

Molekulare Charakterisierung der Mikroglia- aktivierung bei retinaler Degeneration im Retinoschisin-defizienten Mausmodell



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III –
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN – DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Stefanie Ebert

aus Glonn

Juni 2010

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von März 2007 bis Juni 2010 am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg unter der Anleitung von Herrn PD Dr. Thomas Langmann.

Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 30. Juni 2010

Promotionskolloquium am: 12. Oktober 2010

Zusammensetzung des Prüfungsausschusses:

Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Wirth

Erstgutachter: PD Dr. Thomas Langmann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

Drittprüfer: Prof. Dr. Armin Kurtz

Meinen Eltern



*„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach der Zeit und den Umständen das Möglichste getan hat.“*

Johann Wolfgang von Goethe
(1749 - 1832)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Zielsetzung der Arbeit.....	1
2 Einleitung	2
2.1 Aufbau und Funktion der Säugernetzhaut.....	2
2.2 Mikroglia	3
2.2.1 Mikroglia im zentralen Nervensystem und der Netzhaut	3
2.2.2 Funktionen der Mikroglia.....	4
2.2.3 Mikroglia und Netzhautdegeneration	5
2.3 X-gebundene Retinoschisis: Modell für Photorezeptorzelltod bei erblicher Netzhautdystrophie.....	6
2.3.1 Photorezeptordegeneration infolge apoptotischer Mechanismen	6
2.3.2 Genetik, Struktur und Funktion von Retinoschisin	7
2.3.3 Mausmodelle für X-gebundene juvenile Retinoschisis	8
2.4 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren.....	9
2.4.1 Omega-3-Fettsäuren in der Netzhaut	10
2.5 Licht-induzierte Photorezeptordegeneration: ein weiteres Modell für Photorezeptor-Apoptose.....	11
2.5.1 Rolle der Mikroglia bei Licht-induziertem Netzhautschaden	12
2.5.2 Licht-induzierter, oxidativer Stress der Netzhaut	12
2.6 Chondroitinsulfatproteoglykan Disaccharid (CSPG-DS)	14
3 Material	15
3.1 Zellen.....	15
3.2 Oligonukleotide für real time RT-PCR	15
3.3 Enzyme.....	17
3.4 Antikörper	17
3.5 Chemikalien und Kit-Systeme	18
3.6 Medien, Puffer und Lösungen	19
3.7 Verbrauchsmaterialien.....	20
3.8 Geräte und Software	21
4 Methoden.....	22
4.1 Zellkultur	22
4.1.1 Allgemeines	22
4.1.2 Zelllinien.....	22
4.1.2.1 Weiterkultur	22
4.1.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellernte	22
4.1.2.3 <i>In vitro</i> Stimulationen	23
4.1.2.4 Kryokonservierung von Zellen	23
4.2 Mauslinien und Haltung	24
4.2.1 Maus-Genotypisierungen.....	24
4.2.2 DHA Fütterungsstudie.....	25
4.2.3 Blaulicht-induzierte Photorezeptordegeneration	26

4.3	Präparation und Kultivierung von <i>ex vivo</i> Mikroglia	27
4.4	DNA-spezifische molekularbiologische Methoden	27
4.4.1	DNA-Extraktion aus Mausgeweben	27
4.4.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	28
4.4.3	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	28
4.4.4	Auftrennung und Analyse von DNA	29
4.4.5	DNA-Mikroarray Analyse	29
4.4.6	Bioinformatische Datenanalyse	30
4.5	RNA-spezifische molekularbiologische Methoden	31
4.5.1	RNA-Isolierung	31
4.5.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	31
4.5.3	RNA-Qualitätskontrolle	32
4.5.4	Reverse Transkription	32
4.5.5	TaqMan Technologie	33
4.5.6	Relative Quantifizierung	34
4.6	Lipidanalysen	35
4.6.1	Fettsäurezusammensetzung	35
4.6.2	Phospholipidanalyse	36
4.7	Funktionsassays	36
4.7.1	Phagozytose Assay	37
4.7.2	Migrationsassay	37
4.7.3	Griess Reagenz System	37
4.7.4	Zytotoxizitätsassay	37
4.7.5	Apoptose Assay	38
4.8	Morphologische und histologische Methoden	38
4.8.1	Fluoreszenzmikroskopie	38
4.8.2	Immunzytochemie	38
4.8.3	Lipidfärbung mit Nilrot	39
4.8.4	Kryoeinbettung von Geweben	39
4.8.5	Histologische Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin	40
4.8.6	Immunhistochemie	40
4.8.6.1	Antikörperfärbungen an Gewebeschnitten	40
4.8.6.2	Antikörperfärbungen an vollständigen Geweben	40
4.8.7	TUNEL-Assay	41
5	Ergebnisse	43
5.1	Charakterisierung der Rs1h-defizienten Netzhaut	43
5.1.1	Histologische Evaluierung der Mikrogliaaktivierung bei der postnatalen Entwicklung	43
5.1.2	Histologische Charakterisierung der Müllerzellaktivierung und Photorezeptordegeneration	46
5.1.3	Transkriptionelle Veränderungen in der Netzhaut von Rs1h-defizienten Mäusen	48
5.1.4	<i>In vitro</i> Akkumulierung von Lipidtröpfchen in Mikroglia	49
5.1.5	Fettsäure- und Phospholipidgehalt von Rs1h ^{-/-} Netzhäuten	51
5.2	Retinale Anreicherung von DHA <i>in vivo</i>	52
5.3	Einfluss der DHA-Supplementierung auf die frühe retinale Degeneration	53

5.4	Langzeiteffekt der DHA-Supplementierung auf die retinale Degeneration..	55
5.5	Einfluss der DHA-Ergänzung auf die Mikrogliaaktivierung <i>in vivo</i>	57
5.6	Einfluss der DHA-Ergänzung auf Müllerzellen <i>in vivo</i>	58
5.7	Modulation von Lipidtröpfchen in Mikroglia durch DHA <i>in vitro</i>	60
5.8	Blaulicht-induzierte Mikrogliaaktivierung <i>in vivo</i>	62
5.8.1	Histologische Charakterisierung retinaler Mikroglia nach Behandlung mit Blaulicht	62
5.8.2	Transkriptionelle Veränderungen nach Blaulicht-induzierter Schädigung der Netzhaut	63
5.9	<i>In vitro</i> Mikroglia Regulation durch CSPG-DS und daraus resultierende Effekte auf Photorezeptorzellen	66
5.9.1	Genomweite Expressionsanalyse und Genvalidierung.....	67
5.9.2	Einfluss von CSPG-DS auf Mikroglia-Funktionen	69
5.9.3	Einfluss von Mikroglia-konditioniertem Medium auf 661W Photorezeptorzellen	71
6	Diskussion	73
6.1	Aktivierung retinaler Mikroglia: Ein Vergleich zwischen Wildtyp und Rs1h ^{-Y} Mausmodell	73
6.1.1	Ramifizierte Mikroglia in der gesunden Netzhaut der Maus	73
6.1.2	Aktivierte Mikroglia in der Netzhaut Rs1h-defizienter Mäuse	74
6.2	Aktivierung der Müllerzellen in der Netzhaut von Rs1h ^{-Y} -Mäusen.....	76
6.3	Degeneration der Photorezeptoren im Rs1h-Mausmodell	76
6.4	Verminderter DHA-Gehalt in der Netzhaut von Rs1h ^{-Y} Mäusen	78
6.4.1	Aktivierung retinaler Mikroglia und Lipidmetabolismus	79
6.4.2	DHA-Supplementierung als Therapiemöglichkeit bei Rs1h- defizienten Mäusen	80
6.5	Blaulicht-induzierte Photorezeptordegeneration.....	81
6.5.1	Aktivierung und Migration der Mikroglia in Blaulicht-induzierten Läsionen	81
6.5.2	Transkriptioneller Phänotyp retinaler Mikroglia nach Bestrahlung mit Blaulicht.....	82
6.5.3	Induktion von oxidativen Stress-assoziierten Transkripten nach Blaulichtschaden	83
6.6	Phänotypische Charakterisierung CSPG-DS-stimulierter BV2 Mikroglia	85
6.6.1	Transkriptionelle Charakterisierung CSPG-DS-aktivierter Mikroglia.....	85
6.6.2	Funktionelle Analyse CSPG-DS aktivierter Mikroglia	86
7	Zusammenfassung	88
	Literaturverzeichnis.....	IX
	Abbildungsverzeichnis	XXIII
	Tabellenverzeichnis.....	XXV
	Publikationen	XXVI
	Danksagungen	XXVII
	Lebenslauf.....	XXVIII

Abkürzungsverzeichnis

ϵ	molarer Extinktionskoeffizient [cm^2/mol]
AA	<i>arachidonic acid</i>
ADA	<i>adrenic acid</i>
Adfp	<i>adipose differentiation related protein</i>
Agxt2l1	<i>alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1</i>
ALA	<i>α-linolenic acid</i>
Alox5ap	<i>arachidonate 5-lipoxygenase activating protein</i>
AMD	<i>age-related macular degeneration</i>
AP-1	<i>transcription factor AP-1</i>
Apaf1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
ATPase	Adenosintriphosphat Synthase
BM	Bruchsche Membran
BSA	bovines Serumalbumin
c	<i>concentration</i> [Konzentration der absorbierenden Moleküle/mol]
Casp8	Caspase 8
Cbr2	<i>carbonyl reductase 2</i>
Ccl2	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
Ccl5	<i>chemokine (C-C motif) ligand 5</i>
Ccl7	<i>chemokine (C-C motif) ligand 7</i>
Cd28	<i>CD28 antigen</i>
Cd36	<i>CD36 antigen</i>
Cd68	<i>CD68 antigen</i>
Cd95	<i>CD95 antigen</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
Ch25h	<i>cholesterol 25-hydroxylase</i>
Chi3l1	<i>chitinase 3-like 1</i>
Chl1	<i>cell adhesion molecule with homology to L1CAM</i>
Clec4n	<i>C-type lectin domain family 4, member n</i>
Clec7a	<i>C-type lectin domain family 7, member a</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CO ₂	Kohlendioxid
Cox2	cyclooxygenase 2
Crispld2	<i>cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2</i>
cRNA	<i>copy RNA</i>
CSPG-DS	Chondroitinsulfatproteoglykan Disaccharid
C _T	<i>cycle threshold</i>
CX3CL1	<i>chemokine (C-X3-C motif) ligand 1</i>
CX3CR1	<i>chemokine (C-X3-C motif) receptor 1</i>
Cxcl10	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>
Cxcr4	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
d	Schichtdicke [cm]
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHA	<i>docosahexaenoic acid</i>
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNAse	<i>deoxyribonuclease</i>
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DPA	<i>docosapentaenoic acid</i>
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Extinktion
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EAU	experimentelle autoimmune Uveitis
Edn2	<i>endothelin 2</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
Egr1	<i>early growth response gene 1</i>
Emr1	<i>EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1</i>
EPA	<i>eicosapentaenoic acid</i>
ERG	Elektroretinogramm
Erk1	<i>extracellular signal-regulated kinase 1</i>
Erk2	<i>extracellular signal-regulated kinase 2</i>
ESI-MS/MS	Elektronensprayionisation Tandem-Massenspektrometrie
EST	<i>expressed sequence tag</i>
EtOH	Ethanol
F4/80	<i>surface glycoprotein F4/80</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FcγRIIIa	<i>Fc γ receptor III</i>
Fgf2	<i>fibroblast growth factor 2</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
Fut11	<i>fucosyltransferase 11</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
Gas6	<i>growth arrest specific 6</i>
GCL	<i>ganglion cell layer</i>
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
gDNA	genomische DANN
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEDI	<i>gene expression dynamics inspector</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factors</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Gpr37	<i>G protein-coupled receptor 37</i>
GSTM1	<i>glutathione S-transferase, mu 1</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
H2Ab1	<i>histocompatibility 2 class II antigen A β 1</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hmox1	<i>heme oxygenase 1</i>
Iba1	<i>ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
Ifi44	<i>interferon-induced protein 44</i>
Ifi7	<i>interferon-induced protein 7</i>
Ifit1	<i>interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>
Ifit3	<i>interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3</i>
Ifitm1	<i>interferon induced transmembrane protein 1</i>
IFNγ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
Igtp	<i>interferon gamma induced GTPase</i>
Il-18	Interleukin 18
Il-1β	Interleukin 1 β
Il-33	Interleukin 33
Il-6	Interleukin 6
Il-8	Interleukin 8
INL	<i>inner nuclear layer</i>
iNos	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
INT	Iodphenylnitrophenylphenyltetrazolium
IPL	<i>inner plexiform layer</i>
IR	Infrarot
Irf7	<i>interferon regulatory factor 7</i>
Irgm1	<i>immunity-related GTPase family M member 1</i>
IS	<i>inner segments</i>
JAK/STAT	<i>janus kinase/signal transducers and activators of transcription.</i>

KCl	Kaliumchlorid
KFB	Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik
KM	konditioniertes Medium
LacZ	β -Galactosidase
Lcn2	<i>lipocalin 2</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
Lif	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LNA	<i>locked nucleic acids</i>
Lpl	<i>lipoprotein lipase</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
LTC ₄	Leukotrien C ₄
Ltc4s	<i>leukotriene C4 synthase</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
MG	Mikroglia
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
M-MuLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
Mt1	<i>metallothionein 1</i>
Mt2	<i>metallothionein 2</i>
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamadenin dinucleotidhydrogen
NADPH	Nicotinamadenin dinukleotidphosphat (reduziert)
NaN ₃	Natriumazid
NED	N-naphthylethylen-diamindihydrochlorid
Neo ^r	Neomycinresistenz
NFL	<i>nerve fiber layer</i>
NFκB	<i>nuclear factor κ B</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
Nox	<i>NADPH oxidase</i>
Nox1	<i>NADPH oxidase 1</i>
Nox2	<i>NADPH oxidase 2</i>
Noxa1	<i>NADPH oxidase activator 1</i>
Noxo1	<i>NADPH oxidase organizer 1</i>
O.C.T	<i>optimum cutting temperature</i>
O ₂ ⁻	Superoxid
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Men</i>
ONL	<i>outer nuclear layer</i>
OPL	<i>outer plexiform layer</i>
OS	<i>outer segments</i>
Osmr	<i>oncostatin M receptor</i>
P	Phosphorylierung
p22phox	<i>superoxide-generating NADPH oxidase light chain subunit</i>
p40phox	<i>neutrophil cytosolic factor 4</i>
p47phox	<i>neutrophil cytosolic factor 1</i>
p67phox	<i>neutrophil cytosolic factor 2</i>
Parp10	<i>poly (adp-ribose) polymerase family, member 10</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
Pgf	<i>placental growth factor</i>
PGI	Prostacyclin
Phox	<i>phagocyte NADPH oxidase</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Pla2	<i>phospholipase A2</i>
PNA	<i>peanut agglutinin</i>

POD	Peroxidase
PPAR	<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator activated receptor γ</i>
PSD95	<i>postsynaptic density protein 95</i>
PtdCho	Phosphatidylcholin
PtdEtn	Phosphatidylethanolamin
PtdInsP	Phosphatidylinositolphosphat
PtdSer	Phosphatidylserin
Ptgs2	<i>prostaglandin synthase 2</i>
PUFA	polyunsaturated fatty acid
qRT-PCR	quantitative real time RT-PCR
Rac	<i>Ras-related c3 botulinum substrate</i>
Rac1	<i>Ras-related c3 botulinum substrate 1</i>
Rac2	<i>Ras-related c3 botulinum substrate 2</i>
Rbp1	<i>retinol binding protein 1</i>
Rfx2	<i>regulatory factor X, 2</i>
Rho	Rhodopsin
RhoGDI	<i>RhoGDP-dissociation inhibitor</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
Rlbp1	<i>retinaldehyde binding protein 1</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RMA	<i>robust multichip analysis</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RP	Retinitis Pigmentosa
RPE	retinales Pigmentepithel
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RQ	relative Quantifizierung
rRNA	ribosomale RNA
Rs1	<i>retinoschisis (X-linked, juvenile) 1 (human)</i>
RS1	Retinoschisin 1
Rs1h	<i>retinoschisis-1 homologue</i>
Rs1h ^{-Y}	Retinoschisin knockout Maus
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SAM	<i>significance analysis of microarrays</i>
SARM1	<i>Sterile α- and armadillo-motif-containing protein 1</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Serpina3h	<i>serpine peptidase inhibitor, clade e (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1),</i>
Serpina3n	<i>serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade a, member 3n</i>
Socs3	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
SOD	Superoxiddismutase
SOM	<i>self-organizing maps</i>
Sprr1a	<i>small prolin-rich protein1A</i>
STRY	<i>sex determining region of chromosome Y</i>
Steap4	<i>six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 4</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TdT	terminale Deoxynukleotidyltrasferase
Timp1	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 1</i>
Tm4sf1	<i>transmembrane-4-l-six-family-1</i>
Tmbim1	<i>transmembrane bax inhibitor motif containing 1</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Tnfa	<i>tumor necrosis factor α</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
TXA	Thromboxan
UPL	<i>Universal Probe Library</i>
UV	ultraviolett
XLRS	<i>X-linked juvenile retinoschisis</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Zielsetzung der Arbeit

Erblichen und Licht-induzierten Netzhautdystrophien ist die Degeneration von Photorezeptoren durch Mechanismen der Apoptose gemeinsam. Frühere Arbeiten an Retinoschisin-defizienten Mäusen, einem Modell der X-gebundenen juvenilen Retinoschisis, und Blaulicht-bestrahlten Mäusen weisen darauf hin, dass eine Aktivierung der retinalen Mikroglia in der Netzhaut apoptotischen Mechanismen zeitlich vorausgeht. Diese Aktivierung könnte somit kausal mit der Apoptose der Photorezeptoren in Zusammenhang stehen. Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit lag deshalb in der molekularen Charakterisierung von Mikrogliazellen bei retinaler Degeneration im Mausmodell der Retinoschisin-Defizienz.

Ziel war neben der histologischen Visualisierung die Charakterisierung und Aufklärung der spezifischen Aktivierungsmechanismen retinaler Mikrogliazellen. Hierfür wurde auf zwei unterschiedliche Modellsysteme zurückgegriffen. Zum einen das Rs1h-defiziente Mausmodell als Beispiel für hereditäre retinale Degeneration und zum anderen das Blaulicht-induzierte Modell der Netzhautdegeneration als nicht genetisches Beispiel. Analysen auf transkriptioneller Ebene sollten dabei insbesondere Rückschlüsse auf Mikroglia-spezifische Signalmechanismen sowie deren pro-apoptotisches Potential auf Photorezeptoren liefern. Zusätzlich wurden auch *in vitro* Zellkultursysteme unterstützend zur Analyse der Mikrogliaaktivierung eingesetzt.

In dem komplementären Ansatz bestehend aus *in vivo* und *in vitro* Experimenten sollten auch Fragestellungen im Hinblick auf die Identifizierung und Charakterisierung neuer Therapieansätze bei retinaler Degeneration bearbeitet werden:

1. Identifizierung von molekularen Markern und Genexpressionsprofilen aktivierter Mikroglia im Erkrankungsverlauf Rs1h-defizienter Mäuse sowie im Licht-induzierten Modell der Photorezeptordegeneration im Vergleich zu Kontrolltieren.
2. Evaluierung eines möglichen Therapieansatzes unter Zuhilfenahme einer Nahrungsmittelergänzung mit einer Omega-3-Fettsäure.
3. Assoziation erkrankungsbezogener bzw. -unabhängiger Expressionsnetzwerke der Mikrogliaaktivierung mit pro-apoptotischen Signalmechanismen der retinalen Degeneration.
4. Charakterisierung apoptotischer Effekte *in vitro* aktivierter Mikroglia auf kookultierte Photorezeptoren und Evaluierung von Chondroitinsulfatproteoglykan-Disaccharid (CSPG-DS) als Inhibitor der Mikrogliaaktivierung.

2 Einleitung

2.1 Aufbau und Funktion der Säugernetzhaut

Die Netzhaut (Retina) entspricht einem hoch spezialisierten, mehrschichtigen neuronalen Gewebe und befindet sich im proximalen Teil des Auges (Abb. 1: A). Das retinale Pigmentepithel (RPE) beinhaltet Teile der Phototransduktion und ist an der ständigen Regeneration des Sehpigments beteiligt. Für die Lichtwahrnehmung und Reizweiterleitung verfügt die Netzhaut über zwei verschiedene Photorezeptortypen: Zapfen und Stäbchen.

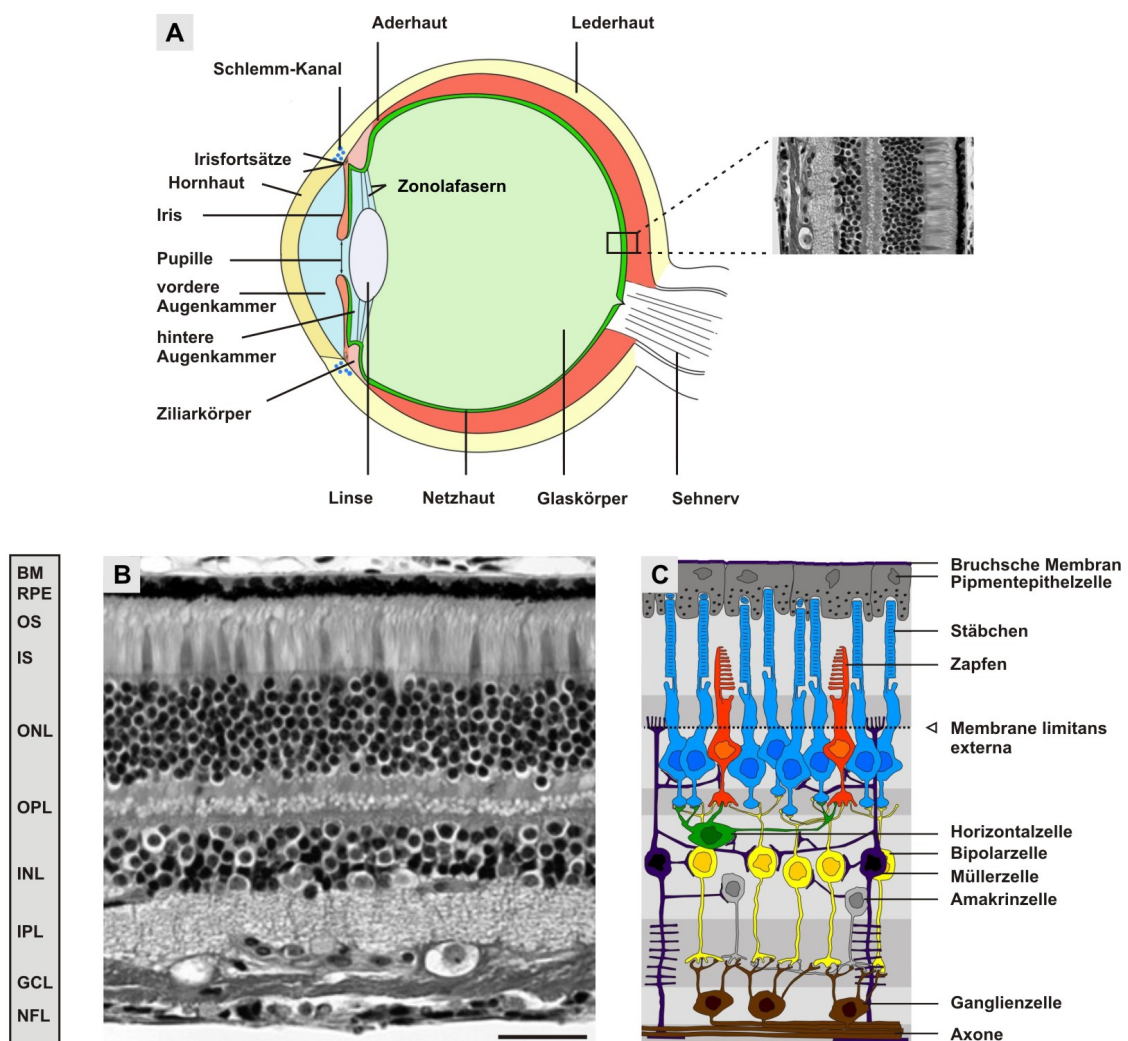


Abb. 1: Übersichtsdarstellung des menschlichen Auges mit einer detaillierten Abbildung der menschlichen Netzhaut. (A) Komplexer Aufbau des menschlichen Auges als sagittaler Querschnitt. (B) Hämatoxylin-Eosin-Färbung der menschlichen Netzhaut mit (C) korrespondierender schematischen Übersicht der einzelnen retinalen Schichten. Maßstab, 50 µm. BM, Bruchsche Membran; GCL, ganglion cell layer (Ganglionzellschicht); INL, inner nuclear layer (innere Körnerschicht); IPL, inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht); IS, inner segments (innere Photorezeptorsegmente); NFL, nerve fiber layer (Nervenfaserschicht); ONL, outer nuclear layer (äußere Körnerschicht); OPL, outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht); OS, outer segments (äußere Photorezeptorsegmente); RPE, retinales Pigmentepithel. Abbildungen verändert nach <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1011033> (A und C) und <http://pathology.wustl.edu/research/corbolab/projects.htm> (B)

Die äußere Körnerschicht (ONL, *outer nuclear layer*) der Netzhaut beherbergt die Zellkerne der Photorezeptoren. Vor allem in der Fovea lokalisiert, besitzt die adulte Netzhaut etwa 7 Millionen Zapfen, die für das photopische Sehen verantwortlich sind. Die Stäbchen, etwa 75-150 Millionen, sorgen hingegen für skotopisches Sehen und sind mit Ausnahme der Fovea über die gesamte Netzhaut verteilt (Osterberg, 1935). Wird ein Photon von einem Chromophor in den Außensegmenten eines Photorezeptors absorbiert, wird eine enzymatische Signalkaskade gestartet und führt zur Hyperpolarisation des Photorezeptors. Diese Kaskade, bekannt als Phototransduktion, vermittelt Signale an die Ganglienzellen (Abb. 1: B und C). Die Zellen der inneren Körnerschicht (INL, *inner nuclear layer*) sind für trophische Versorgung und Signalweiterleitung an die Ganglienzellschicht (GCL, *ganglion cell layer*) verantwortlich. Zwischen der GCL und den Photorezeptoren befinden sich zudem die äußere und innere plexiforme Schicht (OPL, *outer plexiform layer*; IPL, *inner plexiform layer*). Während in der OPL Stäbchen und Zapfen die vertikal verlaufenden Bipolarzellen mit Horizontalzellen verbinden, bilden in der IPL Bipolarzellen und retinale Ganglienzellen Synapsen aus, die wiederum von Amakrinzellen moduliert werden. Axone der Ganglienzellen bilden am distalen Ende der Netzhaut den Sehnerv, der die visuelle Information an das Gehirn weiterleitet. Als einzige Zellen der Netzhaut durchspannen Müllerzellen das gesamte Gewebe und stellen neben den Mikroglia einen weiteren Gliazelltyp der Netzhaut dar (Kolb et al., 2001).

2.2 Mikroglia

Mikrogliazellen sind Makrophagen des mononukleären Phagozytosesystems im Parenchym des zentralen Nervensystems und der Netzhaut (Oehmichen, 1982). Makrophagen gehören zur Gruppe der Leukozyten und gehen im Knochenmark aus einer pluripotenten Stammzelle hervor. Dort erfolgt auch die Differenzierung zu myeloischen Vorläuferzellen wobei verschiedene Wachstumsfaktoren wie M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) eine entscheidende Rolle spielen. Nach Abgabe des gereiften Monozyten ins Blut und Migration ins Gewebe differenzieren sie zu reifen Makrophagen aus (Janeway, 2005).

2.2.1 Mikroglia im zentralen Nervensystem und der Netzhaut

Kreutzberg postulierte 1996 als erster zusammen mit anderen, dass kaum eine Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) ohne Beteiligung der Mikroglia denkbar ist (Kreutzberg, 1996). Zudem stellen Mikroglia die ersten Zellen dar, die auf Veränderungen der Mikroumgebung reagieren und zum Zentrum der Läsion migrieren. Ein weiteres charakteristisches Merkmal liegt in der sehr frühen Aktivierung der Mikroglia. Auf Veränderung des physiologischen Milieus reagieren sie mit der Expression

bestimmter Oberflächenmoleküle und morphologischen Veränderungen. Aufgrund ihrer Proliferationsfähigkeit *in situ* sowie ihrer charakteristischen Morphologie sind Mikroglia eindeutig von anderen Gewebemakrophagen zu unterscheiden. Interaktionen mit Astrozyten und extrazellulären Matrixkomponenten sowie Rezeptor-vermittelte Reaktionen auf sezernierte Faktoren wie M-CSF führen vor allem zu Proliferation und Differenzierung von Mikroglia (Perry and Gordon, 1988, Schmidt Mayer et al., 1994). 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 Laufe später embryonaler und früher postnataler Entwicklung wandern Mikroglia-Vorläufer über Blutgefäße in die Netzhaut ein (Barron, 1995), wo deren Kolonisierung durch die regulierte Expression der Chemokine Ccl2 und Ccl5 koordiniert wird (Rezaie and Male, 1999). Am Ende der Entwicklung werden diese amöboiden Phagozyten in ramifizierte Mikrogliazellen umgeformt und präsentieren 5-20% der gesamten Gliapopulation des ZNS.

2.2.2 Funktionen der Mikroglia

Mikroglia spielen eine zentrale Rolle bei der Immunregulation des ZNS und der Netzhaut. Hierbei ist grundsätzlich zwischen ruhenden ramifizierten und aktivierten amöboiden Mikroglia zu unterscheiden. „Ruhend“ ist dabei nicht wörtlich gemeint, denn Mikroglia patrouillieren permanent ihre physiologische Umgebung und üben somit eine Überwachungsfunktion aus (Nimmerjahn et al., 2005). Durch Phagozytose von Zelltrümmern sowie Regulation der Wundheilung durch Sekretion bestimmter anti-inflammatorischer Faktoren verkörpern sie den protektiven Phänotyp der Mikroglia (Block et al., 2007). Zur Ausübung dieser Funktionen exprimieren Mikroglia eine Reihe bestimmter Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Hierzu zählen vor allem Rezeptoren für Antikörper und Bestandteile des Komplementsystems sowie für Chemokine und Zytokine (Langmann, 2007). Im Zuge der Aktivierung kommt es zu Veränderungen des Phänotyps: Zum einen morphologischer Art hin zu einer amöboiden Zellstruktur, zum anderen zu verstärkter Phagozytose, Migration und Expression von Oberflächenrezeptoren. Trotz der beschriebenen neuroprotektiven Eigenschaften können Mikroglia auch zytotoxisch wirken. Im Falle einer chronischen Aktivierung kommt es vor allem zur Sekretion von freien Stickstoffradikalen (NO), reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) und der Expression pro-inflammatorischer Moleküle wie *tumor necrosis factor α* (Tnfa) oder *chemokine (C-C motif) ligand 2* (Ccl2). In regelmäßiger Anordnung sind ramifizierte Mikroglia in der adulten Netzhaut in inneren und äußeren plexiformen Schichten lokalisiert (Hume et al., 1983), wo sie über einen langen Zeitraum den Immunstatus der Netzhaut

kontrollieren (Bodeutsch and Thanos, 2000). Funktionell sind sie dort für die Phagozytose von Zelltrümmern der GCL und INL verantwortlich und an der Bildung eines Neuron-Glia-Netzwerks durch Organisation extrazellulärer Matrixkomponenten sowie der Synaptogenese während der Entwicklung beteiligt (Bessis et al., 2007).

2.2.3 Mikroglia und Netzhautdegeneration

Durch physiologische und neurotrophe Funktionen der Mikroglia wird die Immunhomöostase im zentralen Nervensystem und der Netzhaut aufrecht erhalten. Die Ausnahmestellung der Mikroglia im Gehirn konnte mit Arbeiten an Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und multipler Sklerose mehrfach beschrieben werden (Kreutzberg, 1996, Streit, 2002). Im Gegensatz dazu ist zur homöostatischen Funktion retinaler Mikroglia oder deren Rolle bei Netzhautdystrophien verhältnismäßig wenig bekannt.

Hereditären Netzhautdystrophien sowie Augeninfektionen und Autoimmunmechanismen ist eine frühe Aktivierung der Mikroglia gemeinsam, was häufig mit einer progressiven Neurodegeneration einher geht (Langmann, 2007, Schuetz and Thanos, 2004). Untersuchungen in Rs1h-defizienten Mäusen konnten zeigen, dass die Degeneration der Photorezeptoren auf die Induktion des Rezeptor-vermittelten extrinsischen Signalwegs der Apoptose zurückzuführen ist und um den postnatalen Tag 18 eintritt. Weitere Analysen der molekularen Ereignisse während der Photorezeptordegeneration legten eine Gruppe differentiell regulierter Gene offen, die mit Adhäsion, Zytoskelett und Vesikeltransport in Verbindung gebraucht werden konnten. Auffallend viele Gene waren zudem mit Mikrogliaaktivität und Immunantworten assoziiert (Gehrig et al., 2006). Mit Hilfe weiterer DNA-Mikroarrayanalysen konnte im Rs1h^{-/-}-Mausmodell gezeigt werden, dass auf transkriptioneller Ebene die Aktivierung von Mikroglia der Degeneration der Photorezeptoren zeitlich vorausgeht (Gehrig et al., 2007). Zeiss und Johnson wiesen eine deutliche Mikrogliaaktivierung und -proliferation in der ONL in rd-1 Mäusen nach, eine weiteres Modell für retinale Degeneration (Zeiss and Johnson, 2004). Darüber hinaus konnte bereits vor Absterben der Photorezeptoren eine erhöhte Expression der Mikroglia-aktivierenden Chemokine Ccl2, Ccl7 und Ccl5 sowie hohe Spiegel an Mikroglia-sezerniertem TNF in der Netzhaut dieser Mäuse festgestellt werden (Zeng et al., 2005). Ähnliche Transkriptionsmuster, die auf eine Aktivierung der Mikroglia hindeuten, konnten auch in Modellen Licht-induzierter retinaler Degeneration und Glaukom aufgezeigt werden (Chen et al., 2004, Steele et al., 2006). Ausgehend von diesen Befunden scheinen Mikroglia an der Initiation und dem Verlauf degenerativer Prozesse direkt an Neurodegenerationen beteiligt zu sein.

2.3 X-gebundene Retinoschisis: Modell für Photorezeptorzelltod bei erblicher Netzhautdystrophie

2.3.1 Photorezeptordegeneration infolge apoptotischer Mechanismen

Die Hauptursache adulter Blindheit in Industrieländern ist auf eine progressive Dysfunktion und Absterben von Photorezeptoren zurückzuführen. Die Degeneration von Photorezeptoren ist eine der genetisch heterogensten Erkrankungen des Menschen und deren Komplexität zudem von Umweltfaktoren beeinflusst wird (Hartong et al., 2006). Da die experimentellen Möglichkeiten bei der Forschungsarbeit an Patientengewebe begrenzt sind, stützen sich Untersuchungen zu retinalen Degenerationsmechanismen häufig auf korrespondierende Tiermodelle. Das Absterben von Photorezeptoren wird dabei als eine Folge apoptotischer Mechanismen angesehen (Chang et al., 1993, Delyfer et al., 2004). Mittlerweile steht eine große Anzahl retinaler Degenerationsmodelle zur Verfügung (Chang et al., 2002). Für die vorliegende Arbeit wurde auf das Rs1h-defiziente Mausmodell der X-gebundenen juvenilen Retinoschisis zurückgegriffen (Weber et al., 2002).

Apoptose stellt einen gut definierten Prozess dar, ausgelöst durch Zelltod-induzierende Stimuli zweier Signalwege: Dem Rezeptor-vermittelten (extrinsischen) Signalweg oder dem intrinsischen (mitochondrialen) Signalweg (Danial and Korsmeyer, 2004). Im extrinsischen Signalweg führt die Ligandenaktivierung von Oberflächenrezeptoren wie Cd95 (alias Fas) zur Formation eines Multiproteinkomplexes namens *death-inducing signaling complex* (DISC) (Kischkel et al., 1995). Dies führt zur Mobilisierung von Adaptorproteinen wie *Fas-associated protein with death domain* (FADD) und Integration von Procaspase 8 in DISC. Als das hauptsächliche Initiator-molekül im Rezeptor-vermittelten Apoptoseweg aktiviert die proteolytisch entstandene Caspase 8 dann Effektorcaspasen, die biochemische Prozesse des zellulären Zelltods katalysieren (Krammer, 2000). Im intrinsischen Signalweg ist das Apoptosom für die Aktivierung der Caspasen verantwortlich. Veränderte Mitochondrienpermeabilität, die daraus resultierende Abgabe von Cytochrom c, und andere pro-apoptotische Komponenten führen zur Bildung des Apoptosoms (Jiang and Wang, 2004). Dies induziert eine Apaf1- (*apoptotic protease activating factor-1*) vermittelte Aktivierung von Procaspase 9, die wiederum nachgeschaltete Procaspase 3 spaltet und aktiviert (Crow et al., 2004).

Zusammengefasst vermittelt eine Familie von Cysteinproteasen, bekannt als Caspasen, diese Art von Zelltod entweder als vorgelagerte Initiatoren (humane Caspase 2, 8, 9, 10) oder als nachgeschaltete Effektoren (humane Caspase 3, 6, 7) (Boatright and Salvesen, 2003, Kroemer and Martin, 2005). Eine Unterkategorie der Caspasen (humane Caspase

1, 4, 5 und murine Caspase 1, 11 und 12) reagiert auf mikrobielle Pathogene mit einer Aktivierung von Apoptose und Immunantworten. Darüber hinaus sind sie an der Aktivierung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und IL-18 durch Spaltung von Vorläuferproteinen beteiligt (Kuida et al., 1995, Martinon and Tschopp, 2004).

2.3.2 Genetik, Struktur und Funktion von Retinoschisin

1898 wurden erstmals die klinischen Merkmale der X-gebunden juvenilen Retinoschisis (XLRS, OMIM #312700) beschrieben (Haas, 1898). XLRS ist eine X-chromosomal vererbte Form der Makuladegeneration und tritt weltweit mit einer Inzidenz von 1:5.000 zu 1:25.000 vor allem bei männlichen Patienten auf (George et al., 1995, Tantri et al., 2004). Dabei kommt es zu einer lokal begrenzten Spaltung der Netzhaut und einer verminderten b-Welle bei relativ unveränderter a-Welle im Elektroretinogramm (ERG), was meist zu einem zentralen Sehverlust in der ersten Lebensdekade führt (George et al., 1995). Trotz einer gewissen Variabilität ist die Sehschärfe bei vielen Patienten auf 20/100 vermindert und bis heute ist keine Behandlung möglich (Kellner et al., 1990, Roesch et al., 1998). Die Retinoschisis wird durch *loss-of-function* Mutationen im Rs1 Gen auf Chromosom Xp22.13 verursacht (Abb. 2).

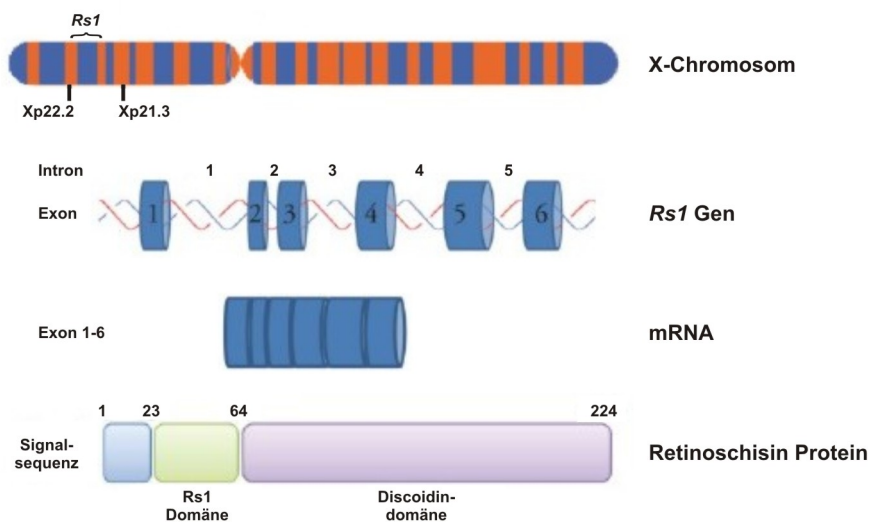


Abb. 2: Lokalisation und schematische Struktur des Retinoschisingens *Rs1* und dessen mRNA- und Proteinprodukte. Funktionelle Domänen des Retinoschisinproteins RS1: Signalsequenz, Rs1- und Discoidindomäne. Abbildung verändert nach <http://www.dart-europe.eu/full.php?id=256721>.

Das Rs1 Gen kodiert für ein Netzhaut-spezifisches 24 kDa Protein, das eine evolutionär konservierte Discoidindomäne enthält und als homooligomerer Protein-Komplex sezerniert wird (Sauer et al., 1997, Takada et al., 2006, Wu et al., 2005). Zur Erhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität der Netzhaut wird Retinoschisin eine Funktion als Adhäsionsmolekül zugesprochen (Wu et al., 2005) und nach Sekretion eine Interaktion

mit inneren retinalen Zellen vermutet (Grayson et al., 2000). Von Photorezeptoren und Bipolarzellen exprimiert, ist das Protein auf der Oberfläche der Innensegmente sowie ONL und OPL lokalisiert (Molday et al., 2001). Sowohl Müllerzellen als auch Bipolarzellen konnten bereits mit den physiologischen Schäden von XLRS in Verbindung gebracht werden (Alexander et al., 2000, Shinoda et al., 2001). Molday et al. konnten zudem belegen, dass Retinoschisin mit der Na^+/K^+ -ATPase (β_2 -Untereinheit) und dem SARM1-Komplex der Photorezeptoren und Bipolarzellen assoziiert ist (Molday et al., 2007).

2.3.3 Mausmodelle für X-gebundene juvenile Retinoschisis

Zum jetzigen Zeitpunkt existieren drei Mausmodelle, die alle die strukturellen und funktionellen Charakteristika der humanen XLRS aufweisen (Johnson et al., 2006, Weber et al., 2002, Zeng et al., 2004). In dem von unserer Arbeitsgruppe verwendeten $\text{Rs1h}^{-/-}$ -Mausmodell wurde das murine Exon 3, das Homolog zu humanem XLRS1 (*retinoschisis-1 homologue*, XLRS1h), *in-frame* mit einer *LacZ/Neo* Kassetten ersetzt, um ein Modell ohne nennenswerte Proteinexpression zu erzeugen (Weber et al., 2002). Diese Mäuse weisen eine starke Disorganisation der äußeren und inneren Körnerschicht, eine Verschiebung der Photorezeptorzellkerne in die äußere Segmentschicht sowie eine deutlich reduzierte Dicke der Netzhaut in Folge der progressiven Degeneration der Photorezeptoren auf (Abb. 3).

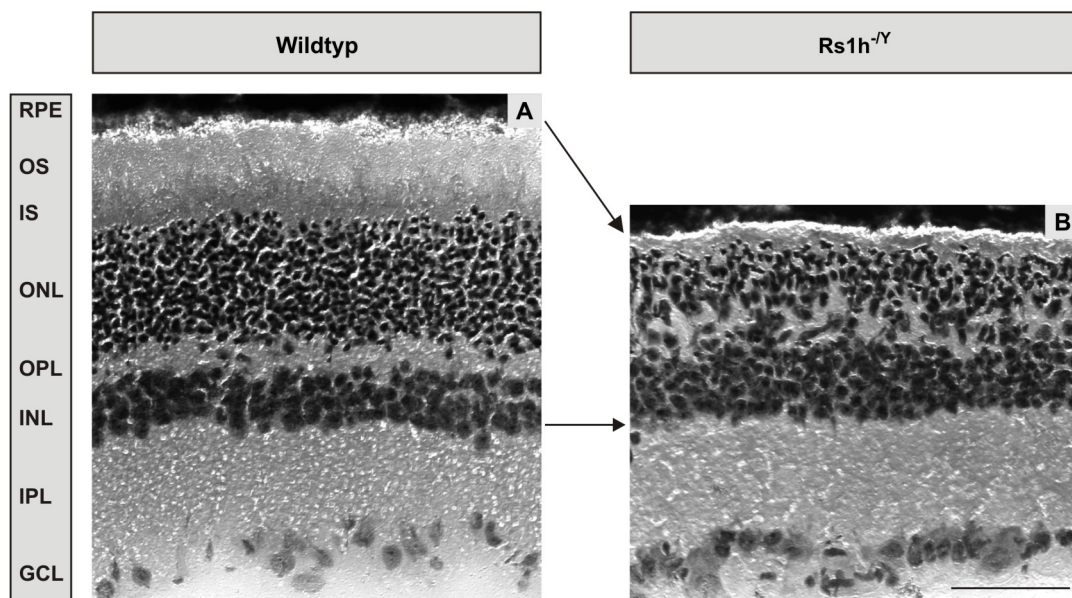


Abb. 3: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Wildtyp und Rs1h -defizienten Netzhaut. Retinale Kryoschnitte von 12 Monate alten (A) Wildtyp und (B) Rs1h -defizienten Mäusen. Maßstab, 50 μm . GCL, ganglion cell layer (Ganglionzellschicht); INL, inner nuclear layer (innere Körnerschicht); IPL, inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht); IS, inner segments (innere Photorezeptorsegmente); ONL, outer nuclear layer (äußere Körnerschicht); OPL, outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht); OS, outer segments (äußere Photorezeptorsegmente); RPE, retinales Pigmentepithel.

Zusätzlich kommt es zu einer deutlichen Störung der Photorezeptor-Bipolarsynapsen, die mit einem Verlust der b-Welle im ERG einhergeht (Weber et al., 2002). Da diese knockout Mäuse und XLRs vergleichbare retinale Merkmale aufweisen, eignen sich diese Tiere als Modellsysteme zur Erforschung der frühen molekularen Ereignisse im Verlauf der menschlichen Retinoschisis.

2.4 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren

Die essentiellen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA, *polyunsaturated fatty acid*) werden in zwei Gruppen eingeteilt: die Omega-3- und die Omega-6-PUFA (ω 3- und ω 6-PUFA). Dabei stellt Linolsäure die Muttersubstanz der ω 6-Fettsäuren und α -Linolensäure die Muttersubstanz der ω 3-Fettsäuren dar (Abb: 4).

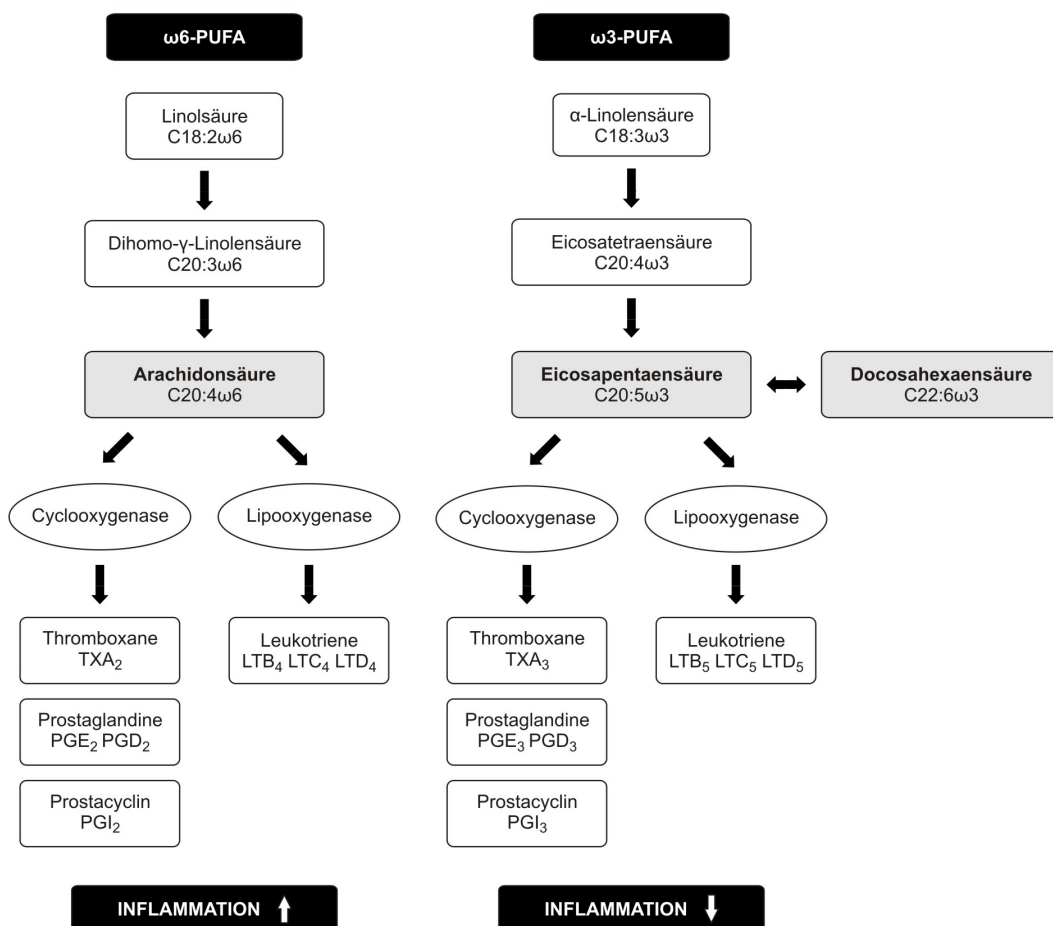


Abb. 4: Biosynthese der Fettsäuren und Eicosanoide. TX, Thromboxan; PG, Prostaglandin; PGI, Prostacyclin; LT, Leukotrien. Modifiziert nach (Simopoulos, 1991)

Durch Desaturierung und Kettenverlängerung können diese dann in die biologisch wichtigen Ausgangsprodukte der Eicosanoidsynthese Arachidonsäure (AA), Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) umgewandelt werden. Allerdings erfolgt diese Biosynthese im menschlichen Organismus nur im geringen Umfang und sehr

langsam. Da diese essentiellen Fettsäuren vom menschlichen Organismus selbst nicht synthetisiert werden können, müssen sie dem Körper mit der Nahrung zugeführt werden (Calder, 1998, Schricker et al., 1997). Dabei stellt Seefisch und die daraus gewonnenen Fischöle für den Menschen die Hauptquelle der ω 3-Fettsäuren EPA und DHA dar, während ω 6-Fettsäuren vor allem aus tierischen und pflanzlichen Fetten bezogen werden (Simopoulos, 1991). Durch den Einbau in Zellmembranen erfüllen sie wichtige Funktionen als Membranbausteine und Modulatoren biochemischer Prozesse. Des Weiteren spielen sie als Vorläufer der Eicosanoidsynthese eine wichtige Rolle in der Immunabwehr und bei Entzündungsreaktionen (Hwang, 1989, Kinsella et al., 1990, Miles and Calder, 1998). In Folge der Nahrungsmittelergänzung mit ω 3-Fettsäuren kommt es zu einer Veränderung der Membranzusammensetzung verschiedener Zellpopulationen, wie beispielsweise von Granulozyten (Chilton et al., 1993) und Monozyten (Croset et al., 1992).

Von ω 3- und ω 6-Fettsäuren abgeleitete Eicosanoide haben unterschiedliche und oft gegensätzliche Auswirkungen. So können beispielsweise von ω 6-Fettsäuren abgeleitete Eicosanoide die Blutgerinnung und Entzündung fördern (Eberhart and Dubois, 1995), wohingegen von ω 3-Fettsäuren abgeleitete Eicosanoide oft eine gegenteilige, gerinnungs- und entzündungshemmende Wirkung haben (Endres, 1993, James et al., 2000). Dadurch greifen die ω 3-Fettsäuren auf verschiedenen Ebenen des Immunsystems ein und können so das zelluläre Abwehrsystem, sowie die Synthese diverser Mediatoren beeinflussen, was wiederum zu einer veränderten Entzündungsantwort führt und somit möglicherweise in einem positiven Einfluss auf die Pathogenese diverser Erkrankungen resultieren kann (Suchner and Senftleben, 1994).

2.4.1 Omega-3-Fettsäuren in der Netzhaut

ω 3- und ω 6-Fettsäuren sind unter anderem an der Modulation der Genexpression beteiligt sowie für die Regulation physikalischer Membraneigenschaften und der Produktion von Eicosanoiden verantwortlich. DHA stellt zudem die vorherrschende mehrfach ungesättigte, langkettige Fettsäure der Membranphospholipide im Gehirn und der Netzhaut von Säugetieren dar (McMahon and Kedzierski, 2009). Als ein Vorläufer von Neuroprotectin D1 ist DHA in der gesunden Netzhaut vor allem in den Außensegmenten der Photorezeptoren hoch angereichert (Mukherjee et al., 2007). Die Netzhaut verfügt zudem über einen effizienten Konservierungs- und Recyclingmechanismus um die retinalen DHA-Konzentrationen auch in Zeiten verminderter diätärer ω 3-Zufuhr zu erhalten (Anderson et al., 1992, Bazan et al., 1992). Die hohen Konzentrationen an DHA in der Netzhaut sowie das Vorhandensein von Konservierungs- und Recyclingmechanismen legen nahe, dass DHA eine wichtige Rolle bei der Netzhautfunktion erfüllt. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren verfügen über eine neuroprotektive Wirkung auf

Faktoren und Abläufe, die mit der Pathogenese degenerativer Netzhauterkrankungen in Verbindung stehen. ω 3-PUFAs wie DHA zeigen zudem anti-inflammatorische Effekte. Zum einen wirken sie auf Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor kappa B* (NF κ B) und *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs), um die inflammatorische Genexpression zu beeinflussen (Calder, 2009). NF κ B spielt durch Kontrolle verschiedener Zytokine (z.B. Il-6 und Tnf α), Chemokine (z.B. Il-8 und Ccl2) und induzierbaren Effektorenzymen (z.B. iNos und Cox2) eine wichtige Rolle bei vielen Entzündungsreaktionen (Ghosh and Karin, 2002). Zum anderen können ω 3-PUFAs die Produktion und Aktivierung bioaktiver Enzyme wie Phospholipase A2 (Pla2) und Cyclooxygenase (Cox) beeinflussen.

Verschiedene hereditäre Formen retinaler Degeneration weisen einen verminderten Gehalt an DHA in der Netzhaut auf (Schaefer et al., 1995). Hoffman et al. zogen hierfür eine verminderte DHA-Synthese bei Patienten mit RP in Betracht (Hoffman et al., 2001). Omega-3-defiziente Tiere weisen im Vergleich zu Omega-3-gesättigten Kontrollen sowohl verzögerte als auch verminderte ERG-Reaktionen auf (Pawlosky et al., 1997, Weisinger et al., 1996). Diverse Fütterungsstudien konnten zudem positive Veränderungen im ERG infolge einer Nahrungsmittelergänzung mit ω 3-Fettsäuren belegen (Jeffrey et al., 2001).

2.5 Licht-induzierte Photorezeptordegeneration: ein weiteres Modell für Photorezeptor-Apoptose

Humane retinale Dystrophien und Licht-induzierte retinale Degenerationen in Tiermodellen haben die Apoptose von Photorezeptorzellen als charakteristisches Merkmal gemein (Wenzel et al., 2005). Durch Regulation der Lichtintensität und Bestrahlungsdauer ist zudem eine Regulation des induzierten Schadens möglich und bietet somit einen enormen Vorteil gegenüber vererbten Dystrophien bei der Untersuchung von retinalen Degenerationsmodellen.

Seit etwa 40 Jahren wird Licht experimentell als exogener Stimulus zum Auslösen von Netzhautdegeneration in Labortieren genutzt. Seit Anfang der 90er Jahre ist bekannt, dass überschwellige Lichtexposition Apoptose in Photorezeptoren auslöst (Reme et al., 1998). Somit steht mit dem Modell der Licht-induzierten Netzhautdegeneration ein System zur Verfügung, welches die Analyse der zellbiologischen Vorgänge der Photorezeptor-Apoptose erlaubt. An einer Vielzahl von Tiermodellen für RP ist gezeigt worden, dass die Lichtintensität, unter der die entsprechenden Tiere gehalten werden, Einfluss auf den Verlauf der Netzhautdegeneration nimmt - höhere Lichtintensitäten beschleunigen den Verlust der Photorezeptoren (LaVail et al., 1987). Grimm et al. konnten zudem eindeutig nachweisen, dass Rhodopsin für die Licht-induzierte Apoptose essentiell ist. Rpe^{-/-} Mäuse

sind nicht in der Lage 11-cis-Retinal zu bilden, das zusammen mit Opsin das funktionelle Rhodopsin bildet. Diese Mäuse sind resistent gegenüber Licht-induzierter Photorezeptor-Apoptose (Grimm et al., 2000). Die exzessive Absorption von Photonen durch Rhodopsin initiiert folglich eine Signalkaskade, die letztendlich zum Absterben der Photorezeptoren führt. Durch starke Bestrahlung mit sichtbarem Licht kommt es zudem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Suter et al., 2000, Wenzel et al., 2000). Wenzel et al. konnten zudem durch Applikation von Steroiden eine Aktivierung von AP-1 inhibieren und damit einen Schutz der Netzhaut vor Licht-induzierten Schaden erzielen (Wenzel et al., 2001).

2.5.1 Rolle der Mikroglia bei Licht-induziertem Netzhautschaden

Einige Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Licht-induzierter Photorezeptor-degeneration und einer Aktivierung retinaler Mikroglia herstellen (Ng and Streilein, 2001, Noell, 1980). Ähnlich hereditärer Netzhautdystrophien kommt es dabei zur Migration der Mikroglia von den inneren retinalen Schichten zur ONL der Netzhaut. Zhang et al. verwendeten für ihre Untersuchungen grün-gefiltertes Fluoreszenzlicht und postulieren, dass retinale Chemokine wie Ccl7 und deren Rezeptoren an der Aktivierung und Migration retinaler Mikroglia bei Licht-induzierter Photorezeptor-degeneration beteiligt sind und somit den apoptotischen Verlust von Photorezeptoren vermitteln (Zhang et al., 2005b). Kürzlich konnte auch eine Blaulicht-induzierte Degeneration der Photorezeptoren mit einer Aktivierung retinaler Mikroglia in Verbindung gebraucht werden (Joly et al., 2009, Santos et al., 2010).

2.5.2 Licht-induzierter, oxidativer Stress der Netzhaut

Die Pathogenese des Lichtschadens zeigt Anzeichen lichtoxidativen Stress, was immunhistochemische Untersuchungen mit spezifischen Markern für oxidativen Schaden belegen konnten (Tanito et al., 2002). Superoxid (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale und eine Vielzahl derer Reaktionsprodukte werden unter dem Begriff reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) zusammengefasst. Die Enzyme der NADPH Oxidase (Nox) von Phagozyten (Phox) der Säugetiere sind in der Lage, ROS als eine Reaktion auf mikrobizide Mechanismen zu bilden (Babior, 2002). Aktiviertes Nox2 in der Membran von Phagosomen produziert Superoxid, das durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) in H_2O_2 umgewandelt wird (Klebanoff, 2005) (Abb. 5). O_2^-/H_2O_2 kann im Phagosom im mikromolaren Konzentrationsbereich liegen und ist somit letal für die phagozytierten Mikroben. H_2O_2 führt zudem durch Redoxmodulation von Ionenkanälen, Enzymen oder Transkriptionsfaktoren zu intrazellulären Signalprozessen (Droge, 2002, Veal et al., 2007). Untersuchungen an kultivierten Mikroglia belegen Redoxmodulationen der Proliferation und Mikrogliafunktion, die auf die Bildung von ROS

durch Nox2 zurückzuführen sind (Block et al., 2007, Mander et al., 2006, Pawate et al., 2004). NADPH Oxidase ist in ruhenden Neutrophilen inaktiv, wird aber durch die Anwesenheit von Mikroorganismen oder Entzündungsmediatoren aktiviert und führt somit zur Produktion von ROS.

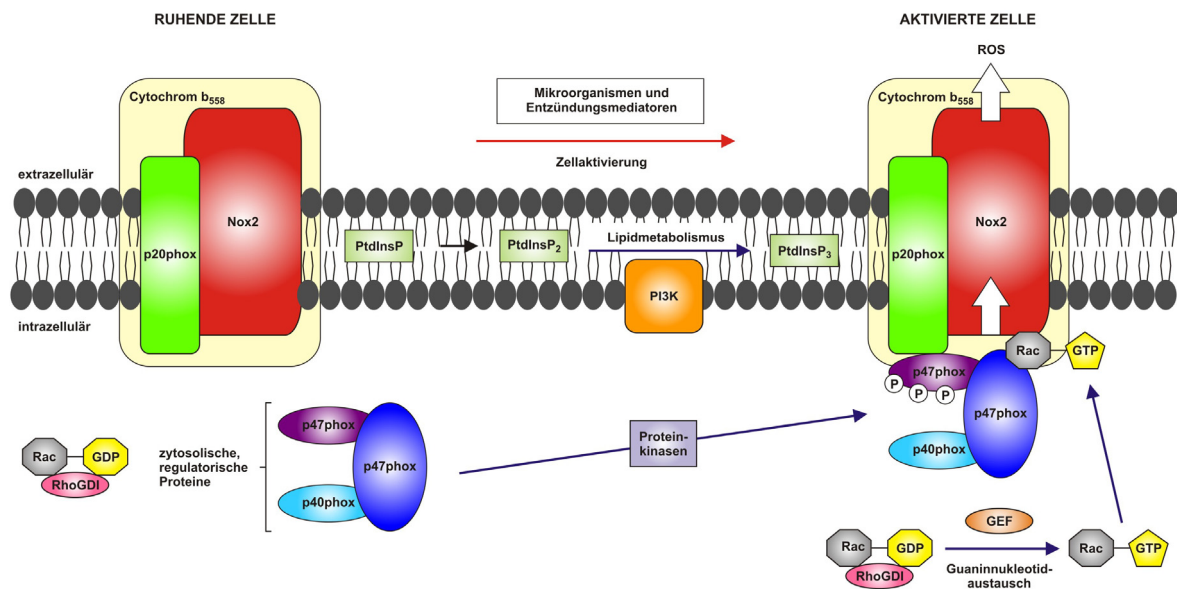


Abb. 5: Bildung von ROS nach Komplexbildung der regulatorischen Phox-Proteine in Phagozyten. Pfeile stehen für den Elektronenfluss und der Bildung von ROS in aktivierten Zellen. Blaue Pfeile verdeutlichen ausgelöste Steuermechanismen nach Aktivierung von Nox2. P, Phosphorylierung; GTP, Guanosintriphosphat; GDP, Guanosindiphosphat; GEF, *guanine nucleotide exchange factors*; Nox, NADPH Oxidase; RhoGDI, *RhoGDP-dissociation inhibitor*; PI3K, Phosphoinositid-3-Kinase; PtdInsP, Phosphatidylinositolphosphat. Modifiziert nach (Groeger et al., 2009, Lambeth, 2004).

Nox besteht aus der katalytischen Untereinheit Nox2, den regulatorischen Untereinheiten p22phox, p47phox, p40phox, p67phox und der kleinen GTPase Rac (Rac1 und Rac2) (Vignais, 2002). Die Enzymaktivität von Nox2 wird durch die Zusammenstellung der regulatorischen Untereinheiten mit Nox2 zu einem aktiven Komplex gesteuert. Dabei bildet p20phox initial einen stabilisierenden Komplex mit Nox2 und ist auf der zytosolischen Seite der Membran lokalisiert. Dieser Komplex konnte in der Vergangenheit biochemisch isoliert werden und als Flavocytochrom b_{558} identifiziert werden. Flavocytochrom b_{558} ist in unstimulierten Phagozyten inaktiv, wird aber durch die Anwesenheit von Mikroorganismen oder Entzündungsmediatoren aktiviert. Im Zytosol komplexiert p47phox mit p40phox und p67phox, wohingegen Rac an *inhibitory protein RhoGDP-dissociation inhibitor* (RhoGDI) gebunden wird (Clark et al., 1990). Durch Aktivierung werden mindestens drei molekulare Steuermechanismen ausgelöst (Phosphorylierung von p47phox, Lipidmetabolismus und Guaninnukleotidaustausch von Rac), die zusammengenommen in einer Membrantranslokation und der Komplexbildung der zytosolischen Untereinheiten mit Flavocytochrom b_{558} und der Bildung von O_2^- und H_2O_2 resultieren. Chéret et al. konnten erstmalig zeigen, dass Mikroglia neben Nox2 auch

katalytisch aktives Nox1 exprimieren (Cheret et al., 2008). Zudem gelang der Arbeitsgruppe der Nachweis, dass die Aktivierung von Mikroglia mit Lipopolysaccharid (LPS) und die Injektion von LPS in das Gehirn die Produktion von IL-1 β und NO via Nox1 induziert. Wie Nox2 ist Nox1 ein Transmembranprotein, das ein Heterodimer mit p20phox bildet und O $_2^-$ produziert (Ambasta et al., 2004, Kawahara et al., 2005). Die Aktivität von Nox1 erfordert neben Rac-Proteinen die beiden regulatorischen Einheiten NoxO1 und Nox1, zwei funktionelle Homologien von p47phox bzw. p67phox (Banfi et al., 2003). Mehrere antioxidante Gene wie *heme oxygenase 1* (Hmox1) (Kutty et al., 1995) und *metallothionein 1* und 2 (Mt1 und Mt2) (Chen et al., 2004) sind zudem nach Lichtschaden hochreguliert. Darüber hinaus konnte ein protektiver Effekt exogener Antioxidanzien auf die lichtgeschädigte Netzhaut von Nagern gezeigt werden (Li et al., 1985, Noell et al., 1987).

Basierend auf diesen Befunden stellt der Lichtschaden somit ein nicht-vererbtes Modell zur Aktivierung retinaler Mikroglia dar. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Mikrogliaaktivierung während Licht-induzierter retinaler Degeneration sind bislang jedoch nicht vollständig aufgeklärt.

2.6 Chondroitinsulfatproteoglykan Disaccharid (CSPG-DS)

Mit verschiedenen neurotrophen und regulatorischen Funktionen erhalten Mikrogliazellen den privilegierten Immunstatus im zentralen Nervensystem und der Netzhaut aufrecht (Streit, 2002, van Rossum and Hanisch, 2004). Allerdings führt eine chronische Aktivierung von Mikroglia bei neurodegenerativen Erkrankungen wie retinalen Dystrophien zu Gewebeschädigungen und neuronalem Zelltod (Langmann, 2007). Infolgedessen stellt der Einsatz bioaktiver Moleküle, die die Überaktivierung von Mikroglia dämpfen, eine denkbare neuroprotektive Therapiemöglichkeit dar.

Chondroitinsulfatproteoglykan (CSPG) ist eine Matrixkomponente, die im zentralen Nervensystem (ZNS) natürlich gebildet wird und im Verlauf chronisch neurodegenerativer Erkrankungen wie Multiple Sklerose (MS), Alzheimer und Glaukom vermehrt vorkommt. Aufgrund seiner wachstumsinhibierenden Wirkung auf Neurone und seinem Mitwirken bei der Aktivierung von Immunkomponenten wird CSPG eine zentrale Rolle bei der Verhinderung der Degeneration im zentralen Nervensystem zugesprochen. Eine Reihe von Studien zeigten, dass die Degeneration von CSPG *in vivo* durch das Enzym Chondroitinase ABC (ChABC) die Regeneration begünstigt. Rolls et al. konnten belegen, dass ein Disaccharid (DS) Spaltprodukt von CSPG (CSPG-DS) die retinale Degeneration durch Aktivierung eines neuroprotektiven Mikroglia-Phänotyps verhindert (Rolls et al., 2004, Rolls et al., 2006).

3 Material

Alle im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Geräte, Softwareprogramme und sämtliches Material wurden vom Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Regensburg zur Verfügung gestellt.

3.1 Zellen

In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien und primären Mauszellen aufgeführt.

Stamm / Zelltyp	Eigenschaften	Herkunft
661W	immortalisierte, murine Photorezeptor-Zelllinie, induziert mit SV40	Prof. Muayyad Al Ubaidi (Tan et al., 2004)
BV2	Mikroglia-ähnliche Tumor-Mauszelllinie, induziert mit v-raf / Vmyc	Prof. Ralph Lucius (Blasi et al., 1990)
ex vivo Mikroglia aus Netzhaut	primäre Mauszellen	Isolation aus C57BL/6 Mäusen (MacGreen, MacGreen / Rs1h ^{-f/y} , Rs1h ^{-f/y} und Wildtyp)
ex vivo Mikroglia aus Gehirn	primäre Mauszellen	Isolation aus C57BL/6 Mäusen (MacGreen, MacGreen / Rs1h ^{-f/y} , Rs1h ^{-f/y} und Wildtyp)

Tab. 1: Organismen und Zellen: Eigenschaften und Herkunft

3.2 Oligonukleotide für real time RT-PCR

Tabelle 2 zeigt alle Oligonukleotide (Firma Metabion) und Roche-Sonden, die für die quantitative real time RT-PCR verwendet wurden.

Gen	Accession No.	Primer	Sequenz (5'-3')	Amplikon	Sonde
Agxt211	NM_027907.3	F	CAGCTCGGGCATGGAATA	72	47
		R	AGCACAGCCAAGCCAACT		
ATPase	NM_016774	F	GGCACAATGCAGGAAAGG	77	77
		R	TCAGCAGGCACATAGATAGCC		
Casp8	NM_009812	F	TGAACAATGAGATCCCCAAAT	60	11
		R	CAAAAATTCAAGCAGGCTCA		
Cbr2	NM_007621.2	F	CAGCAGCATGAAGCTGAATTT	77	81
		R	CAGTGTCCCGTCCAATCC		
Ccl2	NM_011333.2	F	CATCCACGTGTTGGCTCA	76	62
		R	GATCATCTTGCTGGTGAATGAGT		
Cd28	NM_007642.4	F	CCTAAGCTGTTTTGGGCACT	111	67
		R	GAGTCTGTTCTTCTACTATTGTCCA		
Cd68	NM_009853	F	CTCTCTAAGGCTACAGGCTGCT	72	27
		R	TCACGGTTGCAAGAGAAACA		
Cd95	NM_007987	F	AAACCAGACTTCTACTGCGATTCT	73	76
		R	GGGTTCCATGTTACACGA		
Ch25h	NM_009890.1	F	AAGACCTGGGCTGTTCCAG	67	68
		R	GCCTCCCTTGCTCTTATGGT		
Chi311	NM_007695.3	F	AGCAGTATTTCTCCACCCTGAT	87	20
		R	CGCTGAGCAGGAGTTTCTCT		
Crispld2	NM_030209.3	F	GAGTGTCCATCCAGCTACGG	72	27
		R	TTTATGCTTGTGAGGCTTTTCTC		
Cxcl10	NM_021274.1	F	GCTGCCGTCAATTTTCTGC	111	3
		R	TCTCACTGGCCCGTCATC		
Egr1	M_20157	F	CCTTCCAGGGTCTGGAGAA	78	3
		R	ACTGAGTGGCGAAGGCTTTA		

Gen	Accession No.	Primer	Sequenz (5'-3')	Amplikon	Sonde
Emr1	NM_010130.4	F	CCTGGACGAATCCTGTGAAG	64	1
		R	GGTGGGACCACAGAGAGTTG		
FcγrIIIα		F	GGGCTCATTGGACACAACA		89
		R	ATGGATGGAGACCCTGGAT		
Fut11	NM_028428.2	F	TTTGGGAAAGTCGAAGAGATTC	71	11
		R	CCTTGCCAATAATCTTGTAGCC		
Gas6	NM_019521.2	F	GGATTTGCTACCTACAGGCTA	74	42
		R	TTAACTTCCCAGGTGGTTTCC		
Gfap	NM_010277	F	ACAGACTTTTCCAACCTCCAG	63	64
		R	CCTTCTGACACGGATTTGGT		
Gpr37	NM_010338.2	F	CCCTGGTCATCTTCCATGAG	93	2
		R	CACCCAGAGAAGCCACCTC		
H2Ab1		F	GTGGTGCTGATGGTGCTG		26
		R	CCATGAACTGGTACACGAAATG		
IL-1β	NM_008361.3	F	TGTAATGAAAGACGGCACACC	68	78
		R	TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG		
Ifi44	NM_133871.2	F	CTGATTACAAAAGAAGACATGACAGAC	91	78
		R	AGGCAAAACCAAAGACTCCA		
Irf7	NM_016850.2	F	CTTCAGCACTTCTTCCGAGA	68	25
		R	TGTAGTGTGGTGACCCCTTGC		
Irgm1	NM_008326.1	F	AAGGCCACTAACATCGAATCA	75	82
		R	TGCCTTATCTCACTTAATACTCCTCA		
IL-33	NM_133775.1	F	ACCCACGAAAAGATATTCATAAAA	92	13
		R	CAAGCAAGGATCTCTTCTAGAAAT		
iNos	NM_010927.1	F	CTTTGCCACGGACGAGAC	66	13
		R	TCATTGTAATCTGAGGGCTGA		
Lcn2	NM_008491.1	F	CCATCTATGAGCTACAAGAGAACAAT	89	58
		R	TCTGATCCAGTAGCGACAGC		
Ltc4s	NM_008521.1	F	CTCTTCTGGCTACCGTCACC	81	7
		R	AAGCCCTTCGTGCAGAGAT		
Nox1	NM_172203.1	F	CTTGACCGATTGCTTTTAT	100	3
		R	CATTAGATGGGTGCATGACAA		
Nox2	NM_007807.4	F	TGCCAACTTCCTCAGCTACA	73	20
		R	GTGCACAGCAAAGTGATTGG		
Noxa1	NM_172204.4	F	ATCTGGAGCCCATGGATT	70	77
		R	GCGTTGTGGTCATCAGGAAT		
Noxo1	NM_027988.3	F	TGCAAATGGACCGACTCC	114	33
		R	TCTTAAGGGTCTTCTGGAGCTG		
p22phox	NM_007806.3	F	TGCCCTCCACTTCTGT	95	69
		R	GCAGATAGATCACACTGGCAAT		
p40phox	NM_008677.2	F	CTGCTTTTCTGACTACCCACAG	75	3
		R	TGGAAGCTGCTCAAAGTCG		
p47phox	NM_010876.3	F	GGACACCTTCATTGCCATA	94	3
		R	CTGCCACTTAACCAGGAACAT		
p67phox	NM_010877.4	F	TCTGCAGCCACAGTCAGC	78	52
		R	TGTGCCTCACCTTCCAGAG		
Parp10	NM_001163575.1	F	TGCGGGCCTTTTATAGCA	85	56
		R	TGCAGCAATGGGTGTGAC		
Pgf	NM_008827.2	F	CTGGGTTGGCTGTGCATT	70	3
		R	GGCACCATTCCACTTCTGT		
Ptgs2	NM_011198.3	F	GATGCTCTTCCGAGCTGTG	75	45
		R	GGATTGGAACAGCAAGGATT		
Rac1	NM_009007.2	F	AGATGCAGGCCATCAAGTGT	62	77
		R	GAGCAGGCAGGTTTTACCAA		
Rac2	NM_009008.3	F	AATGCAGGCCATCAAGTGT	78	77
		R	TTGGTGGTGTAGCTGATGAGA		
Rfx2	NM_009056.2	F	CTCATCAATGCCATGAGTGG	72	62
		R	TGCGAAGGCACTTACAACAC		
Rlbp1	NM_020599.1	F	CCCCTCGGATCTCAAGAAG	61	1
		R	TTTGAACCTGGCTGGGAAT		

Gen	Accession No.	Primer	Sequenz (5'-3')	Amplikon	Sonde
Serpina3h	ENSMUST00000109960	F	GACATCCACCAGGGCTTTAG	99	1
		R	GCCCAGCTCAGGAAGGAT		
Serpina3n	NM_009252.2	F	ACATCGGGAGTCAGCTATCAC	76	20
		R	CCATCTTCTGTGTTCTGCAGTC		
Sprr1a	NM_009264.2	F	CCTGAAGACCTGATCACCAGA	63	66
		R	AGGCAATGGGACTCATAAGC		
Steap4	NM_054098.3	F	TGGTCAAAGCATTTAACACCAT	89	64
		R	GTCATTTCCACAGACAAACACC		
Timp1	NM_011593.2	F	GCAAAGAGCTTTCTCAAAGACC	73	76
		R	AGGGATAGATAAACAGGGAAACACT		
Tm4sf1	NM_008536.3	F	CTGTGTCATTGTGGCATCACT	130	29
		R	GCACTTGGACCACATAGAGGA		
Tmbim1	NM_027154.5	F	GCTGTCTTCCTTGTACCTACC	90	74
		R	AAAGATGGTGAGCAAGATGATGT		
Tnfa		F	CTGTAGCCCACGTCGTAG	98	25
		R	TTGAGATCCATGCCGTTG		

Tab. 2: Primer und Sonden für TaqMan-Assays

3.3 Enzyme

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die verwendeten Enzyme.

Enzym	Verwendung	Hersteller; Artikelnummer
Collagenase	<i>ex vivo</i> Mikroglia-Kultivierung	Sigma; C0130
DNase I	<i>ex vivo</i> Mikroglia-Kultivierung	Roche; 11284932001
DNase I rekombinant	TUNEL-Assay	Roche; 04536282001
„Haus“-Taq Polymerase	Maus-Genotypisierung	Rekombinant exprimiert und aufgereinigt von Dr. Ulrike Friedrich (Institut für Humangenetik, Regensburg)
Hyaluronidase	<i>ex vivo</i> Mikroglia-Kultivierung	Sigma; H4272
Protease	Mausschwanz-Verdau	Applichem; A3459
Revert Aid™ M-MuLV Reverse Transcritpase	Reverse Transkription	Fermentas; EP0442
Taq Polymerase	Maus-Genotypisierung	Genaxxon; M3454
Trypsin-EDTA (10x)	Trypsinierung von 661W Zellen	PAA; L11-001

Tab. 3: Enzyme: Anwendung und Hersteller

3.4 Antikörper

Die Tabellen 4 und 5 fassen alle verwendeten primären bzw. sekundären Antikörper zusammen.

Primärer Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller; Artikelnummer
F4/80	Ratte, monoklonal	1:600	Acris; BM4007S
FITC-PNA	Erdnuss	1:600	Invitrogen; L-21409
GFAP	Hase, polyklonal	1:200	Sigma; G9269
GFP	Hase, polyklonal	1:500	Abcam; ab290
Iba1	Hase, polyklonal	1:500	Wako; 01-1974
PSD95	Maus, monoklonal	1:200	Acris; SM5003P

Tab. 4: Primäre Antikörper: Spezies, Verdünnung und Hersteller

Sekundärer Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller; Artikelnummer
Ziege anti-Maus IgG Alexa Fluor 594	Maus	1:800	Invitrogen; A11032
Ziege anti-Hase IgG Alexa Fluor 488	Hase	1:1.000	Invitrogen; A11008
Ziege anti-Hase IgG Alexa Fluor 594	Hase	1:800	Invitrogen; A11012
Ziege anti-Ratte IgG Alexa Fluor 594	Ratte	1:800	Invitrogen; A11007

Tab. 5: Sekundäre Antikörper: Spezies, Verdünnung und Hersteller

3.5 Chemikalien und Kit-Systeme

In den Tabellen 6 und 7 sind die wichtigsten Chemikalien und Kit-Systeme sowie ihre Verwendung und Hersteller zusammengefasst.

Chemikalie	Verwendung	Hersteller; Artikelnummer
30% H ₂ O ₂	verschieden	Merck; 1.07209
ADA	<i>in vitro</i> Stimulation	Cayman Chemical; 90010
Biozym LE Agarose	Agarosegele	Biozym; 840004
Borsäure	1x TBE Puffer	Merck; 1.00165
Bromphenolblau	10x DNA-Auftragspuffer	Sigma; B-6131
BSA	Immunhistochemie; whole mounts	Appllichem; A6588
CSPG-DS	<i>in vitro</i> Stimulation	Sigma; C4170
DAPI	Immunzytochemie; Immunhistochemie	Invitrogen; D1306
DHA	<i>in vitro</i> Stimulation	Cayman Chemical; 90310
DMSO	Kryokonservierung	Sigma; D5879
DPA	<i>in vitro</i> Stimulation	Cayman Chemical; 90165
EDTA	Laird's Puffer; 10x TBE-Puffer	Merck; 1.08418.1000
Eosin Y	HE-Färbung	Appllichem; A0822
Ethanol	verschieden	J.T. Baker; UN 1170
Ethidiumbromid-Lösung	Agarosegele	Appllichem; A2273
Glycerin	Kryokonservierung; 10x DNA Auftragspuffer	Appllichem; A3561
Hämatoxylin	HE-Färbung	Sigma; HHS16
IFN γ	<i>in vitro</i> Stimulation	Sigma; I4777
Isopropanol	verschieden	Merck; 100995
Ketamin 10%	Anästhesie der Mäuse	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte (WDT)
LPS (<i>E.coli</i> 0111:B4)	<i>in vitro</i> Stimulation	Sigma; L4391
Magermilchpulver	Immunhistochemie; whole mounts	Roth; T145.3
M-CSF	Kultivierung von <i>ex vivo</i> Mikroglia	R & D; 216-MC/CF
Methocel	Blaulich-induzierte Photorezeptor Degeneration	OmniVision AG
MgCl ₂	15x Puffer	Merck; 1.05833
Na ₂ HPO ₄	10x PBS Puffer	Merck; 106566
NaCl	Laird's Puffer	VWR, REF 27810.364
NaN ₃	Immunhistochemie; whole mounts	Sigma; S-2002
Natriumacetat	10x DNA-Auftragspuffer	
Natriumcitrat	TUNEL-Assay	Merck; 1.06448
Nilrot	Lipidfärbung	Sigma; N3013
PFA	Immunzytochemie; Immunhistochemie	Appllichem; A3813
Phenylephrin 2%	Blaulich-induzierte Photorezeptor Degeneration	Apotheke Universitätsklinikum Regensburg
RNAse ZAP	RNA-Isolierung	Sigma; R-2020
Saccharose	Kryoeinbettung von Geweben	Merck; 1.07651
SDS	20% SDS Puffer	Roth; CN30.3
Tris	Laird's Puffer	USB; 123008
Triton X-100	Immunzytochemie; Immunhistochemie; whole mounts	Sigma; X100
Tween 20	Immunhistochemie	Sigma; P1379
UPL Sonden	real time RT-PCR	Roche
Xylazin 2%	Anästhesie der Mäuse	Serumwerk Bernburg AG
Xylencyanol	10x DNA-Auftragspuffer	Sigma; X-4126
Xylol	HE-Färbung	Roth; 9713.1
Ziegen Serum	Immunzytochemie	Abcam; ab7481
Zyklolat 1%	Blaulich-induzierte Photorezeptor Degeneration	Dr. Gerhard Mann GmbH; 7617732
β -Mercaptoethanol	RNA-Isolierung	Roth; 4227.3

Tab. 6: Chemikalien: Verwendung und Hersteller

Kit-System	Verwendung	Hersteller; Artikelnummer
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Apoptose Assay	Promega; G8090
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Zytotoxizitätsassay	Promega; G1780
Griess Reagent System	Griess Reagenz System	Promega; G2930
In Situ Cell Death Detection Kit, POD	TUNEL-Assay	Roche; 11684817910
Latex Beads	Phagozytose-Assay	Sigma; 51972
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Reverse Transkription	Fermentas; K1632
RNA 6000 Nano LabChip Kit	RNA-Qualitätskontrolle	Agilent Technologies; 5067-1511
RNeasy Micro Kit	RNA-Isolierung	Qiagen; 74004
RNeasy Mini Kit	RNA-Isolierung	Qiagen; 74104

Tab. 7: Kit-Systeme: Verwendung und Hersteller

3.6 Medien, Puffer und Lösungen

Die Tabellen 8 und 9 geben einen Überblick über alle verwendeten Medien, Puffer und Lösungen.

Medium	Zusammensetzung	Hersteller; Artikelnummer
Einfriermedium zur Kryokonservierung von Zellen	60% jeweiliges Vollmedium 30% FCS 10% DMSO	
BV2 Kulturmedium	RPMI with L-Glutamine 5% fetales Kälberserum (FCS) 1% Penicillin/ Streptomycin 1% L-Glutamin (2 mM) 1,95 µl β-Mercaptoethanol (55,77 nM)	PAA; E15-039 PAA; A11-151 PAA; P11-010 PAA; M11-004 Roth; 4227.3
661W Kulturmedium	DMEM High Glucose (4,5 g/l) 10% FCS 1% Penicillin / Streptomycin	PAA; E15-810 PAA; A11-151 PAA; P11-010
ex vivo Mikroglia-Differenzierungsmedium	DMEM High Glucose (4,5 g/l) 10% FCS 1% Penicillin / Streptomycin M-CSF (50 ng/ml)	PAA; E15-039 PAA; A11-151 PAA; P11-010 R & D; 216-MC/CF

Tab. 8: Medien: Zusätze, Verwendung und Hersteller

Lösung / Puffer	Zusammensetzung	Verwendung	Hersteller;
1 kb-Leiter		Agarosegele	Fermentas; SM0332
10x DNA-Auftragspuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 5 mM Natrium-Acetat 2 mM EDTA 10% Glycerin 0,001% (w/v) Bromphenolblau 0,001% (w/v) Xylencyanol	Agarosegele	
10x PBS Puffer	1,5 M NaCl 83 mM Na ₂ HPO ₄ 17 mM H ₂ PO ₄ (pH 7,4)	verschieden	
10x Puffer S	15 mM MgCl ₂	Maus-Genotypisierung	Genaxxon; M3454
10x TBE Puffer	1 M Tris 1 M Borsäure 20mM EDTA (pH 7.5)	Gelelektrophorese	
15x Puffer	15 mM MgCl ₂ in H ₂ O	Maus-Genotypisierung	
2x TaqMan Gene Expression Mastermix		real time RT-PCR	Applied Biosystems; 4370074
20% SDS Puffer	20 g SDS in 100 ml H ₂ O	Mausschwanz-Verdau	
3% H ₂ O ₂ -Lösung	3% (v/v) H ₂ O ₂ in 1x PBS	TUNEL-Assay	
4% PFA-Lösung	4% (w/v) PFA in 1x PBS (pH 7,0)	Immunzytochemie, Immunhistochemie, whole mounts	
Antikörper-Lösung	2% BSA, 0,02% NaN ₃ 0,1% Triton X-100 in 1x PBS	Immunhistochemie, whole mounts	
Antikörper-Lösung	2,5% Ziegenserum 0,1% Triton X-100 in 1x PBS	Immunzytochemie	

Lösung / Puffer	Zusammensetzung	Verwendung	Hersteller;
Blocking Puffer	10% Ziegenserum 0,3% Triton X-100 in 1x PBS	Immunzytochemie	
BLOTTO	1% Magermilchpulver 0,01% Tween 20 in 1x PBS	Immunhistochemie, whole mounts	
DAB Substrat		TUNEL-Assay	Roche; 1718096
DAPI-Lösung	0,1 µg/ml DAPI in 1x PBS	Immunzytochemie, Immunhistochemie	
dATP solution	100 mM Natrium-Salz	Maus-Genotypisierung	Genaxxon, M3018
dCTP solution	100 mM Natrium-Salz	Maus-Genotypisierung	Genaxxon, M3019
dGTP solution	100 mM Natrium-Salz	Maus-Genotypisierung	Genaxxon, M3020
dNTP-Mix	1,25 mM dNTPs in H ₂ O	Maus-Genotypisierung	
dTTP solution	100 mM Natrium-Salz	Maus-Genotypisierung	Genaxxon, M3021
Entellan		Einbettreagenz	Merck; 1.07960
Fluorescent Mounting Medium		Einbettreagenz	Dako; REF 53023
Laird's Puffer	0,2 M NaCl 0,1 M Tris (pH 8,3) 5 mM EDTA (pH 8,0)	Mausschwanz-Verdau	
Permeabilisierungslösung	25% Triton X-100 25% Tween 20 in 1x PBS	whole mounts	
Permeabilisierungslösung	0,1% Triton X-100 0,1% Natriumcitrat in 1x PBS	TUNEL-Assay	
RNA Later	RNA-Isolierung		Ambion; AM7020
Roti Quant		Proteinbestimmung nach Bradford	Roth; K015.1
TissueTek O.C.T. Compound		Kryoeinbettung von Geweben	Hartenstein; TTEK

Tab. 9: Lösungen und Puffer: Zusammensetzung, Verwendung und Hersteller

3.7 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 10 sind alle verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Material	Verwendung	Hersteller; Artikelnummer
1 ml Spritzen	RNA-Isolierung	B & D Systems; REF 300013
1,5 ml Cups	verschieden	Sarstedt; REF 72.706.400
10 µl Filterspitzen	verschieden	Biozym; 770020
10 µl Pipettenspitzen	verschieden	VWR; 613-1068
30 µl Pipettenspitzen	TaqMan	Matrix; 7432
100 µl Filterspitzen	verschieden	Biozym; 770100
100 µl Pipettenspitzen	verschieden	VWR; 613-1066
1000 µl Filterspitzen	verschieden	Biozym; 770600
1000 µl Pipettenspitzen	verschieden	VWR; 613-1062
12-well Zellkulturplatten	Zellkultur	Corning; 3506
15 ml Falcon Röhrchen	verschieden	Sarstedt; REF 62.554.502
2 ml Cups	verschieden	Sarstedt; REF 72.695.400
50 ml Falcon Röhrchen	verschieden	Sarstedt; REF 62.547.254
96-well Mikroplatte	Funktionsassays	Greiner bio-one; REF 655101
Deckgläschen (10 mm Ø)	Immunzytochemie	VWR; 631-1576
Einmalhandschuhe	verschieden	Roth; L949.1
Einwegküvetten	Zytotoxizitätsassay	Sarstedt; REF 67.742
Einwegskalpel	verschieden	Feather, No. 11
Kanülen 20G – Nr.1	RNA-Isolierung	B & D Systems; REF 301300
Kryoröhrchen	Kryokonservierung von Zellen	Sarstedt; REF 72.380.007
MicroAmp Optical 384-well Platte	TaqMan	Applied Biosystems; 4326270
MicroAmp Optical adhesive films	TaqMan	Applied Biosystems; 4311971
Nunc™ Flaschen 75 cm ² nuncion Δ-surface	Zellkultur	Nunc™; 156499
Nunc™ Schalen nuncion Δ-surface	Zellkultur	Nunc™; 150350
PCR Cups	PCR	Biozym; 711030 / 711040

Material	Verwendung	Hersteller; Artikelnummer
PCR Tubestripes	PCR	Biozym; 711030 / 711040
Polycarbonatmembran Transwell Platten	Migrationsassay	Corning; 3428
Polysine Objektträger (25 x 75 x 1,0 mm)	Histologie	VWR; 631-1349
Zellkulturflaschen T75 CN Vent Cap Red	Zellkultur	Sarstedt; REF 83.1813.002
Zellkulturschalen 10 x 2 cm	Zellkultur	Sarstedt; REF 83.1802
Zellschaber 25 cm	Zellkultur	Sarstedt; REF 83.1830
Zellsieb 70µm	ex vivo Mikroglia Kultivierung	VWR; 734-0003

Tab. 10: Verbrauchsmaterialien: Verwendung und Hersteller

3.8 Geräte und Software

Die Tabellen 11 und 12 zeigen eine Auflistung aller benutzten Geräte bzw. Software-Programme.

Gerät	Verwendung	Hersteller
7900 HT Fast real time PCR System	TaqMan	Applied Biosystems
Agilent 2100 Bioanalyzer	RNA-Qualitätskontrolle	Agilent Technologies
Axioskop 2 MOT Plus	Fluoreszenzmikroskopie	Zeiss
BMG Fluostar Optima	Apoptose Assay	Labtech
Brutschrank CB 210	Zellkultur	Binder
Dark Hood DH 30/32	Geldokumentation	Biostep
Einfrierapparatur	Kryokonservierung von Zellen	Thermo Fisher
Gelkammer Blue Marine 200	Gelelektrophorese	Blue Power
Kältemikrotom	Kryoschnitte	Leica
Mikroskop DMIL HC kpl. Invers	verschieden	Leica
Mikroskop Eclipse TE 2000S	Durchlichtmikroskopie	Nikon
Mikroskop Leica DM IL	verschieden	Leica
Mikrowelle Kor-6D07	verschieden	Daewoo
Mikrozentrifuge	verschieden	Labnet
Multipipette	TaqMan	Matrix
Multifuge 3L	verschieden	Heraeus
NanoDrop	Konzentrationsbestimmung von RNA bzw. DNA	PeqLab
Netzgerät Blue Power Plus	Gelelektrophorese	Blue Power
Spektralphotometer Ultraspec	Zytotoxizitätsassay	Amersham Biosciences
Sterilbank	Zellkultur	BDK Luft- & Reinraumtechnik GmbH
T3000 Thermocycler	PCR	Whatman Biometra
Thermomixer compact 5436	verschieden	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge fresco	verschieden	Heraeus
Tissue Lyser	RNA-Isolierung	Qiagen

Tab. 11: Geräte: Verwendung und Hersteller

Software	Verwendung	Hersteller
Agilent 2100 BioAnalyzer	RNA-Qualitätskontrolle	Agilent Technologies
Argus 3.0	Geldokumentation	Argus
AxioVision LE 4.5	Fluoreszenzmikroskopie	Zeiss
ChipInspector	DNA-Mikroarray Analysen	Genomatix GmbH
Corel Draw X4	Anfertigung von Abbildungen	Corel
Expression Console Version 1.0	Bioinformatische Datenanalyse	Affymetrix
NIS viewer	Durchlichtmikroskopie	Nikon
Mikroarray Suite 5.0	DNA-Mikroarray Analysen	Affymetrix
Microsoft Office	verschieden	Microsoft
RQ Manager 1.2	TaqMan	Applied Biosystems
SDS 2.3	TaqMan	Applied Biosystems
Sigma Plot	Auswertungen	Systat Software, Inc

Tab. 12: Software: Verwendung und Hersteller

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Allgemeines

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einem Feuchtinkubator bei 37°C + 5% CO₂ in einer durch Wasserdampf abgesättigten Atmosphäre inkubiert. Alle Medien wurden mit fetalem Kälberserum (FCS) und Penicillin / Streptomycin versetzt. Die Zellkultur der Zelllinien und primärer Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Alle verwendeten Zelllinien wachsen als adhärente Monolayer und wurden alle drei Tage bei vollständiger Konfluenz umgesetzt.

4.1.2 Zelllinien

661W Zellen wurden in 1x DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin / Streptomycin inkubiert. BV2 Zellen wurden in 1x RPMI Medium + 5% FCS + 1% L-Glutamin + 1% Penicillin / Streptomycin + 55,77 nM β -Mercaptoethanol kultiviert.

4.1.2.1 Weiterkultur

Zur Weiterkultivierung der Zellen wurde das alte Medium abgesaugt und frisches hinzu gegeben. Nach Erreichen der Konfluenz (2 - 3 Tage) wurden 661W Zellen 5 - 10 min mit 1x Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert, um die Zellen vom Boden abzulösen. Anschließend wurde das Trypsin-EDTA durch Aufnahme in serumhaltiges Medium inaktiviert. BV2 Zellen wurden im Gegensatz zur 661W-Zelllinie mit einem sterilen Zellschaber vom Flaschenboden abgelöst. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden beide Zelllinien 1:3 verdünnt und in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Wachstum und Zustand der Zellen wurden mit einem inversen Mikroskop (Leica DM IL) kontrolliert.

4.1.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellernte

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde zunächst das alte Medium entfernt. Anschließend wurden die Zellen mithilfe eines sterilen Zellschabers abgeschabt (BV2) bzw. nach erfolgter Trypsinierung (661W) in 10 ml frischem Medium aufgenommen. 10 μ l dieser Zellsuspension wurden mit 90 μ l Medium 1:10 verdünnt. Nun wurden 10 μ l dieser Verdünnung auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Für jede Bestimmung wurden die Zellzahlen von jeweils 16 Kleinquadraten summiert, um die Zellzahl über einem Großquadrat zu erhalten. Aus der Zellzahl und dem Verdünnungsverhältnis wurde dann die Zellzahl pro ml Suspension wie folgt ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der Zellzahl aus 4 Großquadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerkonstante} (10^4)$$

Beim Ernten wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, im entsprechenden Volumen RLT-Puffer (Lysepuffer) abgeschabt und das Zelllysate bis zur RNA-Isolierung bei -80°C gelagert.

4.1.2.3 *In vitro* Stimulationen

Für *in vitro* Stimationsversuche wurden 1×10^6 BV2 Zellen bzw. primäre Mikroglia pro well einer 6-well Platte ausgesät. Alle Stimulanzen wurden mit dem jeweiligen Kulturmedium auf ihre Endkonzentration verdünnt. Sobald eine Konfluenz von 80% erreicht wurde (24 h), wurden die Zellen mit Medium gewaschen und anschließend 24 h in frischem Medium mit oder ohne Stimulanz inkubiert. In Tabelle 13 sind die verwendeten Stimationsansätze aufgelistet.

Stimulanz	Lösungsmittel	Endkonzentration
Adrensäure (ADA)	0,1% EtOH	0,5 µM, 5 µM, 10 µM
Chondroitinsulfatproteoglycan-Disaccharid (CSPG-DS)	1x PBS	50 µg/ml
Docosahexaensäure (DHA)	0,1% EtOH	0,5 µM, 5 µM, 10 µM
Docosapentaensäure (DPA)	0,1% EtOH	0,5 µM, 5 µM, 10 µM
Interferon γ (IFNγ)	1x PBS	20 ng/ml
Lipopolysaccharid (LPS)	DMEM	10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml
macrophage colony stimulating factor (M-CSF)	DMEM	50 ng/ml

Tab. 13: Stimationsansätze: Lösungsmittel und eingesetzte Konzentrationen

4.1.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung von lebenden Zellen wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) eingesetzt, das als Gefrierschutzmittel dient. Es schützt Zellmembranen vor Eiskristallbildung und verhindert somit, dass die Zelle zerstört wird. Ohne Gefrierschutzlösung ist eine Lebendkonservierung von biologischem Material nicht möglich. Die Zellen einer Zellkulturflasche mit hoher Konfluenz wurden zur Kryokonservierung entsprechend abgelöst und abzentrifugiert (5 min, 1.000 rpm, RT). Anschließend wurden die Zellen in 1,8 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Nach mindestens 4-stündiger Inkubation bei -80°C in einer Einfrierapparatur, welche durch Befüllung mit Isopropanol für eine gleichmäßige Erniedrigung der Temperatur um 1°C pro Minute sorgt, wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad überführt, schnell angetaut, anschließend in kaltem 1x PBS gewaschen (300 g, 8 min, 4°C) und mit frischem Medium wieder in Kultur genommen.

4.2 Mauslinien und Haltung

Als Ausgangsmaterial dienten Gewebe von verschiedenen Mauslinien mit C57BL/6 Hintergrund, die in Tabelle 14 aufgelistet sind. Alle Tiere wurden in einer klimatisierten Umgebung bei ca. 63% Luftfeuchte, 12 h hell-dunkel Rhythmus und 20°C - 22°C mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Während der Hellphase wurde der Tierstall mit ca. 15 Lux beleuchtet. Der gesundheitliche Zustand der Tiere wurde regelmäßig kontrolliert. Alle Prozeduren, inklusive der Fütterungsstudien wurden von der Tierschutzkommission der Universität Regensburg genehmigt und entsprachen dem deutschen Tierschutzgesetz. Die Tiere wurden durch CO₂-Asphyxiation und anschließende zervikale Dislokation getötet. Die gewünschten Gewebe wurden präpariert und mit den oben beschriebenen Methoden weiter verarbeitet (siehe Abschnitt 3. Methoden). Zur Überprüfung des korrekten Genotyps wurden die Versuchstiere aller Mauslinien vor Versuchsbeginn mittels PCR genotypisiert.

Maus-Linie	Herkunft	Genetische Veränderung	Referenz
MacGreen	Prof. Dr. David Hume (Roslin Institute, Edinburgh, UK)	Transgen EGFP	(Sasmono et al., 2003)
MacGreen x Rs1h ^{-Y}	Eigenzucht		
Rs1h ^{-Y}	Eigenzucht	knockout	(Weber et al., 2002)
Wildtyp	Charles River (Sulzfeld, Deutschland)	Inzuchtstamm	

Tab. 14: Verwendete Maus-Linien

4.2.1 Maus-Genotypisierungen

Die Genotypisierung der einzelnen Mauslinien und deren Geschlechtsbestimmung erfolgte in unterschiedlichen 25 µl PCR-Ansätzen (Tab. 15), Primerkombinationen (Tab. 16). und PCR-Programmen (Tab. 17). Die Typisierung der Gen-defizienten bzw. transgenen Tiere wurde mittels zweier getrennter PCR-Reaktionen durchgeführt. Die Kombination beider PCR-Reaktionen ermöglichte eine eindeutige Typisierung der Gen-Defizienz bzw. Transgenität.

Maus-Linie	Komponenten	1x Ansatz	c (Stock)	c (Soll)
MacGreen	dNTP-Mix	2,00 µl	1,25 mM	0,1 mM
	Primer (forward)	1,00 µl	10 µM	0,4 µM
	Primer (reverse)	1,00 µl	10 µM	0,4 µM
	15x Puffer (15 mM MgCl ₂)	2,50 µl	15 mM	1,5 mM
	Haus-Taq Polymerase	0,20 µl	2 U/µl	0,016 U/µl
	Nukleasefreies Wasser	17,30 µl		
Rs1h ^{-Y}	gDNA	1,00 µl		
	dNTP-Mix	2,00 µl	1,25 mM	0,1 mM
	Primer (forward)	1,00 µl	10 µM	0,4 µM
	Primer (reverse)	1,00 µl	10 µM	0,4 µM
	10x Puffer S	2,50 µl	10x	1x
	Taq Polymerase (Genaxxon)	0,10 µl	5 U/µl	0,02 U/µl
	DMSO	1,30 µl	100%	5%
	Nukleasefreies Wasser	13,10 µl		
	gDNA	2,00 µl		

Maus-Linie	Komponenten	1x Ansatz	c (Stock)	c (Soll)
SRY (Geschlecht)	dNTP-Mix	2,00 µl	1,25 mM	0,1 mM
	Primer (forward)	1,00 µl	10 µM	0,4 µM
	Primer (reverse)	1,00 µl	10 µM	0,4 µM
	15x Puffer (15mM MgCl ₂)	2,50 µl	15 mM	1,5 mM
	Haus-Taq Polymerase	0,20 µl	2 U/µl	0,016 U/µl
	Nukleasefreies Wasser	17,30 µl		
	gDNA	1,00 µl		

Tab. 15: PCR-Ansätze für Mausgenotypisierungen

Primer-Name	Sequenz (5' – 3')	Produkte (bp)	Genotypisierung
EGFP-F	CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG	630	MacGreen
EGFP-R	CACGAACTCCAGCAGGACCATG		
rsc3Fneu	GAGGACCCCTGGTACCAGAAA	200; 260	Rs1h ^{-Y}
lacZR2	GCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGT		
rsmint3R	CCATCTCAGGCAAGCCAGG		
SRY F	GTTTCTCTTTGCATCACATCT	375	SRY (Geschlecht)
SRY R	ATCTTCAATCTCTGTGCCTCC		

Tab. 16: Primer-Kombinationen für PCR-Amplifikationen, Sequenzen und Produktgrößen von Mausgenotypisierungen

Maus-Linie	Schritt	Temperatur (°C)	Anzahl Zyklen
MacGreen	Vordenaturierung	95°C, 5 min	
	Denaturierung	95°C, 1 min	
	Annealing	60°C, 1 min	
	Elongation	72°C, 1 min	25
	finale Elongation	72°C, 2 min	
Rs1h ^{-Y}	Vordenaturierung	94°C, 3 min	
	Denaturierung	94°C, 30 sek	
	Annealing	60°C-50°C, 30 sek	35
	Elongation	72°C, 30 sek	
	finale Elongation	72°C, 10 min	
SRY	Vordenaturierung	95°C, 3 min	
	Denaturierung	95°C, 30 sek	
	Annealing	62°C, 30 sek	3
	Elongation	72°C, 30 sek	
	Denaturierung	95°C, 30 sek	
	Annealing	59°C, 30 sek	3
	Elongation	72°C, 30 sek	
	Denaturierung	95°C, 30 sek	
	Annealing	56°C, 30 sek	30
	Elongation	72°C, 30 sek	
	finale Elongation	72°C, 2 min	

Tab. 17: PCR-Programme für Mausgenotypisierungen

4.2.2 DHA Fütterungsstudie

Nahrungsbestandteile wurden von der Firma SSNIFF Spezialdiäten GmbH (Soest, Deutschland) bezogen. Diese beinhalteten (in g/kg Futter) 200 Casein, 150 Maisstärke, 150 Maltodextrin, 200 Glukose, 99,5 Saccharose, 50 Zellulosepulver, 3 L-Cystein, 35 Mineralpremix (AIN93G), 10 Vitaminpremix (AIN93G) und 2,5 Cholinchlorid. Das Futter beinhaltete 10% Fett von Distelöl (Kontroll-Futter) oder Distelöl angereichert mit 2% Docosahexaensäure (DHA-Futter). Die unterschiedlichen Konzentrationen an ω 3-mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA, *poly unsaturated fatty acids*) innerhalb dieser

Diäten spiegeln sich in deren $\omega 6/\omega 3$ Verhältnis wider (Tab. 18). Als Stoffquellen für DHA dienten DHASCO-T (Martek Biosciences Corporation, Columbia, MD, USA) und ROPUFA 30 (DSM Nutritional Products, Heerlen, Niederlande) (Connor et al., 2007).

Bestandteile	Kontroll-Futter	DHA-Futter
Palmitinsäure (16:0)	9,08 (0,32)	8,24 (0,42)
Stearinsäure (18:0)	3,03 (0,03)	2,81 (0,02)
Ölsäure (18:1n9)	71,34 (0,67)	68,34 (0,34)
Linolsäure (18:2n6)	12,89 (0,16)	13,60 (0,07)
Linolensäure (18:3n3)	0,23 (0,07)	0,32 (0,13)
Eicosapentaensäure (20:5n3)	-	0,46 (0,05)
Docosahexaensäure (22:6n3)	-	2,18 (0,14)
n6/n3 ratio	56,00	8,24

Tab. 18: Fettsäurezusammensetzung von Kontroll- und DHA-Futter (% Gesamtfettsäuren)

4.2.3 Blaulicht-induzierte Photorezeptordegeneration

Sowohl erbliche als auch induzierte Netzhautdegenerationen resultieren in einem Zellverlust der Photorezeptoren durch Apoptose. Daher kann die akute Licht-induzierte Netzhautdegeneration als Modellsystem zum Studium der zellbiologischen Vorgänge während der Apoptose von Photorezeptorzellen dienen. In diesem Modellsystem kann entweder diffuses weißes Licht, oder fokussiertes blaues Licht verwendet werden. Die Lichtschaden-Versuche mit blauem Licht wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Charlotte Remé von der Universität Zürich am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Regensburg durchgeführt. Das Lichtsystem besteht aus einer Xenon-Reflektorlampe (230 V, 50 Hz, 120 W; Intralux MDR 100), deren emittiertes Licht über ein Glasfaserkabel in ein optisches System von Sammellinsen geleitet wird. Zwischen der ersten und zweiten Linse befinden sich zum einen Interferenzfilter, die ultraviolette (UV)- und infrarotes (IR)-Licht absorbieren. Zum anderen befindet sich dort ein Filterschieber mit blau und grün Filtern, sodass zwischen blau (410 ± 10 nm) und grün (550 ± 10 nm) gewählt werden kann. Ein Reglersystem ermöglicht es, die Strahlungsintensität zu variieren. Die Distanz des Auges zum Lichtaustritt wird so gewählt, dass der gebündelte Lichtstrahl auf der Hornhaut scharf abgebildet ist und im Mäuseauge erneut gebündelt auf die Netzhaut fällt. Für 410 nm Blaulicht wird eine Bestrahlungsintensität von 33 mW/cm^2 (auf Höhe der Hornhaut gemessen) gewählt.

Drei Monate alte MacGreen Mäuse wurden über Nacht (16 h) dunkel adaptiert und die Pupillen bei schwachem Rotlicht mit Phenylephrin 2% und Zyklotat 1% erweitert. Mit einer Mischung aus Ketamin 10% (75 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin 2% (23 mg/kg Körpergewicht) wurden die Mäuse anästhesiert und während der Lichtexposition auf einer Heizdecke gehalten (40°C). Die Hornhaut der lichtexponierten Augen wurde mit einem Tropfen Methocel feucht gehalten und für 2 min pro Auge blauem Licht (410 ± 10 nm) ausgesetzt. Auch die Blaulichtexposition wurde bei schwachem Raum-Rotlicht

durchgeführt. Nach Behandlung mit Blaulicht und Erwachen aus der Narkose, wurden die Mäuse wieder ihrem gewohnten 12 h hell-dunkel Rhythmus zugeführt, mit Futter und Wasser *ad libitum*. Bestrahlte Mäuse wurden 12 h, 24 h oder 72 h nach der Behandlung getötet, Kontrolltiere nach der Dunkeladaption.

4.3 Präparation und Kultivierung von *ex vivo* Mikroglia

Diese primären Zellen wurden frisch aus dem Gewebe isoliert. Im Regelfall besitzen sie unter Kulturbedingungen nur eine begrenzte Lebensdauer. Für viele Fragestellungen werden Primärzellen gegenüber den etablierten Zelllinien bevorzugt, weil gezeigt werden konnte, dass Primärzellen häufig auch unter *in vitro* Bedingungen die Aktivitäten und Funktionen widerspiegeln, die sie in ihrer physiologischen Umgebung zeigen.

Für die Präparation der *ex vivo* Mikroglia wurden 14 bis 21 Tage alte C57BL/6 Mäuse mit dem Genotyp $Rs1h^{-Y}$ oder Wildtyp durch Begasung mit CO_2 getötet. Anschließend wurden je nach gewünschtem Gewebe die Netzhäute bzw. das Gehirn entnommen und in 1,5 ml Cups (Netzhaut) bzw. 2 ml Cups (Gehirn) überführt, die bereits 520 μ l 1x PBS-Puffer enthielten. Die Netzhäute bzw. das Gehirn wurden mit Hilfe einer Schere in sehr feine Stücke zerschnitten und nach Zugabe von 250 μ l Collagenase (1 mg/ml), 30 μ l DNase I (0,3 mg/ml) und 200 μ l Hyaluronidase (2 mg/ml) pro Cup für 40 min bei 37°C im Thermomixer unter Schütteln verdaut. Mit Hilfe eines 70 μ m Zellsiebs wurden nun die übrigen Zellspezies, die in der Netzhaut bzw. dem Gehirn vorkommen und nicht kultiviert werden sollen, entfernt. Dazu wurde die Zellsuspension auf den Zellsieb gegeben, der auf einem 50 ml Falcon Tube auflag, und zweimal mit je 10 ml DMEM Medium gewaschen. Nach der anschließenden Zentrifugation (5 min, 1.600 rpm, RT) wurde das Zellpellet in 10 ml DMEM Medium + 50 ng/ml M-CSF resuspendiert und die Zellen in T175-Flaschen ausgesät. Nach vier Tagen erfolgte eine weitere Zugabe von 50 ng/ml M-CSF. Nach elf Tagen in Kultur wurden die Mikrogliazellen geerntet. Die adhärent wachsenden Zellen wurden für die RNA-Isolierung in einem adäquaten Volumen RLT-Puffer abgeschabt und bis zur weiteren Behandlung bei -80°C gelagert.

4.4 DNA-spezifische molekularbiologische Methoden

4.4.1 DNA-Extraktion aus Mausgeweben

Zur Überprüfung des Mausgenotyps wurde genomische DNA aus der Schwanzspitze der Maus isoliert. Diese wurde in 500 μ l Laird's Puffer, 20 μ l 20% SDS und 20 μ l Protease (20 mg/ml) aufgenommen und bei 57°C drei bis vier Stunden auf einem Rundschüttler inkubiert. Anschließend wurden die unverdauten Zellreste abzentrifugiert (13.000 rpm, 10

min, RT). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Cup überführt und die DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt. Die DNA wurde pelletiert (13.000 rpm, 10 min, RT) und mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach 10 - 20 min Lufttrocknen wurde die DNA in 200 µl nukleasefreiem Wasser gelöst.

4.4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Mit dem Spektrophotometer (NanoDrop) wird die Absorption der Proben bei 260 und 280 nm gemessen, um Konzentration und Reinheitsgrad zu bestimmen. Das Ausmaß der Absorption wird als Extinktion (E) bezeichnet. Diese errechnet sich dabei aus dem Lambert-Beerschen Gesetz ($E = \epsilon cd$). Einer Extinktion von 1 entsprechen 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Reine DNA hat ein Verhältnis $A_{260/280}$ von 1,8. Als Referenz wurde nukleasefreies Wasser eingesetzt und die DNA-Proben unverdünnt auf ihre Konzentration hin vermessen. Durch die Oberflächenspannung der Probe wird eine Flüssigkeitssäule zwischen den Enden der optischen Fasern der Messoberfläche und des Schwingarms aufgebaut, die den Messpfad etabliert. Die gemessenen Spektren, Absorptionswerte und Konzentrationen werden anschließend auf einem Computerbildschirm dargestellt.

4.4.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) stellt eine weit verbreitete Standardmethode dar, kleine Mengen an template DNA innerhalb kurzer Zeit in große Mengen zu amplifizieren. Experimentell versetzt man dafür die DNA mit Primern, Taq-Polymerase, freien Nukleotiden und Puffer. Durch Erhitzen auf 94°C kommt es zur Auftrennung der DNA in Einzelstränge. Während der Annealing-Phase lagern sich die Primer an die denaturierten Einzelstränge an, um in der Elongationsphase mit Hilfe des Enzyms Taq-Polymerase diese zu polymerisieren und so letztlich die DNA zu amplifizieren. Taq-Polymerase ist ein hitzestabiles Enzym, das aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde und deren Temperaturoptimum bei 72°C, also in der Elongationsphase der PCR-Reaktion liegt. Die hybridisierten Primer sind für die Polymerisierungsreaktion der Taq-Polymerase essentiell. Für verschiedene Anwendungen wurden standardmäßig folgende Bedingungen genutzt:

1. Vordenaturierung + Aktivierung des Enzyms
2. Denaturierung
3. Annealing
4. Elongation
5. Finale Elongation

4.4.4 Auftrennung und Analyse von DNA

Quantitative und qualitative DNA Analysen wurden mit Hilfe der Agarose Gelelektrophorese durchgeführt. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines DNA-Fragments im elektrischen Feld hängt von seiner Größe ab. Daher ist es möglich, DNA-Fragmente in einem Agarosegel der Größe nach aufzutrennen. Unter elektrophoretischen Bedingungen ist das Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren ionisiert. Somit liegen die Poly(desoxy)-nukleotide als Polyanionen vor und bewegen sich von der Kathode zur Anode. Je nach Größe der zu analysierenden Fragmente wurden 1,5% (w/v) oder 2% (w/v) Agarose in einem entsprechenden Volumen 1x TBE Puffer + Ethidiumbromid durch Aufkochen gelöst. Diese Lösung erstarrt beim Abkühlen in der Gelkammer innerhalb von 20 - 30 min. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1x TBE Puffer verwendet. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die zu analysierenden DNA-Proben noch mit 10x Auftragspuffer versetzt. Zur akkuraten Masse- sowie Größenabschätzung wurde ein 1-kb Größenstandard verwendet. Die Auftrennung der DNA erfolgte mit einem Netzgerät bei 120 - 150 Volt und dauerte 30 - 45 min. Die DNA-Banden wurden durch Ethidiumbromid Interkalation in die DNA unter UV Bestrahlung visualisiert (Dark Hood). Das Agarosegel wurde mit Hilfe der Argus-Software fotografiert und über einen Thermoprinter ausgedruckt.

4.4.5 DNA-Mikroarray Analyse

Durchgeführt wurden die DNA-Mikroarray Analysen am Kompetenzzentrum für Fluoreszenz Bioanalytik (KFB) in Regensburg. Im Rahmen dieser Dissertation kam dabei der 430 2.0 Mouse Genome Array der Firma Affymetrix zum Einsatz. Dieses DNA-Mikroarray Set umfasst rund 22.000 bekannte murine Gene und mehr als 33.000 *Expressed Sequence Tags* (ESTs). Die genspezifischen Oligonukleotide werden durch ein photolithographisches Verfahren *in situ*, d.h. direkt auf der Chip-Oberfläche, synthetisiert. Ausgehend von 1 - 15 µg total RNA wird im ersten Schritt unter Verwendung eines T7-oligo-d(T)₂₄ Primers doppelsträngige cDNA synthetisiert. Folglich tragen alle gebildeten cDNA Moleküle den bakteriophagen T7 Promotor. Nach einem Aufreinigungsschritt produziert die T7-RNA-Polymerase in der anschließenden *in vitro* Transkription biotinylierte cRNA. Da ein cDNA Molekül mehrere Male als Matrize dienen kann, kommt es im Gegensatz zur cDNA Synthese hierbei zu einer 100 bis 200 fachen Amplifikation. Die cRNA wird aufgereinigt, durch eine metallische Hydrolyse auf eine durchschnittliche Länge von 35 bis 200 Nukleotide fragmentiert und für 16 Stunden bei 45°C und 60 U/min in einem Hybridisierungscocktail auf die DNA-Mikroarrays hybridisiert. Danach werden die Arrays gewaschen, mit einem Streptavidin-Phycoerythrin Komplex gefärbt und gescannt. Aus den gescannten Bildern wurden mit der Affymetrix Expression Console differentiell regulierte Transkripte durch Berechnung und Evaluierung des sog.

detection calls erfasst. Diese geben Auskunft, ob ein Gen exprimiert, schwach exprimiert, oder nicht exprimiert wird. Jeder DNA-Mikroarray wurde zunächst einzeln analysiert, wobei die Gesamtfluoreszenz jeweils auf den Wert 100 skaliert wurde (*single array analysis*). Die zusätzlich generierte Report-Datei erlaubte eine ausführliche Qualitätskontrolle, wobei dem Skalierungsfaktor, der Hintergrundfluoreszenz, den Signalwerten der Hybridisierungskontrollen und den 3'-5' Verhältnissen der internen Kontrollen die größte Bedeutung zukam. Der niedrigste Wert des Skalierungsfaktors unterschied sich nicht mehr als um den Faktor zwei vom höchsten, was eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen DNA-Mikroarrays untereinander gewährleistete. Sämtliche Hybridisierungskontrollen, welche vor der Hybridisierung in unterschiedlichen Konzentrationen eingespiked wurden, konnten als exprimiert detektiert werden. Somit wurde sichergestellt, dass auch sehr niedrig exprimierte Gene ein messbares Signal zeigen. Bei den internen Kontrollen β -Actin und Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden jeweils Expressions-signale am 3'- und am 5'-Ende bestimmt. Aus dem berechneten 3' zu 5' Verhältnis, das ein Verhältnis von 1:3 nie überschritt, konnte eine nicht vollständige cDNA- bzw. cRNA- Synthese ausgeschlossen werden. Nach der Einzelanalyse der Mikroarrays (*single array analysis*) wurden die Netzhaut-Proben jeweils auf die Wildtyp Kontrollprobe bezogen (*comparison analysis*). Dabei wurde der *change call* berechnet, der angibt, ob es zu einer Erhöhung, zu einer Verminderung oder zu keiner Veränderung der Transkription kam. Zusätzlich wurde die Höhe der Expressionsänderung als Zahlenwert angegeben (*fold change*). Alle Daten wurden als *fold changes* der Transkript-Level bezogen auf die jeweilige Kontrolle angegeben.

4.4.6 Bioinformatische Datenanalyse

Die Affymetrix Expression Console Software Version 1.0 wurde verwendet, um Datensätze (*CHP files*) aus 3' – Expressionsarrays (*CEL files*) mittels *Robust Multichip Analysis* (RMA) Algorithmus zu generieren. Das Genomatix ChipInspector Programm (Dennis et al., 2003, Mantovani et al., 2002) ermöglichte die differentielle Expressionsanalyse mittels SAM (*significance analysis of microarrays*). Mit Hilfe des *Gene Expression Dynamics Inspectors* (GEDI), konnte eine integrative Analyse der genomweiten Expressionsaktivitäten von BV2 Zellen vollzogen werden (Thomas et al., 2006). Bei der verwendeten Software handelt es sich um ein Matlab (Mathworks, Natick, MA) Freeware-Programm, das selbst organisierte Karten (SOMs, *self-organizing maps*) für die Übersetzung überdimensionaler Daten in 2D Mosaik verwendet. Jede Kachel des Mosaiks steht für ein individuelles SOM-Cluster. Zur Darstellung hoher oder schwacher

Expression der Cluster-Gene sind die Kacheln farbcodiert. Somit ist eine Identifizierung des zugrundeliegenden Musters möglich.

4.5 RNA-spezifische molekularbiologische Methoden

Totale RNA wurde aus Zellen der Zelllinien BV2 und 661W, primären *ex vivo* Mikrogliazellen und der Netzhaut isoliert. Die Zellzahl entsprach stets den Vorschriften des RNeasy Kits der Firma Qiagen, das zur RNA-Isolierung verwendet wurde. Es wurde unter nukleasefreien Bedingungen und immer auf Eis gearbeitet. Die durchschnittliche RNA-Ausbeute variierte aufgrund der eingesetzten Zellzahl.

4.5.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus geernteten Zellen bzw. Gewebe wurde mit Hilfe des RNeasy Kits von Qiagen durchgeführt. Bei dieser Methode handelt es sich um eine spezifische Aufreinigung der total RNA über hydrophile Siliziumgel Säulen unter Verwendung geeigneter Puffersysteme. Zuerst wurden die Zellen bzw. das Gewebe in einem Guanidiniumisothiocyanat enthaltenden Puffer homogenisiert und lysiert (RLT-Puffer). Dieses chaotrope Salz denaturiert sämtliche Proteine inklusive RNAsen und bewahrt somit die RNA vor Degradierung. Zum Homogenisieren des Zelllysats wurde das Lysat 10x durch eine Spritzennadel (Gr. 20) gezogen und mit Hilfe eines QIAshredders (1 min, 13.000 rpm, RT) von Zellüberresten befreit. Im Falle der Isolierung aus Netzhaut wurde zur Homogenisierung der Tissue Lyzer eingesetzt (2 x 30 sek, 30 Hz). Durch Zugabe von 70% Ethanol wurden geeignete Bindebedingungen eingestellt und die Lösung auf die Säule gegeben. Bei der anschließenden Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min, RT) binden spezifisch total RNA-Moleküle länger als 200 Nukleotide an die Matrix der silicagelbasierten Säule, während die übrigen Substanzen abgetrennt werden. Durch die darauf folgenden Wasch- und Zentrifugationsschritte mit RW1- und RPE-Puffer wurde die RNA aufgereinigt. Abschließend wurde die RNA mit einem entsprechenden Volumen nukleasefreiem Wasser durch Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min, RT) von der Säule eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

4.5.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Eine Überprüfung der quantitativen RNA-Ausbeute nach der Isolierung erfolgte ebenfalls durch spektrophotometrische Messung mit Hilfe des NanoDrops (siehe Abschnitt 4.4.2). Eine Wellenlänge von 280 nm erlaubt eine Aussage über eventuelle Verunreinigungen der RNA-Probe mit Proteinen, eine Wellenlänge von 260 nm entspricht dem Absorptionsmaximum der RNA-Basen. Im Gegensatz zur DNA entspricht eine Extinktion

von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml RNA. Reine RNA weist ein Absorptionsverhältnis $A_{260/280}$ von 2,0 auf. Als Referenz wurde nukleasefreies Wasser eingesetzt und die RNA-Proben unverdünnt auf ihre Konzentration hin vermessen.

4.5.3 RNA-Qualitätskontrolle

Zur Qualitätsbestimmung der RNA wurde der Agilent 2100 Bioanalyzer zusammen mit dem RNA 6000 LabChip verwendet. Dieses *lab-on-chip* Verfahren beruht auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese und der Detektion des in die RNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes PicoGreen. Dazu wurde der Chip mit einem Fluoreszenzfarbstoffgemisch beladen und die RNA-Proben sowie ein Größenstandard (RNA 600 ladder) in die entsprechenden Vertiefungen (wells) auf dem Chip pipettiert. Anschließend erfolgte, durch Anlegen eines elektrischen Feldes, die Auftrennung der einzelnen Proben in einem Separationskanal, wohin sie nacheinander durch Mikrokapillaren gelangen. Die Ergebnisse wurden aufgezeichnet und konnten mit Hilfe der Agilent 2100 Bioanalyzer Software analysiert werden. Dabei wurden die RNA-Daten mit dem Größenstandard verglichen und bei eukaryotischen Proben das Verhältnis zwischen ribosomaler 18S und 28S rRNA ermittelt, welches wiederum Aufschluss über die RNA-Qualität gab. Hierfür hat Agilent einen Algorithmus entwickelt, der die gesamten Daten des Elektropherogramms berücksichtigt und daraus eine sogenannte RNA Integrity Number (RIN) berechnet. Die Werte dieser RIN liegen dabei auf einer Skala von 1 (vollständige Degradation) bis 10 (optimale Qualität) (Schroeder et al., 2006). Dies ermöglichte eine objektive und reproduzierbare Aussage über die Qualität der RNA. Der Vorteil der RNA Qualitätskontrolle mittels der *lab-on-chip*-Technologie besteht in der Verwendung von nur sehr wenig RNA und der besseren Vergleichbarkeit von Proben. Die RNA Qualitätskontrolle wurde nach den Versuchsvorschriften des Herstellers durchgeführt.

4.5.4 Reverse Transkription

Da isolierte RNA nicht als *Template* in die anschließende PCR eingesetzt werden kann, muss sie in einen komplementären DNA Strang (cDNA) umgeschrieben werden (reverse Transkription). Erststrangsynthese komplementärer DNA erfolgte mithilfe des RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas. Dieser enthält die RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase aus dem *Moloney Murine Leukemia Virus*. Dieses Enzym besitzt ein Temperaturoptimum von 42 - 45°C und kann, Angaben des Herstellers zufolge, cDNA bis zu einer Länge von 13 kb synthetisieren.

In die Reaktion wurde 1-3 µg total RNA bei einem Gesamtvolumen von 20 µl wie folgt eingesetzt:

1. Zugabe von:
 - 1 - 3 µg RNA
 - 1 µl Random Hexamer Primer (100 µM)
 - x µl Nukleasefreies Wasser add 12 µl
2. Inkubation bei 70°C für 5 min
3. Zugabe von:
 - 4 µl 5x Reaction Buffer
 - 1 µl Nukleasefreies Wasser
 - 2 µl 10mM dNTP Mix
4. Inkubation bei 25°C für 5 min
5. Zugabe von:
 - 1 µl M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)
6. Inkubation bei 25°C für 10 min
7. Inkubation bei 42°C für 1h
8. Inkubation bei 70°C für 10 min (Denaturierung der Reversen Transkriptase)

4.5.5 TaqMan Technologie

Bei der TaqMan-PCR wird die zyklische Amplifikation des spezifischen PCR-Produkts unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Gensonden (*Universal ProbeLibrary Probes*), die eine spezifische Zielsequenz besitzen, verfolgt. Die Vorteile der TaqMan Technologie sind ihre hohe Sensitivität (< 5 ng template ausreichend) und Spezifität, gute Reproduzierbarkeit und akkurate Quantifizierung von mRNA. Jede Sonde besteht aus acht bis neun Nukleotiden, welche mit einem Reporter- (5'- Ende) und einem Quencherfarbstoff (3'- Ende) versehen und komplementär zu der Zielsequenz ist. Der Quencherfarbstoff unterdrückt die Fluoreszenz des Reporters mittels eines sogenannten Fluoreszenz Resonanz Energietransfers (FRET). Solange die Sonde nicht hydrolysiert ist, befinden sich Reporter- und Quencherfarbstoff in räumlicher Nähe, welche durch die Länge der Sonde bestimmt wird (Abb. 6).

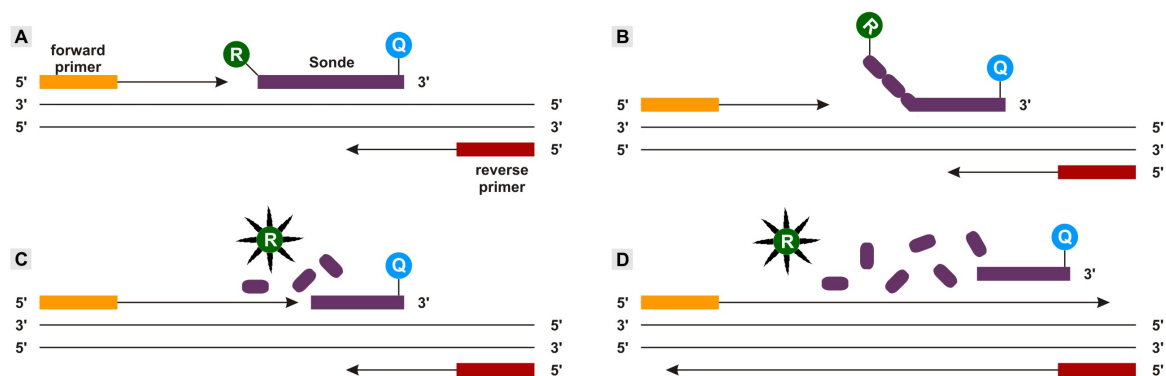


Abb. 6: Das TaqMan Prinzip zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Die Sonde (violett) mit Reporter (R)- und Quencher (Q)-Farbstoff. Forward primer (orange) und reverse primer (rot).

Während der Annealing-Phase lagert sich die Sonde an die komplementäre Sequenz zwischen dem forward und dem reverse Primer an (Abb. 6: A), die innerhalb des PCR-Produkts lokalisiert ist. In der anschließenden Elongationsphase werden die Primer durch die Polymerase verlängert (Abb. 6: B). Die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase spaltet die Sonde schließlich auf und trennt das Reportermolekül räumlich von dem Quencher, wodurch die Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffs steigt (Abb. 6: C). Dieser Vorgang wiederholt sich mit jedem Zyklus, die Fluoreszenzintensität steigt folglich in direkter Abhängigkeit zur Zielsequenzkonzentration (Abb. 6: D).

Die verwendeten Universal Probe Library Sonden, beinhalten sogenannte LNAs (*locked nucleic acids*). LNAs sind modifizierte Nukleotide, die eine erhöhte Hybridisierungsaffinität mit komplementären Nukleotiden besitzen, um Spezifität und Schmelztemperatur trotz ihrer geringen Länge aufrechtzuerhalten. Die real time RT-PCR Reaktion erfolgte in einer 384-well Mikrotiterplatte, die nach jedem einzelnen Zyklus von einem Laser abgetastet wurde. Der Computer sammelte alle Signale und berechnete daraus die Fluoreszenzintensität. Für die Quantifizierung von 50 ng cDNA wurde ein PCR-Protokoll mit 40 Zyklen angewendet (Denaturierung, 95°C, 40 sek; Annealing, 60°C, 60 sek; Elongation, 72 °C, 2 min). Die real time RT-PCR Analyse erfolgte in Triplikaten. Der einzelne Ansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen (Tab. 19):

Komponente	1x Ansatz	c (Stock)	c (Soll)
2x TaqMan Gene Expression Mastermix	5 µl	2x	1x
Primer (forward)	1 µl	10 µM	1 µM
Primer (reverse)	1 µl	10 µM	1 µM
Universal ProbeLibrary Probe	0,125 µl	10 µM	0,125 µM
Nukleasefreies Wasser	0,375 µl		
cDNA (0,02 µg/µl)	2,5 µl		

Tab. 19: 10µl TaqMan Ansatz

4.5.6 Relative Quantifizierung

Zur Evaluierung von real time RT-PCR Ergebnissen können die Rohdaten entweder durch absolute oder relative Quantifizierung ausgewertet werden. Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich relative Quantifizierung für die Erhebung der Ergebnisse benutzt wurde, wird hier nur diese Methode näher beschrieben.

Die Replikation der cDNA steigt während einer PCR-Reaktion exponentiell an, was in der Natur der chemischen Reaktion liegt. Diese kann in einem Diagramm dargestellt werden, in dem man die nach jedem Zyklus gemessene Fluoreszenz (direkt proportional zur Menge an *Template*) gegen die Anzahl der Zyklen aufträgt. Ist am Anfang einer PCR-Reaktion relativ mehr *template* DNA vorhanden, also ein Gen höher exprimiert, steigt die Kurve im Vergleich mit niedriger exprimierten Genen schneller an. Um daraus die Genexpression verschiedener Proben vergleichen zu können, bedient man sich der

Erhebung des C_T -Wertes jeder einzelnen Reaktion. Der C_T -Wert (*Cycle Threshold*) ist ein Schwellenwert, den man in den linearen Bereich der Kurve legt, in dem die Genexpression statistisch signifikant ansteigt. Im Graph wird der C_T -Wert als Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit der Schwellenwertgerade dargestellt. Daraus ergibt sich für höher exprimierte Gene ein geringerer Wert, wohingegen niedriger exprimierte Gene einen höheren Wert erreichen. Zur relativen Quantifizierung werden die Ergebnisse auf einen Kalibrator bezogen, der gleich eins gesetzt wird. Im Rahmen dieser Arbeit dient jeweils die unstimulierte bzw. Wildtyp Probe als Kalibrator. Zusätzlich werden die gemessenen Genexpressionswerte auf ein Referenzgen normalisiert. Ein gutes Referenzgen zeichnet sich durch konstante Genexpression in verschiedenen Geweben, Zellen und Experimenten aus. Durch die Normalisierung auf ein Referenzgen und dessen Beobachtung wird die mögliche Beeinflussung durch experimentelle Prozessierung ausgeschlossen und eine akkurate Vergleichbarkeit der erhobenen Genexpressionsdaten gewährleistet. Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurde murine ATPase, dessen Genexpression unter allen experimentellen Bedingungen konstant ist, als Referenzgen verwendet. Die Erhebung der C_T -Werte aus den Rohdaten sowie die relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode übernahm das Programm RQ Manager 2.1:

1. Bildung von Mittelwerten (CT Avg)
2. Normalisierung auf das Referenzgen (ATPase):
 $C_T \text{ Avg (Gen)} - C_T \text{ Avg (ATPase)} \rightarrow \Delta C_T \text{ Avg}$
3. Bezug auf Kalibrator:
 $\Delta C_T \text{ Avg (Probe)} - \Delta C_T \text{ Avg (Kalibrator)} \rightarrow \Delta\Delta C_T \text{ Avg}$
4. relative Änderung der Genexpression: $\rightarrow 2^{-\Delta\Delta C_T \text{ Avg}}$

4.6 Lipidanalysen

Netzhäute und Serum wurden einer Fettsäure- und Phospholipidanalyse unterzogen, die in Kooperation mit Dr. Richard Mauerer (Synlab Medizinisches Versorgungszentrum Weiden GmbH, Deutschland) durchgeführt und analysiert wurden.

4.6.1 Fettsäurezusammensetzung

Netzhäute wurden mit Hilfe des Tissue Lyzers homogenisiert und deren Proteinkonzentrationen mittels Bradford Assay bestimmt. Die Fettsäurezusammensetzung von Serum und Netzhäute wurden durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) bestimmt. Hierzu wurden 50 μg Protein von jedem retinalen Homogenisat mit Acetylchlorid in Methanol für 1 h bei 95°C derivatisiert (Lepage et al., 1989). Eine interne

Standardmischung, bestehend aus Tridecansäure (C13:0) und Heneicosansäure (C21:0iso), wurde vor der Methylierung zugegeben. Die Methylester wurden mit Hexan extrahiert und mit einem Shimadzu QP-2010 GC-MS analysiert. Fettsäuremethylester wurden über ihre relative Retentionszeiten identifiziert. Die Quantifizierung erfolgte durch eine externe Kalibrierung und relative Molprozentage wurden bestimmt.

4.6.2 Phospholipidanalyse

Phospholipide wurden durch Elektrospray-Ionisation Tandem-MS/MS (ESI-MS/MS) im Positivionenmodus quantifiziert (Liebisch et al., 2004). Elektrospray-Ionisation ist eine Technik zur Erzeugung von Ionen, die in der Massenspektrometrie verwendet wird. Dabei findet die Erzeugung der Ionen unter Atmosphärendruck statt. Es ist das bevorzugte Ionisationsverfahren zur Analyse von Biomolekülen, da es sehr schonend für das Analytmolekül ist und kaum zu Fragmentationen führt.

Hierzu wurden Netzhauthomogenisate in Gegenwart von nicht natürlich vorkommenden Lipidspezies als interne Standards extrahiert. Lipidextrakte wurden mittels ESI-MS/MS durch Benutzung eines Quattro Ultima triple-quadrupole Massenspektrometers, eines HTS PAL Autosamplers und einer Agilent 1100 Pumpe charakterisiert. Die Proben wurden durch direkte Flussinjektionsanalyse quantifiziert. Für Phosphatidylcholin (PtdCho) wurde ein *precursor ion scan* von m/z 184 verwendet. Für Phosphatidylethanolamin (PtdEtn) und Phosphatidylserin (PtdSer) kamen *neutral loss scans* von m/z 141 bzw. m/z 185 zum Einsatz. Nicht natürlich vorkommende Lipidspezies wurden als interne Standards verwendet (PtdCho 28:0, 44:0, PtdEtn 28:0, 40:0, PtdSer 28:0, 40:0). Die Quantifizierung wurde mittels Standardadditionskalibrierung zu Netzhauthomogenisaten durch Verwendung mehrerer natürlicher Lipidspezies für jede Lipidklasse (PtdCho 34:1, 36:2, 38:4, 40:0; PtdEtn 34:1, 36:2, 38:4, 40:6; PtdSer 34:1, 36:2, 38:4, 40:6) durchgeführt. Diese Eichgeraden wurden auch für nicht kalibrierte Spezies angewendet. Die Konzentrationen von gesättigten, einfach- und mehrfach ungesättigten Spezies wurden durch Vergleich mit der ähnlichsten gesättigten, einfach oder mehrfach ungesättigten Eichgerade bestimmt.

4.7 Funktionsassays

Änderungen der Genexpression zeigen nicht zwangsläufig einen Effekt auf translationaler Ebene. Mit Hilfe von funktionellen Assays wurden daher die gemessenen Genexpressionsprofile in stimulierten BV2 Zellen und primären Mikroglia auf ihre phagozytische, anti-inflammatorische und neuroprotektive Wirkung sowie ihr Migrationsverhalten hin untersucht.

4.7.1 Phagozytose Assay

Makrophagen spielen innerhalb des zellulären, unspezifischen Abwehrsystems eine wesentliche Rolle. Für die Ausübung ihrer Funktion sind dynamische Änderungen des Zytoskeletts sowie Aufnahmeprozesse wie Phagozytose von entscheidender Bedeutung. Da es sich bei der Phagozytose um die Aktin-abhängige Internalisierung von Partikeln größer als 0,5 µm handelt, wurde ein Phagozytose Assay mit blauen Latex Beads gewählt. Blaue Latex Beads (1 µm) aus Polystyren wurden hierfür in einer Konzentration von 1 µl Beads / ml in Wells einer 6-well Platte gegeben und nach 8 Stunden Inkubation mit 1x PBS gewaschen. Die Partikelaufnahme wurde mittels Durchlichtmikroskopie überprüft. Durch Auszählen von 100 Zellen in 6 individuellen Wells und Quantifizierung der daraus resultierenden positiven Zellen in Prozent wurde das Phagozytosepotenzial ermittelt.

4.7.2 Migrationsassay

Zur Evaluierung der Zellmigration wurde das Costar Transwell System (8 µm Porengröße, Polycarbonatmembran, 24 mm Durchmesser) verwendet. 2,6 ml Medium wurden in die untere Kammer gegeben und BV2 Zellen (1×10^6 Zellen in 1,5 ml) in das obere Well ausgesät. Die unterschiedlichen Stimulanzen wurden der unteren Kammer beigelegt. Nach 24h Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurden die Zellen oberhalb der Membran entfernt. Zellen, die durch die Membran zur unteren Oberfläche migriert waren, wurden mit einem Zellschaber abgehoben. Die Migrationsaktivität der gewanderten Zellen wurde durch Auszählen mit Hilfe einer Zählkammer quantifiziert.

4.7.3 Griess Reagenz System

In Zellkulturüberständen von Mikroglia (BV2 Zellen und primäre Mikroglia) kann Nitrit als stabiles Abbauprodukt des NO-Metabolismus mittels Griess Reagenz System nachgewiesen werden. Dieser Assay basiert auf einer Diazotierungsreaktion, welche Sulfanilamid und N-napthylethylen-diamindihydrochlorid (NED) unter sauren (Phosphorsäure) Bedingungen verwendet. Um eine genaue NO₂-Quantifizierung zu gewährleisten, wird mit einem Nitritstandard eine Referenzkurve erstellt. Die Absorption des violetten Azofarbstoffs wird bei 535 nm gemessen. Die Durchführung des Tests erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

4.7.4 Zytotoxizitätsassay

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein zytosolisches Enzym, welches bei Permeabilitätsschädigung der Zellmembran freigesetzt wird. Die LDH-Freisetzung ist

proportional der Anzahl untergehender Zellen in einer Kultur. Mit Hilfe des CytoTox 96 Zytotoxizitätstests war eine LDH-Messung im Kulturüberstand stimulierter Mikroglia (BV2 Zellen und primäre Mikroglia) möglich. Freigewordenes LDH in Zellkulturüberständen wurde mit einem 30-minütigen gekoppelten Enzymassay gemessen. LDH katalysiert die Umwandlung von Laktat zu Pyruvat, dabei entsteht NADH. In einer von dem Enzym Diaphorase katalysierten Reaktion von NADH mit Tetrazolium Salz (INT) entsteht ein roter Farbstoff (Formazan). Die Bestimmung des LDH-Gehalts erfolgte durch colorimetrische Messung und entsprechend den Angaben des Herstellers.

4.7.5 Apoptose Assay

Zur Untersuchung von Apoptose wurde der Caspase-Glo[®] 3/7 Assay verwendet. Dieser Lumineszenzassay erfasst die Enzymaktivität von Caspase 3 und 7 in Zellkulturüberständen. Das System bietet ein prolumineszentes Caspase-3/7 Substrat, welches die Tetrapeptidsequenz DEVD enthält. Dieses Substrat wird gespalten, um ein Aminoluziferin abzugeben. Die Zugabe des Caspase Reagenz resultiert in einer Spaltung des Substrats und der Entstehung eines Lumineszenzsignals nach 3-stündiger Inkubation. Die Caspaseaktivität wurde mit Hilfe eines Luminometers analysiert und als relative Lichteinheiten quantifiziert.

4.8 Morphologische und histologische Methoden

4.8.1 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Detektion des Fluoreszenzfarbstoffs, der an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, wurden die Zellpräparate mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axioskop2 MOT Plus untersucht. Als Lichtquelle dient dabei eine Quecksilberdampflampe, welche Licht im gesamten sichtbaren Spektrum, sowie im ultravioletten Bereich emittiert. Die für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff benötigte Wellenlänge wird über optische Filter isoliert. Das Licht regt den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff an, wodurch letzterer Licht einer definierten Wellenlänge abgibt. Das emittierte Licht, das längerwelliger ist als das anregende Licht, wird im Objektiv gesammelt und in das Okular weitergeleitet.

4.8.2 Immunzytochemie

Der immunzytochemische Nachweis von Proteinen oder Peptiden ist eine gängige Methode, um deren Lokalisierung innerhalb der Zelle und deren Expression nachzuweisen. Hierfür wurden primäre Antikörper gegen spezifische Epitope verwendet, die mit Hilfe von sekundären Antikörpern detektiert werden konnten. BV2 Zellen bzw.

primäre Mikroglia wurden bei 37°C und 5% CO₂ auf sterilen Deckgläschen kultiviert. Nachdem die Zellen auf den Deckgläschen angewachsen waren, wurden sie zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit 4% PFA (10 min, RT) fixiert. Im Anschluss daran und auch nach jeder weiteren beschriebenen Behandlung erfolgten mehrfache Waschschrte (mind. 3x) mit 1x PBS. Die Zellen wurden 30 min mit Blocking Puffer inkubiert, um eine unspezifische Bindung des primären Antikörpers und somit unerwünschte Hintergrundfluoreszenz zu minimieren. Anschließend wurde 1 h mit primärem Antikörper, gebrauchsfertig in Antikörper-Lösung verdünnt (siehe Tab. 4), behandelt. Daraufhin wurden die Zellen 30 min mit sekundärem Antikörper, gebrauchsfertig in 1x PBS verdünnt, inkubiert. Dieser Schritt verlief aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Fluoreszenzfarbstoffs unter abgedunkelten Bedingungen. Anschließend wurden die Zellkerne mit 0,1 µg/ml DAPI-Lösung (10 min, RT) angefärbt. Zum Schluss wurden die Glasplättchen aus den Wells entfernt, mit Fluorescent Mounting Medium bedeckt und auf einem Objektträger platziert.

4.8.3 Lipidfärbung mit Nilrot

Neutrallipide sind Bestandteile der Zellmembran und der Zellorganellen. Darüber hinaus reichern sie sich in intrazellulären Lipidtröpfchen an. Zur Detektion der Neutrallipide wurde in dieser Arbeit der Farbstoff Nilrot eingesetzt. Nilrot, auch als Nilblau-Oxazon bezeichnet, ist ein lipophiler fluoreszierender Phenoxazin-Farbstoff. Für die Lebendfärbung wurde eine Stammlösung (250 ng/ml in Aceton) mit Aceton auf eine Endkonzentration von 250 pg/ml verdünnt. Die Verdünnung wurde direkt in das Kulturmedium gegeben und 8 min inkubiert. Die Zellen wurden 3x mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA (10min / RT) fixiert und die Nuklei mit 0,1 µg/ml DAPI-Lösung gefärbt. Nach wiederholtem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen eingebettet und mit dem Axioskop2 Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Nilrot besetzt selektiv die neutralen Lipide in den Zellen. Dabei tritt Fluoreszenz eines bestimmten Wellenlängenbereichs auf:

Anregungswellenlänge: 525 – 560 nm (rot)

Emissionswellenlänge: > 590 nm

4.8.4 Kryoeinbettung von Geweben

Nicht fixierte Gewebe wurden nach kurzem Waschen in 1x PBS in TissueTek O.C.T. Compound einbettet, mit Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert. Gewebe, das dauerfixiert werden sollte, wurde nach erfolgter Präparation für 2 h in 4% PFA fixiert, mehrmals in 1x PBS gewaschen und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur in 18% Saccharose inkubiert. Dann wurde das Gewebe in O.T.C. compound eingebettet und

mit Trockeneis schockgefroren. Mit Hilfe eines Kältemikrotoms wurden 10 µm Gewebeschnitte angefertigt, auf Polysin-Objektträger aufgezogen und für mindestens 1 h bei RT getrocknet. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte bei -80°C gelagert.

4.8.5 Histologische Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin

Die Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin Y dient als einfache und schnelle Übersichtsfärbung. Dabei werden die Zellkerne blau und die übrigen Gewebekomponenten in unterschiedlichen Rottönen dargestellt. Schnitte von nicht fixierten Geweben wurden aufgetaut, luftgetrocknet und für 20 min in 100% Ethanol bei -20°C fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Schnitte 5 min bei RT in 1x PBS gewaschen. Es erfolgte eine Inkubation in Hämatoxylin-Lösung für 5 min bei RT. Die Schnitte wurden anschließend 15 min unter fließendem Leitungswasser gebläut, 3 min in 1% Eosin Y gegengefärbt, kurz in Wasser ausgewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% EtOH 5 sek, 80% EtOH 5 sek, 90% EtOH 5 sek, 100% EtOH, 2 x 2 min) für 3 min in 100% Xylol überführt. Das Einbetten der Schnitte erfolgte in dem Xylol-löslichen Einbettmedium Entellan.

4.8.6 Immunhistochemie

4.8.6.1 Antikörperfärbungen an Gewebeschnitten

Kryoschnitte wurden aufgetaut und luftgetrocknet. Nicht-fixierte Schnitte wurden mit 4% PFA (6 min, RT) nachfixiert und mehrfach mit 1x PBS gewaschen. Für eine erfolgreiche Antikörperfärbung war eine Rehydrierungszeit von 10 min in 1x PBS notwendig. Mit BLOTTO folgte eine Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen im Gewebe für 30 min bei RT. Nun und nach jeder weiteren beschriebenen Behandlung erfolgten mehrfache Waschschrte (mind 3x) mit 1x PBS. Die Schnitte wurden mit primären Antikörpern, gebrauchsfertig in Antikörperlösung verdünnt, bei 4°C für 24 h bzw. bei RT für 4 h inkubiert (siehe Tab. 4). Die nachfolgenden Schritte wurden alle im Dunkeln durchgeführt. Es folgte eine Inkubation der Schnitte mit sekundären fluoreszenz-markiertem Antikörper (Verdünnung in 1x PBS) für 1 h bei RT (siehe Tabelle 5). Die Zellkerne im Gewebe wurden 10 min bei RT 0,1 µg/ml DAPI-Lösung gegengefärbt. Die Schnitte wurden in Fluorescent Mounting Medium eingebettet und mit dem Axioskop2 Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

4.8.6.2 Antikörperfärbungen an vollständigen Geweben

Antikörperfärbungen an vollständigen Geweben (whole mount) wurden an der gesamten Netzhaut von Mäusen durchgeführt. Die entsprechenden Gewebe wurden präpariert und

in 1x PBS bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. In 4% PFA wurden die Augen für 4 Stunden und 4°C fixiert. Im Anschluss daran wurden die Augen zur Erleichterung der Zugänglichkeit zu den Antigen-Bindungsstellen über Nacht bei 4°C in Permeabilisierungslösung auf einem Rotationschüttler inkubiert. Nun und nach jeder weiteren beschriebenen Behandlung erfolgten mehrfache Waschschrte (mind. 3x) mit 1x PBS. Nach Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen im Gewebe mit BLOTTO (1 h, RT) wurde das Gewebe mit primären Antikörper, gebrauchsfertig in Antikörperlösung verdünnt, bei 4°C für 24h inkubiert (siehe Tab. 4). Die nachfolgenden Schritte wurden alle im Dunkeln durchgeführt. Es folgte eine Inkubation der Schnitte mit sekundären fluoreszenzmarkiertem Antikörper (Verdünnung in 1x PBS) für 1h bei RT (siehe Tabelle 5). Die Gewebe wurden abschließend gewaschen und in Fluorescent Mounting Medium eingebettet. Eine Analyse der whole mount Präparate erfolgte mit dem Axioskop2 Fluoreszenzmikroskop in Form von Z-Stapel Aufnahmen.

4.8.7 TUNEL-Assay

Spaltung genomischer DNA während der Apoptose kann sowohl zu doppelsträngigen DNA-Fragmenten mit geringem Molekulargewicht (Mono- und Oligonukleosomen) als auch Einzelstrangbrüchen („nicks“) mit hohem Molekulargewicht führen. Diese DNA-Strangbrüche können durch Markierung des freien 3'-OH Endes mit modifizierten Nukleotiden in einer enzymatischen Reaktion sichtbar gemacht werden (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*, TUNEL). Im ersten Schritt erfolgt die Markierung der Strangbrüche mit terminaler Deoxynukleotidyltransferase (TdT), welche die Polymerisation von markierten Nukleotiden an freie 3'-OH-DNA-Enden katalysiert (TUNEL-Reaktion). Mit Hilfe eines anti-Fluorescein Antikörpers, an den Peroxidase (POD) gekoppelt ist, kann 3'-OH-angehängtes Fluorescein detektiert werden. Nach anschließender Substratreaktion können die gefärbten Kryoschnitte analysiert werden. Zellkerne apoptotischer Zellen, die mit dem TUNEL-Assay gefärbt werden, erscheinen braun.

Kryoschnitte wurden mit 4% PFA-Lösung fixiert (20 min, RT) und anschließend 30 min in 1x PBS rehydriert. Nach jeder folgenden Behandlung erfolgten mehrfache Waschschrte (mind. 3x) mit 1x PBS. Zur Zerstörung endogener Peroxidaseaktivität wurden die Kryoschnitte mit 3% H₂O₂-Lösung (10 min, RT) behandelt. Es folgte eine Inkubation in frisch vorbereiteter Permeabilisierungslösung (2 min, 4°C). Die Kryoschnitte wurden mit 50 µl TUNEL-Reaktionsmix behandelt, welche zuvor durch 1:10 Verdünnung der Enzym-Lösung mit Label-Lösung hergestellt wurde (37°C, 5% CO₂, 60 min). Als Negativkontrolle diente Label-Lösung ohne Enzym-Lösung. Für eine Positivkontrolle dienten Kryoschnitte, die vor Inkubation mit TUNEL-Reaktionsmix mit rekombinater DNase I-Lösung (3.000

U/ μ l) behandelt wurden (10 min / RT). Die Kryoschnitte konnten nun mit einer Anregungswellenlänge von 450 – 500 nm und in einem Wellenlängenbereich von 515 - 565 nm (grün) am Axioskop2 Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Zur Substratreduktion wurden die Kryoschnitte mit 50 μ l Converter-POD Lösung (37°C, 5% CO₂, 30 min) inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Behandlung mit DAB Substrat (10 min, RT). Zellkerne wurden durch Inkubation mit 0,1 μ g/ml DAPI-Lösung visualisiert (10 min / RT). Nach Einbetten der Kryoschnitte mit Fluorescent Mounting Medium wurden diese am Mikroskop ausgewertet. Dazu wurden positiv gefärbte Zellen bei 40x Vergrößerung ausgezählt.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der Rs1h-defizienten Netzhaut

Gehrig und Kollegen führten DNA-Mikroarrays von retinalen Geweben der postnatalen Stadien P7, P9, P11 und P14 an Wildtyp und Rs1h^{-/-} Mäusen durch. Ziel war eine nähere Untersuchung der molekularen Ereignisse, die der Degeneration der Photorezeptoren in Rs1h-defizienten Mäusen vorausgehen. Die Analysen der Daten zeigten eindeutig, dass eine Mikroglia-assoziierte Genexpression der Expression Apoptose-relevanter Transkripte zeitlich deutlich vorausgeht (Gehrig et al., 2007). Ausgehend von diesen Ergebnissen lag eines der Ziele der vorliegenden Dissertation in der Visualisierung und Charakterisierung der frühen Mikrogliaaktivierung in Netzhäuten von Rs1h^{-/-} Tieren als einem prototypischen Mausmodell für erbliche Netzhautdegeneration.

5.1.1 Histologische Evaluierung der Mikrogliaaktivierung bei der postnatalen Entwicklung

Eines der ersten Ziele bestand in der Visualisierung und Charakterisierung der frühen Mikrogliaaktivierung in der Rs1h-defizienten (Rs1h^{-/-}) Maus, einem etablierten Model für schnell fortschreitende hereditäre retinale Degeneration (Weber et al., 2002). Hierzu wurden histologische Untersuchungen an retinalen Kryoschnitten von Wildtyp und Rs1h^{-/-} Mäusen zu sechs verschiedenen Zeitpunkten (P9, P11, P14, P18, P21 und P24) durchgeführt. Von besonderem Interesse waren dabei der Verlauf der Netzhautentwicklung sowie die morphologischen Veränderungen in Folge der Mikrogliaaktivierung bzw. Photorezeptordegeneration (Abb. 7: A-L). Zu den früh gewählten Zeitpunkten P9 und P11 stimmten Rs1h^{-/-}-Mausmodell und Wildtyp Tiere morphologisch überein. Die Netzhaut wies eine Differenzierung in Körnerschichten und plexiforme Schichten auf, eine Unterscheidung in äußere und innere Segmente von Photorezeptoren war jedoch nicht nachzuweisen (Abb. 7: A-D). In Wildtyp Tieren waren am Ende der zweiten postnatalen Woche (P14) alle retinalen Schichten klar voneinander abgegrenzt und deren allgemeine Anordnung entsprach im Wesentlichen der adulter Tiere. Im Vergleich zu jüngeren Tieren waren die plexiformen Schichten dicker, während die innere Körnerschicht (INL) etwas dünner erschien. Des Weiteren war erstmals eine Differenzierung der Photorezeptoren in innere und äußere Segmente (OS) erkennbar (Abb. 7: E). Gleichaltrige Rs1h^{-/-} Netzhäute wiesen zwar ähnliche Morphologien auf, allerdings war eine leichte Disorganisation der äußeren Körnerschicht (ONL) bereits nachzuweisen (Abb. 7: F).

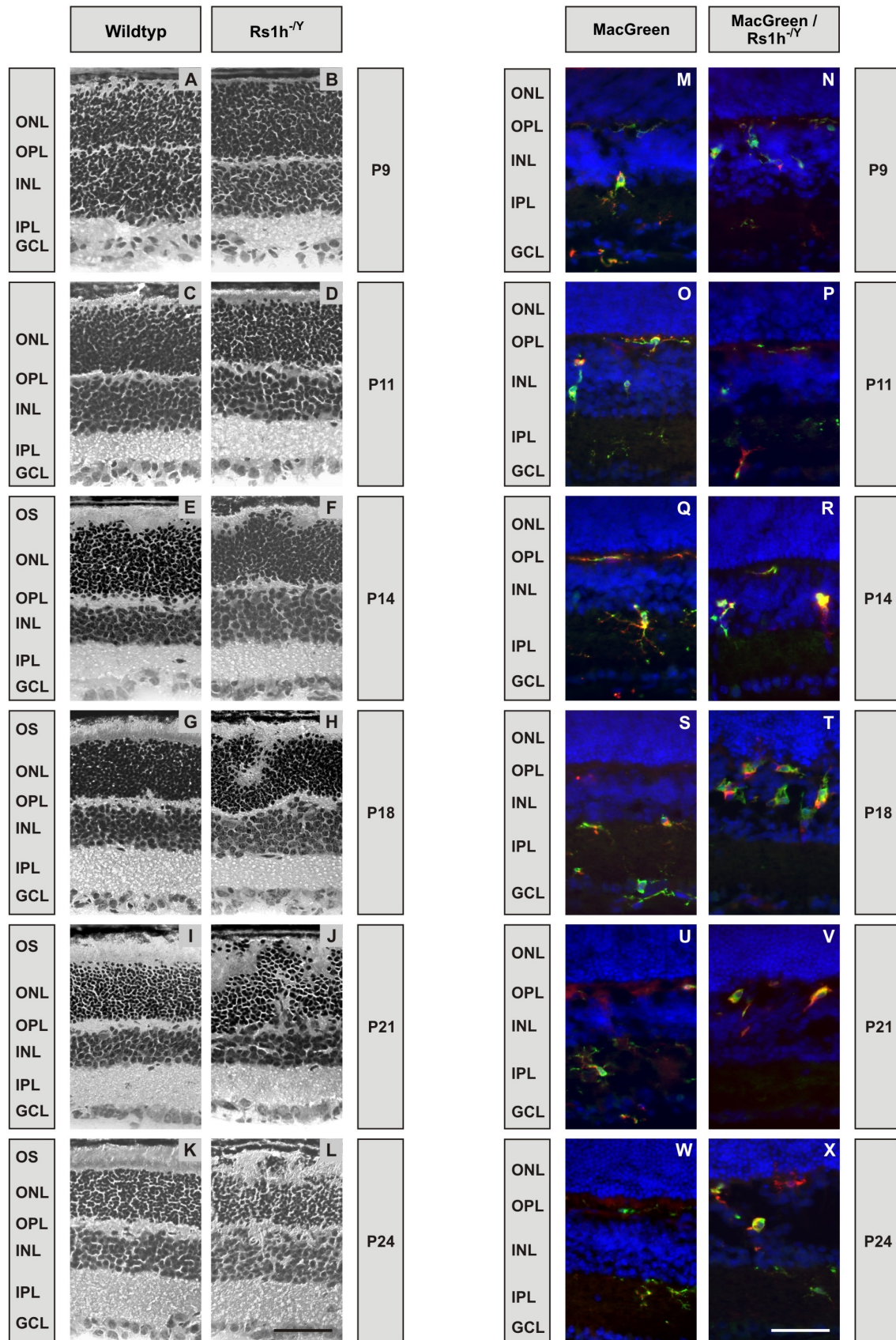


Abb. 7: Hämatoxylin-Eosin- und Immunfluoreszenzfärbungen unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Wildtyp bzw. $Rs1h^{-/-}$ Netzhäuten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung (A-L). Immunfluoreszente Kovisualisierung von F4/80 (rot) und GFP (grün) markierten Mikroglia in MacGreen bzw. MacGreen / $Rs1h^{-/-}$ Netzhäuten. Färbung der Zellkerne mit DAPI. ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, innerplexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Maßstab: 50 μ m.

Zum Zeitpunkt P18 traten im Vergleich zu Wildtyp Mäusen in Rs1h-defizienten Mäusen klare morphologische Anomalien im Bereich der ONL und der äußeren plexiformen Schicht (OPL) auf, welche mit der fortschreitenden Degeneration der Photorezeptoren im Zusammenhang standen. Besonders die Mislokalisierung der Photorezeptoren im subretinalen Spalt und die Bildung von Pseudorosetten waren zu diesem Zeitpunkt regelmäßig zu beobachten (Abb. 7: G und H). Drei Tage später (P21) äußerte sich dieser Phänotyp morphologisch noch deutlicher und verglichen mit Wildtyp Kontrollen war eine strukturelle Abgrenzung zwischen Photorezeptoren, ONL, OPL und INL nicht mehr möglich (Abb. 7: I und J). Im adulten Alter von 24 Tagen waren in Netzhäuten von Rs1h^{-Y} Mäusen keine intakten äußeren Segmente der Photorezeptoren mehr nachweisbar, während Wildtyp Tiere die vollentwickelte retinale Struktur einer gesunden Netzhaut aufwiesen (Abb. 7: K und L). Obwohl Berichte von anderen Arbeitsgruppen einen eher variablen Phänotyp in Rs1h^{-Y} Mäusen beschreiben und Veränderungen vor allem in der inneren Körnerschicht verzeichnen, stimmen die eigenen morphologischen Analysen mit früheren Untersuchungen unserer Rs1h^{-Y} Mauslinie überein (Weber et al., 2002).

Zur besseren Visualisierung der retinalen Mikroglia wurden Retinoschisin-defiziente Weibchen (Rs1h^{-/-}) mit transgenen MacGreen Männchen verpaart (Sasmono et al., 2003), welche *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) unter der Kontrolle des Makrophagen-spezifischen *csf1r* Promotors exprimieren. EGFP⁺ Mikroglia waren somit unabhängig von ihrem Aktivierungsstatus mikroskopisch detektierbar. Ziel war es nun, den zeitlichen Verlauf der Mikrogliaaktivierung im Bezug zur Netzhautdegeneration näher zu beleuchten. In jungen transgenen MacGreen bzw. MacGreen / Rs1h^{-Y} Mäusen (P9 und P11) waren EGFP⁺ Mikroglia innerhalb der plexiformen Schichten und der inneren Körnerschicht (INL) feststellbar. In der äußeren Körnerschicht (ONL) waren keine Mikroglia sichtbar (Abb. 7: M-P). Aufgrund ihrer stark ramifizierten Morphologie und dem Durchspannen der plexiformen Schichten, gestaltete sich die bildliche Darstellung allerdings schwierig. Aus diesem Grund wurden retinale Mikroglia zusätzlich mit dem Makrophagen-spezifischen Antikörper F4/80 identifiziert (Hume et al., 1983). Somit machte die Kolo-kalisierung von GFP und F4/80 eine klare Identifizierung der Mikroglia schließlich möglich. Zur besseren Orientierung wurden die Körnerschichten sowie die Ganglionzellschicht mit DAPI gegengefärbt. Zum Zeitpunkt P14 wiesen MacGreen bzw. MacGreen / Rs1h^{-Y} Mäuse vereinzelt aktivierte Mikroglia in der inneren Körnerschicht auf (Abb. 7: Q und R). In P18 MacGreen / Rs1h^{-Y} Netzhäuten war eine Vielzahl aktivierter Mikroglia mit amöboider Struktur in OPL und INL deutlich zu erkennen (Abb. 7: T), während MacGreen-Kontrollen ramifizierte Mikroglia in den plexiformen Schichten zeigten (Abb. 7: S). Zu den späteren Zeitpunkten P21 und P24 waren ebenfalls aktivierte, amöboide Mikroglia in OPL und INL

sichtbar, allerdings in geringerer Zellzahl. MacGreen Mäuse zeigten im Gegensatz dazu das bekannte Bild ramifizierter Mikroglia in den plexiformen Schichten (Abb. 7: U-X).

Für eine unabhängige Visualisierung der Mikrogliamorphologie zum Zeitpunkt P21 wurden *in situ* GFP-Fluoreszenzaufnahmen von P21 retinalen whole mount Präparaten analysiert. Diese Ergebnisse legten vorwiegend ramifizierte Mikroglia in MacGreen Netzhäuten (Abb. 8: A) und hauptsächlich aktivierte, amöboide Zellen in MacGreen / Rs1h^{-/-} Mäusen offen (Abb. 8: B). Die Aktivierung der Mikroglia ist somit entweder eine frühe Reaktion auf den Beginn der retinalen Degeneration oder ein unabhängiges Ereignis der Rs1h-Defizienz.

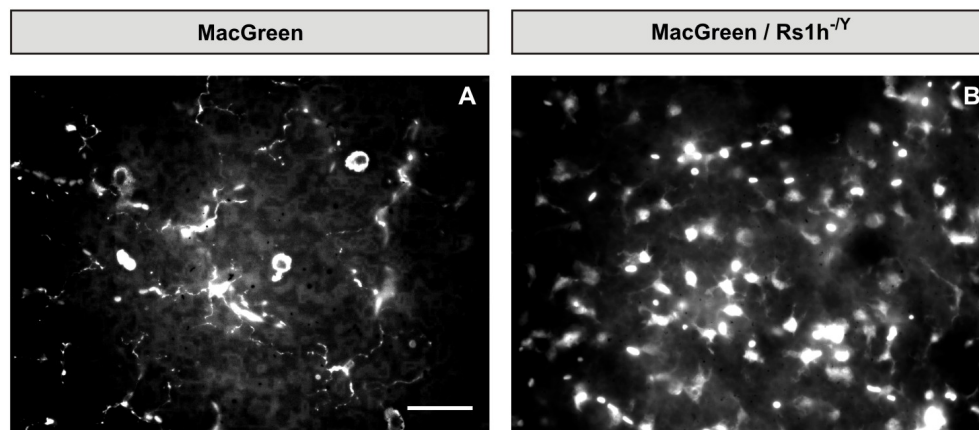


Abb. 8: *In situ* GFP-Fluoreszenzaufnahmen von P21 retinalen whole mount Präparaten. Ramifizierte Mikroglia in MacGreen Mäusen (A) vs. aktivierte, amöboide Zellen in MacGreen / Rs1h^{-/-} Mäusen (B). Maßstab, 50 µm

5.1.2 Histologische Charakterisierung der Müllerzellaktivierung und Photorezeptordegeneration

Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass neben Mikroglia auch Müllerzellen im Rs1h-defizienten Mausmodell aktiviert werden (Luna et al., 2009, Reid et al., 2003). Somit stellte sich die Frage nach dem zeitlichen Kontext der Aktivierung beider glialer Zelltypen. Zur Klärung dieses Sachverhalts wurden Kryoschnitte von Wildtyp und Rs1h^{-/-} Mäusen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien immunhistochemisch untersucht (P14, P18 und P21). Anti-F4/80 wurde als Marker für Mikrogliaaktivierung verwendet (Hume et al., 1983), während Anti-GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) als Stressindikator und Marker für retinale Müllerzellen eingesetzt wurde (Sarthy et al., 1991). In wildtypischen Netzhäuten beschränkte sich die GFAP Färbung zu allen drei Zeitpunkten auf die Ganglionzellschicht (Abb. 9: A, C und E). Diese Befunde stimmen mit früheren Arbeiten von Sarthy et al. überein, welche GFAP im Verlauf der normalen Entwicklung nur in Astrozyten nachweisen konnten (Sarthy et al., 1991). Die GFAP Färbung von Müllerzellen in Rs1h^{-/-} Netzhäuten zum Zeitpunkt P14 war der in Wildtyp Kontrollen ähnlich und zeigte nur in der Ganglionzellschicht eine Expression (Abb. 9: B). Im Gegensatz dazu war GFAP zum

Zeitpunkt P18 bereits in der inneren Hälfte der $Rs1h^{-/-}$ Netzhäuten sichtbar, was wiederum für eine Aktivierung der Müllerzellen in Folge der einsetzenden Photorezeptordegeneration spricht (Abb. 9: D). Am Ende der dritten postnatalen Woche (P21) durchzog die GFAP Expression die gesamte Netzhaut (Abb. 9: F). Zur Visualisierung der retinalen Photorezeptordegeneration wurden unabhängige Kryoschnitte von Wildtyp und $Rs1h^{-/-}$ Netzhäuten in verschiedenen Entwicklungsstadien (P14, P18 und P21) immunhistochemisch untersucht. Als Marker für Zapfen und Bipolarsynapsen wurde FITC-konjugiertes *peanut agglutinin* (PNA) verwendet, während zur Markierung der terminalen Stäbchenaxone Anti-PSD95 eingesetzt wurde. Zu allen drei Zeitpunkten war eine positive Expression von PNA und PSD95 in der äußeren plexiformen Schicht detektierbar, was für eine intakte synaptische Transmission spricht (Abb. 9: G, I und K). Im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen wiesen $Rs1h^{-/-}$ Netzhäute zum Zeitpunkt P14 eine ähnliche Kolo-kalisation von PNA und PSD95 auf, was eine normale Verbindung zwischen prä- und postsynaptischen Zelltypen verdeutlicht (Abb. 9: H). Zum Zeitpunkt P18 und umso mehr bei P21 waren die äußeren plexiformen Schichten deformiert und $PSD95^{+}$ Photorezeptorenden erstreckten sich in die äußere Körnerschicht (ONL). Des Weiteren war eine positive Expression von PNA in der plexiformen Schicht nicht mehr detektierbar (Abb. 9: J und L).

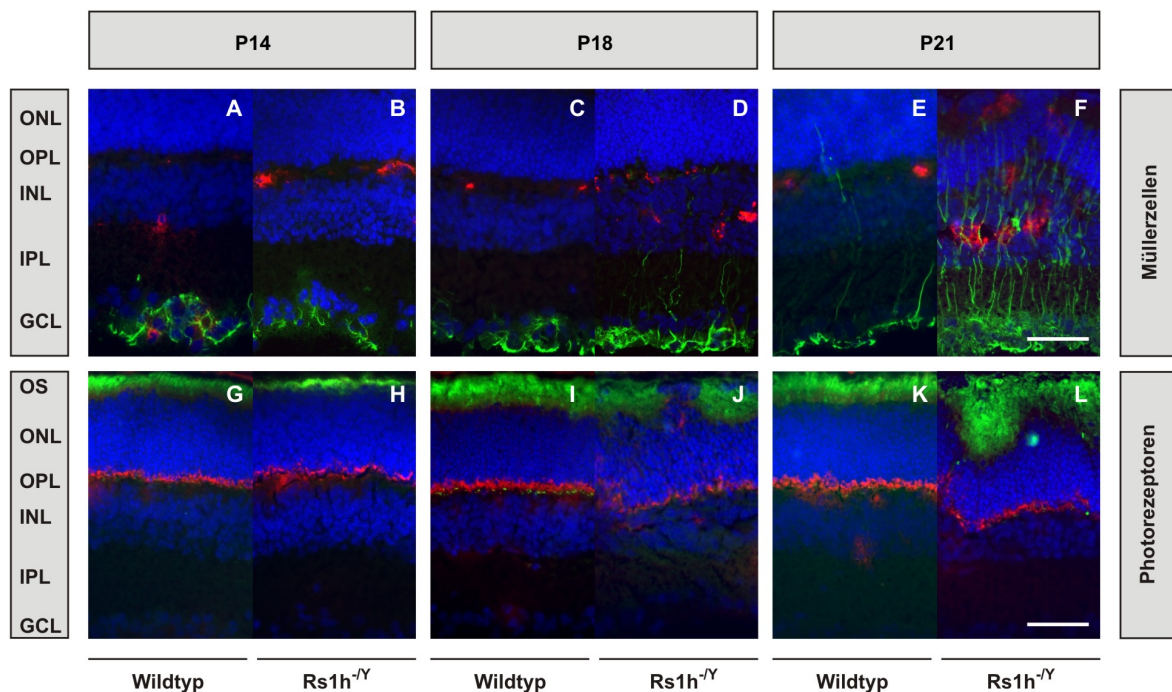


Abb. 9: Histologische Charakterisierung von Müllerzellen und Photorezeptordegeneration im $Rs1h$ -defizienten Mausmodell. Fluoreszenzaufnahmen von Wildtyp bzw. $Rs1h^{-/-}$ Mäusen zu den Zeitpunkten P14, P18 und P21. F4/80 (rot) markierte Mikroglia und GFAP (grün) markierte Müllerzellen (A-F). Zapfen bzw. bipolare Photorezeptorsynapsen markiert mit PNA (grün) und PSD95 (rot) markierte Photorezeptorsynapsen (G-H) Visualisierung der Zellkerne mit DAPI (blau). GCL, ganglion cell layer (Ganglionzellschicht); INL, inner nuclear layer (innere Körnerschicht); IPL, inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht); ONL, outer nuclear layer (äußere Körnerschicht); OPL, outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht). Maßstab: 50 μ m.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine zerstörte plexiforme Schicht und disorganisierte synaptische Strukturen im Rs1h-defizienten Mausmodell erst nach normaler Schichten- und Synapsenbildung in der äußeren plexiformen Schicht entstehen.

5.1.3 Transkriptionelle Veränderungen in der Netzhaut von Rs1h-defizienten Mäusen

Die genomweite Expressionsstudie Rs1h-defizienter Netzhäute offenbarte unabhängig von Retinoschisin eine Reihe differentiell exprimierter Transkripte mit funktionellen Verbindungen zu Zelladhäsion, Zytoskelett, Vesikeltransport und der Immunantwort. Die meisten Gene dieser Gruppen wurden reguliert, bevor eine nennenswerte Expression von Apoptose-assoziierten Genen begann (Gehrig et al., 2007). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden quantitative real time RT-PCR Analysen von Wildtyp und Rs1h^{-/-} Netzhäuten in sechs verschiedenen Entwicklungsstadien (P9, P11, P14, P18, P21 und P24) durchgeführt, um transkriptionelle Regulationsmechanismen im Zuge der Mikrogliaaktivierung näher zu charakterisieren. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und die resultierenden Daten nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode für relative Quantifizierung analysiert (Abb. 10). Als Kalibratoren dienten jeweils gleichaltrige Wildtyp Kontrollen und Adenosintriphosphatase (ATPase) fungierte als Referenzgen. Als klassische Aktivierungsmarker dienten *chemokine (C-C motif) ligand 2* (Ccl2), *early growth response gene 1* (Egr1), *tumor necrosis factor α* (Tnfa) und *inducible NO synthase* (iNos). Mikroarrayanalysen von *ex vivo* isolierten retinalen Mikroglia zeigten die Induktion eines Gensets auf, welches mit der Bildung von Lipidtröpfchen und Eicosanoidsynthese in Verbindung steht (Gehrig et al., 2007). Um die Degeneration der Photorezeptoren auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, wurden Cd95 und Caspase 8 als Apoptosemarker gewählt. Die immunhistologischen Untersuchungen ließen eine Migration von Mikroglia zu den degenerierenden Photorezeptoren vermuten, weswegen Cd68 und Emr1 als konstitutive Mikroglia marker untersucht wurden. Des Weiteren konnte mittels Immunfluoreszenz-mikroskopie eine Aktivierung der Müllerzellen im Rs1h-defizienten Mausmodell aufgezeigt werden, weswegen auch *glial fibrillary acidic protein* (Gfap) als Aktivierungsmarker für Müllerzellen eingesetzt wurde. Die Aktivierungsmarker Ccl2, Egr1, Tnfa und iNos zeigten alle eine deutlich erhöhte Expression zum Zeitpunkt P14 und, mit Ausnahme von Tnfa, bereits am postnatalen Tag 11. Mit Einsetzen der Photorezeptordegeneration (P18) nahm die Expression Aktivierungs-assoziiierter Mikroglia gene rapide ab.

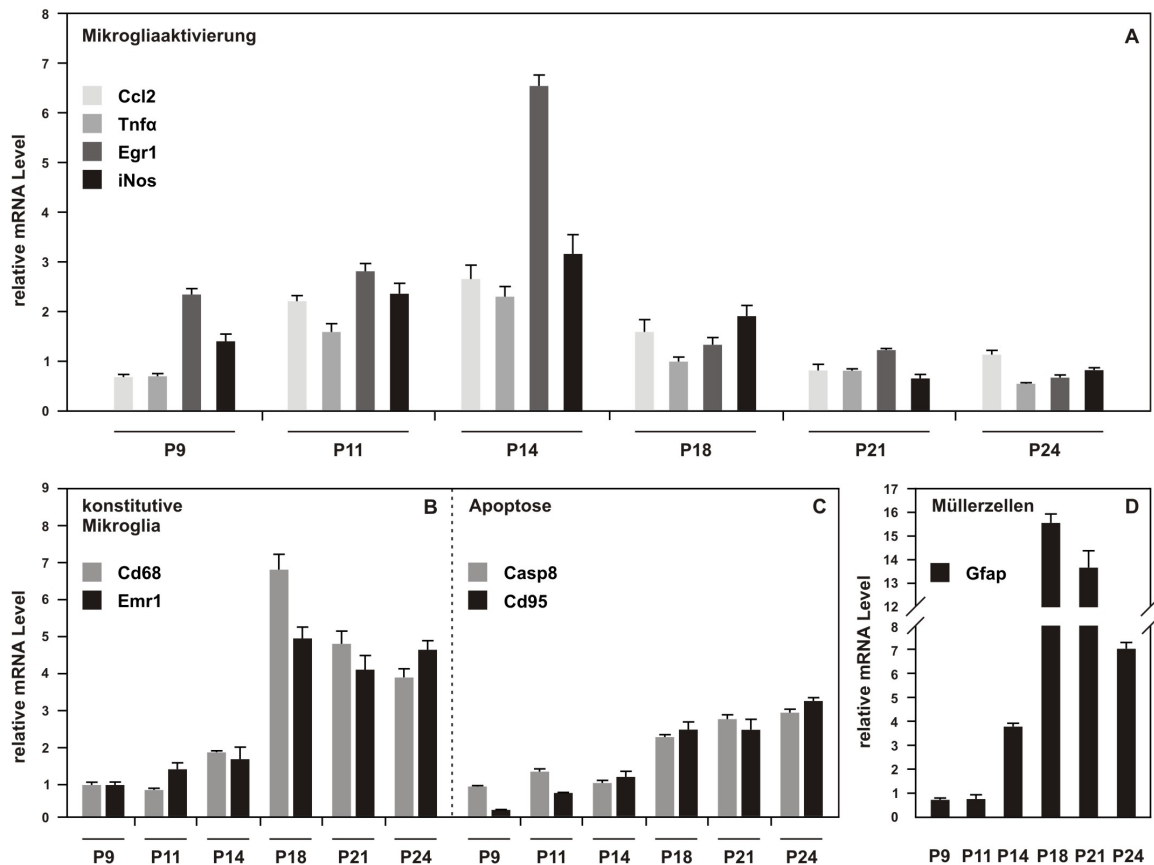


Abb. 10: Quantitative real time RT-PCR Analysen von Wildtyp und $Rs1h^{-/-}$ Netzhäuten in verschiedenen Entwicklungsstadien. Untersuchte Transkripte: konstitutiver Mikroglia marker Cd68 und Emr1, Ptg2 und Ltc4s als Marker für Lipidtröpfchen, Marker für Mikrogliaaktivierung Ccl2, Tnfa, Egr1 und iNos, Apoptose-assoziierte Transkripte Casp8 und Cd95, sowie Gfap als Marker für Müllerzellaktivierung. Normalisierung der mRNA Expression auf Wildtyp Kontrollen und Verwendung von ATPase als Referenzgen. Mittelwerte \pm SD. n = 3 zu jedem Zeitpunkt. SD, *standard deviation* (Standardabweichung).

Mit Einsetzen der Photorezeptordegeneration (P18) stieg zeitgleich die Expression der konstitutiven Mikroglia gene Cd68 und Emr1, was wiederum ein Einwandern der Mikroglia aus anderen retinalen Geweben bzw. eine lokale Proliferation nahelegt (Abb. 10: C). Abschließend zeigen ansteigende mRNA Spiegel von Gfap eine starke Aktivierung der Müllerzellen ab P14 und untermauern somit die histologischen Befunde (Abb. 10: B).

Die histologischen Untersuchungen und Genexpressionsanalysen zusammengenommen sprechen für eine Aktivierung der Mikroglia ab dem Zeitpunkt P14, welche der Aktivierung von Müllerzellen sowie der Degeneration der Photorezeptoren zeitlich vorausgeht.

5.1.4 *In vitro* Akkumulierung von Lipidtröpfchen in Mikroglia

Nach der Isolierung von MacGreen bzw. MacGreen / $Rs1h^{-/-}$ Netzhäuten erlaubte der GFP Marker eine Separation der Mikrogliazellen. Nach anschließender Kultivierung war ein Fortbestehen der morphologischen Phänotypen zu beobachten. Dabei waren in MacGreen / $Rs1h^{-/-}$ Mikroglia regelmäßig intrazelluläre Vesikel zu erkennen (Abb. 11: D),

die in MacGreen Zellen nicht zu erkennen waren (Abb. 11: A). Spezifische Färbungen mit dem Lipidfarbstoff Nilrot identifizierten diese Vesikel als Lipidtröpfchen in aktivierten MacGreen / Rs1h^{-/-} Mikroglia (Abb. 11: E), welche zudem eine starke Kolokalisation mit GFP Vesikelsignalen aufwiesen (Abb. 11: F). Der Aktivierungsprozess scheint also mit der Formation von Lipidtröpfchen einherzugehen.

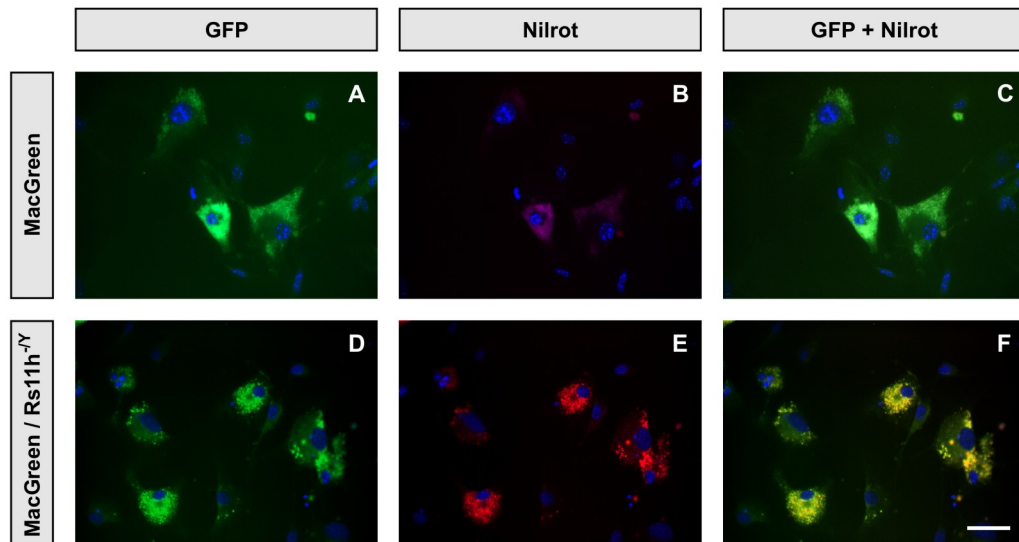


Abb. 11: Mikrogliaaktivierung und Bildung von Lipidtröpfchen in P14 MacGreen / Rs1h^{-/-} Mikroglia. Zytoplasmatische Färbung von Vesikeln mit Nilrot (rot). Visualisierung von intrazellulären Lipidtröpfchen in *in vitro* kultivierten retinalen GFP⁺ Mikroglia (grün). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab, 50µm.

Zur Untermauerung dieser Hypothese wurden mit *ex vivo* isolierten und *in vitro* kultivierten Mikroglia aus MacGreen bzw. MacGreen / Rs1h^{-/-} Mäusen Mikroarrayanalysen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten die Induktion eines Gensets auf, welches mit der Bildung von Lipidtröpfchen und Eicosanoidsynthese in Verbindung steht (Abb. 12).

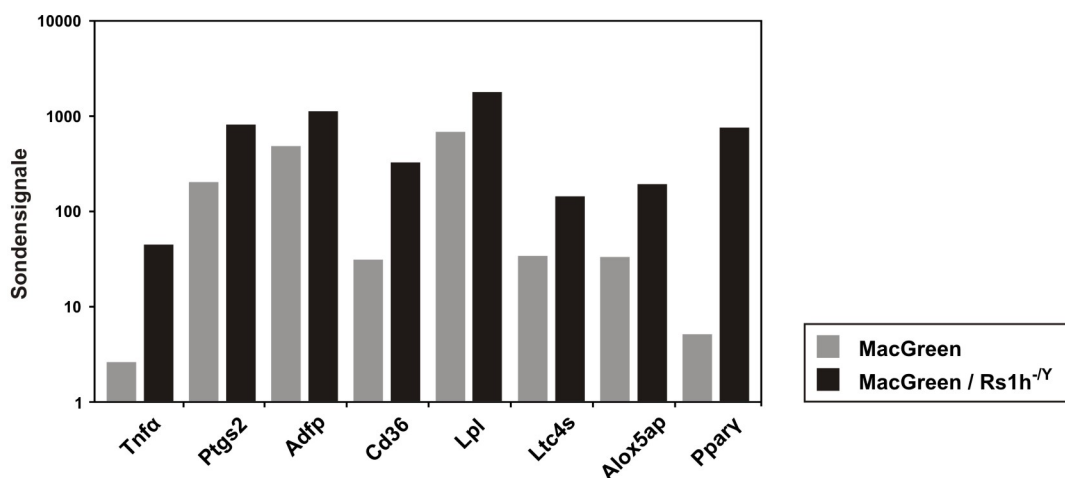


Abb. 12: Mikroarray-Expressionsdaten von *ex vivo* P14 isolierten retinalen Mikroglia. Die Analyse ermittelte erhöhte mRNA Mengen für Tnfa und sieben Lipidtröpfchen-assoziierte Gene in P14 retinalen Mikroglia von MacGreen vs. MacGreen / Rs1h^{-/-} Netzhäuten. Mittelwerte der Sondensignale. Mikroglia-kulturen n = 2 (jeweils vier gepoolte Netzhäute).

Erhöhte mRNA Spiegel von *adipose differentiation related protein* (Adfp), *Cd36*, *lipoprotein lipase* (Lpl) und *peroxisome proliferator activated receptor γ* (Ppar γ) weisen zum einen auf eine verstärkte Bildung von Lipidtröpfchen hin, während eine Hochregulation von *Ptgs2*, *Ltc4s* und *arachidonate 5-lipoxygenase activating protein* (Alox5ap) eine aktive Eicosanoidsynthese reflektieren könnte (Bozza et al., 2007).

5.1.5 Fettsäure- und Phospholipidgehalt von Rs1h^{-/-} Netzhäuten

In Leukozyten unterliegen Bildung von Lipidtröpfchen und inflammatorische Lipidproduktion der Regulation durch ω 6/ ω 3-mehrfachungesättigten Fettsäuren (PUFAs). Aufgrund der unterschiedlichen Lipidtröpfchen-Akkumulation bestand das nächste Ziel in der Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von P14 Wildtyp bzw. Rs1h^{-/-} Netzhäuten mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS). Dabei zeigten sich in Rs1h^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen deutlich erhöhte Werte für die ω 6-PUFA Arachidonsäure (AA, 20:4n6), während der Gehalt an der ω 3-PUFA Docosahexaensäure (DHA, 22:6n3) signifikant reduziert war (Abb. 13: A).

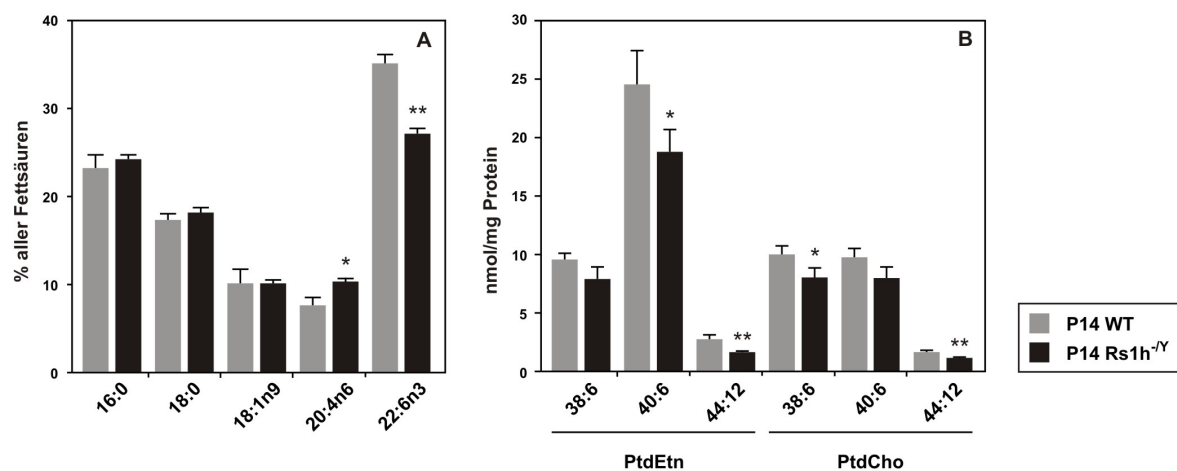


Abb. 13: Retinale Fettsäureprofile von P14 Wildtyp und Rs1h^{-/-} Netzhäuten. (A) Relative Molprozente der Fettsäuren \pm SD. (B) Quantifizierung von Phosphatidylethanolamin- (PtdEtn) und Phosphatidylcholin- (PtdCho) Spezies, die DHA beinhalten (38:6 = 16:0 + 22:6, 40:6 = 18:0 + 22:6, 44:12 = 22:6 + 22:6). Masse (nmol/mg total Protein) als Mittelwerte \pm SD. *P < 0,05; **P < 0,01. Unpaired Student's t-test. n = 4 Netzhäute. WT, Wildtyp; SD, standard deviation (Standardabweichung).

Um nachzuweisen, welche Phospholipidspezies von den veränderten Fettsäurezusammensetzungen betroffen waren, wurde eine Phospholipidanalyse mittels Elektrospray-Ionisation Tandem-MS/MS (ESI-MS/MS) angefertigt. Für DHA-enhaltendes Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin konnten signifikante Unterschiede zwischen Rs1h^{-/-} und Wildtyp Netzhäuten festgestellt werden. In Rs1h^{-/-} Netzhäuten waren die Phosphatidylethanolamin Spezies 40:6 (18:0 + 22:6n3) und 44:12 (22:6n3 + 22:6n3) um 24% bzw. 40% vermindert. Darüber hinaus waren die Werte der DHA-enhaltenden Phosphatidylcholin Spezies 38:6 (16:0 + 22:6n3) und 44:12 (22:6n3 +

22:6n3) um 20% bzw. 31% reduziert (Abb. 13: B). Diese Ergebnisse deuten auf einen zeitlichen und womöglich kausalen Zusammenhang zwischen dem verminderten DHA-Gehalt in den meisten Phospholipidspezies der Netzhaut und der Aktivierung der Mikroglia hin.

5.2 Retinale Anreicherung von DHA *in vivo*

Die nachfolgenden Experimente sollten einen möglichen Zusammenhang zwischen veränderten DHA-Spiegeln bei hereditären Netzhautdystrophien und der Mikrogliaaktivierung weiter untermauern. Am Beispiel der Retinoschisin-defizienten Maus sollte darüber hinaus auch die Wirksamkeit einer Nahrungsmittelergänzung geprüft werden.

Conner et al. konnten bei adulten Mäusen eine Erhöhung des retinalen DHA-Gehalts durch verabreichen eines DHA-angereicherten Futters erreichen (Connor et al., 2007). Angelehnt an diesen publizierten Befund wurde nun eine spezifische Futterzusammensetzung erarbeitet, welche 2% der ω 3-PUFA DHA beinhaltet, während ein Kontrollfutter nur sehr geringe Anteile von ω 3-PUFAs enthält (Tab. 18). Um zu belegen, dass eine DHA-Supplementierung auch bei $Rslh^{-/-}$ Tieren möglich ist, wurden in einer wöchentlich kontrollierten Pilotstudie 3 Monate alte $Rslh^{-/-}$ Weibchen vier Wochen mit DHA- bzw. Kontrollfutter versorgt. In Plasma und Netzhaut von $Rslh^{-/-}$ Weibchen, die DHA-supplementiertes Futter erhielten, konnte eine deutliche Anreicherung von DHA erzielt werden (Abb. 14: A und B). In Gehirn und Leber war eine Anreicherung nur geringfügig bzw. gar nicht möglich (Abb. 14: C und D). Nach erfolgreicher DHA-Anreicherung stellte sich nun die Frage, ob $Rslh^{-/-}$ Nachkommen über die Muttermilch ebenfalls DHA-supplementiert werden können.

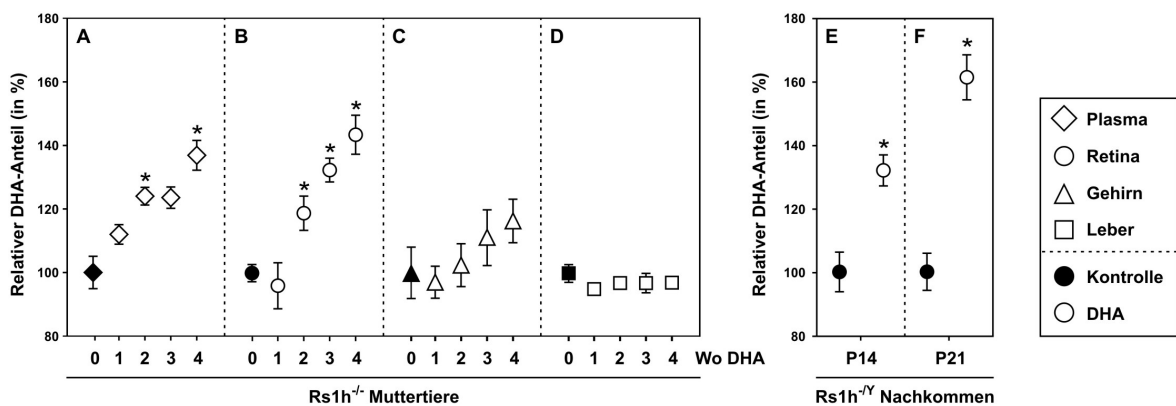


Abb. 14: Relativer DHA-Anteil von $Rslh^{-/-}$ Müttertieren und deren $Rslh^{-/-}$ Nachkommen. DHA-Gehalt von Plasma (A), Netzhaut (B), Gehirn (C) und Leber (D) in $Rslh^{-/-}$ Müttertieren nach Verabreichung von DHA-Futter für vier Wochen (Wo). Durchschnittlicher DHA-Gehalt verglichen zu Kontrolltieren \pm SD, * $P < 0,05$, $n = 3$ zu jedem Zeitpunkt. DHA-Gehalt von P14 und P21 $Rslh^{-/-}$ Nachkommen von DHA-gefütterten $Rslh^{-/-}$ Müttertieren verglichen zu Nachkommen von Kontroll-gefütterten $Rslh^{-/-}$ Müttertieren. * $P < 0,05$; Unpaired Student's t-test; $n = 12-15$ Tiere zu jedem Zeitpunkt. SD, *standard deviation* (standardabweichung).

Um $\text{Rs1h}^{-\text{Y}}$ Nachkommen zu erhalten wurden hierfür $\text{Rs1h}^{-\text{Y}}$ Muttertiere 4 Wochen auf DHA-Diät oder Kontroll-Futter gehalten und anschließend mit Wildtyp Männchen verpaart. Zum Zeitpunkt P14, und umso mehr an P21, konnten in $\text{Rs1h}^{-\text{Y}}$ Nachkommen DHA-supplementierter Muttertiere im Vergleich zu nicht-supplementierten Mäusen ein signifikant erhöhter DHA-Anteil in der Netzhaut festgestellt werden (Abb. 14: E und F). Nachdem eine erfolgreiche retinale Anreicherung von DHA für $\text{Rs1h}^{-\text{Y}}$ Muttertiere und deren $\text{Rs1h}^{-\text{Y}}$ Nachkommen über die Muttermilch belegt werden konnte, wurden in einer Hauptstudie $\text{Rs1h}^{-\text{Y}}$ Nachkommen von DHA- bzw. kontrollgefütterten Muttertieren näher untersucht. Für beide experimentellen Gruppen blieben die Diäten der $\text{Rs1h}^{-\text{Y}}$ Muttertiere und ihrer Nachkommen bis zur Durchführung der Analysen an den postnatalen Tagen P14 und P21 konstant. Zu diesen beiden Zeitpunkten wurden die Augen der $\text{Rs1h}^{-\text{Y}}$ Nachkommen entfernt und der retinale DHA-Gehalt bestimmt. P14 und P21 $\text{Rs1h}^{-\text{Y}}$ Nachkommen von DHA-gefütterten Muttertieren zeigten einen deutlich erhöhte DHA Gehalt (P14: $131,9\% \pm 4,9\%$; $*P < 0,05$ / P21: $161,3\% \pm 7,1\%$; $*P < 0,05$) verglichen mit gleichaltrigen $\text{Rs1h}^{-\text{Y}}$ Nachkommen von kontrollgefütterten Muttertieren (Abb. 14: E und F).

5.3 Einfluss der DHA-Supplementierung auf die frühe retinale Degeneration

Nach erfolgreicher retinaler Anreicherung in $\text{Rs1h}^{-\text{Y}}$ Netzhäuten galt es zu klären, ob diese Supplementierung auch eine positive Beeinflussung der retinalen Degeneration zur Folge hat. Hierfür wurde das Ausmaß der retinalen Degeneration in DHA-supplementierten $\text{Rs1h}^{-\text{Y}}$ Nachkommen im Vergleich zu nicht-supplementierten Nachkommen histologisch und immunhistologisch verglichen. P21 $\text{Rs1h}^{-\text{Y}}$ Mäuse, die kein DHA über die Muttermilch erhielten, wiesen eine stark disorganisierte Struktur der Netzhaut auf (Abb. 15: B). Im Gegensatz dazu zeigten $\text{Rs1h}^{-\text{Y}}$ Mäuse, die DHA-supplementiert wurden, morphologisch einen deutlich schwächeren Phänotyp der retinalen Degeneration (Abb. 15: C). In DHA-supplementierten $\text{Rs1h}^{-\text{Y}}$ Mäusen war die äußere Körnerschicht zwar dünner und die innere Körnerschicht etwas dicker verglichen mit Wildtyp Tieren (Abb. 15: A), insgesamt wurde die retinale Morphologie in DHA-supplementierten $\text{Rs1h}^{-\text{Y}}$ Mäusen jedoch erhalten.

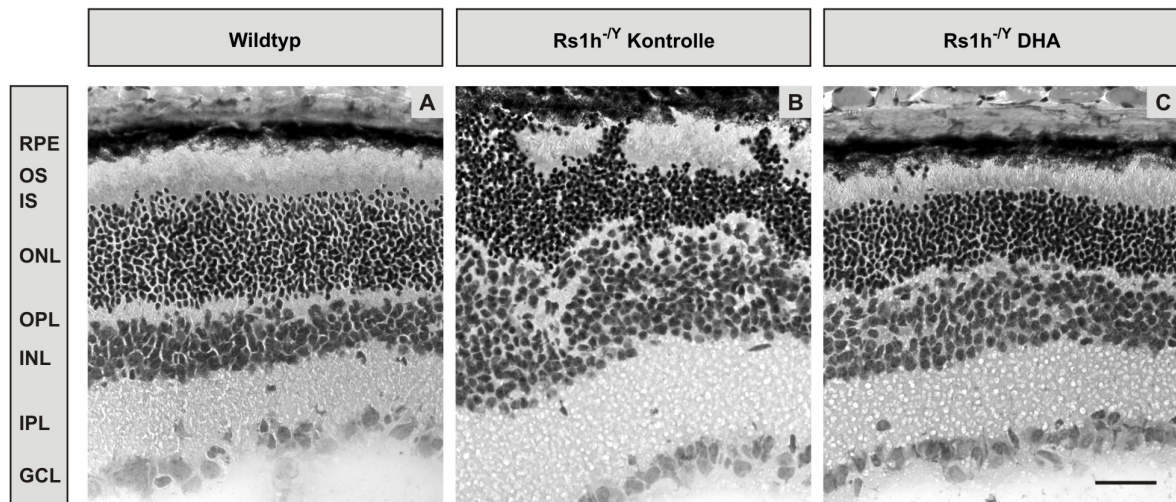


Abb. 15: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von P21 Wildtyp und $Rs1h^{-/-}$ Netzhäuten. Keine histologischen Auffälligkeiten in P21 Wildtyp Netzhäuten (A). Retinale Disorganisation in $Rs1h^{-/-}$ Tieren, die Kontroll-Futter über die Muttermilch erhalten haben (B). Annähernd normale Morphologie in DHA-supplementierten $Rs1h^{-/-}$ Nachkommen (C). RPE, retinales Pigmentepithel; OS, outer segments (äußere Segmente); IS, inner segments (innere Segmente); ONL, outer nuclear layer (äußere Körnerschicht); OPL, outer plexiform Layer (äußere plexiforme Schicht); INL, inner nuclear layer (innere Körnerschicht), IPL, inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht); GCL, ganglion cell layer (Ganglionzellschicht). Maßstab 50 μ m.

Um zu quantifizieren, ob DHA sich positiv auf das Fortbestehen von Photorezeptoren ausübt, wurden retinale Kryoschnitte mit Fluoreceinisothiocyanat-konjugiertem (FITC) PNA (*peanut agglutinin*) gefärbt, das spezifisch Zapfen und Bipolarsynapsen markiert. Verglichen mit Wildtyp Tieren zeigten diese Untersuchungen ein deutlich vermindertes PNA-Signal in P21 $Rs1h^{-/-}$ Mäusen ohne DHA-Ergänzung ($106,1 \pm 13,2$ vs. $239,7 \pm 14,5$ PNA-Signale / Kryoschnitt) (Abb. 16: A, B und D).

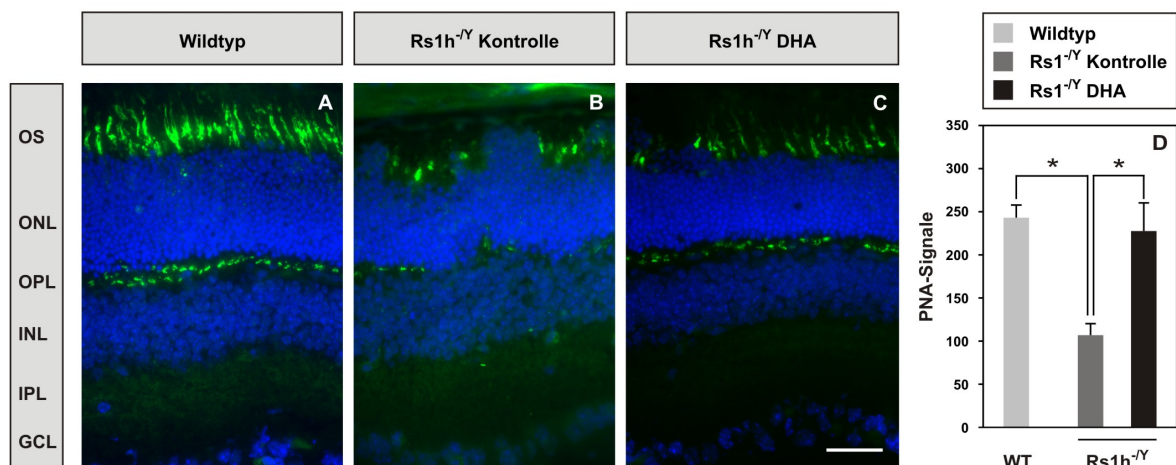


Abb. 16: PNA-Färbung von P21 Wildtyp und $Rs1h^{-/-}$ Netzhäuten. Markierung von Zapfen und Bipolarzellen mit FITC-konjugiertem PNA (grün) in Kryoschnitten von Wildtyp und DHA- bzw. kontrollgefütterten $Rs1h^{-/-}$ Mäusen (A-C). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). PNA-Signale, $n = 3$ Kryoschnitte und 3 Mäuse pro Gruppe (D). * $P < 0,05$; unpaired Student's t-test. WT, Wildtyp; OS, outer segments (äußere Segmente); IS, inner segments (innere Segmente); ONL, outer nuclear layer (äußere Körnerschicht); OPL, outer plexiform Layer (äußere plexiforme Schicht); INL, inner nuclear layer (innere Körnerschicht), IPL, inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht); GCL, ganglion cell layer (Ganglionzellschicht). Maßstab 50 μ m.

Im Gegensatz dazu wiesen Netzhäute von DHA-supplementierten Mäusen wesentlich höhere PNA-Signale auf ($226,3 \pm 32,5$ PNA-Signale / Kryoschnitt) (Abb. 16: C und D).

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die apoptotische Zelldegeneration mittels TUNEL-Assay näher untersucht. Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellkerne in der äußeren Körnerschicht konnte zwischen Wildtyp und nicht supplementierten $Rsl1h^{-/-}$ Kontroll-Tieren aufgezeigt werden ($58,63 \pm 4,4$ vs. $17,73 \pm 2,3$ TUNEL-positive Zellen). Weitaus weniger Apoptose war in DHA-behandelten Tieren feststellbar ($23,33 \pm 4,2$ TUNEL-positive Zellen) (Abb. 17: A-D).

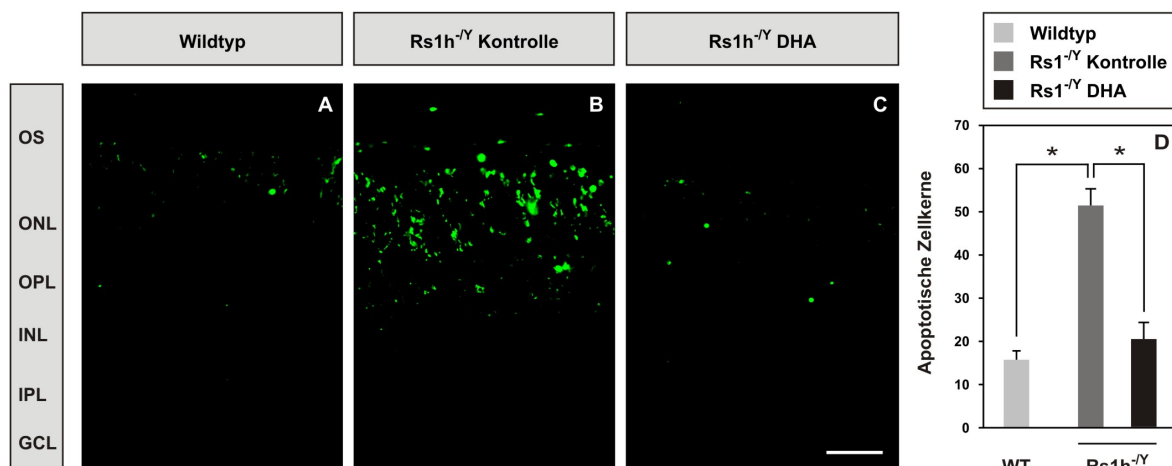


Abb. 17: TUNEL-Färbung von P21 Wildtyp und $Rsl1h^{-/-}$ Netzhäuten. Nachweis retinaler Apoptose durch *in situ* Detektion von DNA-Strangbrüchen (TUNEL-Assay) (A-C). TUNEL-positive Zellen (grün), $n = 3$ Kryoschnitte und 3 Mäuse pro Gruppe (D). * $P < 0,05$; unpaired Student's t-test. WT, Wildtyp; OS, outer segments (äußere Segmente); IS, inner segments (innere Segmente); ONL, outer nuclear layer (äußere Körnerschicht); OPL, outer plexiform Layer (äußere plexiforme Schicht); INL, inner nuclear layer (innere Körnerschicht); IPL, inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht); GCL, ganglion cell layer (Ganglionzellschicht). Maßstab 50 μ m.

Zusammengenommen sprechen die histologischen Untersuchungen für den Erhalt der retinalen Integrität in DHA-supplementierten Mäusen zum Zeitpunkt P21 – dem Zeitpunkt apoptotischen Zelltods und früher Photorezeptordegeneration in $Rsl1h^{-/-}$ Mäusen.

5.4 Langzeiteffekt der DHA-Supplementierung auf die retinale Degeneration

Nach erfolgreicher Verminderung der Degeneration von Photorezeptorzellen in jungen $Rsl1h^{-/-}$ Mäusen durch DHA-Supplementierung stellte sich die Frage nach der dauerhaften Wirksamkeit von DHA. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Wildtyp Mäuse sowie DHA- bzw. kontrollgefütterte $Rsl1h^{-/-}$ Mäuse nach zwei (P56) bzw. drei Monaten (P84) abermals histologisch und immunhistologisch untersucht. P56 und P84 Wildtyp Mäuse zeigten keinerlei morphologische Auffälligkeiten (Abb. 18: A und G). In P56 kontrollgefütterten $Rsl1h^{-/-}$ Mäusen konnte eine starke Disorganisation der Netzhaut

nachgewiesen werden (Abb. 18: C). Morphologischen Anomalien wurden auch in P84 kontrollgefütterten $Rs1h^{-/-}$ Mäusen sichtbar, die darüber hinaus eine Reduktion der Netzhautdicke aufzeigten (Abb. 18: I). Diese Ergebnisse wurden durch eine PNA-Färbung weiter untermauert. Verglichen mit Wildtyp Tieren wiesen P56 und P84 kontrollgefütterte $Rs1h^{-/-}$ Mäuse ein deutlich vermindertes PNA-Signal auf (Abb. 18: D und J). Im Gegensatz zu den positiven DHA-Effekten in jungen $Rs1h^{-/-}$ Mäusen konnten in zwei bzw. drei Monate alten Mäusen kein protektiver Einfluss von DHA mehr nachgewiesen werden (Abb. 18: F und L). Weder mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Abb. 18: E und K) noch mittels PNA-Färbung (Abb. 18: F und L) waren zwischen DHA- und kontrollgefütterten Mäusen histologische Unterschiede feststellbar. Aufgrund dieser negativen Befunde wurde für die weitere Untersuchung des nachhaltigen DHA-Effekts auf eine TUNEL-Färbung zur Visualisierung apoptotischer Zellen verzichtet. Es ist anzunehmen, dass eine Ergänzung mit nur 2% DHA im Futter für einen protektiven Langzeiteffekt nicht ausreicht.

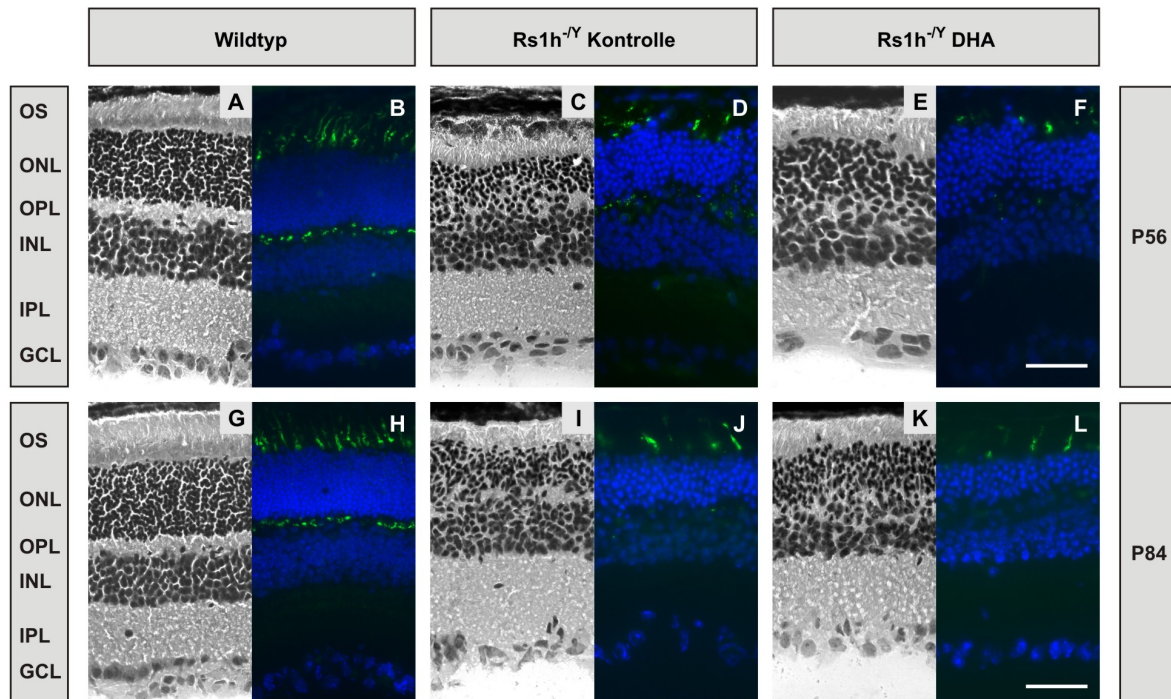


Abb. 18: Hämatoxylin-Eosin- und PNA-Färbung von P56 und P84 Wildtyp bzw. $Rs1h^{-/-}$ Mäusen. Keine histologischen Auffälligkeiten in P56 und P84 Wildtyp Netzhäuten (A und G). Retinale Disorganisation in kontroll- und DHA-gefütterten $Rs1h^{-/-}$ Tieren zu beiden Zeitpunkten (C, E, I und K). Visualisierung von Zapfen und Synapsen von Bipolarzellen mit PNA-FITC (grün) in Kryoschnitten von P56 und P84 Wildtyp (B und H) und kontroll- (D und J) bzw. DHA-gefütterten $Rs1h^{-/-}$ Mäusen (F und L). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). RPE, retinales Pigmentepithel; OS, outer segments (äußere Segmente); ONL, outer nuclear layer (äußere Körnerschicht); OPL, outer plexiform Layer (äußere plexiforme Schicht); INL, inner nuclear layer (innere Körnerschicht); IPL, inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht); GCL, ganglion cell layer (Ganglionzellschicht). Maßstab 50 μ m.

5.5 Einfluss der DHA-Ergänzung auf die Mikrogliaaktivierung *in vivo*

Da der Aktivierung von Mikroglia die Degeneration der Photorezeptoren zeitlich vorausgeht, wurde der Einfluss der DHA-Ergänzung auf den Phänotyp retinaler Mikroglia näher beleuchtet. Hierfür wurden retinale whole mount-Präparate angefertigt und retinale Mikroglia mit Anti-Iba1 markiert (Marti and Cuadros, 2008), welcher in Wildtyp Mäusen vorwiegend ramifizierte, nicht-aktivierte Mikroglia identifizierte (Abb. 19: A und D). In Netzhäuten von $Rsl1h^{-/-}$ Tieren, die Kontroll-Futter erhielten, war eine Vielzahl amöboider aktivierter Mikroglia präsent (Abb. 19: B und E). Im Gegensatz dazu wiesen retinale Mikroglia von DHA-supplementierten $Rsl1h^{-/-}$ Mäusen lange Ausläufer auf, welche typisch für ramifizierte Mikroglia sind (Abb. 19: C und F).

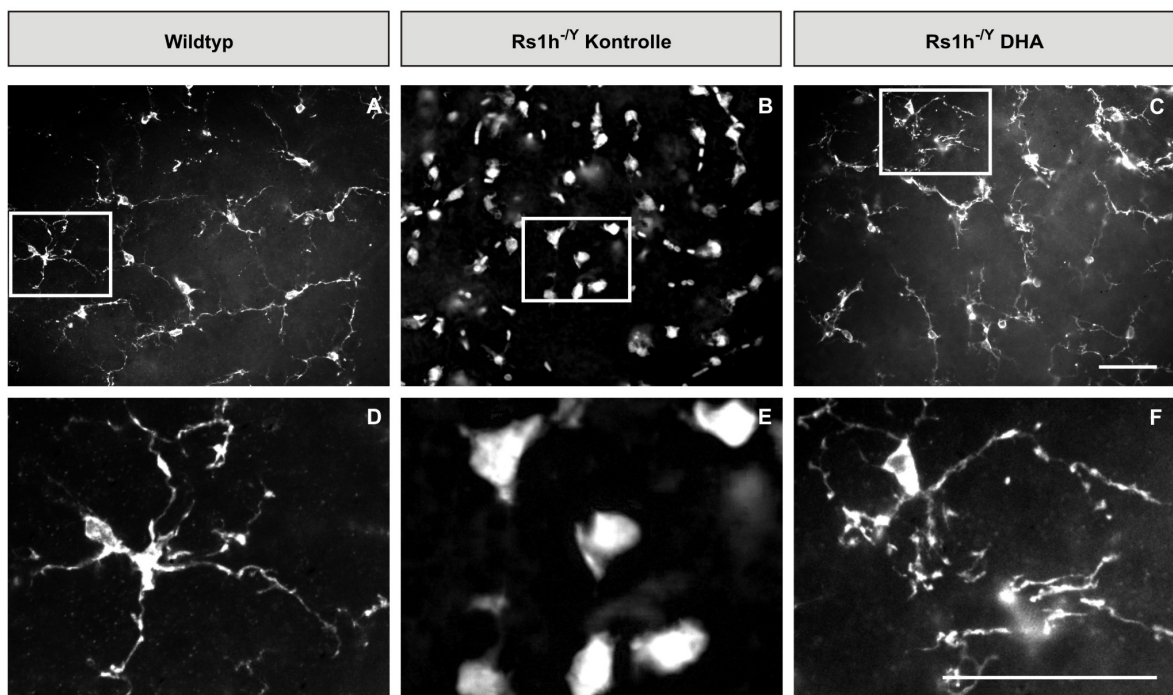


Abb. 19: Fluoreszenzaufnahmen Iba1-markierter retinaler Mikroglia von P21 Wildtyp und $Rsl1h^{-/-}$ Mäusen in whole mount-Präparaten. Ramifizierte, nicht-aktivierte Mikroglia in Wildtyp Tieren (A und D) bzw. amöboide, aktivierte Mikroglia in kontrollgefütterten $Rsl1h^{-/-}$ Netzhäuten (B und E). DHA-supplementierte $Rsl1h^{-/-}$ Mäuse weisen Mikroglia mit langen Ausläufern auf, welche morphologisch für ruhende, nicht-aktivierte Mikroglia stehen (C und F). Maßstab 50 μ m.

Nach der morphologischen Analyse von Mikroglia wurde im Folgenden die Genexpression Mikroglia- bzw. Apoptose-assoziiierter Marker bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde dabei die linke Netzhaut für whole mount-Präparate verwendet, während die rechte Netzhaut einer Genexpressionanalyse unterzogen wurde. Hierfür wurden P14 und P21 Netzhäute von Wildtyp und $Rsl1h^{-/-}$ Mäusen verwendet, wobei letztere DHA- oder Kontroll-Futter erhalten haben. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und die gewonnenen Daten mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode relativ quantifiziert. Die

Expression des konstitutiven Mikroglia markers Cd68 erhöhte sich zwar zwischen P14 und P21, wies aber keine Unterschiede innerhalb der Tiergruppen auf. Im Gegensatz dazu konnte den Markern für Lipidtröpfchen (Ptgs2 und Ltc4s) sowie den Entzündungsmarkern Tnfa und Ccl2 eine erhöhte Expression in P21 Netzhäuten von kontrollgefütterten Rs1h^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden. In der Gruppe der DHA-supplementierten Rs1h^{-/-} Tiere zeigten alle diese Transkripte verminderte Expressionswerte in P21 Netzhäuten. Verglichen mit Wildtyp Netzhäuten war die Expression von Egr1 und dem Apoptose-assoziierten Transkript Cd95 in Rs1h^{-/-} Mäusen zu den Zeitpunkten P14 und P21 bereits erhöht. Kontrollgefütterte Rs1h^{-/-} Mäuse, verglichen mit DHA-supplementierten Rs1h^{-/-} Tieren, wiesen zu beiden Zeitpunkten eine verminderte Expression von Egr1 und Cd95 auf (Abb. 20). Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Nahrungsmittelergänzung mit DHA die Aktivierung von Mikroglia in der Netzhaut dämpft und zu verminderter mRNA-Expression Apoptose-relevanter Gene führt.

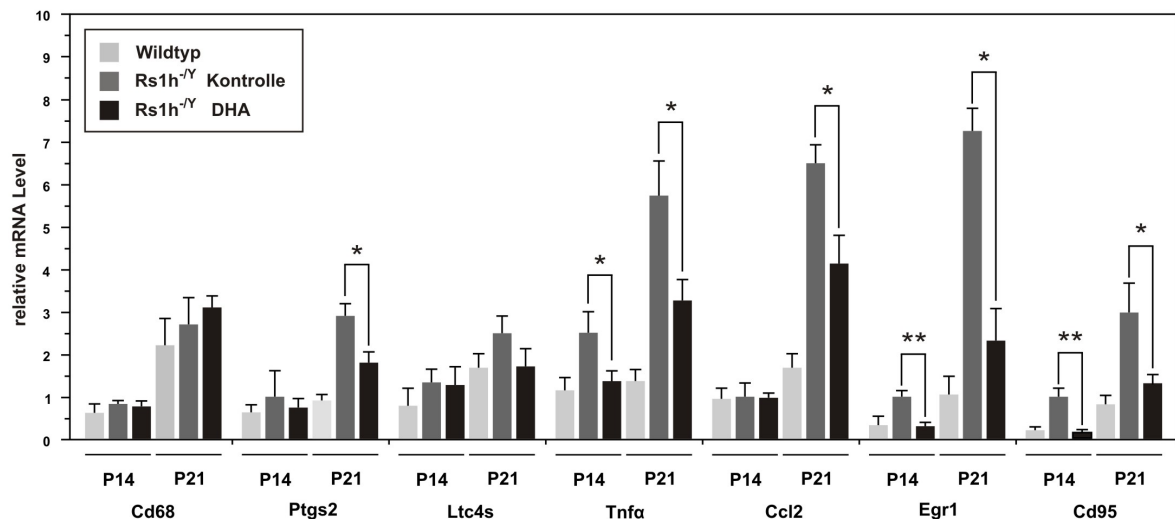


Abb. 20: Quantitative real time RT-PCR Expressionsanalyse von P14 und P21 Netzhäuten mit und ohne DHA-Supplementierung. Untersuchte Transkripte: konstitutiver Mikroglia marker Cd68, Ptgs2 und Ltc4s als Marker für Lipidtröpfchen, Aktivierungsmarker Tnfa, Ccl2 und Egr1, sowie Apoptose-assoziiertes Transkript Cd95. Normalisierung der mRNA Expression zu P14 Wildtyp Level. Verwendung von ATPase als Referenzgen. Mittelwerte \pm SD. *P < 0,05; **P < 0,01; unpaired Student's t-test, n = 12-15 Tiere. SD, *standard deviation* (standardabweichung).

5.6 Einfluss der DHA-Ergänzung auf Müllerzellen *in vivo*

Im Verlauf der Pathogenese im Rs1h-defizienten Mausmodell kommt es neben den Mikroglia auch zu einer Aktivierung der Müllerzellen, welche bereits ausführlich beschrieben wurde (Luna et al., 2009). Um zu klären, ob die Nahrungsmittelergänzung mit DHA auch einen Effekt auf Müllerzellen zeigt, wurden neben Wildtyp Mäusen auch kontroll- bzw. DHA-supplementierte Rs1h^{-/-} Mäuse histologisch hinsichtlich der Aktivierung von Müllerzellen untersucht. Hierfür wurden Kryoschnitte mit Anti-F4/80 als Mikroglia marker und Anti-GFAP als Stressindikator für Müllerzellen immunfluoreszent

markiert. In P14 und P21 $Rs1h^{-/-}$ Kontroll-Mäusen (Abb. 21: B und E) kommt es im Vergleich zu gleichalten Wildtyp Mäusen zu einer starken Expression des intermediären Filamentproteins GFAP (Abb. 21: A und D). Anti-GFAP markierte Müllerzellen von kontrollgefütterten $Rs1h^{-/-}$ Mäusen erstreckten sich von der Ganglionzellschicht durch die äußere Körnerschicht, während in Wildtyp Mäusen GFAP-positive Müllerzellen nur in der Ganglionzellschicht sichtbar waren. Im Gegensatz dazu wiesen Netzhäute von DHA-supplementierten Nachkommen wesentlich schwächere GFAP-Signale auf, was wiederum eine verminderte Aktivierung der Müllerzellen widerspiegelt (Abb. 21: C und F).

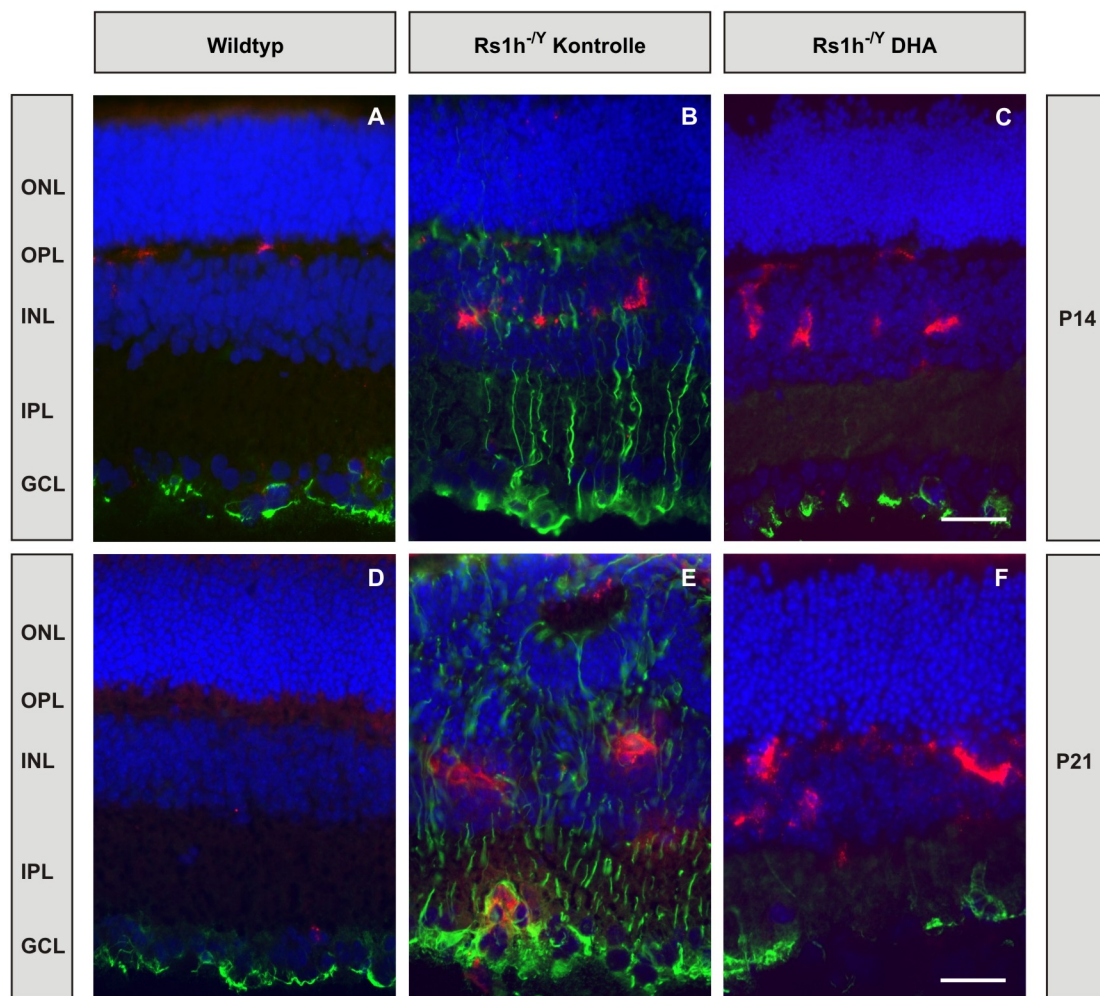


Abb. 21: GFAP- und F4/80- Färbung von P14 und P21 $Rs1h^{-/-}$ Netzhäuten. Markierung von Müllerzellen mit Anti-GFAP (grün) und Mikroglia mit Anti-F4/80 (rot) in Kryoschnitten von DHA- bzw. kontrollgefütterten P14 und P21 $Rs1h^{-/-}$ Mäusen (A-F). Kernfärbung mit DAPI (blau). ONL, outer nuclear layer (äußere Körnerschicht); OPL, outer plexiform Layer (äußere plexiforme Schicht); INL, inner nuclear layer (innere Körnerschicht); IPL, inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht); GCL, ganglion cell layer (Ganglionzellschicht). Maßstab 50 μ m.

5.7 Modulation von Lipidtröpfchen in Mikroglia durch DHA *in vitro*

Die Veränderungen des mikroglialen Phänotyps in DHA-supplementierten Mäusen könnte eine indirekte Folge durch das Einwirken auf Photorezeptoren und RPE sein. Um die Möglichkeit eines direkten DHA-Effekts abschätzen zu können, wurden BV2 Zellen *in vitro* mit verschiedenen Konzentrationen an DHA (0,5; 5 und 10 μ M) behandelt. Im Anschluss daran wurden Bildung von Lipidtröpfchen, Expression von Mikrogliamarkern sowie Zellmigration und Apoptose näher untersucht. Obwohl BV2 Zellen keine primären Zellen der Netzhaut sind, erfüllen sie viele zelluläre Charakteristika der Mikroglia. Hier sei vor allem ihr funktionelles Verhalten im Bezug auf Entzündung und neuronalem Schaden erwähnt (Henn et al., 2009). Um die Spezifität der DHA-Effekte zu bestimmen, wurden BV2 Zellen zudem mit DPA (Docosapentaensäure, 22:5n3) und ADA (Adrensäure, 22:4n6) stimuliert. Um BV2 Zellen in einen aktivierten Zustand zu versetzen, erfolgte eine Vorstimulierung mit LPS (50 ng/ml) für 24 h und anschließend die Analyse der dosisabhängigen Effekte von DHA, DPA und ADA. Nun galt es zu klären, ob DHA direkt und spezifisch die LPS-induzierte Formation von Lipidtröpfchen beeinflusst. Die Inkubation mit LPS führte zu einer starken Nilrotfärbung, gleichbedeutend mit intrazellulärer Bildung von Lipidvesikeln (Abb. 22: A). Im Gegensatz dazu führte die Kostimulation mit DHA nur zu einer schwachen Nilrotfärbung (Abb. 22: B). DPA und ADA zeigten keinen Einfluss auf die Lipidakkumulation (Abb. 22: C und D), was wiederum eine spezifischen gegen-regulatorischen Effekt von DHA widerspiegelt.

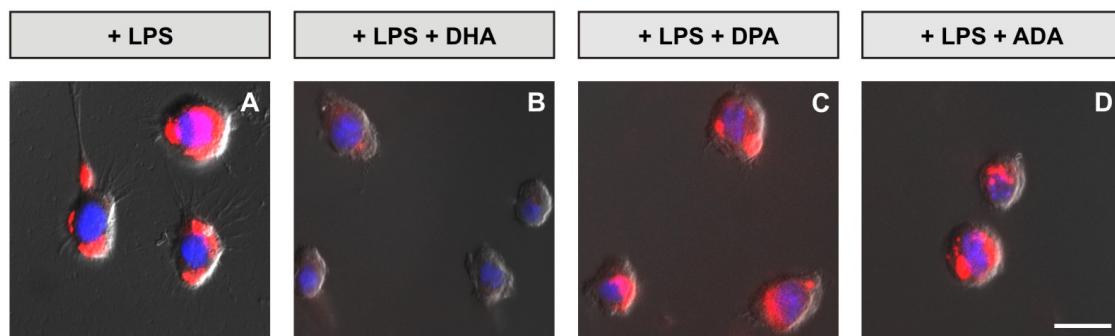


Abb. 22: Nilrotfärbung von Lipidtröpfchen in BV2 Zellen. Nilrot-Färbung von BV2 Zellen (rot). Zellen zur Aktivierung 24h mit LPS (50 ng/ml) inkubiert und mit Ethanol oder 10 μ M DHA, DPA bzw. ADA kostimuliert. Visualisierung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab 50 μ m.

Für die anschließende Genexpressionsanalyse dienten als pro-inflammatorische Mikrogliamarker Interleukin 1 β (Il-1 β), Ptgs2 und Ccl2. mRNA Level von allen drei Transkripten wurden mit steigender DHA-Konzentration deutlich vermindert (Abb. 23: A), während DPA die Expression von Il-1 β und Ptgs2 nur bei Behandlung mit 10 μ M beeinflusste und auf Ccl2 mRNA keinen Einfluss zeigte (Abb. 23: B). ADA-Stimulation

hatte keine Wirkung auf Il-1 β Transkripte und konnte die Expression von Ptgs2 nur bei einer Dosis von 10 μ M drosseln (Abb. 23: C). Im Gegensatz zu DHA führte die Behandlung mit ADA mit steigenden Konzentrationen zu einer deutlichen Induktion der Ccl2 Expression (Abb. 23: C).

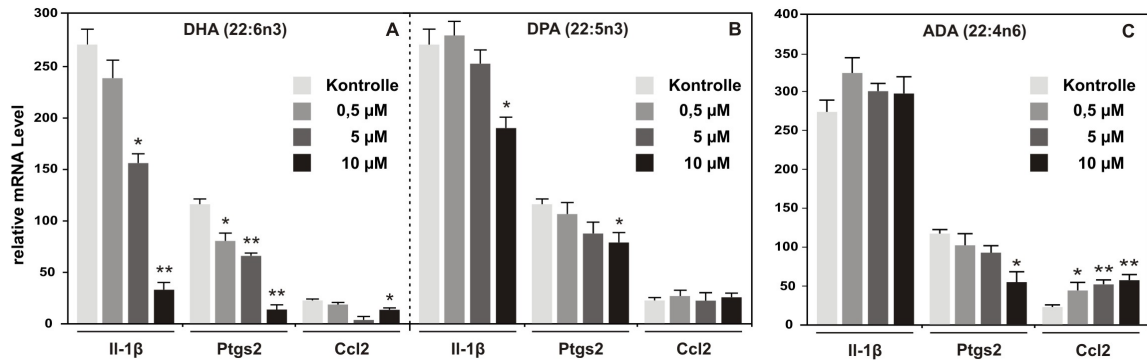


Abb. 23: DHA-vermittelte Reduktion pro-inflammatorischer Genexpression *in vitro*. Quantitative real time RT-PCR Analysen von pro-inflammatorischen Markertranskripten in stimulierten BV2 Zellen (n = 3). BV2 Zellen behandelt mit LPS (50 ng/ml) für 24h und anschließend inkubiert mit 0,1% Ethanol oder unterschiedlichen Konzentrationen an DHA (22:6n3) (A), DPA (22:5n3) (B) bzw. ADA (22:4n6) (C). Normalisierung auf Referenzgen ATPase. Mittelwerte \pm SD. *P < 0,05; **P < 0,01; Paired Student's t-test. SD, standard deviation (standardabweichung).

Um auf funktioneller Ebene den Einfluss von DHA zu unterstreichen, wurde zusätzlich die Migration von Mikroglia näher betrachtet. Die Behandlung mit DHA zeigte keinerlei Einfluss auf das Wanderverhalten ruhender BV2 Zellen, wohingegen die Migration der LPS-voraktivierten Zellen dosisabhängig unterbunden wurde (Abb. 24: A). Um ausschließen zu können, dass diese PUFA-Effekte nicht die Folge vermehrten Zelltods waren, wurde die Zellviabilität der stimulierten BV2 Zellen bestimmt. 10 μ M DHA und DPA hatten keinen Einfluss auf den Fortbestand der BV2 Zellen, während Stimulation mit ADA die Zellviabilität verminderte. Somit verhindert DHA effizient pro-inflammatorische Genexpression in aktivierten Mikroglia, wohingegen die verwandten PUFAs DPA und ADA nur schwache oder sogar konträre Effekte aufwiesen (Abb. 24: B).

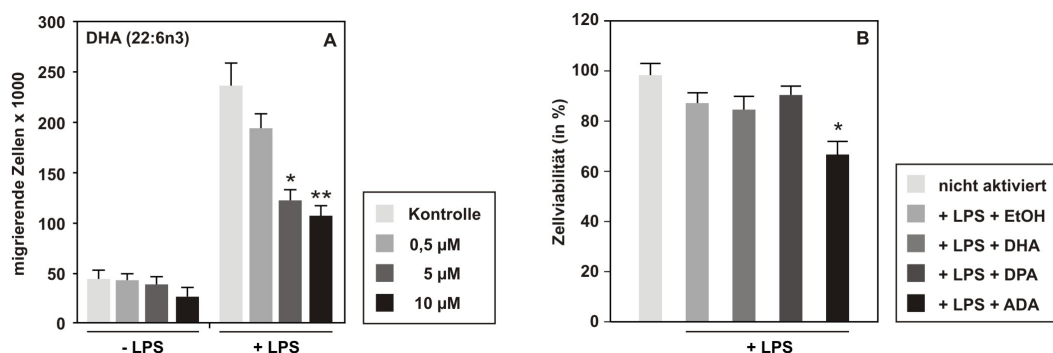


Abb. 24: Assays für Migration und Zellviabilität von stimulierten BV2 Zellen. Transwell Migration von BV2 Zellen stimuliert mit oder ohne 50 ng/ml LPS für 24h und in Anwesenheit unterschiedlicher DHA-Konzentrationen (A). Nachweis der Zellviabilität mit Zytotoxizitätsassay. BV2 Zellen behandelt mit oder ohne 50 ng/ml LPS + 0,1% Ethanol, 50 ng/ml LPS + 10 μ M DHA, DPA bzw. ADA (B). Mittelwerte \pm SD. *P < 0,05; **P < 0,01; Paired Student's t-test. SD, standard deviation (standardabweichung).

5.8 Blaublicht-induzierte Mikrogliaaktivierung *in vivo*

Um die zugrundeliegenden zellulären Ereignisse Blaublicht-induzierter retinaler Degenerationsprozesse weiter aufzuklären, wurde die Mikrogliaaktivierung sowohl histologisch als auch auf transkriptioneller Ebene untersucht. Hierfür wurden 3 Monate alte MacGreen Mäuse, welche GFP in retinalen Mikroglia exprimieren, blauem Licht einer Wellenlänge von 410 ± 10 nm für 2 min ausgesetzt. 12 h, 24 h und 72 h nach der Behandlung wurden die Augen für Histologie, quantitative real time RT-PCR und Mikroarrayanalysen präpariert.

5.8.1 Histologische Charakterisierung retinaler Mikroglia nach Behandlung mit Blaublicht

Für die histologische Analyse des induzierten Netzhautschadens wurden whole mount-Präparate angefertigt und mikroskopisch untersucht. Zu den drei gewählten Zeitpunkten nach Blaublichtbestrahlung (12 h, 24 h und 72 h) wurde eine eindeutige Läsion der Netzhaut nur nach 72 h sichtbar. Während dunkel-adaptierte Kontroll-Mäuse eine gesunde Morphologie der Netzhaut aufwiesen (Abb. 25: A), zeichnete sich in Blaublicht-bestrahlten Netzhäuten nach 72 h eine deutliche Läsion ab (Abb. 25: B). Bei näherer Betrachtung dieses „Hot Spots“ nahe dem Sehnerv, war eine Migration von GFP⁺ Mikroglia zum Zentrum der Läsion deutlich erkennbar (Abb. 25: C). Eine Vergrößerung der Läsion enthüllte darüber hinaus eine aktivierte amöboide Morphologie der Mikroglia (Abb. 25: D).

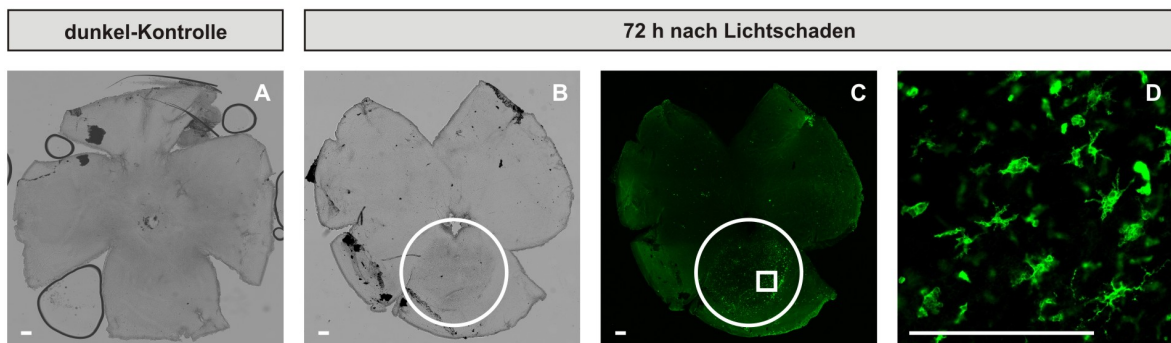


Abb. 25: Whole mounts von Blaublicht-bestrahlten MacGreen Netzhäuten. Durchlicht- und Immunfluoreszenzaufnahmen von dunkel-adaptierten bzw. Blaublicht-bestrahlten MacGreen Mäusen nach 72 h. Weißer Kreis verdeutlicht induzierten Schaden („Hot Spot“) (B). GFP⁺ Mikroglia (grün) mit aktivierter amöboider Morphologie (C und D). Maßstab 200 μ m

Zur weiteren histologischen Charakterisierung der Blaublicht-induzierten Mikrogliaaktivierung wurden Kryoschnitte angefertigt und immunhistochemisch untersucht. In der nicht-bestrahlten dunkel-Kontrolle waren ramifizierte GFP⁺ Mikroglia mit langen zellulären Fortsätzen in Ganglionzellschicht (GCL) der und den plexiformen Schichten (IPL und

OPL) feststellbar (Abb. 26: A und E). 12 Stunden nach induziertem Lichtschaden tauchten GFP⁺ Mikroglia in der OPL auf, während nach 24 Stunden und noch mehr nach 72 Stunden eine deutliche Migration der Mikroglia zum Zentrum der Läsion aufgezeigt werden konnte (Abb. 26: B-D). Diese Zellen wiesen mit ihren aufgeblasenen Zellkörpern eine deutlich aktivierte amöboide Morphologie auf (Abb. 26: F).

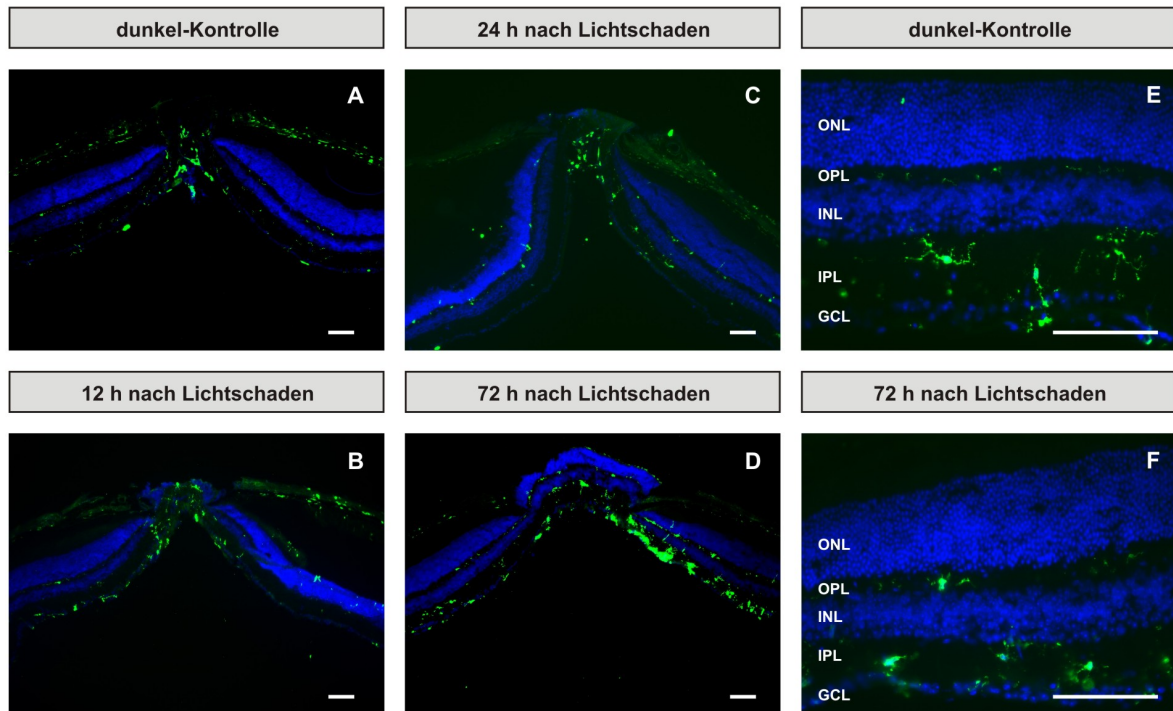


Abb. 26: Kryoschnitte von Blaulicht-bestrahlten MacGreen Netzhäuten. GFP⁺ Mikroglia (grün) in dunkel-adaptierten (A und E) bzw. Blaulicht-bestrahlten Netzhäuten (B-D und F) von 3 Monate alten MacGreen Mäusen. Visualisierung der Zellkerne mit DAPI (blau). ONL, *outer nuclear layer* (äußere Körnerschicht); OPL, *outer plexiform layer* (äußere plexiforme Schicht); INL, *inner nuclear layer* (innere Körnerschicht); IPL, *inner plexiform layer* (innere plexiforme Schicht); GCL, *ganglion cell layer* (Ganglionzellschicht). Maßstab 100 µm

5.8.2 Transkriptionelle Veränderungen nach Blaulicht-induzierter Schädigung der Netzhaut

Mit Hilfe von Mikroarrayanalysen konnten Chen und Kollegen in der Netzhaut Weißlicht-induzierte Veränderungen auf transkriptioneller Ebene nachweisen (Chen et al., 2004). Vor allem Gene, welche mit Transkriptionsfaktoren, Entzündung und Apoptose in Verbindung stehen, konnten als signifikant reguliert identifiziert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen und der eigenen histologischen Befunde, liegen Blaulicht-induzierte transkriptomische Veränderungen nahe. Aus diesem Grund wurden Affymetrix DNA Mikroarrayanalysen durchgeführt. Eine vergleichende Analyse der Daten mit Hilfe des *gene expression dynamics inspector* (GEDI) lieferte im Vergleich zu dunkel-adaptierten Kontroll-Mäusen 102 signifikant regulierte Transkripte in Folge der Blaulichtbestrahlung (Abb. 27: A). Eine nähere Betrachtung der 102 regulierten Transkripte war mit einer

significance analysis of microarrays (SAM) und einer false discovery rate von 0% möglich. Somit konnte dem Großteil der 102 signifikant regulierten Gene eine frühe Hochregulation der Genexpression nachgewiesen werden (Abb. 27: B).

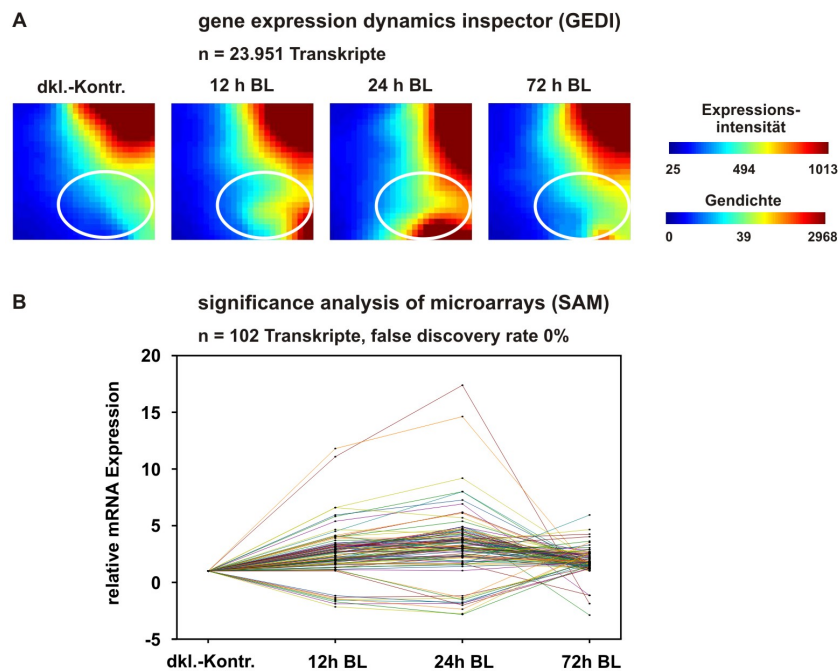


Abb. 27: Bioinformatische Analyse der Mikroarray-Daten nach Blaulicht-induzierter Schädigung der Netzhaut. Identifizierung von 102 signifikant regulierten Transkripten mit Hilfe des *gene expression dynamics inspector* (GEDI) nach Blaulichtbestrahlung der Netzhaut verglichen mit dunkel-adaptierten Kontroll-Mäusen. Weißer Kreis verdeutlicht unterschiedliche Expressionsprofile zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Blaulichtbestrahlung (A). *Significance analysis of microarrays* (SAM) der 102 Transkripte deckt vorwiegend frühe Hochregulation der Genexpression auf (B). BL, nach Blaulichtschaden. dkl.-Kontr., dunkel-Kontrolle.

Mit Hilfe einer umfangreichen Literaturrecherche konnten die 102 signifikant regulierten Gene, die durch Bestrahlung mit Blaulicht induziert wurden, funktionellen Kategorien zugeordnet werden (Abb. 28).

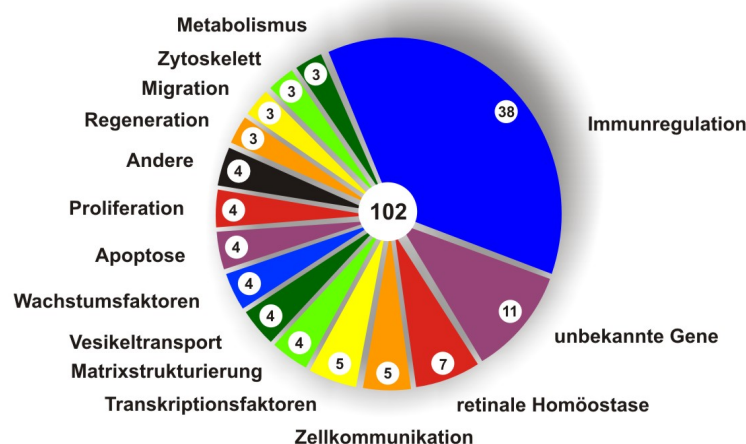


Abb. 28: Genexpressionsprofile von Blaulicht-bestrahlten MacGreen Mäusen. Kuchendiagramm mit überrepräsentierenden funktionellen Kategorien der 102 signifikant regulierten Transkripte. Bestrahlung der MacGreen Mäuse mit blauem Licht (410 ± 10 nm) für 2 min und genomweite Genexpressionsanalyse von bestrahlten Netzhäuten nach 12 h, 24 h und 72 h, verglichen zu dunkel-adaptierten Kontroll-Mäusen.

Im Zuge dessen konnten vor allem Immunregulation, retinale Homöostase und Zellkommunikation sowie Wachstums- und Transkriptionsfaktoren als betroffene Signalwege zugewiesen werden. Darüber hinaus wurden 11 bislang unbekannte Gene identifiziert. Etliche Blaulicht-induzierten Transkripte, wie *lipocalin 2* (Lcn2), *serine peptidase inhibitor clade A member 3N* (Serpina3n), *tissue inhibitor of metalloproteinase* (Timp1) und *six-transmembrane epithelial antigen of prostate 4* (Steap4) stehen mit Immunantwort, Matrixstrukturierung und Zellkommunikation von Mikroglia während retinaler Degenerationsprozesse (Swiderski et al., 2007, Takamiya et al., 2001, Yang et al., 2007b) und Entzündungsreaktionen (Ramadoss et al., 2010) in Zusammenhang. Zusätzlich wurden Marker für retinale Homöostase mit belegter anti-oxidanter und regenerativer Wirkung identifiziert. Dazu gehören die Enzyme *heme oxygenase 1* (Hmox1) (Sun et al., 2007), *metallothionein 1* und *2* (Mt1 und Mt2) (Zmijewski et al., 2009) sowie die Adhäsionsmoleküle *cell adhesion molecule with homology to L1CAM* (Chl1) (Wu et al., 2010) und *retinaldehyde binding protein 1* (Rlbp1) (Vazquez-Chona et al., 2009). Des Weiteren konnte eine stark induzierte Expression des Wachstumsfaktors *fibroblast growth factor 2* (Fgf2) identifiziert werden, von dem eine protektive Wirkung nach induziertem Lichtschaden bereits bekannt ist (O'Driscoll et al., 2008). Ebenfalls stark exprimiert waren Transkriptionsfaktoren wie *retinol binding protein 1* (Rbp1) (Binda et al., 2008) und *suppressor of cytokine signaling 3* (Socs3) (Park et al., 2009), welche wiederum in regenerative Prozesse der verletzten Netzhaut involviert sind. Diese Expressionsmuster lassen auf ein regeneratives und anti-inflammatorisches Profil Blaulicht-aktivierter Mikroglia schließen.

Zur Bestätigung der veränderten Genexpression wurde eine Auswahl der 102 signifikant regulierten Transkripte mittels quantitativer real time RT-PCR validiert. Oxidativer Stress spielt eine wichtige Rolle im Lichtschaden Model retinaler Degeneration sowie in altersbedingter Makuladegeneration. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) agiert als Vertreter der reaktiven Sauerstoffarten sowohl destruktiv als auch protektiv in verschiedenen intrazellulären Signalwegen. Aus diesem Grund wurden im Rahmen der Mikroarrayvalidierung auch Gene der *NADPH oxidase 2* (Nox2) Familie untersucht, welche für die H_2O_2 -Produktion von Makrophagen verantwortlich ist (Groeger et al., 2009). Einen Teil der gemessenen Gene konnte bereits eine Weißlicht-induzierte Regulation nachgewiesen werden (Chen et al., 2004). Die Ergebnisse der Validierung untermauerten die Mikroarray-Daten und vor allem Gene assoziiert mit Immunregulation (Lcn2, Serpina3n, Timp1), oxidativem Stress (p40phox, Rac2, Nox2) und retinaler Homöostase (Tmbim1, Rlbp1) wurden abermals nachgewiesen, einer starken Regulation nach Bestrahlung mit Blaulicht zu unterliegen (Tab. 20).

	dkl.-Kontr.		12 h nach Lichtschaden				24 h nach Lichtschaden				72 h nach Lichtschaden			
Gen	Avg C _T	Expression	Avg C _T	Expression	RQ	RQ SD	Avg C _T	Expression	RQ	RQ SD	Avg C _T	Expression	RQ	RQ SD
ATPase	21,34	***	21,77	***			21,72	***			21,58	***		
Timp1	32,57	.	28,07	**	30,45	0,59	25,52	**	172,71	11,85	29,91	**	7,48	0,45
Lcn2	26,59	**	21,78	***	37,96	4,36	19,56	***	171,03	9,35	24,85	***	3,95	0,30
Steap4	30,24	.	25,80	**	29,30	2,50	24,21	***	85,41	0,70	27,02	**	10,98	0,56
Serpina3n	27,38	**	22,58	***	37,57	4,74	21,94	***	56,60	0,54	24,49	***	8,73	0,46
Chi3l1	26,58	**	24,60	***	5,33	0,80	22,07	***	29,61	0,67	25,78	**	2,05	0,03
p40phox	33,76	.	33,11	.	2,11	0,15	29,38	**	27,08	2,18	31,66	.	5,05	0,44
Serpina3h	35,33	-	34,71	.	2,08	0,04	30,98	.	AN		35,64	-	AUS	
Irgm1	31,62	.	30,80	.	2,37	0,49	27,30	**	26,05	0,77	29,16	**	6,51	0,29
Rac2	29,24	**	28,66	**	2,02	0,08	25,00	***	24,57	1,64	27,00	**	5,58	0,13
Nox2	32,56	.	32,86	.	1,10	0,08	28,77	**	18,11	1,02	29,31	**	11,27	1,09
Pgf	31,28	.	30,05	.	3,16	0,50	27,52	**	17,64	2,31	30,12	.	2,63	0,08
p47phox	31,55	.	32,32	.	0,79	0,00	28,65	**	9,75	2,39	29,68	**	4,33	0,24
Parp10	28,58	**	29,40	**	0,77	0,02	25,77	**	9,14	0,93	27,48	**	2,53	0,26
Crispld2	28,67	**	26,35	**	6,72	0,79	25,86	**	9,12	0,80	28,12	**	1,73	0,09
Rfx2	27,22	**	25,34	**	4,97	0,17	24,50	***	8,59	1,59	26,59	**	1,82	0,30
Il-33	23,89	***	22,01	***	4,97	0,13	21,47	***	6,97	0,76	23,74	***	1,31	0,15
Tm4sf1	28,69	**	26,03	**	8,53	0,90	26,69	**	5,21	0,03	28,61	**	1,25	0,09
Tmbim1	28,32	**	27,28	**	2,79	0,00	26,55	**	4,47	0,15	28,23	**	1,26	0,00
p67phox	31,33	.	31,56	.	1,16	0,11	30,01	.	3,25	0,56	30,57	.	2,01	0,34
Ch25h	27,72	**	26,28	**	3,65	0,24	26,84	**	2,40	0,04	26,91	**	2,07	0,02
p22phox	28,31	**	29,54	**	0,58	0,09	27,69	**	2,01	0,35	28,45	**	1,07	0,08
Sprr1a	27,30	**	26,17	**	2,95	0,17	26,75	**	1,91	0,11	26,91	**	1,55	0,03
Noxo1	29,51	**	30,24	.	0,81	0,04	29,11	**	1,72	0,11	29,37	**	1,30	0,04
Rac1	23,01	***	23,64	***	0,87	0,26	23,07	***	1,25	0,53	23,10	***	1,11	0,01
Fut11	25,02	**	26,36	**	0,53	0,21	25,36	**	1,03	0,35	25,46	**	0,87	0,17
Nox1	33,23	.	32,33	.	2,52	0,12	33,67	.	0,96	0,01	33,34	.	1,10	0,20
Gpr37	23,33	***	25,60	**	0,28	0,08	24,57	***	0,55	0,16	23,14	***	1,35	0,13
Rlbp1	24,46	***	27,07	**	0,22	0,03	27,15	**	0,20	0,02	24,61	***	1,06	0,14
Agxt2l1	27,05	**	28,04	**	0,68	0,36	30,19	.	0,15	0,04	27,45	**	0,89	0,20
Noxa1	-	-	36,79	-			35,27	-			36,76	-		

Tab. 20: Validierung der Mikroarray-Daten mittels quantitativer real time RT-PCR. Dargestellte Werte sortiert entsprechend der relativen Quantifizierung (RQ) 24 h nach Bestrahlung mit Blaulicht. Signifikant hochregulierte Gene rot gekennzeichnet ab einem RQ Wert ≥ 2 und signifikant negativ regulierte Gene blau gekennzeichnet ab einem RQ Wert $\leq 0,5$. Avg C_T ≤ 25 (***, starke Expression); Avg C_T ≤ 30 (**, mittlere Expression); Avg C_T ≤ 35 (*, schwache Expression); Avg C_T > 35 (-, keine Expression). n = 2 Mäuse pro Zeitpunkt. Normalisierung auf Referenzgen ATPase. Avg, average (Mittelwert); dkl.-Kontr., dunkel-Kontrolle; SD, standard deviation (Standardabweichung)

5.9 *In vitro* Mikroglia Regulation durch CSPG-DS und daraus resultierende Effekte auf Photorezeptorzellen

Eine Überaktivierung von Mikrogliazellen führt zu Gewebeschädigung und neuronaler Apoptose bei neurodegenerativen Erkrankungen wie retinalen Dystrophien. Von daher stellen bioaktive Substanzen, welche die Überaktivierung von Mikroglia dämpfen, potentielle neuroprotektive Therapeutika dar. Ein Abbauprodukt der Matrixkomponente Chondroitinsulfatproteoglykan-Disaccharid (CSPG-DS) stellt hierfür einen möglichen Kandidaten dar, für den eine verminderte retinale Degeneration durch Beeinflussung der Mikrogliaaktivierung bereits im Glaukommodell der Ratte gezeigt werden konnte (Bakalash et al., 2007, Rolls et al., 2004, Rolls et al., 2006). Zum besseren Verständnis der immunmodulierenden Eigenschaften von CSPG-DS wurde der Einfluss der Substanz auf immortalisierte BV2 Mikrogliazellen und primäre Mikrogliazellen umfassend charakterisiert. Um bei BV2 Zellen einen klassisch aktivierten Phänotyp zu induzieren, wurde Interferon γ (IFN γ) als pro-inflammatorische Kontrollsubstanz verwendet.

Genomweite transkriptionelle Veränderungen wurden durch eine DNA-Mikroarray-Expressionsanalyse identifiziert und mittels quantitativer real time RT-PCR (qRT-PCR) validiert. Des Weiteren wurden mit Hilfe funktioneller Analysen Effekte von Mikroglia-konditioniertem Medium auf kultivierte 661W Photorezeptorzellen näher beleuchtet. Der gesamte Versuchsablauf ist in Abbildung 29 schematisch dargestellt.

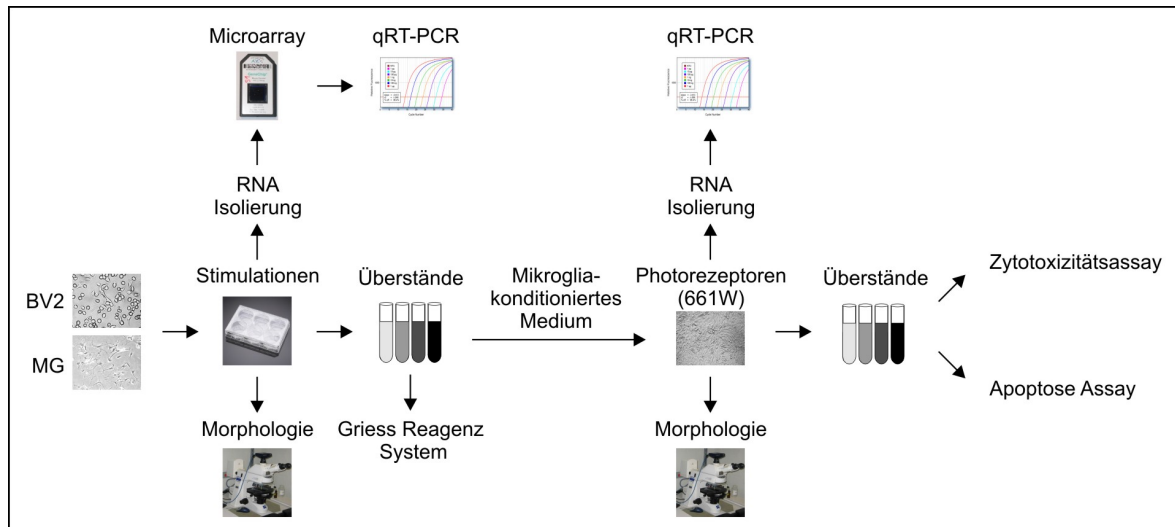


Abb. 29: Schematischer Versuchsablauf des angewandten Zellkultursystems. BV2 Zellen und primäre Mikroglia wurden 24h mit CSPG-DS (50µg/ml), IFN γ (20ng/ml) und IFN γ + CSPG-DS kostimuliert. 661W Photorezeptorzellen wurden im Anschluss daran mit diesen Mikroglia-konditionierten Medien inkubiert. Die Zellmorphologie wurde mikroskopisch beurteilt. Transkriptionelle Genexpressionsanalysen der BV2 Zellen, primären Mikroglia und 661W Photorezeptoren wurden mittels Mikroarrayanalysen bzw. qRT-PCR durchgeführt. Die gewonnenen Überstände wurden funktionellen Analysen mit Griess Reagenz System, Zytotoxizitätsassays und Apoptoseassays unterzogen. MG, Mikroglia.

5.9.1 Genomweite Expressionsanalyse und Genvalidierung

Die genomweite Expressionsanalyse wurde mit Affymetrix 430 2.0 Mausgenomarrays in Kooperation mit dem Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB) durchgeführt. Es wurden RNAs von zwei unabhängigen Mikroglia-kulturen verwendet, die unstimuliert waren bzw. mit IFN γ oder CSPG-DS stimuliert wurden. Durch Anwendung einer Signifikanzanalyse für Mikroarrays (SAM) mit einer *false discovery rate* von 5%, einer Minimum log₂ ratio von 1,5 (entspricht einem Fold Change von 2,9) und einem Schwellenwert von drei signifikanten Einzelsonden, konnten 29 hoch- und 25 herunterregulierte Gene identifiziert werden. Für eine funktionelle Annotation dieser CSPG-DS regulierten Transkripte, wurde die *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (Dennis et al., 2003) sowie der *GenMap Annotator* und *Pathway Profiler* (Gladstone Institutes, San Francisco, CA, USA) verwendet. Somit konnten die biologischen Signalwege, welche durch die induzierten bzw. supprimierten Gene dargestellt werden, klar voneinander separiert werden. (Abb. 30: A und B). In der CSPG-DS-induzierten Gruppe (Abb. 30: B) konnten vor allem Phagozytose, Detoxifikation, Migration, Immunregulation und Antigenpräsentation als betroffene

Signalwege identifiziert werden. In der Gruppe der herunterregulierten Gene (Abb. 30: A) waren vor allem Gene des Zellzyklus und des Nukleotidmetabolismus überrepräsentiert. Diese Expressionsmuster deuten klar auf ein phagozytisches und vor allem anti-inflammatorisches Profil CSPG-DS-aktivierter Mikroglia hin.

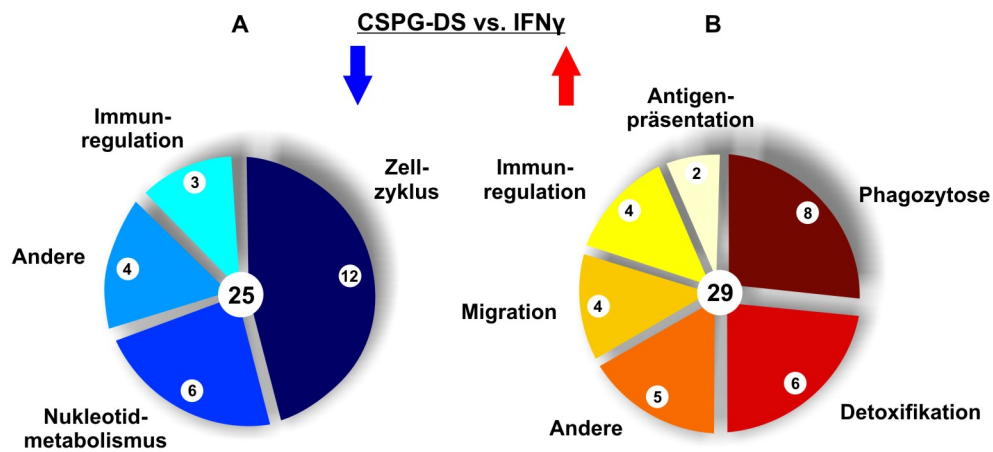


Abb. 30: Genexpressionsprofile von CSPG-DS und IFN γ stimulierten Mikroglia. Funktionelle Kategorien der 25 signifikant herunter- (A) und 29 signifikant hochregulierten (B) Transkripte. Stimulation der BV2 Zellen mit 50 μ g/ml CSPG-DS bzw. 20 ng/ml IFN γ für 24 Stunden.

Um die DNA-Mikroarrayergebnisse der BV2 Zellen zu validieren, wurden quantitative real time RT-PCR Analysen durchgeführt. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und die resultierenden Daten nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode für relative Quantifizierung analysiert. Als Kalibratoren dienten jeweils unstimulierte Zellen. Die differentielle Expression aller 29 hoch- und der 10 am stärksten herunterregulierten Gene in BV2 Zellen konnte auf diese Weise repliziert werden.

Verschiedene biologische Unterschiede zwischen immortalisierten BV2 Zellen und primären Mikroglia sind bereits beschrieben worden (de Jong et al., 2008). Aus diesem Grund wurden zusätzlich kultivierte Primärmikroglia hinsichtlich der transkriptionellen Effekte von CSPG-DS untersucht. Des Weiteren wurden Kostimulationsexperimente durchgeführt, um eine potentielle gegenregulatorische Rolle von CSPG-DS auf IFN γ -vermittelte Genexpression evaluieren zu können. Hierzu wurden mit *Histocompatibility 2 class II antigen A β 1* (H2Ab1) und *Fc γ receptor III* (Fc γ RIII α) zunächst zwei Gene ausgewählt, die besonders hohe Expressionsveränderungen bei der Mikroarrayanalyse in der Gruppe der Phagozytose-assoziierten Transkripte zeigten. BV2 Zellen und primäre Mikroglia, für 24h mit CSPG-DS behandelt, zeigten ähnlich wie IFN γ eine starke Erhöhung der mRNA Mengen beider Gene. Im Gegensatz dazu hatte eine Kostimulation mit CSPG-DS und IFN γ keine dämpfende Genexpression zur Folge (Abb. 31: A und B). Primäre Mikroglia, verglichen mit BV2 Zellen, zeigten in den meisten Genexpressions-experimenten einen Trend zu höheren Reaktionen. In beiden Zelltypen hatte eine

Behandlung mit CSPG-DS eine Erhöhung von Gas6, Cbr2 und Cd28 Transkripten zur Folge (Abb. 31: C-E), wohingegen die mRNA Spiegel der pro-inflammatorischen Mediatoren Ifi44, Irf7 und Cxcl10 stark vermindert wurden (Abb. 31: F-H). Besonders hervorzuheben ist hier, dass IFN γ für diese drei Gene einen gegensätzlichen Effekt aufwies. In den Kostimulationsexperimenten konnte CSPG-DS die inhibitorische Aktivität von IFN γ auf die Transkription von Gas6, Cbr2 und Cd28 aufheben (Abb. 31: C-E) und die IFN γ -stimulierte Transkription von Ifi44, Irf7 und Cxcl10 zumindest dämpfen (Abb. 31: F-H). Diese Daten verdeutlichen, dass CSPG-DS- und IFN γ -stimulierte Mikroglia gegensätzliche Phagozytenphänotypen mit unterschiedlicher genetischer Steuerung repräsentieren.

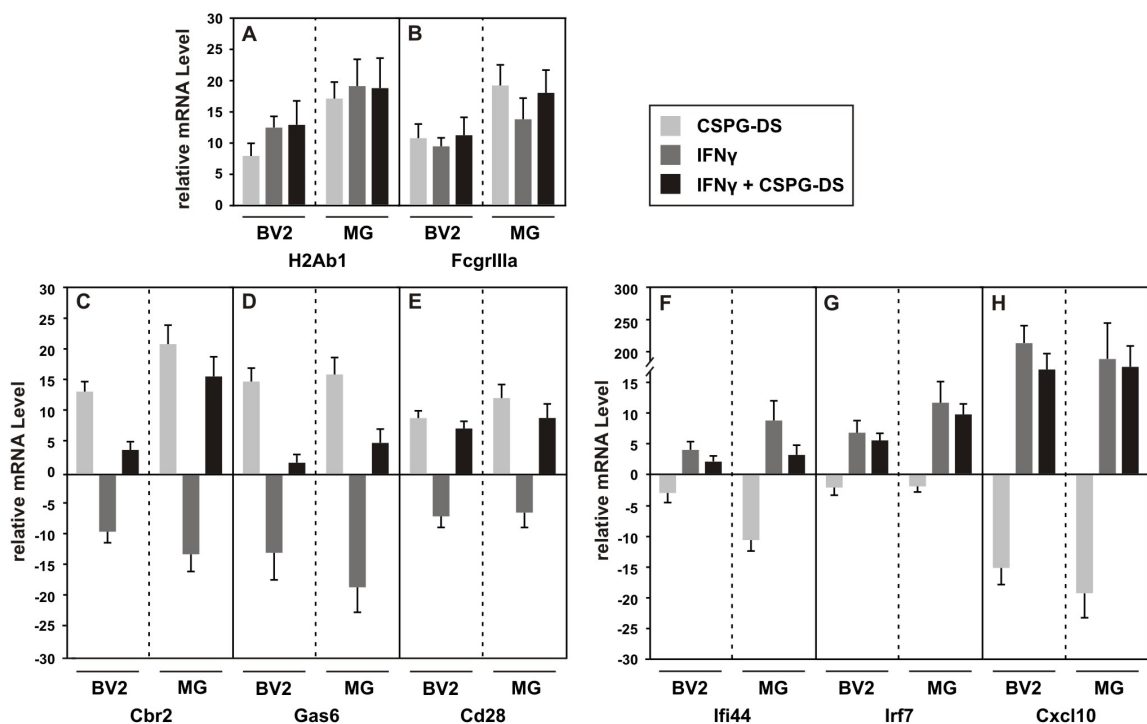


Abb. 31: Quantitative real time RT-PCR Analysen. CSPG-DS (50 μ g/ml), IFN γ (20 ng/ml) und IFN γ - + CSPG-DS-kostimierte BV2 Zellen und primäre Mikroglia. Durchschnittliche relative mRNA Level \pm SD. RNA von BV2 Zellen, n = 3. RNA von primären MG, n = 2. Normalisierung auf Referenzgen ATPase. MG, Mikroglia; SD, standard deviation (Standardabweichung).

5.9.2 Einfluss von CSPG-DS auf Mikroglia-Funktionen

Um abschätzen zu können, ob die einzelnen Genexpressionsprofile von CSPG-DS-stimulierten BV2 Zellen und primären Mikroglia auch funktionelle Auswirkungen zum Beispiel auf phagozytische, anti-inflammatorische und neuroprotektive Eigenschaften haben, wurden verschiedene funktionelle Untersuchungen durchgeführt. Mit Hilfe eines Phagozytoseassays wurde zunächst untersucht, ob CSPG-DS im Stande war, die Partikelaufnahme zu beeinflussen. Hierfür wurden blaue Latex Beads den Kulturwells zugegeben und die Zellen nach 8 h Inkubation mit PBS gewaschen. Während

unstimulierte BV2 Zellen bzw. primäre Mikroglia eine nur mäßige Partikelaufnahme aufwiesen (Abb. 32: A und D), zeigten CSPG-DS-behandelte Zellen eine stark erhöhte Phagozytose der Latex Beads (Abb. 32: B und E). Als Kontrolle wurde hier IFN γ verwendet, von dem eine phagozytose-induzierende Wirkung auf Mikroglia bereits bekannt ist (Quan et al., 2009). Trotz der anti-inflammatorischen Wirkung auf transkriptioneller Ebene konnte CSPD-DS das Phagozytoseverhalten von Mikroglia im Vergleich zu IFN γ -stimulierten Mikroglia stark erhöhen. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zusammen mit dem erhöhten Phagozytoseverhalten legen eine anti-inflammatorische Wirkungsweise von CSPG-DS in Mikrogliazellen nahe.

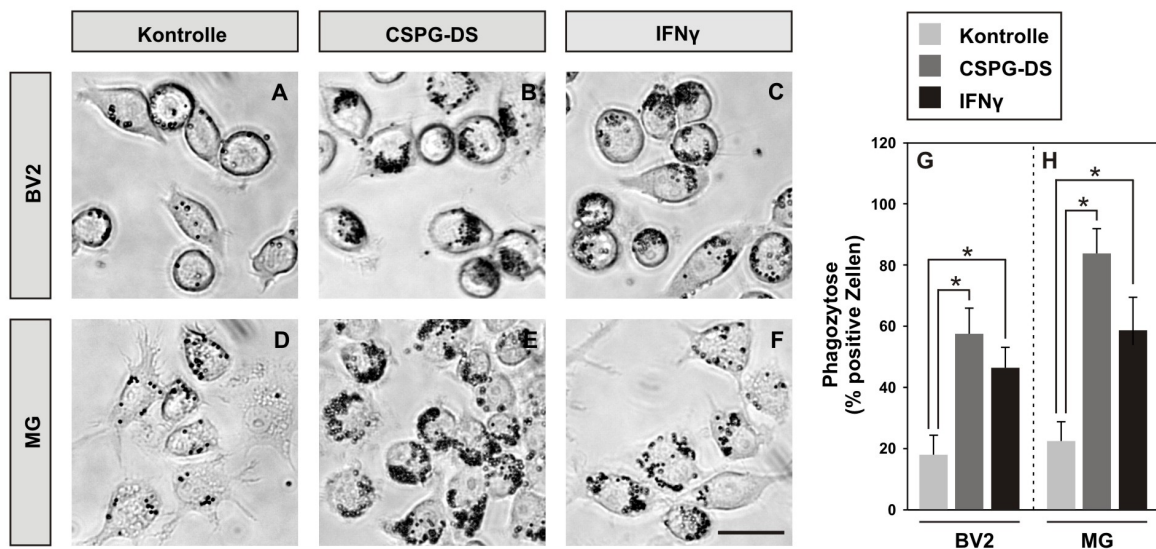


Abb. 32: Effekte von CSPG-DS und IFN γ auf das Phagozytoseverhalten von BV2 Zellen und primären Mikroglia. BV2 Zellen (A-C) und primäre Mikroglia (D-F), behandelt mit Medium (A und D), 50 μ g/ml CSPG-DS (B und E) oder 20 ng/ml IFN γ (C und F), wurden mit blauen Latex Beads (\varnothing 1 μ m, 1 μ l Beads/ml) für 8 h inkubiert und anschließend hinsichtlich der Partikelaufnahme mikroskopisch untersucht. Die optische Beaddichte wurde in 100 Zellen in sechs unabhängigen Kulturwells bestimmt. Die Durchschnittswerte \pm SD eines jeden Phagozytoseindex werden als positive Zellen in Prozent graphisch dargestellt. BV2 Zellen, n= 3. Primäre MG, n= 2. *P < 0,05; Student's t-test. MG, Mikroglia. SD, standard deviation (Standardabweichung). Maßstab 50 μ m.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde zusätzlich untersucht, ob eine Stimulation mit CSPG-DS eine Ausschüttung von NO, einem zytotoxischen Produkt pro-inflammatorisch aktivierter Makrophagen und Mikroglia, bewirkt. Die von BV2 Zellen bzw. primären Mikroglia an das Kulturmedium abgegebene NO-Menge wurde mit dem Griess Reagenz System unter Zuhilfenahme einer Natriumnitrit-Standardkurve berechnet. In CSPG-DS-behandelten BV2 Zellen und primären Mikroglia war keine NO-Sekretion detektierbar, wohingegen IFN γ wirksam die Abgabe von NO in beiden Zellkulturen wirksam erhöhte. Die Kostimulation mit IFN γ und CSPG-DS resultierte im Vergleich zur Stimulation mit IFN γ alleine in beiden Zelltypen in deutlich erniedrigten NO Mengen (Abb. 33: A und B). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Mikrogliaaktivierung durch CSPG-DS keine

direkten zytotoxischen Effekte zur Folge hat und die Zytotoxizität in einer pro-inflammatorischen Umgebung dämpfen kann.

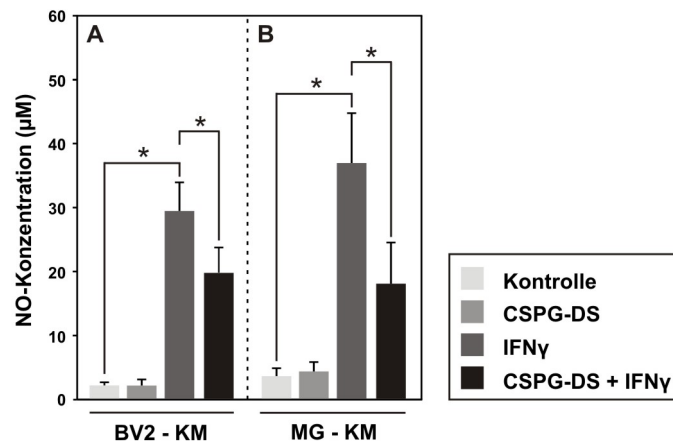


Abb. 33: NO-Sekretion von CSPG-DS, IFN γ und IFN γ + CSPG-DS-kostimulierten BV2 Zellen und primären Mikroglia. Nachweis von NO im Kulturmedium mittels Griess Reagenz System. BV2 Zellen n = 3. Primäre MG, n = 2. *P < 0,05; Student's t-test. MG, Mikroglia; KM, konditioniertes Medium

5.9.3 Einfluss von Mikroglia-konditioniertem Medium auf 661W Photorezeptorzellen

Um die Hypothese der verminderten Zytotoxizität von CSPG-DS-stimulierten Mikroglia zu erhärten, wurde ein Zellkultursystem entwickelt, bei dem 661W Photorezeptorzellen mit konditioniertem Medium (KM) von BV2 Zellen oder primären Mikroglia behandelt wurden. Die Zellmorphologie wurde mittels Durchlichtmikroskopie beurteilt und die Zellviabilität mit einem Zytotoxizitätsassay bestimmt, welcher die Freisetzung von intrazellulärer Laktatdehydrogenase (LDH) in das Medium erfasst. Mit Hilfe eines Apoptose Assays, der die Aktivität der Caspasen 3 und 7 quantifiziert, konnte der apoptotische Zelltod näher bestimmt werden. 661W Zellen in ihrem eigenen Medium wuchsen konfluent nach 24h (Abb. 34: A und E). CSPG-DS konditioniertes Medium von BV2 Zellen hatte keinen Einfluss auf das Zellwachstum von 661W Zellen (Abb. 34: B und F), während IFN γ -KM von BV2 Zellen und primären Mikroglia die Proliferation von 661W Zellen stark verminderte (Abb. 34: C und G). Dies spiegelte sich vor allem in einem inhomogenen Zellwachstum wider. Durch Stimulation der 661W Photorezeptoren mit konditioniertem Medium von IFN γ - und CSPG-DS-kostimulierten BV2 Zellen bzw. primären Mikroglia wurden annähernd normale Zellcharakteristika beibehalten (Abb. 34: D und H). 661W Zellen, behandelt mit IFN γ -KM von BV2 Zellen und primären Mikroglia, wiesen eine deutlich verminderte Zellviabilität (Abb. 35: A und B) in Kombination mit hoher Caspase 3/7 Aktivität (Abb. 35: C und D) auf. Im Gegensatz dazu zeigten Überstände von CSPG-DS-Stimulationen weder Einfluss auf die Zellviabilität von 661W Photorezeptoren (Abb. 35: A und B), noch wurden Caspase-assoziierte Signalkaskaden aktiviert (Abb. 35: C und D).

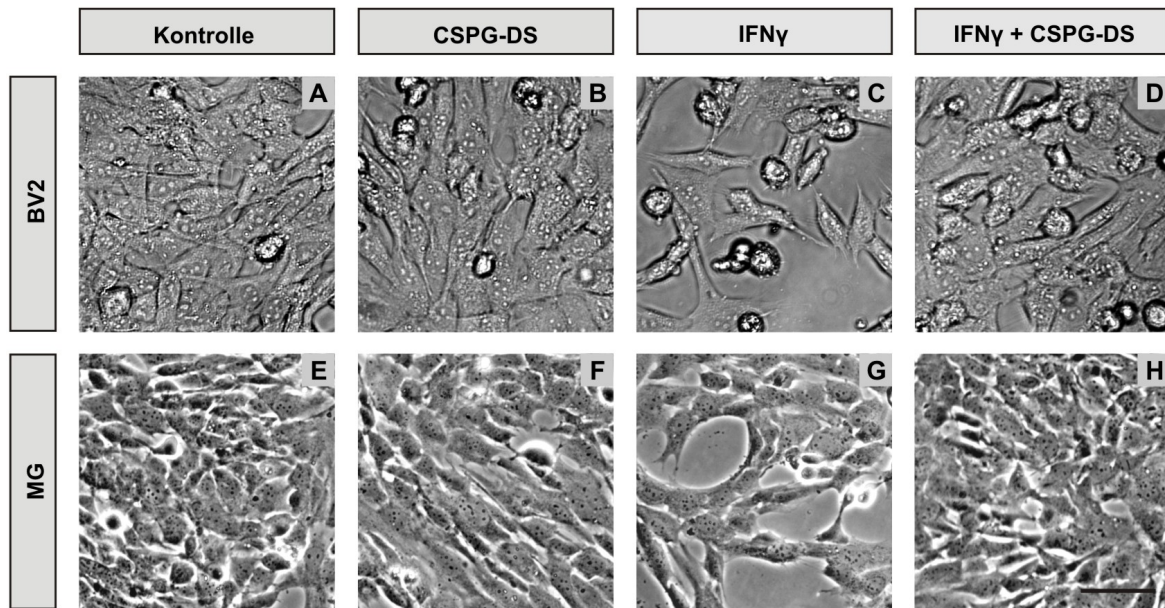


Abb. 34: Effekte von CSPG-DS-, IFN γ - und IFN γ + CSPG-DS-behandelten BV2 Zellen und primären Mikroglia auf Zellmorphologie von 661W Photorezeptorzellen. Morphologische Untersuchungen von 661W Zellkulturen stimuliert mit konditionierten Medien von unstimulierten (A und E), CSPG-DS (B und F), IFN γ (C und G) und IFN γ + CSPG-DS- (D und H) behandelten BV2 Zellen bzw. primären Mikroglia. MG, Mikroglia. Maßstab 50 μ m.

Die Behandlung mit IFN γ - und CSPG-DS-konditioniertem Medium verhinderte den Zelltod von 661W Zellen (Abb. 35: A und B) und führte zu einer deutlichen Reduktion der Caspase 3/7 Aktivität (Abb. 35: C und D).

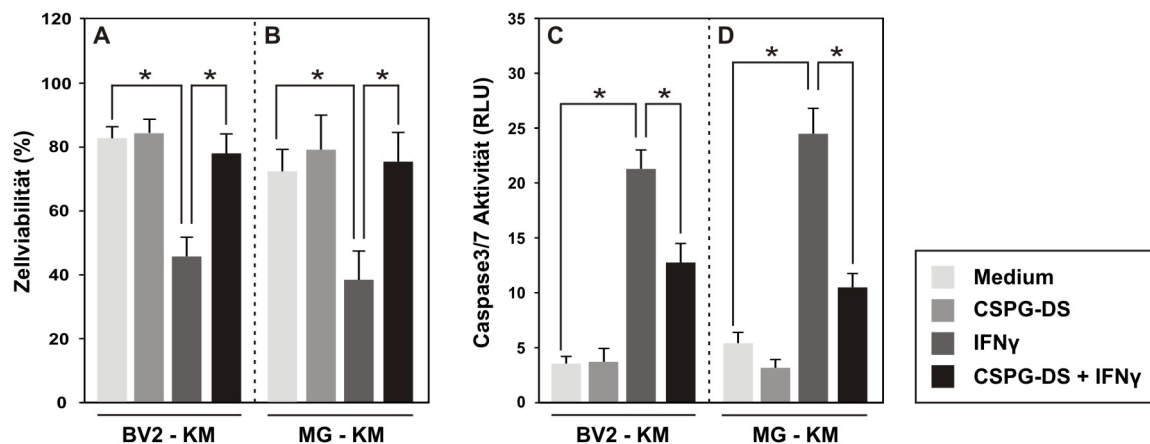


Abb. 35: Effekte von CSPG-DS-, IFN γ - und IFN γ + CSPG-DS-behandelten BV2 Zellen und primären Mikroglia auf Zellviabilität und Apoptose von 661W Photorezeptorzellen. Nachweis der Zellviabilität von 661W Zellkulturen nach Behandlung mit konditioniertem Medium (KM) von IFN γ -stimulierten BV2 Zellen (A) bzw. primären Mikroglia (B) mittels Zytotoxizitätsassay. Quantifizierung der Caspase 3/7 Aktivität mit Caspase 3/7 Assay nach Inkubation von 661W Photorezeptorzellen mit unterschiedlichen KMs (C und D). Mittelwerte \pm SD. BV2 Zellen, n = 3. Primäre MG, n = 2. *P < 0,05; Student's t-test. MG, Mikroglia; KM, konditioniertes Medium; RLU, relative light units (relative Lichteinheiten); SD, standard deviation (Standardabweichung)

Die Ergebnisse bezüglich der gegen-regulatorischen Eigenschaften von CSPG-DS auf die zytotoxische Wirkung von IFN γ konnten mit Hilfe dieser funktionellen Analysen also weiter untermauert werden.

6 Diskussion

Störungen und Verletzungen des ZNS bzw. der Netzhaut führen zur Aktivierung ramifizierter Mikroglia, was morphologische Veränderungen zur Folge hat und immunphänotypische Eigenschaften ähnliche der von Makrophagen hervorruft (Streit et al., 1999). Zudem kommt es zur Einwanderung von Makrophagen aus der Blutzirkulation in das geschädigte Gewebe (Stoll and Jander, 1999). Diverse Studien konnten bereits belegen, dass Mikroglia auf verschiedene Störungen der Netzhaut mit einer Verschiebung des normalen Verteilungsmusters reagieren (Chen et al., 2002, Roque et al., 1999, Santos et al., 2008, Zhang et al., 2005a). Mutationen in 161 Genen (RetNet, „*the Retinal Information Network*“ mit Stand vom 01.06.2010) können für retinale Degenerationen verantwortlich sein und zu Sehstörungen bzw. Erblindung führen (Hartong et al., 2006). Progressive Apoptose der Photorezeptorzellen ist das charakteristische Merkmal dieser genetisch heterogenen Gruppe retinaler Dystrophien im Menschen und konnte zudem in einer Reihe von spontanmutierten Tieren und genetisch veränderten Mäusen und Ratten nachgewiesen werden (Chang et al., 1993). Seit einigen Jahren geht man auch davon aus, dass eine Überaktivierung der retinalen Mikroglia wesentlich am Prozess der neuronalen Apoptose bei retinalen Dystrophien beteiligt ist (Schuetz and Thanos, 2004). Durch Beseitigung von Gewebetrümmern und der Sekretion neurotropher Faktoren übernehmen ruhende Mikroglia die Kontrolle der Immunantwort in der Netzhaut. Die degenerierende Netzhaut versetzt Mikroglia durch endogene Impulse hingegen in Alarmbereitschaft, was zu lokaler Proliferation, Migration und Zytokinsekretion führt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass vererbte retinale Degeneration mit einer starken Aktivierung residenter Mikroglia sowie einer Infiltration amöboider Makrophagen in die äußere Körnerschicht assoziiert ist (Langmann, 2007). Somit stellen die amplifizierte Immunkaskade sowie der Verlust von Kontrollmechanismen denkbare Ursachen für die retinalen Gewebeschäden und pro-apoptotischen Ereignisse dar. Eine lokale oder systemische Immuntherapie zur Erhaltung der retinalen Immunhomöostase bietet folglich einen möglichen Ansatzpunkt, um den Verlauf der Neurodegeneration zu verlangsamen (Schwartz, 2007).

6.1 Aktivierung retinaler Mikroglia: Ein Vergleich zwischen Wildtyp und $Rs1h^{-Y}$ Mausmodell

6.1.1 Ramifizierte Mikroglia in der gesunden Netzhaut der Maus

Mikrogliazellen sind für die Überwachung und Reinigung des zentralen Nervensystems durch bestimmte Immunreaktionen verantwortlich (Kreutzberg, 1996). In der Netzhaut von

adulten Mäusen konnten ramifizierte Mikroglia in der Ganglionzellschicht (GCL, *ganglion cell layer*) und den plexiformen Schichten (IPL und OPL) identifiziert werden, wohingegen sie in der inneren Körnerschicht (INL, *inner nuclear layer*) kaum und in der äußeren Körnerschicht (ONL, *outer nuclear layer*) überhaupt nicht vorhanden sind (Hume et al., 1983). Das immunologische Potential von Mikroglia ist im Bezug auf sekretorische Funktionen mit dem von Blutmonozyten vergleichbar, denn sie exprimieren kaum kostimulatorische Moleküle und verfügen nur über eine schwache Phagozytoseaktivität (Dick et al., 2003). Für den Erhalt der neuronalen Homöostase der Netzhaut stehen retinale Mikroglia im ständigen Kontakt zu anderen immunrelevanten Zelltypen wie Neuronen, Müllerzellen und RPE Zellen (Streit, 2002). Zudem sezernieren Mikroglia nach Aktivierung eine Reihe neurotropher Faktoren, die Einfluss auf die Physiologie und das Überleben von Neuronen nehmen. Dabei konnten vor allem *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) und *basic fibroblast growth factor* (Fgf2) mit dem Regulationsmechanismen zum Schutz der Photorezeptoren in Verbindung gebracht werden (Carwile et al., 1998). Aber auch eine intakte Kommunikation zwischen Mikroglia und Müllerzellen ist für die autokrine und parakrine Wirkung dieser trophischen Faktoren notwendig (Harada et al., 2002). Mit Hilfe einer Reihe von Oberflächenproteinen wie Rezeptoren für Zytokine, Chemokine, Antikörper und Adhäsionsmoleküle spüren ramifizierte Mikroglia mit ihren langen Zellausläufern immunologische Verbindungen in ihrer Umgebung auf (Streit, 2002). Dabei scheint vor allem die konstitutive Sekretion von *chemokine (C-X3-C motif) ligand 1* (CX3CL1) von gesunden Neuronen, das wiederum an *chemokine (C-X3-C motif) receptor 1* (CX3CR1) auf Mikrogliazellen bindet, eine wichtige Rolle bei der Regulation der Mikroglia-homöostase einzunehmen, denn ein Verlust von CX3CR1 führt zu Neurotoxizität und Degeneration (Cardona et al., 2006).

6.1.2 Aktivierte Mikroglia in der Netzhaut Rs1h-defizienter Mäuse

Basierend auf DNA-Mikroarrayanalysen konnten differentiell regulierte, retinale Gene in frühen postnatalen Phasen der Rs1h-defizienten Maus identifiziert werden, die neben Adhäsion, Zytoskelett und Zellkommunikation vor allem mit molekularen Prozessen der Immunantwort in Verbindung stehen (Gehrig et al., 2007). Eines der sehr früh induzierten Transkripte war *early growth response 1* (Egr1), das bereits ab P9 signifikante Expressionsänderungen zeigte. Die Expression von Egr1 wird durch eine Reihe externer Signale, wie Wachstumsfaktoren, Hormone und Neurotransmitter, über die Serin-Threonin-Kinasen Erk1 und Erk2 (*extracellular signal-regulated kinase 1* und 2) im *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg beeinflusst (Shin et al., 2001, Thiel and Cibelli, 2002). Egr1 induziert zudem die Expression inflammatorischer Mediatoren wie

Tnf α oder Ccl2 (Pritchard and Nagy, 2005, Thiel and Cibelli, 2002, Yao et al., 1997). Neben MAPK- konnten auch NF κ B-Signalwege mit der Aktivierung von Mikroglia in Zusammenhang gebracht werden (Bae et al., 2006, Uesugi et al., 2006). Studien an primären Mikroglia deuten daraufhin, dass die Expression von p38 durch Mikroglia eine wichtige Rolle bei der Produktion inflammatorischer Zytokine und freier Radikale wie NO im zentralen Nervensystem spielen (Combs et al., 2001, Jung et al., 2006). Darüber hinaus konnte nach Inhibierung der p38-Aktivierung eine verminderte Induktion verschiedener pro-inflammatorischer Faktoren wie iNos, Tnf α , Il-1 β und Cox2 gezeigt werden (Piao et al., 2003). Ccl2 ist ein Mitglied der CC-Chemokinfamilie, den Chemokinen, die vorwiegend an der Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen zum Ort der Entzündung verantwortlich sind. Frühere Arbeiten lassen zudem darauf schließen, dass Ccl2 an der Aktivierung und Rekrutierung von Mikroglia in der ONL bei Licht-induzierter und vererbter retinaler Degeneration beteiligt sind (Yang et al., 2007a, Zhang et al., 2005b)

Ausgehend von diesen Befunden, wurden Netzhäute von Wildtyp und Rs1h-defizienten Mäusen mittels real time RT-PCR auf die vier Mikroglia-spezifischen Transkripte Ccl2, iNos, Egr1 und Tnf α untersucht. Während zum Zeitpunkt P9 nur Egr1 bereits signifikante erhöhte Expressionswerte im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen zeigte, nahmen die mRNA Werte aller gemessenen Mikroglia-marker von P11 bis P14 zu und erreichten dort ihr Maximum. Bezüglich der Expressionsregulation konnten die bisher publizierten Daten somit vollständig repliziert werden. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Makrophagen aus dem Blut mit residenten Mikroglia zusammenwirken, um tote Photorezeptoren infolge retinaler Degeneration zu beseitigen (Joly et al., 2009). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Netzhäute von Wildtyp und Rs1h^{-Y} Mäusen zudem transkriptionell auf die konstitutiven Mikroglia-marker Cd68 und Emr1 untersucht. In beiden Fällen wurde zum Zeitpunkt P18 die Expression signifikant hochreguliert, was den Verdacht der Infiltration von Mikroglia in die geschädigte Netzhaut erhärtet.

Um die gemessenen Mikroglia-spezifischen mRNA Profile mit der Proteinexpression zu korrelieren, wurden Netzhäute von Rs1h-defizienten und Wildtyp Mäusen zu unterschiedlichen postnatalen Zeitpunkten immunhistochemisch mit F4/80, einem spezifischen Makrophagenmarker, untersucht. Bis P14 zeigten sich keine Unterschiede zwischen knockout und Wildtyp Mäusen und ruhende ramifizierte Mikroglia waren in OPL und IPL bzw. GCL zu finden. P14 ist der Zeitpunkt, an dem histopathologische Veränderungen, wie zystenähnliche Strukturen in der inneren Netzhaut und Disorganisation der OPL und der Photorezeptoren, in der Rs1h^{-Y} Maus erstmals auftreten (Weber et al., 2002). Zu den späteren Zeitpunkten (P18, P21 und P24) waren hingegen deutliche Anomalien in der Netzhautanordnung sowie morphologische Veränderungen der

Mikroglia zu erkennen. Diese, nun aktivierten amöboiden Zellen, waren vor allem in OPL, INL und IPL lokalisiert. Die real time RT-PCR Daten wurden somit durch diese immunhistochemischen Ergebnisse bekräftigt.

6.2 Aktivierung der Müllerzellen in der Netzhaut von Rs1h^{-/-}-Mäusen

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) wird von zwei Klassen retinaler Gliazellen synthetisiert: Astrozyten in der Ganglionzellschicht exprimieren GFAP konstitutiv, Müllerzellen hingegen exprimieren GFAP nur bei Schädigung der Netzhaut (Sarthy et al., 1991). Zu allen untersuchten Zeitpunkten (P14, P18 und P21) war eine positive GFAP-Färbung in Wildtyp Netzhäuten auf die Ganglionzellschicht begrenzt. Diese Befunde stimmen mit früheren Arbeiten überein, die GFAP im Laufe der normalen Entwicklung nur in Astrozyten nachweisen konnten (Sarthy et al., 1991). Zum Zeitpunkt P14 wiesen Rs1h^{-/-} Mäuse GFAP-gefärbte Müllerzellen in der inneren Hälfte auf, an P21 durchspannten GFAP⁺-Müllerzellen sogar die gesamte Rs1h^{-/-} Netzhaut. Die durchgeführten real time RT-PCR Analysen an Rs1h-defizienten Mäusen ergaben im Vergleich zu Wildtyp Mäusen steigende Expressionswerte von Gfap ab dem postnatalen Tag 14. Die histologischen und transkriptionellen Untersuchungen lassen somit eine Müllerzell-reaktive Gliose in Folge des Netzhautschadens vermuten. Diese konsistente Hochregulation von Gfap wird zudem von anderen Modellen für retinalen Schaden, wie Glaukom (Ahmed et al., 2004, Steele et al., 2006) und diabetischer Retinopathie (Gerhardinger et al., 2005), gestützt.

6.3 Degeneration der Photorezeptoren im Rs1h-Mausmodell

Arbeiten von Gehrig et al. belegten schon früher, dass die Degeneration von Photorezeptoren in der Netzhaut Rs1h-defizienter Mäuse eine Folge apoptotischer Prozesse ist, die um den postnatalen Tag P14 einsetzen (Gehrig et al., 2006, Gehrig et al., 2007). Morphologisch äußert sich dies in einer progressiven Reduktion der ONL-Dicke im Laufe der Zeit (Kjellstrom et al., 2007, Weber et al., 2002). Um den postnatalen Tag 18 kommt es im Rs1h^{-/-}-Mausmodell zu einer Welle apoptotischen Zelltods von Photorezeptoren (Weber et al., 2002). Dieser Prozess ist assoziiert mit einer erhöhten Expression des FADD Adapters und der auslösenden Caspase 8, und legt daher einen extrinsischen Apoptoseweg im Zuge der Retinoschisin-Defizienz nahe. Zudem lassen Untersuchungen von Gehrig et al. mit einer starken Expression der Caspasen 1, 11 und 12 eine inflammatorische Komponente in der Ätiologie der Retinoschisis vermuten (Gehrig et al., 2006).

Um die apoptotische Degeneration der Photorezeptoren zu erhärten, wurde die mRNA Expression der Initiatorcaspase Caspase 8 sowie des „Tod-Rezeptors“ Cd95 mittels real time RT-PCR in Wildtyp und Rs1h-defizienten Netzhäuten untersucht. Beide Transkripte wurden ab P18 signifikant hochreguliert, dem Zeitpunkt der bereits in früheren Arbeiten mit dem Höhepunkt der Apoptose im Rs1h^{-Y}-Mausmodell in Verbindung gebracht werden konnte (Gehrig et al., 2006). Die Bindung des Adapterproteins FADD an Cd95 ermöglicht die Rekrutierung von Procaspase 8 an den Multiproteinkomplex DISC. Aktivierte Caspase 8 spaltet sich daraufhin und aktiviert damit die nachgeschalteten Caspasen 3 und 7 (Kischkel et al., 1995, Krammer, 2000)

Veränderungen der b-Welle im Rs1h-defizienten Mausmodell legen eine fehlerhafte synaptische Signalweiterleitung nahe (Takada et al., 2008). In allen Wildtyp Stadien waren in der OPL PNA-gefärbte Bipolarsynapsen mit PSD95⁺ präsynaptischen Zapfenenden assoziiert. Rs1h^{-Y} Netzhäute zeigten zum Zeitpunkt P14 eine vergleichbare Kolokalisation präsynaptischer Photorezeptorenden mit Bipolarfortsätzen, was für normale Kontakte zwischen prä- und postsynaptischen Zelltypen spricht. Die äußere plexiforme Schicht (OPL) von P21 Rs1h^{-Y} Mäusen wiesen hingegen eine irreguläre Morphologie auf und PSD95⁺ Photorezeptorenden erstreckten sich in die äußere Körnerschicht (ONL). Diese morphologischen Auffälligkeiten legen nahe, dass eine gestörte OPL und displatzierte synaptische Strukturen erst nach Bildung einer gesunden Zellformation und Synaptogenese in der OPL auftreten. Zudem scheint Retinoschisin für den Erhalt synaptischer Strukturen in der OPL in späteren Entwicklungsstadien benötigt zu werden. Folglich kann die Veränderung der b-Welle im Rs1h-defizienten Mausmodell möglicherweise auf Störungen der synaptischen Struktur zurückgeführt werden. Darüber hinaus lassen sich damit auch die Unterschiede zu anderen Modellen der Photorezeptordegeneration, wie Rhodopsin P23H und RCS Ratten, die einen größeren Verlust der a- als der b-Welle im ERG aufweisen, erklären. Diese Modelle zeigen zwar synaptische Alterationen, allerdings erst nach extensiver Photorezeptordegeneration (Aleman et al., 2001, Bush et al., 1995).

Die Ergebnisse der histologischen und transkriptionellen Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse früherer Arbeiten am Rs1h^{-Y}-Mausmodell (Gehrig et al., 2007) und untermauern zudem die Ansicht, dass der Degeneration der Photorezeptoren eine Aktivierung der Mikroglia zeitlich vorausgeht.

6.4 Verminderter DHA-Gehalt in der Netzhaut von Rs1h^{-Y} Mäusen

Neben Genersatztherapien und systemischer Immuntherapie wurden auch Ansätze entwickelt, die auf einer Wiederherstellung der biochemischen und zellulären Homöostase durch Neuroprotektion der geschädigten Netzhaut beruhen. Hierfür wurden insbesondere neurotrophe Faktoren (Joly et al., 2008, Sieving et al., 2006), Kalziumkanalblocker (Frasson et al., 1999) und antioxidante Vitamine (Li et al., 1998) als Therapeutika retinaler Degeneration getestet.

Im Rahmen der selbst durchgeführten Fütterungsstudie konnte ein verminderter DHA-Gehalt in der degenerierenden Netzhaut Rs1h^{-Y}-defizienter Mäuse festgestellt werden. Dieser Befund wird von früheren Arbeiten an hereditärer retinaler Degeneration mit Rhodopsin-mutanten Ratten (Anderson et al., 2002), schwedischen Briardhunden (Anderson et al., 1997) sowie Patienten mit Retinitis Pigmentosa (Schaefer et al., 1995) gestützt. Daher wurde im Zuge dieser Arbeit eine Nahrungsmittelergänzung mit ω 3-PUFA DHA als eine therapeutische Option untersucht. Dabei konnten günstige Auswirkungen einer diätischen DHA-Supplementation auf den Krankheitsphänotyp und die Mikrogliaaktivierung während der frühen retinalen Degeneration gezeigt werden. Ein nahrungsmittelbedingter Mangel an ω 3-PUFAs während der Schwangerschaft konnte mit eingeschränkter Sehschärfe in Rhesusaffen (Neuringer et al., 1986) und Kleinkindern (Innis and Friesen, 2008) in Verbindung gebracht werden. Diese Befunde sprechen dafür, dass DHA sowohl für die frühe embryonale Entwicklung, als auch für die adulte retinale Homöostase eine wichtige Rolle spielt. Durch die moderate DHA-Supplementation von Rs1h^{-/-} Muttertieren konnte zum einen das retinale DHA-Defizit in Rs1h^{-Y} Nachkommen aufgehoben und zum anderen die retinale Neurodegeneration verzögert werden. Interessanterweise konnte eine Kompensation der retinalen DHA-Defizienz oder Modifikation des Krankheitsverlaufs in adulten Hunden mit progressiver Stäbchen-Zapfen-Dystrophie durch Supplementation mit Fischöl nicht erreicht werden (Aguirre et al., 1997). In einer anderen Studie wird zwar von einer Erhöhung der DHA-Spiegel in den Außensegmenten von Stäbchen nach einer Nahrungsmittelergänzung von transgenen Ratten mit Retinitis Pigmentosa Phänotyp berichtet, ein Fortbestehen der degenerierenden Photorezeptoren konnte dabei allerdings nicht erzielt werden (Martin et al., 2004). Im Gegensatz zu unserem Versuchsaufbau, im Zuge dessen Muttertiere bis zur Verpaarung einer vierwöchigen Vorfütterung unterzogen wurden, begannen die Autoren dieser Studie erst im dritten Trimester der fötalen Entwicklung mit der Supplementation. Zudem legen diese Befunde nahe, dass einige Phänotypen retinaler Degeneration durch DHA-Ergänzung beeinflusst werden und andere nicht. Unterstützt wird diese Hypothese

auch dadurch, dass DHA mit dem Schutz gegen N-methyl-N-nitroso-urea-induzierte Photorezeptorapoptose in der Netzhaut adulter Ratten in Verbindung gebracht werden konnte (Moriguchi et al., 2003).

6.4.1 Aktivierung retinaler Mikroglia und Lipidmetabolismus

Mikroglia in der degenerierenden Netzhaut von Rs1h^{-/-} Mäusen wiesen eine aktivierte Morphologie mit aufgeblähten Zellkörpern und kurzen Ausläufern auf. Nach Zellisolierung und Kultivierung behielten diese ihren morphologischen Phänotyp bei und eine Nilrotfärbung machte große intrazytoplasmatische Lipidtröpfchen sichtbar. *In situ* whole mount-Präparate von Netzhäuten machten die Überführung dieser amöboiden Mikroglia in ramifizierte Zellen in Folge der DHA-Ergänzung deutlich. Obwohl die direkte Wirkung von DHA auf die Bildung von Lipidkörperchen nicht untersucht wurde, sprechen die *in vitro* Kulturen von BV2 Zellen für einen suppressiven Effekt von DHA auf die Formation von Lipidtröpfchen in der Netzhaut. Lipidkörperchen sind typischerweise in aktivierten Neutrophilen und Makrophagen nach Infektion und unter *in vitro* Bedingungen einer LPS-Stimulation zu finden (Pacheco et al., 2002), wurden aber bislang nicht in aktivierten Mikroglia von neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben. Eine erhöhte Expression von Adipophilin und die Lokalisation von Eicosanoid-synthetisierenden Enzymen wie Ptgs2 und Ltc4s in Lipidtröpfchen stehen mit der Bildung von Prostaglandinen und Leukotrienen in Verbindung (D'Avila et al., 2006). Aufgrund der geringen Menge retinaler Mikroglia war eine Analyse der Protein-Spiegel und Enzymaktivitäten nicht möglich. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass aktivierte Rs1h^{-/-} Mikroglia, die diese Transkripte ebenfalls hochregulieren, zur Bildung pro-inflammatorischer Lipidmediatoren führen können.

Neben den verminderten DHA-Spiegeln konnten auch erhöhte Konzentrationen an Arachidonsäure (AA) in Rs1h^{-/-} Netzhäuten identifiziert werden. AA stellt ein Substrat für Ptgs2 dar und kontrolliert somit die Schlüsselstellung während der Prostaglandinsynthese. Da eine Nahrungsmittelergänzung mit ω 3-PUFA die Bildung von Lipidtröpfchen unterbunden hat, kann eine Aktivierung der Mikroglia in Folge der unausgeglichene ω 6/ ω 3-Bilanz vermutet werden. Diese Ansicht wird zudem durch die *in situ* Analysen DHA-supplementierter Netzhäute unterstützt, in denen die meisten Mikroglia den ramifizierten, inaktivierten Phänotyp bewahrten.

6.4.2 DHA-Supplementierung als Therapiemöglichkeit bei Rs1h-defizienten Mäusen

Omega-3-Fettsäuren wie DHA führen über die Modulation des Eicosanoidspektrums einerseits und direkt über die Beeinflussung bestimmter intrazellulärer Signaltransduktionswege andererseits zu einer veränderten Synthese inflammatorischer und immunregulatorischer Zytokine. Verschiedene tierexperimentelle Studien, sowie diverse Untersuchungen an gesunden Menschen basierten bereits auf einer bestimmten Nahrungsmittelergänzung. Im Gegensatz zu einer Ernährung mit ω 6-Fettsäuren, führte eine Supplementierung der Nahrung mit ω 3-Fettsäuren dabei zu einer verminderten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Il-1 β , Tnf α und Il-6 (Endres et al., 1989, Hayashi et al., 1998, Kelley et al., 1999). Die aus AA gebildeten Eicosanoide PGE₂ und LTB₄ gelten dabei als wichtige Regulatoren dieser Zytokinsynthese (Calder, 1997). Des Weiteren führt der Einbau von ω 3-Fettsäuren durch Aktivierungsminderung von Proteinkinase C-Isoformen und die herabgesetzte Ceramid-Produktion zu einer reduzierten Aktivierung von NF κ B, was wiederum in einer verminderten Expression zytokinspezifischer Transkripte resultiert (Jolly et al., 1997, Tappia et al., 1995).

Obwohl die Funktionen von ω 3-PUFAs während Neuroprotektion und Entzündung Gegenstand vieler Untersuchungen waren (Bazan, 2007), konnte eine direkte Verbindung zwischen ω 6/ ω 3-Gehalt, Mikrogliaaktivierung und Neurodegeneration bislang nicht hergestellt werden. DHA schützt RPE Zellen vor oxidativem Stress (Mukherjee et al., 2007) und übt anti-inflammatorische Effekte auf periphere Blutleukozyten aus (Vedin et al., 2008). Verminderte DHA-Spiegel sind nicht auf retinale Degenerationen begrenzt und könnten somit auch an neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer maßgeblich beteiligt sein. Eine Kompensation der DHA-Defizienz mit Hilfe einer Nahrungsmittelergänzung wirkt der Amyloid- β Produktion entgegen und verbessert somit den Alzheimer-Phänotyp in Mäusen, dem wahrscheinlich eine Umwandlung zu Neuroprotectin D1 zugrunde liegt (Lukiw et al., 2005). Im Gehirn von Parkinson-Patienten scheinen mehrfach ungesättigte Fettsäuren ebenfalls entscheidende Regulatoren der Mikrogliaaktivierung zu sein. α -Synuclein reguliert beispielsweise den AA-Metabolismus im Gehirn und beeinflusst somit die Eicosanoidbiosynthese von Mikroglia (Golovko et al., 2009). Diese publizierten Befunde weisen klar auf eine Regulation neuronaler Homöostase und Mikrogliaaktivierung durch neuronale ω 6/ ω 3-PUFA-Spiegel sowohl im Gehirn als auch in der Netzhaut hin.

Um das retinale DHA-Defizit von Rs1h^{-/-} Mäusen zu kompensieren, wurde Rs1h^{-/-} Muttertieren in dieser Arbeit eine moderate DHA-Ergänzung mit 2% DHA zugeführt. Da natürliche DHA-Quellen wie Fischöl nur begrenzt verfügbar sind, stellen pflanzliche ω 3-PUFAs einen adäquaten Ersatz dar. In Leinsamen natürlich vorkommende α -Linolensäure

(ALA, 18:3n3) ist die Fettsäurevorstufe der Eicosapentaensäure (EPA, 20:5n3) und DHA (22:6n3). Sowohl im Gehirn von Leinöl-supplementierten Ratten (Barcelo-Coblijn et al., 2005) als auch in Erythrozyten von Menschen, die Leinölkapseln eingenommen hatten (Barcelo-Coblijn et al., 2008), konnte die Umwandlung und Akkumulation von ALA aus der Nahrung bereits nachgewiesen werden. Basierend auf diesen Befunden wäre eine Erhöhung der DHA-Spiegel in der Netzhaut von Mensch und Tier durch Supplementierung mit ALA ebenfalls denkbar.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der durchgeführten Fütterungsstudie abermals eine Aktivierung retinaler Mikroglia vor Einsetzen der Photorezeptordegeneration im Rs1h^{-Y}-Mausmodell beobachtet werden. Zudem war ein direktes Einwirken von DHA auf die Aktivierung retinaler Mikroglia feststellbar. Eine frühe Nahrungsmittelergänzung mit DHA könnte somit die retinale Integrität durch Erhalt der lokalen Immunhomöostase begünstigen und stellt damit eine alternative Therapiemöglichkeit zur Behandlung dieser retinalen Dystrophie dar.

6.5 Blaublicht-induzierte Photorezeptordegeneration

Mikroglia können eine Vielzahl schädlicher Substanzen über Oberflächenrezeptoren wahrnehmen, was zu Migration und Phagozytoseaktivität sowie Sekretion von Entzündungsmediatoren (Zytokine, Chemokine) und reaktiven Sauerstoffspezies zur Folge hat und zu Neurotoxizität führt (Block et al., 2007). Ähnliche Mechanismen sind auch in der Netzhaut denkbar. Es ist bekannt, dass Apoptose und Sekretion inflammatorischer Lipidmediatoren und reaktiver Sauerstoffspezies bei retinalem Lichtschaden vorkommen und daher als initiale Signale für die Aktivierung von Mikroglia in Frage kommen (Jung and Reme, 1994, Reme et al., 1998, Wenzel et al., 2005).

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden transgene MacGreen Mäuse mit Blaublicht bestrahlt, um die Degeneration von Photorezeptoren auszulösen. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion des Lichtschadens wurden die Netzhäute histologisch untersucht und mit Hilfe von DNA-Mikroarrays einer transkriptionellen Analyse unterzogen. Mit einer anschließenden real time RT-PCR wurde das Expressionsverhalten ausgewählter signifikant regulierter Gene validiert.

6.5.1 Aktivierung und Migration der Mikroglia in Blaublicht-induzierten Läsionen

Die durchgeführten histologischen Experimente zeigen deutlich eine Aktivierung und Migration der Mikroglia zum Zentrum der Blaublicht-induzierten Läsion in der Netzhaut. Während die ONL der gesunden Netzhaut frei von Mikroglia ist (Santos et al., 2008),

konnten diverse Studien nach Schädigung der Netzhaut durch Licht eine Kolonisierung von Mikroglia in die ONL nachweisen (Harada et al., 2002, Ng and Streilein, 2001, Zhang et al., 2005b). In der Netzhaut Blaulicht-bestrahlter Mäuse werden residente Mikroglia bei der Beseitigung degenerierter Photorezeptoren von eingewanderten Mikroglia aus dem Knochenmark unterstützt. Die Transplantation von EGFP⁺ Knochenmark in Wildtyp Mäuse zeigte eine deutliche Migration von Mikroglia-Vorläufern aus dem Blut direkt zum Zentrum der Blaulicht-induzierten Läsionen in der Netzhaut (Joly et al., 2009). Santos et al. analysierten die Mikrogliaantwort auf weißes Licht zu unterschiedlichen Zeitpunkten (3 h - 10 d) nach der Bestrahlung. Dabei waren vor allem eine starke Migration der Mikroglia zu den Regionen der Licht-induzierten Degeneration, sowie morphologische Veränderungen hin zum amöboiden Phänotyp aktivierter Mikroglia feststellbar. Die Zunahme der Mikroglia in der ONL der Licht-geschädigten Netzhaut wird dabei ebenfalls auf die vitreale Einwanderung mikroglialer Vorläufer als Reaktion auf lokale Proliferation residenter Mikroglia zurückgeführt (Santos et al., 2010).

6.5.2 Transkriptioneller Phänotyp retinaler Mikroglia nach Bestrahlung mit Blaulicht

Die Analyse der DNA-Mikroarray-Daten legte die Induktion eines Genclusters offen, das in erster Linie mit der Inflammation in Verbindung stehen. Der Großteil der identifizierten Gene wurde 12 bzw. 24 Stunden nach induziertem Lichtschaden signifikant hochreguliert, während morphologische Veränderungen und Migration der Mikroglia erst nach 72 Stunden am deutlichsten waren. 102 signifikant regulierte Transkripte konnten zum Erhalt der retinalen Homöostase sowie funktionellen Gruppen, wie Zellkommunikation, Vesikeltransport, Apoptose, Proliferation, Regeneration und Migration, zugeordnet werden. Des Weiteren wurden elf bislang unbekannte Gene identifiziert. Durch real time RT-PCR konnten die Ergebnisse der Mikroarray-Daten reproduziert werden.

Der Großteil der signifikant regulierten Gene war funktionell der Immunantwort zuzuordnen. Die Analyse der Mikroarray-Daten lieferte neben klassisch aktivierten Transkripten von Mikroglia (Ccl2, Chi3l) auch einige Interferon-assoziierte Gene (Ifit1, Ifit3, Ifitm1, Igtp und Irf7). Li et al. identifizierten Makrophagen nach induziertem Lichtschaden im subretinalen Raum und postulieren in diesem Zusammenhang eine *chemokine (C-C motif) ligand 2* (Ccl2) induzierte Rekrutierung choroidaler Mikroglia, die unterstützend bei der Beseitigung retinaler Zelltrümmern wirken (Li et al., 1991). Zudem spielt Ccl2 eine wichtige Rolle bei der Beseitigung retinaler Zelltrümmer auch in chronischen Situationen. So zeigen alte Mäuse, denen Ccl2 oder dessen Rezeptor fehlt, eine verdickte Bruch'sche Membran und Anzeichen retinaler Degeneration (Ambati et al., 2003). Makrophagen sezernieren unter anderem das Glykoprotein *Chitinase-3-like 1*

(Chi3l), das mitogen aktiv ist und zudem einen Migrationsfaktor für vaskuläre Endothelzellen darstellt (De Ceuninck et al., 2001). Darüber hinaus ist Chi3l in der Netzhaut und dem RPE-Choroid-Komplex lokalisiert und in exzidierten choroidalen neovaskulären Membranen von AMD-Patienten zu finden. Rakic et al. berichten zudem von einer Hochregulation in Laser-induzierten choroidalen, neovaskulären Membranen von Mäusen und einer Herunterregulation in der Netzhaut Ötradiol-bahandelter Mäuse (Rakic et al., 2003). Die Hochregulation nach Blaulicht-induziertem Netzhautschaden lässt vermuten, dass Chi3l eine wichtige Funktion bei der „Wundheilung“ nach Licht-oxidativem Stress oder Netzhautschaden einnimmt. Von T- und NK-Zellen produziertes Interferon hat Einfluss auf Makrophagen. Die Hochregulation der IFN γ -assoziierten Transkripte *interferon induced transmembrane protein 1* (Ifitm1), *interferon γ induced GTPase* (Igtg), *interferon regulatory factor 7* (Ifi7) und *interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1* bzw. 3 (Ifit1 und Ifit3) legen einen erhöhten Gehalt an Interferonen nach Licht-induzierter Netzhautschädigung nahe. Die Arbeiten von Chéret et al. belegen, dass Mikroglia neben Nox2 auch Nox1 exprimieren, das die intrazelluläre und intraphagosomale Produktion von O $_2^-$ katalysiert (Cheret et al., 2008). Zudem postulieren die Autoren, dass Nox1 und Nox2 die Produktion von pro-inflammatorischen und potentiell zytotoxischen Verbindungen auf unterschiedliche Art und Weise fördern. Die Aktivierung von Nox1 unterstützt dabei Immunabwehr und neuroregressive Ereignisse während der Neurogenese bzw. bei neuronalem Gewebeschaden – Prozesse, die bei neurodegenerativen und inflammatorischen Störungen in Erscheinung treten. Auch wenn die durchgeführten real time RT-PCR Analysen keine signifikante Expression von Nox1 und seiner regulatorischen Untereinheiten ergab, ist zumindest auch nach induziertem Lichtschaden von einer gewissen „Koinduktion“ der beiden NADPH Oxdasen Nox1 und Nox2 auszugehen (Cheret et al., 2008).

6.5.3 Induktion von oxidativen Stress-assoziierten Transkripten nach Blaulichtschaden

Ein Teil der hochregulierten Transkripte, wie *endothelin 2* (Edn2), *lipocalin 2* (Lcn2), *oncostatin M receptor* (Osmr), *serine peptidase inhibitor clade a member 3n* (Serpina3n) und *suppressor of cytokine signaling 3* (Socs3), stellen laut Literatur Gene der Stressantwort dar (Rattner and Nathans, 2005, Swiderski et al., 2007). Edn2 wird von Photorezeptoren exprimiert und spielt als potenter Regulator der Gefäßverengung eine wichtige Rolle bei Licht-induzierter Degeneration (Rattner and Nathans, 2005). Rattner et al. konnten nach retinalem Schaden Osmr in apikalen Mikrovilli des RPE lokalisieren und ziehen dessen Rezeptorliganden, der von der Netzhaut selbst oder von infiltrierenden Mikroglia stammt, als Mitglied der Osm/Lif/IL-6 Zytokinfamilie in Betracht (Rattner and

Nathans, 2005, Swiderski et al., 2007). In vielen Erkrankungen sind Lcn2 und Serpina3n als Akutphaseproteine mit Entzündungsreaktionen assoziiert (Reid and Sallenave, 2001, Tong et al., 2005). Serpina3n ist ein sezernierter Proteaseinhibitor, dem kürzlich eine inhibierende Wirkung auf *immune system protease granzyme B* nachgewiesen werden konnte und somit zum Erhalt des lokalen Immunstatus beiträgt (Sipione et al., 2006). Socs3 ist an der negativen Regulation von Zytokinen beteiligt, die den JAK/STAT Signalweg verwenden und bei zellulären Funktionen wie der Immunantwort involviert sind (Cooney, 2002).

Oxidativer Stress steht in Verbindung mit der Pathogenese von Lichtschaden und für viele Gene, wie *heme oxygenase 1* (Hmox1) (Kutty et al., 1995) und *metallothionein 1* und *2* (Mt1 und Mt2) (Chen et al., 2004), konnte eine Hochregulation nach induziertem Lichtschaden bereits gezeigt werden. Die durchgeführten Mikroarrays zeigten ebenfalls eine Hochregulation von Hmox1, Mt1 und Mt2 nach Blaulicht-induziertem Netzhautschaden. Das Antioxidant Metallothionein ist ein kleines Reparatur- und Zink-Bindungsprotein, das Superoxid- und Hydroxylradikale abfangen kann (Chiaverini and De Ley, 2010). Die Überexpression von Mt1 in humanen RPE Kulturen schützt die Netzhaut vor toxischem Gehalt an Cadmium, Häm- und Eisen-induzierter Oxidation und UV-Licht-induzierter Apoptose (Lu et al., 2002).

Der Signalaustausch von Photorezeptoren und Mikroglia beinhaltet neben „Tod-Signalen“ von Photorezeptoren oder aktivierten Mikroglia auch bestimmte Rettungsmechanismen. Aktivierte Mikroglia der Netzhaut exprimieren beispielsweise neurotrophe Faktoren, die Müllerzellen ein Signal zur Sekretion von *fibroblast growth factor 2* (Fgf2) und *glial cell line-derived neurotrophic factor* vermitteln, und somit einen Rettungsmechanismus in Licht-induzierter Netzhautdegeneration darstellen (Harada et al., 2002). Samardzija et al. konnten im Weißlicht-induzierten Lichtschadenmodell hohe Expressionswerte von *leukemia inhibitory factor* (Lif) in der Netzhaut feststellen (Samardzija et al., 2006). Eine Folgestudie konnte zudem Lif als zentrales Molekül der retinalen Stressantwort identifizieren (Joly et al., 2008). Lif wird von Müllerzellen produziert und trägt zum Fortbestand der Photorezeptoren bei. Ohne Lif wird am Ende der endogenen JAK/STAT und Edn2 Signalkaskade kein *fibroblast growth factor 2* (Fgf2) produziert was zur schnelleren Degeneration von Photorezeptoren nach induziertem Lichtschaden führt (Burgi et al., 2009).

6.6 Phänotypische Charakterisierung CSPG-DS-stimulierter BV2 Mikroglia

6.6.1 Transkriptionelle Charakterisierung CSPG-DS-aktivierter Mikroglia

Mit einer genomweiten Expressionsanalyse wurde der Effekt von CSPG-DS auf BV2 Zellen und primäre Mikroglia charakterisiert und deren Einfluss auf kultivierte Photorezeptoren mit Hilfe funktioneller Analysen untersucht.

Der Vergleich von unstimulierten zu CSPG-DS-behandelten Zellen offenbarte dabei 29 hoch- und 25- herunterregulierte Transkripte. CSPG-DS-induzierten Gene waren vor allem den funktionellen Gruppen Phagozytose, Detoxifikation, Migration, Immunantwort und Antigenpräsentation zuzuordnen. Ein sorgfältiger Vergleich der gewonnen Genexpressionsdaten zu Profilen aus genomischen Datenbanken und der Literatur offenbarte dabei Parallelen mit dem transkriptionellen Phänotyp alternativ aktivierter Gewebemakrophagen (M2 Typ) (Mantovani et al., 2002) bzw. nur geringfügige Übereinstimmungen mit klassisch aktivierten Mikroglia (M1 Typ) (Thomas et al., 2006).

Ein Teil des hochregulierten Genclusters (Gas6, Clec4n und Clec7a) konnte mit trophischen, anti-inflammatorischen und strukturellen Funktionen embryonaler Phagozyten und Mikroglia in Zusammenhang gebracht werden (Grommes et al., 2008, Rae et al., 2007). Zudem beinhaltet dieses Genset einige Marker für migrierende phagozytische Mikroglia mit belegten neuroprotektiven Funktionen. *Carbonylreductase 2* (Cbr2) (Maser, 2006) und GSTm1 (Xue et al., 2005) präsentieren dabei Enzyme der Detoxifikation, während Cxcr4 (Tanabe et al., 1997), Heparanase (Takahashi et al., 2008) und *CD39/EDTP-Dase 1* (Farber et al., 2008) mit der Regulation der Zellmigration assoziiert sind. Maecker et al. identifizierten *TNFL superfamily 12/TNF-like weak inducer of apoptosis* als eine Art Gegenregulator der pro-inflammatorischen Immunantwort (Maecker et al., 2005). Auffällig war zudem die starke Expression des Kostimulators Cd28, die bislang nur auf T-Zellen und Neutrophilen nachgewiesen und mit Zellmigration in Zusammenhang gebraucht werden konnte (Venuprasad et al., 2001). Die Identifizierung eines solchen prägnanten Genclusters weist klar auf einen aktivierten Mikroglia-Phänotyp mit anti-inflammatorischen, phagozytischen Eigenschaften hin.

In der Gruppe der herunterregulierten Gene (Abb. 30: A) waren vor allem Gene des Zellzyklus und des Nukleotidmetabolismus überrepräsentiert. Zudem war die Expression der pro-inflammatorischen Gene *interferon-induced protein 44* (Ifi44), *interferon regulatory factor 7* (Irf7) und *chemokine (C-X-C motif) ligand 10* (Cxcl10) durch CSPG-DS stark vermindert (Thomas et al., 2006). Die Expression dieser Gene ist mit dem M1-Phänotyp

klassisch aktivierter Mikroglia assoziiert. Die deutliche Unterdrückung dieses Gensets untermauert das anti-inflammatorische Profil CSPG-DS-aktivierter Mikroglia.

Obwohl die Analyse der DNA-Mikroarray-Daten die Induktion eines alternativen Phänotyps aktivierter Mikroglia bereits ergab, wurden diese mit Hilfe quantitativer real time RT-PCR Analysen validiert, und die differentielle Expression aller 29 hochregulierten und der zehn am stärksten herunterregulierten Gene in BV2 Zellen bestätigt. Der Vergleich von CSPG-DS-, IFN γ - und kostimulierten (IFN γ + CSPG-DS) Mikroglia ergab vor allem die Induktion von Immunantwort-, Migration- und Detoxifikation-assoziierten Genen wie Cbr2, Gas6 und Cd28 und die Unterdrückung pro-inflammatorischer Gene wie Ifi44, Irf7 und Cxcl10. Interessanterweise zeigte eine Behandlung mit IFN γ eine gegensätzliche Expression der beschriebenen Gene. In Kostimulationsexperimenten konnte die inhibitorische Aktivität von IFN γ auf die Expression von Cbr2, Gas6 und Cd28 aufgehoben und im Fall von Irf7 und Cxcl10 zumindest gedämpft werden.

Sowohl die Analyse der Mikroarray-Daten, als auch die anschließende Validierung bestätigen, dass CSPG-DS zur Induktion eines Phagozytenphänotyps führt, der sich von dem klassisch aktivierter Mikroglia deutlich unterscheidet. Zum jetzigen Zeitpunkt ist allerdings unklar, ob CSPG-DS über einen Oberflächenrezeptor fungiert oder direkt in die Zellen eindringt, um eine anti-inflammatorische Signalkaskade zu induzieren. Einen denkbareren Mechanismus stellt die Störung der NF κ B-Aktivierung dar, welche kürzlich für Heparansulfat-Disaccharid-behandelte T-Zellen gezeigt werden konnte (Hecht et al., 2004).

6.6.2 Funktionelle Analyse CSPG-DS aktivierter Mikroglia

Nachdem ein Teil des hochregulierten Genclusters (Gas6, Clec4n und Clec7a) eine erhöhte Phagozytoseaktivität CSPG-DS-aktivierter Mikroglia vermuten ließ, wurde dies mit Hilfe eines Phagozytoseassays auf funktioneller Ebene bestätigt.

Überraschenderweise zeigten CSPG-DS-aktivierte Mikroglia verglichen mit IFN γ -stimulierten Mikroglia sogar noch höhere Phagozytoseaktivitäten. In Tiermodellen für experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (EAE) und experimentelle autoimmune Uveitis (EAU) kommt es zu Neuropathologien im ZNS. Der Einsatz von CSPG-DS milderte dabei deutlich die klinischen Symptome von EAE und verhinderte neuronale Schäden bei EAU (Rolls et al., 2006). Frühere Arbeiten von Rolls et al. identifizierten CSPG-DS zudem als potente Verbindung, die Neuronen vor Toxizität schützt (Rolls et al., 2004). Rolls et al. führen die Effekte von CSPG-DS vor allem auf die Induktion eines aktiven Mikroglia-Phänotyps mit anti-inflammatorischen Eigenschaften zurück. Die beschriebenen Befunde zusammen und das identifizierte Gencluster legen einen

Zusammenhang zwischen der protektiven Eigenschaft CSPG-DS-aktivierter Mikroglia und der starken Phagozytoseaktivität nahe.

Um die Induktion eines alternativ aktivierten Phänotyps weiter zu erhärten, wurde untersucht, ob eine Stimulation mit CSPG-DS die Abgabe von NO, einem zytotoxischem Produkt klassisch aktivierter Makrophagen und Mikroglia, verursacht. CSPG-DS-behandelten BV2 Zellen und primären Mikroglia konnte keine NO-Sekretion nachgewiesen werden, während eine Stimulation mit IFN γ eine erhöhte Abgabe von NO in beiden Kulturen zur Folge hatte. Eine Kostimulation mit beiden Substanzen verminderte dabei sogar die NO-Sekretion. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Mikrogliaaktivierung durch CSPG-DS selbst keine zytotoxischen Effekte hat, darüber hinaus aber die Zytotoxizität in einer pro-inflammatorischen Umgebung zu reduzieren vermag.

Zur Verstärkung dieser Hypothese wurde ein Zellkultursystem entwickelt, im Zuge dessen 661W Photorezeptorzellen mit Mikroglia-konditioniertem Medium behandelt wurden. Inkubationen mit CSPG-DS-konditioniertem Medium zeigten weder Einfluss auf Wachstum und Viabilität von 661W Photorezeptoren, noch wurden Caspase-assoziierte Apoptosesignalwege eingeleitet. Im Gegensatz dazu verminderte die Kultivierung mit IFN γ -behandelten Mikrogliaüberständen die Proliferation von 661W Photorezeptoren. Zusätzlich war in konditionierten Überständen von IFN γ -stimulierten BV2 Zellen und primären Mikroglia eine verminderte Zellviabilität von 661W Zellen zusammen mit einer hohen Aktivität der Caspasen 3 und 7 feststellbar. Eine gemeinsame Behandlung von IFN γ -konditionierten Mikroglia und CSPG-DS verhinderte zum Einen den Zelltod von 661W Zellen und reduzierte zum Anderen die Aktivierung von Caspase 3 und 7. CSPG-DS scheint hierbei sowohl der Induktion pro-inflammatorischer Signalwege, als auch der Sekretion zytotoxischer Substanzen wie NO entgegenzuwirken.

7 Zusammenfassung

Die Degeneration von Photorezeptoren ist bei erblichen und experimentellen Netzhautdystrophien generell auf Mechanismen der Apoptose zurückzuführen. Erste Vorarbeiten am Retinoschisin-defizienten Mausmodell konnten belegen, dass eine Aktivierung retinaler Mikroglia den apoptotischen Prozessen zeitlich vorausgeht. Somit ist ein kausaler Zusammenhang zwischen Mikrogliaaktivierung und Photorezeptor-degeneration denkbar. Das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit war deshalb die genaue Charakterisierung der Mechanismen der retinalen Mikrogliaaktivierung im Mausmodell der Retinoschisin-Defizienz.

Wildtyp Mäuse zeigten nicht-aktivierte ramifizierte Mikroglia, die vor allem in den plexiformen Schichten (OPL und IPL) lokalisiert waren. In der Netzhaut von $Rs1h^{-/-}$ Mäusen kam es ab dem postnatalen Tag P14 zu einer Aktivierung der Mikroglia, die zum Einen mit morphologischen Veränderungen hin zu einer amöboiden Zellform einhergeht. Zum Anderen findet eine Verlagerung der Zellverteilung in die innere Körnerschicht (INL) statt. Diese histologischen Befunde der Aktivierung wurden durch real time RT-PCR Analysen Mikroglia-spezifischer Transkripte (*Egr1*, *Ccl2*, *Tnf α* und *iNos*) bestätigt. Die Degeneration von Photorezeptoren war morphologisch erst ab dem postnatalen Tag P18 nachweisbar. Verglichen mit Wildtyp Tieren zeigte sich als Folge der Degenerationsprozesse eine Disorganisation der Netzhaut im Bereich der Körnerschichten (ONL und INL) und der äußeren plexiformen Schicht (OPL). Real time RT-PCR Analysen ergaben dementsprechend eine erhöhte Expression der Apoptose-relevanten Transkripte *Cd95* und *Caspase 8* ab dem postnatalen Tag P18.

Mikroarray-Expressionsdaten von isolierten, retinalen Mikrogliaulturen Retinoschisin-defizienter Mäuse lieferten neben pro-inflammatorischen Markern mehrere Lipidtröpfchen-assoziierte Transkripte, die eine verstärkte Bildung von Lipidtröpfchen und eine aktive Eicosanoidsynthese widerspiegeln könnten. Eine Untersuchung des Fettsäure- und Phospholipidgehalts von $Rs1h^{-/-}$ Netzhäuten ergab dementsprechend verminderte DHA-Spiegel im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen. Im Rahmen einer diäten Interventionstudie, in der $Rs1h^{-/-}$ Muttertiere einer DHA-Supplementierung unterzogen wurden, konnte eine verminderte retinale Degeneration und abgeschwächte Mikrogliaaktivierung in Netzhäuten von jungen $Rs1h^{-/-}$ Nachkommen erreicht werden. *In vitro* Experimente belegten nachfolgend einen direkten inhibitorischen Effekt von DHA auf die pro-inflammatorische Zytokinexpression und Migration von Mikroglia. Die Mikrogliaaktivität und das Ausmaß der Photorezeptordegeneration sind also durch den DHA-Gehalt in der Netzhaut direkt beeinflussbar.

Im genetisch unabhängigen Modell der Blaulicht-induzierten Photorezeptorapoptose konnte ebenfalls eine Aktivierung von Mikroglia vor allem im Zentrum der Läsionen nachgewiesen werden. Mikroarray-Expressionsanalysen der Blaulicht-bestrahlten Netzhaut im Vergleich zur unbestrahlten Netzhaut ergaben eine differentielle Expression von 102 vorwiegend hochregulierten Genen. Die signifikant regulierten Transkripte konnten der Immunregulation, retinalen Homöostase und Zellkommunikation sowie Wachstums- und Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden. Die funktionelle Bedeutung dieser Transkriptionsprofile wird Gegenstand weiterer Forschungen der Arbeitsgruppe um PD Dr. Thomas Langmann sein.

Abschließend wurde die bioaktive Wirkung von Chondroitinsulfatproteoglykan-Disaccharid (CSPG-DS) auf stimulierte Mikroglia umfassend untersucht. Dabei konnte ein neuer, aktivierter Phänotyp mit phagozytischer Aktivität und geringem zytotoxischem Potential identifiziert werden. CSPG-DS stellt somit eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit dar, um pro-inflammatorische Mikrogliaaktivierung zu dämpfen, und somit die homöostatischen und neurotrophen Funktionen von Phagozyten im zentralen Nervensystem zu erhalten.

Literaturverzeichnis

- AGUIRRE, G. D., ACLAND, G. M., MAUDE, M. B. & ANDERSON, R. E. (1997) Diets enriched in docosahexaenoic acid fail to correct progressive rod-cone degeneration (prcd) phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38, 2387-407.
- AHMED, F., BROWN, K. M., STEPHAN, D. A., MORRISON, J. C., JOHNSON, E. C. & TOMAREV, S. I. (2004) Microarray analysis of changes in mRNA levels in the rat retina after experimental elevation of intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 1247-58.
- ALEMAN, T. S., LAVAIL, M. M., MONTEMAYOR, R., YING, G., MAGUIRE, M. M., LATIES, A. M., JACOBSON, S. G. & CIDECIYAN, A. V. (2001) Augmented rod bipolar cell function in partial receptor loss: an ERG study in P23H rhodopsin transgenic and aging normal rats. *Vision Res*, 41, 2779-97.
- ALEXANDER, K. R., FISHMAN, G. A. & GROVER, S. (2000) Temporal frequency deficits in the electroretinogram of the cone system in X-linked retinoschisis. *Vision Res*, 40, 2861-8.
- AMBASTA, R. K., KUMAR, P., GRIENDLING, K. K., SCHMIDT, H. H., BUSSE, R. & BRANDES, R. P. (2004) Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 279, 45935-41.
- AMBATI, J., ANAND, A., FERNANDEZ, S., SAKURAI, E., LYNN, B. C., KUZIEL, W. A., ROLLINS, B. J. & AMBATI, B. K. (2003) An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med*, 9, 1390-7.
- ANDERSON, R. E., MAUDE, M. B., MCCLELLAN, M., MATTHES, M. T., YASUMURA, D. & LAVAIL, M. M. (2002) Low docosahexaenoic acid levels in rod outer segments of rats with P23H and S334ter rhodopsin mutations. *Mol Vis*, 8, 351-8.
- ANDERSON, R. E., MAUDE, M. B., NARFSTROM, K. & NILSSON, S. E. (1997) Lipids of plasma, retina, and retinal pigment epithelium in Swedish briard dogs with a slowly progressive retinal dystrophy. *Exp Eye Res*, 64, 181-7.
- ANDERSON, R. E., O'BRIEN, P. J., WIEGAND, R. D., KOUTZ, C. A. & STINSON, A. M. (1992) Conservation of docosahexaenoic acid in the retina. *Adv Exp Med Biol*, 318, 285-94.
- BABIOR, B. M. (2002) The leukocyte NADPH oxidase. *Isr Med Assoc J*, 4, 1023-4.
- BAE, J. H., JANG, B. C., SUH, S. I., HA, E., BAIK, H. H., KIM, S. S., LEE, M. Y. & SHIN, D. H. (2006) Manganese induces inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression via activation of both MAP kinase and PI3K/Akt pathways in BV2 microglial cells. *Neurosci Lett*, 398, 151-4.
- BAKALASH, S., ROLLS, A., LIDER, O. & SCHWARTZ, M. (2007) Chondroitin Sulfate-Derived Disaccharide Protects Retinal Cells from Elevated Intraocular Pressure in Aged and Immunocompromised Rats. *Investigative Ophthalmology*, 48.
- BANFI, B., CLARK, R. A., STEGER, K. & KRAUSE, K. H. (2003) Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem*, 278, 3510-3.
- BARCELO-COBLIJN, G., COLLISON, L. W., JOLLY, C. A. & MURPHY, E. J. (2005) Dietary alpha-linolenic acid increases brain but not heart and liver docosahexaenoic acid levels. *Lipids*, 40, 787-98.
- BARCELO-COBLIJN, G., MURPHY, E. J., OTHMAN, R., MOGHADASIAN, M. H., KASHOUR, T. & FRIEL, J. K. (2008) Flaxseed oil and fish-oil capsule consumption

- alters human red blood cell n-3 fatty acid composition: a multiple-dosing trial comparing 2 sources of n-3 fatty acid. *Am J Clin Nutr*, 88, 801-9.
- BARRON, K. D. (1995) The microglial cell. A historical review. *J Neurol Sci*, 134 Suppl, 57-68.
- BAZAN, N. G. (2007) Omega-3 fatty acids, pro-inflammatory signaling and neuroprotection. 136-141.
- BAZAN, N. G., GORDON, W. C. & RODRIGUEZ DE TURCO, E. B. (1992) Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process. *Adv Exp Med Biol*, 318, 295-306.
- BESSIS, A., BECHADE, C., BERNARD, D. & ROUMIER, A. (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*, 55, 233-8.
- BINDA, O., NASSIF, C. & BRANTON, P. E. (2008) SIRT1 negatively regulates HDAC1-dependent transcriptional repression by the RBP1 family of proteins. *Oncogene*, 27, 3384-92.
- BLASI, E., BARLUZZI, R., BOCCHINI, V., MAZZOLLA, R. & BISTONI, F. (1990) Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol*, 27, 229-37.
- BLOCK, M. L., ZECCA, L. & HONG, J. S. (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci*, 8, 57-69.
- BOATRRIGHT, K. M. & SALVESEN, G. S. (2003) Caspase activation. *Biochem Soc Symp*, 233-42.
- BODEUTSCH, N. & THANOS, S. (2000) Migration of phagocytotic cells and development of the murine intraretinal microglial network: an in vivo study using fluorescent dyes. *Glia*, 32, 91-101.
- BOZZA, P. T., MELO, R. C. & BANDEIRA-MELO, C. (2007) Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther*, 113, 30-49.
- BURGI, S., SAMARDZIJA, M. & GRIMM, C. (2009) Endogenous leukemia inhibitory factor protects photoreceptor cells against light-induced degeneration. *Mol Vis*, 15, 1631-7.
- BUSH, R. A., HAWKS, K. W. & SIEVING, P. A. (1995) Preservation of inner retinal responses in the aged Royal College of Surgeons rat. Evidence against glutamate excitotoxicity in photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36, 2054-62.
- CALDER, P. C. (1997) n-3 polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease. *Ann Nutr Metab*, 41, 203-34.
- CALDER, P. C. (1998) Dietary fatty acids and the immune system. *Nutr Rev*, 56, S70-83.
- CALDER, P. C. (2009) Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*, 91, 791-795.
- CARDONA, A. E., PIORO, E. P., SASSE, M. E., KOSTENKO, V., CARDONA, S. M., DIJKSTRA, I. M., HUANG, D., KIDD, G., DOMBROWSKI, S., DUTTA, R., LEE, J. C., COOK, D. N., JUNG, S., LIRA, S. A., LITTMAN, D. R. & RANSOHOFF, R. M. (2006) Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci*, 9, 917-24.
- CARWILE, M. E., CULBERT, R. B., STURDIVANT, R. L. & KRAFT, T. W. (1998) Rod outer segment maintenance is enhanced in the presence of bFGF, CNTF and GDNF. *Exp Eye Res*, 66, 791-805.

- CHANG, B., HAWES, N. L., HURD, R. E., DAVISSON, M. T., NUSINOWITZ, S. & HECKENLIVELY, J. R. (2002) Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Research*, 42, 517-525.
- CHANG, G. Q., HAO, Y. & WONG, F. (1993) Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron*, 11, 595-605.
- CHEN, L., WU, W., DENTCHEV, T., ZENG, Y., WANG, J., TSUI, I., TOBIAS, J. W., BENNETT, J., BALDWIN, D. & DUNAIEF, J. L. (2004) Light damage induced changes in mouse retinal gene expression. *Experimental Eye Research*, 79, 239-247.
- CHEN, L., YANG, P. & KIJLSTRA, A. (2002) Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm*, 10, 27-39.
- CHERET, C., GERVAIS, A., LELLI, A., COLIN, C., AMAR, L., RAVASSARD, P., MALLET, J., CUMANO, A., KRAUSE, K. H. & MALLAT, M. (2008) Neurotoxic activation of microglia is promoted by a nox1-dependent NADPH oxidase. *J Neurosci*, 28, 12039-51.
- CHIAVERINI, N. & DE LEY, M. (2010) Protective effect of metallothionein on oxidative stress-induced DNA damage. *Free Radic Res*, 44, 605-13.
- CHILTON, F. H., PATEL, M., FONTEH, A. N., HUBBARD, W. C. & TRIGGIANI, M. (1993) Dietary n-3 fatty acid effects on neutrophil lipid composition and mediator production. Influence of duration and dosage. *J Clin Invest*, 91, 115-22.
- CLARK, R. A., VOLPP, B. D., LEIDAL, K. G. & NAUSEEF, W. M. (1990) Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *J Clin Invest*, 85, 714-21.
- COMBS, C. K., KARLO, J. C., KAO, S. C. & LANDRETH, G. E. (2001) beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci*, 21, 1179-88.
- CONNOR, K. M., SANGIOVANNI, J. P., LOFQVIST, C., ADERMAN, C. M., CHEN, J., HIGUCHI, A., HONG, S., PRAVDA, E. A., MAJCHRZAK, S., CARPER, D., HELLSTROM, A., KANG, J. X., CHEW, E. Y., SALEM, N., JR., SERHAN, C. N. & SMITH, L. E. (2007) Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med*, 13, 868-73.
- COONEY, R. N. (2002) Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock*, 17, 83-90.
- CROSET, M., BAYON, Y. & LAGARDE, M. (1992) Incorporation and turnover of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in human blood platelets in vitro. *Biochem J*, 281 (Pt 2), 309-16.
- CROW, M. T., MANI, K., NAM, Y. J. & KITSIS, R. N. (2004) The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res*, 95, 957-70.
- D'AVILA, H., MELO, R. C., PARREIRA, G. G., WERNECK-BARROSO, E., CASTRO-FARIA-NETO, H. C. & BOZZA, P. T. (2006) Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol*, 176, 3087-97.
- DANIAL, N. N. & KORSMEYER, S. J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, 116, 205-19.
- DE CEUNINCK, F., GAUFILLIER, S., BONNAUD, A., SABATINI, M., LESUR, C. & PASTOUREAU, P. (2001) YKL-40 (cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 285, 926-31.

- DE JONG, E. K., DE HAAS, A. H., BROUWER, N., VAN WEERING, H. R., HENSENS, M., BECHMANN, I., PRATLEY, P., WESSELING, E., BODDEKE, H. W. & BIBER, K. (2008) Expression of CXCL4 in microglia in vitro and in vivo and its possible signaling through CXCR3. *J Neurochem*, 105, 1726-36.
- DELYFER, M. N., LEVEILLARD, T., MOHAND-SAID, S., HICKS, D., PICAUD, S. & SAHEL, J. A. (2004) Inherited retinal degenerations: therapeutic prospects. *Biol Cell*, 96, 261-9.
- DENNIS, G., JR., SHERMAN, B. T., HOSACK, D. A., YANG, J., GAO, W., LANE, H. C. & LEMPICKI, R. A. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol*, 4, P3.
- DICK, A. D., CATER, D., ROBERTSON, M., BRODERICK, C., HUGHES, E., FORRESTER, J. V. & LIVERSIDGE, J. (2003) Control of myeloid activity during retinal inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 74, 161-166.
- DROGE, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82, 47-95.
- EBERHART, C. E. & DUBOIS, R. N. (1995) Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 109, 285-301.
- ENDRES, S. (1993) Messengers and mediators: interactions among lipids, eicosanoids, and cytokines. *Am J Clin Nutr*, 57, 798S-800S.
- ENDRES, S., GHORBANI, R., KELLEY, V. E., GEORGILIS, K., LONNEMANN, G., VAN DER MEER, J. W., CANNON, J. G., ROGERS, T. S., KLEMPNER, M. S., WEBER, P. C. & ET AL. (1989) The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med*, 320, 265-71.
- FARBER, K., MARKWORTH, S., PANNASCH, U., NOLTE, C., PRINZ, V., KRONENBERG, G., GERTZ, K., ENDRES, M., BECHMANN, I., ENJOYOJI, K., ROBSON, S. C. & KETTENMANN, H. (2008) The ectonucleotidase cd39/ENTPDase1 modulates purinergic-mediated microglial migration. *Glia*, 56, 331-41.
- FRASSON, M., SAHEL, J. A., FABRE, M., SIMONUTTI, M., DREYFUS, H. & PICAUD, S. (1999) Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse. *Nat Med*, 5, 1183-7.
- GEHRIG, A., JANSSEN, A., HORLING, F., GRIMM, C. & WEBER, B. H. (2006) The role of caspases in photoreceptor cell death of the retinoschisin-deficient mouse. *Cytogenet Genome Res*, 115, 35-44.
- GEHRIG, A., LANGMANN, T., HORLING, F., JANSSEN, A., BONIN, M., WALTER, M., POTHS, S. & WEBER, B. H. (2007) Genome-wide expression profiling of the retinoschisin-deficient retina in early postnatal mouse development. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 891-900.
- GEORGE, N. D., YATES, J. R. & MOORE, A. T. (1995) X linked retinoschisis. *Br J Ophthalmol*, 79, 697-702.
- GERHARDINGER, C., COSTA, M. B., COULOMBE, M. C., TOTH, I., HOEHN, T. & GROSU, P. (2005) Expression of acute-phase response proteins in retinal Muller cells in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 349-57.
- GHOSH, S. & KARIN, M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, 109 Suppl, S81-96.
- GOLOVKO, M. Y., BARCELO-COBLIJN, G., CASTAGNET, P. I., AUSTIN, S., COMBS, C. K. & MURPHY, E. J. (2009) The role of alpha-synuclein in brain lipid metabolism: a

- downstream impact on brain inflammatory response. *Mol Cell Biochem*, 326, 55-66.
- GRAYSON, C., REID, S. N., ELLIS, J. A., RUTHERFORD, A., SOWDEN, J. C., YATES, J. R., FARBER, D. B. & TRUMP, D. (2000) Retinoschisin, the X-linked retinoschisis protein, is a secreted photoreceptor protein, and is expressed and released by Weri-Rb1 cells. *Hum Mol Genet*, 9, 1873-9.
- GRIMM, C., WENZEL, A., HAFEZI, F., YU, S., REDMOND, T. M. & REME, C. E. (2000) Protection of Rpe65-deficient mice identifies rhodopsin as a mediator of light-induced retinal degeneration. *Nat Genet*, 25, 63-6.
- GROEGER, G., QUINEY, C. & COTTER, T. G. (2009) Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. *Antioxid Redox Signal*, 11, 2655-71.
- GROMMES, C., LEE, C. Y., WILKINSON, B. L., JIANG, Q., KOENIGSKNECHT-TALBOO, J. L., VARNUM, B. & LANDRETH, G. E. (2008) Regulation of microglial phagocytosis and inflammatory gene expression by Gas6 acting on the Axl/Mer family of tyrosine kinases. *J Neuroimmune Pharmacol*, 3, 130-40.
- HAAS, J. (1898) Über das Zusammenvorkommen von Veränderungen der Retina und Choroidea. *Arch Augenheilkd*, 37, 343-348.
- HARADA, T., HARADA, C., KOHSAKA, S., WADA, E., YOSHIDA, K., OHNO, S., MAMADA, H., TANAKA, K., PARADA, L. F. & WADA, K. (2002) Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci*, 22, 9228-36.
- HARTONG, D. T., BERSON, E. L. & DRYJA, T. P. (2006) Retinitis pigmentosa. *Lancet*, 368, 1795-809.
- HAYASHI, N., TASHIRO, T., YAMAMORI, H., TAKAGI, K., MORISHIMA, Y., OTSUBO, Y., SUGIURA, T., FURUKAWA, K., NITTA, H., NAKAJIMA, N., SUZUKI, N. & ITO, I. (1998) Effects of intravenous omega-3 and omega-6 fat emulsion on cytokine production and delayed type hypersensitivity in burned rats receiving total parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 22, 363-7.
- HECHT, I., HERSHKOVIZ, R., SHIVTIEL, S., LAPIDOT, T., COHEN, I. R., LIDER, O. & CAHALON, L. (2004) Heparin-disaccharide affects T cells: inhibition of NF-kappaB activation, cell migration, and modulation of intracellular signaling. *J Leukoc Biol*, 75, 1139-46.
- HENN, A., LUND, S., HEDTJARN, M., SCHRATTENHOLZ, A., PORZGEN, P. & LEIST, M. (2009) The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *Altex*, 26, 83-94.
- HOFFMAN, D. R., DEMAR, J. C., HEIRD, W. C., BIRCH, D. G. & ANDERSON, R. E. (2001) Impaired synthesis of DHA in patients with X-linked retinitis pigmentosa. *J Lipid Res*, 42, 1395-401.
- HUME, D. A., PERRY, V. H. & GORDON, S. (1983) Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J Cell Biol*, 97, 253-7.
- HWANG, D. (1989) Essential fatty acids and immune response. *Faseb J*, 3, 2052-61.
- INNIS, S. M. & FRIESEN, R. W. (2008) Essential n-3 fatty acids in pregnant women and early visual acuity maturation in term infants. *Am J Clin Nutr*, 87, 548-57.
- JAMES, M. J., GIBSON, R. A. & CLELAND, L. G. (2000) Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr*, 71, 343S-8S.

- JANEWAY, C. A. (2005) *Immunobiology the immune system in health and disease*, New York, Garland Science.
- JEFFREY, B. G., WEISINGER, H. S., NEURINGER, M. & MITCHELL, D. C. (2001) The role of docosahexaenoic acid in retinal function. *Lipids*, 36, 859-71.
- JIANG, X. & WANG, X. (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 73, 87-106.
- JOHNSON, B. A., IKEDA, S., PINTO, L. H. & IKEDA, A. (2006) Reduced synaptic vesicle density and aberrant synaptic localization caused by a splice site mutation in the Rs1h gene. *Vis Neurosci*, 23, 887-98.
- JOLLY, C. A., JIANG, Y. H., CHAPKIN, R. S. & MCMURRAY, D. N. (1997) Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids suppress murine lymphoproliferation, interleukin-2 secretion, and the formation of diacylglycerol and ceramide. *J Nutr*, 127, 37-43.
- JOLY, S., FRANCKE, M., ULBRICHT, E., BECK, S., SEELIGER, M., HIRRLINGER, P., HIRRLINGER, J., LANG, K. S., ZINKERNAGEL, M., ODERMATT, B., SAMARDZIJA, M., REICHENBACH, A., GRIMM, C. & REME, C. E. (2009) Cooperative phagocytes: resident microglia and bone marrow immigrants remove dead photoreceptors in retinal lesions. *Am J Pathol*, 174, 2310-23.
- JOLY, S., LANGE, C., THIERSCH, M., SAMARDZIJA, M. & GRIMM, C. (2008) Leukemia inhibitory factor extends the lifespan of injured photoreceptors in vivo. *J Neurosci*, 28, 13765-74.
- JUNG, H. & REME, C. (1994) Light-evoked arachidonic acid release in the retina: illuminance/duration dependence and the effects of quinacrine, melittin and lithium. Light-evoked arachidonic acid release. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 232, 167-75.
- JUNG, K. K., LEE, H. S., CHO, J. Y., SHIN, W. C., RHEE, M. H., KIM, T. G., KANG, J. H., KIM, S. H., HONG, S. & KANG, S. Y. (2006) Inhibitory effect of curcumin on nitric oxide production from lipopolysaccharide-activated primary microglia. *Life Sci*, 79, 2022-31.
- KAWAHARA, T., RITSICK, D., CHENG, G. & LAMBETH, J. D. (2005) Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *J Biol Chem*, 280, 31859-69.
- KELLEY, D. S., TAYLOR, P. C., NELSON, G. J., SCHMIDT, P. C., FERRETTI, A., ERICKSON, K. L., YU, R., CHANDRA, R. K. & MACKEY, B. E. (1999) Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men. *Lipids*, 34, 317-24.
- KELLNER, U., BRUMMER, S., FOERSTER, M. H. & WESSING, A. (1990) X-linked congenital retinoschisis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 228, 432-7.
- KINSELLA, J. E., LOKESH, B., BROUGHTON, S. & WHELAN, J. (1990) Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview. *Nutrition*, 6, 24-44; discussion 59-62.
- KISCHKEL, F. C., HELLBARDT, S., BEHRMANN, I., GERMER, M., PAWLITA, M., KRAMMER, P. H. & PETER, M. E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*, 14, 5579-88.
- KJELLSTROM, S., BUSH, R. A., ZENG, Y., TAKADA, Y. & SIEVING, P. A. (2007) Retinoschisin gene therapy and natural history in the Rs1h-KO mouse: long-term rescue from retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 3837-45.
- KLEBANOFF, S. J. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*, 77, 598-625.

- KOLB, H., NELSON, R., AHNELT, P. & CUENCA, N. (2001) Cellular organization of the vertebrate retina. *Prog Brain Res*, 131, 3-26.
- KRAMMER, P. H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407, 789-95.
- KREUTZBERG, G. W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19, 312-8.
- KROEMER, G. & MARTIN, S. J. (2005) Caspase-independent cell death. *Nat Med*, 11, 725-30.
- KUIDA, K., LIPPKE, J. A., KU, G., HARDING, M. W., LIVINGSTON, D. J., SU, M. S. & FLAVELL, R. A. (1995) Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*, 267, 2000-3.
- KUTTY, R. K., KUTTY, G., WIGGERT, B., CHADER, G. J., DARROW, R. M. & ORGANISCIK, D. T. (1995) Induction of heme oxygenase 1 in the retina by intense visible light: suppression by the antioxidant dimethylthiourea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1177-81.
- LAMBETH, J. D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*, 4, 181-9.
- LANGMANN, T. (2007) Microglia activation in retinal degeneration. *J. Leukoc. Biol.*, 81, 1345-1351.
- LAVAIL, M. M., GORRIN, G. M., REPACI, M. A., THOMAS, L. A. & GINSBERG, H. M. (1987) Genetic regulation of light damage to photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 28, 1043-8.
- LEPAGE, G., LEVY, E., RONCO, N., SMITH, L., GALEANO, N. & ROY, C. C. (1989) Direct transesterification of plasma fatty acids for the diagnosis of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. *J Lipid Res*, 30, 1483-90.
- LI, T., SANDBERG, M. A., PAWLYK, B. S., ROSNER, B., HAYES, K. C., DRYJA, T. P. & BERSON, E. L. (1998) Effect of vitamin A supplementation on rhodopsin mutants threonine-17 --> methionine and proline-347 --> serine in transgenic mice and in cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11933-8.
- LI, Z. L., LAM, S. & TSO, M. O. (1991) Desferrioxamine ameliorates retinal photic injury in albino rats. *Curr Eye Res*, 10, 133-44.
- LI, Z. Y., TSO, M. O., WANG, H. M. & ORGANISCIK, D. T. (1985) Amelioration of photic injury in rat retina by ascorbic acid: a histopathologic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 26, 1589-98.
- LIEBISCH, G., LIESER, B., RATHENBERG, J., DROBNIK, W. & SCHMITZ, G. (2004) High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm. *Biochim Biophys Acta*, 1686, 108-17.
- LU, H., HUNT, D. M., GANTI, R., DAVIS, A., DUTT, K., ALAM, J. & HUNT, R. C. (2002) Metallothionein protects retinal pigment epithelial cells against apoptosis and oxidative stress. *Exp Eye Res*, 74, 83-92.
- LUKIW, W. J., CUI, J. G., MARCHESELLI, V. L., BODKER, M., BOTKJAER, A., GOTLINGER, K., SERHAN, C. N. & BAZAN, N. G. (2005) A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest*, 115, 2774-83.
- LUNA, G., KJELLSTROM, S., VERARDO, M. R., LEWIS, G. P., BYUN, J., SIEVING, P. A. & FISHER, S. K. (2009) The Effects of Transient Retinal Detachment on Cavity

- Size and Glial and Neural Remodeling in a Mouse Model of X-Linked Retinoschisis. *Investigative Ophthalmology*, 50.
- MAECKER, H., VARFOLOMEEV, E., KISCHKEL, F., LAWRENCE, D., LEBLANC, H., LEE, W., HURST, S., DANILENKO, D., LI, J., FILVAROFF, E., YANG, B., DANIEL, D. & ASHKENAZI, A. (2005) TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell*, 123, 931-44.
- MANDER, P. K., JEKABSONE, A. & BROWN, G. C. (2006) Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. *J Immunol*, 176, 1046-52.
- MANTOVANI, A., SOZZANI, S., LOCATI, M., ALLAVENA, P. & SICA, A. (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, 23, 549-55.
- MARTI, D. & CUADROS, M. A. (2008) Embryonic and Postnatal Development of Microglial Cells in the Mouse Retina. *Comparative and General Pharmacology*, 239, 224-239.
- MARTIN, R. E., RANCHON-COLE, I., BRUSH, R. S., WILLIAMSON, C. R., HOPKINS, S. A., LI, F. & ANDERSON, R. E. (2004) P23H and S334ter opsin mutations: Increasing photoreceptor outer segment n-3 fatty acid content does not affect the course of retinal degeneration. *Mol Vis*, 10, 199-207.
- MARTINON, F. & TSCHOPP, J. (2004) Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell*, 117, 561-74.
- MASER, E. (2006) Neuroprotective role for carbonyl reductase? *Biochem Biophys Res Commun*, 340, 1019-22.
- MCMAHON, A. & KEDZIERSKI, W. (2009) Polyunsaturated extremely long chain C28-C36 fatty acids and retinal physiology. *Group*.
- MILES, E. A. & CALDER, P. C. (1998) Modulation of immune function by dietary fatty acids. *Proc Nutr Soc*, 57, 277-92.
- MOLDAY, L. L., HICKS, D., SAUER, C. G., WEBER, B. H. & MOLDAY, R. S. (2001) Expression of X-linked retinoschisis protein RS1 in photoreceptor and bipolar cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 816-25.
- MOLDAY, L. L., WU, W. W. & MOLDAY, R. S. (2007) Retinoschisin (RS1), the protein encoded by the X-linked retinoschisis gene, is anchored to the surface of retinal photoreceptor and bipolar cells through its interactions with a Na/K ATPase-SARM1 complex. *J Biol Chem*, 282, 32792-801.
- MORIGUCHI, K., YURI, T., YOSHIZAWA, K., KIUCHI, K., TAKADA, H., INOUE, Y., HADA, T., MATSUMURA, M. & TSUBURA, A. (2003) Dietary docosahexaenoic acid protects against N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in rats. *77*, 167-173.
- MUKHERJEE, P. K., MARCHESELLI, V. L., BARREIRO, S., HU, J., BOK, D. & BAZAN, N. G. (2007) Neurotrophins enhance retinal pigment epithelial cell survival through neuroprotectin D1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 13152-7.
- NEURINGER, M., CONNOR, W. E., LIN, D. S., BARSTAD, L. & LUCK, S. (1986) Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 4021-5.
- NG, T. F. & STREILEIN, J. W. (2001) Light-induced migration of retinal microglia into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 3301-10.
- NIMMERJAHN, A., KIRCHHOFF, F. & HELMCHEN, F. (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308, 1314-8.

- NOELL, W. K. (1980) Possible mechanisms of photoreceptor damage by light in mammalian eyes. *Vision Res*, 20, 1163-71.
- NOELL, W. K., ORGANISCIK, D. T., ANDO, H., BRANIECKI, M. A. & DURLIN, C. (1987) Ascorbate and dietary protective mechanisms in retinal light damage of rats: electrophysiological, histological and DNA measurements. *Prog Clin Biol Res*, 247, 469-83.
- O'DRISCOLL, C., O'CONNOR, J., O'BRIEN, C. J. & COTTER, T. G. (2008) Basic fibroblast growth factor-induced protection from light damage in the mouse retina in vivo. *J Neurochem*, 105, 524-36.
- OEHMICHEN, M. (1982) Are resting and/or reactive microglia macrophages? *Immunobiology*, 161, 246-54.
- OSTERBERG, G. (1935) Topography of the layer of rods and cones in the human retina. *Acta Ophthalmol*, Suppl. 6, 1-103.
- PACHECO, P., BOZZA, F. A., GOMES, R. N., BOZZA, M., WELLER, P. F., CASTRO-FARIA-NETO, H. C. & BOZZA, P. T. (2002) Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol*, 169, 6498-506.
- PARK, K. K., HU, Y., MUHLING, J., POLLETT, M. A., DALLIMORE, E. J., TURNLEY, A. M., CUI, Q. & HARVEY, A. R. (2009) Cytokine-induced SOCS expression is inhibited by cAMP analogue: impact on regeneration in injured retina. *Mol Cell Neurosci*, 41, 313-24.
- PAWATE, S., SHEN, Q., FAN, F. & BHAT, N. R. (2004) Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferon gamma. *J Neurosci Res*, 77, 540-51.
- PAWLOSKEY, R. J., DENKINS, Y., WARD, G. & SALEM, N., JR. (1997) Retinal and brain accretion of long-chain polyunsaturated fatty acids in developing felines: the effects of corn oil-based maternal diets. *Am J Clin Nutr*, 65, 465-72.
- PERRY, V. H. & GORDON, S. (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci*, 11, 273-7.
- PIAO, C. S., KIM, J. B., HAN, P. L. & LEE, J. K. (2003) Administration of the p38 MAPK inhibitor SB203580 affords brain protection with a wide therapeutic window against focal ischemic insult. *J Neurosci Res*, 73, 537-44.
- PRITCHARD, M. T. & NAGY, L. E. (2005) Ethanol-induced liver injury: potential roles for egr-1. *Alcohol Clin Exp Res*, 29, 146S-150S.
- QUAN, Y., MOLLER, T. & WEINSTEIN, J. R. (2009) Regulation of Fc gamma receptors and immunoglobulin G-mediated phagocytosis in mouse microglia. *Neurosci Lett*, 464, 29-33.
- RAE, F., WOODS, K., SASMONO, T., CAMPANALE, N., TAYLOR, D., OVCHINNIKOV, D. A., GRIMMOND, S. M., HUME, D. A., RICARDO, S. D. & LITTLE, M. H. (2007) Characterisation and trophic functions of murine embryonic macrophages based upon the use of a Csf1r-EGFP transgene reporter. *Dev Biol*, 308, 232-46.
- RAKIC, J. M., LAMBERT, V., DEPREZ, M., FOIDART, J. M., NOEL, A. & MUNAUT, C. (2003) Estrogens reduce the expression of YKL-40 in the retina: implications for eye and joint diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 1740-6.
- RAMADOSS, P., CHIAPPINI, F., BILBAN, M. & HOLLENBERG, A. N. (2010) Regulation of hepatic six transmembrane epithelial antigen of prostate 4 (STEAP4) expression by STAT3 and C/EBPalpha. *J Biol Chem*.

- RATTNER, A. & NATHANS, J. (2005) The Genomic Response to Retinal Disease and Injury: Evidence for Endothelin Signaling from Photoreceptors to Glia. *Neurobiology of Disease*, 25, 4540-4549.
- REID, P. T. & SALLENAVE, J. M. (2001) Neutrophil-derived elastases and their inhibitors: potential role in the pathogenesis of lung disease. *Curr Opin Investig Drugs*, 2, 59-67.
- REID, S. N. M., YAMASHITA, C. & FARBER, D. B. (2003) Retinoschisin, a Photoreceptor-Secreted Protein, and Its Interaction with Bipolar and Müller Cells. *In Situ*, 23, 6030-6040.
- REME, C. E., GRIMM, C., HAFEZI, F., MARTI, A. & WENZEL, A. (1998) Apoptotic cell death in retinal degenerations. *Prog Retin Eye Res*, 17, 443-64.
- REZAIE, P. & MALE, D. (1999) Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review. *Microsc Res Tech*, 45, 359-82.
- ROESCH, M. T., EWING, C. C., GIBSON, A. E. & WEBER, B. H. (1998) The natural history of X-linked retinoschisis. *Can J Ophthalmol*, 33, 149-58.
- ROLLS, A., AVIDAN, H., CAHALON, L., SCHORI, H., BAKALASH, S., LITVAK, V., LEV, S., LIDER, O. & SCHWARTZ, M. (2004) A disaccharide derived from chondroitin sulphate proteoglycan promotes central nervous system repair in rats and mice. *The European journal of neuroscience*, 20, 1973-83.
- ROLLS, A., CAHALON, L., BAKALASH, S., AVIDAN, H., LIDER, O. & SCHWARTZ, M. (2006) A sulfated disaccharide derived from chondroitin sulfate proteoglycan protects against inflammation-associated neurodegeneration. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20, 547-9.
- ROQUE, R. S., ROSALES, A. A., JINGJING, L., AGARWAL, N. & AL-UBAIDI, M. R. (1999) Retina-derived microglial cells induce photoreceptor cell death in vitro. *Brain Research*, 110-119.
- SAMARDZIJA, M., WENZEL, A., AUFENBERG, S., THIERSCH, M., REME, C. & GRIMM, C. (2006) Differential role of Jak-STAT signaling in retinal degenerations. *Faseb J*, 20, 2411-3.
- SANTOS, A. M., CALVENTE, R., TASSI, M., CARRASCO, M. C., MARTIN-OLIVA, D., MARIN-TEVA, J. L., NAVASCUES, J. & CUADROS, M. A. (2008) Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol*, 506, 224-39.
- SANTOS, A. M., MARTIN-OLIVA, D., FERRER-MARTIN, R. M., TASSI, M., CALVENTE, R., SIERRA, A., CARRASCO, M. C., MARIN-TEVA, J. L., NAVASCUES, J. & CUADROS, M. A. (2010) Microglial response to light-induced photoreceptor degeneration in the mouse retina. *J Comp Neurol*, 518, 477-92.
- SARTHY, P. V., FU, M. & HUANG, J. (1991) Developmental expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene in the mouse retina. *Cell Mol Neurobiol*, 11, 623-37.
- SASMONO, R. T., OCEANDY, D., POLLARD, J. W., TONG, W., PAVLI, P., WAINWRIGHT, B. J., OSTROWSKI, M. C., HIMES, S. R. & HUME, D. A. (2003) A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood*, 101, 1155-63.
- SAUER, C. G., GEHRIG, A., WARNEKE-WITTSTOCK, R., MARQUARDT, A., EWING, C. C., GIBSON, A., LORENZ, B., JURKLIES, B. & WEBER, B. H. (1997) Positional

- cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. *Nat Genet*, 17, 164-70.
- SCHAEFER, E. J., ROBINS, S. J., PATTON, G. M., SANDBERG, M. A., WEIGEL-DIFRANCO, C. A., ROSNER, B. & BERSON, E. L. (1995) Red blood cell membrane phosphatidylethanolamine fatty acid content in various forms of retinitis pigmentosa. *J Lipid Res*, 36, 1427-33.
- SCHMIDTMAYER, J., JACOBSEN, C., MIKSCH, G. & SIEVERS, J. (1994) Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: membrane currents. *Glia*, 12, 259-67.
- SCHRICKER, T., GEISSER, W. & GEORGIEFF, M. (1997) [Parenteral nutrition therapy. Energy and non-energy actions of carbohydrates and fats]. *Anaesthesist*, 46, 371-84.
- SCHROEDER, A., MUELLER, O., STOCKER, S., SALOWSKY, R., LEIBER, M., GASSMANN, M., LIGHTFOOT, S., MENZEL, W., GRANZOW, M. & RAGG, T. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 7, 3.
- SCHUETZ, E. & THANOS, S. (2004) Microglia-targeted pharmacotherapy in retinal neurodegenerative diseases. *Curr Drug Targets*, 5, 619-27.
- SCHWARTZ, M. (2007) Modulating the immune system: a vaccine for glaucoma? *Can J Ophthalmol*, 42, 439-41.
- SHIN, S. Y., KIM, S. Y., KIM, J. H., MIN, D. S., KO, J., KANG, U. G., KIM, Y. S., KWON, T. K., HAN, M. Y., KIM, Y. H. & LEE, Y. H. (2001) Induction of early growth response-1 gene expression by calmodulin antagonist trifluoperazine through the activation of Elk-1 in human fibrosarcoma HT1080 cells. *J Biol Chem*, 276, 7797-805.
- SHINODA, K., OHDE, H., MASHIMA, Y., INOUE, R., ISHIDA, S., INOUE, M., KAWASHIMA, S. & OGUCHI, Y. (2001) On- and off-responses of the photopic electroretinograms in X-linked juvenile retinoschisis. *Am J Ophthalmol*, 131, 489-94.
- SIEVING, P. A., CARUSO, R. C., TAO, W., COLEMAN, H. R., THOMPSON, D. J., FULLMER, K. R. & BUSH, R. A. (2006) Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 3896-901.
- SIMOPOULOS, A. P. (1991) Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr*, 54, 438-63.
- SIPIONE, S., SIMMEN, K. C., LORD, S. J., MOTYKA, B., EWEN, C., SHOSTAK, I., RAYAT, G. R., DUFOUR, J. M., KORBUTT, G. S., RAJOTTE, R. V. & BLEACKLEY, R. C. (2006) Identification of a novel human granzyme B inhibitor secreted by cultured sertoli cells. *J Immunol*, 177, 5051-8.
- STEELE, M. R., INMAN, D. M., CALKINS, D. J., HORNER, P. J. & VETTER, M. L. (2006) Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 977-85.
- STOLL, G. & JANDER, S. (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol*, 58, 233-47.
- STREIT, W. J. (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, 40, 133-9.
- STREIT, W. J., WALTER, S. A. & PENNELL, N. A. (1999) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol*, 57, 563-81.

- SUCHNER, U. & SENFTLEBEN, U. (1994) Immune modulation by polyunsaturated fatty acids during nutritional therapy: interactions with synthesis and effects of eicosanoids. *Infusionsther Transfusionsmed*, 21, 167-82.
- SUN, M. H., PANG, J. H., CHEN, S. L., KUO, P. C., CHEN, K. J., KAO, L. Y., WU, J. Y., LIN, K. K. & TSAO, Y. P. (2007) Photoreceptor protection against light damage by AAV-mediated overexpression of heme oxygenase-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 5699-707.
- SUTER, M., REME, C., GRIMM, C., WENZEL, A., JAATTELA, M., ESSER, P., KOCIOK, N., LEIST, M. & RICHTER, C. (2000) Age-related macular degeneration. The lipofusion component N-retinyl-N-retinylidene ethanolamine detaches proapoptotic proteins from mitochondria and induces apoptosis in mammalian retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem*, 275, 39625-30.
- SWIDERSKI, R. E., NISHIMURA, D. Y., MULLINS, R. F., OLVERA, M. A., ROSS, J. L., HUANG, J., STONE, E. M. & SHEFFIELD, V. C. (2007) Gene expression analysis of photoreceptor cell loss in bbs4-knockout mice reveals an early stress gene response and photoreceptor cell damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 3329-40.
- TAKADA, Y., FARISS, R. N., MULLER, M., BUSH, R. A., RUSHING, E. J. & SIEVING, P. A. (2006) Retinoschisin expression and localization in rodent and human pineal and consequences of mouse RS1 gene knockout. *Mol Vis*, 12, 1108-16.
- TAKADA, Y., VIJAYASARATHY, C., ZENG, Y., KJELLSTROM, S., BUSH, R. A. & SIEVING, P. A. (2008) Synaptic pathology in retinoschisis knockout (Rs1-/y) mouse retina and modification by rAAV-Rs1 gene delivery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 3677-86.
- TAKAHASHI, H., MATSUMOTO, H., SMIRKIN, A., ITAI, T., NISHIMURA, Y. & TANAKA, J. (2008) Involvement of heparanase in migration of microglial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1780, 709-15.
- TAKAMIYA, A., TAKEDA, M., YOSHIDA, A. & KIYAMA, H. (2001) Expression of serine protease inhibitor 3 in ocular tissues in endotoxin-induced uveitis in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 2427-33.
- TAN, E., DING, X. Q., SAADI, A., AGARWAL, N., NAASH, M. I. & AL-UBAIDI, M. R. (2004) Expression of cone-photoreceptor-specific antigens in a cell line derived from retinal tumors in transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 764-8.
- TANABE, S., HEESSEN, M., YOSHIZAWA, I., BERMAN, M. A., LUO, Y., BLEUL, C. C., SPRINGER, T. A., OKUDA, K., GERARD, N. & DORF, M. E. (1997) Functional expression of the CXC-chemokine receptor-4/fusin on mouse microglial cells and astrocytes. *J Immunol*, 159, 905-11.
- TANITO, M., MASUTANI, H., NAKAMURA, H., OHIRA, A. & YODOI, J. (2002) Cytoprotective effect of thioredoxin against retinal photic injury in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 1162-7.
- TANTRI, A., VRABEC, T. R., CU-UNJIENG, A., FROST, A., ANNESLEY, W. H., JR. & DONOSO, L. A. (2004) X-linked retinoschisis: a clinical and molecular genetic review. *Surv Ophthalmol*, 49, 214-30.
- TAPPIA, P. S., MAN, W. J. & GRIMBLE, R. F. (1995) Influence of unsaturated fatty acids on the production of tumour necrosis factor and interleukin-6 by rat peritoneal macrophages. *Mol Cell Biochem*, 143, 89-98.
- THIEL, G. & CIBELLI, G. (2002) Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol*, 193, 287-92.

- THOMAS, D. M., FRANCESCUTTI-VERBEEM, D. M. & KUHN, D. M. (2006) Gene expression profile of activated microglia under conditions associated with dopamine neuronal damage. *FASEB J*, 20, 515-7.
- TONG, Z., WU, X., OVCHARENKO, D., ZHU, J., CHEN, C. S. & KEHRER, J. P. (2005) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a survival factor. *Biochem J*, 391, 441-8.
- UESUGI, M., NAKAJIMA, K., TOHYAMA, Y., KOHSAKA, S. & KURIHARA, T. (2006) Nonparticipation of nuclear factor kappa B (NFkappaB) in the signaling cascade of c-Jun N-terminal kinase (JNK)- and p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK)-dependent tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induction in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated microglia. *Brain Res*, 1073-1074, 48-59.
- VAN ROSSUM, D. & HANISCH, U. K. (2004) Microglia. *Metab Brain Dis*, 19, 393-411.
- VAZQUEZ-CHONA, F. R., CLARK, A. M. & LEVINE, E. M. (2009) Rbp1 promoter drives robust Muller glial GFP expression in transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 3996-4003.
- VEAL, E. A., DAY, A. M. & MORGAN, B. A. (2007) Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell*, 26, 1-14.
- VEDIN, I., CEDERHOLM, T., FREUND LEVI, Y., BASUN, H., GARLIND, A., FAXEN IRVING, G., JONHAGEN, M. E., VESSBY, B., WAHLUND, L. O. & PALMBLAD, J. (2008) Effects of docosahexaenoic acid-rich n-3 fatty acid supplementation on cytokine release from blood mononuclear leukocytes: the OmegAD study. *Am J Clin Nutr*, 87, 1616-22.
- VENUPRASAD, K., PARAB, P., PRASAD, D. V., SHARMA, S., BANERJEE, P. R., DESHPANDE, M., MITRA, D. K., PAL, S., BHADRA, R., MITRA, D. & SAHA, B. (2001) Immunobiology of CD28 expression on human neutrophils. I. CD28 regulates neutrophil migration by modulating CXCR-1 expression. *Eur J Immunol*, 31, 1536-43.
- VIGNAIS, P. V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 59, 1428-59.
- WEBER, B. H., SCHREWE, H., MOLDAY, L. L., GEHRIG, A. & WHITE, K. L. (2002) Inactivation of the murine X-linked juvenile retinoschisis gene, Rs1h, suggests a role of retinoschisin in retinal cell layer organization and synaptic structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 6222-6227.
- WEISINGER, H. S., VINGRYS, A. J. & SINCLAIR, A. J. (1996) The effect of docosahexaenoic acid on the electroretinogram of the guinea pig. *Lipids*, 31, 65-70.
- WENZEL, A., GRIMM, C., MARTI, A., KUENG-HITZ, N., HAFEZI, F., NIEMEYER, G. & REME, C. E. (2000) c-fos controls the "private pathway" of light-induced apoptosis of retinal photoreceptors. *J Neurosci*, 20, 81-8.
- WENZEL, A., GRIMM, C., SAMARDZIJA, M. & REME, C. E. (2005) Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res*, 24, 275-306.
- WENZEL, A., GRIMM, C., SEELIGER, M. W., JAISSE, G., HAFEZI, F., KRETSCHMER, R., ZRENNER, E. & REME, C. E. (2001) Prevention of photoreceptor apoptosis by activation of the glucocorticoid receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 1653-9.
- WU, J., WRATHALL, J. R. & SCHACHNER, M. (2010) Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Cdelta activation induces close homolog of adhesion molecule L1 (CHL1) expression in cultured astrocytes. *Glia*, 58, 315-28.

- WU, W. W., WONG, J. P., KAST, J. & MOLDAY, R. S. (2005) RS1, a discoidin domain-containing retinal cell adhesion protein associated with X-linked retinoschisis, exists as a novel disulfide-linked octamer. *J Biol Chem*, 280, 10721-30.
- XUE, B., WU, Y., YIN, Z., ZHANG, H., SUN, S., YI, T. & LUO, L. (2005) Regulation of lipopolysaccharide-induced inflammatory response by glutathione S-transferase P1 in RAW264.7 cells. *FEBS Lett*, 579, 4081-7.
- YANG, L. P., LI, Y., ZHU, X. A. & TSO, M. O. (2007a) Minocycline delayed photoreceptor death in rds mice through iNOS-dependent mechanism. *Mol Vis*, 13, 1073-82.
- YANG, Z., QUIGLEY, H. A., PEASE, M. E., YANG, Y., QIAN, J., VALENTA, D. & ZACK, D. J. (2007b) Changes in gene expression in experimental glaucoma and optic nerve transection: the equilibrium between protective and detrimental mechanisms. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 5539-48.
- YAO, J., MACKMAN, N., EDGINGTON, T. S. & FAN, S. T. (1997) Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor- α promoter in human monocytic cells. Regulation by Egr-1, c-Jun, and NF- κ B transcription factors. *J Biol Chem*, 272, 17795-801.
- ZEISS, C. J. & JOHNSON, E. A. (2004) Proliferation of microglia, but not photoreceptors, in the outer nuclear layer of the rd-1 mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 971-6.
- ZENG, H.-Y., ZHU, X.-A., ZHANG, C., YANG, L.-P., WU, L.-M. & TSO, M. O. M. (2005) Identification of Sequential Events and Factors Associated with Microglial Activation, Migration, and Cytotoxicity in Retinal Degeneration in. *Investigative Ophthalmology*, 46, 2992-2999.
- ZENG, Y., TAKADA, Y., KJELLSTROM, S., HIRIYANNA, K., TANIKAWA, A., WAWROUSEK, E., SMAOUI, N., CARUSO, R., BUSH, R. A. & SIEVING, P. A. (2004) RS-1 Gene Delivery to an Adult Rs1h Knockout Mouse Model Restores ERG b-Wave with Reversal of the Electronegative Waveform of X-Linked Retinoschisis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 3279-85.
- ZHANG, C., LAM, T. T. & TSO, M. O. (2005a) Heterogeneous populations of microglia/macrophages in the retina and their activation after retinal ischemia and reperfusion injury. *Exp Eye Res*, 81, 700-9.
- ZHANG, C., SHEN, J. K., LAM, T. T., ZENG, H. Y., CHIANG, S. K., YANG, F. & TSO, M. O. (2005b) Activation of microglia and chemokines in light-induced retinal degeneration. *Mol Vis*, 11, 887-95.
- ZMIJEWSKI, M. A., SWEATMAN, T. W. & SLOMINSKI, A. T. (2009) The melatonin-producing system is fully functional in retinal pigment epithelium (ARPE-19). *Mol Cell Endocrinol*, 307, 211-6.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Übersichtsdarstellung des menschlichen Auges mit einer detaillierten Abbildung der menschlichen Netzhaut.....	2
Abb. 2:	Lokalisation und schematische Struktur des Retinoschisingens <i>Rs1</i> und dessen mRNA- und Proteinprodukte.....	7
Abb. 3:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Wildtyp und <i>Rs1h</i> -defizienten Netzhaut.....	8
Abb. 4:	Biosynthese der Fettsäuren und Eicosanoide.....	9
Abb. 5:	Bildung von ROS nach Komplexbildung der regulatorischen Phox-Proteine in Phagozyten.....	13
Abb. 6:	Das TaqMan® Prinzip zur Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	33
Abb. 7:	Hämatoxylin-Eosin- und Immunfluoreszenzfärbungen unterschiedlicher Entwicklungsstadien	44
Abb. 8:	<i>In situ</i> GFP-Fluoreszenzaufnahmen von P21 retinalen whole mount Präparaten	46
Abb. 9:	Histologische Charakterisierung von Müllerzellen und Photorezeptor-degeneration im <i>Rs1h</i> -defizienten Mausmodell.....	47
Abb. 10:	Quantitative real time RT-PCR Analysen von Wildtyp und <i>Rs1h^{-Y}</i> Netzhäuten in verschiedenen Entwicklungsstadien.	49
Abb. 11:	Mikrogliaaktivierung und Bildung von Lipidtröpfchen in P14 MacGreen / <i>Rs1h^{-Y}</i> Mikroglia.....	50
Abb. 12:	Mikroarray-Expressionsdaten von <i>ex vivo</i> P14 isolierten retinalen Mikroglia kulturen.....	50
Abb. 13:	Retinale Fettsäureprofile von P14 Wildtyp und <i>Rs1h^{-Y}</i> Netzhäuten	51
Abb. 14:	Relativer DHA-Anteil von <i>Rs1^{-/-}</i> Muttertieren und deren <i>Rs1h^{-Y}</i> Nachkommen.....	52
Abb. 15:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung von P21 Wildtyp und <i>Rs1h^{-Y}</i> Netzhäuten.....	54
Abb. 16:	PNA-Färbung von P21 Wildtyp und <i>Rs1h^{-Y}</i> Netzhäuten.....	54
Abb. 17:	TUNEL-Färbung von P21 Wildtyp und <i>Rs1h^{-Y}</i> Netzhäuten.....	55
Abb. 18:	Hämatoxylin-Eosin- und PNA-Färbung von P56 und P84 Wildtyp bzw. <i>Rs1h^{-Y}</i> Mäusen	56
Abb. 19:	Fluoreszenzaufnahmen Iba1-markierter retinaler Mikroglia von P21 Wildtyp und <i>Rs1h^{-Y}</i> Mäusen in whole mount-Präparaten.....	57
Abb. 20:	Quantitative real time RT-PCR Expressionsanalyse von P14 und P21 Netzhäuten mit und ohne DHA-Supplementierung	58
Abb. 21:	GFAP- und F4/80- Färbung von P14 und P21 <i>Rs1h^{-Y}</i> Netzhäuten.....	59

Abb. 22:	Nilrotfärbung von Lipidtröpfchen in BV2 Zellen.....	60
Abb. 23:	DHA-vermittelte Reduktion pro-inflammatorischer Genexpression <i>in vitro</i>	61
Abb. 24:	Assays für Migration und Zellviabilität von stimulierten BV2 Zellen.....	61
Abb. 25:	Whole mounts von Blaulicht-bestrahlten MacGreen Netzhäuten.....	62
Abb. 26:	Kryoschnitte von Blaulicht-bestrahlten MacGreen Netzhäuten	63
Abb. 27:	Bioinformatische Analyse der Mikroarray-Daten nach Blaulicht-induzierter Schädigung der Netzhaut.....	64
Abb. 28:	Genexpressionsprofile von Blaulicht-bestrahlten MacGreen Mäusen.....	64
Abb. 29:	Schematischer Versuchsablauf des angewandten Zellkultursystems.....	67
Abb. 30:	Genexpressionsprofile von CSPG-DS und IFN γ stimulierten Mikroglia.....	68
Abb. 31:	Quantitative real time RT-PCR Analysen.....	69
Abb. 32:	Effekte von CSPG-DS und IFN γ auf das Phagozytoseverhalten von BV2 Zellen und primären Mikroglia..	70
Abb. 33:	NO-Sekretion von CSPG-DS, IFN γ und IFN γ + CSPG-DS-kostimulierten BV2 Zellen und primären Mikroglia	71
Abb. 34:	Effekte von CSPG-DS-, IFN γ - und IFN γ + CSPG-DS-behandelten BV2 Zellen und primären Mikroglia auf Zellmorphologie von 661W Photorezeptorzellen.....	72
Abb. 35:	Effekte von CSPG-DS-, IFN γ - und IFN γ + CSPG-DS-behandelten BV2 Zellen und primären Mikroglia auf Zellviabilität und Apoptose von 661W Photorezeptorzellen.....	72

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Organismen und Zellen: Eigenschaften und Herkunft	15
Tab. 2:	Primer und Sonden für TaqMan-Assays	17
Tab. 3:	Enzyme: Anwendung und Hersteller.....	17
Tab. 4:	Primäre Antikörper: Spezies, Verdünnung und Hersteller.....	17
Tab. 5:	Sekundäre Antikörper: Spezies, Verdünnung und Hersteller	17
Tab. 6:	Chemikalien: Verwendung und Hersteller.....	18
Tab. 7:	Kit-Systeme: Verwendung und Hersteller	19
Tab. 8:	Medien: Zusätze, Verwendung und Hersteller	19
Tab. 9:	Puffer und Lösungen: Zusammensetzung, Verwendung und Hersteller	20
Tab. 10:	Verbrauchsmaterialien: Verwendung und Hersteller.....	21
Tab. 11:	Geräte: Verwendung und Hersteller	21
Tab. 12:	Software: Verwendung und Hersteller.....	21
Tab. 13:	Stimulationsansätze: Lösungsmittel und eingesetzte Konzentrationen	23
Tab. 14:	Verwendete Maus-Linien	24
Tab. 15:	PCR-Ansätze für Mausgenotypisierungen.....	25
Tab. 16:	Primerkombinationen für PCR-Amplifikationen, Sequenzen und Produktgrößen von Mausgenotypisierungen.....	25
Tab. 17:	PCR-Programme für Mausgenotypisierungen	25
Tab. 18:	Fettsäurezusammensetzung von Kontroll- und DHA-Futter	26
Tab. 19:	10µl TaqMan Ansatz	34
Tab. 20:	Validierung der Mikroarray-Daten mittels quantitativer real time RT-PCR	66

Publikationen

KARLSTETTER M., WALCZAK Y., WEIGELT K., **EBERT S.**, VAN DEN BRULLE J., SCHWER H., FUCHSHOFER R., LANGMANN T. (2010) The novel activated microglia/macrophage WAP domain protein, AMWAP, acts as a counter-regulator of proinflammatory response. *Journal of Immunology*, 2010 Sep 15;185(6):3379-90

KARLSTETTER M., **EBERT S.**, LANGMANN T. (2010) Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models. *Journal of Immunobiology*, 2010 Sep-Oct;215(9-10):685-91

DIRSCHERL K., KARLSTETTER M., **EBERT S.**, KRAUS D., HLAWATSCH J., WALCZAK Y., MOEHLE C., FUCHSHOFER R., LANGMANN T. (2010) Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype *Journal of Neuroinflammation*, Jan 14;7:3

EBERT S., WEIGELT K., WALCZAK Y., DROBNIK W., MAUERER R., HUME D., WEBER B.H.F., LANGMANN T. (2009) Docosahexaenoic acid attenuates microglial activation and delays early retinal degeneration. *Journal of Neurochemistry*, Sep; 110(6):1863-75

LANGMANN T., **EBERT S.**, WALCZAK Y., WEIGELT K., EHRENGRUBER M.U., STIEWE T., WEBER B.H.F. (2009) Induction of early growth response-1 mediates microglia activation in vitro but is dispensable in vivo. *Journal of Neuromolecular Medicine*, 2009; 11(2):87-96

WALCZAK Y., **EBERT S.**, KASCHKOETOE J. SCHILD T., FERLINZ A., GONI R., LANGMANN T. (2009) Expression profiling of microglia and macrophages using novel Lipidomic TaqMan Array Cards and TaqMan Array plates. *BioTechniques*, Vol. 46, No. 4, April, pp. 315–317

MAUERER R., **EBERT S.**, LANGMANN T. (2009) High glucose, unsaturated and saturated fatty acids differentially regulate expression of ATP-binding cassette transporter ABCA1 and ABCG1 in human macrophages. *Journal of Experimental and Molecular Medicine*, Feb 28;41(2):126-32

STOECKER K., WEIGELT K., **EBERT S.**, KARLSTETTER M., WALCZAK Y., LANGMANN T. (2009) Induction of STAP-1 promotes neurotoxic activation of microglia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Jan 30;379(1):121-6

EBERT S., SCHOEBERL T., WALCZAK Y., STOECKER K., STEMPFL T., MOEHLE C., WEBER B.H.F., LANGMANN T. (2008) Chondroitin sulfate disaccharide stimulates microglia to adopt a novel regulatory phenotype. *Journal of Leukocyte Biology*, Sep; 84(3):736-40

WEIGELT K., ERNST W., WALCZAK Y., **EBERT S.**, LOENHARDT T., KLUG M., REHLI M., WEBER B.H.F., LANGMANN T. (2007) Dap12 expression in activated microglia from retinoschisin-deficient retina and its PU.1-dependent promoter regulation. *Journal of Leukocyte Biology*, Dec; 82(6):1564-74

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit entstand im Wesentlichen im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Regensburg. Das Gelingen der vorliegenden Dissertation wurde in nicht unerheblichem Maße von der Unterstützung und dem Verständnis zahlreicher Freunde und Kollegen getragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn *PD Dr. Thomas Langmann*, der mir die Bearbeitung dieses spannenden Dissertationsthemas in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Mit seinen Ideen, Erfahrungen sowie vielen anregenden Diskussionen hat er diese Arbeit immer wieder vorangetrieben und meine wissenschaftliche Entwicklung damit immens gefördert. Bei Herrn *Prof. Dr. Bernhard Weber* möchte ich mich an dieser Stelle für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut bedanken.

Herrn *Prof. Dr. Stephan Schneuwly* danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für seine Hilfsbereitschaft während meiner gesamten Studienzeit. Herrn *Prof. Dr. Armin Kurtz* und Herrn *Prof. Dr. Reinhard Wirth* danke ich für die Bereitschaft als Drittprüfer bzw. des Vorsitzender im Prüfungsausschuss zur Verfügung zu stehen.

Ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit bestand in *in vivo* Arbeiten mit transgenen MacGreen Mäusen. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank insbesondere Herrn *Prof. Dr. David Hume* vom Roslin Institut der Universität Edinburgh für die Bereitstellung der Mäuse.

Bei meinen Kollegen und Freunden am Institut bedanke ich mich auf diesem Weg für die anregenden Diskussionen und die überaus angenehme Arbeitsatmosphäre. Stellvertretend für alle anderen richtet sich mein Dank an *Alexander Aslanidis*, *Tobias Härtinger*, *Marcus Karlstetter* und *Dominik Kraus*. Ein persönlicher Dank gebührt auch *Yana Walczak*, der besten „Bench“-Nachbarin die man sich wünschen kann.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie: meiner Schwester *Carolin Ebert*, die immer das nötige Verständnis für mein „Arbeitsleid“ aufbrachte, und insbesondere meinen Eltern *Otto-Erwin* und *Deborah Ebert*, die mir mit ihrem uneingeschränkten Rückhalt und ihrer steten Unterstützung meine akademische Ausbildung erst ermöglicht haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Zu guter Letzt gilt mein ganz persönlicher Dank meinem Freund *Christian Oswald*, der mir während der gesamten Dissertationsphase mit seinem uneingeschränkten Verständnis sowie seiner steten Motivation und Unterstützung zur Seite stand.

Lebenslauf

Stefanie Ebert

Diplom-Biologin

*05.September 1980 in München

PROMOTION

seit 03/2007

Institut für Humangenetik

Universität Regensburg

„Molekulare Charakterisierung der Mikrogliaaktivierung bei retinaler Degeneration im Retinoschisin-defizienten Mausmodell“

STUDIUM

10/2001 – 12/2006

Studium der Biologie (Dipl. biol.)

Hauptfach: Zellbiologie

Erstes Nebenfach: medizinische Mikrobiologie

Zweites Nebenfach: Zoologie

DIPLOMARBEIT

04/2006 – 12/2006

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin

Universität Regensburg

„Expressionsanalyse von ABC Transportern in Blutmonozyten“

SCHULE

1991-2000

Gymnasium Grafing, Abitur 2000

AUSZEICHNUNGEN

07/2010

Young Investigator Award

14. Symposium für retinale Degeneration (Mont Tremblant, Kanada)