

Aus dem Department für Augenheilkunde Tübingen
Universitäts-Augenklinik

**Validierung der hypothermischen Therapie in einem
oxidativen Stress Modell der Schweineretina**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Kiebler, Tobias Nicolas Ernil

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Dr. S. Schnichels

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

Tag der Disputation: 09.12.2021

Präambel

Faszination Auge

"Die Annahme, dass das Auge mit all seinen unnachahmlichen Einrichtungen [z. B.] die Linse den verschiedenen Entfernungen anzupassen, wechselnde Lichtmengen zuzulassen und sphärische wie chromatische Abweichungen zu verbessern, durch die natürliche Zuchtwahl entstanden sei, erscheint, wie ich offen bekenne, im höchsten Grade als absurd."[1]. Anders als man es erwarten möchte, stammt diese Aussage von einem der weltweit bekanntesten Evolutionstheoretikern, Charles Robert Darwin. Freilich diene diese rhetorische Raffinesse in erster Linie dem Ziel, mit dem Leser eine gemeinsame Grundlage zu schaffen, um diese scheinbare Absurdität anschließend mit Darwins Selektionstheorie zu rationalisieren. Dennoch zeigt es, wie sehr das Auge die Menschen seit jeher fasziniert und verblüfft.

Auch für mich stellt das Auge eine Faszination dar, die seinesgleichen sucht. Die Funktion des Auges ist ganz und gar nicht auf das - für sich allein gestellt schon verblüffende - Verarbeiten elektromagnetischer Wellen bestimmter Frequenzen limitiert. Denn die Retina ist das einzige jederzeit sichtbare Element des menschlichen Gehirns, die Choroidea das einzige direkte Schaufenster des individuellen arteriellen Gefäßstatus des Menschen und die Iris die unverhüllte Preisgabe des aktuellen vegetativen Nervenzustands. Da ist es nur selbstverständlich, dass auch jede einzelne menschliche Basisemotion wie Angst, Wut, Trauer, aber auch Überraschung und Freude in unseren Augen zweifelsfrei wiedergespiegelt wird.

Die Vielfältigkeit der Funktionen dieses Sinnesorgans sind meiner Faszination für das Auge immanent und prägen meine Leidenschaft, den Wissens- und Therapiefortschritt in der Augenheilkunde im Rahmen meiner Promotionsarbeit aktiv mitzugestalten.

Inhaltsverzeichnis

I. Tabellenverzeichnis.....	III
II. Abbildungsverzeichnis.....	III
III. Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Retina.....	1
1.1.1 Aufbau der Retina.....	1
1.1.2 Rolle der Gliazellen in der Retina.....	3
1.2 Oxidativer Stress	4
1.2.1 Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativem Stress.....	4
1.2.2 Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) als Stressor.....	5
1.2.3 Oxidativer Stress in der Neuroretina	8
1.3 Wirkung von Hypothermie	9
1.4 Vergleich von Zellkulturmodellen, Tierversuchen und Organkulturmodellen.....	11
1.4.1 Zellkulturmodelle.....	11
1.4.2 Tierversuche.....	12
1.4.3 Organkulturmodelle.....	13
1.5 Zielsetzung.....	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Materialien.....	15
2.1.2 Chemikalien.....	16
2.1.3 Puffer u. Lösungen.....	17
2.1.4 Antikörper.....	17
2.1.5 Geräte.....	19
2.1.6 Software.....	19
2.2 Methoden.....	20
2.2.1 Verwendung von tierischen Nebenprodukten.....	20
2.2.2 Organkulturen von Retina-Explantaten.....	20
2.2.3 Immunhistochemie.....	22
2.2.4 Western Blot Proteinanalysen.....	24
2.2.5 Quantitative Real-Time-PCR	26

2.2.6	Statistische Auswertungen.....	29
3.	Ergebnisse.....	30
3.1	Erhalt der Zellstruktur und Zellverbände durch Hypothermie	30
3.2	Tendenzielle Protektion retinaler Ganglienzellen durch Hypothermie	31
3.3	Ausbleibende Makrogliareaktion auf H ₂ O ₂ und Hypothermie	33
3.4	Protektion von Amakrinzellen durch Hypothermie	35
3.5	Protektion von Bipolarzellen durch Hypothermie	37
3.6	Sensitive Reaktion von Mikrogliazellen auf Wasserstoffperoxid und Hypothermie.....	38
3.7	Geringer, reversibler Anstieg proinflammatorischer Marker.....	40
3.8	Geringe Reaktion proapoptotischer Marker	42
4.	Diskussion.....	48
4.1	Hypothermie schützt retinale Zellstrukturen	50
4.2	Reaktion retinaler Ganglienzellen auf äußere Einflüsse	50
4.3	Oxidativer Stress führt nicht zwangsläufig zur Gliose	51
4.4	Amakrin- und Bipolarzellen profitieren von hypothermischer Behandlung....	53
4.5	Unterbindung einer Mikrogliareaktion durch Hypothermie	54
4.6	Hypothermie wirkt proinflammatorischen Faktoren entgegen	55
4.7	Geringe Reaktion proapoptotischer Mechanismen	56
4.8	Vergleich von Retina-Degenerationsmodellen mit Wasserstoffperoxid und Kobaltchlorid.....	57
4.9	Validierung des Schweineretina-Organkultur-Degenerationsmodells	60
4.10	Schlussfolgerung und Ausblick	60
5.	Zusammenfassung.....	62
IV.	Liste der Veröffentlichungen.....	VII
V.	Literaturverzeichnis.....	VIII
VI.	Anhang.....	XVII
VII.	Eigenanteilserklärung.....	XVIII
VIII.	Danksagung	XIX

I. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Regulation von Zellvorgängen durch Hypothermie
- Tabelle 2: Verwendete Materialien
- Tabelle 3: Verwendete Chemikalien
- Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen
- Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper in der Immunhistochemie
- Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper in der Immunhistochemie
- Tabelle 7: Verwendete primäre Antikörper in den Western Blot Proteinanalysen
- Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper der Western Blot Proteinanalysen
- Tabelle 9: Verwendete Geräte
- Tabelle 10: Verwendete Software
- Tabelle 11: Übersicht der durchgeführten Maßnahmen der immunhistochemischen Färbung
- Tabelle 12: Übersicht der durchgeführten Maßnahmen zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung
- Tabelle 13: Übersicht der auf dem Kipptisch durchgeführten Maßnahmen zur Immundetektion in den Western Blot Proteinanalysen
- Tabelle 14: Verwendete Primer der quantitativen real-time PCR mit zugehöriger Oligonukleotidsequenz
- Tabelle 15: Vergleich zweier Schweineretinadegenerationsmodelle

II. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Aufbau der retinalen Zellschichten
- Abbildung 2: Entstehung von ROS im Zellmetabolismus
- Abbildung 3: Signalwege der Apoptosemechanismen
- Abbildung 4: Studiendesign
- Abbildung 5: Zyklusablauf der quantitativen real-time PCR
- Abbildung 6: Analyse der Zellstruktur der Neuroretina
- Abbildung 7: Analyse der retinalen Ganglienzellen
- Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung und Western Blot Proteinanalysen der Makrogliazellen
- Abbildung 9: Immunhistochemische Analysen der Amakrinzellen
- Abbildung 10: Immunhistochemische Analysen der Bipolarzellen
- Abbildung 11: Immunhistochemische Analysen der Mikrogliazellen
- Abbildung 12: Analysen der mRNA-Expressionen von VEGF, HSP70, HIF
- Abbildung 13: Analysen der mRNA-Expression von p21
- Abbildung 14: mRNA-Expression und Western Blot Proteinanalysen des Bax/Bcl-2-Protein-Verhältnisses (Bax/Bcl-2-Ratio)

Abbildung 15: Analysen der mRNA-Expression von Caspase 8

Abbildung 16: Western Blot Proteinanalysen der relativen NK- κ B- und PUMA-Expressionen

Abbildung 17: Schematische Darstellung der Auswirkungen von H₂O₂ und Hypothermie auf die Retina.

III. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ÄNS	Äußere nukleäre Schicht
ÄPS	Äußere plexiforme Schicht
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (engl. <i>bicinchoninic acid</i>)
BSA	Bovines Serum Albumin
Bspw	Beispielsweise
ChAT	choline Acetyltransferase
CoCl ₂	Kobaltchlorid
d	Tag(e)
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
d.h.	das heißt
et al.	lat. <i>et alii</i> (= und andere)
Etc.	lat. <i>et cetera</i> (= und die übrigen)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Saures Gliafaserprotein (engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
h	Stunde(n)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HSP70	Hitzeschockprotein 70
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Iba1	Ionisiertes Calcium-Bindungs-Adapter-Molekül 1

INS	Innere nukleäre Schicht
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (engl. <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IOD	Intraokularer Druck
IPS	Innere Plexiforme Schicht
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen aktivierter Protein Kinase – Signalweg
mm	Millimeter
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NeuN	Neuronales Zellkernprotein (engl. <i>neuronal-specific nuclear protein</i>)
NF- κ B	Transkriptionsfaktor (engl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of B-cells</i>)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	PBS-Tween 20
PBS-TX	PBS-Tween X-100
PFA	Paraformaldehyd
PGP9.5	Deubiquitinierungsenzym (engl. <i>Protein Gene Product 9.5</i>)
PKC α	Enzym Proteinkinase C Alpha
PUMA	engl. <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i> (proapoptotisches Protein)
P21	Tumorsuppressorgen p21 (auch: CDK-Inhibitor 1)
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion
RGZ	Retinale Ganglienzellen
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RPE	Retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur (21 - 23°C)
Tab.	Tabelle
V	

TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. <i>tris buffered saline</i>)
TBS-T	TBS-Tween 20
TNF α	Tumornekrosefaktor- alpha
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	Zentrales Nervensystem
°C	Grad Celsius
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar

1. Einleitung

1.1 Die Retina

Die im dorsalen und dorsolateralen Bereich des Augapfels befindlichen Zellschichten, welche die einfallenden Lichtreize verarbeiten, in elektrische Signale umwandeln und final zum *Nervus Opticus* konfluieren, werden als Retina bezeichnet. *„Die Retina ist ein faszinierendes zelluläres Netzwerk. [...] Informationen werden innerhalb der Netzhaut durch Fortsätze mit einer Gesamtlänge von ca. 10 km weitergeleitet und an ca. zehn Milliarden Synapsen übertragen.“*[2]

Die Retina ist genau genommen ein Teil des Zentralen Nervensystems (ZNS) und stellt eine Ausstülpung des Diencephalons dar [3]. Der Name Retina (lat. Rete = Netz) spiegelt die netzartige Verflechtung der dort befindlichen Nervenzellen wider (Abb.1). Sie weist eine mittlere Dicke von ca. 250 µm auf, die sich jedoch in verschiedenen Retinaabschnitten unterscheidet [4].

1.1.1 Aufbau der Retina

Erstaunlicherweise ist die Anordnung der lichtsensitiven Zellen der lichtexponierten Seite abgewandt. Man spricht daher vom sog. *„inversen Auge“*, welches viele Tierarten, inklusive aller Säugetiere, gemein haben [3]. Die lichtsensitiven Photorezeptoren liegen also in einer Zellschicht, die dem Lichteinfall am weitesten entfernt liegt. Dorsal der Photorezeptoren befindet sich eine melaninbeinhaltende Schicht aus Pigmentepithelzellen (retinales Pigmentepithel = RPE), welche die Rückstreuung des einfallenden Lichts reduziert [5]. Das RPE spielt außerdem eine elementare Rolle bei der suffizienten Nährstoffversorgung der Photorezeptorzellen [6]. Die signalweiterleitenden Neurone bestehen aus den fünf Hauptnervenzellklassen Photorezeptoren, Bipolar-, Horizontal-, Amakrin- sowie retinalen Ganglienzellen (RGZ), welche jeweils nochmal in dutzende Subtypen aufgliedert werden können [7, 8]. Photorezeptorzellen, welche in Stäbchen und Zapfen eingeteilt werden, stellen bipolare, lang gestreckte Nervenzellen dar, deren Dendriten zur Absorption von Lichtquanten spezialisiert sind [9, 10]. Die Zellkerne der Photorezeptorzellen repräsentieren die äußere nukleäre Schicht [3]. Die Axone dieser Zellen knüpfen an die nächst innergelegenen Zellen, die Bipolarzellen an, welche dann die Reizinformation weiterleiten [7]. Horizontalzellen führen hier eine erste Modulation der ankommenden Reize durch [7]. Diese Schicht der Verbindung zwischen Stäbchen und

Zapfen mit Bipolarzellen und Horizontalzellen wird als äußere plexiforme Schicht bezeichnet [3]. Die nachfolgende Schicht aus den Zellkernen von Bipolar-, Horizontal- und Amakrinzellen wird innere nukleäre Schicht genannt. Diese Interneurone sind für die Reizweiterleitung und Signalmodulation von den Photorezeptoren zu den RGZ essentiell. Amakrinzellen stehen auf der einen Seite mit ihren Dendriten mit den Axonen der Bipolarzellen und auf der anderen Seite mit den Dendriten der RGZ in Kontakt. An dieser Stelle führen Amakrinzellen zu einer lateralen und vertikalen Verschaltung des neuronalen Netzwerks und bewirken eine weitere Modulation der Informationsweiterleitung [7]. Die Übergangsschicht von Bipolarzellen und Amakrinzellen zu den RGZ wird als innere plexiforme Schicht bezeichnet. Die Axone der RGZ ziehen gemeinsam zur Papille und konfluieren schließlich zum *Nervus Opticus*. Erst nach der vollständigen Vereinigung zum Nervus opticus ab der *Lamina cribrosa*, sind die Nervenzellen durch Oligodendrozyten von einer Myelinscheide umhüllt [7, 9-11]. In den als Retina bezeichneten Zellschichten finden sich jedoch nicht nur die hier erwähnten neuronalen Zellen, sondern ebenso sog. Gliazellen, welche für die Funktion essentiell sind [8].

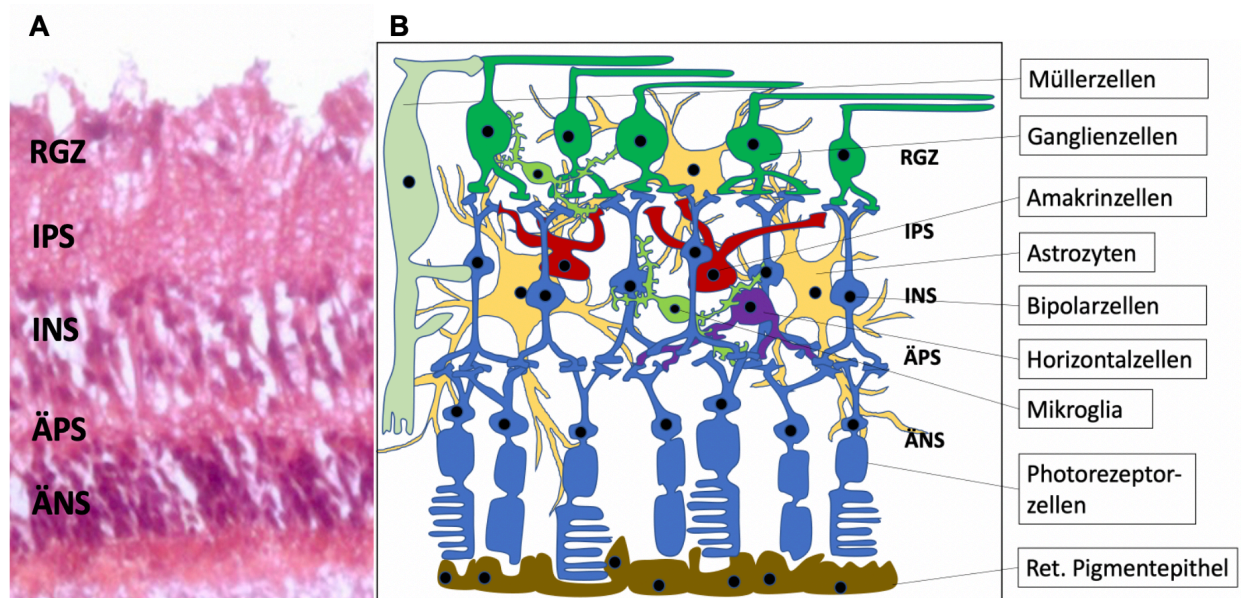


Abbildung 1: Aufbau der retinalen Zellschichten in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (A) und als schematische Darstellung (B). RGZ = retinale Ganglienzellen, IPS = innere plexiforme Schicht, INS = innere nukleäre Schicht, ÄPS = äußere plexiforme Schicht, ÄNS = äußere nukleäre Schicht, Ret. Pigmentepithel = Retinales Pigmentepithel

1.1.2 Rolle der Gliazellen in der Retina

Neben den signalweiterleitenden Neuronen beinhaltet die Retina zwei Typen von Gliazellen, die Mikro- und die Makroglia (Abb. 1) [8]. Mikroglia stellen eine Gruppe von Immuneffektorzellen des zentralen Nervensystems dar und bilden somit einen Teil des Mononukleär-phagozytären Systems [9]. Makrogliazellen lassen sich wiederum in zwei in der Retina vorkommende Untergruppen aufteilen, die Astrozyten und die Müllerglia.

Mikroglia sind die „*Makrophagen des Gehirns*“ und werden als Teil des primären Immunsystems durch Pathogene und Zellschäden aktiviert, migrieren in das Infektionsgebiet, eliminieren Pathogene und entfernen geschädigte Zellen [9]. Ebenso fungieren Mikroglia als Regulator neuronaler Apoptoseprozesse [12]. Des Weiteren führen sie direkte Immunantworten aus, indem sie Zytokine, Chemokine, Prostaglandine, Stickstoffmonoxid (NO) sowie reaktive Sauerstoffspezies absondern [9, 13, 14].

Astrozyten nehmen vielfältige Funktionen ein und stellen eine maßgebliche Verbindung zwischen Blutkapillaren und Neuronen dar. Ihnen wird die Kontrolle des lokalen Blutflusses zur Nährstoffversorgung der Neurone sowie die Regulation der synaptischen Aktivitäten zugeschrieben [10, 15]. Zusätzlich regulieren sie den pH-Wert, indem sie Kalium-Ionen und auch toxische Substanzen aus dem Extrazellulärraum aufnehmen [9, 16]. Sie sind in der Lage, zusammen mit Mikrogliazellen geschädigte Zellen zu phagozytieren und Narben zu bilden [9]. Besonders bleibt zu berücksichtigen, dass sich die Astrozyten hauptsächlich ubiquitär im Gehirn und Sehnerv befinden und in den retinalen Zellschichten unterrepräsentiert sind [17]. Bei diesem Organkulturmodell ist der Sehnerv jedoch abgetrennt. Daher können etwaige Reaktionen der im Sehnerv befindlichen Immunzellen auf die Retina in diesem Modell nicht dargestellt werden.

Die retinaspezifischen Müllerglia untermauern und stabilisieren das neuronale Netzwerk und deren Ausläufer bilden die innere und äußere Grenzmembran [3]. Ihre Funktion als Stützzellen für die Neurone führte zur Namensgebung Glia (griech. glia = Leim) [9]. Des Weiteren können Müllerglia Neurotransmitter, wie Glutamat, aufnehmen und gewährleisten so die Regulation der Homöostase (Ionen, Wasser,

Neurotransmitter, pH-Wert) innerhalb der Retina [18, 19]. Dies führt zu einer Beendigung der Glutamat-induzierten Signalweiterleitung und vermeidet somit die Entstehung von oxidativem Stress [20]. Ebenso setzen Müllerzellen zum Schutz vor oxidativem Stress protektive Substanzen, wie Antioxidantien, Neutrophine sowie unter sauerstoffarmen Bedingungen den Wachstumsfaktor VEGF frei [19, 21]. Eine weitere Funktion ist die Minimierung der intraretinalen Lichtstreuung durch geordnete Ausrichtung der die Retina durchdringenden Lichtstrahlen [22].

1.2 Oxidativer Stress

1.2.1 Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativem Stress

Sauerstoff ist für die physiologische Zellfunktion eukaryotischer Organismen unabdingbar. In aeroben Stoffwechselprozessen dient elementarer Sauerstoff als Oxidationsmittel und ist somit in der Lage, Elektronen von reduzierten Stoffwechselsubstanzen aufzunehmen [23]. Eine Vielzahl unterschiedlicher physiologischer Reaktionen des Zellmetabolismus, wie z.B. die Oxidation von Aminosäuren, führen zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, wie dem Hydroxyl-Radikal ($\text{OH}\cdot$), dem Hydroperoxyl-Radikal ($\text{HOO}\cdot$), dem Superoxidanionen-Radikal ($\text{O}_2\cdot^-$), dem Ozon (O_3), angeregten Sauerstoffspezies (Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$) oder eben dem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) [23-25]. Diese reaktiven Sauerstoffspezies werden unter dem Begriff ROS (reactive oxygen species) zusammengefasst. Das Fehlen ungepaarter Elektronen führt zu einer erheblich höheren Reaktionsfreudigkeit der Radikale [26]. Hauptort der Bildung dieser ROS stellt das Zytosol, das Endoplasmatische Retikulum, die Peroxisomen sowie die Elektronentransportkette der Mitochondrienmembran dar [27-29]. Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies ist somit ein essentieller Bestandteil zur Aufrechterhaltung des physiologischen Zellzyklus und zur Immunabwehr [30]. Die Superoxid-Dismutase, Katalasen und (Glutathion-) Peroxidasen übernehmen den enzymatischen Abbau dieser Nebenprodukte des Zellstoffwechsels [24].

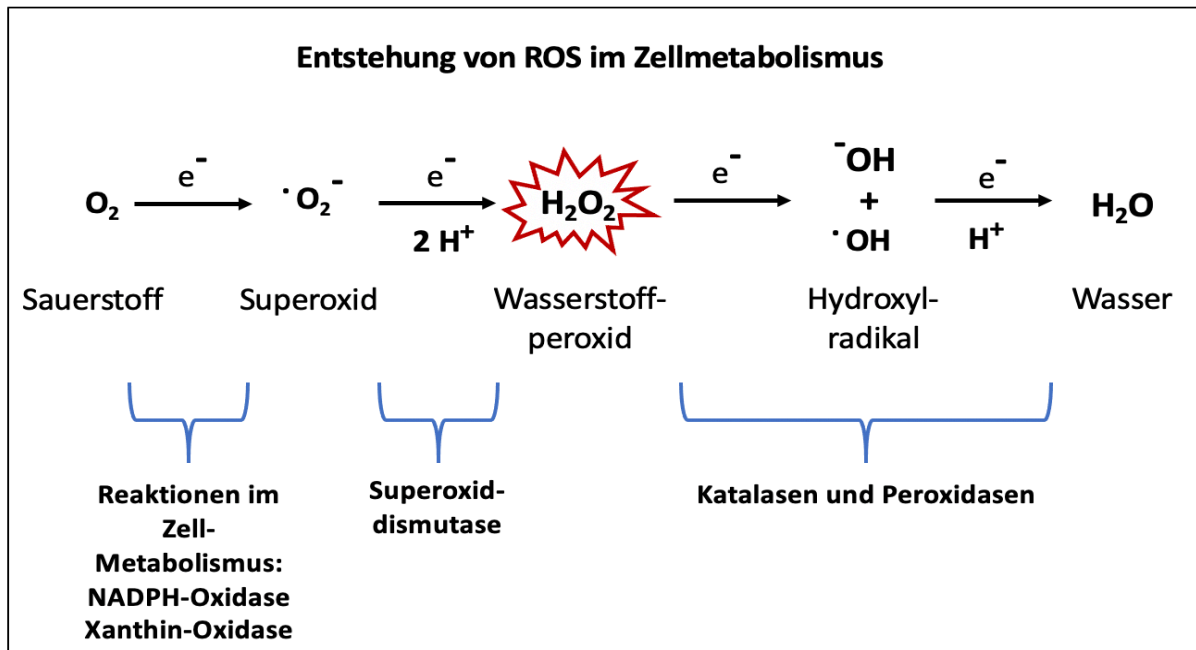


Abbildung 2: Entstehung von ROS im Zellmetabolismus. Modifizierte Darstellung nach „Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases“ [31]. Die ROS-Entstehung findet im Arachidonsäuremetabolismus sowie in Elektronenübertragungsketten statt. Die NADPH-Oxidase und die Xanthin-Oxidase bilden durch die Bindung eines Elektrons an Sauerstoff das Superoxidanionen-Radikal. Die Superoxiddismutase wandelt dies durch Zugabe von Elektronen und Wasserstoff in Wasserstoffperoxid um. Bei Anstieg der ROS-Konzentration wird Wasserstoffperoxid im physiologischen Zellmetabolismus durch Katalasen und Glutathionperoxidasen über die Umwandlung in Hydroxylradikale zu Wasser abgebaut. ROS = reaktive Sauerstoffspezies, O_2 = Sauerstoff, e^- = Elektron, O_2^- = Superoxidanionen-Radikal, H^+ = Wasserstoffion, H_2O_2 = Wasserstoffperoxid, $\cdot\text{OH}$ = Hydroxylradikal, OH^- = Hydroxidion, H_2O = Wasser, NADPH = Nicotinamidadeninucleotidphosphat

Ist die physiologische Konzentration der ROS durch ein Ungleichgewicht in Produktion und Abbau massiv erhöht, so spricht man von oxidativem Stress [24]. Oxidativer Stress entsteht sowohl durch Akkumulation der ROS durch extrazelluläre Einflüsse (Wasserstoffperoxid) oder intrazelluläre Störungen (Gendefekt) als auch durch einen verringerten ROS-Abbau aufgrund eines relativ geringen Antioxidantiengehalts [24, 32, 33]. Der hohe Anteil ungesättigter Fettsäuren in neuronalem Gewebe führt hier zu einer besonders starken Anfälligkeit vor ROS [24].

1.2.2 Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Stressor

Das nichtradikale Oxidans Wasserstoffperoxid (H_2O_2) führt zu einem Zellschaden durch Bildung hochreaktiver Hydroxylradikale bei der Reaktion mit Hydroperoxid (Haber-Weiss-Reaktion) [26, 34]. Hierbei kommt es zu destruktiven Proteinmodifikationen mit Schäden der Zellmembran, Hemmung der mitochondrialen Atmungskette, DNA-Schädigungen sowie Lipidoxidationen [34]. Die toxische Wirkung von H_2O_2 entsteht

u.a. durch die ROS-vermittelte Expression von Todesliganden [35]. Die enge Verknüpfung des Überangebots an ROS und des Todesliganden Tumor-Nekrose-Faktor-alpha ($\text{TNF}\alpha$) wurde schon in unterschiedlichen Studien gezeigt [36, 37].

Diese Expression wird zum einen durch den MAPK (Mitogen aktivierte Protein Kinase) Signalweg aktiviert. Hier führt das Vorhandensein von oxidativem Stress zur Ligandenbindung an einen Todesrezeptor (TNF-Rezeptor bzw. FAS-Rezeptor) auf der Zelloberfläche (extrinsischer Signalweg) [38]. Es folgt eine Konformationsänderung der Rezeptoren, welche eine Aktivierung der Phosphorylierungskaskade, insbesondere der Apoptose-Initiator-Caspase 8, mit sich bringt [38, 39]. Die darauffolgende Aktivierung von Effektor-Caspasen (Caspase 3, 6 und 7) führt schlussendlich zur Apoptose der Zelle [35, 38].

Zum anderen beeinflussen ROS auch redox-sensitive Transkriptionsfaktoren, wie $\text{NF}\kappa\text{B}$, $\text{HIF-1}\alpha$ oder p53, welche ebenso die Expression der Todesliganden fördern (intrinsischer Signalweg) [35]. Der *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of B-cells* (kurz: $\text{NF-}\kappa\text{B}$) ist ein pleiotroper Transkriptionsfaktor, der je nach Trigger durch Bindung an unterschiedliche DNA-Abschnitte die Transkription bestimmter Gene beeinflusst [40]. So stimulieren ROS den $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Signalweg zunächst durch Aktivierung des IKK-Kinase-Komplexes [41]. Dieser phosphoryliert Regulatoren, welche zur proteosomalen Degradation der $\text{I}\kappa\text{B}$ -Inhibitoren führen [42]. Somit wird $\text{NF-}\kappa\text{B}$ freigesetzt, kann in den Zellkern verlagert werden und die Transkription von DNA-Abschnitten modifizieren [42]. Das Protein *p53 upregulated modulator of apoptosis* (kurz: PUMA, auch *Bcl-2 binding component 3*, kurz *BBC3* genannt) ist ein proapoptotisches Protein, welches durch den Tumorsuppressor p53 direkt induziert wird [43]. H_2O_2 führt in Gliazellen sowie Oligodendrozyten zur Induktion von p53 [44, 45]. Im aktiven Zustand hemmt PUMA die Interaktion des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins mit dem proapoptotischen Bax Protein [43]. Bax löst somit die Freisetzung des proapoptotischen Cytochrom C Proteins aus dem mitochondrialen Intermembranraum aus [46]. Dies führt zur Aktivierung der Apoptose-Initiator-Caspase 9, welche dann die Caspase-Kaskade der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktiviert und zum apoptotischen Zelltod führt [46].

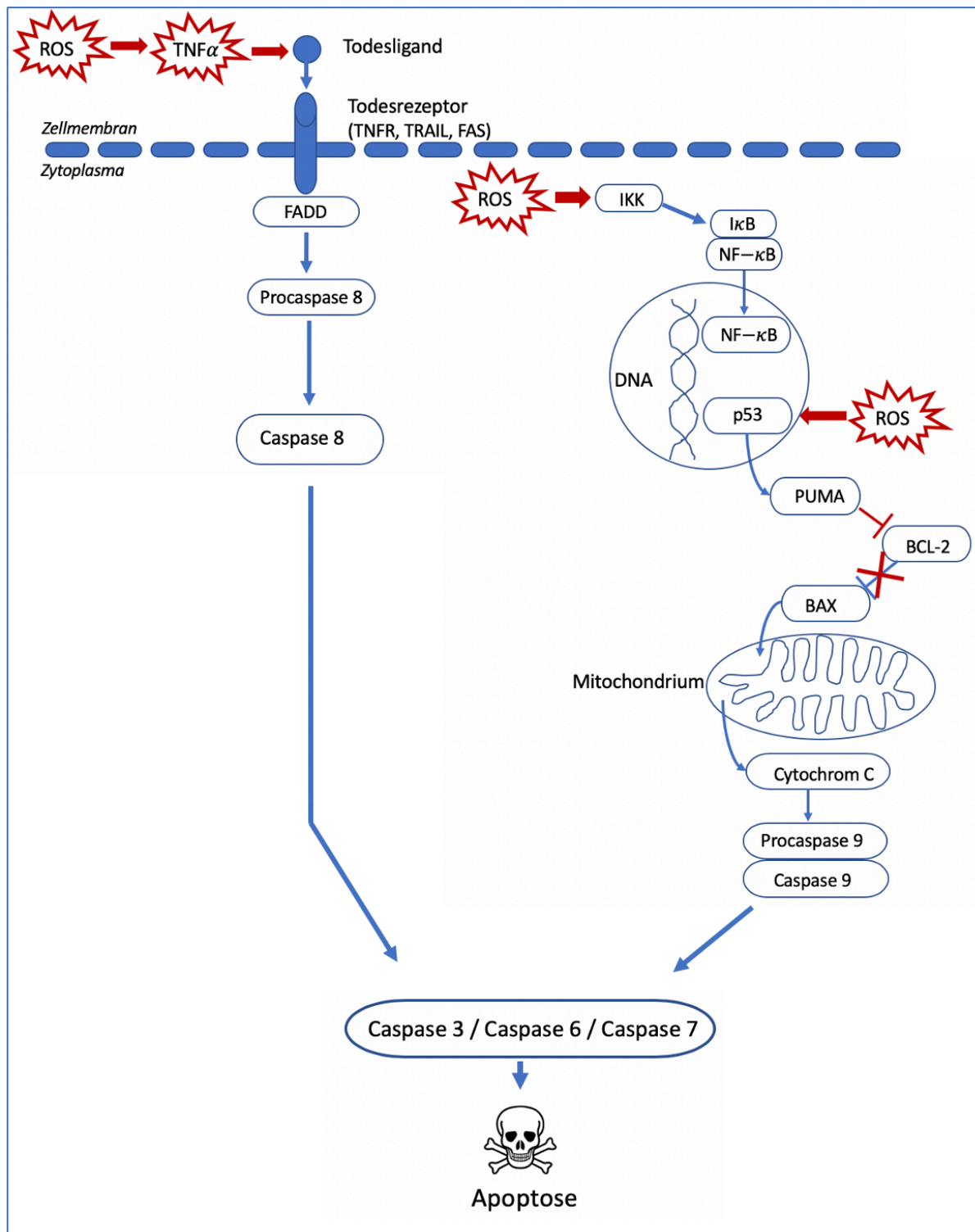


Abbildung 3: Signalwege der Apoptosemechanismen. Modifizierte und vereinfachte Darstellung von „Apoptosis Pathways And Drug Targets Poster“ [47]. Caspase-8 wird durch den extrinsischen Signalweg aktiviert, das heißt ein Todesligand (z.B. $TNF\alpha$) bindet von extrazellulär an den Todesrezeptor in der Zellmembran. Es folgt eine Konformationsänderung der Rezeptoren, welche eine Aktivierung der Phosphorylierungskaskade, insbesondere der Apoptose-Initiator-Caspase 8, mit sich bringt. Die darauffolgende Aktivierung der Caspase-Kaskade der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 führt schlussendlich zur Apoptose der Zelle. ROS stimulieren den NF- κ B-Signalweg durch Aktivierung des

IKK-Kinase-Komplexes. Dieser phosphoryliert Regulatoren, welche zur proteosomalen Degradation der I κ B-Inhibitoren führen. Somit wird NF- κ B freigesetzt, in den Zellkern verlagert und modifiziert die Transkription von DNA-Abschnitten. Der Tumorsuppressor p53 wird ebenso durch ROS aktiviert und induziert direkt das proapoptotische Protein PUMA. Im aktiven Zustand hemmt PUMA die Interaktion zwischen dem antiapoptotischen Bcl-2 Protein und dem proapoptotischen Bax Protein. Bax löst somit die Freisetzung des proapoptotischen Cytochrom C Proteins aus dem mitochondrialen Intermembranraum aus. Dies führt zur Aktivierung der Apoptose-Initiator-Caspase 9, welche dann die Caspase-Kaskade der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktiviert und zum apoptotischen Zelltod führt. *ROS = reaktive Sauerstoffspezies, TNF α = Tumor-Nekrose-Faktor-alpha, TNFR = Tumor-Nekrose- Faktor-Rezeptor, TRAIL = Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand, FAS = Fas-Rezeptor, FADD = Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne, I κ B = inhibitorisches κ B-Protein, IKK = I κ B-Kinase-Komplex, NF- κ B = Nukleärer Faktor-kappaB, DNA = Desoxyribonukleinsäure, p53 = p53-Protein, PUMA = p53-hochregulierter Modulator der Apoptose, Bcl-2 = Bcl-2-Protein, Bax = Bax-Protein.*

Die extrazelluläre Zugabe von Wasserstoffperoxid stellt ein, gerade in der Forschung an Retinazellen, etabliertes Verfahren zur gezielten Induktion von oxidativem Stress dar [48-50]. Auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten Retinadegenerationsmodell handelt es sich um Schweineretinae, welche mit Wasserstoffperoxid oxidativem Stress ausgesetzt wurden.

1.2.3 Oxidativer Stress in der Neuroretina

Der hohe Anteil ungesättigter Fettsäuren in neuronalem Gewebe macht die Neuroretina besonders anfällig für ROS-bedingten Schaden [24]. Demnach spielt ein Minderangebot an Sauerstoff und Nährstoffen, welches als Ischämie bezeichnet wird, eine zentrale Rolle bei vielen Netzhauterkrankungen. Dies trifft etwa auf das Glaukom, oder auf retinale Gefäßverschlüsse zu [51]. Gemein ist der ischämische Zustand und der damit einhergehende vermehrte oxidative Stress innerer Netzhautareale [51].

Das Glaukom stellt mit jährlich ca. 1.000 Neuerblindungen in Deutschland eine äußerst wichtige und häufige Augenerkrankung dar [52, 53]. Es zählt mit ca. 11,2 Millionen visusgeminderten Glaukomekranken im Jahr 2020 zur zweithäufigsten Erblindungsursache der Welt [52, 53]. Das Glaukom stellt eine neurodegenerative Erkrankung dar, welche durch einen pathognomonischen Sehnervenpapillenschaden und einen progredienten Verlust von RGZ, meist mit einem erhöhten Augeninnendruck einhergehend, gekennzeichnet ist [54]. Die genauen Pathomechanismen werden immer noch erforscht. Neben mechanischen und immunologischen Prozessen stellen

auch ischämische Schäden, welche mit erhöhtem oxidativen Stress einhergehen, bei der Erforschung der Pathogenese des Glaukoms zentrale Aspekte dar [54].

Eine weitere relevante Erkrankung stellt der retinale Gefäßverschluss dar, der meist zur unmittelbaren Ischämie und Anstieg des oxidativen Stress im betroffenen Netzhautareal führt [55]. Je nach Lokalisation und Art reichen die Symptome von kleinsten Gesichtsfeldausfällen bis hin zur vollständigen Erblindung [55]. Sie stellen nach der diabetischen Retinopathie die zweithäufigste vaskuläre Erkrankung der Netzhaut dar [55]. Die Inzidenz retinaler Venenverschlüsse liegt bei ca. 0,7 %, die der Zentralarterienverschlüsse liegt bei 0,85 pro 100.000 Einwohner [56]. Es kommt zu einer Schwellung und grau-weiß Verfärbung der minderversorgten Nervenfaserschicht [51]. Vor allem bei der anschließenden Wiederdurchblutung des Gewebes entsteht durch den dann vermehrt vorhandenen Sauerstoff oxidativer Stress, welcher als Reperfusionsschaden bezeichnet wird [57].

Die derzeit zur akuten Behandlung verfügbaren Therapieoptionen von inneren Netzhautischämien sind unbefriedigend. Das hier etablierte Modell simuliert mit Hilfe der künstlichen Erzeugung von oxidativem Stress pathologische Zellzustände, wie sie auch beim Glaukom und der retinalen Ischämie vorherrschen. Dadurch kann dieses Modell als Grundlage für die Erforschung weiterer Behandlungsmethoden dienen.

1.3 Wirkung von Hypothermie

Eine Absenkung der Temperatur auf unter 37 °C wird definitionsgemäß als Hypothermie bezeichnet. In unserem Fall wurde für die Validierung des H₂O₂-Retinadegenerationsmodells eine Hypothermie von 30 °C angewandt.

Die Absenkung der Temperatur zeigte sich aus vielerlei Hinsicht als probates Verfahren, Stoffwechselreaktionen, Inflammationsreaktionen sowie die Apoptose-Aktivität zu beeinflussen. Grundsätzlich ist zu beachten, dass sämtliche intrazelluläre enzymatische Prozesse temperaturabhängig ablaufen, was den Effekt der Hypothermiebehandlung enorm ausweitet [58]. So führt Hypothermie allgemein zu einer Verringerung des Zellstoffwechsels, was eine Reduktion des Sauerstoff- und Glukosebedarfs mit sich bringt. Außerdem führt die Temperaturabsenkung zur Unterdrückung der ischämie-induzierten Inflammationsreaktionen und pro-

inflammatorischer Zytokine [59-61]. Ebenso zieht die geringere Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid eine Reduktion des Reperfusionsschadens nach sich [58, 62]. Untersuchungen haben gezeigt, dass Kühlung die Apoptose-Aktivität der Zellen vermindert, indem die Caspase-3-Aktivität inhibiert wird und gleichzeitig protektive Enzyme, wie Bcl-2, verstärkt exprimiert werden [63, 64]. Diese gravierenden Vorteile führen dazu, dass Hypothermie heute eine gebräuchliche Methode im klinischen Alltag zur Organprotektion bei Transplantationen darstellt, da es die notwendige Ischämietoleranz signifikant erhöht [65].

Tabelle 1: Regulation von Zellvorgängen durch Hypothermie (modifiziert nach Polderman [66]).

Hochregulation durch Hypothermie	Reduktion durch Hypothermie
<ul style="list-style-type: none"> - Aktivierung protektiver Gene - Verbesserte Ischämietoleranz 	<ul style="list-style-type: none"> - Stoffwechsel (ca. 6-10% pro Grad Celsius unter 37 °C) - Ionenpumpendysfunktion (Kalzium-Einstrom) - Produktion von ROS - Apoptose-Aktivität - Mitochondriale Dysfunktion - Reperfusionsschaden - Immunantwort / Neuroinflammation - Gefäßpermeabilität - Durchlässigkeit der Blut-Retina-Schranke - Zerebraler Metabolismus (toxische Metabolite, Azidose)

Bei Anwendung einer systemischen hypothermischen Therapie sind unterschiedliche Nebenwirkungen, wie eine Veränderung der Glukose- und Elektrolytkonzentration der Zellen, Funktionsstörungen der Gerinnungskaskade, ein erhöhtes Infektionsrisiko durch Abnahme der pro-inflammatorischen Zytokine bis hin zu kardialer Hypotension und Bradykardie als mögliche Nebenwirkungen, gezeigt [67-70].

Im Gegensatz dazu ist anzunehmen, dass die systemischen Aus- und Nebenwirkungen einer topischen hypothermischen Therapie, wie etwa bei einer retinalen Spülung, vernachlässigbar gering sind. Schließlich gleicht sich bei einer

hypothermen Spülung der Retina während einer Vitrektomie die Temperatur der Spüllösung an die Körpertemperatur an. Diese Annahme stützt sich auf die Tatsache, dass systemische Auswirkungen selbst bei intravitrealen Medikamentenapplikationen als unwahrscheinlich angesehen werden [71].

Die neuroprotektive Wirkung der Hypothermie spielt in der Forschung der Augenheilkunde eine wichtige Rolle. Gemeinsames Ziel ist der Funktionserhalt retinaler Zellen und die Minimierung des neuronalen Zelltods [72, 73]. So erwies sich im Mausmodell bei transienter retinaler Ischämie eine lokal angewendete Hypothermie, etwa durch Perfusion der Retina mit einer hypothermischen Spüllösung, als erfolgreich [72]. Ebenso konnte im Rattenmodell eine Reduktion des in großen Mengen für Neuronen schädlichen Stickstoffmonoxids (NO) durch Hypothermie nachgewiesen werden [73]. Daher wurde die Behandlung mit Hypothermie zur Validierung dieses Retinadegenerationsmodells als zuverlässige und bewährte Methode ausgewählt.

1.4 Vergleich von Zellkulturmodellen, Tierversuchen und Organkulturmodellen

1.4.1 Zellkulturmodelle

Zellkulturmodelle nehmen bis heute eine zentrale Rolle im Bereich der wissenschaftlichen Forschung ein. Dies betrifft auch retinale Degenerationsmodelle [74-78]. Allerdings bringen Zellkulturen auch gravierende Nachteile mit sich.

Zellkulturen spiegeln durch die Isolation der einzelnen Zelltypen nicht das Vorhandensein und die Interaktion verschiedener Zelltypen innerhalb des Zellverbands samt Extrazellulärmatrix wider. Somit ist weder der Austausch von Neurotransmittern oder elektrischen Signalen zwischen den Synapsen noch der Einfluss von Makroglia- und Mikrogliazellen gegeben. Sie sind dadurch nicht in der Lage, physiologische Zusammenhänge darzustellen oder *in vivo* Methoden vollständig zu ersetzen [79].

Eine besondere Herausforderung stellt die Kultivierung von RGZ dar. Ein Problem der Zellkultur von ZNS-Neuronen stellt die verminderte Fähigkeit nach Isolation zu regenerieren, zu überleben oder Axone auszubilden dar [80]. Hierfür ist unter anderem der Verlust trophischer Reize verantwortlich bzw. die fehlende Fähigkeit der RGZ darauf zu reagieren [80, 81]. Mehrere Studien konnten zeigen, dass bereits nach sieben Tagen 50 % der kultivierten RGZ zu Grunde gehen, weniger als 10 % sind am 14. Tag noch zu detektieren [82-84]. Zwar kann die Hinzugabe von neurotrophen Faktoren den Untergang der RGZ hinauszögern, die Anzahl, Struktur und Funktionsfähigkeit der Dendriten nimmt dennoch in der ersten Woche um 50 % ab [83, 85].

1.4.2 Tierversuche

Tierversuche nehmen in der gesamten medizinischen Forschung eine wichtige Rolle ein und werden auch künftig von Bedeutung sein. Sie ermöglichen die Erforschung physiologischer und pathophysiologischer Prozesse, wie z.B. Degenerationsprozesse [86, 87]. Die hohen regulatorischen Anforderungen, die logistische Komplexität, die hohen Kosten und die vermehrten ethischen Fragestellungen erschweren jedoch die Forschung an lebenden Systemen.

Außerdem können sich die pathophysiologischen Prozesse der künstlichen Krankheitsinduktion von den realen Prozessen der Krankheitsentstehung unterscheiden [88].

Das Glaukom bspw. stellt eine neurodegenerative Erkrankung dar, welche durch einen pathognomonischen Sehnervenpapillenschaden und einen progredienten Verlust von RGZ gekennzeichnet ist [54]. Hierbei ist der intraokulare Druck (IOD) meist, jedoch nicht immer, erhöht [54]. Tiermodelle des Glaukoms basieren meist auf der Erhöhung des IOD durch die Injektion von hypertotonischer Kochsalzlösung, Polystyrolkugeln, Latex, Venenkauterisierung oder Laserphotokoagulation. Dadurch wird der IOD erhöht bzw. der Abfluss des Kammerwassers blockiert [89, 90]. Andere Glaukom-Tiermodelle ohne IOD-Steigerungen basieren auf genetischen Mutationen, mechanischen Traumata des Sehnervs, Injektionen von Stress-Proteinen oder Ischämieinduktionen [91-94]. Weder die Augendruckabhängigen noch die Augendruckunabhängigen Versuchsdesigns reproduzieren somit die Komplexität des Glaukoms [95].

Insgesamt bleibt zu berücksichtigen, dass Entwicklung, Wachstum und anatomischen Strukturen zwischen verschiedenen Spezies teils so erheblich variieren, dass eine Übertragbarkeit von Tiermodellen auf den Menschen oft nicht möglich ist [96, 97].

1.4.3 Organkulturmodelle

Aufgrund der bisher genannten Nachteile an Zellkulturen und Tierversuchen haben Organkulturmodelle in den letzten Jahren in der präklinischen ophthalmologischen Forschung stark an Bedeutung gewonnen [98]. Sie verbinden die Vorteile von reinen Zellkulturexperimenten und *in vivo* Experimenten. So bleiben physiologische Zell-Zell-Interaktionen erhalten und es können gleichzeitig kontrollierte, standardisierte Laborversuchsbedingungen unter Ausschluss ungewollter externer Einflüsse geschaffen werden [99-102]. Des Weiteren können Organkulturmodelle im Sinne des 3-R-Prinzips (*Replacement, Reduction, Refinement*) von William Russel und Rex Burch die Anzahl von Tierversuchen verringern und teilweise ganz ersetzen [103, 104].

Grundlage des hier verwendeten Organkulturmodells war die postmortale Gewebsentnahme von Schlachthoftieren, deren Augen von der Lebensmittelindustrie nicht verwendet werden und normalerweise ungenutzt entsorgt werden. Die große anatomische und physiologische Ähnlichkeit zum menschlichen Auge hinsichtlich der Größe, des retinalen Gefäßsystems sowie der Netzhautstruktur stellt einen erheblichen Vorteil von Schweineretinaorgankulturen gegenüber Organkulturen aus anderen Spezies dar [105, 106]. Hinzukommt, dass durch die große Größe der Schweineaugen mehrere Retinaprobe(n) (bis zu acht) pro Auge entnommen werden können, was die Vergleichbarkeit der Proben sowie deren statistische Korrelation stark begünstigt [107].

Zu beachten bleibt die bei Organkulturen begrenzte Dauer der Kultivierungszeit. Die Axotomie führt zu einem Nährstoffmangel der inneren Netzhaut, welcher bereits nach 24 Stunden Apoptose- und Nekrosemechanismen in RGZ induziert [49, 99, 108-110]. Außerdem sind Adhäsionsmoleküle herunterreguliert, was *in vivo* nicht der Fall ist [111]. Vorarbeiten zu diesem Modell zeigen jedoch eine mögliche Kultivierungsdauer von acht Tagen [112].

1.5 Zielsetzung

Diese Promotionsarbeit hatte das Ziel, ein bestehendes Schweineretina-Degenerationsmodell mit Hilfe des Nachweises von erfolgreicher hypothermischer Therapie zu validieren. Die Behandlung der Retina mit H₂O₂ induzierte eine Zelldegeneration, indem es oxidativen Stress auslöste. Die zeitgleiche Behandlung mit Hypothermie, durch eine Absenkung der Kultivierungstemperatur auf 30 °C, sollte die schädigende Wirkung von H₂O₂ reduzieren und somit neuroprotektiv wirken.

In den Vorversuchen zeigte eine dreistündige Kultivierung mit einer Konzentration von 300 µM H₂O₂ optimale neurodegenerative Effekte [113]. Für diese Promotionsarbeit wurden die Schweineretina-Organokulturen insgesamt fünf Tage kultiviert. Am ersten Tag der Kultivierung erfolgte die dreistündige Behandlung mit H₂O₂ bei 37 °C oder zum Vergleich unter hypothermischen Bedingungen bei 30 °C. Die restlichen Tage wurden die Explantate konstant bei 37 °C kultiviert.

Neben den RGZ, deren Axone den Sehnerv (*Nervus Opticus*) bilden, wurden auch Amakrin- und Bipolarzellen sowie Makroglia- und Mikrogliazellen immunhistologisch untersucht. Ihre Beschaffenheit lässt Rückschlüsse auf die stattgefundenen Apoptoseprozesse zu. Ergänzend wurden die vorhandenen inflammatorischen und apoptotischen Prozesse hinsichtlich der protektiven Effekte von Hypothermie mittels Western Blot Proteinanalysen und qRT-PCR quantifiziert.

Die Analysen der durch oxidativen Stress geschädigten Zelltypen konnten Aufschluss über die Protektionsfähigkeit der hypothermischen Therapie geben. Von Interesse war ebenso die Beeinflussung der Makro- und Mikrogliareaktionen durch Hypothermie. Das Ziel war es, durch hypothermische Behandlung bei 30 °C eine neuroprotektive Wirkung auf RGZ, Amakrin- und Bipolarzellen sowie eine abgeschwächte Immunreaktion zu erreichen. Die Validierung dieses Modells soll dessen Einsatz für künftige, weitere Therapiestudien ermöglichen, und den Einsatz dieses Organokultur-Modells als ernsthafte Alternative zu Tierversuchen in der ophthalmologischen Forschung verifizieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Materialien

Tabelle 2: Verwendete Materialien

Materialien	Hersteller
6/12/24/96-Well Platten "Costar"	SigmaAldrich, Deutschland
Biopsie-Stanze 6mm Cat. No. GS1-128	PMF Medical AG, Deutschland
cDNA Modul Set Multi MACS	Miltenyi Biotec, Deutschland
Deckgläser 22x60 mm Art.: 1-2260/x	R. Langenbrinck GmbH, Deutschland
Deckplatten Shandon	Thermo Scientific, UK
Einbettkassetten, Cryomold intermediate 15x15x5mm	Tissue-Tek Sakura Finetek, Deutschland
Filterpapier Mini Trans-Blot	BIO-RAD, USA
Filterpapier Mini-Trans Blot Filter Paper	BIO-RAD, USA
Kipptisch CAT ST5	Zipperer GmbH, Deutschland
Mikroschere Cat. No. G-19776	Geuder AG, Deutschland
Mikrotom Blade Stainless Steel S35	Feather, Japan
mRNA Modul Set f. cDNA Syn. Multi MACS	Miltenyi Biotec, Deutschland
Nitrozellulose Membran 0,2 µm	GE Healthcare, USA
Objektträger, Microscope Slides 25x75x1 mm Art. 03-0070	R. Langenbrinck GmbH, Deutschland
Parafilm	Bemis, USA
Petrischalen: Ø 60mm und Ø 18 cm	Orange Scientific, Deutschland
Pinzetten Cat.No. 3-SA Cat. No. 5-SA	Outils Rubis SA, Schweiz
Pipetten Research Plus 10/100/200/1000 µl	Eppendorf AG, Deutschland
Pipettenspitzen Eppendorf, Costar 2ml, Pyrogenic	SigmaAldrich, Deutschland
Polyacrylamidgel, NuPAGE 12% Bis-Tris-Gel	Novex, USA
Polypropylen Röhrchen Cellstar	Greiner Bio One, Österreich
Protein Gel Mini Protean TGX 10 %	BIO-RAD, USA
Proteinbestimmungs Set Pierce BCA	Thermo Scientific, UK
Schaumstoffschwamm Cat. No. Ei9052	Invitrogen, Deutschland
Skalpell Surgical Disposable	Aesculap AG, Deutschland
Super Frost Plus Objektträger 25x75x1mm	R. Langenbrinck GmbH, Deutschland
Zellkultur Einsätze (Cell culture inserts) Ø 30mm	Millipore Merck KGaA, Deutschland
Zellkultur Einsätze Cellstar THINCERT Platte	Greiner Bio One, Österreich
Zellkultur Einsätze Cellstar THINCERT Ø 0,4 µm	Greiner Bio One, Österreich
Zellkultur Röhrchen Safe-Lock 0,5/1,5/2,0 mL	Eppendorf AG, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
2-Mercaptoethanol min. 98% M3148	SigmaAldrich, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	SERVA, Deutschland
Albumin fraktioniert (pH 7.0)	Appllichem, Deutschland
Bis-Tris	SigmaAldrich, Deutschland
Di-Natrium-Hydrogenphosphat	Roth, Deutschland
Eosin	Merck, Deutschland
Essigsäure 99-100%	Merck, Deutschland
Ethanol 99 %	J.T. Baker, Niederlande
Ethanol 96 %	VWR, Belgien
Ethanol 70 %	Waldeck, Deutschland
Eukitt	O-Kindler, Deutschland
Eindeckmedium Fluor Save	Millipore Merck KGaA, Deutschland
Gibco B-27 Serum-freier Zusatz	Life Technologies Corp, USA
Gibco L-Glutamin, 200 mM	Life Technologies Corp, USA
Gibco N2 Zusatz	Life Technologies Corp, USA
Gibco Neurobasal-A-Medium	Life Technologies Corp, USA
Glycin 99%	Roth, Deutschland
Hämalaunlösung	Merck, Deutschland
Kalium-Dihydrogenphosphat	Merck, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Deutschland
Methanol 99 %	Roth, Deutschland
Natriumchlorid	VWR, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom GmbH, Deutschland
Protein-Kaleidoskop Precision Plus	BIO-RAD, Deutschland
Protease Inhibitor	SigmaAldrich, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	SigmaAldrich, Deutschland
Trizma Base	SigmaAldrich, Deutschland
Triton X-100	SigmaAldrich, Deutschland
Tween-20	SigmaAldrich, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Deutschland
Xylol	J.T. Baker, Niederlande

2.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer u. Lösungen	Inhalte
0,1 % PBS-TX	10 µl Triton X-100 + 10 ml 1x PBS
10x PBS-Puffer (pH 7,4)	80 g Natriumchlorid + 2 g Kaliumchlorid + 14,4 g Di-Natrium-Hydrogenphosphat + 2,4 g Kalium-Dihydrogenphosphat + mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt
1x PBS-Puffer (pH 7,4)	100 ml 10x PBS + 900 ml Aqua dest.
Blockpuffer 5 %	2,5 g BSA in 50 ml PBS
Eosinstammlösung	1 g Eosin in 100 ml Aqua dest.
Eosinlösung	1 ml Stammlösung + 100 ml Ethanol (99 %)
PBS-T (Waschpuffer)	500 ml PBS + 250 µl Tween-20
Rinderserumalbuminstandardlösung	2 mg/ml BSA in 1ml NaCl (0,9 %)
TBS Stocklösung (pH 7,6)	60,57 g Trizma Base + 87,66 g NaCl + mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt
TBS-T	100 ml TBS Stocklösung + 899 ml Aqua dest. + 1 ml Tween-20
Wasserstoffperoxid-Stocklösung (100 mM)	2,5 µl H ₂ O ₂ + 247,5 µl H ₂ O
Wasserstoffperoxid-Kulturmedium 300 µM	285 µl H ₂ O ₂ Stocklösung + 9715 µl Neurobasal-A-Medium

2.1.4 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper in der Immunhistochemie

Primäre Antikörper Immunhistochemie			
Antigen	Wirtspezies	Verdünnung in 5% BSA in PBS	Hersteller, Land
ChAT	Kaninchen	1 : 400	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland
GFAP	Kaninchen	1 : 4.000	Dako Agilent, USA
Iba1	Huhn	1 : 400	Synaptic Systems, Deutschland
iNOS	Kaninchen	1 : 50	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
NeuN	Kaninchen	1 : 300	Abcam, UK
PKC-alpha	Maus	1 : 500	Novus Biologicals, Deutschland

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper in der Immunhistochemie

Sekundärantikörper Immunhistochemie					
Antigen	Wirt- spezies	Zielspezies	Farbstoff	Verdünnung in 5% BSA in PBS	Hersteller, Land
Goat anti-Rabbit IgG	Ziege	Kaninchen	Alexa	1 : 2.000	Thermo
Goat anti-Chicken IgY	Ziege	Huhn	Fluor 488	1 : 400	Fisher
Goat anti-Rabbit IgG	Ziege	Kaninchen	Alexa	1 : 600	Scientific,
Goat anti-Mouse IgG	Ziege	Maus	Fluor 555	1 : 2.000	Deutschland

Tabelle 7: Verwendete primäre Antikörper in den Western Blot Proteinanalysen

Primäre Antikörper Western Blot			
Antigen	Wirtspezies	Verdünnung in 5% BSA in TBST	Hersteller, Land
β-Aktin	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Deutschland
β-Aktin	Maus	1:1000	
Bax	Kaninchen	1:1000	
Bcl-2	Kaninchen	1:1000	
GFAP	Kaninchen	1:1000	
NF-κB	Maus	1:1000	Elabscience, USA
PUMA	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Deutschland

Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper der Western Blot Proteinanalysen

Sekundärantikörper Western Blot					
Antigen	Wirt- spezies	Zielspezies	Farbstoff	Verdünnung in 5% BSA in TBST	Hersteller, Land
IRDye 680 RD Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	Ziege	Kaninchen	IR-Dye 680 RD	1:10.000	LI-COR Bioscience, Deutschland
IRDye 800 CW Goat anti-Mouse IgG (H+L)	Ziege	Maus	IR-Dye 800 CW	1:10.000	

2.1.5 Geräte

Tabelle 9: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Barnstead Gen Pure Pro	Thermo Fisher Scientific, USA
BIO-RAD CFX96 Real-Time System	BIO-RAD, USA
BIO-RAD Power PAC 300	BIO-RAD, USA
Brutschrank, CO ₂ -Inkubator Heraeus Function Line B6	Thermo Fisher Scientific, USA
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Z1 Inverted	Carl Zeiss AG, Deutschland
Fluoreszenztomograph Li-COR ODYSSEY, Model 2800	LI-COR Bioscience, Deutschland
Heizplatte/Rührer COMBIMAG RCT	IKA, Deutschland
Leica CM1850 Kryostat	Leica Biosystems, Deutschland
Magnet-aktivierte Zellseparation MultiMACS	Miltenyi Biotec, Deutschland
Mikroplattenleser Nano Quant infinite M200	Tecan Group AG, Schweiz
pH-Meter inoLab 100	inoLab, Deutschland
Schüttler Minuteni Blot Mixer	VWR, Deutschland
Vortexer Lab Dancer	VWR, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 8R	Thermo Fischer Scientific, USA
Zentrifuge Mega star 3.0 R Laboratory	VWR, Deutschland
Zentrifuge Mini G	IKA, Deutschland

2.1.6 Software

Tabelle 10: Verwendete Software

Software	Hersteller
Axio Vision Rel. 4.8.	Carl Zeiss AG, Deutschland
CFX Manager Software 3.1	BIO-RAD, USA
GraphPad PRISM 6	GraphPad Software, USA
i-Control 1.6	Tecan Group AG, Schweiz
ImageJ, Version 1.5	Wayne Rasband, USA
Software Image Studio Ver. 4.0	LI-COR Bioscience, USA
Odyssey Infrared Imaging System V2	LI-COR Bioscience, USA
Zen 2012	Carl Zeiss AG, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Verwendung von tierischen Nebenprodukten

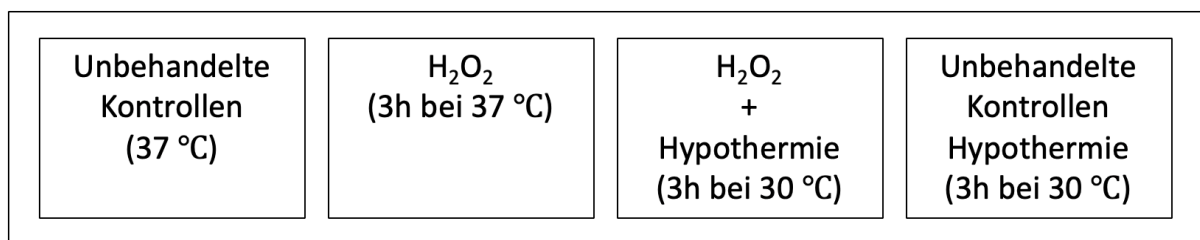
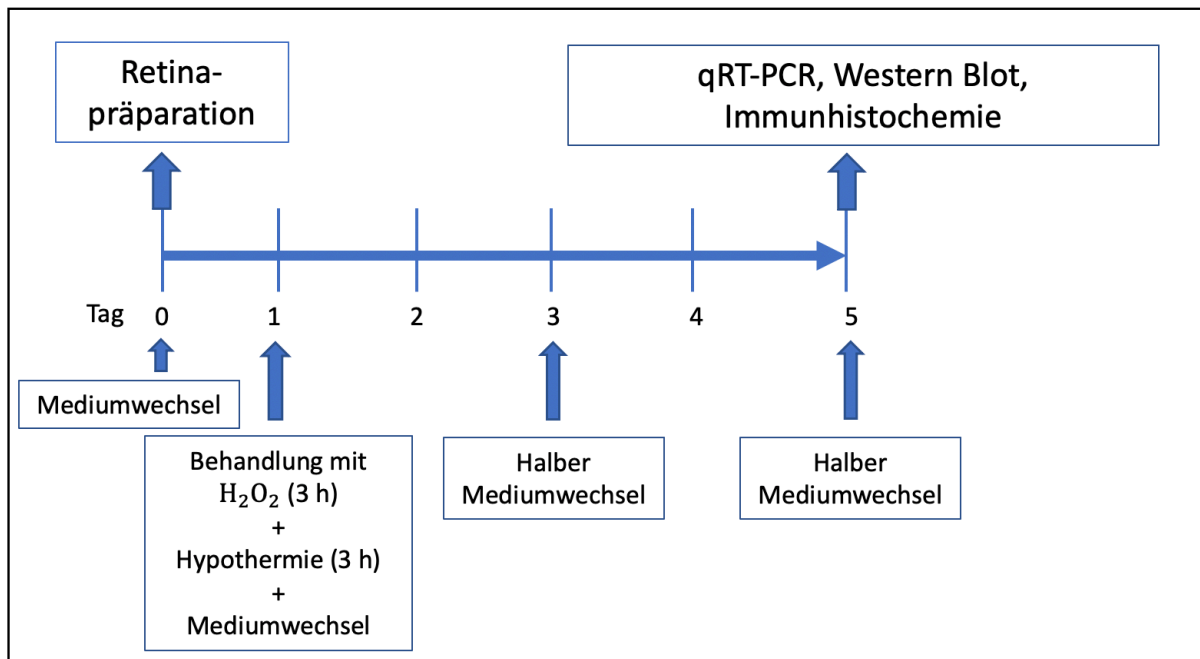
Für die Gewinnung der Retinae wurden Schweineaugen verwendet, welche von einem lokalen Schlachthof (Bochumer Fleischhandel) bezogen wurden. Die Tiere wurden hierfür bei 2 °C mit 80-90%igem CO₂ betäubt und euthanasiert [114]. Unmittelbar nach dem Tod wurde die Enukleation vorgenommen und die Augen auf Eis transportiert. Die Registrierung des Knappschaftskrankenhauses Universitätsaugenklinik Bochum bei der Stadt Bochum und der Universitätsaugenklinik Tübingen bei dem Landkreis Tübingen zur Verwendung tierischer Nebenprodukte gem. Art. 23 VO (EG) 1069/2009 lag vor Beginn der Studiendurchführung schriftlich vor (Registrierungs-Nr. DE 05 911 00 29 21 und DE 08 416 1123 21).

2.2.2 Organkulturen von Retinaexplantaten

Vor Beginn der Präparation wurden die Schweineaugen in 70%igem gekühltem Ethanol (Waldeck GmbH & Co. KG, Deutschland) desinfiziert und anschließend in gekühlter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Biochrom GmbH, Deutschland) gewaschen. Nach dem Entfernen vorhandener Gewebereste, erfolgte die Eröffnung des Bulbus unter sterilen Bedingungen mittels Skalpell (Aesculap AG, Deutschland) und Schere (Geuder AG, Deutschland). Zunächst erfolgte die Entfernung von Kornea, Linse und Glaskörper. Der Augenbecher wurde durch vier Schnitte in vier ähnlich große Segmente aufgeteilt und kleblattförmig aufgeklappt. In einer mit PBS gefüllten Petrischale wurde mit einer Hautstanze ($\varnothing=6,0$ mm) (PMF Medical AG, Deutschland) pro Segment ein Retinaexplantat ohne das darunter liegende RPE entnommen. Die Stanzen wurden einzeln in Zellkultureinsätzen (0,4 µm, $\varnothing=30$ mm) (Greiner Bio One, Österreich) in eine sechs-Well Platte (SigmaAldrich, Deutschland) überführt. Die Nährstoffversorgung wurde mit 1 ml Kulturmedium (Merck, Deutschland), bestehend aus Neurobasal A + 10 % B27 + 10 % N2 + 10 % Penicillin/Streptomycin + 0,8 mM L-Glutamin, je Explantat sichergestellt. Die Kultivierung fand in einem Inkubator bei konstanten 37 °C mit 5 % CO₂ statt.

Bei einer Testgruppe wurde einen Tag nach der Präparation eine Inkubation mit H₂O₂ für drei Stunden durchgeführt. Hierbei wurde eine H₂O₂-Lösung mit einer Konzentration von 100 mM mit H₂O und Neurobasal A zu einem H₂O₂-haltigem Kulturmedium mit einer Konzentration von 300 µM verdünnt. Bei der zweiten

Testgruppe fand diese dreistündige Inkubation mit H_2O_2 -haltigem Medium zeitgleich unter hypothermischen Bedingungen ($30\text{ }^\circ\text{C}$, Raumluft) statt. Die Kontrollgruppen mit $37\text{ }^\circ\text{C}$ und $30\text{ }^\circ\text{C}$ wurden ausschließlich mit reinem Kulturmedium kultiviert. Am Tag null, drei, fünf bzw. direkt nach der Exposition mit H_2O_2 -haltigem Medium fand ein Mediumwechsel statt. Am fünften Tag wurden die Proben für weitere Analysen geerntet und bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$ schockgefroren. Die Effekte der Inkubation mit H_2O_2 in Kombination mit hypothermischer Behandlung wurden mittels Immunhistochemie, qRT-PCR- sowie Western-Blot-Analysen untersucht.

A**B****Abbildung 4: Studiendesign**

A Die Explantate wurden in vier Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe, welche bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ mit H_2O_2 -haltigem Medium behandelt wurde, eine Gruppe, welche unter hypothermischen Bedingungen ($30\text{ }^\circ\text{C}$) mit H_2O_2 -haltigem Medium kultiviert wurde und zwei unbehandelte Kontrollen bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $30\text{ }^\circ\text{C}$. **B** Alle Retinae wurden am ersten Postexplantationstag entweder bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ oder bei $30\text{ }^\circ\text{C}$ mit $300\text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 -enthaltendem Medium für die Dauer von drei Stunden kultiviert. Die Kontrollgruppe mit $37\text{ }^\circ\text{C}$ und die Kontrollgruppe mit $30\text{ }^\circ\text{C}$ enthielten ein H_2O_2 -freies Medium. Nach dem 100%igen Mediumwechsel

direkt nach der Präparation sowie im Anschluss an die H₂O₂- bzw. Hypothermiebehandlung am Tag 1, erfolgte im Abstand von zwei Tagen jeweils ein halber Mediumwechsel. Pro Gruppe und pro Analyseverfahren (qRT-PCR, Western Blot, Immunhistochemie) wurden n = neun Proben kultiviert. h = Stunde(n), qRT-PCR = quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion.

Je nach Art der konsekutiven Probenanalyse wurden die Explantate zur späteren Verwendung aufbewahrt. Proben für PCR- und Western Blot – Analysen wurden in 1,5 ml große Eppendorfgefäße (Eppendorf AG, Deutschland) überführt und bei -25 °C tiefgefroren. Die Proben für immunhistochemische Analysen wurden zunächst für 15 min mit 4 % Paraformaldehyd (Merck, Deutschland) fixiert, dann für 15 min in 15% Succhrose (Merck, Deutschland) und 30 min in 30% Succhrose (Merck, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Retinaexplantate in Einbettkassetten (Sakura Finetek, Deutschland) mit Tissue-Tek (Sakura Finetek, Deutschland) eingebettet und mit Hilfe von Flüssigstickstoff bei -25 °C tiefgefroren.

2.2.3 Immunhistochemie

Die Methodik der Immunhistochemie dient dazu, Proteine durch spezifische Antikörperbindungen zu quantifizieren. Hierzu wurden die in Tissue-Tek gefrorenen Retinaprobe mittels eines Kryostats in 14 µm Schnitte geschnitten. Diese Kryoschnitte wurden auf Objektträger (R. Langenbrinck GmbH, Deutschland) aufgetragen und bis zur weiteren Verwendung für Antikörperfärbungen eingefroren.

Vor der Hinzugabe von Antikörpern wurden die Gewebsschnitte eine Stunde mit einer Blocklösung (mit 5 % Rinderserumalbumin) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Die Immundetektion erfolgt durch Bindung eines Antikörpers an das spezifische Antigen. Dieser inkubiert über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Dunkelkammer. Anschließend erfolgt die Hinzugabe eines fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers, welcher gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Dieser haftet dann an dem primären Antikörper und macht ihn bei Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Der Nachweis von RGZ erfolgte mit Antikörpern gegen das neuronspezifische Zellkernantigen (NeuN), der Nachweis von Makroglia (Astrozyten) mit Antikörpern gegen saures Gliafaserprotein (GFAP) [116]. Antikörper gegen die Choline

Acetyltransferase (ChAT) und Proteinkinase C ($PKC\alpha$) wurden zur Detektion von Amakrinzellen bzw. Bipolarzellen verwendet [117, 118]. Ruhende Mikroglia wurden mit einem Antikörper gegen den mikroglia-spezifischen Kalziumligand (Iba1) nachgewiesen, aktive Mikroglia konnten mit einem Antikörper gegen die Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) kenntlich gemacht werden [119, 120]. Zellkerne wurden mit 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht der durchgeführten Maßnahmen der immunhistochemischen Färbung; AK = Antikörper, Aqua dest. = destilliertes Wasser, min = Minute(n), RT = Raumtemperatur.

Maßnahme	Lösung	Inkubation
Waschen	TBS-T	1-2 min, RT
	10 % BSA in PBS	
Blocken	+ 0,1 % Triton	60 min, RT
Inkubation 1. AK	s. Tabelle 5	über Nacht, 4 °C
3 x Waschen	TBS-T	Je 5 min, RT
Inkubation 2. AK	s. Tabelle 6	Dunkelkammer, 90 min, RT
3 x Waschen	TBS-T	Je 5 min, RT
Inkubation DAPI	DAPI (0,01 µg/ml)	Dunkelkammer, 5 min, RT
2 x Waschen	TBS-T	Je 5 min, RT
1 x Waschen	Aqua dest.	5 min, RT

Die Objektträger wurden im Dunkeln bei 400-facher Vergrößerung im Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Fluoreszenzmikroskop Zeiss Z1 Inverted, Carl Zeiss AG, Deutschland) analysiert. Es wurden pro Färbung 324 Retinaabschnitte (81 Retinaabschnitte pro Gruppe) analysiert. Die Zellzählung der RGZ, Amakrin- und Bipolarzellen sowie Mikrogliazellen erfolgte mittels ImageJ (Version 1.5, Wayne Rasband, USA). Ausgewertet wurde die Anzahl der Zellen pro mm, wobei nur diejenigen Zellen in die Bewertung einfließen, welche eine Kolo-kalisation mit DAPI aufwiesen. Aus der Anzahl der zehn einzelnen Bilder pro Gewebeexplantat wurde anschließend pro Versuchsgruppe ein arithmetischer Mittelwert an positiven RGZ gebildet. Die Auswertung der glialen Intermediärfilamente, welche mittels GFAP gefärbt wurden, erfolgte durch eine Flächenauswertung der Signale. Hierzu erfolgte die Messung der Signale pro Fläche des Bildausschnitts mittels ImageJ. Auch hier

erfolgte die Bildung des arithmetischen Mittels pro Gewebeexplantat und pro Versuchsgruppe.

Hämatoxylin-Eosin-Färbungen

Die Hämatoxylin-Eosin Doppelfärbung (HE-Färbung) färbt negativ geladene Zellkomponenten, wie die DNA als Kernsäure oder extrazelluläre Proteoglykane durch Hämatoxylin blau-violett, faserige extrazelluläre Komponenten durch Eosin rot [121]. Somit führt die HE-Färbung zu einer differenzierten Darstellung der retinalen Zellverbände. In Tabelle 12 sind die Arbeitsschritte der Färbung aufgeführt.

Tabelle 12: Übersicht der durchgeführten Maßnahmen zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung; *Aqua dest.* = destilliertes Wasser, *min* = Minute(n), *RT* = Raumtemperatur.

Maßnahme	Lösung	Inkubation
Inkubation	Hämalaun	3 min, RT
Waschen	Aqua dest.	1 min, RT
Inkubation	Eosin	2 min, RT
Entwässerung	70 % Ethanol	30 sec, RT
2 x Entwässerung	96 % Ethanol	Je 1 min, RT
Entwässerung	99 % Ethanol	5 min, RT
Inkubation	Xylol	5 min, RT
Waschen	Aqua dest.	1 min, RT
Eindecken	Eukitt	30 min, RT

Die gefärbten Schnitte wurden bei 400-facher Vergrößerung im Durchlicht-mikroskop analysiert. Es wurden 224 Retinabilder (Acht Retinae pro Gruppe, Sieben Bilder pro Retina) untersucht. Vor der Auswertung wurden die Dateinamen in eine randomisierte Zahl umgewandelt, um die Zugehörigkeit zu den Behandlungsgruppen zu maskieren. Somit wurde eine objektive Bewertung sichergestellt. Anschließend wurde die neuroretinale Breite, d.h. der Abstand von dem äußeren Rand der Photorezeptorzellen bis zu der retinalen Ganglienzellschicht gemessen. Für jeden Querschnitt wurden drei Schichtdickenmessungen vorgenommen, um intraretinale Schwankungen auszugleichen. Die Messwerte wurden anschließend gemittelt.

2.2.4 Western Blot Proteinanalysen

Die Western Blot Proteinanalyse dient dazu, Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen, auf eine Trägermembran zu übertragen (engl. Blotting) und anschließend mit unterschiedlichen Antikörpern sichtbar zu machen und zu quantifizieren.

Zur Vorbereitung auf den Western Blot wurden die Gewebeexplantate mit Lysepuffer (RIPA-Puffer, Cell Signaling Technology, USA) lysiert. Eine anschließende Zentrifugation trennt die nun freigesetzten Proteine, welche sich dann im Überstand befinden, von restlichen Zellbestandteilen. Mit Hilfe eines Bicinchoninsäure (kurz: BCA) Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, USA) wurde die Proteinkonzentration des Überstands bestimmt, um 10 µg Protein pro Geltasche auftragen zu können. Die BCA-Reaktion führt in alkalischer Lösung zu einer Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} durch Proteine. Die einwertigen Kupferionen führen mit BCA als Komplexbildner zu einer Violettfärbung, welche eine starke Absorption bei 562 nm aufweist [122]. Die Menge der Absorption bei 562 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Um die Konzentration des Proteingemischs exakt zu bestimmen, wurde eine Standardproteinkonzentration aus Rinderalbumin (BSA Protein Assay Standards, Thermo Fisher Scientific, USA) zur Kalibrierung verwendet.

Die Proben wurden durch eine 45-minütige Gelelektrophorese mit 10%igem Natriumdodecylsulfat (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) bei einer konstanten Spannung von 200 V der Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurde ein einstündiger Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran (GE Healthcare, USA) bei konstanten 350 mA durchgeführt. Die Immundetektion der jeweils gesuchten Proteine erfolgt durch Bindung eines spezifischen ersten Antikörpers an das gesuchte Antigen. Der Nachweis von Makroglia (Astrozyten) erfolgte mit Antikörpern gegen GFAP [116]. Die Bindung von Antikörpern gegen NF-κB, PUMA und Bax/Bcl-2 spiegelte die Inflamationsreaktion bzw. das Apoptoseverhalten wider [40, 43, 123]. Je Blot wurden die gemessenen Proteinbanden stets auf das Kontrollprotein β-Aktin relativiert. Die fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper, welche an die Primärantikörper binden, wurden am Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Bioscience, Deutschland) detektiert. Gemessen wurde mit einer Wellenlänge von 700 nm und 800 nm sowie einer Belichtungszeit von jeweils fünf Minuten. Dann wurden die Bandenintensitäten, welche Aufschluss über die jeweilige Proteinexpression

geben, gemessen. Die korrekte Identifizierung der Proteine wurde durch einen Standardmarker (Kaleidoscope, Precision Plus von BIO-RAD) sichergestellt.

Tabelle 13: Übersicht der auf dem Kipptisch durchgeführten Maßnahmen zur Immundetektion in den Western Blot Proteinanalysen; AK = Antikörper, min = Minute(n), RT = Raumtemperatur.

Maßnahme	Lösung	Inkubation
Blocken	5% BSA in TBS-T	60 min, RT
Inkubation 1. AK	s. Tabelle 7	über Nacht, 4°C
3 x Waschen	TBS-T	5, 10, 15 min, RT
Inkubation 2.AK	s. Tabelle 8	60 min, RT
3 x Waschen	TBS-T	5, 10, 15 min, RT

2.2.5 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (kurz: qRT-PCR) dient dazu spezifische Genexpressionen von Zellen zu quantifizieren. Hierbei wird mRNA in cDNA transkribiert und anschließend werden spezifische DNA-Abschnitte exponentiell vervielfältigt, mit dem Ziel, die Genexpression zu eruieren.

Zur Vorbereitung auf die qRT-PCR wurden die bei -25°C gelagerten Gewebe mit Lysepuffer (Lysis Buffer, Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland) lysiert, um die mRNA frei zu setzen. Mit Hilfe eines mRNA Isolation Kits (MultiMACS mRNA Isolation Kit, Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland) wurde die mRNA isoliert. Hierzu wurden 30 µl Oligo(dT)-konjugierte superparamagnetisierte Partikel (Oligo(dT) MicroBeads) hinzugefügt, die mit dem Poly-A-Schwanz der mRNA hybridisieren. Die magnetisierte mRNA bindet dann in einem temperierbaren Magnet-Separator an magnetisch geladene Säulen und wurde somit isoliert (MultiMACS mRNA Isolation Kits User Manual, Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland). Direkt im Anschluss erfolgte mit Hilfe einer reversen Transkriptase (MultiMACS cDNA Synthesis Kit, Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland) in den Magnetsäulen die cDNA Synthese aus der isolierten mRNA. Nicht-gebundene Nukleotide, mRNA-Rückstände und frei gelöste Beads wurden ausgewaschen, sodass die pure cDNA zur weiteren Verwendung zur Verfügung stand. Anschließend erfolgte eine Nukleinsäure-Quantifizierung mit Hilfe von Lumineszenzmessungen bei 260 – 280 nm am Microplate-Reader (infinite M200,

TECAN Group AG, Schweiz). Vor dem Start der qRT-PCR wurde dann die Konzentration der cDNA auf 1 ng/µl verdünnt. Die Konzentration der Primer wurde auf 1 µM verdünnt. Mit Hilfe von Primern und thermostabilen DNA-Polymerasen (BIO-RAD, Deutschland) konnten gezielt spezifische Sequenzen der cDNA amplifiziert werden. Zur Detektion der DNA wurde der Farbstoff SYBR Green (SYBR Green Master Mix, BIO-RAD, Deutschland) verwendet. DNA-freie Kontrollreaktionen schlossen durch fehlende Primerbindungen das Vorhandensein von DNA-Kontaminationen aus.

Grundsätzlich besteht der PCR-Prozess aus drei Schritten. Zuerst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzung in zwei einzelne Stränge aufgetrennt („Denaturierung“). Als nächstes lagern sich die spezifischen Primer an jeweils definierte DNA-Abschnitte an („Primer Annealing“) und initiieren somit den Start der jeweiligen Polymerisation, d.h. die Erstellung des komplementären Gegenstrangs durch die DNA-Polymerasen („Primer Extension“). Während einem PCR-Zyklus finden bei der quantitativen real-time PCR Fluoreszenzmessungen statt und ermöglichen anhand der Stärke der Fluoreszenz eine Quantifizierung der gewonnenen DNA. Dieser Prozess wurde 42 Mal hintereinander ausgeführt, was zu einer exponentiellen Vervielfältigung der spezifischen DNA-Abschnitte geführt hat.

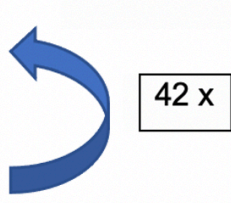
Zyklus 1	initiale Denaturierung	3 min	95°C	
Zyklus 2	Denaturierung	10 sec	95°C	
Zyklus 3	Primer Annealing	30 sec	60°C	
Zyklus 4	READING			
Zyklus 5	Primer Extension	31 sec	65°C	
Zyklus 6	abschließende Synthese	5 sec	65°C	

Abbildung 5: Zyklusablauf der quantitativen real-time PCR.

Der Ablauf bestand aus 42 Zyklen. Min = Minuten, sec = Sekunden.

Die relative Expression der nervenfaserspezifischen Enzyms Protein-Gen-Produkt 9.5 (PGP9.5) mRNA spiegelt die Menge der noch vorhandenen RGZ direkt wider [124-128]. Die Menge der exprimierten Gene *Caspase 8*, *p21*, *VEGF*, *HSP70*, *HIF* und *Bax/Bcl-2* lassen Rückschlüsse auf die neuronale Aktivität, Entzündungsreaktionen, und Apoptosen zu [21, 39, 113, 123, 128-130]. Zur Quantifizierung der Genexpressionen wurde die Pfaffl Methode (auch: $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode) [131] als etablierte

Berechnungsmethode verwendet und alle gemessenen Werte durch die Expression der *Housekeeping* Gene (β -Aktin und Histon H3) geteilt.

Tabelle 14: Verwendete Primer der quantitativen real-time PCR mit zugehöriger Oligonukleotidsequenz. qRT-PCR = quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion; for = forward Primer; rev = reverse Primer; PGP9.5 = Protein-Gene-Produkt 9.5; Caspase 8 = Cysteinprotease 8; p21= Tumorsuppressorgen p21; VEGF= Vascular Endothelial Growth Factor; HSP70= Hitzeschockprotein 70; Bax = Bax-Protein; Bcl-2 = Bcl-2-Protein; HIF1 α = Hypoxie-induzierter Faktor 1 alpha; β -Aktin = β -Aktin-Protein; Histon H3 = Histon-Protein H3.

qRT-PCR Primer-Paare	
Gen	Oligonukleotidsequenz (5' – 3')
<i>PGP9.5 for</i>	TCTCCCTCCATGGTGAAAAG
<i>PGP9.5 rev</i>	ATCAGAGGCCAACATCCAAC
<i>Caspase 8 for</i>	GCCCAGATCTCTGCCTACAG
<i>Caspase 8 rev</i>	CAGGGCCTTGTTGTTTGT
<i>p21 for</i>	GACCCTCAGAAGAGCCACAG
<i>p21 rev</i>	GTCGAAGTTCATCGCTCTC
<i>VEGF for</i>	CTACCTCCACCATGCCAAGT
<i>VEGF rev</i>	ACACTCCAGACCTTCGTCGT
<i>HSP70 for</i>	ATGTCCGCTGCAAGAGAAGT
<i>HSP70 rev</i>	GGCGTCAAACACGGTATTCT
<i>Bax for</i>	AAGCGCATTGGAGATGAACT
<i>Bax rev</i>	AAAGTAGAAAAGCGCGACCA
<i>Bcl-2 for</i>	AATTACCATCGGCGTAGTGC
<i>Bcl-2 rev</i>	CGTTTCAGCCACCGTAAAAT
<i>HIF1 α R.n. for 577</i>	TCAAGTCAGCAACGTGGAAG
<i>HIF1 α R.n. rev 774</i>	TATCGAGGCTGTGTCGACTG
Housekeeping Gene	
<i>β-Aktin for</i>	GGAGTCTCTCCGATCTGTGC
<i>β-Aktin rev</i>	ATCGGGGAAGAAAGGACAGT
<i>Histon H3 for</i>	ACTGGCTACAAAAGCCGCTC
<i>Histon H3 rev</i>	ACTTGCCTCCTGCAAAGCAC

2.2.6 Statistische Auswertungen

Die statistischen Analysen und das Erstellen der Graphen erfolgten mit *GraphPad PRISM* (Version 6.0). Bei allen Auswertungen wurde ein *post hoc one-way-ANOVA Dunnett's Multiple Comparison* Test durchgeführt. Mit Hilfe dieses Tests wurden die einzelnen Gruppenmittelwerte der verschiedenen Behandlungsgruppen mit denen der Degenerationsgruppe (37 °C, H₂O₂-behandelt) verglichen, um signifikante Gruppenunterschiede zu evaluieren. In dieser Arbeit wurden die Gruppenunterschiede als „signifikant“ gewertet, sobald der p-Wert den Wert 0,05 unterschreitet. Die Kennzeichnung der unterschiedlichen Signifikanzniveaus erfolgte bei $p < 0,05$ mit (*), bei $p < 0,01$ mit (**) und bei $p < 0,001$ mit (***). Der Standardfehler des Mittelwerts (\pm SEM) wurde durch einen vertikalen Fehlerbalken angezeigt, die Mittelwerte durch eine horizontale Linie.

3. Ergebnisse

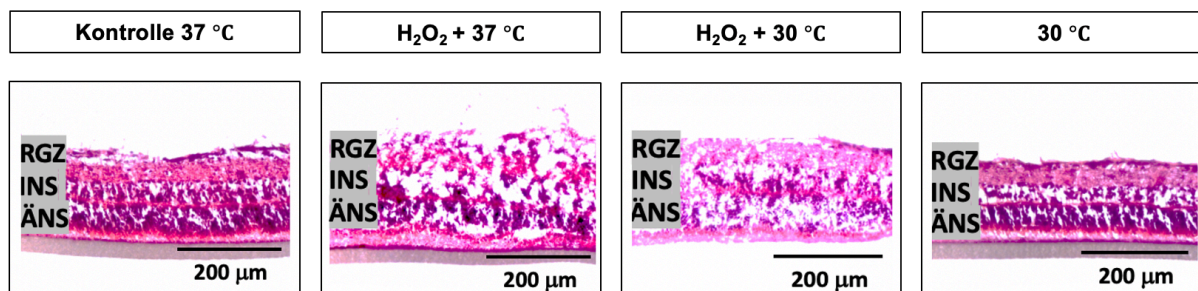
Die kultivierten Schweineretinae wurden nach Beendigung der Kultivierung hinsichtlich der durch oxidativen Stress und Hypothermie hervorgerufenen Auswirkungen auf die Zellstruktur und die Proteinexpressionen untersucht. Von besonderem Interesse waren die Auswirkungen auf die RGZ, Amakrin- und Bipolarzellen sowie auf die strukturelle Erscheinung der Retina. Des Weiteren wurden inflammatorische und proapoptotische Effekte anhand der Makro- und Mikrogliareaktionen sowie der Proteinexpressionen untersucht.

3.1 Erhalt der Zellstruktur und Zellverbände durch Hypothermie

Die Kontrollgruppen wiesen eine kompakte und geordnete Retinastruktur mit klaren Abgrenzungen der einzelnen Zellschichten auf. Die Degenerationsgruppe mit hypothermischer Behandlung fiel durch erkennbare Inkonsistenzen der Retinaschichten und einer schlechteren Abgrenzbarkeit der Zellreihen auf. Die normotherm degenerierten Retinaschnitte waren geprägt von offensichtlichen Auflösungen der Zellverbände inklusive starken Zellverlusten (Abb. 6A).

Um die Auswirkungen der H₂O₂-Degeneration und der kombinierten hypothermischen Behandlung reproduzierbar zu beurteilen, wurde eine verblindete Schichtdickenmessung vorgenommen. Die einzelnen Gruppen zeigten je nach Behandlung eine teils sehr unterschiedliche Dicke. Die Retinaschnitte der Degenerationsgruppe mit 37 °C waren deutlich aufgequollen und verzerrt, was zu einer signifikanten Zunahme der Retinadicke von 261 µm (± 49 µm) in den Kontrollen auf 319 µm (± 53 µm) führte (p<0,001). Die Behandlung mit Hypothermie und H₂O₂ stellte sich mit einer Retinadicke von 284 µm (± 90 µm) im Vergleich zur normothermen Degenerationsgruppe mit 319 µm (± 53 µm) (p<0,01) kompakter dar. Eine hypothermische Behandlung ohne H₂O₂ (265 µm, ± 42 µm) wies keine Unterschiede zur Kontrollgruppe auf (261 µm, ± 49 µm) und unterschied sich somit signifikant von der Degenerationsgruppe (p<0,001) (Abb. 6B).

A Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Neuroretina



B

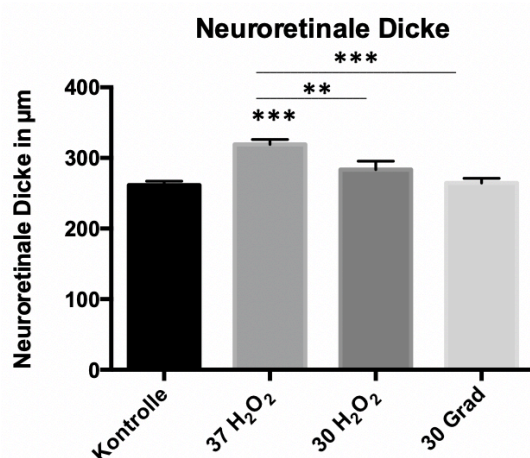


Abbildung 6: Analyse der Zellstruktur der Neuroretina **A** Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Neuroretina. RGZ = retinale Ganglienzellen, INS = innere nukleäre Schicht, ÄNS = äußere nukleäre Schicht, µm = Mikrometer. **B** Die durchschnittliche neuroretinale Dicke war in der H₂O₂-Gruppe mit 37 °C signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen ($p < 0,001$). Die hypothermische H₂O₂-Gruppe wies eine deutlich geringere Retinabreite gegenüber der H₂O₂-Gruppe mit 37 °C auf ($p < 0,01$). Eine hypothermische Behandlung ohne H₂O₂ wies keine Unterschiede zur Kontrollgruppe auf und unterschied sich somit signifikant von der Degenerationsgruppe ($p < 0,001$). µm = Mikrometer.

3.2 Protektion retinaler Ganglienzellen durch Hypothermie

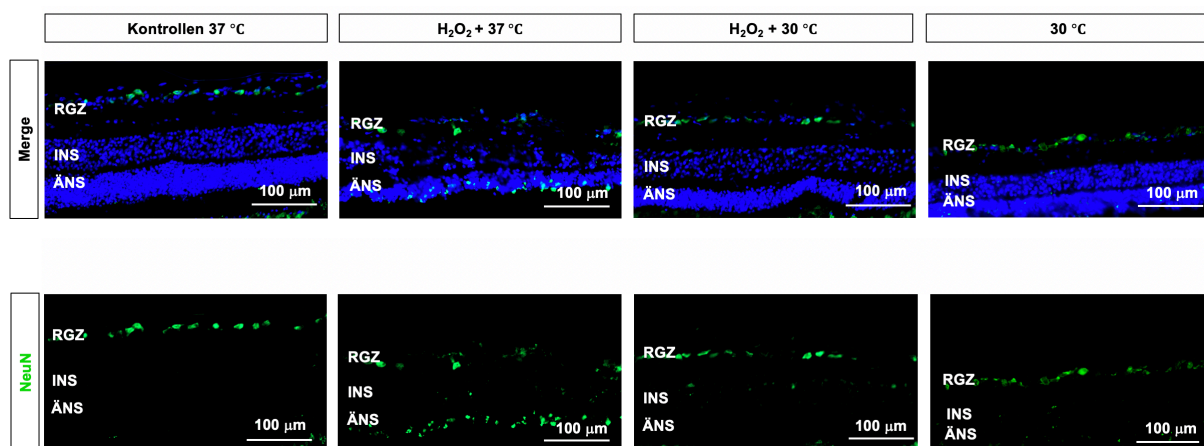
Um den Einfluss von H₂O₂ und Hypothermie auf das Überleben der RGZ zu untersuchen, wurden diese mit Hilfe eines Antikörpers gegen neuronales Zellkernantigen (NeuN) detektiert (Abb. 7A). Des Weiteren wurde das nervenfaser-spezifische Enzym PGP9.5 verwendet, um die Quantität der RGZ mittels qRT-PCR-Analyse zu ermitteln (Abb. 7C) [124].

Die Anzahl der NeuN⁺ RGZ war bei den degenerierten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant reduziert ($p < 0,001$). Jedoch führte die hypothermische

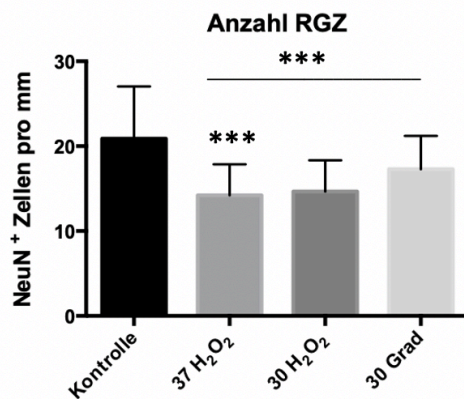
Therapie bei der degenerierten Retina zu keiner signifikanten Protektion gegenüber der Degenerationsgruppe mit 37 °C ($p=0,45$). Die Anzahl der NeuN⁺ RGZ nahm von 20,9 NeuN⁺ Zellen/mm ($\pm 6,2$) in der Kontrollgruppe auf 14,2 NeuN⁺ Zellen/mm ($\pm 3,6$) in der Degenerationsgruppe mit 37 °C bzw. auf 14,7 NeuN⁺ Zellen/mm ($\pm 3,7$) in der hypothermischen Degenerationsgruppe ab (Abb. 7B). Zu erkennen ist hier also eine tendenzielle Protektion der NeuN⁺ RGZ in der hypothermischen Degenerationsgruppe im Vergleich zu der Degenerationsgruppe bei 37 °C. In der hypothermischen Gruppe ohne H₂O₂-Degeneration blieb die Anzahl mit 17,3 NeuN⁺ Zellen/mm ($\pm 3,9$) nahe an der Kontrollgruppe und somit auch signifikant gegenüber der Degenerationsgruppe ($p<0,001$) (Abb. 7B).

Die relative Expression des nervenfaserspezifischen Enzyms PGP9.5 sank in der Degenerationsgruppe mit 37 °C ($0,93 \pm 0,20$) stärker ab als in der hypothermischen Degenerationsgruppe ($1,02 \pm 0,36$) (Abb.7C). Insgesamt wiesen die Veränderungen der PGP9.5-Expression keine signifikanten Gruppenunterschiede zu den Kontrollen bei 37 °C ($1,08 \pm 0,52$) bzw. 30 °C ($0,99 \pm 0,13$) auf ($p=0,88$).

A Immunhistochemische Färbung der Ganglienzellen (NeuN)



B



C

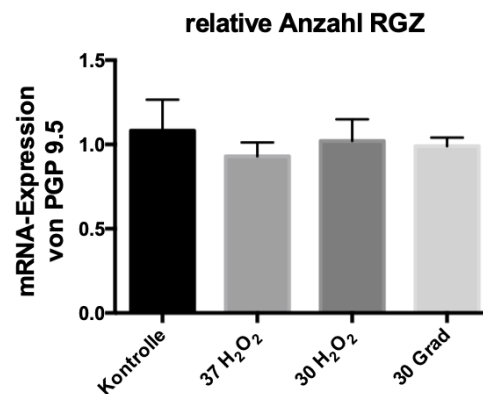


Abbildung 7: Analyse der retinalen Ganglienzellen. **A** Retinale Ganglienzellen wurden mit einem Antikörper gegen neuronales Zellkernantigen (NeuN, grün) immunhistochemisch gefärbt. RGZ = retinale Ganglienzellen, INS = innere nukleäre Schicht, ÄNS = äußere nukleäre Schicht, μm = Mikrometer. **B** Ausgewertet wurde die Anzahl der positiv gefärbten RGZ, welche eine Kolokalisation mit DAPI (blau) aufwiesen. Die Anzahl der NeuN⁺ RGZ war in der H₂O₂-Gruppe bei 37 °C signifikant reduziert ($p < 0,001$). Die NeuN⁺ RGZ reduzierten sich in der H₂O₂-Gruppe bei 30 °C im Vergleich zur H₂O₂-Gruppe bei 37 °C fast identisch ($p = 0,45$). In der hypothermischen Gruppe blieb die Anzahl vergleichbar mit der Kontrollgruppe und somit signifikant höher als die H₂O₂-Gruppe bei 37 °C ($p < 0,001$). mm = Millimeter, RGZ = retinale Ganglienzellen. **C** Die Expression des nervenfaserspezifischen Enzyms Protein-Gen-Produkt 9.5 (PGP9.5) wies keine maßgebliche Änderung zwischen den Gruppen auf ($p = 0,88$). RGZ = retinale Ganglienzellen.

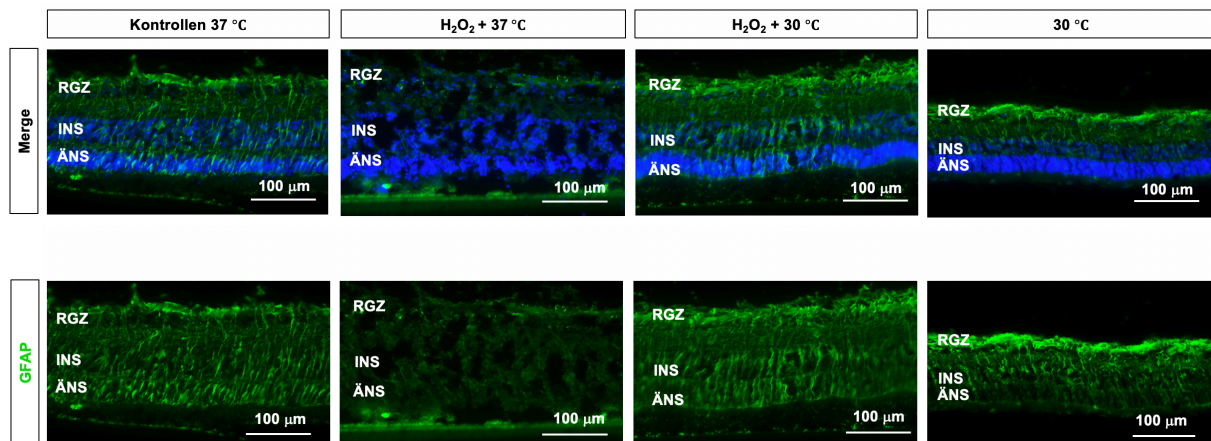
3.3 Ausbleibende Makrogliareaktion auf H₂O₂ und Hypothermie

Retinale Makrogliazellen, wie die Astrozyten, wurden mit einem Antikörper gegen saures Gliafaserprotein (Glial Fibrillary Acidic Protein = GFAP) angefärbt (Abb. 8 A). Die Behandlung mit H₂O₂ bewirkte eine Reduktion des GFAP-Signals. Die hypothermische Behandlung mit H₂O₂ führte zu einem geringeren Rückgang der Makrogliareaktion. Insgesamt konnte lediglich ein signifikanter Unterschied der GFAP⁺ Fläche zwischen der Kontrollgruppe mit 37 °C ($p < 0,01$) bzw. mit 30 °C ($p < 0,05$) und der H₂O₂ Gruppe bei 37 °C festgestellt werden. Der Unterschied zwischen der hypothermischen oxidativen Stress Gruppe (30 °C H₂O₂) und der normothermen oxidativen Stress Gruppe (37 °C H₂O₂) war nicht signifikant ($p = 0,34$) (Abb. 8B). Die GFAP⁺ Fläche der Kontrollgruppe betrug 23,10 % ($\pm 11,0$ %). Die H₂O₂ Gruppe fiel auf 17,57 % GFAP⁺ Fläche ($\pm 9,2$ %). Hypothermie führte in der oxidativen Stress Hypothermiegruppe auf 19,32 % GFAP⁺ Fläche ($\pm 13,5$ %), während die nicht-

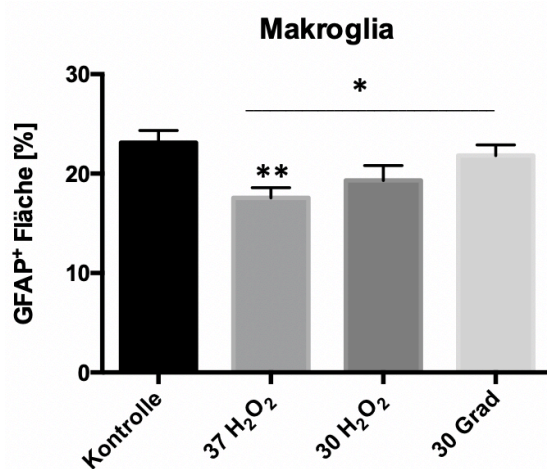
gestresste Hypothermiegruppe mit 21,80 % GFAP⁺ Fläche ($\pm 9,7$ %) sehr nahe an der Kontrollgruppe einzuordnen ist.

Die Western Blot Proteinanalysen führten zu keinen signifikanten Gruppenunterschieden ($p=0,67$). Die durchschnittlichen Proteinexpressionswerte der Kontrollgruppen sind mit 0,44 ($\pm 0,37$) in der 37 °C Gruppe und 0,43 ($\pm 0,15$) in der 30 °C Gruppe nahezu identisch. Die H₂O₂ Gruppen weichen mit durchschnittlichen Proteinexpressionswerten von 0,34 ($\pm 0,16$) in der 37 °C Gruppe und 0,33 ($\pm 0,28$) in der 30 °C Gruppe leicht von den Kontrollen ab (Abb. 8C u. 8D).

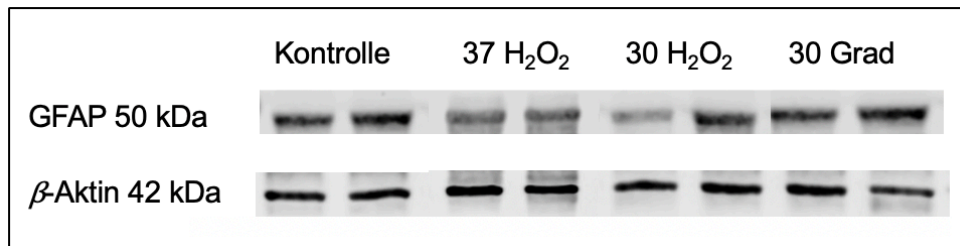
A Immunhistochemische Färbung der Makroglia (GFAP)



B



C



D

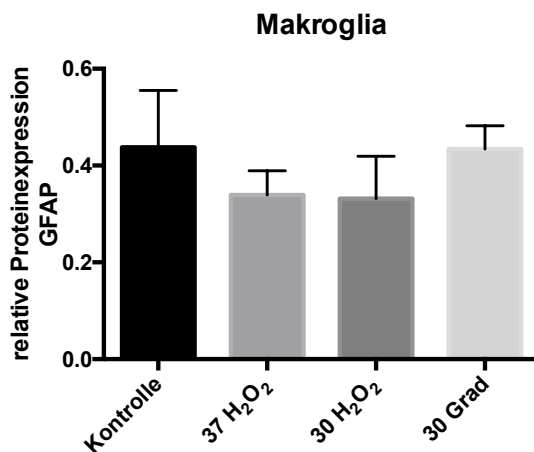


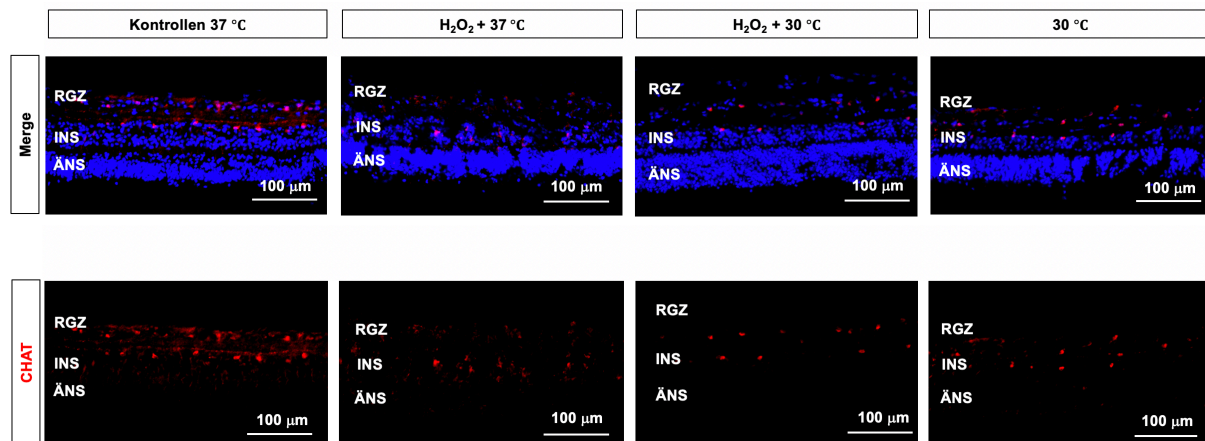
Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung und Western Blot Proteinanalysen der Makrogliazellen. **A** Makrogliazellen (Astrozyten) wurden mit einem Antikörper gegen saures Gliafaserprotein (GFAP, grün) immunhistochemisch gefärbt. RGZ = retinale Ganglienzellen, INS = innere nukleäre Schicht, ÄNS = äußere nukleäre Schicht, μm = Mikrometer. **B** Die GFAP⁺ Signalfläche zeigte eine signifikante Absenkung bei der H₂O₂-Gruppe bei 37 °C ($p < 0,01$). Die H₂O₂-Gruppe bei 30 °C weist keinen nennenswerten Unterschied zu dieser Gruppe auf. Die hypothermische Gruppe hält das Niveau der Kontrollen und liegt daher leicht signifikant über der Degenerationsgruppe ($p < 0,05$). **C** Abbildung von je zwei Proteinbanden der Proteine GFAP und β -Aktin mit Angabe der jeweiligen Proteinmasse in den analysierten Gruppen Kontrolle, 37 °C mit H₂O₂, 30 °C mit H₂O₂ und 30 °C. **D** Die Western Blot Proteinanalysen führten zu keinen signifikanten Gruppendifferenzen der relativen Proteinexpressionen von GFAP ($p = 0,67$).

3.4 Protektion von Amakrinzellen mit Hypothermie

Amakrinzellen sind für die Reizweiterleitung und Signalmodulation von den Photorezeptoren zu den RGZ essentiell. Amakrinzellen wurden mit Hilfe eines Antikörpers gegen die choline Acetyltransferase (ChAT) markiert (Abb. 9A) [117]. Die Anzahl der ChAT⁺ Zellen war in der H₂O₂-Gruppe bei 37 °C signifikant reduziert ($p < 0,001$). Die Anzahl sank von 15,22 ChAT⁺ Zellen/mm ($\pm 5,08$) in der Kontrollgruppe um 32% auf 10,37 ChAT⁺ Zellen/mm ($\pm 5,01$) in der Degenerationsgruppe. Die H₂O₂-Gruppe bei 30 °C konnte diesen Zelluntergang signifikant blockieren mit einer

Zunahme von 23% auf 12,78 ChAT⁺ Zellen/mm ($\pm 5,00$) ($p < 0,05$). Die hypothermische Gruppe hält mit 15,11 ChAT⁺ Zellen/mm ($\pm 5,80$) das Niveau der Kontrollen und zeigt sich somit signifikant erhöht gegenüber der Degenerationsgruppe ($p < 0,001$) (Abb. 9B).

A Immunhistochemische Färbung der Amakrinzellen (ChAT)



B

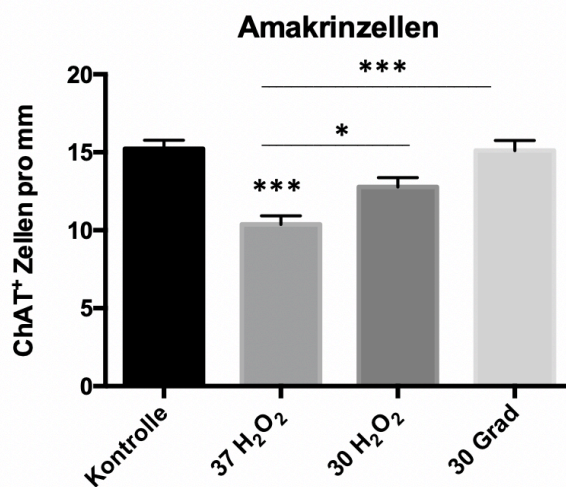
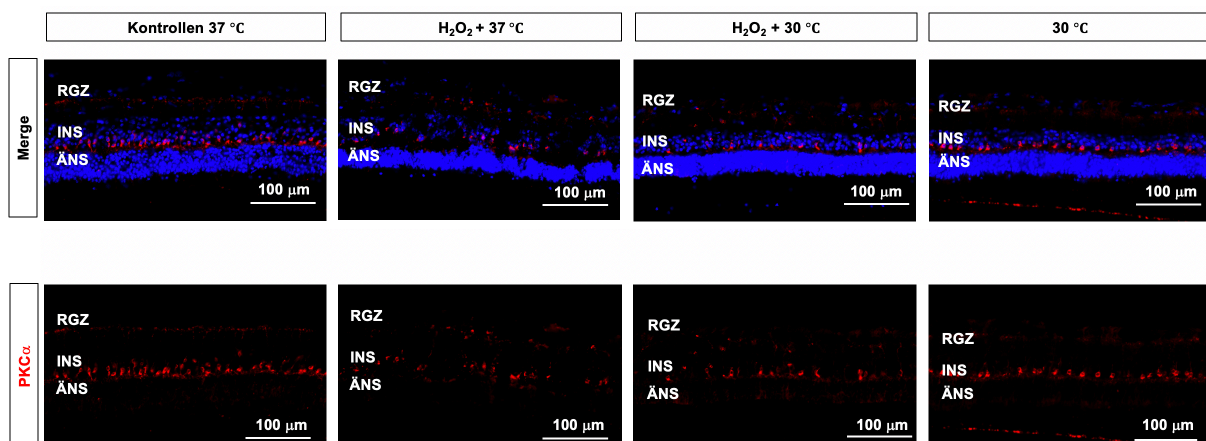


Abbildung 9: Immunhistochemische Analysen der Amakrinzellen. **A** Amakrinzellen wurden mit einem Antikörper gegen choline Acetyltransferase (ChAT, rot), immunhistochemisch markiert. RGZ = retinale Ganglienzellen, INS = innere nukleäre Schicht, ÄNS = äußere nukleäre Schicht, μm = Mikrometer. **B** Die ChAT⁺ Zellen wiesen eine signifikante Reduktion in der H₂O₂-Gruppe bei 37 °C auf ($p < 0,001$). Die H₂O₂-Gruppe bei 30 °C konnte einen signifikant geringeren Verlust der Amakrinzellen verzeichnen ($p < 0,05$). Die hypothermische Gruppe unterschied sich nicht von den Kontrollen und lässt sich somit signifikant von der H₂O₂-Gruppe bei 37 °C abgrenzen ($p < 0,001$). mm = Millimeter.

3.5 Protektion von Bipolarzellen mit Hypothermie

Die ON-Zapfenbipolarzellen verfügen über eine hohe Konzentration des Enzyms Proteinkinase C α (PKC α) [118]. Die durch PKC α -Antikörper markierten Bipolarzellen fielen von 27,06 PKC α^+ Zellen/mm (\pm 6,01) in den Kontrollen durch Kultivierung in H₂O₂ signifikant auf 16,35 PKC α^+ Zellen/mm (\pm 5,77) ab ($p < 0,001$). Zudem war ein signifikanter neuroprotektiver Effekt durch die Kultivierung in H₂O₂ bei 30 °C zu erkennen, indem sich die Zahl der PKC α^+ Zellen/mm um 54% auf 25,22 PKC α^+ Zellen/mm (\pm 8,92) erhöhte ($p < 0,001$). Die Anzahl an PKC α^+ Zellen/mm bei 30 °C lag mit Werten von 27,90 PKC α^+ Zellen/mm (\pm 9,05) sehr nahe an den Kontrollen und somit ebenso signifikant gegenüber der Degenerationsgruppe ($p < 0,001$) (Abb. 10 A+B).

A Immunhistochemische Färbung der Bipolarzellen (PKC α)



B

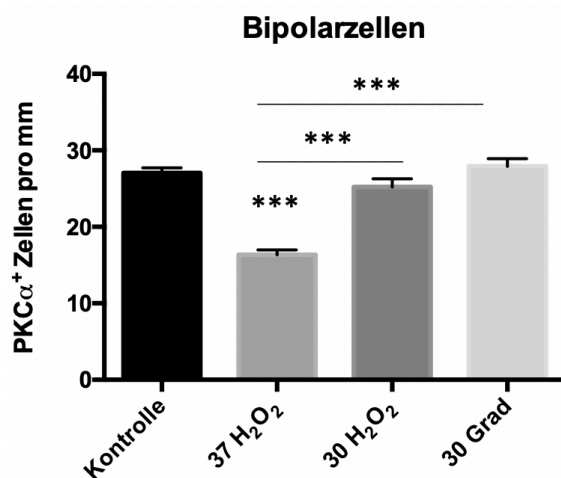


Abbildung 10: Immunhistochemische Analysen der Bipolarzellen. A Bipolarzellen wurden mit einem Antikörper gegen Proteinkinase C α (PKC α , rot immunhistochemisch markiert). RGZ = retinale

Ganglienzellen, INS = innere nukleäre Schicht, ÄNS = äußere nukleäre Schicht, μm = Mikrometer. **B** Die Anzahl der $\text{PKC}\alpha^+$ Zellen sank in der H_2O_2 -Gruppe bei 37 °C signifikant ab ($p < 0,001$). Dieser neuronale Zelluntergang konnte in der H_2O_2 -Gruppe bei 30 °C nahezu vollständig unterbunden werden ($p < 0,001$). Die Anzahl der Bipolarzellen in der hypothermischen Gruppe war vergleichbar mit der Kontrollgruppe und damit signifikant höher als die Degenerationsgruppe ($p < 0,001$). mm = Millimeter.

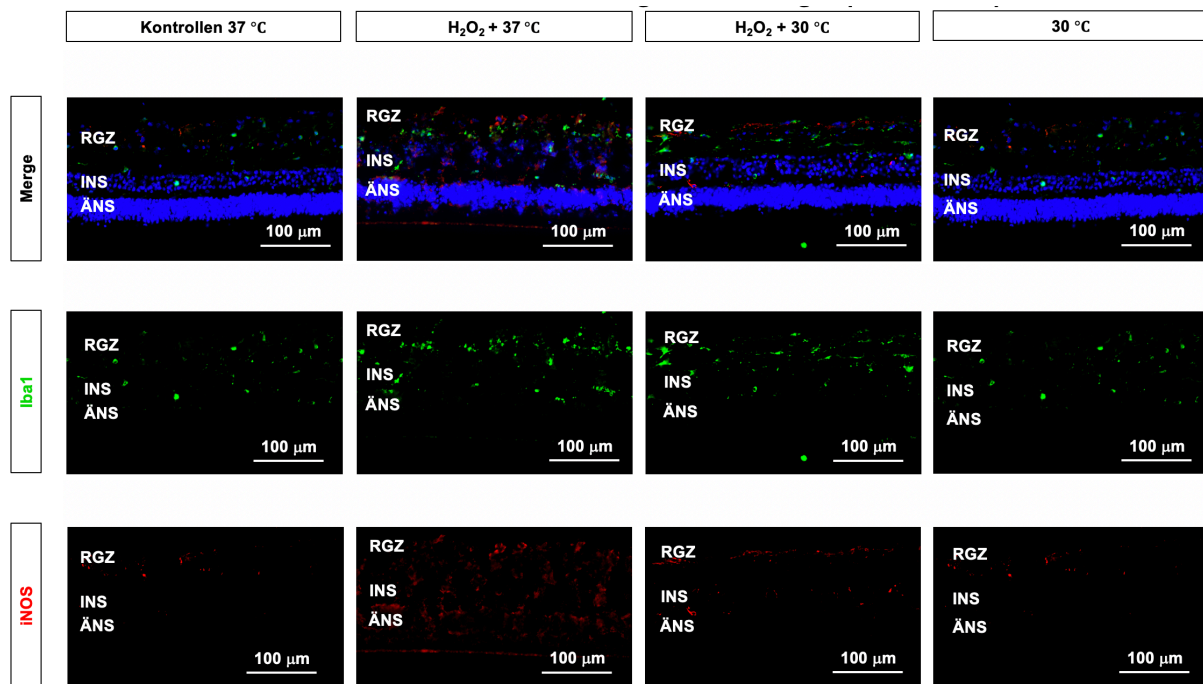
3.6 Sensitive Reaktion von Mikrogliazellen auf Wasserstoffperoxid und Hypothermie

Wegen ihrer wichtigen immunmodulatorischen Bedeutung wurden ebenfalls die Auswirkungen von H_2O_2 und Hypothermie auf Mikrogliazellen in dieser Studie analysiert. Hierfür wurde der Antikörper Iba1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*) zur immunhistochemischen Färbung von Mikrogliazellen verwendet (Abb.11A). Zur Beurteilung der Mikrogliaaktivität wurde ein Antikörper gegen das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) verwendet (Abb. 11A) [119, 120].

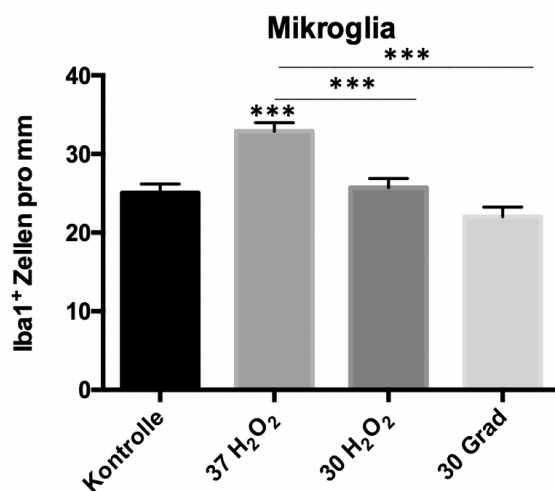
Die Anzahl der Mikrogliazellen war in der oxidativen Stressgruppe signifikant erhöht. So betrug die Anzahl an Iba1⁺ Zellen/mm 25,06 Iba1⁺ Zellen/mm ($\pm 8,88$) in den Kontrollen und 32,88 Iba1⁺ Zellen/mm ($\pm 8,86$) in der H_2O_2 -Gruppe ($p < 0,001$). In der oxidativen Stressgruppe mit hypothermischen Bedingungen blieb die Anzahl mit 25,71 Iba1⁺ Zellen/mm ($\pm 8,69$) auf Höhe der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Die reine Hypothermiegruppe wies mit 22,00 Iba1⁺ Zellen/mm ($\pm 9,95$) die geringste Anzahl an Mikroglia auf und unterschied sich somit signifikant von der Degenerationsgruppe ($p < 0,001$) (Abb. 11B).

Analog dazu zeigte sich auch die Aktivität der Mikroglia. Die Anzahl an iNOS⁺ Zellen/mm war in der H_2O_2 -Gruppe signifikant erhöht. Hier waren 8,50 iNOS⁺ Zellen/mm ($\pm 4,59$) in der Kontrollgruppe und 14,38 iNOS⁺ Zellen/mm ($\pm 5,17$) in der H_2O_2 -Gruppe zu sehen ($p < 0,001$). In der oxidativen Stressgruppe unter hypothermischen Bedingungen verharrte die Anzahl aktiver Mikroglia mit 8,00 iNOS⁺ Zellen/mm ($\pm 3,89$) sogar unter der Anzahl der Kontrollen ($p < 0,001$). Die reine Kultivierung bei Hypothermie führte mit 6,81 iNOS⁺ Zellen/mm ($\pm 4,01$) den niedrigsten Wert auf ($p < 0,001$) (Abb. 11C).

A Immunhistochemische Färbung der Mikroglia (Iba1 und iNOS)



B



C

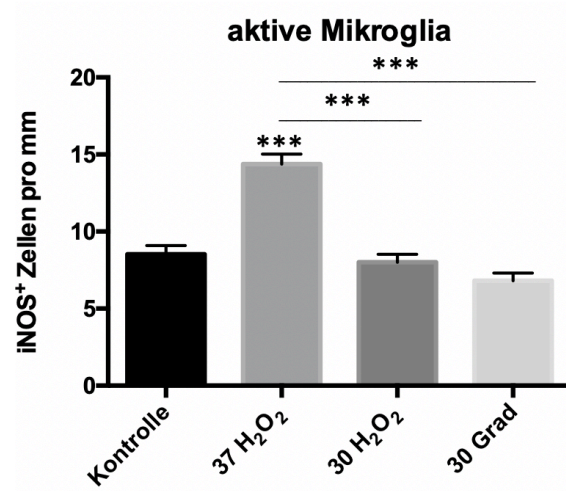


Abbildung 11: Immunhistochemische Analysen der Mikrogliazellen A Mikrogliazellen wurden mit einem Antikörper gegen ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1, grün) angefärbt, aktive Mikrogliazellen wurden mit einem Antikörper gegen Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS, rot) markiert. RGZ = retinale Ganglienzellen, INS = innere nukleäre Schicht, ÄNS = äußere nukleäre Schicht, µm = Mikrometer. B Die Behandlung mit H₂O₂ bei 37 °C führte zu einem signifikanten Anstieg der Iba1⁺ Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Die Anzahl der Iba1⁺ Zellen in der H₂O₂-Gruppe bei 30 °C war signifikant geringer ($p < 0,001$). Auch die unbehandelten Kontrollen bei 30 °C wiesen eine geringere Anzahl an Iba1⁺ Zellen im Vergleich zur Degenerationsgruppe auf ($p < 0,001$). mm = Millimeter C Auch die Anzahl der iNOS⁺ aktiven Mikrogliazellen/mm nahm in der H₂O₂-Gruppe bei 37 °C signifikant zu ($p < 0,001$). Die Anzahl der aktiven Mikroglia verharrte in der H₂O₂-Gruppe bei 30 °C auf dem Niveau der

Kontrollen ($p < 0,001$). Die reine Kultivierung bei Hypothermie führte den niedrigsten Wert auf ($p < 0,001$).
mm = Millimeter

3.7 Geringer, reversibler Anstieg proinflammatorischer Marker

Neben der Betrachtung der Mikrogliareaktionen sind auch die Veränderungen der Expressionsstärke von proinflammatorischen Faktoren von Interesse. Untersucht wurden die mRNA-Expressionen von VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), HSP70 (Hitze-Schock-Protein-70) und HIF (Hypoxie-induzierter Faktor). VEGF und HIF stellen jeweils hypoxiesensitive Signalmoleküle dar [21, 129]. Während VEGF in der hypoxie-induzierten Vaskulogenese eine zentrale Rolle spielt [132], reguliert der Transkriptionsfaktor HIF die Anpassungsfähigkeit der Zelle an ein mangelndes Sauerstoffangebot [133]. HSP70 fungiert in den Zellen als Chaperon und ist daher für die korrekte Proteinfaltung in Zellen zuständig [113]. Oxidativer Stress führt zu einer Anhäufung von Proteinaggregaten in den Zellen, wodurch vermehrt Hitzeschockproteine exprimiert werden [113].

In der Retina wird VEGF hauptsächlich von Müllerzellen ausgeschüttet und spielt gleichzeitig eine wichtige Rolle bei der Protektion der Zellen vor oxidativem Stress [134, 135]. Die H_2O_2 -Degeneration führte zu einem Anstieg der relativen VEGF-mRNA-Expression vom 1,15-fachen ($\pm 0,39$) in der Kontrollgruppe auf das 1,78-fache ($\pm 0,71$) in der Degenerationsgruppe. Hypothermie bewirkte hier eine Reduktion auf die 1,43-fache ($\pm 0,31$) Expression. Insgesamt blieben die Gruppenunterschiede im nicht-signifikanten Bereich ($p=0,17$) (Abb. 12A).

Die Ischämieinduktion mit H_2O_2 ließ die relative HSP70-mRNA-Expression vom 0,96-fachen ($\pm 0,51$) in der Kontrollgruppe auf das 1,45-fache ($\pm 0,37$) in der Degenerationsgruppe ansteigen. Analog zu VEGF verringerte auch hier die Kultivierung bei 30 °C die relative HSP70-mRNA-Expression auf das 0,94-fache ($\pm 0,42$) und lag somit sogar unter der Kontrollgruppe. Insgesamt waren die Gruppenunterschiede bei HSP70 nicht signifikant ($p=0,10$) (Abb. 12B).

Zusätzlich waren die Auswirkungen auf die Expression des Hypoxie-induzierten-Faktors (HIF) von Interesse. Die durch die H_2O_2 -Behandlung induzierte Hypoxie verstärkte sich die relative HIF-mRNA-Expression. Auch hier konnte Hypothermie die Inflamationsreaktion reduzieren. Die hypoxische Situation verstärkte die relative HIF-

mRNA-Expression auf das 1,33-fache ($\pm 0,21$) im Vergleich zum 1,10-fachen ($\pm 0,28$) Expression in den Kontrollen. Die Kultivierung bei Hypothermie wies hier komparabel zu der VEGF- und HSP70-Entwicklung eine Abnahme der Inflammation auf die 1,08-fache ($\pm 0,19$) HIF-mRNA-Expression auf. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant ($p=0,08$) (Abb. 12C).

Trotz der fehlenden Signifikanz zeigten die Reaktionen dieser pro-inflammatorischen Faktoren einen messbaren Anstieg in der H_2O_2 -Degenerationsgruppe und Werte nahe der Kontrollgruppe bei der Kombination aus H_2O_2 -Degeneration und hypothermischer Behandlung (Abb. 12 A-C).

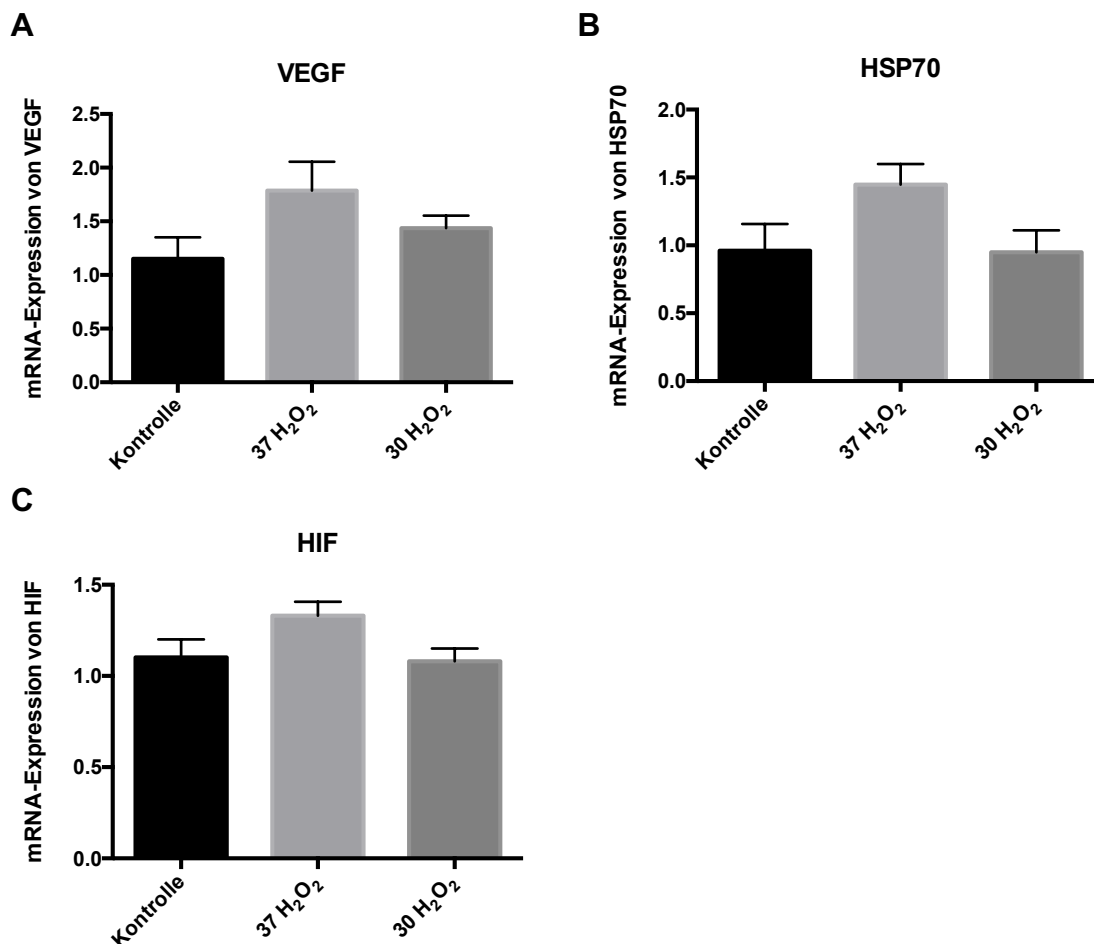


Abbildung 12: mRNA-Expressionen von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), HSP70 (Hitze-Schock-Protein-70) und HIF (Hypoxie-induzierter Faktor) **A** Die Stressinduktion mit H_2O_2 verstärkte die relative VEGF-mRNA-Expression von dem 1,15-fachen in der Kontrollgruppe auf das 1,78-fache in der Degenerationsgruppe. Hypothermie bewirkte hier eine Reduktion auf die 1,43-fache Expression. Insgesamt blieben die Gruppenunterschiede im nicht-signifikanten Bereich ($p=0,17$). **B** Die Ischämieinduktion mit H_2O_2 ließ die relative mRNA-Expression von HSP70 von dem 0,96-fachen in der

Kontrollgruppe auf das 1,45-fache in der Degenerationsgruppe ansteigen. Die Kultivierung bei 30 °C verringerte die relative HSP70-Expression auf das 0,94-fache. Insgesamt waren sich die Gruppenunterschiede bei HSP70 nicht signifikant ($p=0,10$). **C** Die hypoxische Situation verstärkte die relative HIF-mRNA-Expression auf das 1,33-fache im Vergleich zur 1,10-fachen Expression in den Kontrollen. Die Kultivierung bei Hypothermie verringerte hier komparabel zu der VEGF- und HSP70-Entwicklung die mRNA-Expression auf das 1,08-fache. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant ($p=0,08$).

3.8 Geringe Reaktion proapoptotischer Marker

Bereits die Betrachtung der RGZ durch NeuN und PGP9.5 sowie der strukturellen Veränderungen durch HE-Färbungen ließen deutliche Zellverluste erkennen. Um diese Zellverluste zu spezifizieren, wurden p21, PUMA, NF- κ B, das Bax/Bcl-2-Verhältnis sowie die Caspase 8 in ihrer Funktion als Apoptosemarker analysiert. p21 stellt einen Proteinkinaseinhibitor dar, der einen Stillstand des Zellzyklus verursacht und typischerweise durch ROS hochreguliert wird [130]. PUMA, NF- κ B sowie Bax/Bcl-2 stellen Proteine des intrinsischen Apoptosesignalwegs dar, welche durch ROS stimuliert werden [41, 136, 137]. Das Enzym Caspase 8 wird hingegen im extrinsischen Apoptose-Signalweg durch ROS stimuliert [39]. Hierbei wurden die relativen mRNA-Expressionen von p21, dem Bax/Bcl-2-Verhältnis und Caspase 8 mit Hilfe von PCR-Analysen untersucht. Ergänzend wurden die relativen Proteinexpressionen im Western Blot von PUMA, NF- κ B sowie Bax/Bcl-2 analysiert.

Die relative p21-mRNA-Expression stieg in der H₂O₂-Gruppe von dem 1,10-fachen ($\pm 0,68$) in der Kontrollgruppe auf das 1,32-fache ($\pm 0,47$) in der Degenerationsgruppe. Die Degenerationsgruppe bei 30 °C kam hingegen mit dem 0,96-fachen ($\pm 0,47$) auf Werte unterhalb der Kontrollgruppe. Die Gruppenunterschiede waren nicht signifikant ($p=0,55$) (Abb. 13).

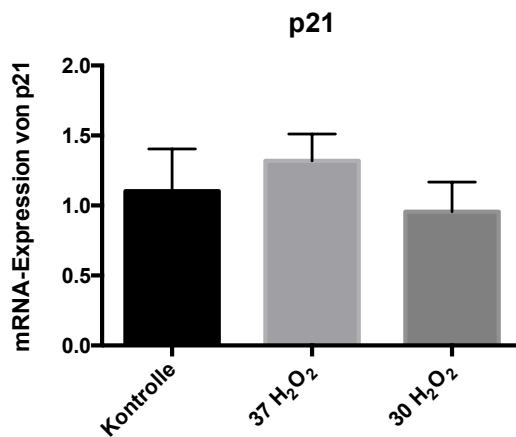


Abbildung 13: mRNA-Expression des Proteinkinaseinhibitor p21. P21 stieg in der H₂O₂-Gruppe von dem 1,10-fachen in der Kontrollgruppe auf das 1,32-fache in der Degenerationsgruppe. Die Degenerationsgruppe bei 30 °C wies hingegen mit dem 0,96-fachen Expressionswerte unterhalb der Kontrollgruppe auf. Insgesamt waren die Gruppendifferenzen nicht signifikant ($p=0,55$).

Des Weiteren wurden zur Beurteilung des Bax/Bcl-2-Verhältnisses sowohl die mRNA-Expressionen als auch die Proteinanalysen im Western Blot vorgenommen. Beide Analysenverfahren ließen einen deutlichen Anstieg der Bax/Bcl-2-Ratio bei der Behandlung mit H₂O₂ erkennen. Ebenso reduzierte die hypothermische Kultivierung in beiden Analysen das Bax/Bcl-2-Verhältnis. Die relative mRNA-Expression des Bax/Bcl-2-Verhältnisses erhöhte sich in der H₂O₂-degenerierten Gruppe auf die 1,23-fache ($\pm 0,43$) Expression im Vergleich zur 1,12-fachen ($\pm 0,48$) in der Kontrollgruppe. Hypothermie verringerte die Bax/Bcl-2-Expression auf die 0,79-fache ($\pm 0,16$) mRNA-Expression. Die unbehandelten Kontrollen bei 30 °C lagen mit 1,00 ($\pm 0,50$) leicht unterhalb der Kontrollgruppe. Insgesamt waren die Gruppendifferenzen nicht signifikant ($p=0,20$) (Abb. 14 A). Die quantitativen Proteinanalysen mit Hilfe der Auftrennung der Proteine im Western Blot ergab ein vergleichbares Ergebnis. Hier stieg die Proteinexpression von 0,92 ($\pm 0,85$) bei den Kontrollen auf 1,12 ($\pm 0,79$) in der H₂O₂-Gruppe. Die Kombinationsbehandlung aus Hypothermie und H₂O₂ ließ die Expression auf 0,28 ($\pm 0,42$) senken, wohingegen die reine hypothermische Kultivierung die Proteinexpression auf 0,66 ($\pm 0,70$) senkte. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren aufgrund der geringen Anzahl verwertbarer Proteinbanden nicht signifikant ($p=0,14$) (Abb. 14 B+C).

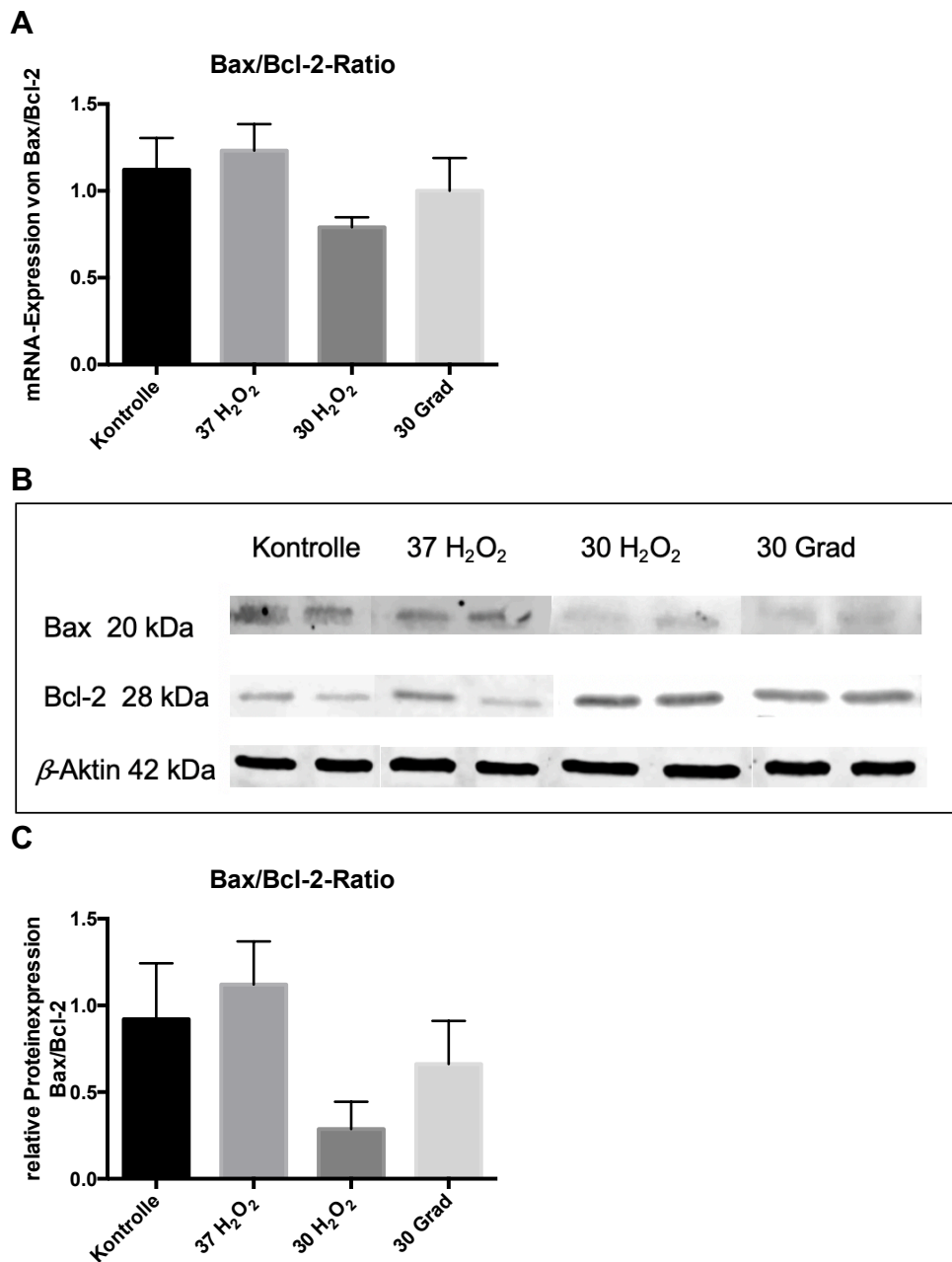


Abbildung 14: mRNA-Expression und Western Blot Proteinanalysen des Bax/Bcl-2-Protein-Verhältnisses (Bax/Bcl-2-Ratio) **A** Die relative mRNA-Expression der Bax/Bcl-2-Ratio erhöhte sich in der H₂O₂-degenerierten Gruppe auf die 1,23-fache Expression im Vergleich zur 1,12-fachen in der Kontrollgruppe. Hypothermie verringerte die Bax/Bcl-2-Expression auf die 0,79-fache mRNA-Expression. Die unbehandelten Kontrollen bei 30 °C lagen mit 1,00 leicht unterhalb der Kontrollgruppe. Insgesamt waren die Gruppendifferenzen nicht signifikant ($p=0,20$). **B** Abbildung von je zwei Proteinbanden der Proteine Bax, Bcl-2 und β -Aktin mit Angabe der jeweiligen Proteinmasse in den analysierten Gruppen Kontrolle, 37 °C mit H₂O₂, 30 °C mit H₂O₂ und 30 °C. kDa = Kilodalton **C** Im Western Blot stieg die relative Proteinexpression von Bax/Bcl-2 von 0,92 bei den Kontrollen auf 1,12 in der H₂O₂-Gruppe. Die Kombinationsbehandlung aus Hypothermie und H₂O₂ ließ die Expression auf 0,28 senken, wohingegen die reine hypothermische Kultivierung die Proteinexpression auf 0,66 senkte. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant ($p=0,14$).

Die mRNA-Expression der Cysteinprotease 8 (Caspase 8) verdoppelte sich durch H_2O_2 nahezu von dem 0,71-fachen ($\pm 0,40$) auf das 1,27-fache ($\pm 0,65$). Die Kultivierung mit H_2O_2 bei hypothermischen Bedingungen konnte die Caspase 8 mRNA-Expression nicht verringern (1,40-fache $\pm 1,1$ relative mRNA-Expression). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant ($p=0,30$) (Abb. 15).

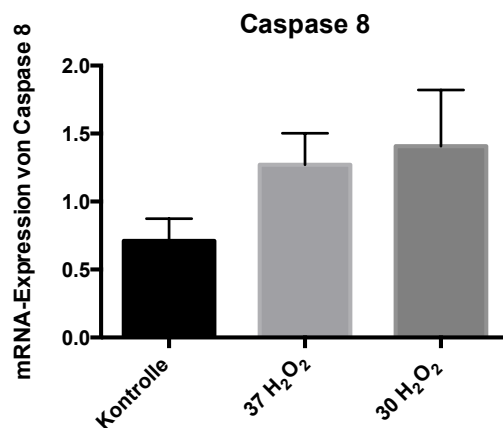


Abbildung 15: mRNA-Expression der Cysteinprotease 8 (Caspase 8). Die mRNA-Expression von Caspase 8 verdoppelte sich nahezu von der 0,71-fachen Expression in der Kontrollgruppe auf die 1,27-fache Expression in der H_2O_2 -degenerierten Gruppe. Die Kultivierung mit H_2O_2 bei hypothermischen Bedingungen konnte die Caspase 8 mRNA-Expression nicht verringern (1,40-fache relative mRNA-Expression). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant ($p=0,30$).

Im Western Blot lag die relative Proteinexpression des Transkriptionsfaktors NF- κ B in allen drei Gruppen bei etwa gleichen Expressionsstärken mit 0,035 ($\pm 0,030$) bei den Kontrollen, 0,038 ($\pm 0,040$) in der H_2O_2 -Gruppe und 0,043 ($\pm 0,028$) in der hypothermen Degenerationsgruppe und unterschied sich somit nicht signifikant ($p=0,87$) (Abb. 16 A).

Das proapoptotische Protein PUMA erschien insgesamt in den Western Blot Analysen zwar als ein schwaches Signal (Proteinexpression der Kontrollen bei $0,0024 \pm 0,0012$). Die Behandlung mit H_2O_2 induzierte eine PUMA-Expression von $0,0066 (\pm 0,0092)$, die gleichzeitige Behandlung mit H_2O_2 und Hypothermie reduzierte die Proteinexpression auf $0,0033 (\pm 0,0047)$. Die pure hypothermische Behandlung senkte die Proteinexpression unter den Kontrollwert auf $0,001 (\pm 0,001)$. Insgesamt waren die unterschiedlichen PUMA-Expressionen durch die schwache Expression nicht signifikant verschieden ($p=0,12$) (Abb. 16 B).

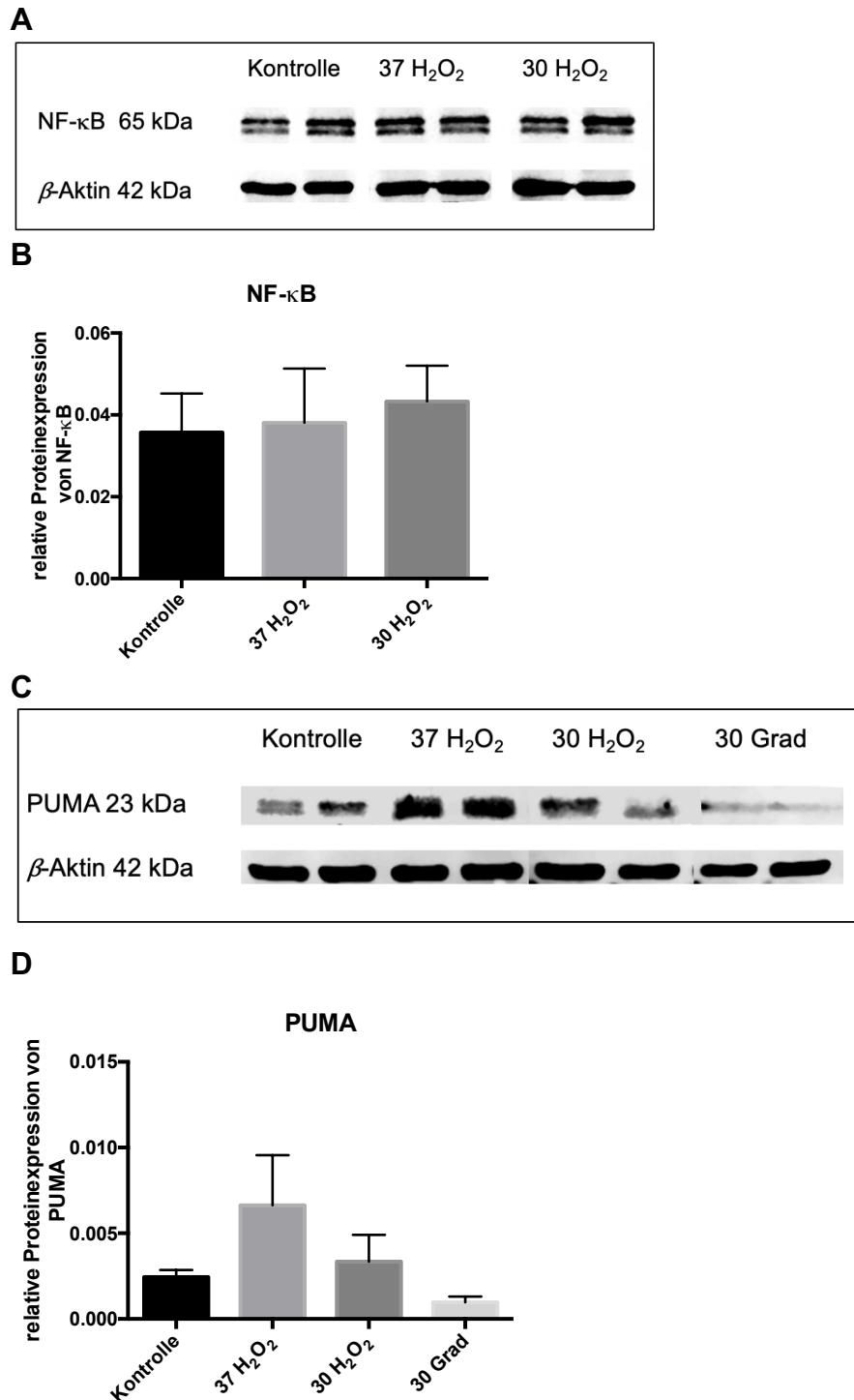


Abbildung 16: Western Blot Proteinanalysen von NF-κB und p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA). **A** Abbildung von je zwei Proteinbanden der Proteine NF-κB und β-Aktin mit Angabe der jeweiligen Proteinmasse in den analysierten Gruppen Kontrolle, 37 °C mit H₂O₂ und 30 °C mit H₂O₂. kDa = Kilodalton **B** Die Bandenintensität von NF-κB stieg im Western Blot marginal von 0,035 bei den Kontrollen auf 0,038 in der H₂O₂-Gruppe an. Die hypotherme Degenerationsgruppe wies Werte von 0,043 auf. Die Expressionsstärken unterschieden sich somit nicht signifikant ($p=0,87$). **C** Abbildung von je zwei Proteinbanden der Proteine p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) und β-Aktin mit Angabe der jeweiligen Proteinmasse in den analysierten Gruppen Kontrolle, 37 °C mit H₂O₂, 30 °C mit

H₂O₂ und 30 °C. kDa = Kilodalton **D** *Wasserstoffperoxid (H₂O₂) konnte die extrem geringe Bandenintensität des Proteins p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) von 0,002 in den Kontrollen auf 0,006 anheben. Die Kultivierung mit H₂O₂-haltigem Medium bei 30 °C reduzierte die Proteinexpression auf 0,003. Die Kultivierung bei 30 °C ohne H₂O₂ senkte die Proteinexpression mit 0,001 unter den Kontrollwert. Insgesamt waren die unterschieden sich die PUMA-Expressionen durch die schwachen Expressionsstärken nicht signifikant (p=0,12).*

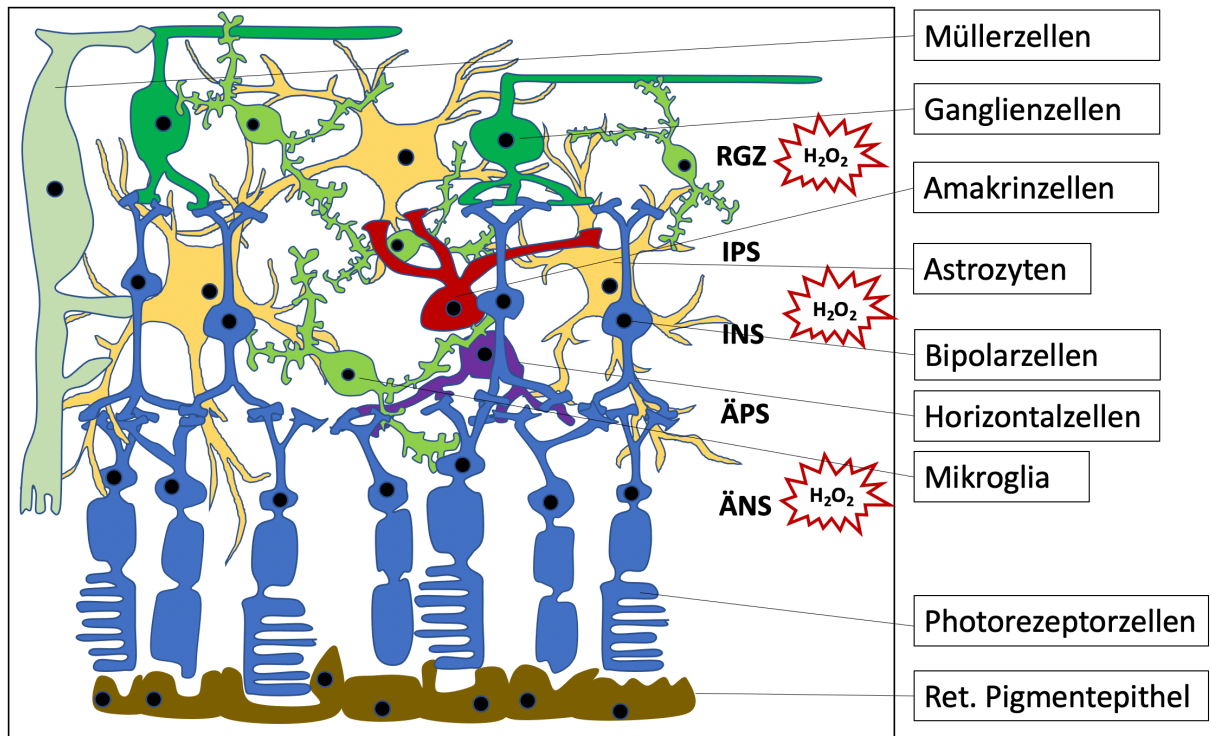
Insgesamt zeigen die Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen, dass sich vor allem die Mikrogliareaktionen durch oxidativen Stress und durch Hypothermie jeweils signifikant beeinflussen lassen. Auch die Amakrin- und Bipolarzellen profitieren von einer neuroprotektiven hypothermischen Behandlung. Hypothermie konnte zu einem Trend, aber keiner signifikanten Neuroprotektion der RGZ beitragen. Eine H₂O₂-bedingte Makrogliose war nicht zu erkennen. Der Anstieg der Inflammations- und Apoptosemarker, welcher in den PCR- und Western Blot Analysen nachgewiesen wurde, konnte durch Hypothermie nur teilweise verhindert werden.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe eines oxidativen Stressmodells der Schweineretina-Organkultur die hypothermische Therapie der Retina zu untersuchen und zu validieren. Hierzu wurde dem Medium H_2O_2 hinzugegeben. H_2O_2 führt durch die Bildung von hochreaktiven Sauerstoffradikalen zu einem massiven Überangebot an ROS [23-25]. In Vorversuchen zeigte sich ein optimaler Degenerationsgrad bei einer Behandlung mit einer Konzentration von $300 \mu\text{M}$ H_2O_2 [113]. Die Kultivierung bei hypothermischen Bedingungen (30°C) führt zur Unterdrückung der induzierten Inflammationsreaktionen und pro-inflammatorischer Zytokine [59-61]. Der Nachweis der neuroprotektiven Wirkung von Hypothermie auf dieses Degenerationsmodell soll weiterhin dazu dienen, dieses Modell für weiterführende neuronale bzw. retinale Forschungszwecke zu validieren. Dazu wurde der Degenerationsgrad bei 37°C und bei 30°C mit den unbehandelten Kontrollen verglichen.

Nach immunhistochemischer Detektion und statistischem Vergleich der Auswirkungen der H_2O_2 -Behandlung sowie der Hypothermiebehandlung konnte ein signifikanter Verlust an RGZ durch H_2O_2 detektiert werden. Hypothermische Behandlung konnte diesem Verlust der RGZ messbar, jedoch nicht signifikant entgegenwirken. Ebenfalls degenerierte in der INS durch den oxidativen Stress eine Vielzahl von Amakrin- und Bipolarzellen. Diese Degeneration konnte durch hypothermische Therapie erfolgreich verhindert werden. Die Anzahl und Aktivität der Mikroglia verstärkte sich durch H_2O_2 deutlich, während in der Hypothermiegruppe Anzahl und Aktivität auf dem Kontrollniveau blieben. In der qRT-PCR- und in Western Blot Analysen erhöhte sich die Apoptoserate durch H_2O_2 , welche durch Hypothermie verhindert wurde. Des Weiteren konnte eine signifikante Änderung der neuroretinalen Dicke inklusive der Auflösung von Zellverbänden unter H_2O_2 -Degeneration festgestellt werden, wohingegen Hypothermie neuroprotektive Effekte hervorrief. Kongruent zu den Vorversuchen zeigten die Makroglia weder durch H_2O_2 noch durch die hypothermische Therapie eine erkennbare Makroglie. Insgesamt scheint die Behandlung degenerierter Retinazellen mittels Hypothermie zwar protektiv zu wirken. Das Ausmaß der Regeneration divergiert jedoch zwischen den einzelnen Neuronenzelltypen.

A



B

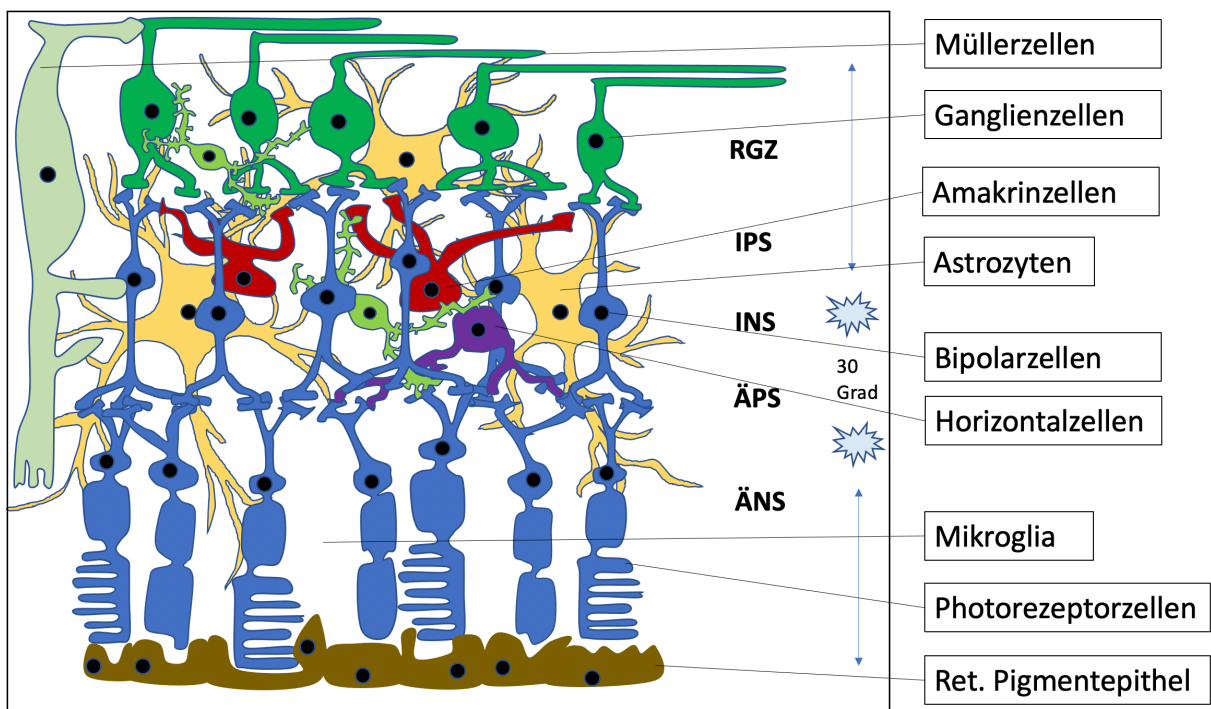


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Auswirkungen von H_2O_2 (A) und Hypothermie (B) auf die Retina. A: Zu erkennen ist die Abnahme von RGZ, Amakrin- und Bipolarzellen sowie die Zunahme der Mikrogliazellen unter H_2O_2 . B: Hypothermie wirkt dagegen protektiv auf RGZ, Amakrin- und Bipolarzellen und verhindert eine Mikrogliose. RGZ = retinale Ganglienzellschicht, IPS = innere plexiforme Schicht, INS = innere nukleäre Schicht, ÄPS = äußere plexiforme Schicht, ÄNS = äußere nukleäre Schicht, Ret. Pigmentepithel = Retinales Pigmentepithel.

4.1 Hypothermie schützt retinale Zellstrukturen

Die H₂O₂-Degeneration führte zu Dislokationen der einzelnen Retinaschichten durch Auflösungen der Zellverbände. Ein deutliches Aufquellen der Retina mit signifikanter Zunahme der neuroretinalen Dicke wurden beobachtet (Abb. 6).

Die Auflösung der Zellverbände lässt sich auf die Herunterregulation der mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen in retinalen Organkulturen zurückführen [111]. Außerdem stellt allein die Explantation der Retinae aus dem Augenbecher eine mechanische Manipulation der Zellverbände dar.

Eine Reihe von Studien konnte bereits die neuroprotektive Wirkung von hypothermischer Therapie nachweisen [138-140]. Hypothermische Therapie schützt in Organkulturmodellen sowohl in Ratten als auch in Schweinen signifikant die Zellstruktur und erhält die Zellverbände der Retina [141, 142]. Auch die hier durchgeführte hypothermische Kultivierung brachte eine sichtbare Erhaltung der Konvergenz der Zellschichten hervor. Dem durch oxidativen Stress hervorgerufenen Auflösen und Aufquellen der Zellverbände konnte mittels Hypothermie erfolgreich entgegengewirkt werden (Abb. 6). Der neuroprotektive Effekt der Hypothermie zeigte sich nicht nur anhand der retinalen Gesamtdicke. Auch der Erhalt einzelner Zellschichten, insbesondere der IKS untermauern die neuroprotektive Wirkung durch Hypothermie.

4.2 Reaktion retinaler Ganglienzellen auf äußere Einflüsse

Die Anzahl der NeuN⁺ RGZ reduzierte sich signifikant in den degenerierten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Ein vergleichbar starker RGZ-Verlust konnte auch in anderen achttägigen H₂O₂-Degenerationsmodellen detektiert werden [113]. Ebenso verzeichneten Hypoxämie-Degenerationsmodelle an Schweineretinae einen durch CoCl₂ hervorgerufenen signifikanten Abfall an RGZ [112, 143, 144]. Jedoch erzielte die hypothermische Therapie der degenerierten Retina keine signifikante Veränderung gegenüber der Degenerationsgruppe mit 37 °C (Abb. 7). Schließlich führt bereits die Axotomie zu einem zunehmenden Nährstoffmangel, welcher Apoptose- und Nekrosemechanismen in RGZ induziert und somit die starken Zellverluste erklärt [49, 109, 145]. Zu erkennen ist allerdings die tendenziell erhöhte Anzahl NeuN⁺ RGZ in der hypothermischen Degenerationsgruppe im Vergleich zu der

Degenerationsgruppe bei 37 °C (Abb. 7). Diese Ergebnisse entsprechen einer Ischämie-Organkulturstudie von Schultheiss *et al.* an Rinderaugen, welche ebenso einen protektiven Trend durch Hypothermie auf ischämisch-degenerierte RGZ in mRNA-Analysen feststellen konnte [146]. Gleichmaßen trat dieser Effekt bei hypothermischer Therapie von ischämisch degenerierten RGZ von Minischweinen sowie menschlichen Spenderaugen auf [147]. Lediglich ein CoCl₂-Degenerationsmodell konnte bisher eine signifikante Protektion von RGZ mittels hypothermischer Therapie erreichen [141]. Dies liegt vermutlich an der Blockierung der Interaktion von CoCl₂ mit HIF-1 α , einem durch Hypoxie induzierbaren proapoptotischen Faktor, durch Hypothermie [141].

Die Quantifizierung des nervenfaserspezifischen Enzyms Protein-Gen-Produkt 9.5 (PGP9.5) zeigte keine maßgebliche Änderung der PGP9.5 Expressionen in der Degenerationsgruppe mit 37 °C oder in der hypothermischen Degenerationsgruppe (Abb. 7). Dies entspricht dem Ergebnis eines anderen Degenerationsmodells, bei denen eine signifikante Reduktion der PGP9.5 Expression erst nach acht Tagen nachgewiesen werden konnte [113]. Auch im Hypoxiemodell an Ratten konnte nach einer hypothermischen Kultivierung bei 30 °C keine signifikant erhöhte RGZ-spezifische mRNA Expression festgestellt werden [142]. Eine Erklärung ist, dass sich viele RGZ im verwendeten Modell zum Analysezeitpunkt zwar in einer beginnenden Degeneration befanden, jedoch noch nicht vollständig degeneriert waren. In der immunhistochemischen Betrachtung erschien eine Vielzahl von RGZ in der Degenerationsgruppe kleiner, deformiert und zeigte ein schwächeres Signal (Abb. 7). Die Beurteilung der RGZ könnte in weiteren Studien neben der Quantität auch qualitative Erscheinungsmerkmale in Betracht ziehen. Längere Kultivierungsdauern würden zwar einen ausgeprägteren Zellverlust sichtbar machen, sind in diesem Modell jedoch nicht realisierbar, da dann der Degenerationsgrad zu weit fortgeschritten und nicht mehr umkehrbar ist.

4.3 Oxidativer Stress führt nicht zwangsläufig zur Gliose

Makroglia setzen neuroprotektive Substanzen, wie Antioxidantien, VEGF und Neutrophine frei und verringern oxidativen Stress, indem sie überschüssige ROS aufnehmen [18, 148]. Eine abnorme Ansammlung und Aktivierung von Makrogliazellen

wird als reaktive Gliose bezeichnet und kann zur Bildung von Glia-Narben führen und mit zytotoxischen Effekten einhergehen [9, 149].

Daher könnte man auch bei einer Induktion von oxidativem Stress mit einer reaktiven Gliose rechnen [150]. Auch im Menschen führt eine Gliose zu einer starken Signalanhebung von GFAP [151]. Nach Zugabe von H₂O₂-haltigem Medium konnte in diesem Modell jedoch keine Makrogliose festgestellt werden. Die GFAP-Expression war sowohl in den immunhistochemischen Analysen als auch in den Western Blot Proteinanalysen in den Degenerationsgruppen sogar reduziert (Abb. 8). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Makrogliazellen selbst von der Toxizität von H₂O₂ betroffen sind, sodass eine Reaktion ihrerseits verhindert wurde. Auch andere Schweineretina-Degenerationsmodelle konnten eine ausbleibende Makrogliose in ihren Studien feststellen [113, 152]. Gleichzeitig konnten Taylor *et al.* beschreiben, dass bereits die alleinige Kultivierung von Schweineretinae eine erhöhte GFAP-Expression im Vergleich zu *in vivo* Retinae aufweist, sodass der zusätzliche degenerative Effekt von H₂O₂ möglicherweise daher in der Organkultur nicht zur Geltung kommt [102]. Andererseits gibt es Mäuseretina-Organokulturen, bei denen oxidativer Stress einen Anstieg der GFAP-Expression hervorrief [153]. Demnach wäre es auch möglich, dass die nachweisbare Makrogliose zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt aufgelaufen ist. Die Arbeit von Hurst *et al.* verdeutlicht die Relevanz des Analysezeitpunktes, da bei der Kultivierung von Schweineretinae bei 300 µM H₂O₂ eine leichte, nicht signifikante Makrogliose an Tag drei sowie eine vollständig ausbleibende Makrogliose an Tag acht festgestellt wurde [113]. Gosh *et al.* untersuchten in Ihrer Studie gezielt neuroinflammatorische Reaktionen von Schweineretinazellen [154]. Trotz umfassenden neuronalen Degenerationen konnten sie lediglich minimale Zeichen einer Gliose feststellen, was auf eine möglicherweise verminderte Gliose von Schweineretinae *in vitro* schließen lässt [154].

Zusammenfassend fügen sich die hier festgestellten GFAP Reaktionen in eine Reihe weitere Organokulturstudien von Schweineretinae ein. Unter Berücksichtigung des Speziesproblems bei kultivierten Schweineretinae, der Relevanz des Analysezeitpunktes und den möglicherweise toxischen Effekt von H₂O₂ auf Makrogliazellen lässt sich eine fehlende induzierte Gliose in diesem Modell nicht auf den Menschen oder andere *in vivo* Modelle übertragen.

4.4 Amakrin- und Bipolarzellen profitieren von hypothermischer Behandlung

Die Induktion von oxidativem Stress führte zu einer starken neurotoxischen Wirkung, welche in einer deutlichen Reduktion der Amakrinzellen resultierte (Abb. 9). Es ist bekannt, dass Amakrinzellen einen vulnerablen Zelltyp darstellen und empfindlich auf Zellschäden reagieren [155, 156]. So konnten auch andere Degenerations-Modelle einen signifikanten Untergang von Amakrinzellen durch Ischämie bzw. CoCl_2 feststellen [141, 143, 157]. In Rattenmodellen führte eine durch NMDA verursachte Exzitotoxizität der Retina zu einem Untergang der INS [158]. Hypothermische Therapie konnte die neurotoxische Wirkung von H_2O_2 weitgehend ausgleichen (Abb. 9). Da CoCl_2 - und H_2O_2 -Behandlungen in verschiedenen Studien nach acht Tagen zum irreversiblen Untergang Amakrinerzellen geführt haben, handelt es sich in diesem Modell höchstwahrscheinlich um eine Hinauszögerung des Zelluntergangs durch Hypothermie [141, 143].

Kongruent zu den Amakrinzellen zeigte die Induktion von oxidativem Stress auch bei On-Bipolarzellen eine degenerative Wirkung. Die Anzahl der On-Zapfenbipolarzellen, welche eine hohe Konzentration des Enzyms Proteinkinase C α ($\text{PKC } \alpha$) aufweisen, wurde nahezu halbiert (Abb.10) [118]. Diese Reaktion war insofern erstaunlich, da andere oxidative Stress Modelle der kultivierten Schweineretina keinen oder nur einen geringen Bipolarzellverlust innerhalb der ersten vier Kultivierungstage verzeichnen konnten [113, 141, 143, 157]. Nach acht Kultivierungstagen konnte sowohl in H_2O_2 - also auch in CoCl_2 -Degenerationsmodellen ein signifikanter Bipolarzellverlust verzeichnet werden [141, 143]. Gleichzeitig wiesen die untersuchten On-Bipolarzellen das größte Regenerationspotential auf. Die Kultivierung bei 30°C konnte die $\text{PKC } \alpha^+$ Zellen vor den neurotoxischen Effekten durch H_2O_2 schützen (Abb.10). Das hängt vermutlich damit zusammen, dass die Biopolarzellen unter den in dieser Arbeit untersuchten retinalen Zelltypen diejenigen Zellen darstellen, welche am stärksten in das neuroretinale Netzwerk integriert sind und somit von einer Vielzahl von neuroprotektiven Zellen, wie z.B. Makroglia, umgeben sind [148]. Diese geschützte Lage der Bipolarzellen wird deutlich, wenn selbst nach einer 21-tägigen retinalen Ischämie, welche durch einen erhöhten intraokulären Druck erzeugt wird, die Bipolarzellen keinen Schaden davontragen [157]. Insgesamt konnte somit nicht nur ein signifikanter neurodegenerativer Effekt von H_2O_2 auf retinale Zellschichten (Ganglienzellschicht, INS) konstatiert werden. Auch eine erfolgreiche Neuroprotektion

der geschädigten Nervenzellen konnte mittels hypothermischer Therapie erreicht und nachgewiesen werden.

4.5 Unterbindung einer Mikrogliareaktion durch Hypothermie

Verschiedene Studien haben die entscheidende immunmodulatorische Rolle von Mikrogliazellen auf neuronale Zellen bei oxidativem Stress festgestellt [159, 160]. Studien mit Organkulturen von Mäuseretinae konnten eine starke Proliferation von Iba1⁺ Mikrogliazellen aufgrund von oxidativem Stress belegen [161]. Ebenso erhöhen Behandlungen von Schweineretinzellen mit unterschiedlichen H₂O₂-Konzentrationen übereinstimmend die Anzahl von Iba1⁺ Zellen massiv [113]. Auch im Rahmen dieser Dissertation konnte bei Behandlung mit H₂O₂ eine starke Proliferation retinaler Mikrogliazellen verzeichnet werden. Die Anzahl unspezifischer Mikrogliazellen, welche mit Iba1-Antikörpern kenntlich gemacht wurde, stieg signifikant an (Abb. 11). Die Anzahl der aktiven Mikrogliazellen, welche durch iNOS angefärbt wurden, verdoppelte sich sogar nahezu (Abb. 11).

Zudem konnte beobachtet werden, dass der Großteil der (aktiven und ruhenden) Mikroglia-signalen in der Ganglienzellschicht sowie der INS lokalisiert waren. Diese Verteilung erscheint kongruent zu den nachgewiesenen Degenerationen der RGZ, der Amakrin- und der Bipolarzellen. Neuroretinale Degeneration führt typischerweise nicht nur zur Aktivierung der Mikrogliazellen, sondern ebenso zu deren lokaler Proliferation und Migration ins Degenerationsgebiet [162, 163]. Die Korrelation von apoptotischen RGZ und einer Aktivierung von Mikroglia konnte bereits in einer Glaukom-Studie an Ratten nachgewiesen werden [144].

Zur Beurteilung der Aktivität der Mikroglia eignet sich die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), welche zur Substanzklasse der reaktiven Sauerstoffspezies gehört. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass iNOS maßgeblich am neuronalen Zelltod beteiligt ist [164, 165]. Die Produktion von iNOS selbst führt wiederum im Rahmen einer positiven Rückkopplung zu einer verstärkten Stimulation der Mikrogliazellen. Dieser zusätzliche Effekt von iNOS stellte sich in Ischämie-Modellen an Rattenretinae bei oxidativem Stress ebenfalls heraus [166].

Hypothermische Therapie konnte diesen durch oxidativen Stress ausgelösten starken Proliferationsraten der retinalen Immunzellen voll entgegenwirken. Die Iba1⁺ Zellen bzw. die iNOS⁺ Zellen änderten sich in der Gruppe 30 °C + H₂O₂ nicht zu den

unbehandelten Kontrollen (Abb. 11). Der neuroprotektive Effekt von hypothermischer Therapie sowie die Verlängerung der Ischämietoleranz wurde schon in Kapitel 1.4 ausführlich beschrieben. Hinzukommt außerdem die Reduktion der Immunaktivität und die Beeinflussung des Migrationsverhaltens der Mikrogliazellen. Somit lässt sich durch Hypothermie der Anstoß proinflammatorischer Prozesse sowie der daraus entstehenden sekundären Zellschäden limitieren. In Tierversuchen an Ratten sowie Mäusen konnte nach ischämischen Cerebralschäden ein Rückgang von iNOS-positiven Mikrogliazellen und weiterer proinflammatorischer Reaktionsfaktoren durch hypothermische Therapie erreicht werden [167, 168].

4.6 Hypothermie wirkt proinflammatorischen Faktoren entgegen

Der durch H_2O_2 induzierte oxidative Stress der Retinazellen führte zu einem teils reversiblen Anstieg von proinflammatorischen Signalmolekülen wie VEGF, HIF-1 α und HSP70.

Retinale Ischämie Modelle zeigen übereinstimmend einen signifikanten Anstieg der hypoxiesensitiven Signalmoleküle VEGF und HIF [21, 129]. VEGF stellt ein zentrales Signalprotein der hypoxie-induzierten Vaskulogenese dar und spielt gleichzeitig eine wichtige Rolle bei der Protektion der Zellen vor oxidativem Stress [132, 134]. In der Retina wird VEGF hauptsächlich von Makrogliazellen ausgeschüttet [135]. Der geringe VEGF-Anstieg lässt sich somit auf die fehlende Makrogliose in diesem Modell zurückführen. Der protektive Effekt von Hypothermie konnte in diesem Modell durch ein Sistieren der VEGF-Expression auf Höhe der Kontrollen nachgewiesen werden (Abb.12).

Als Transkriptionsfaktor reguliert HIF (Hypoxie-induzierter Faktor) die Anpassungsfähigkeit der Zelle an ein mangelndes Sauerstoffangebot [133]. Jedoch gibt es auch eine hypoxieunabhängige Aktivierung des HIF-1 α / β -Dimers, nämlich durch H_2O_2 [169]. Allerdings scheint dieser Effekt erst nach zeitlicher Verzögerung einzutreten. Erstaunlicherweise konnte sogar ein Hypoxie-Degenerationsmodell erst nach acht Tagen einen signifikanten Anstieg der HIF-1 α -Expression feststellen [143]. Dieser Fakt konnte durch den fehlenden Anstieg der HIF-1 α -Expression in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 12). Durch hypothermische Kultivierungsbedingungen konnte, sowohl in dieser als auch in weiteren Studien, die HIF-1 α -Expression auf der Expressionsstärke der Kontrollgruppe gehalten werden (Abb. 12) [141, 143].

Hitzeschockproteine, wie HSP70, fungieren als Chaperone und sind daher für die korrekte Proteinfaltung in Zellen zuständig. Schon Hurst. et al. konnten in ihrer Studie einen Anstieg der HSP70 mRNA Expression nach oxidativem Stress in Schweineretinae feststellen [113]. Oxidativer Stress führt demnach zu einer Anhäufung von Proteinaggregaten in den Zellen, wodurch vermehrt Hitzeschockproteine exprimiert werden [113]. Der Rückgang von HSP70 durch Hypothermie lässt sich durch die Reduktion des oxidativen Stresses bei Temperaturabsenkung erklären (Abb. 12). Auch in Rattenmodellen führte eine 30-Grad-Behandlung nach ischämischer Enzephalopathie zu einem Rückgang der HSP70-Expression [170].

Insgesamt bestätigt der reversible Anstieg der ROS- und Stress-Marker kongruent zu den Mikrogliaereaktionen den neuroprotektiven Einfluss hypothermischer Therapie auf das Inflamationsverhalten.

4.7 Geringe Reaktion proapoptotischer Mechanismen

Die untersuchten proapoptotischen Marker p21, das Bax/Bcl-2-Verhältnis, Caspase 8 sowie NF- κ B und PUMA wiesen nur eine geringe und oft irreversible Reaktion auf die Stressinduktion mit H₂O₂ auf.

p21, welches als Proteinkinaseinhibitor einen Stillstand des Zellzyklus verursacht und typischerweise durch ROS hochreguliert wird, reagierte in diesem Modell weder auf H₂O₂ noch auf Hypothermie (Abb.13) [130]. Eine Erklärung hierfür ist die geringe HIF-1 α Aktivität, welche für die p21-Expression verantwortlich ist [171]. Bax ist ein proapoptotisches Protein, welches die intrinsische Apoptose durch Freisetzung von Cytochrom C in das Zytoplasma induziert (Abb. 3) [137, 172]. Bcl-2 fungiert als antiapoptotischer Gegenspieler, indem es Bax und die Freisetzung von Cytochrom C inhibiert [137]. Die fehlende Reaktion des Bax/Bcl-2-Verhältnisses bei allen Gruppen, lässt kongruent zu CoCl₂-Degenerationsmodellen darauf schließen, dass der intrinsische Apoptose-Signalweg zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht betroffen ist (Abb.14) [113, 141]. Caspase 8, welche bereits im frühen Stadium des extrinsischen Apoptose-Signalwegs aktiviert wird (Abb. 3), erhöhte sich sowohl in diesem Modell wie auch im CoCl₂-Modell bereits zu frühen Messzeitpunkten (Abb. 15) [39, 141]. Kongruent zu den anderen Schweineretina Studien konnte eine hypothermische Behandlung keine signifikante Reduktion der Caspase 8- und der Bax/Bcl-2-mRNA-Expression in den ersten vier bzw. fünf Tagen herbeiführen (Abb. 14+15) [141, 173].

Eine Erklärung hierfür ist die Aktivität anderer proapoptotischer Proteine, welche eine Reduktion von Caspase 8 und Bax/Bcl-2 verhinderten.

ROS stimulieren den NF- κ B-Signalweg, zu dessen Zielgenen iNOS-produzierende, pro-inflammatorische Zytokine und Enzyme zählen [41, 169]. Der NF- κ B-Signalweg interagiert jedoch mit einer Vielzahl intrazellulärer Signalkaskaden [40]. Folglich ist die Induktion von NF- κ B nicht einzig und allein durch die ROS zu erklären, was auch den unerwarteten Anstieg bei der Kombination aus 30 °C und H₂O₂ erklären könnte (Abb. 16). Analog dazu konnte in einer Studie zur retinalen Degeneration durch oxidativen Stress an Ratten an nur einem von fünf Analysezeitpunkten eine Erhöhung von NF- κ B konstatiert werden [174].

Oxidativer Stress induziert in neuronalen Zellen die Expression von PUMA [44, 45, 136]. Des Weiteren konnten Wilson *et al.* nachweisen, dass die auf die Hochregulierung von p53 folgende PUMA-Aktivierung direkt mit dem Zelltod von RGZ in Verbindung steht [175]. Die Ergebnisse stehen mit der Steigerung der PUMA-Expression in der H₂O₂-Gruppe in diesem Modell in Einklang (Abb. 16). Ebenso geht die PUMA-Reduktion mit einem Überleben von RGZ einher, was auch Wilson *et al.* feststellen konnten [176].

Die geringen und teils irreversiblen Reaktionen proapoptotischer Marker verdeutlichen die Abhängigkeit von anderen Proteinexpressionen sowie den zeitlichen Einfluss auf die Reagibilität.

4.8 Vergleich von Retinadegenerationsmodellen mit Wasserstoffperoxid und Kobaltchlorid

H₂O₂-Retinadegenerationsmodelle simulieren degenerative Prozesse durch die Induktion von oxidativem Stress mit Hilfe von H₂O₂ [113]. Retinadegenerationsmodelle mit Kobaltchlorid (CoCl₂), welches in hohen Konzentrationen durch Zerstörung der mitochondrialen Atmungskette zytotoxisch wirkt, führen durch Imitation eines hypoxischen Zellschadens zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [112].

Vergleicht man das H₂O₂-Modell mit dem CoCl₂-Modell, so reduzierte sich in beiden Degenerationsverfahren die Anzahl der RGZ signifikant im Vergleich zu den Kontrollgruppen [112, 143, 177]. Hypothermie konnte den Untergang der RGZ in beiden Modellen vermindern [141, 146, 177]. Die Reaktion PKC α^+ Bipolarzellen war

im Hinblick auf Degeneration und Neuroprotektion durch Hypothermie in beiden Modellen ähnlich, auch wenn die Effekte im CoCl_2 -Modell verzögert und vermindert auftraten [141, 177]. Eine weitere Gemeinsamkeit war die Ausbleibende Makrogliose mit einer verminderten GFAP-Expression in den Degenerationsgruppen [113, 152, 177]. Sowohl im H_2O_2 als auch im CoCl_2 -Modell führte Stress zu einem Anstieg des Inflamationsparameters HSP70 und Hypothermie zu einem Wiederabfall, jedoch erwies sich diese Reaktion nur im CoCl_2 -Modell als signifikant [113, 141]. Die Aktivität des intrinsischen Apoptosewegs, welcher durch das Bax/Bcl-2-Verhältnis widergespiegelt wird, tritt mit zeitlicher Verzögerung ein und war weder im H_2O_2 - noch im CoCl_2 -Modell verstärkt aktiv [113, 141, 177]. Eine verstärkte Caspase-8-Expression konnte in keinem der beiden Modelle durch Hypothermie signifikant gesenkt werden [141].

Unterschiede zeigten sich bei der Reaktion der vulnerablen Amakrinzellen. Während H_2O_2 direkt zum Untergang von Amakrinzellen führte, kam es im CoCl_2 -Modell zu einem verzögerten Verlust, nämlich als Sekundäreffekt von RGZ-Verlusten und trat somit erst zu einem späteren Zeitpunkt (nach acht Tagen) auf [141, 177]. Im oxidativen Stress Modell konnte eine hypothermische Therapie den Untergang von Amakrinzellen verhindern. Dies war im CoCl_2 -Modell nicht möglich [141, 177]. Vermutlich trug dort der erhebliche RGZ-Verlust zum irreversiblen Untergang der Amakrinzellen bei. Die Analyse der Mikrogliareaktion brachte diametrale Ergebnisse hervor. Oxidativer Stress sorgte, kongruent zu anderen H_2O_2 -Modellen, für eine starke Proliferation der immunmodulatorischen Mikroglia [113, 161, 177]. CoCl_2 weist dagegen zytotoxische Effekte auf Mikrogliazellen auf, indem es die Apoptoserate und den Stillstand des Zellzyklus induziert [178]. Auch der Inflamationsmarker HIF nimmt durch die starke Interaktion mit CoCl_2 eine besondere Rolle ein. Die Stabilisierung der 1α Untereinheit durch CoCl_2 verhindert dessen Degradation und geht folglich mit erhöhten Inflamationsreaktionen durch iNOS und HSP70 einher [179-181]. Somit lässt sich eine stärkere HIF Expression in CoCl_2 Modellen gegenüber dem H_2O_2 Modell erklären [141, 143]. Da HIF für die p21-Expression verantwortlich ist, führt folglich die geringere HIF-Expression im H_2O_2 Modell auch zu einer geringeren p21-Expression im Vergleich zum CoCl_2 Modell [171]. Ein weiterer Unterschied betrifft die neuroretinale Dicke. Während eine H_2O_2 -Degeneration zu einem Aufquellen der Retina mit Verlust der Zellverbände geführt hat, verringerte sich die Dicke im CoCl_2 -Modell aufgrund der vorherrschenden Apoptosen [141]. In beiden Fällen konnte Hypothermie die

degenerativen Effekte mindern und zur Normalisierung der Zellstruktur beitragen [141].

Tabelle 15: Vergleich zweier Schweineretinadegenerationsmodelle. Verglichen werden die Auswirkungen der Degeneration mit je 300 μM H_2O_2 und CoCl_2 sowie die Effekte einer simultanen Behandlung unter hypothermischen Bedingungen (30 °C). Die Werte der RGZ, Amakrin- und Bipolarzellen sowie Makro- und Mikroglia beziehen sich auf immunhistochemische Analysen; die Werte pro-inflammatorischer und pro-apoptotischer Marker beziehen sich auf mRNA-Expressionsstärken.

↑ = signifikanter Anstieg, ↓ = signifikanter Abfall, - = kein signifikanter Effekt. Die erste Angabe bezeichnet den Effekt der Degeneration im Vergleich zur Kontrollgruppe; die zweite Angabe bezeichnet den Effekt der hypothermischen Degeneration im Vergleich zur jeweiligen Degenerationsgruppe. d = Tage, h = Stunden, RGZ = Retinale Ganglienzellen, μM = Mikromolar

Vergleich zweier Schweineretinadegenerationsmodelle				
Induktion der Degeneration	H₂O₂ (300 μM)		CoCl₂ (300 μM)	
Behandlungsdauer	3 h		48 h	
Gesamtkultivierungszeit	5 d	8 d	4 d	8 d
Hypothermische Behandlung	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C
Effekte der Behandlung durch Degeneration / Degeneration+Hypothermie				
RGZ	↓ / -	↓ / ↑	↓ / ↑	↓ / ↑
Amakrinzellen	↓ / ↑	↓ / ↑	- / -	↓ / -
Bipolarzellen	↓ / ↑	↓ / -	- / -	↓ / ↑
Makrogliazellen	↓ / -	- / -	↓ / -	↓ / -
Mikrogliazellen	↑ / ↓	↑ / ↓	- / -	↓ / ↑
Pro-inflammatorische Marker				
HIF-1 α	- / -		↑ / ↓	↑ / -
HSP 70	- / -	- /	↑ / ↓	↑ / ↓
Pro-apoptotische Marker				
Bax/Bcl-2	- / -	- / -	- / -	- / -
Caspase 8	- / -		↑ / -	↑ / -
P21	- / -		↑ / ↓	↑ / ↓
Neuroretinale Dicke	↑ / ↓		↓ / ↑	↓ / ↑

4.9 Validierung des Schweineretina-Organkultur-Degenerationsmodells

Das hier untersuchte Modell sollte zur möglichst realistischen Simulation der durch oxidativen Stress hervorgerufenen Retinadegeneration validiert werden. Ziel war es, durch hypothermische Therapie eine Neuroprotektion der Retinazellen zu erreichen, sodass dieses Modell künftig für die Testung potentiell protektiver Substanzen geeignet ist.

Zusammenfassend ist das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Schweineretina-Degenerationsmodell unter Verwendung von einer H_2O_2 -Konzentration von $300 \mu\text{M}$ für eine Simulation der durch oxidativen Stress induzierten Degeneration der Retina geeignet. Durch die erfolgreiche Neuroprotektion mittels Hypothermie konnte gezeigt werden, dass dieses Modell eine optimale, heißt signifikant messbare, aber nicht irreversible Degeneration der Retina induziert. Die dreistündige Behandlung mit H_2O_2 simuliert einen ausreichenden und realistischen Degenerationsgrad von Ganglien-, Bipolar- und Amakrinzellen sowie eine starke Mikrogliareaktion, welche durch hypothermische Therapie erfolgreich verhindert werden kann. Es ermöglicht damit eine große Variationsbreite an zellspezifischen, regenerativen Untersuchungen. Im Vergleich zu einer achttägigen Degeneration mit $300 \mu\text{M}$ H_2O_2 bringen beide Modelle gleich starke RGZ-Verluste hervor und weisen eine gleichstarke Mikrogliareaktion bezüglich Anzahl und Aktivität auf [113]. Auch die Inflammations- und Apoptoseparameter, insbesondere die Bax/Bcl-2-, VEGF- und HSP70-Expressionen, weisen vergleichbar schwache Reaktionen auf [113]. In beiden Modellen trat keine Makrogliose auf [113]. Bipolar- und Amakrinzellen scheinen im Vergleich zu diesem Modell in der achttägigen Behandlung weniger stark von der Degeneration betroffen zu sein [113]. Somit stellt das hier durchgeführte fünftägige Degenerationsmodell durch die relativ kurze Kultivierungsdauer ein sehr zeitsparendes Modell dar, welches sich insbesondere für Kurzzeitstudien gut eignet.

4.10 Schlussfolgerung und Ausblick

Auf klinischer Ebene spielt oxidativer Stress eine zentrale Rolle bei vielen Netzhauterkrankungen. Hierzu zählen u.a. das Glaukom oder retinale Gefäßverschlüsse [51]. Gemein ist, wie in Kapitel 1.2.3 ausführlich erläutert, der ischämische Zustand und der damit einhergehende vermehrte oxidative Stress innerer Netzhautareale [51]. Folglich wurden bereits unterschiedliche Therapiemodelle, etwa

die Gabe von Antioxidantien, wie Dimethylthioharnstoff, Glutathion oder Vitaminen getestet [182, 183]. Auch die Behandlung mit Gypenosiden konnte oxidativen Stressbedingten Zellschaden in der Retina senken [184].

Die Hypothermische Therapie stellt aufgrund der neuroprotektiven Wirkung eine interessante Therapiemöglichkeit dar. Der protektive Nutzen von Hypothermie bei transienter retinaler Ischämie wurde bereits mehrfach nachgewiesen [72, 73]. Die hier angewandte therapeutische hypothermische Kultivierung bei 30 °C führte zu protektiven Effekten im Hinblick auf Mikrogliareaktionen sowie Apoptoseverhalten. Beim Menschen sind verschiedene kurzfristige Anwendungsmöglichkeiten denkbar. So könnte im Rahmen einer Vitrektomie bei einer Netzhautablösung die Retina zur Neuroprotektion mit einer hypothermischen Infusion gespült werden. Bei einer retinalen Ischämie könnte ein hypothermischer Zustand den Untergang retinaler Zellen hinauszögern und so in Kombination mit einer rechtzeitigen Lysetherapie zum Visuserhalt beitragen.

Die erfolgreiche Validierung der hypothermischen Therapie in diesem Degenerationsmodell ermöglicht dessen Verwendung für weitere Therapiestudien. So könnte in Zukunft eine Behandlung mit einem iNOS-Hemmer untersucht werden, um die Inflammationsreaktion auf vermehrten oxidativen Stress innerer Netzhautareale zu reduzieren. Ebenso bietet dieses Modellsystem zahlreichen anderen universitären Arbeitsgruppen sowie auch der Industrie die Möglichkeit, es zur Erforschung neuroretinaler Erkrankungen und zur Entwicklung neuer Therapieansätze zu verwenden oder für die jeweilige Fragestellung abzuwandeln [98]. Die erfolgreiche Etablierung dieses Modells trägt außerdem dazu bei, das Screening von Medikamenten zunehmend auf Organkulturen zu übertragen und leistet somit einen Beitrag, die notwendige Anzahl an Tierversuchen zu reduzieren und nach und nach zu ersetzen [98].

5. Zusammenfassung

Oxidativer Stress spielt in vielen Augenerkrankungen, wie z.B. dem Glaukom oder der retinalen Ischämie, eine zentrale Rolle. Eine denkbare Therapieoption ist die Behandlung mit Hypothermie. Diese soll die toxische Wirkung von Sauerstoffradikalen reduzieren, die Inflammations- und Apoptoserate senken und neuroprotektiv wirken. Im Rahmen dieser Promotion wurde ein bestehendes Retinadegenerationsmodell mittels hypothermischer Therapie validiert. Die Versuche wurden an einem Schweineorgankulturmodell durchgeführt, welches eine realistische Alternative zu Tierversuchen darstellt. Zur Induktion von oxidativem Stress diente die Behandlung mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2). In früheren Arbeiten konnte eine Konzentration von $300 \mu M$ als optimale Dosis für neurodegenerative Effekte ermittelt werden [113]. Für diese Arbeit wurden die Schweineretina-Organkulturen fünf Tage kultiviert. Am ersten Tag der Kultivierung erfolgte eine dreistündige Behandlung mit H_2O_2 . Bei einem Teil der Retinae fand diese Kultivierung unter hypothermischen Bedingungen bei $30 \text{ }^\circ C$ statt. Die Beurteilung der Effekte von H_2O_2 und Hypothermie auf die neuroretinalen Zellen erfolgte mittels immunhistochemischer Färbungen. Zusätzlich wurde die Expression von Inflammations- und Apoptoseparametern in der qRT-PCR und im Western Blot untersucht. Im Ergebnis wurde nicht nur ein signifikanter neurodegenerativer Effekt von H_2O_2 auf neuroretinale Zellen konstatiert, sondern es konnte auch eine erfolgreiche Protektion durch hypothermische Therapie erzielt werden. So war unter hypothermischen Bedingungen die Anzahl der retinalen Ganglienzellen (+3 %) tendenziell, der Amakrin- (+23 %) und Bipolarzellen (+54 %) signifikant erhöht im Vergleich zur normothermen Degenerationsgruppe. Kongruent zu den bisherigen Arbeiten zeigten die Makrogliazellen weder mit noch ohne hypothermischer Therapie eine H_2O_2 -bedingte Makrogliose. Bei den Mikrogliazellen führte die H_2O_2 -Behandlung zu einem signifikanten Anstieg (+40 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe, welcher durch die hypothermische Behandlung vollständig unterbunden wurde. Der Anstieg von Inflammations- und Apoptoseparametern, wie VEGF, HIF, HSP70, p21, Bax/Bcl-2, Caspase 8 konnte durch die Hypothermie nur teilweise verhindert werden. Zusammenfassend ist somit das beschriebene Schweineretina-Degenerationsmodell für die Untersuchung weiterer antioxidativer und neuroprotektiver Substanzen sehr geeignet. Es simuliert einen ausreichenden Degenerationsgrad mit einer starken Abnahme retinaler Zellen und einer Mikrogliareaktion, welche durch hypothermische Therapie erfolgreich unterbunden werden kann.

IV. Liste der Veröffentlichungen

Teile der Ergebnisse, welche aus dieser Dissertationsschrift hervorgegangen sind, wurden publiziert:

Paper:

Ana Mueller-Buehl, Hannah Doepper, Sven Grauthoff, **Tobias Kiebler**, Laura Peters, José Hurst, Sandra Kuehn, Karl U Bartz-Schmidt, B. Dick, Stephanie C Joachim, Sven Schnichels; *Oxidative stress-induced retinal damage is prevented by mild hypothermia in an ex vivo model of cultivated porcine retinas*; Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology; 17/02/2020.

Poster:

Tobias Kiebler, Ana Maliha, José Hurst, K.-U. Bartz-Schmidt, Stephanie C. Joachim, Sven Schnichels; *Prevention of degenerative processes through hypothermia in a porcine retina organ culture model*; Postervorstellung auf der Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), Berlin, Deutschland, 28/09/2019.

Maliha AM, Grauthoff S, **Kiebler T**, Hurst J, Schnichels S, Joachim SC; *Retinal protection against oxidative stress via mild hypothermia*; Kongress der European Society for Alternatives to Animal Testing (EUSAAT), Linz, Österreich, 10/10/2019.

Review:

Sven Schnichels, **Tobias Kiebler**, José Hurst, Ana Maliha, Marina Löscher, H. Burkhard Dick, K. Ulrich Bartz-Schmidt, Stephanie C. Joachim; *Retinal Organ Cultures as Alternative Research Models*; Alternatives to Laboratory Animals (ATLA); 25/06/2019.

Vortrag:

Joachim SC, Kühn S, Hurst J, Tsai T, **Kiebler T**, Schnichels S; *Analyse der toxisch induzierten Zelldegeneration in einer organotypischen Kultur der Schweineretina*; set-Stiftung, Frankfurt, Deutschland, 03/05/2017.

V. Literaturverzeichnis

1. Darwin, C., *The Origin of Species*. 1872.
2. Jülich, F. *Die Retina*. 2013 [cited 2018; Available from: http://www.fz-juelich.de/ics/ics-4/DE/Forschungsthemen/01Retina/artikel_retina.html].
3. W. Kahle, H.L., W. Platzer, *Nervensystem und Sinnesorgane*. Taschenatlas der Anatomie. Vol. 6. 1991: Thieme.
4. Alamouti, B. and J. Funk, *Retinal thickness decreases with age: an OCT study*. Br J Ophthalmol, 2003. **87**(7): p. 899-901.
5. Wilfried de Decker, *Strabismus: 72 Tabellen*. Vol. 3. 2004: Thieme.
6. Cheng, Z., et al., *A derivative of betulinic acid protects human Retinal Pigment Epithelial (RPE) cells from cobalt chloride-induced acute hypoxic stress*. Exp Eye Res, 2019. **180**: p. 92-101.
7. J. C. Behrens, J.B., R. Deutzmann, *Duale Reihe Physiologie* Vol. 2. 2012: Thieme.
8. Masland, R.H., *The fundamental plan of the retina*. Nat Neurosci, 2001. **4**(9): p. 877-86.
9. R. Klinke, H.-C.P., S. Silbernagl, *Physiologie* Vol. 5. 2005: Thieme.
10. G. Aumüller, G.A., A. Doll, *Duale Reihe Anatomie*. Vol. 2. 2010: Thieme.
11. M. Schünke, E.S., U. Schumacher, *Kopf, Hals und Neuroanatomie*. Prometheus, LernAtlas der Anatomie. Vol. 3. 2012: Thieme.
12. Frade, J.M. and Y.A. Barde, *Nerve growth factor: two receptors, multiple functions*. Bioessays, 1998. **20**(2): p. 137-45.
13. Miller, K.R. and W.J. Streit, *The effects of aging, injury and disease on microglial function: a case for cellular senescence*. Neuron Glia Biol, 2007. **3**(3): p. 245-53.
14. Stolzing, A., S. Sethe, and T. Grune, *Chronically active: activation of microglial proteolysis in ageing and neurodegeneration*. Redox Rep, 2005. **10**(4): p. 207-13.
15. Kettenmann, H. and A. Verkhratsky, *[Neuroglia--living nerve glue]*. Fortschr Neurol Psychiatr, 2011. **79**(10): p. 588-97.
16. Kinraide, T.B., I.A. Newman, and B. Etherton, *A Quantitative Simulation Model for H-Amino Acid Cotransport To Interpret the Effects of Amino Acids on Membrane Potential and Extracellular pH*. Plant Physiol, 1984. **76**(3): p. 806-13.
17. Hollander, H., et al., *Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Muller cells*. J Comp Neurol, 1991. **313**(4): p. 587-603.
18. Bringmann, A., et al., *GABA and Glutamate Uptake and Metabolism in Retinal Glial (Muller) Cells*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 48.
19. Bringmann, A., et al., *Muller cells in the healthy and diseased retina*. Prog Retin Eye Res, 2006. **25**(4): p. 397-424.
20. Kowluru, R.A., et al., *Retinal glutamate in diabetes and effect of antioxidants*. Neurochem Int, 2001. **38**(5): p. 385-90.
21. Joachim, S.C., et al., *Protective effects on the retina after ranibizumab treatment in an ischemia model*. PLoS One, 2017. **12**(8): p. e0182407.
22. Agte, S., et al., *Muller glial cell-provided cellular light guidance through the vital guinea-pig retina*. Biophys J, 2011. **101**(11): p. 2611-9.
23. Gandhi, S. and A.Y. Abramov, *Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration*. Oxid Med Cell Longev, 2012. **2012**: p. 428010.
24. Peter C. Heinrich, M.M., Lutz Graeve, *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 2014: Springer Berlin Heidelberg.

25. Halliwell, B., *Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease*. Am J Med, 1991. **91**(3C): p. 14S-22S.
26. Halliwell, B., *Reactive oxygen species and the central nervous system*. J Neurochem, 1992. **59**(5): p. 1609-23.
27. Boveris, A. and B. Chance, *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen*. Biochem J, 1973. **134**(3): p. 707-16.
28. Giulivi, C., A. Boveris, and E. Cadenas, *Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA*. Arch Biochem Biophys, 1995. **316**(2): p. 909-16.
29. Hassan, H.M. and I. Fridovich, *Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds*. Arch Biochem Biophys, 1979. **196**(2): p. 385-95.
30. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 1-13.
31. Aouache, R., et al., *Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(5).
32. Halliwell, B., *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life*. Plant Physiol, 2006. **141**(2): p. 312-22.
33. Halliwell, B., *Biochemistry of oxidative stress*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 5): p. 1147-50.
34. Veal, E.A., A.M. Day, and B.A. Morgan, *Hydrogen peroxide sensing and signaling*. Mol Cell, 2007. **26**(1): p. 1-14.
35. Gough, D.R. and T.G. Cotter, *Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule*. Cell Death Dis, 2011. **2**: p. e213.
36. Suematsu, N., et al., *Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes*. Circulation, 2003. **107**(10): p. 1418-23.
37. Chen, X., et al., *Role of Reactive Oxygen Species in Tumor Necrosis Factor-alpha Induced Endothelial Dysfunction*. Curr Hypertens Rev, 2008. **4**(4): p. 245-255.
38. Nair, P., et al., *Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway*. Methods Enzymol, 2014. **544**: p. 99-128.
39. Zhang, Y.B., W. Zhao, and R.X. Zeng, *Autophagic degradation of caspase-8 protects U87MG cells against H2O2-induced oxidative stress*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(7): p. 4095-9.
40. Oeckinghaus, A., M.S. Hayden, and S. Ghosh, *Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 695-708.
41. Israel, A., *The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(3): p. a000158.
42. King, C.C., et al., *The rate of NF-kappaB nuclear translocation is regulated by PKA and A kinase interacting protein 1*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18713.
43. Nakano, K. and K.H. Vousden, *PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53*. Mol Cell, 2001. **7**(3): p. 683-94.
44. Kitamura, Y., et al., *Hydrogen peroxide-induced apoptosis mediated by p53 protein in glial cells*. Glia, 1999. **25**(2): p. 154-64.
45. Uberti, D., et al., *Hydrogen peroxide induces nuclear translocation of p53 and apoptosis in cells of oligodendroglia origin*. Brain Res Mol Brain Res, 1999. **65**(2): p. 167-75.
46. Kuida, K., *Caspase-9*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. **32**(2): p. 121-4.

47. John C. Reed, Z.H., *APOPTOSIS PATHWAYS AND DRUG TARGETS POSTER*. NATURE REVIEWS 2004.
48. Himori, N., et al., *Critical role of Nrf2 in oxidative stress-induced retinal ganglion cell death*. J Neurochem, 2013. **127**(5): p. 669-80.
49. Kobuch, K., et al., *Maintenance of adult porcine retina and retinal pigment epithelium in perfusion culture: characterisation of an organotypic in vitro model*. Exp Eye Res, 2008. **86**(4): p. 661-8.
50. Maher, P. and A. Hanneken, *The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(2): p. 749-57.
51. Masuda, T., M. Shimazawa, and H. Hara, *Retinal Diseases Associated with Oxidative Stress and the Effects of a Free Radical Scavenger (Edaravone)*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 9208489.
52. Quigley, H.A. and A.T. Broman, *The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020*. Br J Ophthalmol, 2006. **90**(3): p. 262-7.
53. Gesellschaft, D.O. *Stellungnahme der DOG zur Glaukomfrüherkennung*. 2015; Available from: <https://www.dog.org/wp-content/uploads/2015/11/SN-Glaukom-August-2015.pdf>.
54. Joachim, S.C., et al., *Immune response against ocular tissues after immunization with optic nerve antigens in a model of autoimmune glaucoma*. Mol Vis, 2013. **19**: p. 1804-14.
55. Hayreh, S.S., *Prevalent misconceptions about acute retinal vascular occlusive disorders*. Prog Retin Eye Res, 2005. **24**(4): p. 493-519.
56. Rumelt, S., Y. Dorenboim, and U. Rehany, *Aggressive systematic treatment for central retinal artery occlusion*. Am J Ophthalmol, 1999. **128**(6): p. 733-8.
57. Joachim, S.C., et al., *Effect of ischemia duration on autoantibody response in rats undergoing retinal ischemia-reperfusion*. Ophthalmic Res, 2012. **48**(2): p. 67-74.
58. Schmitt, K.R.L., *Hypothermie zur Organprotektion*, in *Medizinischen Fakultät, Klinik für Angeborene Herzfehler / Kinderkardiologie*. 2011, Charité – Universitätsmedizin Berlin.
59. Aibiki, M., et al., *Effect of moderate hypothermia on systemic and internal jugular plasma IL-6 levels after traumatic brain injury in humans*. J Neurotrauma, 1999. **16**(3): p. 225-32.
60. Globus, M.Y., et al., *Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intraischemic brain temperature modulation*. J Neurochem, 1995. **65**(3): p. 1250-6.
61. Kimura, A., et al., *Moderate hypothermia delays proinflammatory cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells*. Crit Care Med, 2002. **30**(7): p. 1499-502.
62. Luchting, B., *Einfluss der Organtemperatur auf den mikrovaskulären Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber*, in *Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München* 2007, LMU München
63. Diestel, A., et al., *Hypothermia protects H9c2 cardiomyocytes from H2O2 induced apoptosis*. Cryobiology, 2011. **62**(1): p. 53-61.
64. Ohmura, A., et al., *Prolonged hypothermia protects neonatal rat brain against hypoxic-ischemia by reducing both apoptosis and necrosis*. Brain Dev, 2005. **27**(7): p. 517-26.
65. Schmaderer, C.L., J.; Stangl, M.; Heemann, U., *Ischämie-/Reperfusionsschaden nach Nierentransplantation*. Transplantinc, Heft 10, 2005(Pabst Science Publishers).
66. Polderman, K.H., *Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia*. Crit Care Med, 2009. **37**(7 Suppl): p. S186-202.

67. Polderman, K.H., S.M. Peerdeman, and A.R. Girbes, *Hypophosphatemia and hypomagnesemia induced by cooling in patients with severe head injury*. J Neurosurg, 2001. **94**(5): p. 697-705.
68. Lewis, M.E., et al., *The effects of hypothermia on human left ventricular contractile function during cardiac surgery*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(1): p. 102-8.
69. Polderman, K.H. and I. Herold, *Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods*. Crit Care Med, 2009. **37**(3): p. 1101-20.
70. Rizzotti, A., J. Bas, and E. Cuestas, *[Efficacy and security of therapeutic hypothermia for hypoxic ischemic encephalopathy: a meta-analysis]*. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba, 2010. **67**(1): p. 15-23.
71. Baillif, S., et al., *[Systemic safety following intravitreal injections of anti-VEGF]*. J Fr Ophthalmol, 2018. **41**(3): p. 271-276.
72. Wang, X., et al., *Neuronal degradation in mouse retina after a transient ischemia and protective effect of hypothermia*. Neurol Res, 2002. **24**(7): p. 730-5.
73. Rey-Funes, M., et al., *Hypothermia prevents nitric oxide system changes in retina induced by severe perinatal asphyxia*. J Neurosci Res, 2011. **89**(5): p. 729-43.
74. Keller, K.E., et al., *Consensus recommendations for trabecular meshwork cell isolation, characterization and culture*. Exp Eye Res, 2018. **171**: p. 164-173.
75. Susskind, D., et al., *Toxic effects of melphalan, topotecan and carboplatin on retinal pigment epithelial cells*. Acta Ophthalmol, 2016. **94**(5): p. 471-8.
76. Ju, W.K., et al., *Elevated hydrostatic pressure triggers release of OPA1 and cytochrome C, and induces apoptotic cell death in differentiated RGC-5 cells*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 120-34.
77. Almasieh, M., et al., *The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma*. Prog Retin Eye Res, 2012. **31**(2): p. 152-81.
78. Morrison, J.C., et al., *Limbal microvasculature of the rat eye*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. **36**(3): p. 751-6.
79. Arango-Gonzalez, B., et al., *In vivo and in vitro development of S- and M-cones in rat retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(10): p. 5320-7.
80. Goldberg, J.L. and B.A. Barres, *The relationship between neuronal survival and regeneration*. Annu Rev Neurosci, 2000. **23**: p. 579-612.
81. Shen, S., et al., *Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy*. Neuron, 1999. **23**(2): p. 285-95.
82. Berkelaar, M., et al., *Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats*. J Neurosci, 1994. **14**(7): p. 4368-74.
83. Mansour-Robaey, S., et al., *Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(5): p. 1632-6.
84. Thomas, C.N., et al., *Retinal Ganglion Cells Die by Necroptotic Mechanisms in a Site-Specific Manner in a Rat Blunt Ocular Injury Model*. Cells, 2019. **8**(12).
85. Johnson, T.V., et al., *Time-Lapse Retinal Ganglion Cell Dendritic Field Degeneration Imaged in Organotypic Retinal Explant Culture*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016. **57**(1): p. 253-64.
86. Langner, A., *Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Untersuchung der Biotransformation von Arzneistoffen*. . Pharmazie in unserer Zeit, 24: 207–218. doi:10.1002/pauz.19950240410, 1995.

87. Lu, Y., S. Kim, and K. Park, *In vitro-in vivo correlation: perspectives on model development*. Int J Pharm, 2011. **418**(1): p. 142-8.
88. Niwa, M., et al., *Retinal Cell Degeneration in Animal Models*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(1).
89. Ruiz-Ederra, J., et al., *The pig eye as a novel model of glaucoma*. Exp Eye Res, 2005. **81**(5): p. 561-9.
90. Almasieh, M. and L.A. Levin, *Neuroprotection in Glaucoma: Animal Models and Clinical Trials*. Annu Rev Vis Sci, 2017. **3**: p. 91-120.
91. Johnson, T.V. and S.I. Tomarev, *Rodent models of glaucoma*. Brain Res Bull, 2010. **81**(2-3): p. 349-58.
92. Levkovitch-Verbin, H., et al., *RGC death in mice after optic nerve crush injury: oxidative stress and neuroprotection*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(13): p. 4169-74.
93. Tsai, T., et al., *Role of Heat Shock Proteins in Glaucoma*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(20).
94. Kuehn, S., et al., *Intravitreal S100B Injection Leads to Progressive Glaucoma Like Damage in Retina and Optic Nerve*. Front Cell Neurosci, 2018. **12**: p. 312.
95. Bouhenni, R.A., et al., *Animal models of glaucoma*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 692609.
96. Gyan Prakash, T.I., *Advances in Vision Research, Volume I: Genetic Eye Research in Asia and the Pacific*. Vol. I. 2017. 523.
97. Huber, G., et al., *Novel rodent models for macular research*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13403.
98. Schnichels, S., et al., *Retinal Organ Cultures as Alternative Research Models*. Altern Lab Anim, 2019. **47**(1): p. 19-29.
99. Kaempf, S., et al., *Novel organotypic culture model of adult mammalian neurosensory retina in co-culture with retinal pigment epithelium*. J Neurosci Methods, 2008. **173**(1): p. 47-58.
100. Mohlin, C., et al., *Autophagy and ER-stress contribute to photoreceptor degeneration in cultured adult porcine retina*. Brain Res, 2014. **1585**: p. 167-83.
101. Tamiya, S., L. Liu, and H.J. Kaplan, *Epithelial-mesenchymal transition and proliferation of retinal pigment epithelial cells initiated upon loss of cell-cell contact*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(5): p. 2755-63.
102. Taylor, L., K. Arner, and F. Ghosh, *N-methyl-N-nitrosourea-induced neuronal cell death in a large animal model of retinal degeneration in vitro*. Exp Eye Res, 2016. **148**: p. 55-64.
103. John Hopkins Bloomberg School of Public Health. *The principles of Humane Experimental Technique*, W.M.S. Russell and R.L. Burch. 2017; Available from: http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc.
104. National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research. *The 3Rs*. 2017; Available from: <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>.
105. Guduric-Fuchs, J., et al., *Immunohistochemical study of pig retinal development*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 1915-28.
106. Hendrickson, A. and D. Hicks, *Distribution and density of medium- and short-wavelength selective cones in the domestic pig retina*. Exp Eye Res, 2002. **74**(4): p. 435-44.
107. Johansson, U.E., S. Eftekhari, and K. Warfvinge, *A battery of cell- and structure-specific markers for the adult porcine retina*. J Histochem Cytochem, 2010. **58**(4): p. 377-89.
108. Fliesler, S.J. and R.E. Anderson, *Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina*. Prog Lipid Res, 1983. **22**(2): p. 79-131.

109. Osborne, N.N., et al., *A hypothesis to explain ganglion cell death caused by vascular insults at the optic nerve head: possible implication for the treatment of glaucoma*. Br J Ophthalmol, 2001. **85**(10): p. 1252-9.
110. Tezel, G., *Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences*. Prog Retin Eye Res, 2006. **25**(5): p. 490-513.
111. Roark, E.F., et al., *Evidence for endogenous proteases, mRNA level and insulin as multiple mechanisms of N-cadherin down-regulation during retinal development*. Development, 1992. **114**(4): p. 973-84.
112. Kuehn, S., et al., *Degenerative effects of cobalt-chloride treatment on neurons and microglia in a porcine retina organ culture model*. Exp Eye Res, 2017. **155**: p. 107-120.
113. Hurst, J., et al., *A novel porcine ex vivo retina culture model for oxidative stress induced by H(2)O(2)*. Altern Lab Anim, 2017. **45**(1): p. 11-25.
114. KG, B.F.m.C. 2017.
115. Landwirtschaft, B.f.E.u. *Tierische Nebenprodukte*. 2021; Available from: https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tiergesundheit/tierische-nebenprodukte/tierische-nebenprodukte_node.html.
116. Ridet, J.L., et al., *Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function*. Trends Neurosci, 1997. **20**(12): p. 570-7.
117. Hutchins, J.B. and J.G. Hollyfield, *Cholinergic neurons in the human retina*. Exp Eye Res, 1987. **44**(3): p. 363-75.
118. Ahn, M., et al., *Immunohistochemical localization of protein kinase C-alpha in the retina of pigs during postnatal development*. Neurosci Lett, 2009. **455**(2): p. 93-6.
119. Madeira, M.H., et al., *Contribution of microglia-mediated neuroinflammation to retinal degenerative diseases*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 673090.
120. Arroba, A.I., et al., *Modulation of microglia polarization dynamics during diabetic retinopathy in db/db mice*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1862**(9): p. 1663-74.
121. Welsch, *Lehrbuch Histologie Vol. 2*. 2005.
122. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
123. Schultheiss, M., et al., *Staurosporine-induced differentiation of the RGC-5 cell line leads to apoptosis and cell death at the lowest differentiating concentration*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2012. **250**(8): p. 1221-9.
124. Wilkinson, K.D., et al., *The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase*. Science, 1989. **246**(4930): p. 670-3.
125. Casson, R.J., J.P. Wood, and N.N. Osborne, *Hypoglycaemia exacerbates ischaemic retinal injury in rats*. Br J Ophthalmol, 2004. **88**(6): p. 816-20.
126. Chidlow, G., et al., *Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve transection: an RT-PCR study*. Mol Vis, 2005. **11**: p. 387-96.
127. Nash, M.S. and N.N. Osborne, *Assessment of Thy-1 mRNA levels as an index of retinal ganglion cell damage*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**(6): p. 1293-8.
128. Osborne, N.N., et al., *ACS67, a hydrogen sulfide-releasing derivative of latanoprost acid, attenuates retinal ischemia and oxidative stress to RGC-5 cells in culture*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(1): p. 284-94.
129. Tan, S.Q., et al., *Xue-fu-Zhu-Yu decoction protects rats against retinal ischemia by downregulation of HIF-1alpha and VEGF via inhibition of RBP2 and PKM2*. BMC Complement Altern Med, 2017. **17**(1): p. 365.
130. Yang, J., et al., *Oxidative stress and cell cycle arrest induced by short-term exposure to dustfall PM2.5 in A549 cells*. Environ Sci Pollut Res Int, 2018. **25**(23): p. 22408-22419.

131. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
132. Shweiki, D., et al., *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis*. Nature, 1992. **359**(6398): p. 843-5.
133. Haase, V.H., *HIF-prolyl hydroxylases as therapeutic targets in erythropoiesis and iron metabolism*. Hemodial Int, 2017. **21 Suppl 1**: p. S110-S124.
134. el-Remessy, A.B., et al., *Oxidative stress inactivates VEGF survival signaling in retinal endothelial cells via PI 3-kinase tyrosine nitration*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 1): p. 243-52.
135. Li, S.Y., Z.J. Fu, and A.C. Lo, *Hypoxia-induced oxidative stress in ischemic retinopathy*. Oxid Med Cell Longev, 2012. **2012**: p. 426769.
136. Steckley, D., et al., *Puma is a dominant regulator of oxidative stress induced Bax activation and neuronal apoptosis*. J Neurosci, 2007. **27**(47): p. 12989-99.
137. Chipuk, J.E., et al., *The BCL-2 family reunion*. Mol Cell, 2010. **37**(3): p. 299-310.
138. Zhao, Q.J., X.G. Zhang, and L.X. Wang, *Mild hypothermia therapy reduces blood glucose and lactate and improves neurologic outcomes in patients with severe traumatic brain injury*. J Crit Care, 2011. **26**(3): p. 311-5.
139. Antonic, A., et al., *Hypothermia protects human neurons*. Int J Stroke, 2014. **9**(5): p. 544-52.
140. Salido, E.M., et al., *Global and ocular hypothermic preconditioning protect the rat retina from ischemic damage*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61656.
141. Maliha, A.M., et al., *Diminished apoptosis in hypoxic porcine retina explant cultures through hypothermia*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 4898.
142. Klemm, P., et al., *Hypothermia protects retinal ganglion cells against hypoxia-induced cell death in a retina organ culture model*. Clin Exp Ophthalmol, 2019. **47**(8): p. 1043-1054.
143. Hurst, J., et al., *iNOS-inhibitor driven neuroprotection in a porcine retina organ culture model*. J Cell Mol Med, 2020.
144. Wang, X., S.S. Tay, and Y.K. Ng, *An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinæ of rats with experimental glaucoma*. Exp Brain Res, 2000. **132**(4): p. 476-84.
145. Winkler, J., et al., *Cellular and cytoskeletal dynamics within organ cultures of porcine neuroretina*. Exp Eye Res, 2002. **74**(6): p. 777-88.
146. Schultheiss, M., et al., *Hypothermia Protects and Prolongs the Tolerance Time of Retinal Ganglion Cells against Ischemia*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0148616.
147. Reinhard, K., et al., *Hypothermia Promotes Survival of Ischemic Retinal Ganglion Cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016. **57**(2): p. 658-63.
148. Bringmann, A., et al., *Cellular signaling and factors involved in Muller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects*. Prog Retin Eye Res, 2009. **28**(6): p. 423-51.
149. de Hoz, R., et al., *Retinal Macrogial Responses in Health and Disease*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 2954721.
150. Sachsenweger, M., *Duale Reihe Augenheilkunde*. Vol. 2. 2003: Thieme.
151. Tuccari, G., et al., *Distribution of glial fibrillary acidic protein in normal and gliotic human retina*. Basic Appl Histochem, 1986. **30**(4): p. 425-32.
152. Kuehn, S., et al., *The novel induction of retinal ganglion cell apoptosis in porcine organ culture by NMDA - an opportunity for the replacement of animals in experiments*. Altern Lab Anim, 2016. **44**(6): p. 557-568.

153. Ulyanova, T., et al., *Oxidative stress induces heme oxygenase-1 immunoreactivity in Muller cells of mouse retina in organ culture*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(6): p. 1370-4.
154. Ghosh, F., et al., *Retinal neuroinflammatory induced neuronal degeneration - Role of toll-like receptor-4 and relationship with gliosis*. Exp Eye Res, 2018. **169**: p. 99-110.
155. Akopian, A., et al., *Amacrine cells coupled to ganglion cells via gap junctions are highly vulnerable in glaucomatous mouse retinas*. J Comp Neurol, 2019. **527**(1): p. 159-173.
156. Reinehr, S., et al., *HSP27 immunization reinforces All amacrine cell and synapse damage induced by S100 in an autoimmune glaucoma model*. Cell Tissue Res, 2018. **371**(2): p. 237-249.
157. Schmid, H., et al., *Loss of inner retinal neurons after retinal ischemia in rats*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(4): p. 2777-87.
158. Lam, T.T., et al., *N-methyl-D-aspartate (NMDA)--induced apoptosis in rat retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**(10): p. 2391-7.
159. Peterson, L.J. and P.M. Flood, *Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 401264.
160. Zhu, X., et al., *Causes of oxidative stress in Alzheimer disease*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(17): p. 2202-10.
161. Soderstjerna, E., et al., *Silver and gold nanoparticles exposure to in vitro cultured retina--studies on nanoparticle internalization, apoptosis, oxidative stress, glial- and microglial activity*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e105359.
162. Langmann, T., *Microglia activation in retinal degeneration*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(6): p. 1345-51.
163. Rashid, K., A. Wolf, and T. Langmann, *Microglia Activation and Immunomodulatory Therapies for Retinal Degenerations*. Front Cell Neurosci, 2018. **12**: p. 176.
164. Brown, G.C., *Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 5): p. 1119-21.
165. Mander, P. and G.C. Brown, *Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration*. J Neuroinflammation, 2005. **2**: p. 20.
166. Cho, K.J., et al., *Glial cell response and iNOS expression in the optic nerve head and retina of the rat following acute high IOP ischemia-reperfusion*. Brain Res, 2011. **1403**: p. 67-77.
167. Lee, J.H., et al., *Regulation of therapeutic hypothermia on inflammatory cytokines, microglia polarization, migration and functional recovery after ischemic stroke in mice*. Neurobiol Dis, 2016. **96**: p. 248-260.
168. Truettner, J.S., H.M. Bramlett, and W.D. Dietrich, *Posttraumatic therapeutic hypothermia alters microglial and macrophage polarization toward a beneficial phenotype*. J Cereb Blood Flow Metab, 2017. **37**(8): p. 2952-2962.
169. Marinho, H.S., et al., *Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors*. Redox Biol, 2014. **2**: p. 535-62.
170. Lee, B.S., et al., *Hypothermia decreased the expression of heat shock proteins in neonatal rat model of hypoxic ischemic encephalopathy*. Cell Stress Chaperones, 2017. **22**(3): p. 409-415.
171. Carmeliet, P., et al., *Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis*. Nature, 1998. **394**(6692): p. 485-90.
172. Miyashita, T., et al., *Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo*. Oncogene, 1994. **9**(6): p. 1799-805.

173. Zitta, K., et al., *2-Iminobiotin Superimposed on Hypothermia Protects Human Neuronal Cells from Hypoxia-Induced Cell Damage: An in Vitro Study*. *Front Pharmacol*, 2017. **8**: p. 971.
174. Shinde, V.M., et al., *ER stress in retinal degeneration in S334ter Rho rats*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e33266.
175. Wilson, A.M., et al., *ASPP1/2 regulate p53-dependent death of retinal ganglion cells through PUMA and Fas/CD95 activation in vivo*. *J Neurosci*, 2013. **33**(5): p. 2205-16.
176. Wilson, A.M., et al., *Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 (iASPP) is required for neuronal survival after axonal injury*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e94175.
177. Mueller-Buehl, A.M., et al., *Oxidative stress-induced retinal damage is prevented by mild hypothermia in an ex vivo model of cultivated porcine retinas*. *Clin Exp Ophthalmol*, 2020. **48**(5): p. 666-681.
178. Wang, H.G., *Injury effect of CoCl₂-induced chemical hypoxia on N9 microglia*. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2013. **29**.
179. Yuan, Y., et al., *Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(18): p. 15911-6.
180. Catalani, S., et al., *Neurotoxicity of cobalt*. *Hum Exp Toxicol*, 2012. **31**(5): p. 421-37.
181. Karovic, O., et al., *Toxic effects of cobalt in primary cultures of mouse astrocytes. Similarities with hypoxia and role of HIF-1alpha*. *Biochem Pharmacol*, 2007. **73**(5): p. 694-708.
182. Wiktorowska-Owczarek, A. and J.Z. Nowak, *[Pathogenesis and prophylaxis of AMD: focus on oxidative stress and antioxidants]*. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2010. **64**: p. 333-43.
183. Alio, J.L., et al., *Antioxidant therapy in the treatment of experimental acute corneal inflammation*. *Ophthalmic Res*, 1995. **27**(3): p. 136-43.
184. Zhang, H.K., et al., *Gypenosides Prevent H₂O₂-Induced Retinal Ganglion Cell Apoptosis by Concurrently Suppressing the Neuronal Oxidative Stress and Inflammatory Response*. *J Mol Neurosci*, 2020. **70**(4): p. 618-630.

VI. Anhang



Die Oberbürgermeisterin

Ordnungsamt

Stadt Bochum | 32 1111 | 44777 Bochum

Knappschafts Krankenhaus
 Universitätsaugenklinik
 Frau Dr. med. Joachim
 In der Schornau 23-25
 44892 Bochum

Historisches Rathaus
 Willy-Brandt-Platz 2-6
 44777 Bochum
 Zimmer 249

Frau Rohn
 fon 0234/910-1408
 fax 0234/910-1351
 amt32@bochum.de

www.bochum.de

Mein Zeichen: 32 1111

14.12.2015

Tierische Nebenprodukte

Registrierung gemäß §§ 7 und 26 TierNebV i.V.m. Art. 23 VO (EG) 1069/2009

Sehr geehrte Frau Dr. Joachim,

Bezug nehmend auf Ihren Antrag auf Registrierung gemäß §§ 7 und 26 TierNebV i.V.m. Art. 23 VO (EG) 1069/2009 teile ich Ihnen folgende Registrierungsnummer zu:

DE 05 911 00 29 21

Sie haben mir mit Ihrem Schreiben angezeigt, dass Sie im Rahmen Ihrer Forschung tierische Nebenprodukte handhaben und transportieren. Bei dem von Ihnen verwendeten Material handelt es sich ausschließlich um Material der Kategorie 3 im Sinne der VO (EG) 1069/2009.

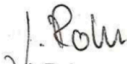
Vorsorglich weise ich darauf hin, dass Sie gemäß § 12 TierNebG der Überwachung durch mich als zuständige Behörde unterstehen. Im Rahmen Ihrer Verantwortung als Betreiber, sind Sie verpflichtet sicherzustellen, dass die Anforderungen der VO (EG) 1069/2009 in Ihrem Betrieb eingehalten werden.

Dies bedeutet insbesondere:

- das Verbot einer nachfolgenden Verwendung der tierischen Nebenprodukte oder ihrer Folgeprodukte zu anderen Zwecken
- die Verpflichtung, die tierischen Nebenprodukte oder Folgeprodukte sicher zu beseitigen oder sie gegebenenfalls an ihren Ursprungsort zurückzusenden.

Sollten sich Änderungen ergeben, sind Sie verpflichtet mir diese mitzuteilen.

Mit freundlichen Grüßen
 Im Auftrag


 J. Rohn

VII. Eigenanteilerklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Inauguraldissertation mit dem Titel

„Validierung der hypothermischen Therapie

in einem oxidativen Stress Modell der Schweineretina“

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe. Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall eine inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Außerdem erkläre ich, dass ich diese Dissertationsarbeit in dieser oder ähnlicher Form bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Tübingen, den 12.04.2021

Tobias Nicolas Ernil Kiebler

VIII. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Karl-Ulrich Bartz-Schmidt bedanken, dass er mir die großartige Möglichkeit gegeben hat, diese Promotionsarbeit in seiner Klinik anfertigen zu dürfen.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Sven Schnichels für die Ermöglichung, die Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen sowie die außerordentlich gute Betreuung und Unterstützung. Frau Dr. rer. nat. José Hurst und den Labormitarbeiterinnen Manuela Kübler, Marina Löscher, Katharina Rasp sowie Karin Tiedemann möchte ich meinen großen Dank für die vertrauensvolle, hilfsbereite und kollegiale Zusammenarbeit aussprechen.

Ebenso herzlich danke ich Frau Prof. Dr. Stephanie C. Joachim für die bilaterale und zielorientierte Zusammenarbeit inklusive der Ermöglichung eines temporären Forschungsaufenthaltes in ihrer Arbeitsgruppe. Den dortigen Kolleginnen, insbesondere Frau Dr. Sandra Kühn, Ana Maliha sowie Natalie Gimbel möchte ich ebenfalls meinen Dank für die gute Zusammenarbeit aussprechen.

Der Young-DOG danke ich sehr für die ideelle und finanzielle Unterstützung, die für mich neben der Ermöglichung eines Freisemesters mit Konzentration auf die experimentelle Forschungsarbeit eine große Ehre und Wertschätzung darstellt.

Abschließend möchte ich mich bei allen direkt oder indirekt Beteiligten für ihre Unterstützung, Rücksichtnahme und ihr Verständnis während der gesamten Promotionsphase bedanken.