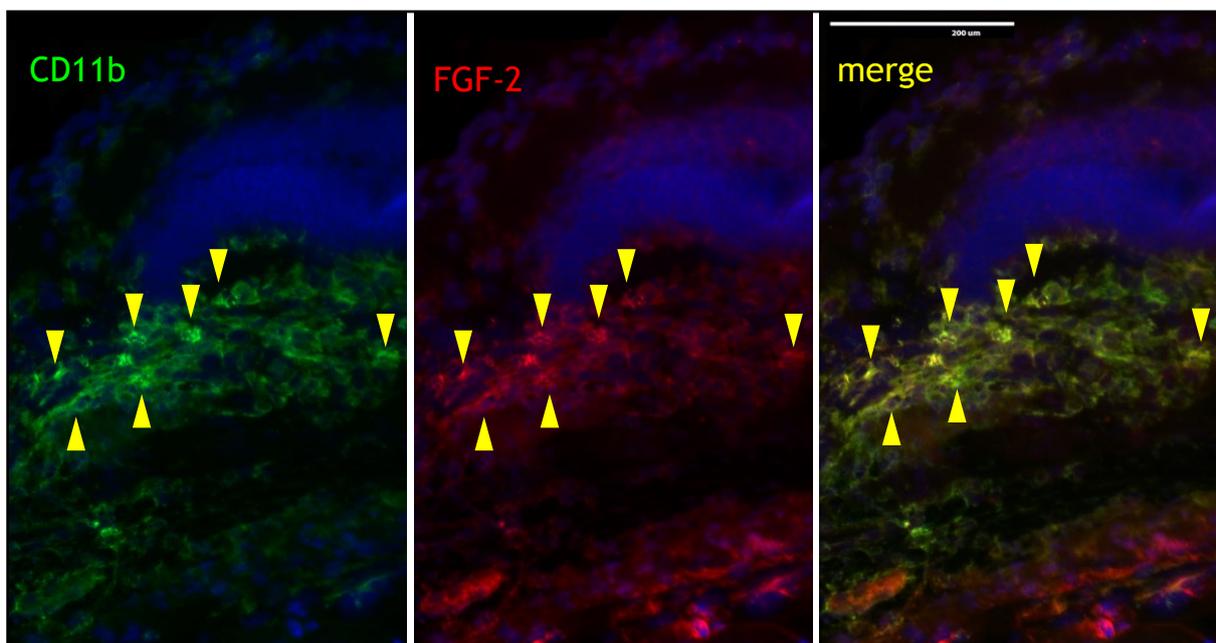


Abbildung 5.05: 4 Tage nach Laserbehandlung

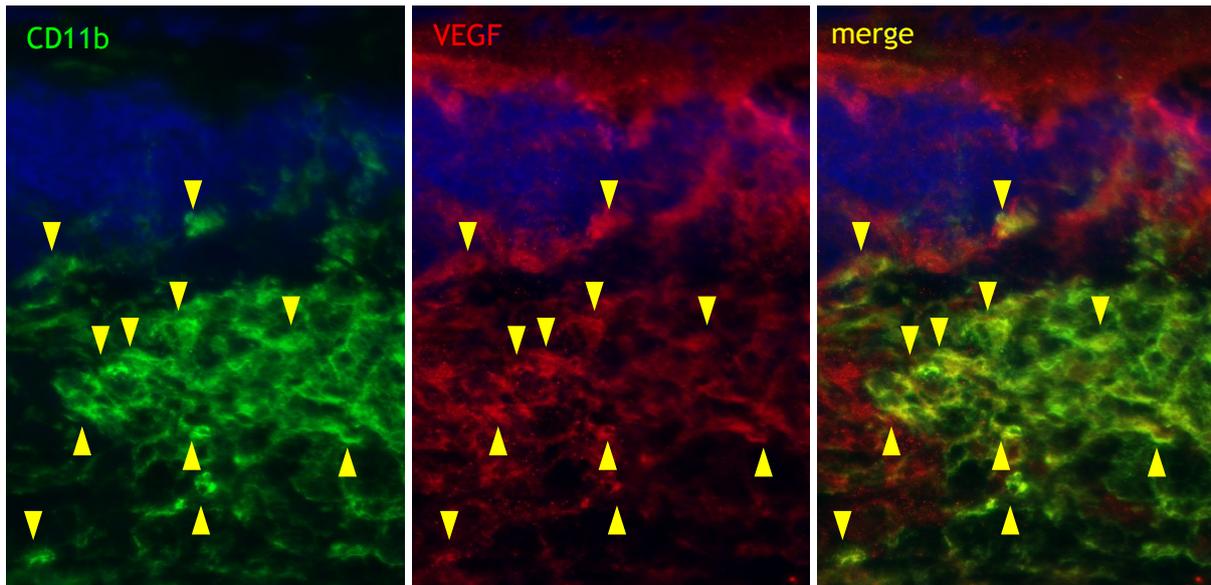


Abbildung 5.06: 4 Tage nach Laserbehandlung

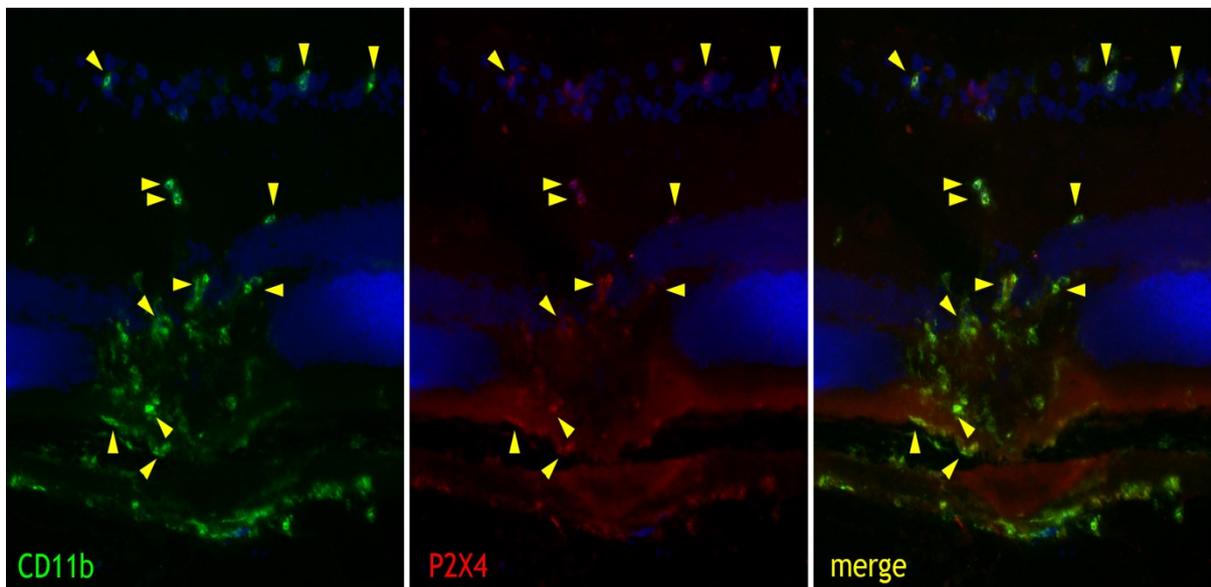


Abbildung 5.07: 4 Tage nach Laserbehandlung

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden keine weiteren immunhistochemischen Färbungen durchgeführt, da die Ergebnisse der *in-vivo*-Untersuchungen und die RT-PCR-Ergebnisse qualitativ besser eingeschätzt werden können, um eine bessere Aussage über die Modulation der Mikroglia-Aktivität zu treffen.

5.3. Modulation der Mikroglia-Migration

Wie in 4.2. beschrieben, wurden die Mäuse in verschiedene Versuchsgruppen unterteilt, die CNV mit Hilfe eines Argonlasers indiziert und anschließend durch die intravitrealen Injektion von Mikroglia-hemmenden Substanzen oder PBS behandelt.

Die Abbildung 5.08 zeigt den Einfluss von verschiedenen intravitreal injizierten Substanzen auf die Mikroglia-Migration zu den Laserherden. 2, 4 und 7 Tage nach der Laserbehandlung wurden die Tiere mit Hilfe der in 4.3. beschriebenen *in-vivo*-Methode untersucht. Als 1. Kontrollgruppe wurden Mäuse überprüft, die keine Injektion bekommen haben. Da die Mikroglia-hemmenden Substanzen in PBS gelöst wurden, wurde der 2. Kontrollgruppe PBS intravitreal injiziert. Es konnte in den späteren Analysen festgestellt werden, dass zwischen den beiden Kontrollgruppen keine Unterschiede bestehen. Das heisst, dass die Injektion per se keinen Einfluss auf die Migration der Mikroglia-Zellen hat. Den 4 Versuchsgruppen wurden Cortisol, Minocyclin, RGDS und TKP injiziert. Wie in der Abbildung 5.08 schon zu erkennen ist, wird die Migration der Mikroglia-Zellen zu den Laserherden durch die Behandlung mit Minocyclin oder TKP inhibiert. Analysen der Größe der Schädigungsgebiete, dem Verhältnis der Helligkeit der Mikroglia-Zellen und der Größe der Mikroglia-Areale aufgrund der Laserbehandlung ergaben, dass Cortisol und RGDS keinen Effekt auf die Migration der Mikroglia-Zellen ausübt. Aus diesem Grund werden in den folgenden Untersuchungen nur Minocyclin und TKP analysiert.

Die Auswertung der Daten erfolgte wie in 4.4. und 4.4.1. beschrieben. Als 1. Parameter wurde die Größe der Schädigungsgebiete aufgrund der Laserbehandlung im Infrarotbild untersucht (Abbildung 5.09). Dabei wurde die Anzahl der Pixel als Vergleichswert definiert. An Tag 2 lag die mittlere Größe der Schädigungsgebiete bei den PBS-Kontrolltieren bei 16.605 ± 5.597 bei den Minocyclin-behandelten Tieren bei 7.670 ± 2.580 , und bei den TKP-behandelten Tieren bei 15.364 ± 2.530 . Die mittlere Größe der Schädigungsgebiete bei den Minocyclin-behandelten Tieren war signifikant unterschiedlich gegenüber der PBS-Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). Der Unterschied der TKP-behandelten Tiere gegenüber der PBS-Kontrollgruppe war nicht signifikant. An Tag 4 war die mittlere Größe der Schädigungsgebiete bei den Minocyclin-behandelten Tieren (12.476 ± 7.086 , $p < 0,01$) und den TKP-behandelten Tiere (11.676 ± 4.046 , $p < 0,05$) signifikant kleiner als bei der PBS-Kontrollgruppe (17.873 ± 6.978).

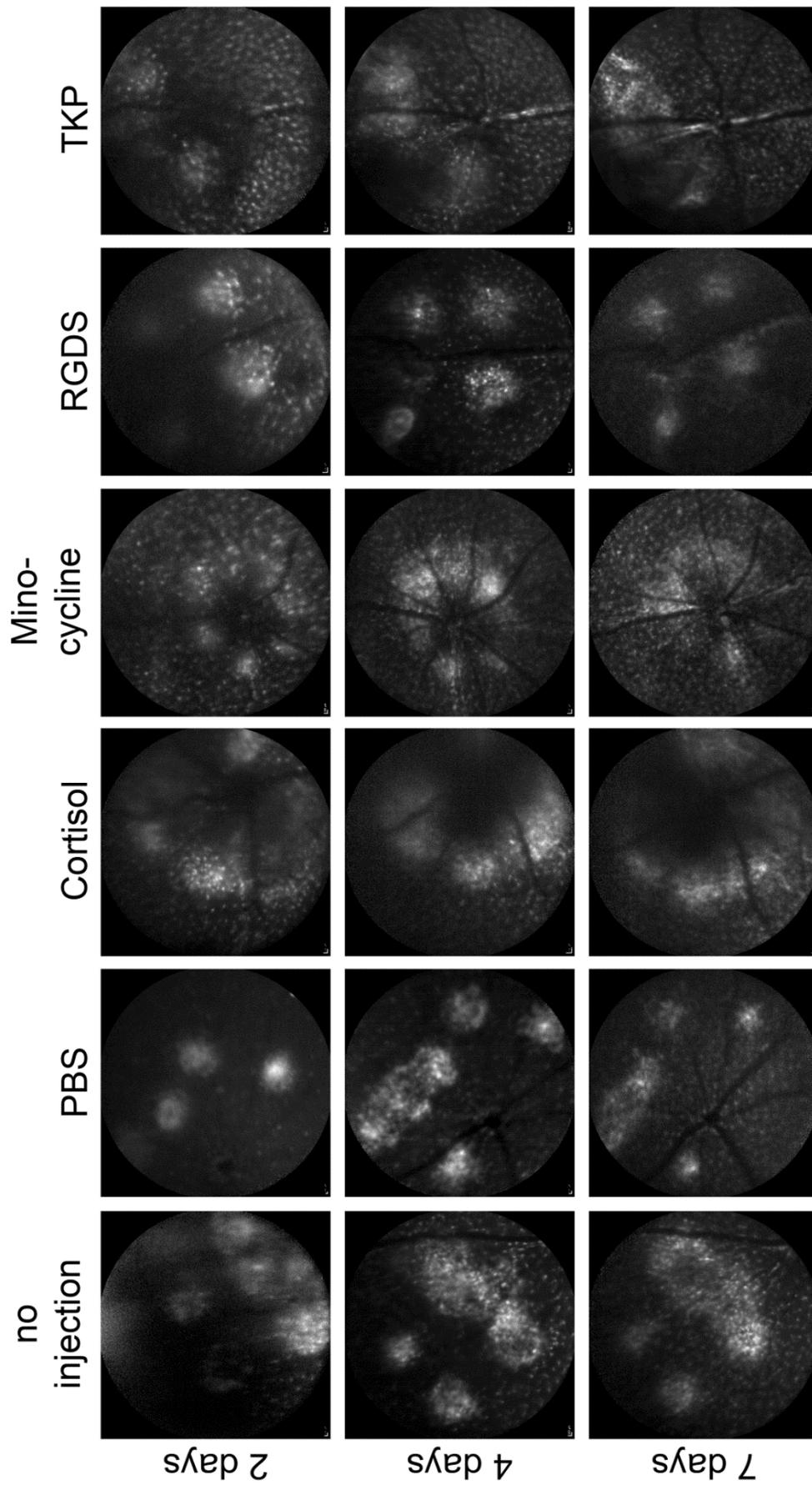


Abbildung 5.08: Übersicht über die Mikroglia-Migration zu den Laserherden

Ab Tag 4 wurden die topisch behandelten Tiere, also die Versuchstiere, denen die Substanzen nicht intravitreal sondern als Augentropfen verabreicht wurden, untersucht. Grund dafür war die Annahme, dass die Mikroglia-Migration erst an Tag 4 ihr Maximum erreicht. Bei den topisch behandelten Tieren lag die mittlere Größe der Schädigungsgebiete bei den PBS-Kontrolltieren bei 20.637 ± 3.423 bei den Minocyclin-behandelten Tieren bei 14.854 ± 4113 ($p < 0,05$), und bei den TKP-behandelten Tieren bei 12.749 ± 2.386 ($p < 0,01$). Die Unterschiede zwischen den Minocyclin- und TKP-behandelten Tieren waren signifikant gegenüber der Kontrollgruppe.

7 Tage nach der Laserbehandlung und der intravitrealen Injektion beträgt die mittlere Größe der Schädigungsgebiete der PBS-Kontrolltiere 18.110 ± 6.485 , die der Minocyclin-behandelten Tiere 8.588 ± 4.312 und die der TKP-behandelten Tiere 14.133 ± 2.770 . Die Minocyclin-behandelten Tiere zeigen signifikant kleinere Schädigungsgebiete im Vergleich zu den PBS-Kontrolltieren ($p < 0,0001$). Die TKP-Versuchstiere weisen keinen signifikanten Unterschied gegenüber der PBS-Kontrollgruppe auf. Bei den topisch behandelten Tieren ist die mittlere Größe der Schädigungsgebiete der Minocyclin-behandelten Tiere (11.270 ± 1.648 ; $p < 0,01$) und die der TKP-behandelten Tiere (12.128 ± 2.162 ; $p < 0,01$) signifikant kleiner gegenüber den PBS-Kontrolltieren (18.868 ± 3.944).

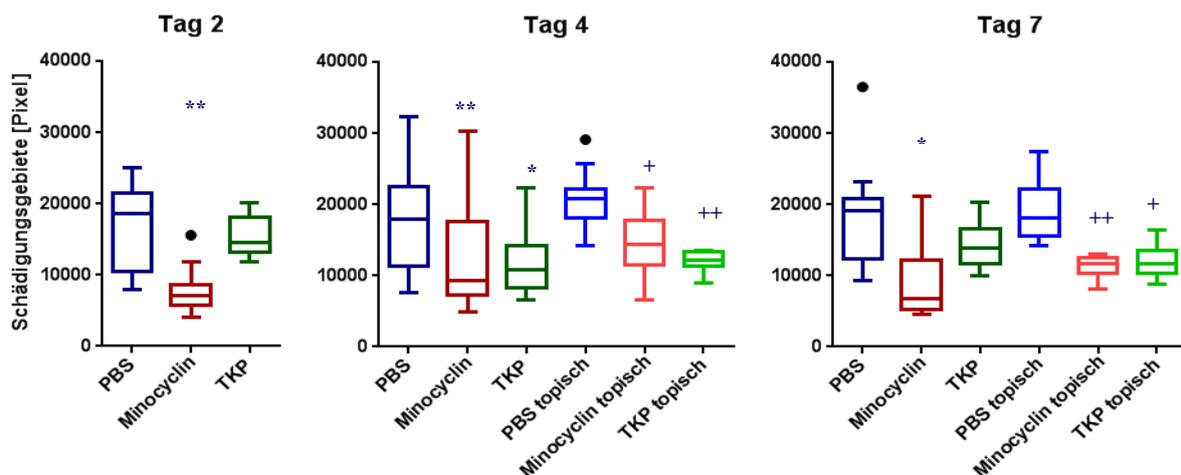


Abbildung 5.09: Größe der Schädigungsgebiete aufgrund der Laserbehandlung

Der 2. zu untersuchende Parameter war das Verhältnis der Helligkeit der Mikroglia-Zellen im Bereich der Laserherde (Abbildung 5.10). Wie in 4.4 beschrieben, wird das Verhältnis der Helligkeit zwischen Laserherd und einem Referenzbereich bestimmt

und die Ergebnisse der Versuchsgruppen untereinander analysiert. Sowohl bei der intravitreal injizierten Gruppe (IjG) als auch bei den topisch behandelten Tieren (toG) sind die Verhältnisse der Helligkeit von Minocyclin-behandelten Tieren (ijG Tag 2: $1,84 \pm 0,16$, $p < 0,0001$; Tag 4: $1,94 \pm 0,15$, $p < 0,0001$; Tag 7: $1,88 \pm 0,14$, $p < 0,0001$; toG Tag 4: $2,11 \pm 0,33$, $p < 0,01$; Tag 7: $1,84 \pm 0,11$, $p < 0,0001$) und TKP-behandelten Tieren (ijG Tag 2: $2,01 \pm 0,22$, $p < 0,001$; Tag 4: $1,86 \pm 0,13$, $p < 0,0001$; Tag 7: $1,80 \pm 0,12$, $p < 0,0001$; toG Tag 4: $1,84 \pm 0,10$, $p < 0,0001$; Tag 7: $1,84 \pm 0,15$, $p < 0,0001$) signifikant geringer im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe (ijG Tag 2: $2,56 \pm 0,46$; Tag 4: $2,71 \pm 0,26$; Tag 7: $2,64 \pm 0,47$; toG Tag 4: $2,56 \pm 0,27$; Tag 7: $2,48 \pm 0,38$).

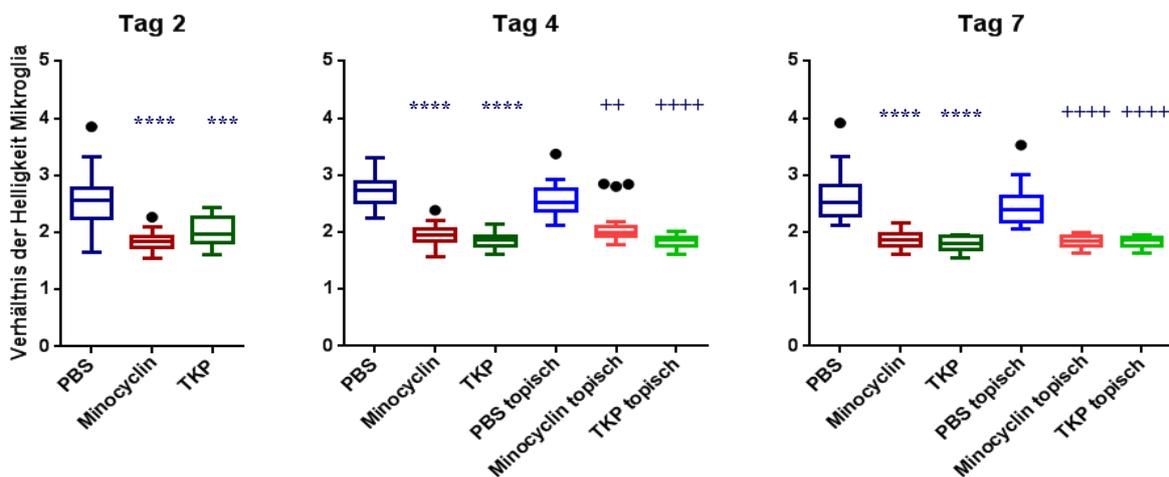


Abbildung 5.10: Verhältnis der Helligkeit der Mikroglia im Bereich der Laserherde

Des Weiteren wurde die Größe der Mikroglia-Areale (Angabe in Pixeln) im Bereich der Laserherde untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 5.11 zeigen, dass die Minocyclin-behandelten Tiere (ijG Tag 2: 5.575 ± 2.284 , $p < 0,0001$; Tag 4: 9.016 ± 5.021 , $p < 0,05$; Tag 7: 5.711 ± 2.415 , $p < 0,001$; toG Tag 4: 10.856 ± 3.812 , $p < 0,01$; Tag 7: 7.620 ± 1.944 , $p < 0,05$) zu allen Zeitpunkten und in beiden Versuchsgruppen signifikant kleiner sind gegenüber der PBS-Kontrollgruppe (ijG Tag 2: 11.162 ± 4.351 ; Tag 4: 12.815 ± 5.618 ; Tag 7: 10.605 ± 5.891 ; toG Tag 4: 16.521 ± 3.044 ; Tag 7: 11.487 ± 2.857). Die TKP-behandelten Tiere weisen in der intravitreal injizierten Versuchsgruppe keinen signifikanten Unterschied zur PBS-Kontrollgruppe auf (Tag 2: 12.025 ± 2.877 ; Tag 4: 9.195 ± 3.857 ; Tag 7: 10.328 ± 2.231). Bei den topisch-behandelten Tieren ist nur an Tag 4 mit 11.176 ± 1.597 , $p < 0,05$ ein signifikanter Unterschied messbar (Tag 7 9.330 ± 2.573).

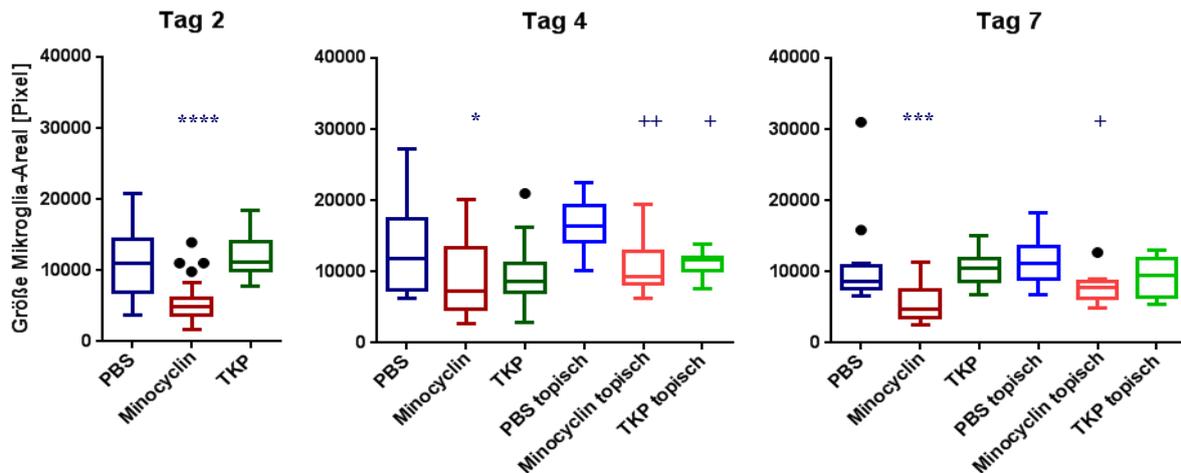


Abbildung 5.11: Größe der Mikroglia-Areale

5.4. Modulation des Ausmaßes der Neovaskularisation

In den weiteren Untersuchungen sollte überprüft werden, inwiefern die Modulation der Mikroglia-Zellen einen Effekt auf das Ausmaß der Neovaskularisation hat. Die Analyse erfolgte an Tag 4 und Tag 7 nach der Laserbehandlung und auch hier wurden die Versuchstiere in 2 Gruppen aufgeteilt, bei den die 1. Versuchsgruppe die Substanzen einmalig intravitreal injiziert bekamen und die 2. Versuchsgruppe unmittelbar nach der Laserbehandlung und daraufhin jeden 2. Tag die Substanzen topisch appliziert bekam. Abbildung 5.12 soll beispielhaft für die Unterschiede in dem Verhältnis der Helligkeit der Leckage und der Größe der Leckage stehen. Wie schon in dieser Abbildung zu erkennen ist, sind die Helligkeit (2,93) und die Größe der Leckage (25.382) bei den PBS-Kontrolltieren intensiver bzw. größer als die Helligkeit (2,13) und die Größe der Leckage (10.294) bei den Minocyclin-behandelten Tieren. Bei den Ergebnissen der Helligkeitsverhältnisse zeigte sich, dass sowohl die Minocyclin-behandelten Tiere (ijG Tag 4: $1,91 \pm 0,29$, $p < 0,0001$; Tag 7: $1,91 \pm 0,16$, $p < 0,0001$; toG Tag 4: $1,70 \pm 0,14$, $p < 0,001$; Tag 7: $1,85 \pm 0,12$, $p < 0,001$) als auch die TKP-behandelten Tiere (ijG : Tag 4: $1,81 \pm 0,16$, $p < 0,0001$; Tag 7: $1,86 \pm 0,13$, $p < 0,0001$; toG Tag 4: $1,79 \pm 0,13$, $p < 0,05$; Tag 7: $1,74 \pm 0,15$, $p < 0,0001$) eine signifikant geringere Intensität aufwiesen im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe (ijG: Tag 4: $2,86 \pm 0,62$; Tag 7: $3,13 \pm 0,45$; toG Tag 4: $2,16 \pm 0,42$; Tag 7: $2,56 \pm 0,50$) (Abbildung 5.13).

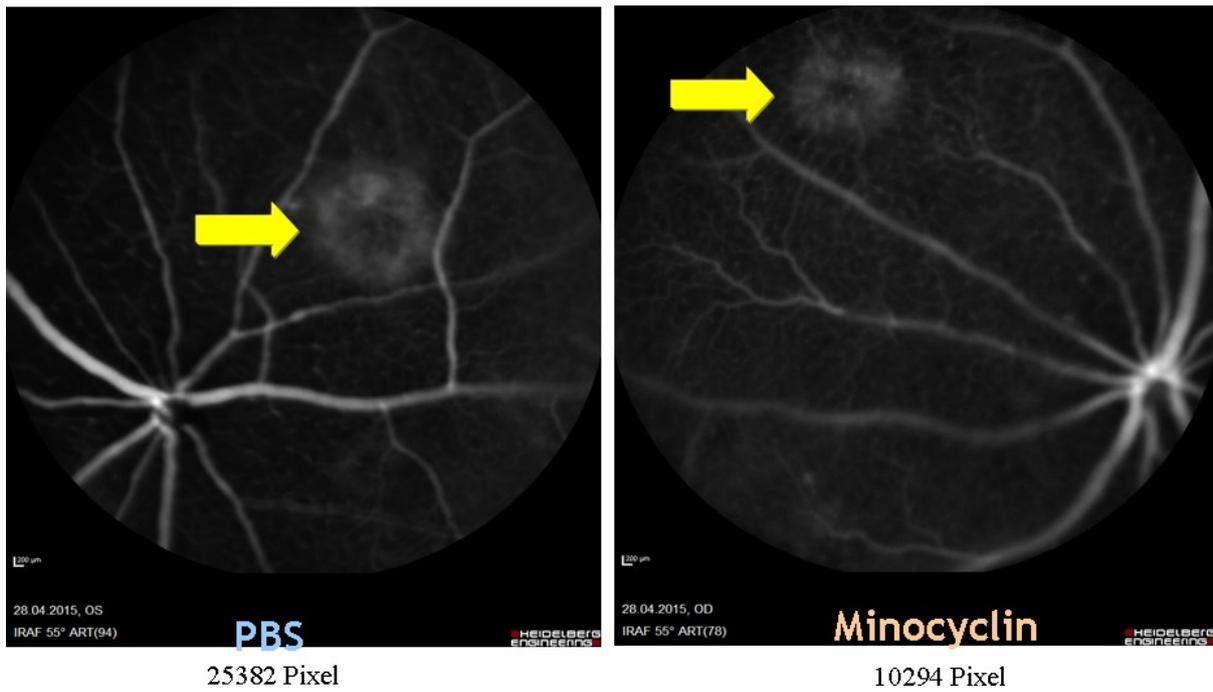


Abbildung 5.12: Unterschied in der Größe der Leckage

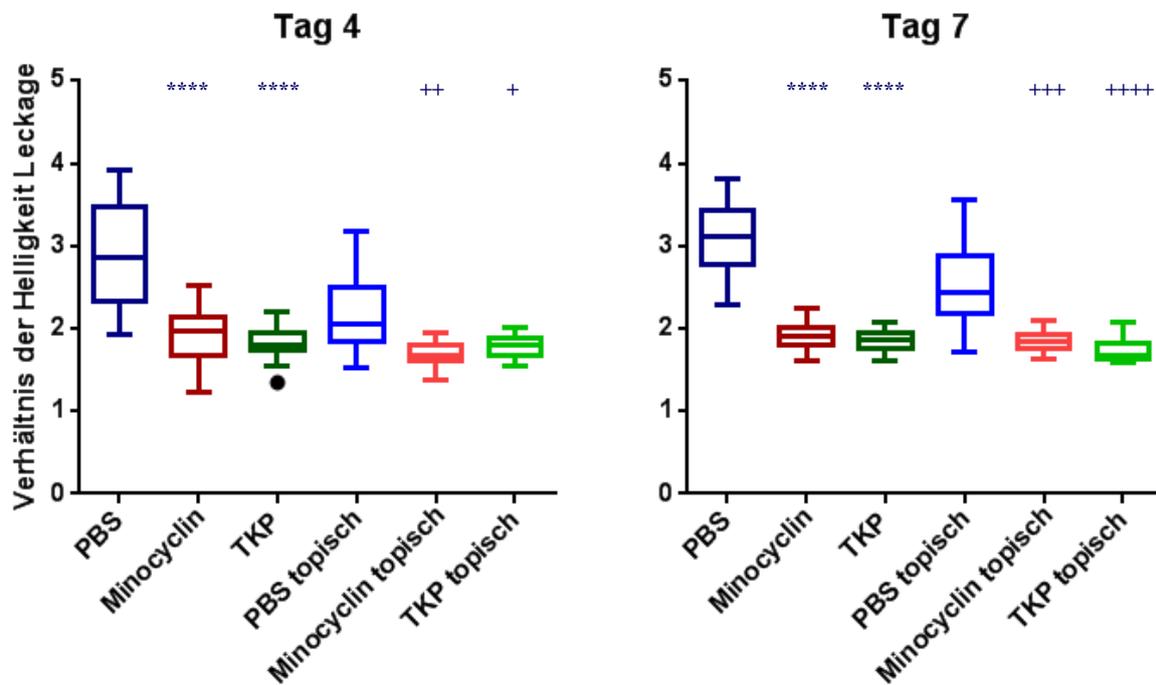


Abbildung 5.13: Verhältnis der Helligkeit der Leckage im Bereich der Laserherde

Die Größe der Leckage war der 5. Parameter, der bei den *in-vivo*-Versuchen untersucht wurde (Abbildung 5.14). 4 Tage nach der Laserbehandlung war die mittlere Größe der Leckage bei den Minocyclin-behandelten Tieren (7.507 ± 3.420 ; $p < 0,0001$) und die der TKP-behandelten Tiere (7.345 ± 2.528 ; $p < 0,0001$) signifikant kleiner als die Größe der Leckage bei den PBS-Kontrolltieren (14.803 ± 5.927). Bei der topisch-behandelten Gruppe waren die Minocyclin-behandelten Tiere (6.550 ± 3.781 ; $p < 0,001$) signifikant unterschiedlich gegenüber der PBS-Kontrollgruppe (11.503 ± 4.609). Die TKP-behandelten Tiere (6.902 ± 1.829 , $p < 0,05$) wiesen ebenfalls einen signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren auf. Bei den Untersuchungen an Tag 7 waren beide Versuchsgruppen, denen Minocyclin appliziert wurde (ijG: 7.673 ± 3.864 ; $p < 0,0001$; toG: 8.934 ± 1.593 ; $p < 0,001$) signifikant kleiner gegenüber den PBS-Kontrollgruppen (ijG: 16.022 ± 6.078 ; toG: 16.234 ± 3.237). Die Behandlung mit TKP führte bei regelmäßiger topischer Applikation (9.756 ± 2.567 ; $p < 0,01$), jedoch nicht bei einmaliger intravitrealer Injektion (14.056 ± 5.087), zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe.

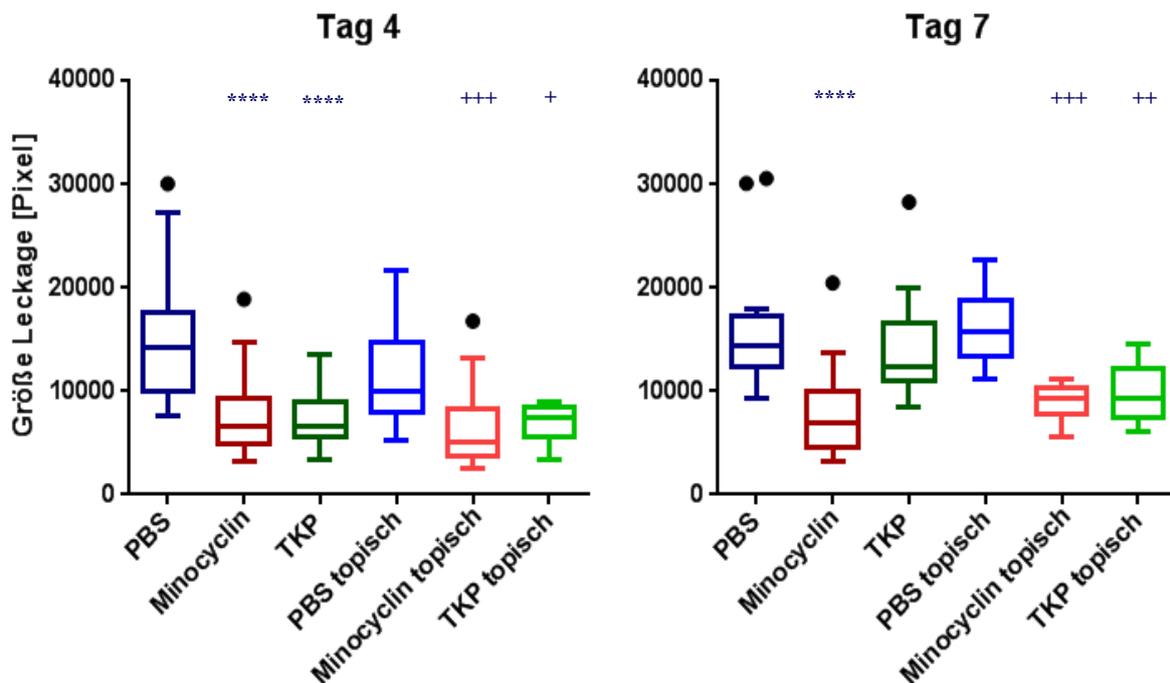


Abbildung 5.14: Größe der Leckage

5.5. Ergebnisse der RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Genexpression verschiedener Gene analysiert. Den hier verwendeten Versuchstieren wurden die Substanzen nach der Laserbehandlung intravitreal injiziert und die Augen 3 Tage nach der Laserbehandlung entnommen. Die Retina wurde wie in 4.5 beschrieben präpariert und die RNA extrahiert (4.6.).

Die zu untersuchten Tiere wurden in 4 Gruppen aufgeteilt: PBS-Injektion ohne Laserbehandlung, Laserbehandlung mit PBS-Injektion, Laserbehandlung mit TKP-Injektion und Laserbehandlung mit Minocyclin-Injektion (Abbildung 5.15). Pro Gruppe wurden 3 Tieren die jeweiligen Substanzen appliziert. Dabei wurden die Ergebnisse der Genexpression der laserbehandelten Tiere mit PBS-Injektion auf 100% festgelegt und die Ergebnisse der anderen 3 Gruppen mit dieser Behandlung verglichen.

Bei den Versuchstieren, denen PBS injiziert wurde aber keine Laserbehandlung stattgefunden hatte, zeigten alle untersuchten Genexpressionen einen niedrigeren Wert, als die Vergleichsgruppe. Die TKP-behandelten Tiere wiesen in der Genexpression, bis auf PDGF- β , eine prozentual gestiegene Genexpression im Vergleich zu den PBS-Kontrolltieren auf. Bei den Minocyclin-behandelten Tieren konnte sowohl eine gestiegene (P2rx4, TGF- β , VEGF) als auch eine geringere (PeCam1, FGF-2, PDGF- β , CCL-2) Genexpression gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

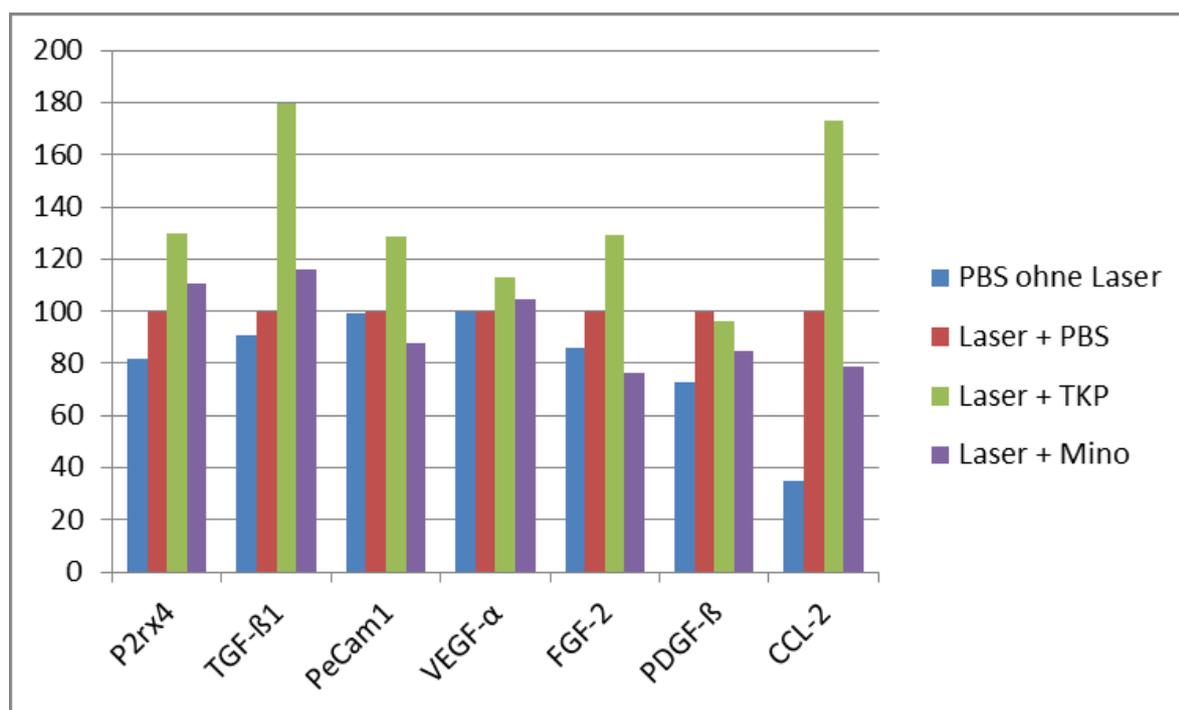


Abbildung 5.15: Übersicht der RT-PCR-Ergebnisse

5.6. Ergebnisse des Next Generation Sequencing

Wie in 4.11 beschrieben, wurden die Daten von Dr. Grassmann ausgewertet. Wie in 5.5 wurden auch hier die Genexpressionswerte der laserbehandelten Tiere mit PBS-Injektion als Vergleichswert verwendet und die anderen 3 Versuchsgruppen mit dieser Gruppe verglichen. Pro Gruppe wurde ein Tier analysiert.

Die Abbildung 5.16 zeigt, dass die ungelaserten Versuchstiere, denen PBS appliziert wurde (blau), zur Vergleichsgruppe geringere Expressionswerte erkennen lassen. Die gelaserten und TKP-behandelten Tiere weisen sowohl eine geringere (P2rx4, TGF- β 1, FGF-2, PDGF- β , CCL-2) als auch eine gestiegene (PeCam1, VEGF) Genexpression auf (grün). Bei den Minocyclin-behandelten Tieren ist die Genexpression bei allen untersuchten Genen, mit der Ausnahme VEGF, geringer gegenüber der Vergleichsgruppe.

In Abbildung 5.17 sind beispielhaft weitere Gene und die verschiedenen Genexpressionswerte aufgrund unterschiedlicher Behandlungsmethoden aufgezeigt. Die Genexpression bei „PBS (ohne Laser)“ und „Laser + Minocyclin“ sind bei allen Genen geringer im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe (rot). Die gelaserten und TKP-behandelten Tiere weisen sowohl eine geringere (S100A4, IL-6, CD11b) als auch eine gestiegene (IL-1, Iba1, MMP9) Genexpression auf (grün).

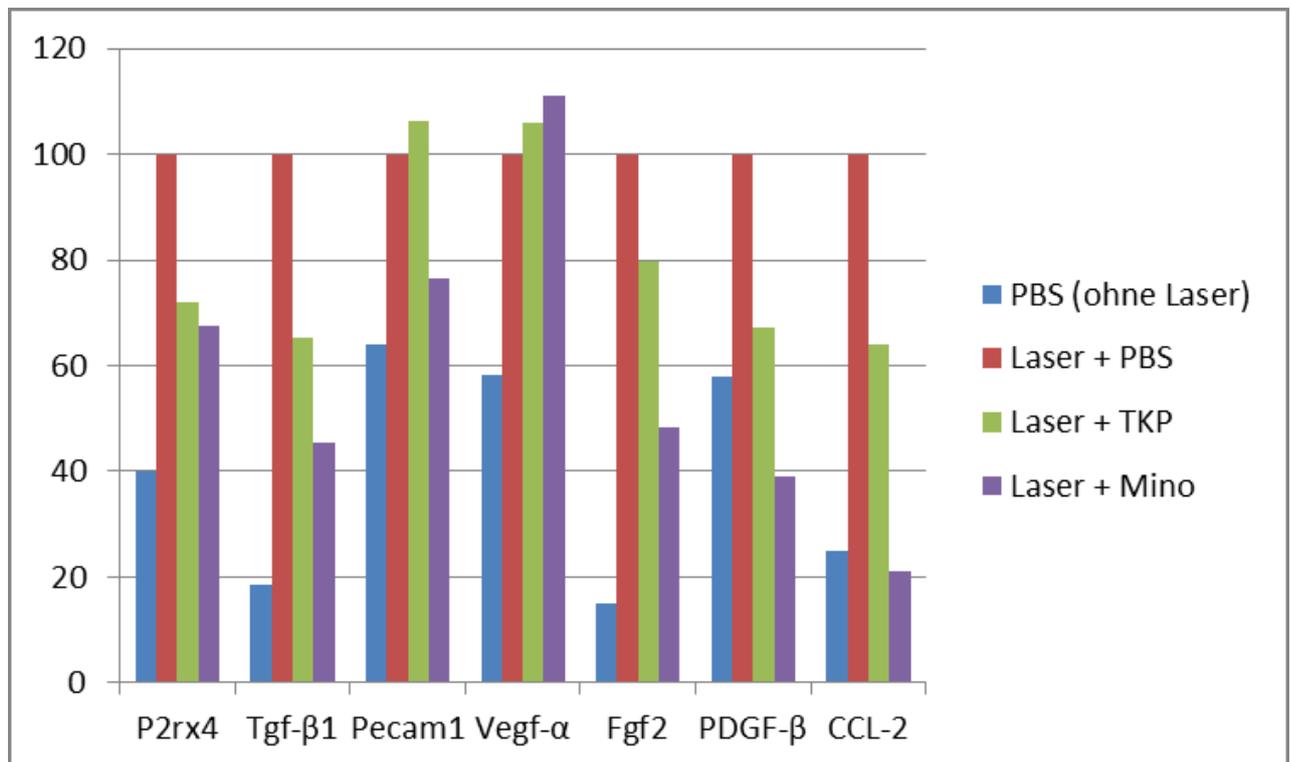


Abbildung 5.16: Übersicht der NGS-Ergebnisse

Ergebnisse

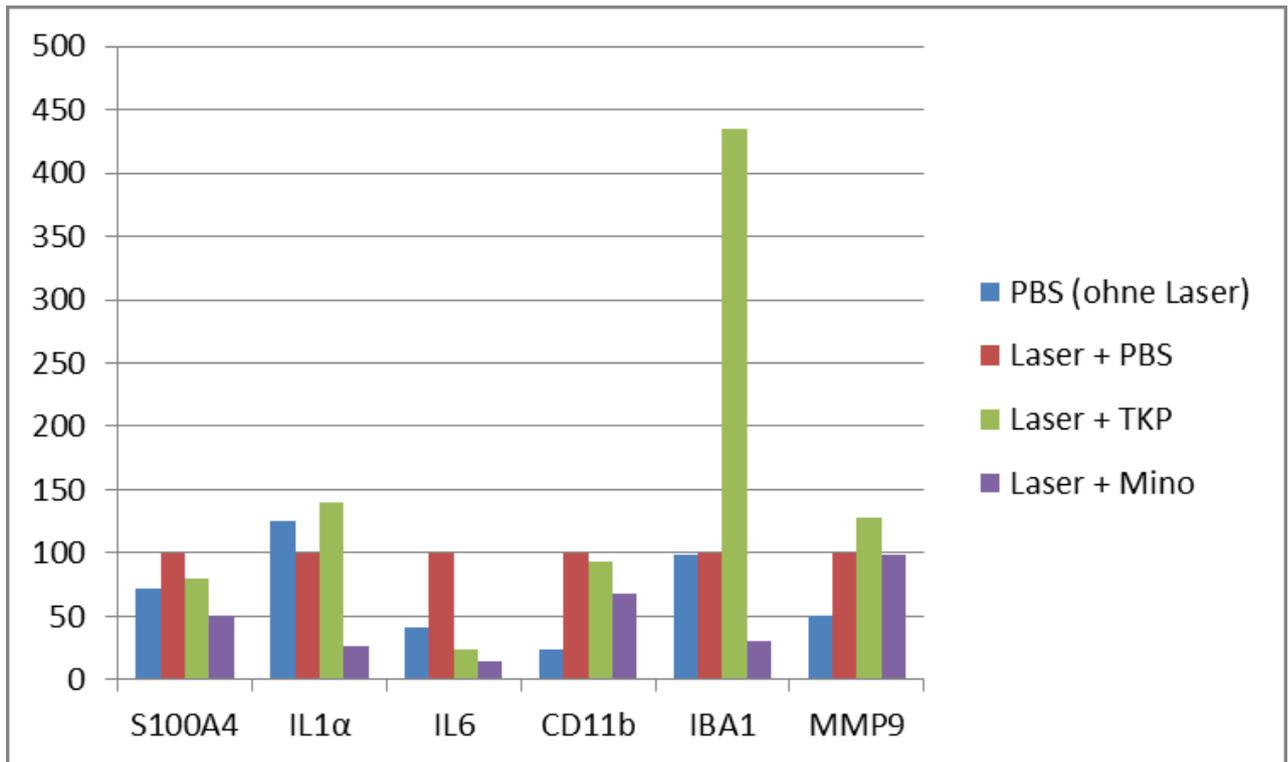


Abbildung 5.17: Übersicht weiterer NGS-Ergebnisse

6. Diskussion

In dieser Arbeit wurden *in-vivo*-bildgebende Methoden, molekularbiologische Methoden (RT-PCR) und immunhistologische Färbungen durchgeführt. Das Ziel der Arbeit war es, die Rolle der Mikroglia-Zellen im alternden Auge sowie bei der Entstehung und dem Fortschreiten der AMD zu untersuchen. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden im Tiermodell der laser-induzierten choroidalen Neovaskularisation bei Mäusen durchgeführt. Es sollte überprüft werden, ob und inwieweit sich durch immunmodulierende Substanzen die Größe der Laserherde, die Migration der Mikroglia-Zellen zu den Laserherden, die Größe der Mikroglia-Areale und das Ausmaß der Neovaskularisation eindämmen lassen. Ebenso sollte ermittelt werden, ob die immunmodulierenden Substanzen einen Einfluss auf die Genexpression von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und die Produktion anderer Signalmoleküle der Mikroglia-Zellen haben. Für die immunhistologische Färbung von Mikroglia-Zellen wurde ein Antikörper gegen CD11b verwendet. Es ist bekannt, dass CD11b vor allem von „aktivierten“ Mikroglia-Zellen exprimiert wird. Angesichts der Positionierung in der Retina und der Form von CD11b-positiven Zellen, die in den immunhistologischen Färbungen (5.2.) vorlagen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Zellen um Mikroglia-Zellen handelte. Bei den *in-vivo*-Methoden wurden CX3CR1^{GFP/+}-Mäuse verwendet. Bei diesen Tieren wurde ein Allel des Fraktalkin-Rezeptor-Gens durch das Gen für das *green fluorescent protein* (GFP) ersetzt, so dass die Mikroglia-Zellen die grüne Autofluoreszenz des GFP aufweisen (Abbildung 5.01).

Um die Mikroglia-Zellen zu inhibieren, wurden verschieden immunmodulierende Substanzen verwendet: Minocyclin, TKP, RGDS und Cortisol

Minocyclin ist ein halbsynthetisches Tetracyclin-Derivat, welches vor allem als Antibiotikum bei Hautkrankheiten Verwendung findet. Es ist in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Yong, 2004). Minocyclin hat eine anti-inflammatorische und eine durch die Inhibition der Mikroglia-Aktivität bewirkte neuroprotektive Wirkung. Diese neuroprotektive Wirkung zeigt sich in Versuchsmodellen wie beispielsweise dem ischämischen Schlaganfall (Yrjänheikki., 1998), Multiple Sklerose (Brundula, 2002), Rückenmarksverletzung (Stirling, 2004), Morbus Parkinson (Wu, 2002), Huntington-Krankheit (Chen, 2000), amyotrophe Lateralsklerose (Zhu, 2002), und dem osmotischen Demyelinisierungs-Syndrom (Suzuki, 2010). 2001 berichteten

Tikka und Koistinaho, dass der protektive Einfluss von Minocyclin mit der Reduktion von spezifischen Cytokinen (IL-1 β , TNF- α) und der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase, die hauptsächlich von Mikroglia-Zellen exprimiert werden, verbunden ist. Zusätzlich inhibiert Minocyclin die Proliferation der Mikroglia-Zellen (Tikka, 2001). Darüber hinaus zeigten einige Studien, dass die Inhibierung der Mikroglia-Aktivität durch Minocyclin auch einen Effekt bei verschiedenen retinalen und Sehnerven-erkrankungen ausübt, einschließlich Venenverschluss (Sun, 2013), diabetische Retinopathie (Cukras, 2012; Vincent, 2007), subretinalen Blutungen (Zhao, 2011), Netzhautablösung (Yang, 2009), Glaukom (Bosco, 2008; Levkovitch-Verbin, 2014), und Sehnervendurchtrennung (Baptiste, 2005). 2013 zeigte Huang, dass die Inhibierung der Mikroglia-Zellen mit Hilfe von Minocyclin bei dem Modell der laserinduzierten CNV zu einer geringeren Leckage führt und somit eine mögliche therapeutische Strategie zur Behandlung der AMD sein könnte (Huang, 2013). Ein Versuchsmodell der lichtinduzierten Netzhautdegeneration zeigt ähnliche Ergebnisse. Durch die Behandlung von Minocyclin und der damit einhergehenden Hemmung der Mikroglia-Aktivität werden die Photorezeptorzellen geschützt (Zhang, 2004).

TKP ist ein Tripeptid aus den Aminosäuren Threonin, Lysin und Prolin. Es entsteht während der Bildung von Immunoglobulin G und kann die Aktivierung von Zellen monozytären Ursprungs hemmen, einschließlich der Mikroglia-Zellen (Auriault, 1983). Es wurde untersucht, dass TKP während der Sehnervendurchtrennung die Axotomie-induzierte retinale Ganglienzelldegeneration reduziert (Thanos, 1993). Im zentralen Nervensystem hemmt TKP die Demyelinisierung und T-Zell Infiltration bei der experimentellen allergischen Encephalomyelitis und mindert Ödeme sowie die neuronale Degeneration im Modell der intrazerebralen Blutung (Wang, 2005). Ebenfalls unterstützt TKP den funktionellen Genesungsprozess nach Verletzungen des Rückenmarks (Emmetsberger, 2012). Über den Wirkungsmechanismus von TKP auf die Mikroglia-Zellen ist zurzeit noch nicht viel bekannt. Es ist möglich, dass TKP den metabolischen Zustand der Mikroglia-Zellen reguliert (Thanos, 1993).

RGDS ist ein Tetrapeptid aus den Aminosäuren Arginin, Glycin, Asparaginsäure und Serin. RGDS ist auf Fibronectin, Fibrinogen α und von Willebrand Faktor, nicht jedoch auf Vitronectin oder Kollagen zu finden. Dieses synthetische Fragment interagiert mit $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha V\beta 3$ Integrinen und stört die Bindung von Zellen an Fibronectin-beschichtete Oberflächen (Haverstick, 1985; Pierschbacher, 1984;

Basani, 2014). Es blockiert auch die Anheftung bestimmter Krankheitserreger an die Zellen (Thomas, 1985; Pottratz, 1990). Das RGDS-Peptid hemmt die Thrombin-induzierte Bindung von Blutplättchen an Fibronectin, Fibrinogen α und von Willebrand Faktor (Gartner, 1985; Ginsberg, 1985). Die Interaktion des RGDS-Peptids mit Integrinen verändert die intrazelluläre Signalisierung in einer Weise, die zell- und Stimulus-spezifisch sind (Moon, 2009; Dekkers, 2010). RGDS reduziert die Phagozytose apoptotischer Neurone durch Mikroglia-Zellen (Witting, 2000). Die Sterberate der retinalen Ganglienzellen wurde nach einer Axotomie durch die intravitreale Injektion von RGDS reduziert (Heiduschka, 2004).

Das natürliche Glucocorticoid Cortisol zeigt eindeutige, anti-inflammatorische und immunsuppressive Wirkungen. Bei entzündlichen und demyelinisierenden ZNS-Störungen können Glucocorticoide die Produktion von Stickstoffmonoxiden durch die Mikroglia über die Hemmung der Proteinkinase C (PKC) Signaltransduktion regulieren (Jun, 1994). Obwohl Cortisol eine toxische Wirkung für Neurone haben kann, kann es zum Schutz der Neuronen die Produktion von zytotoxischen Molekülen, NO und TNF- α durch die Mikrogliazellen blockieren (Drew, 2000). Cortisol wurde erfolgreich als ein Neuroprotektivum bei der Schädigung des Sehnervs in einem Versuchsmodell mit Ratten angewandt. Die intravitreale Applikation von Cortisol führte zu einer erhöhten Anzahl an überlebenden retinalen Ganglienzellen bei einer Axotomie (Heiduschka, 2004; Heiduschka und Thanos, 2006). Durch die Injektion der künstlichen Glucocorticoide Dexamethason und Methylprednisolon konnten keine solchen neuroprotektiven Effekte erzielt werden (Heiduschka, 2004; Huang, 2013). In anderen Studien zeigten die Ergebnisse, dass Cortisol die Funktion von Mikroglia-Zellen inhibieren kann und somit eine therapeutische Rolle bei Patienten mit Netzhauterkrankungen einnehmen kann (Glybina, 2009, 2010; Shen, 2014).

Das Ausmaß der Expression von Wachstumsfaktoren, Cytokinen und anderer Signalmoleküle der Mikroglia-Zellen, bestimmt durch immunhistochemische Färbungen, konnte für eine genauere Quantifizierung nicht genutzt werden. Aufgrund von gewissen subjektiven Fehlern konnten die immunhistochemischen Färbungen nur grobe Rückschlüsse auf die Expression liefern und wurden für den weiteren Verlauf der Arbeit nicht weiter verfolgt.

Den Effekt der verschiedenen Inhibitoren auf die Mikroglia-Migration zu den Laserherden lässt sich in Abbildung 5.08 schon erkennen. Den Tieren, denen Minocyclin intravitreal injiziert wurde, zeigten sowohl an Tag 2, 4 als auch an Tag 7 einen signifikanten Unterschied zur PBS-Kontrollgruppe (Abbildungen 5.09-11). Diese Ergebnisse stimmen mit den Erkenntnissen von Huang überein, der zeigte, dass Minocyclin die Akkumulation von Mikroglia-Zellen im Bereich der Laserherde inhibiert (Huang, 2013). Auch die Größe der Schädigungsgebiete und die Größe der Mikroglia-Areale waren signifikant geringer gegenüber der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis konnte bisherige Untersuchungsbefunde (Tikka, 2001; Reichman, 1986; Monje, 2002) bestätigen. Über den Wirkungsmechanismus von TKP auf die Mikroglia-Zellen ist zurzeit noch nicht viel bekannt. Die Ergebnisse aus der Abbildung 5.10 zeigen aber, dass bei einmaliger Applizierung von TKP die Akkumulation der Mikroglia-Zellen im Bereich der Laserherde gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert wird. In Bezug auf die Größe der Schädigungsgebiete und die Größe der Mikroglia-Areale nimmt die einmalige Injektion von TKP jedoch keinen Einfluss. Da es sich bei TKP um ein sehr kleines Tripeptid handelt besteht die Möglichkeit, dass es leichter abgebaut oder ausgewaschen wird. Bei einer mehrmaligen Behandlung wird dieser Vorgang möglicherweise umgangen.

Werden die Mikroglia-hemmenden Substanzen topisch verabreicht, dann zeigt sich bei den Minocyclin-behandelten Tieren ebenfalls ein signifikanter Unterschied in den 3 Parametern Größe der Schädigungsgebiete, Verhältnis der Helligkeit der Mikroglia-Zellen und Größe der Mikroglia-Areale. Obwohl bei der topischen Applikation aufgrund von Auswaschung und anderen Faktoren nur ein geringer Prozentsatz der Substanzen am Wirkungsort ankommt, zeigen sich dieselben Ergebnisse wie bei der intravitrealen Injektion. Diese Behandlungsmethode hat den eindeutigen Vorteil, dass es für das Versuchstier und einer späteren Anwendung im Menschen keine negativen Auswirkungen aufgrund der Injektion geben kann und mit einer geringeren Belastung verbunden ist. Entzündungen im Glaskörperbereich (Endophthalmitis) werden so vermieden, und die Handhabung ist für den Patienten einfacher. Bei der mehrmaligen topischen Behandlung mit TKP lässt sich, im Gegensatz zum Zeitpunkt von 4 Tagen, 7 Tage nach der Laserbehandlung kein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe in Bezug auf die Größe der Mikroglia-Areale messen (Abbildung 5.11). Die Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass Minocyclin und TKP

einen hemmenden Einfluss auf die Migration der Mikroglia-Zellen zu dem Bereich der Schädigungsstelle haben.

Die Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass Minocyclin und TKP einen hemmenden Einfluss auf die Migration der Mikroglia-Zellen zu dem Bereich der Schädigungsstelle haben.

Analysen der Größe der Schädigungsgebiete, des Verhältnisses der Helligkeit der Mikroglia-Zellen und der Größe der Mikroglia-Areale aufgrund der Laserbehandlung ergaben, dass Cortisol und RGDS keinen Effekt auf die Migration der Mikroglia-Zellen ausüben.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde untersucht, ob die Inhibition der Mikroglia-Zellen einen Effekt auf das Ausmaß der CNV hat. Dabei zeigen Abbildung 5.13 die Helligkeitsintensität der Leckage und Abbildung 5.14 die Größe der Leckage. Die Minocyclin-behandelten Tiere weisen in beiden Versuchsgruppen, also einmalige intravitreale Injektion oder mehrmalige topische Applikation, einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe auf. Damit lassen sich die Untersuchungen von Huang bestätigen, dass Minocyclin die CNV hemmt (Huang, 2013). Ebenso sind bei den TKP-behandelten Tieren signifikante Unterschiede in der Intensität der Leckage gegenüber den Kontrolltieren zu erkennen. Nur am Tag 7 bei der intravitrealen Injektion lässt sich kein Unterschied nachweisen. Das würde mit den Erkenntnissen übereinstimmen, dass die Wirkung von TKP auf die Mikroglia-Zellen relativ schnell nachlässt, wenn keine regelmäßige Zugabe von TKP folgt. Bisher konnte noch in keinem Forschungsprojekt festgestellt werden, dass TKP einen signifikant inhibierenden Einfluss auf das Ausmaß der CNV hat.

In Bezug auf die Genexpression der Mikroglia-Zellen sollte untersucht werden, ob die immunmodulierenden Substanzen einen Einfluss auf die Genexpression von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und die Produktion anderer Signalmoleküle der Mikroglia-Zellen haben. Die Ergebnisse in Abbildung 5.15-17 zeigen, dass die Mikroglia-Zellen, einmal aktiviert, eine Vielzahl von proangiogenen Faktoren, wie zum Beispiel den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), exprimieren. VEGF spielt bei der Pathogenese der neovaskulären Form der AMD eine wichtige Rolle (Ferrara, 2004; Funk, 2009). Dieser Wachstumsfaktor wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert: Endothelzellen, Astrozyten, Müller-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen und Mikrogliazellen. Darüber hinaus gab es nach der

Laserbehandlung höhere Anteile von choroidalen Makrophagen und Mikroglia-Zellen, die VEGF exprimierten (Krause, 2014), Diese Untersuchungen konnten in dieser Arbeit bestätigt werden (Abbildung 5.16).

Neben VEGF sollen weitere proangiogene Faktoren die neovaskuläre Form der AMD begünstigen. Untersuchungen zeigten, dass das Plasmalevel von PDGF- β bei AMD-Patienten signifikant höher ist im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Zehetner, 2014). Jo et al. (2006) präsentierte in seinen Forschungsergebnissen, dass die Inhibition von VEGF-a und PDGF- β effektiver zur Behandlung der CNV ist, als die alleinige Inhibition von VEGF-a (Jo, 2006). In einer anderen Arbeit wurde darüber berichtet, dass PDGF- β die Mikroglia-Zellen stimulieren kann und diese so aktiviert werden. Durch die tägliche intravitreale Injektion von Minocyclin kann die Funktion von PDGF- β gehemmt werden (Masuda, 2009). Abbildung 5.15 und 5.16 zeigen, dass durch die intravitreale Injektion sowohl von Minocyclin als auch von TKP die Expression von PDGF- β reduziert wird. Ein weiteres Beispiel ist TGF- β , dass die Proliferation, Zelldifferenzierung und andere Funktionen in den meisten Zellen steuert. TGF- β kann die Sekretion von VEGF aus dem retinalen Pigmentepithel (RPE) und Zellen des Choroids induzieren und kann somit die neovaskuläre Form der AMD begünstigen (Naginei, 2013). 2 Wochen nach der Laserbehandlung von Ratten lässt sich durch die Inhibition von TGF- β das Ausmaß der CNV reduzieren (Zarranz-Ventura, 2013). Ob die Mikroglia-Zellen alleine für die Expression von TGF- β und der neovaskulären Form der AMD verantwortlich sind, ist bisher noch nicht bekannt. Die Ergebnisse in Abbildung 5.16 lassen aber die Behauptung zu, dass durch die Inhibition der Mikroglia-Aktivität und Mikroglia-Migration durch Minocyclin und TKP, die Expression von TGF- β reduziert wird und damit die Angiogenese gehemmt wird.

Ein weiteres Beispiel für einen proangiogenen Faktor ist FGF-2. Die Hauptwirkung von FGF-2 ist die Vermittlung der Bildung neuer Blutgefäße bei der Wundheilung von normalen Geweben nach einer Verletzung (Ornitz, 2001; Wang, 2012). FGF-2 wird von einer Vielzahl von Zelltypen sezerniert, einschließlich vaskulären Endothelzellen der Choriokapillaris, RPE-Zellen und Fibroblasten (Martin, 2001; Rosenthal, 2005). In Arbeiten über die Rolle von FGF-2 bei der Entwicklung der CNV zeigte sich, dass FGF-2 indirekt die CNV über die Regulierung von VEGF und erhöhter Proliferation von Endothelzellen induziert (Amin, 1994; Guerrin, 1997; Soubrane, 1994). Bei der Behandlung der CNV lässt eine Kombination aus der Hemmung von VEGF und FGF-2 eine bessere Therapie gegenüber der VEGF-Hemmung erkennen (Stahl, 2009). Hu

schloss 2009 aus seinen Ergebnissen, dass FGF-2 ein wichtiger Regulator bei der beginnenden Neovaskularisation ist, und VEGF bei der späteren Phase der Angiogenese wichtig ist (Hu, 2009). Bei einigen neurologischen Erkrankungen wurde berichtet, dass Mikroglia-Zellen eine Quelle der FGF-2-Sezernierung seien (Gudi, 2011; Voss, 2012). Bisher gibt es keine Studien darüber, ob Mikroglia-Zellen FGF-2 bei der AMD produzieren. Basierend auf den Ergebnissen in Abbildung 5.15 und 5.16 lässt sich die Hypothese aufstellen, dass eine Inhibition der Mikroglia-Zellen durch Minocyclin und TKP zu einer Reduzierung der Expression von FGF-2 führt.

Aus den Ergebnissen der RT-PCR und dem Ergebnis, dass das Ausmaß der Neovaskularisation durch die Hemmung der Mikroglia-Zellen durch Minocyclin und TKP signifikant reduziert wird, kann man schließen, dass die Mikroglia-Zellen einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung neuer Blutgefäße bei der AMD haben. Ob die Mikroglia-Zellen nun direkt die proangiogenen Faktoren sezernieren oder die Behandlung mit Minocyclin und TKP die Migration der Mikroglia-Zellen zu den Laserherden inhibiert und diese nicht mit dem RPE interagieren können, welches proangiogene Faktoren sezerniert, muss weiter erforscht werden. Des Weiteren wurden die Versuche in 5.5 und 5.6 mit Tieren durchgeführt, die die Substanzen intravitreal injiziert bekommen haben. Ob es bei topischer Applikation zu demselben Ergebnis kommt, muss weiter untersucht werden. Die Ergebnisse in den Abbildungen 5.13 und 5.14 sprechen dafür.

Es besteht kein Zweifel, dass die Entzündung eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von AMD spielt (Stanton, 2014). Typische inflammatorische Zytokine, einschließlich IL-6 (Jonas, 2012; Miao, 2012; Seddon, 2005), IL-1 β (Liu, 2013; Shen, 2011) und Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) (Jonas, 2012; Zeng, 2004) wirken zur Entzündungskaskade, Drusen und CNV bei. Über die Expression von proinflammatorischen Cytokinen von Mikroglia-Zellen bei der AMD ist wenig bekannt. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe zeigten immunhistologische Färbungen, dass Mikroglia-Zellen nur ein geringes proinflammatorisches Verhalten bei der laser-induzierten CNV aufweisen. Die Ergebnisse in Abbildung 5.17 sprechen aber, bei der Behandlung mit Minocyclin und TKP, für eine geringere Expression von proinflammatorischen Cytokinen. Es braucht noch weitere Untersuchungen, um die Rolle der Mikroglia-Zellen bei der Pathogenese der AMD zu verstehen. Inwieweit Minocyclin und TKP als ein neues therapeutisches Mittel zur Behandlung der AMD genutzt werden können, müssen folgende Arbeiten zeigen.

7. Zusammenfassung/Summary

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist eine Hauptursache für Erblindungen bei älteren Bürgern in den westlichen Ländern, mit zunehmendem Ausmaß. Ausgehend von einer Akkumulation von Lipofuszin im retinalen Pigmentepithel (RPE) und der Ablagerung von Drusen zwischen dem RPE und der Bruchschen Membran findet eine Reihe von noch unzureichend erforschten pathologischen Prozessen statt, die letztendlich zu einer Degeneration des RPE und der Photorezeptoren führt. In ca. 15% der Fälle tritt als eine zusätzliche Komplikation eine von der Aderhaut ausgehende Neovaskularisation auf, durch welche der Verlust der Sehfähigkeit noch stärker beschleunigt wird. In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass auch das Immunsystem an der Pathogenese der AMD beteiligt ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Rolle der Mikroglia-Zellen, den immunkompetenten Zellen des ZNS, im alternden Auge sowie bei der Entstehung und dem Fortschreiten der AMD zu untersuchen. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden anhand der laser-induzierte choroidale Neovaskularisation im Tiermodell bei Mäusen durchgeführt. Es sollte überprüft werden, ob und inwieweit sich durch immunmodulierende Substanzen die Größe der Laserherde, die Migration der Mikroglia-Zellen zu den Laserherden, die Größe der Mikroglia-Areale und das Ausmaß der Neovaskularisation eindämmen lässt. Ebenso sollte ermittelt werden, ob die immunmodulierenden Substanzen einen Einfluss auf die Genexpression von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und die Produktion anderer Signalmoleküle der Mikroglia-Zellen haben. Zur Modulation der Mikroglia-Aktivität und Migration wurden Minocyclin und TKP intravitreal und topisch appliziert. In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Mikroglia-hemmende Wirkung von Minocyclin nicht nur die Migration der Mikroglia zu den Laserherden, sondern auch das Ausmaß der Laser-induzierten CNV signifikant reduziert. Bei topischer Behandlung war dieses Ausmaß auch bei den mit TKP behandelten Tieren signifikant verringert. Auch die Genexpression von proangiogenen (TGF- β , PDGF- β oder FGF-2) und proinflammatorischen (IL-1, IL-6 oder CCL-2) Faktoren wurde durch die Verwendung von Minocyclin und TKP reduziert. Aus diesen Ergebnissen lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die Inhibierung der Mikroglia einen hemmenden Einfluss auf die choroidale Neovaskularisation hat.

Age-related macular degeneration (AMD) is one of the main reasons for blindness of elderly people in western countries, with increasing incidence. Beginning with an accumulation of lipofuscin in the retinal pigment epithelium (RPE) and the deposition of drusen between the RPE and Bruch's membrane there proceed a range of uninvestigated pathological processes that eventually lead to degeneration of the RPE and photoreceptors. In approximately 15% of the cases as an additional complication a neovascularisation originating from the choroid occurs, whereby the loss of vision is even more accelerated. In recent years, it has been found that the immune system is involved in the pathogenesis of AMD. Therefore, it was the purpose of this study to investigate the role of microglial cells, because they are the immune competent cells of the CNS, in the aging eye and in the development and progression of AMD. The investigations in this study were performed in the animal model of choroidal neovascularisation after laser treatment. It should be verified whether and to what extent it is possible to curb the size of laser spots, the migration of microglial cells to the laser spots, the size of the microglia areas and the extent of neovascularization by using immunomodulating substances. It should also be investigated whether the immune-modulating substances have an influence on the gene expression of growth factors, cytokines and the production of other signaling molecules of the microglial cells. To modulate the microglial activity and migration minocycline and TKP were administered intravitreally and topically. It was exhibit in the experiments, that the microglia-inhibitory effect of minocycline not only significantly reduce the migration of microglia to the laser spots, but also the extant of laser-induced CNV. For topical treatment the amount was significantly reduced even animals treated with TKP. Also, the gene expression of pro angiogenesis (FGF- β , PDGF- β and FGF-2) and pro-inflammatory (IL-1, IL-6 or CCL-2) factors was reduced by using minocycline and TKP. This results come to the conclusion that the inhibition of microglia has an inhibitory effect on choroidal neovascularization.

8. Literaturverzeichnis

Adams RA, Bauer J, Flick MJ, Sikorski SL, Nuriel T, Lassmann H, et al., 2007. The fibrin-derived gamma377-395 peptide inhibits microglia activation and suppresses relapsing paralysis in central nervous system autoimmune disease. *J Exp Med.*, 204, 571-582

Algvere PV, Steen B, Seregard S, Kvanta A., 2008. A prospective study on intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration of different durations. *Acta ophthalmologica.*, 86(5):482-9

Alliot F, Lecain E, Grima B, Pessac B, 1991. Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 1541-1545

Alliot F, Godin I. & Pessac B., 1999. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* , 117, 145-52

Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, Rollins BJ, Ambati BK, 2003. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat. Med.* 9, 1390-1397

Amin R, Puklin JE, Frank RN, 1994. Growth factor localization in choroidal neovascular membranes of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35, 3178-3188

Anderson DH, Fisher SK & Steinberg RH., 1978. Mammalian cones: disc shedding, phagocytosis, and renewal. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 17, 117-33

Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS & Johnson LV., 2002. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol* 134, 411-431

Ashwell K., 1991. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 58, 1-12

Augustin AJ., 2007. *Augenheilkunde*: Springer Verlag

Auriaul C, Joseph M, Tartar A, Capron A., 1983. Characterization and synthesis of a macrophage inhibitory peptide from the second constant domain of human immunoglobulin G. *FEBS Lett.* 153, 11-15

Baehr W, Wu SM, Bird AC, & Palczewski K., 2003. The retinoid cycle and retina disease. *Vision Res*, 43, 2957-8

Baptiste DC, Powell KJ, Jollimore CA, Hamilton C, LeVatte TL, Archibald ML, Chauhan BC, Robertson GS, Kelly ME., 2005. Effects of minocycline and tetracycline on retinal ganglion cell survival after axotomy. *Neuroscience* 134, 575-582

Basani RB, D'Andrea G, Mitra N et al., 2014. RGD-containing peptides inhibit fibrinogen binding to platelet $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ by inducing an allosteric change in the amino-terminal portion of αIIb . *J Biol Chem* 276(17) 13975-13981

- Beatty S, Koh HH, Henson D, Boulton M., 2000. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Survey of ophthalmology*. 45(2):115-34
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Martin-Partido G, Francisco-Morcillo J., 2012. Light-induced degeneration and microglial response in the retina of an epibenthonic pigmented teleost: age-dependent photoreceptor susceptibility to cell death. *J. Exp. Biol.* 215, 3799-3812
- Benveniste EN, Nguyen VT, O'Keefe GM., 2001. Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 39(5-6):38191
- Bergmann M, Schutt F, Holz FG & Kopitz J., 2004. Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Faseb J* 18, 562-564
- Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW., 2007. Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci.* 30(11):596-602
- Bindewald-Wittich A, Jorzik JJ, Roth F, Holz FG., 2005. cSLO-Fundusautofluoreszenz-Imaging. *Methodische Weiterentwicklungen der konfokalen Scanning-Laser-Ophthalmoskopie*. *Ophthalmologe*, 102: 259–264
- Bird AC., 1991. Doyne Lecture. Pathogenesis of retinal pigment epithelial detachment in the elderly; the relevance of Bruch's membrane change. *Eye (Lond)* 5 (Pt 1), 1-12
- Booij JC, BAAS DC, BEISEKEEVA J, GORGELS TG & BERGEN AA., 2010. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res*, 29, 1-18
- Bosco A, Inman DM, Steele MR, Wu G, Soto I, Marsh-Armstrong N, Hubbard WC, Calkins DJ, Horner PJ, Vetter ML., 2008. Reduced retina microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 1437-1446
- Boulton M, Moriarty P, Jarvis-Evans J & Marcyniuk B., 1994. Regional variation and age-related changes of lysosomal enzymes in the human retinal pigment epithelium. *Br J Ophthalmol*, 78, 125-9.
- Boulton M & Dayhaw-Barker P., 2001. The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye (Lond)* 15, 384-389
- Boya J, Calvo J, Prado A., 1979. The origin of microglial cells. *J. Anat.* 129, 177-186
- Bressler NM., 1999. Degeneration TARM. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin - One-year results of 2 randomized clinical trials - TAP report 1. *arch ophthalmol.* 117(10):1329-45
- Brundula V, Rewcastle NB, Metz, LM, Bernard CC, Yong VW., 2002. Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain* 125, 1297-1308.
- Buschini E, Piras A, Nuzzi R, Vercelli A., 2011. Age related macular degeneration and drusen: neuroinflammation in the retina. *Prog. Neurobiol.* 95, 14-25

- Bustin SA., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169–193
- Cammermeyer J., 1970. The life history of the microglial cell: a light microscopic study. *Neurosci. Res. (NY)* 3, 43-129
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P., 2007. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev.* 53(2):344-54
- Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell LA, Hersch SM, Hobbs W, Vonsattel JP, Cha JH, Friedlander RM., 2000. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* 6, 797-801
- Chen L, Yang P, Kijlstra A., 2002. Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 10, 27-39
- Chen H, Liu B, Lukas TJ & Neufeld AH., 2008. The aged retinal pigment epithelium/choroid: a potential substratum for the pathogenesis of age-related macular degeneration. *PLoS One* 3, e2339
- Chugani DC, Kedersha NL, Rome LH., 1991. Vault immunofluorescence in the brain: new insights regarding the origin of microglia. *J Neurosci.* 11:256–68
- Coleman HR, Chan CC, Ferris FL, 3rd, Chew EY., 2008. Age-related macular degeneration. *Lancet.* 372(9652):1835-45
- Columba-Cabezas S, Serafini B, Ambrosini E, Sanchez M, Penna G, Adorini L, Aloisi F., 2002. Induction of macrophage-derived chemokine/CCL22 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and cultured microglia: implications for disease regulation. *J. Neuroimmunol.* 130, 10-21
- Columba-Cabezas S, Serafini B, Ambrosini E, Aloisi F., 2003. Lymphoid chemokines CCL19 and CCL21 are expressed in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the maintenance of chronic neuroinflammation. *Brain Pathol.* 13, 38-51
- Combadiere C, Feumi C, Raoul W, Keller N, Rodero M, Pezard A, Lavalette S, Houssier M, Jonet L, Picard E, Debre P, Sirinyan M, Deterre P, Ferroukhi T, Cohen SY, Chauvaud D, Jeanny JC, Chemtob S, Behar-Cohen F, Sennlaub F., 2007. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J. Clin. Investig.* 117, 2920-2928
- Cukras CA, Petrou P, Chew EY, Meyerle CB, Wong WT., 2012. Oral minocycline for the treatment of diabetic macular edema: results of a phase I/II clinical study. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 3865-3874
- Dalmau I, Vela JM, Gonzalez B, Castellano B., 1997. Expression of LFA-1alpha and ICAM-1 in the developing rat brain: a potential mechanism for the recruitment of microglial cell precursors. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 103, 163-170
- Damani MR, Zhao L, Fontainhas AM, Amaral J, Fariss RN, Wong WT., 2011. Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Aging Cell* 10, 263-276

- Das A & McGuire PG., 2003. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. *Prog Retin Eye Res*, 22(6), 721-748
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB., 2005. ATP mediates rapid microglial response to local injury in vivo. *Nat Neurosci* 8(6):752-758
- de Jong PT., 2006. Age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. 355(14):1474-85
- de Simone R, Giampaolo A, Giometto B, Gallo P, Levi G, Peshle C, Aloisi F., 1995. The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions. *J Neuropath Exp Neurol* 54:175-187
- Dekkers BG, Bos IST, Gosens R, et al., 2010. The integrin-blocking peptide RGDS inhibits airway smooth muscle remodeling in a guinea pig model of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 181(6) 556-565
- Delcourt C, Diaz JL, Ponton-Sanchez A & Papoz L., 1998. Smoking and age-related macular degeneration. The POLA Study. *Pathologies Oculaires Liees a l'Age*. *Arch Ophthalmol* 116, 1031-1035
- Delori FC, Goger DG & Dorey CK., 2001. Age-related accumulation and spatial distribution of lipofuscin in RPE of normal subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 1855-1866
- Dias JR, Rodrigues EB, Maia M, Magalhaes O, Jr, Penha FM & Farah ME., 2011. Cytokines in neovascular age-related macular degeneration: fundamentals of targeted combination therapy. *Br J Ophthalmol*
- Drew PD, Chavis JA., 2000. Inhibition of microglial cell activation by cortisol. *Brain Res. Bull.* 52, 391-396
- Emmetsberger J, Tsirka SE., 2012. Microglial inhibitory factor (MIF/TKP) mitigates secondary damage following spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* 47, 295-309
- Eter N, Engel DR, Meyer L, Helb HM, Roth F, Maurer J, Holz FG, Kurts C., 2008. In vivo visualization of dendritic cells, macrophages, and microglial cells responding to laser-induced damage in the fundus of the eye. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3649-3658
- Eyo UB, Wu LJ., 2013. Bidirectional microglia-neuron communication in the healthy brain. *Neural Plast.* 2013, 456857
- Fawcett JW, Asher RA., 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 49(6):377-391
- Fedoroff S, Zhai R, Novak JP., 1997. Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J. Neurosci. Res.* 50, 477-486
- Ferrara N., 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25, 581-611
- Ferris FL, 3rd, Fine SL & Hyman L., 1984. Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. *Arch Ophthalmol* 102, 1640-1642

- Finger RP, Fimmers R, Holz FG, Scholl HP., 2011. Incidence of Blindness and Severe Visual Impairment in Germany: Projections for 2030. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (7), S. 4381–4389
- Fletcher AE., 2010. Free Radicals, Antioxidants and Eye Diseases: Evidence from Epidemiological Studies on Cataract and Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmic Res.* 44: 191-198
- Flynn G, Maru S, Loughlin J, Romero IA, Male D., 2003. Regulation of chemokine receptor expression in human microglia and astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 136, 84-93
- Franze K, Grosche J, Skatchkov SN, Schinkinger S, Foja C, Schild D, Uckermann O, Travis K, Reichenbach A & Guck J., 2007. Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 8287-92.
- Frennesson C, Nilsson UL & Nilsson SE., 1995. Colour contrast sensitivity in patients with soft drusen, an early stage of ARM. *Doc Ophthalmol* 90, 377-386
- Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B et al., 2004. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch. Ophthalmol.* 122: 564-572.
- Fritsche LG et al., 2008. Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA. *Nat Genet* 40, 892-896
- Funk M, Karl D, Georgopoulos M, Benesch T, Sacu S, Polak K, Zlabinger GJ, Schmidt-Erfurth U., 2009. Neovascular age-related macular degeneration: intraocular cytokines and growth factors and the influence of therapy with ranibizumab. *Ophthalmology*, 116, 2393-2399
- Galasso JM, Miller MJ, Cowell RM, Harrison JK, Warren JS, Silverstein FS., 2000. Acute excitotoxic injury induces expression of monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor, CCR2, in neonatal rat brain. *Exp. Neurol.* 165, 295-305
- Garden GA, Möller T., 2006. Microglia biology in health and disease. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 1, 127-137
- Gartner TK and Bennett JS., 1985. The tetrapeptide analogue of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding to activated platelets. *J Biol Chem* 260(22) 11891-11894
- Gehrmann J, Banati RB., 1995. Microglial turnover in the injured CNS: Activated microglia undergo delayed DNA fragmentation following peripheral nerve injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:680-688
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M., 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841-845
- Ginsberg M, Pierschbacher MD, Ruoslahti E et al., 1985. Inhibition of fibronectin binding to platelets by proteolytic fragments and synthetic peptides which support fibroblast adhesion. *J Biol Chem* 260(7) 3931-3936
- Glybina IV, Kennedy A, Ashton P, Abrams GW, Lezzi R., 2009. Photoreceptor neuroprotection in RCS rats via low-dose intravitreal sustained-delivery of fluocinolone acetonide. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 4847-4857

- Glybina IV, Kennedy A, Ashton P, Abrams GW, Lezzi R., 2010. Intravitreal delivery of the corticosteroid fluocinolone acetonide attenuates retinal degeneration in S334ter-4 rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 4243-4252
- Gold B et al., 2006. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet* 38, 458-462
- Graeber MB., 2010. Changing face of microglia. *Science* , 330, 783-788
- Grehn F., 2008. *Augenheilkunde*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg
- Green M, Sambrook J., 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.; Auflage: 4
- Grossniklaus HE, Green WR., 2004. Choroidal neovascularization. *American journal of ophthalmology*. 137(3):496-503
- Grossniklaus HE, Kang SJ, Berglin L., 2010. Animal models of choroidal and retinal neovascularization. *Prog. Retin. Eye Res.* 29, 500-519
- Gudi V, Škuljec J, Yildiz Ö, Frichert K, Skripuletz T, Moharreggh-Khiabani D, Voss E, Wissel K, Wolter S, Stangel M., 2011. Spatial and temporal profiles of growth factor expression during CNS demyelination reveal the dynamics of repair priming. *PLoS One*, 6, 22623
- Guerrin M, Scotet E, Malecaze F, Houssaint E, Plöuet J., 1997. Overexpression of vascular endothelial growth factor induces cell transformation in cooperation with fibroblast growth factor 2. *Oncogene*, 14, 463-471
- Gupta N, Brown KE, Milam AH., 2003. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* 76, 463-471
- Haab O., 1885. Erkrankungen der Macula lutea. *Zentralblatt Praktische Augenheilkunde*. 9:383-4
- Haines JL et al., 2005. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308, 419-421
- Hanisch UK., 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40, 140-155
- Hanisch UK, Kettenmann H., 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10: 1387-1394
- Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L., 1998. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10896-10901
- Hausler KG, Prinz M, Nolte C et al., 2002. Interferon differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *Eur J Neurosci U. K.* 16: 2113-22
- Haverstick DM, Cowan JF, Yamada KM et al., 1985. Inhibition of platelet adhesion to fibronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor substrates by a synthetic tetrapeptide derived from the cell-binding domain of fibronectin. *Blood* 66(4) 946-952

- Heiduschka P, Fischer D, Thanos S., 2004. Neuroprotection and regeneration after traumatic lesion of the optic nerve. *Klin. Monbl. Augenheilkd.* 221, 684-701
- Heiduschka P, Thanos S., 2006. Cortisol promotes survival and regeneration of axotomised retinal ganglion cells and enhances effects of aurintricarboxylic acid. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 244, 1512-1521
- Heppner FL, Prinz M & Aguzzi A., 2001. Pathogenesis of prion diseases: possible implications of microglial cells. *Prog Brain Res*, 132, 737-750
- Hogan MJ, Alvarado J., 1967. Studies on the human macula. IV. Aging changes in Bruch's membrane. *arch ophthalmol.* 77(3):410-20
- Holz FG, Spaide RF, Bird AC., 2004. *Alterabhängige Makuladegeneration*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Hortega P.. 1919. El "tercer elemento" de los centros nerviosus. *Bol Soc Esp Biol* 9:69–120
- Hortega P., 1933. Art and artifice in the science of histology. Reprinted in *Histopathology* 22,515-525,
- Hu W, Criswell MH, Fong SL, Temm CJ, Rajashekhar G, Cornell TL, Clauss MA., 2009. Differences in the temporal expression of regulatory growth factors during choroidal neovascular development. *Exp Eye Res*, 88, 79-91
- Huang TL, Chang CH, Lin KH, Sheu MM, Tsai RK., 2011. Lack of protective effect of local administration of triamcinolone or systemic treatment with methylprednisolone against damages caused by optic nerve crush in rats. *Exp. Eye Res.* 92, 112-119
- Huang H, Parlier R, Shen JK, Luttly GA, Viores SA., 2013. VEGF receptor blockade markedly reduces retinal microglia/macrophage infiltration into laserinduced CNV. *PLoS One* 8, 71808
- Hutchinson T., 1874. Symmetrical central choroido-retinal disease occurring in senile persons. *Lond Ophthalmic Hosp Rep J.* 231-44
- Hutchins KD, Dickson DW, Rashbaum WK, Lyman WD., 1990. Localization of morphologically distinct microglial populations in the developing human fetal brain: implications for ontogeny. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 55, 95-102
- Hyman L, Schachat AP, He Q & Leske MC., 2000. Hypertension, cardiovascular disease, and age-related macular degeneration. Age-Related Macular Degeneration Risk Factors Study Group. *Arch Ophthalmol* 118, 351-358
- Ishibashi T, Miller H, Orr G, Sorgente N, Ryan SJ., 1987. Morphologic observations on experimental subretinal neovascularization in the monkey. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28, 1116-1130
- Jager RD, Mieler WF & Miller JW., 2008. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 358, 2606-2617
- Janabi N, Hau I, Tardieu M., 1999. Negative feedback between prostaglandin and alpha- and beta-chemokine synthesis in human microglial cells and astrocytes. *J. Immunol.* 162, 1701-1706

- Jean B, Frohn A, Thiel HJ., 1990. Laser scanning in ophthalmology. *Fortschr Ophthalmol.* 87: 158–167
- Jo N, Maihos C, Ju M, Cheung E, Bradley J, Nishijima K, Robinson GS, Adamis AP, Shima DT., 2006. Inhibition of platelet-derived growth factor B signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization. *Am J Pathol*, 168, 2036-2053
- Jonas JB, Tao Y, Neumaier M, Findeisen P., 2012. Cytokine concentration in aqueous humour of eyes with exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol*, 90, 381-388
- Jun CD, Hoon-Ryu, Um JY, Kim JM, Kang SS, Kim HM, Chung HT., 1994. Involvement of protein kinase C in the inhibition of nitric oxide production from murine microglial cells by glucocorticoid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 633-638
- Kaiser PK., 2006. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: 5-year results of two randomized clinical trials with an open-label extension: TAP report no. 8. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie.* 244(9):1132-42
- Kannan R et al., 2006. Stimulation of apical and basolateral VEGF-A and VEGF-C secretion by oxidative stress in polarized retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis* 12:1649 –1659
- Kanski JJ., 2007. *Clinical Ophthalmology, A Systematic Approach* Butterworth Heinemann
- Kassoff A, Kassoff J, Buehler J, Eglow M, Kaufman F, Mehu M et al., 2001. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss - AREDS Report No. 8. *arch ophthalmol.* 119(10):1417-36
- Khan JC et al., 2006. Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol* 90, 75-80
- Kellner U & Wachtlin J., 2008. *Retina: Diagnostik und Therapie der Erkrankungen des hinteren Augenabschnitts*, Thieme Georg Verlag.
- Kim SU, de Vellis J., 2005. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81:302-313
- Kitamura T, Miyake T, Fujita S., 1984. Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 226, 421-433
- Klein R, Klein BE, Tomany SC, Meuer SM, Huang GH., 2002. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Beaver Dam eye study. *Ophthalmology.* 109(10):1767-79
- Klein R, Peto T, Bird A & Vannewkirk MR., 2004. The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 137, 486-495

- Klein RJ et al., 2005. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308, 385-389
- Klein R, Klein BE, Knudtson MD, Wong TY, Cotch MF, Liu K, et al., 2006. Prevalence of age-related macular degeneration in 4 racial/ethnic groups in the multiethnic study of atherosclerosis. *Ophthalmology*. 113(3):373-80
- Klein R, Klein B, Knudtson EK, Michael D, Meuer S, Swift M, Gangnon R., 2007. Fifteen-Year Cumulative Incidence of AgeRelated Macular Degeneration. In: *Ophthalmology* 114 (2), S. 253–262
- Klein R, Cruickshanks KJ, Nash SD, Krantz EM, Javier Nieto F, Huang GH et al., 2010. The prevalence of age-related macular degeneration and associated risk factors. In: *Arch Ophthalmol* 128 (6), S. 750–758
- Kohno T, Inomata H, Taniguchi Y., 1982. Identification of microglia cell of the rat retina by light and electron microscopy. In: *Jpn J Ophthalmol* 26 (1), S. 53–68
- Kolb H., 1995. Facts and Figures Concerning the Human Retina
- Krause TA, Alex AF, Engel DR, Kurts C, Eter N., 2014. VEGF-production by CCR2-dependent macrophages contributes to laser-induced choroidal neovascularization. *PLoS One*, 9, 94313
- Kreutzberg GW., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19, 312-8.
- Lang G., 2008. Optische Kohärenztomographie (OCT). In: Kröll P, Kühle M, Kühle H, Hrsg., *Augenärztliche Untersuchungsmethoden*, Thieme, 436–443
- Lang G., 2013. Histotechnik. Springer-Verlag, Kapitel 8.3.2.3 Reagenzien
- Langmann T., 2007. Microglia activation in retinal degeneration. *J. Leukoc. Biol.*, 81, 1345-1351
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S., 1992. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48, 405-415
- Lee JE, Liang KJ, Fariss RN et al., 2008. Ex vivo dynamic imaging of retinal microglia using time-lapse confocal microscopy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49: 4169-4176
- Lehnardt S., 2010. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*. 58(3):253-63
- Levkovitch-Verbin H, Waserzoog Y, Vander S, Makarovsky D, Piven I., 2014. Minocycline upregulates pro-survival genes and downregulates pro-apoptotic genes in experimental glaucoma. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 252, 761-772
- Lewis GP, Sethi CS, Carter KM, Charteris DG, Fisher SK., 2005. Microglial cell activation following retinal detachment: a comparison between species. *Mol. Vis.* 11, 491-500
- Ling EA, Penney D, Leblond CP., 1980. Use of carbon labelling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the “ameboid cells” present in the corpus callosum of postnatal rats. *J. Comp. Neurol.* 193, 631-657

- Linnartz B, Wang Y, Neumann H., 2010. Microglial immunoreceptor tyrosine-based activation and inhibition motif signaling in neuroinflammation. *Int J Alzheimers Dis*
- Liu RT, Gao J, Cao S, Sandhu N, Cui JZ, Chou CL, Fang E, Matsubara JA., 2013. Inflammatory mediators induced by amyloid-beta in the retina and RPE in vivo: implications for inflammasome activation in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54, 2225-2237
- Livak KJ, Schmittgen TD., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 25 402-408
- Luhmann UF, Carvalho LS, Robbie SJ, Cowing JA, Duran Y, Munro PM, Bainbridge JW, Ali RR., 2013. Ccl2, Cx3cr1 and Ccl2/Cx3cr1 chemokine deficiencies are not sufficient to cause age-related retinal degeneration. *Exp. Eye Res.* 107, 80-87
- Maguire MG, Fine SL, Folk JC, Bressler NM, Javornik NB, Alexander J et al., 1994. Visual Outcome after Laser Photocoagulation for Subfoveal Choroidal Neovascularization Secondary to Age-Related Macular Degeneration the Influence of Initial Lesion Size and Initial Visual-Acuity. *arch ophthalmol.* 112(4):480-8
- Miao H, Tao Y, Li XX., 2012. Inflammatory cytokines in aqueous humor of patients with choroidal neovascularization. *Mol Vis*, 18, 574-580
- Marchesani O., 1926. Die Morphologie der Glia im Nervus opticus und in der Retina, dargestellt nach den neuesten Untersuchungsmethoden und Untersuchungsergebnissen. *Graefes Arch. Ophthalmol.* 117, 575-605
- Marmorstein AD, Marmorstein LY, Sakaguchi H, Hollyfield JG., 2002. Spectral profiling of autofluorescence associated with lipofuscin, Bruch's Membrane, and sub-RPE deposits in normal and AMD eyes. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 (7), S. 2435–2441
- Martin TA, Mansel R, Jiang WG., 2001. Hepatocyte growth factor modulates vascular endothelial-cadherin expression in human endothelial cells. *Clin Cancer Res*, 7, 734-737
- Masuda J, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K., 2009. Intrathecal delivery of PDGF produces tactile allodynia through its receptors in spinal microglia. *Mol Pain*, 5, 23
- Medzhitov R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435
- Möller T., 2002. Calcium signaling in microglial cells. *Glia* 40, 184-194
- Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD., 2002. Irradiation induces neural precursor cell dysfunction. *Nature Med* 8(9):955-962
- Moon C, Han JR, Park H et al., 2009. Synthetic RGDS peptide attenuates lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation by inhibiting integrin signaled MAP kinase pathways. *Respir Res* 10-18
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1:263-73.

- Nagineeni CN, Samuel W, Nagineeni S, Pardhasaradhi K, Wiggert B, Detrick B, Hooks JJ., 2003. Transforming growth factor-beta induces expression of vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells: involvement of mitogen-activated protein kinases. *J Cell Physiol*, 197, 453-462
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ., 2009. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 132, 288-295
- Nguyen KB, Pender MP., 1998. Phagocytosis of apoptotic lymphocytes by oligodendrocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol* 95:40-46
- Nimmerjahn A., 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318
- Ornitz DM, Itoh N., 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*, 2, REVIEWS3005
- Pauleikhoff D, Barondes MJ, Minassian D, Chisholm IH & Bird AC., 1990. Drusen as risk factors in age related macular disease. *Am J Ophthalmol* 109, 38-43
- Perry VH, Hume DA, Gordon S., 1985. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15:313-26
- Perry VH, Cunningham C, Holmes C., 2007. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol*. 7(2):161-7
- Pierschbacher MD and Ruoslahti E., 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309(5963) 30-33
- Plesch A, Chaperon V, Bille J, Götz ML, Jaeger W., 1986. Laser scanning ophthalmoscopy. *Fortschr Ophthalmol*. 83: 530-531
- Polazzi E, Contestabile A., 2002. Reciprocal interactions between microglia and neurons: From survival to neuropathology. *Rev Neurosci* 13(3):221-242
- Pottratz ST and Martin WJ., 1990. Mechanism of *Pneumocystis carinii* attachment to cultured rat alveolar macrophages. *J Clin Invest* 86(5) 1678-1683
- Power CA, Proudfoot AE., 2001. The chemokine system: novel broad-spectrum therapeutic targets. *Curr. Opin. Pharmacol*. 1, 417-424
- Provis JM, Diaz CM, Penfold PL., 1996. Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies. *Perspect. Dev. Neurobiol*. 3, 213-222
- Pryor WA, Hales BJ, Premovic PI, Church DF., 1983. The radicals in cigarette tar. Their nature and suggested physiological implications. In: *Science* 220 (4595), S. 425-427
- Ransohoff RM, Perry VH., 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*. 27:119-45
- Ransohoff RM, Cardona AE., 2010. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*. 486, 253-262

- Regillo CD, Brown DM, Abraham P, Yue H, Ianchulev T, Schneider S et al., 2008 Randomized, double-masked, sham-controlled trial of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: PIER Study year 1. *American journal of ophthalmology*. 145(2):239-48
- Reichman HR, Farrell CL, Del Maestro RF., 1986. Effects of steroids and nonsteroid anti-inflammatory agents on vascular permeability in a rat glioma model. *J Neurosurg* 65:233-237
- Rein-David B., 2009. Forecasting Age-Related Macular Degeneration through the Year 2050. The Potential Impact of New Treatments. In: *Arch Ophthalmol* 127 (4), S. 533
- Rivest S., 2009. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 429-439
- Rizzolo LJ, Peng S, Luo Y & Xiao W., 2011. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res*, 30, 296-323
- Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY et al., 2006 Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. 355(14):1419-31
- Rosenthal R, Malek G, Salomon N, Peill-Meininghaus M, Coeppicus L, Wohlleben H, Wimmers S, Bowes Rickman C, Strauss O., 2005. The fibroblast growth factor receptors, FGFR-1 and FGFR-2, mediate two independent signaling pathways in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 337, 241-247
- Ryan SJ, Mittl RN, Maumenee AE., 1980. The disciform response: an historical perspective. *Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 215(1):1-20
- Saijo K, Glass CK., 2011. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 775-787
- San Giovanni JP, Chew EY, Clemons TE, Davis MD, Ferris FL, 3rd, Gensler GR et al., 2007. The relationship of dietary lipid intake and age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 20. *arch ophthalmol*. 125(5):671-9
- Sarks SH, Arnold JJ, Killingsworth MC, Sarks JP., 1999. Early drusen formation in the normal and aging eye and their relation to age related maculopathy: a clinicopathological study. *The British journal of ophthalmology*. 83(3):358-68
- Sarks S, Cherepanoff S, Killingsworth M & Sarks J., 2007. Relationship of Basal laminar deposit and membranous debris to the clinical presentation of early age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 968-77
- Schmittgen TD, Livak KJ., 2008. Analyzing Real-Time PCR data by the comparative Ct method. *Nature Protocols* 3 1101-1108
- Schmitz-Valckenberg S, Jorzik J, Unnebrink K, Holz FG., 2002. Analysis of digital scanning laser ophthalmoscopy fundus autofluorescence images of geographic

atrophy in advanced age-related macular degeneration. In: Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 240 (2), S.73-78

Schrader WF., 2006. Altersbedingte Makuladegeneration. Soziökonomische Zeitbombe in der alternden Gesellschaft. Ophthalmologe 103: 742-748

Schütz E & Thanos S., 2004. Microglia-targeted pharmacotherapy in retinal neurodegenerative diseases. Curr Drug Targets, 5, 619-27

Seddon JM et al., 1994. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. Jama 272, 1413-1420

Seddon JM, George S, Rosner B, Rifai N., 2005. Progression of age-related macular degeneration: prospective assessment of C-reactive protein, interleukin 6, and other cardiovascular biomarkers. Arch Ophthalmol, 123, 774-782

Shen D, Cao X, Zhao L, Tuo J, Wong WT, Chan CC., 2011. Naloxone ameliorates retinal lesions in Ccl2/Cx3cr1 double-deficient mice via modulation of microglia. Invest Ophthalmol Vis Sci, 52, 2897-2904.

Shen W, Lee SR, Araujo J, Chung SH, Zhu L, Gillies MC., 2014. Effect of glucocorticoids on neuronal and vascular pathology in a transgenic model of selective Müller cell ablation. Glia 62, 1110-1124

Shi SR, Y. Shi, C. R. Taylor., 2011. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. In: The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. Band 59, Nummer 1, S. 13–32

Shin WH, Lee D, Park KW, Kim SP, Yang M, Joe E, Jin BK., 2004. Microglia expressing Interleukin-13 undergo cell death and contribute to neuronal survival in vivo. Glia 46:142-152

Simpson J, Rezaie P, Newcombe J, Cuzner ML, Male D, Woodroffe MN., 2000. Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. J. Neuroimmunol. 108, 192-200

Soubrane G, Cohen SY, Delayre T, Tassin J, Hartmann MP, Coscas GJ, Courtois Y, Jeanny JC., 1994. Basic fibroblast growth factor experimentally induced choroidal angiogenesis in the minipig. Curr Eye Res, 13, 183-195

Spaide RF, Laud K, Fine HF, Klanchnik JM, Jr., Meyerle CB, Yannuzzi LA et al., 2006. Intravitreal bevacizumab treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. Retina Philadelphia, Pa. 26(4):383-90

Stahl A, Paschek L, Martin G, Feltgen N, Hansen LL, Agostini HT., 2009. Combinatory inhibition of VEGF and FGF-2 is superior to solitary VEGF inhibition in an in vitro model of RPE-induced angiogenesis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 247, 767-773

Stanton CM, Wright AF., 2014. Inflammatory biomarkers for AMD. Adv Exp Med Biol, 801, 251-257

- Steinberg RH., 1985. Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc Ophthalmol*, 60, 327-46.
- Stirling DP, Khodarahmi K, Liu J, McPhail LT, McBride CB, Steeves JD, Ramer MS, Tetzlaff W., 2004. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 24, 2182-2190
- Streilein JW, Ma N, Wenkel H et al., 2002. Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res.* 42: 487-495
- Streit WJ., 2002. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40, 133-139
- Sun C, Li XX, He XJ, Zhang Q, Tao Y., 2013. Neuroprotective effect of minocycline in a rat model of branch retinal vein occlusion. *Exp. Eye Res.* 113, 105-116
- Sunness JS et al., 1997. Visual function abnormalities and prognosis in eyes with age-related geographic atrophy of the macula and good visual acuity. *Ophthalmology* 104, 1677-1691
- Suzuki H, Franz H, Yamamoto T, Iwasaki Y, Konno H., 1988. Identification of the normal microglial population in human and rodent nervous tissue using lectin histochemistry. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 14, 221-227
- Suzuki H, Sugimura Y, Iwama S, Suzuki H, Nobuaki O, Nagasaki H, Arima H, Sawada M, Oiso Y., 2010. Minocycline prevents osmotic demyelination syndrome by inhibiting the activation of microglia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 2090-2098
- Takeda K, Kaisho T, Akira, S., 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335-376
- Thanos S, Mey J, Wild M., 1993. Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro. *J. Neurosci.* 13, 455-466
- Thomas DD, Baseman JB, Alderete JF., 1985. Fibronectin tetrapeptide is target for syphilis spirochete cytoadherence. *J Exp Med* 162(5) 1715-1719
- Thornton J, Edwards R, Mitchell P, Harrison RA, Buchan I, Kelly SP., 2005. Smoking and age-related macular degeneration. A review of association. In: *Eye (Lond)* 19 (9), S. 935-944
- Tikka T, Fiebich BL, Goldstein G, Keinänen R, Koistinaho J., 2001. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci* 21(8):2580-2588
- Tikka TM, Koistinaho JE., 2001. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J. Immunol.* 166, 7527-7533
- Tobe T, Ortega S, Luna JD, Ozaki H, Okamoto N, Derevjanić NL, Viores SA, Basilico C, Campochiaro PA., 1998. Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *Am. J. Pathol.* 153, 1641-1646

- Tolentino MJ, Miller S, Gaudio AR, Sandberg MA., 1994. Visual field deficits in early age-related macular degeneration. *Vision Res* 34, 409-413
- Tomany SC, Wang JJ, Van Leeuwen R, Klein R, Mitchell P, Vingerling JR et al., 2004. Risk factors for incident age-related macular degeneration: pooled findings from 3 continents. *Ophthalmology*. 111(7):1280-7
- van Rossum D, Hanisch UK., 2004. Microglia. *Metab. Brain Dis.* 19, 393-411
- Vincent JA, Mohr S., 2007. Inhibition of caspase-1/interleukin-1 beta signalling prevents degeneration of retinal capillaries in diabetes and galactosemia. *Diabetes* 56, 224-230
- Voss EV, Škuljec J, Gudi V, Skripuletz T, Pul R, Trebst C, Stangel M., 2012. Characterisation of microglia during de- and remyelination: can they create a repair promoting environment? *Neurobiol Dis*, 45, 519-528
- Wang J, Tsirka S., 2005. Tuftsin fragment 1-3 is beneficial when delivered after the induction of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 36, 613-618
- Wang J, Ohno-Matsui K, Yoshida T, Shimada N, Ichinose S, Sato T, Mochizuki M, Morita I., 2009. Amyloid-beta up-regulates complement factor B in retinal pigment epithelial cells through cytokines released from recruited macrophages/microglia: Another mechanism of complement activation in age-related macular degeneration. *J Cell Physiol*, 220, 119-128
- Webb RH, Hughes GW, Delori FC., 1987. Confocal scanning laser ophthalmoscope. *Appl Ophthalmology* 25: 1492–1499
- Webb RH, Hughes GW., 1981. Scanning laser ophthalmoscope. *IEEE Trans Biomed Eng* 28: 488–492
- Williams K, Bar-Or A, Ulvestad E, Olivier A, Antel JP, Yong V., 1992. Biology of adult human microglia in culture: comparisons with peripheral blood monocytes and astrocytes. *J Neuropath Exp Neurol* 51:538-549
- Witting A, Müller P, Herrmann A, Kettenmann H, Nolte C., 2000. Phagocytic clearance of apoptotic neurons by Microglia/Brain macrophages in vitro: involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition. *J. Neurochem.* 75, 1060-1070
- Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S., 2002. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J. Neurosci.* 22, 1763-1771
- Xu H, Chen M, Mayer EJ, Forrester JV, Dick AD., 2007. Turnover of resident retinal microglia in the normal adult mouse. *Glia* 55, 1189-1198
- Xu H, Chen M, Manivannan A, Lois N, Forrester JV., 2008. Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice. In: *Aging Cell* 7 (1), S. 58–68
- Xu H, Chen M, Forrester JV., 2009. Para-inflammation in the aging retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 28, 348-368

Yang L, Kim JH, Kovacs KD, Arroyo JG, Chen DF., 2009. Minocycline inhibition of photoreceptor degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 127, 1475-1480

Yates JR et al., 2007. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 357, 553-561

Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM., 2004. The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol.* 3, 744-751.

Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hökfelt T, Koistinaho J., 1998. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*95, 15769-15774

Zarbin MA., 2004. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *arch ophthalmol.* 122(4):598-614

Zarranz-Ventura J, Fernández-Robredo P, Recalde S, Salinas-Alamán A, Borrás-Cuesta F, Dotor J, García-Layana A., 2013. Transforming growth factor-beta inhibition reduces progression of early choroidal neovascularization lesions in rats: P17 and P144 peptides. *PloS One*, 8, 65434

Zehetner C, Kirchmair R, Neururer SB, Kralinger MT, Bechrakis NE, Kieselbach GF., 2014. Systemic upregulation of PDGF-B in patients with neovascular AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55, 337-344

Zeng J, Jiang D, Liu X, Zhu X, Tang L., 2004. Matrix metalloproteinases expression in choroidal neovascular membranes. *Yan Ke Xue Bao*, 20, 191-193

Zhang C, Lei B, Lam TT, Yang F, Sinha D, Tso MO., 2004. Neuroprotection of photoreceptors by minocycline in light-induced retinal degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 2753-2759

Zhao L, Ma W, Fariss RN, Wong WT., 2011. Minocycline attenuates photoreceptor degeneration in a mouse model of subretinal hemorrhage microglial: inhibition as a potential therapeutic strategy. *Am. J. Pathol.* 179, 1265-1277

Zhu S, Stavrovskaya, IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, Sarang S, Liu AS, Hartley DM, Wu DC, Gullans S, Ferrante RJ, Przedborski S, Kristal BS, Friedlander RM., 2002. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 417, 74-78

9. Anhang

9.1. Lebenslauf

9.2. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich:

PD Dr. rer. nat. Peter Heiduschka für die Betreuung meiner Arbeit, für seine Diskussionsbereitschaft, sein Vertrauen und die Freiheiten, die er mir während der letzten Jahre entgegengebracht hat.

Univ.-Prof. Dr. med. Nicole Eter für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Klinik für Augenheilkunde anfertigen zu können. Weiterhin danke ich ihr für ihre Anregungen und Hilfestellungen.

Prof. Dr. Joachim Kurtz und Prof. Dr. Christian Stock für ihre unkomplizierte Zusage als Mitglieder meines Promotionskomitees zu fungieren.

Ein ganz großes Dankeschön geht an alle Mitglieder des Forschungslabors. Danke für die tolle Zusammenarbeit, die Atmosphäre, das warmherzige Klima und jeden kleinen Spaß. Gerburg für die exzellente Einführung in die Einbettung der Augen und für jede spaßige Unterhaltung. Tanja für die Hilfe bei der RNA-Aufreinigung, den PCR-Methoden und ihre Lache. Dr. Anne Alex für die Einführung in die laserinduzierte CNV und die *in-vivo*-Methoden.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der Klinik für Augenheilkunde bedanken. Ihr habt mir alle geholfen und ward jederzeit bereit mir zu helfen.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Eltern und Familie, die mich während der letzten Jahre und im speziellen in der Studienzeit voll und ganz unterstützt haben.

Mein größter Dank geht aber an meine Frau Julia. Danke für deine Liebe, dein Vertrauen, deine Geduld und deinen Rückhalt. Einfach danke für alles.

9.3. Versicherung

Versicherung nach § 6 Abs. 3, Nr. 5, 6, 9

Hiermit versichere ich, dass ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Münster,.....

.....

(Unterschrift)

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben habe und die Dissertation nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegen hat.

Münster,.....

.....

(Unterschrift)

Hiermit erkläre ich mich mit der Zulassung von Zuhörerinnen/Zuhörern beim öffentlichen Teil der Disputation einverstanden.*

Münster,.....

.....

(Unterschrift)

* Auf begründeten schriftlichen Antrag der Kandidatin/des Kandidaten oder des Promotionskomitees an den Promotionsausschuss, kann die Öffentlichkeit von Vortrag und Diskussion ausgeschlossen werden. (§ 9 Abs. 8)

9.4. Eidesstattliche Versicherung

Versicherung nach § 6 Abs. 3 (2)

Hiermit versichere ich, dass ich nicht wegen einer Straftat zu einer Strafe von mehr als einem Jahr Freiheitsentzug verurteilt worden bin, zu deren Begehung ich meine wissenschaftliche Qualifikation mussbraucht habe.

Münster,.....

.....

(Unterschrift)