Einfluss von Makrophagen und IL-6 auf die axonale Regeneration retinaler Ganglienzellen bei der adulten Ratte

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der
Fakultät für Naturwissenschaften
der Universität Ulm

vorgelegt von
Thomas Hauk
aus Ratibor

2008

Dekan der Naturwissenschaftlichen Fakultät: Prof. Dr. Spindler

1. Gutachter: Prof. Dr. Horn

2. Gutachter: PD Dr. Stein

Tag der Promotion: 30.09.2008

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS I

1 EINLEITUNG 1

1.1 VORWORT 1
1.2 URSACHEN FÜR DAS REGENERATIONSDEFIZIT IM ZNS 2
1.2.1 Inhibitorische Einflüsse der glialen Umgebung im ZNS 2
1.2.2 Verlust des intrinsischen Regenerationspotentials 6
1.2.3 Defizit an neurotrophen Faktoren 7
1.3 LINSENVERLETZUNG – STRATEGIE ZUR ÜBERWINDUNG DES REGENERATIONSDEFIZITS 9
1.4 MONOZYTEN UND MAKROPHAGEN 10
1.4.1 Entstehung und Entwicklung 10
1.4.2 Allgemeine Funktion und Aktivierung von Makrophagen 11
1.4.3 Makrophagendepletion durch Clodronat 13
1.5 ONCOMODULIN (PARVALBUMIN ß) 14
1.5.1 Kalzium-bindende Proteine 14
1.5.2 Oncomodulin (Parvalbumin ß) 15
1.6 ZYTOKINE 15
1.6.1 Das Zytokin Interleukin-6 16
1.6.2 Interleukin-6-Rezeptor und Signaltransduktion 17
1.7 DIE NETZHAUT DER RATTE ALS MODELL ZUR ERFORSCHUNG NEURODEGENERATIVER ERKRANKUNGEN 19
1.8 FRAGESTELLUNG 20

2 MATERIAL UND METHODEN 22

2.1 CHIRURGISCHE METHODEN 22
2.1.1 Material 22
2.1.2 Versuchstiere 23
2.1.3 Operationsprotokolle 23
2.1.4 Intrakardiale Perfusion und Gefriermikrotomschnitte 28
2.2 LICHTMIKROSKOPISCHE VERFAHREN 29
2.2.1 Material 29
2.2.2 Immunhistochemie 30
2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie 31
2.3 BIOCHEMISCHE VERFAHREN 33
2.3.1 Material 34
2.3.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese 35
2.3.3 Proteinnachweis mittels Western-blotting 37
2.3.4 Herstellung von Clodronat-Liposomen 39

2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE VERFAHREN 39
2.4.1 Polymerasekettenreaktion 39
2.4.2 Reverse Transkription (RT) 41
2.4.3 Quantitative real-time RT-PCR 42
2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese 43
2.4.5 Klonierung von Oncomodulin 44
2.4.6 Präparation von Plasmid-DNA 45
2.4.7 RNA-Extraktion 45
2.4.8 Isolierung von peritonealer Makrophagen 46
2.5 ZELLBIOLOGISCHE VERFAHREN 47
2.5.1 Material 47
2.5.2 Zellkultivierung 48
2.5.3 Transfektion von HEK293 48
2.5.4 Zellextraktion 48
2.6 STATISTIK 49

3 ERGEBNISSE 50

3.1. DIE MAKROPHAGENDEPLETION IM INNEREN AUGE 50
3.1.1 Definition von Makrophagen und Mikrogliazellen 51
3.1.2 Quantifizierung der ED1- und Ox42-positiven Zellen 52
3.1.3 Einfluss der Makrophagendepletion auf die Expression von GFAP und Gap43 56
3.2 EINFLUSS VON MAKROPHAGEN AUF DAS ÜBERLEBEN VON AXOTOMIERTEN RGZ 60
3.3 EINFLUSS VON MAKROPHAGEN AUF DIE AXONALE REGENERATION 63
3.4 UNTERSUCHUNG DER ONCOMODULIN-EXPRESSION 68
3.4.1 Einfluss der Makrophagendepletion auf die Oncomodulin-Expression 68
3.4.2 Expressionsuntersuchung von Oncomodulin im inneren Auge 75
3.4.3 Untersuchung der Oncomodulin-Expression hinsichtlich unterschiedlicher Rattenstämme 77
3.4.4 Untersuchung der Oncomodulin-Expression hinsichtlich unterschiedlicher Zeitpunkte 78
3.5 UNTERSUCHUNG DER NEURITOGENEN EFFEKTE VON IL-6 79
3.5.1 Untersuchung der Expression von IL-6 in der Retina 79
3.5.2 Einfluss von IL-6 auf dissoziierte RGZ 80
3.5.3 Einfluss von IL-6 auf die axonale Regeneration in vivo 82

4 DISKUSSION 87

4.1 DIE MAKROPHAGENDEPLETION IM INNEREN AUGE 88
4.2 EINFLUSS VON MAKROPHAGEN AUF DAS ÜBERLEBEN VON AXOTOMIERTEN RGZ 90
4.3 EINFLUSS VON MAKROPHAGEN AUF DIE AXONALE REGENERATION 91
4.4 UNTERSUCHUNG DER ONCOMODULIN-EXPRESSION 92

4.5 UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION VON IL-6 IN DER RETINA..... 95
4.6 UNTERSUCHUNG DER NEURITOGENEN EFFEKTE VON IL-6 96

5 ZUSAMMENFASSUNG.....99

6 SUMMARY 100

7 LITERATURVERZEICHNIS 101

DANKSAGUNG.....122

CURRICULUM VITAE.....123

VERÖFFENTLICHUNGEN.....124

ERKLÄRUNG.....124

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAV-2	Adeno-assoziierter Virus (Serotyp 2)
ad libitum	nach Belieben
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	*Brain-derived neurotrophic factor*
Bp	Basenpaar
Bromphenolblau	3‘,3‘‘,5‘,5‘‘-Tetrabromphenol-sulfonphthalein
BSA	Rinderserumalbumin
BSF-2	B-Zellen stimulierender Faktor
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
$CaCl_2$	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBM	Zytokin-bindendes Modul
cDNA	*copy* DNA
Cl_2MDP	Dichlormethylen-diphosphonat (Clodronat)
Clo	Clodronathaltige Liposomen (Clodrolips)
CNTF	*Ciliary neurotrophic factor*
CO_2	Kohlendioxid
CS	*Colliculus superior*
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
CSPG	Chondroitinsulfatproteoglykan
d	Tag(e)
dH_2O	destilliertes Wasser
DMEM	*Dulbecco’s Modified Eagle Medium*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP’s	Desoxyribonukleosidtriphosphat

DTT	Dithiothreitol
ECL	*Enhanced chemoluminescence*
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötales Kälberserum
Gap43	*Growth-associated protein 43*
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GFAP	*Glial fibrillary acidic protein*
Gp80	Glykoprotein 80
Gp130	Glykoprotein 130
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
INF	Interferon
JAK	Januskinase
K	Kontrolle
kb	Kilobasenpaar
kD	Kilo Dalton
LV	Linsenverletzung
LIF	*Leukemia inhibitory factor*
Lip	Kontrollliposomen
LPS	Lipopolysaccharide

M	molar
MAG	*Myelin-associated glycoprotein*
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
mRNA	*messenger* Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n	Anzahl der verwendeten Tiere
NaCl	Natriumchlorid
NGF	*Nerve growth factor*
NO	Stickstoffmonoxid
NgR	Nogo-Rezeptor
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NT-3	*Neurotrophin-3*
NT-4	*Neurotrophin-4*
$\mathbf{O}_2$	Sauerstoff
OEG	*Olfactory ensheating glia*
OMgp	*Oligodendrocyte-myelin glycoprotein*
OSM	Oncostatin-M
PBS	Phospat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pen/ Strep	Penicillin/ Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PI-3-K	Phosphotidylinositol-3-Kinase
PNS	Peripheres Nervensystem
RGZ	Retinale Ganglienzelle(n)
RGS	Retinale Ganglienzellschicht

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	Standardfehler der Mittelwerte
SHP-2	Zytosolische Phosphotyrosin Phosphatase-2
SQ	Sehnervquetschung
Stat3	*Signal transducers and activators of transcription-3*
Tab.	Tabelle
TAE	Tris – Acetat – EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N‘, N-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris- (Hydroxymethyl-) Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat
U	*unit*
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
(v/v)	Volumen/ Volumen Verhältnis
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Die Anpassung eines Organismus an veränderte Umweltbedingungen, krankhafte Prozesse und Verletzungen erfordert im Verlauf seines Lebens natürliche Regenerationsprozesse. Die Fähigkeit zur Regeneration geht nach der Ausreifung des Zentralen Nervensystems (ZNS) bei höheren Vertebraten (Vögel und Säugetiere) im Gegensatz zu niederen Vertebraten weitestgehend verloren. Eine spontane axonale Regeneration mit vollständiger Wiederherstellung verloren gegangener Funktionen nach einer Verletzung ist demnach im adulten ZNS mit Ausnahme bestimmter Regionen wie dem olfaktorischen System nicht möglich. Als Konsequenz führen Verletzungen und Schädigungen des ZNS zu irreparablen Schäden. Bei der Multiplen Sklerose entstehen durch die Zerstörung von Markscheiden Läsionen in der weißen Substanz von Gehirn und Rückenmark, die unter anderem mit einem axonalen Verlust assoziiert sind. Ebenso kann eine Verletzung zentraler Nervenfasern im Rückenmark bzw. Sehnerven (als Teil des ZNS) in einer Querschnittslähmung bzw. Erblindung des betroffenen Auges resultieren.

Im Gegensatz zum adulten ZNS können verletzte Axone von Nervenzellen des Peripheren Nervensystems (PNS) regenerieren und behalten trotz postmitotischer Reifung die Fähigkeit zur axonalen Regeneration mit partieller funktioneller Restaurierung nach einer Läsion bei.

Die oben angeführten Beispiele verdeutlichen die Notwendigkeit der Erforschung der molekularen Mechanismen, die der Regenerationsinsuffizienz des ZNS zugrunde liegen. Deren Kenntnis stellt eine Voraussetzung für die Entwicklung innovativer therapeutischer Strategien zur Steigerung der axonalen Regeneration dar, die vielleicht in Zukunft klinische Relevanz für die Forschungsbereiche der Multiplen Sklerose, traumatischen Verletzungen des Rückenmarks und Sehnerven erlangen können.

1.2 Ursachen für das Regenerationsdefizit im ZNS

1.2.1 Inhibitorische Einflüsse der glialen Umgebung im ZNS

Verletzte Nervenfasern des adulten ZNS höherer Vertebraten sind nicht mehr regenerationsfähig, was unter anderem auf die hemmenden Einflüsse der zentralnervösen Umgebung im ZNS zurückgeführt wurde (Cajal, 1928). Demgegenüber steht die Fähigkeit zur axonalen Nervenregeneration bei niederen Vertebraten wie Fischen und Amphibien sowie Nervenzellen des noch unreifen ZNS und vor allem des PNS (Aguyao et al., 1991; Benfey and Aguayo, 1982; Bentley and Zottoli, 1993). Die Arbeitsgruppe um Aguayo konnte jedoch die grundsätzliche Regenerationsfähigkeit von ZNS-Neuronen adulter Säugetiere zur axonalen Regeneration zeigen. Dies setzt allerdings eine geeignete, wachstumspermissive Umgebung voraus. In Transplantationsexperimenten konnte beobachtet werden, dass Axone von Nervenzellen des Spinaltrakts nach Durchtrennung in ein Transplantat aus peripheren Ischiasnerven einwachsen können (David and Aguayo, 1981). In nachfolgenden Studien wurde die grundsätzliche Fähigkeit von ZNS-Neuronen zur axonalen Regeneration in verschiedenen ZNS-Regionen wie dem Sehnerven (Vidal-Sanz et al., 1987) oder dem olfaktorischen System (Ramon-Cuerto et al., 2000) bestätigt und weiterentwickelt. Ramon-Cuerto et al. (2000) beobachteten hierbei, dass verletzte Axone von Rückenmarksneuronen durch die Transplantation von glialen Zellen des olfaktorischen Systems (OEG, olfactory ensheathing glia) eine schwache, jedoch signifikante axonale Regeneration zeigten (Ramon-Cuerto et al., 2000; Franklin et al., 2000).

Diese Studien führten zu der Annahme, dass das Problem des Regenerationsdefizits im adulten ZNS unter anderem mit den inhibitorischen Eigenschaften der glialen Umgebung im ZNS assoziiert ist. Neben der Ausbildung einer gliotischen Narbe an der Läsionstelle sind vor allem spezifische Proteine im Myelin für die Nichtregenerierbarkeit von adulten ZNS-Neuronen verantwortlich. Zu diesen Myelin-assoziierten Proteinen, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch genauer beschrieben werden, gehören Nogo-A, das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) und das Oligodendrozyten Myelin Glykoprotein (OMgp) (Chen et al., 2000; GrandPre et al., 2000; McKerracher et al., 1994; Wang et al., 2002; Schwab, 2004; Silver and Miller, 2004; Qiu et al., 2000). In den letzten Jahren sind

mit Semaphorin 4D und Ephrin B3 weitere Myelinhemmer identifiziert worden, die das axonale Auswachsen von ZNS-Neuronen durch eine Destabilisierung des Wachstumskegels inhibieren können (Benson et al., 2005; Moreau-Fauvarque et al., 2003; Yiu and He, 2006). Auch die insuffiziente Versorgung der Nervenzellen mit neurotrophen Faktoren (Oudega and Hagg, 1999; Logan et al., 2006; Taylor et al., 2004) und die Unfähigkeit, embryonal vorhandene, wachstumsassoziierte Programme zu induzieren, werden als weitere Gründe für die Regenerationsinsuffizienz im adulten ZNS diskutiert (Cajal, 1928; Silver and Miller, 2004; Yiu and He, 2006; Filbin, 2003; Qiu et al., 2000).

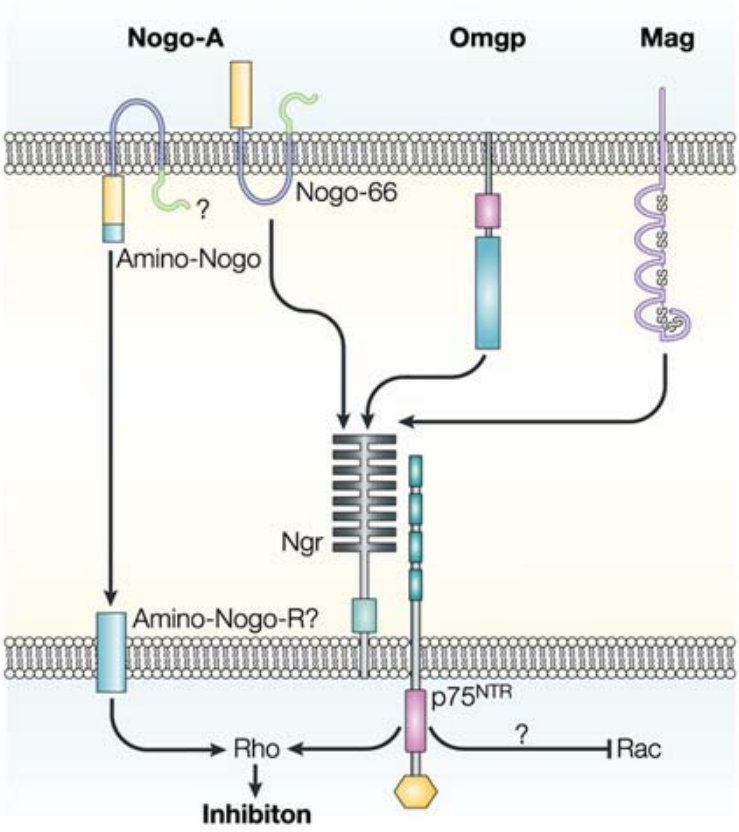


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Signaltransduktion über den Nogo-Rezeptor (Ngr) ausgehend von den wachstumsinhibierenden Membranproteinen Nogo-A, MAG (Myelin-assoziiertes Glykoprotein) und OMgp (Oligodendrozyten Myelin Glykoprotein).
Quelle: Marie T. Filbin, Nature Reviews Neuroscience 4, 703-713 (2003).

Oligodendrozyten

Im Gegensatz zum PNS, in dem Schwann´sche Zellen das Myelin bilden, wird es im ZNS von Oligodendrozyten gebildet. Es stellt ein komplexes Gemisch aus u.a. verschiedenen wachstumsinhibierenden Membranproteinen dar (Caroni and Schwab, 1988; Savio and Schwab, 1989), zu diesen die bereits erwähnten Proteine Nogo-A, MAG und OMgp gezählt werden. Alle drei Proteine binden an den sogenannten Nogo-Rezeptor (NgR). Der NgR selbst ist lediglich über einen Lipidanker an die Membran der Nervenzelle gebunden und kann daher den neuriteninhibierenden Effekt nicht ohne Ko-Rezeptoren in das Zytosol des Neurons vermitteln (Abb. 1). Als mögliche Ko-Rezeptoren wurden LINGO-1 (LRR and Ig domain–containing Nogo receptor–interacting protein), der Neurotrophin-Rezeptor p75 sowie alternativ zu p75 der p75 verwandte Rezeptor TROY/TAJ (Tumor necrosis factor receptor superfamily) beschrieben (Wang et al., 2002; Park et al., 2005; Shao et al., 2005; Mi et al., 2004; Yiu and He, 2006; Fournier et al., 2001). Die Signalübertragung ins Zellinnere löst eine Kaskade über die kleine membrangebundene GTPase RhoA aus, die ein Kollabieren des Wachstumskegels zur Folge hat (Abb. 1) (Fournier et al., 2001, 2003; Park et al., 2005; Shao et al., 2005; Silver and Miller, 2004; Yin and He, 2006; Hsieh et al., 2006). In weiteren Studien sind mit Semaphorin 4D und Ephrin B3 weitere Myelin-assoziierte Moleküle identifiziert worden, die das axonale Auswachsen von ZNS-Neuronen inhibieren können (Benson et al., 2005; Moreau-Fauvarque et al., 2003).

Der Arbeitsgruppe um Martin Schwab gelang es bereits 1988 Nogo-A aus dem Myelin des Rückenmarks der Ratte zu isolieren und einen funktionellen Antikörper (IN-1) gegen dieses Protein zu entwickeln. In *in vitro*-Versuchen konnte hierbei durch dessen Applikation die neuritenhemmende Wirkung von weißer Gehirnsubstanz zumindest teilweise aufgehoben werden (Caroni and Schwab, 1988b; Savio and Schwab, 1989; Schwab, 2004). Ebenso konnte bei Rückenmarksverletzungen durch die Applikation des Antikörpers eine erhöhte Regeneration von ZNS-Axonen des kortiko-spinalen Trakts beobachtet werden, wobei der Regenerationserfolg in diesem Modell vergleichsweise gering ausfiel (Schnell and Schwab, 1990; Brösamle et al., 2000). Eine mögliche Erklärung für diesen geringen Regenerationserfolg könnte darin begründet sein, dass die inhibitorischen Proteine ihre auf die axonale Regeneration hemmende Wirkung

nur dann entfalten, wenn Oligodendrozyten verletzt werden, was durch minimal-invasive Eingriffe offensichtlich vermieden wird (Davies et al., 1997). Ebenso könnten kompensatorische Signalwege oder andere Myelin-assoziierte Proteine ein weiterer Erklärungsansatz sein (Schwab, 2004). Untersuchungen an Nogo *Knock-out* Mäusen zeigen hierbei, dass die alleinige Deletion von Nogo oder dessen Rezeptor (NgR) lediglich eine geringe bis keine signifikante Steigerung der axonalen Regeneration im Rückenmark *in vivo* erlaubt (Kim et al., 2003; Simonen et al., 2003; Zheng et al., 2003).

Gliose

Wichtige Aufgaben der Narbe nach deren Bildung an der Läsionsstelle bestehen im Wesentlichen aus dem Verschluss der Wunde, der Abkapselung zerstörten Gewebes von unverletzten Organbereichen und auch darin, das Eindringen unerwünschter und gegebenenfalls schädlicher Moleküle und Wirkstoffe in das gesunde Gewebe zu unterbinden. Neben diesen für die Restitution erforderlichen Effekten hat die Narbenbildung jedoch gleichzeitig auch eine negative Auswirkung auf das Regenerationsgeschehen.

Neben den inhibitorischen Proteinen im Myelin ist ebenso die Bildung einer Narbe als physikalische und chemische Barriere für das Regenerationsdefizit im ZNS verantwortlich. Die Narbe besteht aus Fibroblasten, Epithelzellen, Mikrogliazellen und hauptsächlich aus hyperfilamentösen, aktivierten Astozyten, deren Fortsätze die Abschottung des verletzten zum gesunden Nervengewebe durch das Ausfüllen von entstandenen Kavitäten begründen (Fawcett and Asher, 1999; Rieske et al., 1989; Graeber et al., 2002; Silver and Miller, 2004; Davies et al., 1997). Während bereits Ramon y Cajal die inhibitorischen Eigenschaften der Narbe erkannte und ihre Eigenschaften primär auf eine unüberwindliche physikalische Barriere zurückführte, zeigen nachfolgende Arbeiten, dass diese Eigenschaften vornehmlich auf inhibitorische Proteine zurückzuführen sind. Hierbei werden für aktivierte Mikrogliazellen der Tumornekrosefaktor-*α* (TNF-α) sowie Stickstoffmonoxid (NO), für reaktive Astrozyten vor allem Chondroitinsulfatproteoglykane (CSPG), Tenascin und CD44 in diesem Zusammenhang diskutiert (Chen et al., 2000; Fawcett and Asher, 1999; Asher et al., 2001).

Jedoch werden auch wachstumspermissive Moleküle der Extrazellulärmatrix wie Laminin und Fibronektin von Mikrogliazellen und Astrozyten gebildet (Rabchevsky and Streit, 1997; Silver and Miller, 2004). Es bedarf demnach weiterer Untersuchungen, um die Rolle der Mikrogliazellen und Astrozyten in der axonalen Regeneration des ZNS eindeutig zu klären.

1.2.2 Verlust des intrinsischen Regenerationspotentials

Im Gegensatz zum PNS können Nervenzellen des adulten ZNS höherer Vertebraten ihre verletzten Axone nicht mehr regenerieren. Unter dem intrinsischen Regenerationspotential versteht man die Aktivierung und Regulation von intrazellulären Signalwegen und die Induktion wachstumsassoziierter Programme.

Die Fähigkeit zur axonalen Regeneration nimmt bei Nervenzellen des ZNS mit der postmitotischen Reifung und Entwicklung ab (Goldberg et al., 2002b; Bregmann et al., 1998b; Li et al., 1995; Shewan et al., 1995, 2002). Embryonale Nervenzellen zeigen hierbei eine stärkere intrinsische Regenerationsbereitschaft als postnatale oder adulte Nervenzellen. So konnten Goldberg et al. (2002b) in dissoziierten Retinakulturen nachweisen, dass Axone embryonaler retinaler Ganglienzellen (RGZ) (E20) eine 10 mal höhere Wachstumsrate als die von postnatalen RGZ (P8) zeigten (Goldberg et al., 2002b). Ebenso konnte in *in vivo* Studien die entwicklungsabhängige Fähigkeit zur axonalen Regeneration bestätigt werden (Li et al., 1995; Shewan et al., 2002; Watanabe et al., 1993). Sogar in Anwesenheit einer wachstumspermissiven Umgebung zeigen adulte ZNS-Neurone lediglich eine geringe Regeneration (Vidal-Sanz et al., 1987; David and Aguayo, 1981; Watanabe et al., 1993; So and Aguayo, 1995). In Transplantationsexperimenten konnte beobachtet werden, dass axotomierte RGZ-Axone zwar in ein peripheres Nerventransplantat regenerieren, wenn dieses an einen Sehnervstumpf angenäht wurde, jedoch repräsentierten die ausgewachsenen Axone nur einen geringen Anteil der Gesamtpopulation an verletzten RGZ-Axonen (Vidal-Sanz et al., 1987).

Als Lösungsstrategien zur Aktivierung des intrinsischen Regenerationsprogramms werden neben der Modelierung der Expression von wachstumsassoziierten (Bomze et al., 2001; Aigner et al., 1995; Jacobs and Fehling, 2006) und anti-

apoptotischen Genen (Jiao et al., 2005; Chen, 1995; Teng and Tang, 2006) ebenso Behandlungsstrategien diskutiert, die die intrazelluläre Konzentration von axonaler mRNA und/ oder die Proteinsynthese verändern (Verma et al., 2005; Zheng et al., 2001; Henz et al., 2003). Des Weiteren scheint die Administration von neurotrophen Faktoren und/ oder die Erhöhung der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) ein weiterer Lösungsansatz zu sein (Gao et al., 2003, 2004; Qiu et al., 2002; Neumann et al., 2002; Cai et al., 1995).
Diese und weitere Lösungsstrategien müssen jedoch in folgenden Studien weiter verfolgt werden, um die genauen molekularen Mechanismen, die der insuffizienten intrinsischen Regenerationsfähigkeit zugrunde liegen, aufdecken zu können.

1.2.3 Defizit an neurotrophen Faktoren

Neurotrophe Faktoren sind Signalmoleküle, die sowohl die Differenzierung als auch das Überleben und die Regeneration von Nervenzellen regulieren. In Studien hat man daher versucht, das Überleben von axotomierten RGZ und die Regeneration durchtrennter Axone durch die exogene Applikation von neurotrophen Faktoren zu fördern (Pernet and Di Polo, 2006; Logan et al., 2006; Hu et al., 2007; Zhang et al., 2005; Goldberg et al., 2002; Tucker et al., 2001; Cui et al., 2002; Bähr, 2000). Der Familie der klassischen Neurotrophine wird der *Nerve growth factor* (NGF), *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *Neurotrophin-3* (NT-3) und *Neurotrophin-4* (NT-4) zugeordnet, die in den axonalen Zielgebieten der Neurone gebildet und über den retrograden, axonalen Transport in die Zellsoma transportiert werden. Infolge einer Nervenläsion im adulten ZNS kommt es zu einer Unterbrechung der Versorgung des Zellsomas mit neurotrophen Faktoren, wodurch wachstumsgerichtete Stoffwechselvorgänge zum Erliegen kommen. Als Folge davon unterliegt der distale Axonstumpf der Nervenzelle der „Waller´schen Degeneration“ und der proximale Teil wird samt Zellkörper nach axotomiebedingter Apoptose phagozytiert. Die retrograde Degeneration, die auf einem apoptotischen Mechanismus beruht, ist hierbei abhängig von der Art der Verletzung und dem Abstand der Läsionsstelle zum Zellsoma (Berkelaar et al., 1994; Mey and Thanos, 1993; Zeng et al., 1994).

An Retinakulturen konnte *in vitro* eine Induktion axonaler Regenerationsprozesse durch eine exogene Applikation einzelner neurotropher und hämatopoetischer Faktoren nachgewiesen werden (Zhang et al., 2005; Lorber et al., 2002; Mansour-Robaey et al., 1994; Jo et al., 1999; Peinado-Ramon et al., 1996). *In vivo* konnte gezeigt werden, dass der Degenerationsprozess axotomierter RGZ nach intravitrealer Applikation von BDNF und dem hämatopoetische Faktor *Ciliary neurotrophic factor* (CNTF) verlangsamt wird (Pernet and Di Polo, 2006). Obwohl die intraokulare Injektion von CNTF zwar ein Auswachsen von adulten RGZ-Axonen in ein an den Sehnervstumpf angenähtes peripheres Nerventransplantat stimuliert (Cui et al., 1998, 1999; Cui and Harvey, 2000), zeigten jedoch Axone von RGZ keine deutlich verbesserte axonale Regeneration in einen zuvor gequetschten Sehnerven (Pernet and Di Polo, 2006; Leon et al., 2000; Cui et al., 1998). Die pharmakologische Bioverfügbarkeit dieser Faktoren nach intravitrealer Applikation könnte hierbei der limitierende Grund sein, da diese Faktoren möglicherweise schnell proteolytisch abgebaut werden könnten (Lingor et al., 2008; Leaver et al., 2006; Müller et al., 2007). Die Überexpression von neurotrophen oder hämatopoetischen Faktoren mittels Adeno-assoziierter Viren vom Serotypen 2 (AAV-2) kann hierbei eine mögliche Lösungsstrategie bieten. Leaver et al. (2006) beobachteten in diesem Zusammenhang ein gesteigertes Überleben und verbesserte axonale Regeneration von verletzten RGZ-Axonen durch die Transduktion von RGZ mit AAV-2, die daraufhin kontinuierlich eine sezenerierte Form von CNTF exprimierten (Leaver et al., 2006). Neben der kontinuierlichen Freisetzung von neurotrophen oder hämatopoetischen Faktoren kann die Kombination aus neurotrophen Faktoren mit *cAMP* (Lu et al., 2004) oder mehreren neurotrophen Faktoren (Oudega and Hagg, 1999; Logan et al., 2006) axonale Regeneration im adulten ZNS fördern.

1.3 Linsenverletzung – Strategie zur Überwindung des Regenerationsdefizits

RGZ sind typische Projektionsneurone des ZNS. Nach einer Verletzung des Sehnerven zeigen ihre Axone zwar an der Läsionsstelle ein kurzzeitiges Aussprossen, jedoch kein erneutes Auswachsen über längere Distanzen. Stattdessen unterliegt die gesamte Nervenzelle einem progressiven Degenerationsprozess. Zwei Wochen nach einer intraokularen Quetschung des Sehnerven überleben lediglich 5-10% der ursprünglichen Population an RGZ (Mey and Thanos, 1994; Berkelaar et al., 1994; Fischer et al., 2000).
Zahlreiche Studien sind unternommen worden, um den axotomiebedingten Degenerationsprozess der RGZ zu unterbinden und axonales Wachstum zu stimulieren. Die intravitreale Injektion von neurotroph wirksamen Faktoren ist bereits oben beschrieben worden (siehe Kapitel 1.2.3). Ebenso führt die Inaktivierung der Rho-GTPasen (Lehmann et al., 1999; Fischer et al., 2004), die intraokulare Administration von trophischen Faktoren (Cui et al., 1999; Lorber et al., 2002) und die Applikation von aktivierten Makrophagen an die Läsionsstelle (Lazarov-Spiegler et al., 1998) zu einer verbesserten axonalen Regeneration. Des Weiteren können neuroprotektive und regenerationsfördernde Effekte auf eine Verletzung der Linse bzw. Linsenkapsel zurückgeführt werden (Fischer et al., 2000; Leon et al., 2000). Fischer et al. (2000) und Leon et al. (2000) sind es unabhängig voneinander gelungen, den axotomiebedingten Degenerationsprozess von RGZ durch eine Linsenverletzung (LV) zu verlangsamen und die adulten Nervenzellen in einen aktiven Regenerationszustand zu versetzen. Infolgedessen überleben etwa 40% der ursprünglichen Population an RGZ 14 Tage nach Sehnervquetschung und ein Teil der zuvor geschädigten Nervenzellen kann in den distalen Teil eines zuvor gequetschten Sehnerven einwachsen (Fischer et al., 2000, 2001; Leon et al., 2000). Derart starke Effekte sind zuvor in diesem Modell durch keine der oben genannten Strategien erreicht worden.

Die LV, ebenso wie die intravitreale Injektion des Hefezellwandextrakts Zymosan, führten hierbei zu inflammatorischen Prozessen, die durch eine starke Infiltration und Akkumulation von aktivierten Makrophagen im inneren Auge induziert wurden

(Fischer et al., 2000, 2001; Leon et al., 2000; Yin et al., 2003; Lorber et al., 2005). Leon et al. (2000) postulierten in diesem Zusammenhang, dass die neuroprotektiven und regenerationsfördernden Effekte der LV auf einer Aktivierung von Makrophagen beruht, die in den Glaskörper und in die Retina des Auges infiltrieren (Leon et al., 2000). Obwohl die intravitreale Injektion von aktivierten primären Makrophagen weder die axonale Regeneration noch die Expression des wachstumsassoziierten Proteins *Growth-associated protein 43* (Gap43) in RGZ induziert (Leon et al., 2000), wurde postuliert, dass das Makrophagen-sezernierte Protein Oncomodulin angeblich der Hauptmediator der LV-induzierten Effekte/ Inflammation sein soll (Yin et al., 2006). Diese Behauptung stützt sich auf die Beobachtung, dass Oncomodulin in Abhängigkeit einer gleichzeitigen Administration von *cAMP* die Regenerationsprozesse sowohl *in vitro* bei dissoziierten RGZ als auch in axotomierten RGZ *in vivo* induziert. Als Folge dieser Induktion können RGZ-Axone *in vivo* in einem zuvor gequetschten Sehnerven regenerieren (Yin et al., 2006). Anzumerken ist bei dieser Studie jedoch, dass Oncomodulin - wenn überhaupt - nicht alleine für diese positiven Effekte verantwortlich sein kann. Zum einen zeigt Oncomodulin keine neuroprotektiven Eigenschaften, zum anderen waren seine beschriebenen neuritogenen Effekte *in vitro* und *in vivo* abhängig von Faktoren, die die Konzentration von intrazellulärem *cAMP* erhöhen (Yin et al., 2006).

Untersuchungen zur Bestätigung einer Beteiligung von Makrophagen an den neuroprotektiven und neuritogenen Effekten einer LV sind unter anderem Gegenstand dieser Arbeit.

1.4 Monozyten und Makrophagen

1.4.1 Entstehung und Entwicklung

Makrophagen gehören wie Monozyten zum mononukleären Phagozytensystem (MPS) und sind mesodermalen Ursprungs (Hume et al., 2002; Cecchini et al., 1994). Sie entstehen aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark und reifen durch Stimulation unterschiedlicher Wachstumsfaktoren wie GM-CSF (Granulozyten-Monozyten colony stimulating factor) von Monoblasten zu Promonoblasten und anschließend zu Monozyten heran (Kuwana et al., 2003;

Suzuki et al., 2004; Miyamoto et al., 2001). Die gereiften Monozyten verbleiben etwa 1 Tag im Knochenmark, bevor sie in die Blutbahn migrieren. Ein geringer Anteil der Monozyten zirkuliert anschließend weiterhin im Blut, wobei die Mehrzahl zufällig oder durch einen inflammatorischen Stimulus nach spätestens 3 Tagen in ihr Zielgewebe einwandert (Diapedese). Dort differenzieren sie induziert durch Wachstumsfaktoren zu residenten Makrophagen mit einem Durchmesser von 25-50 µm (Delneste et al., 2003; Hume et al., 2002). Je nach Zielgewebe lassen sich Makrophagen in

- Alveolarmakrophagen in der Lunge
- Kupffersternzellen in der Leber
- Lymphknotenmakrophagen
- Milz-Sinus-Makrophagen oder in
- Serosamakrophagen

einteilen. Dort angekommen erlangen sie dann ihre volle Funktionsfähigkeit (Kuwana et al., 2003; Komuro et al., 2001; Ziegler-Heitbrock, 2007; Carson et al., 1998).

1.4.2 Allgemeine Funktion und Aktivierung von Makrophagen

Allgemeine Funktion

Makrophagen spielen zum einen eine zentrale Rolle bei der Induktion der spezifischen, adaptiven, zum anderen bei der angeborenen Immunantwort. Charakteristisch für diese Zellen ist ihre Fähigkeit zur Phagozytose und Antigenpräsentation, sowie ihre Zytokinsekretion und antimikrobielle und zytotoxische Wirkung (Ziegler-Heitbrock, 2007; Hume et al., 2002; Morris et al., 1991b). Fremdmaterial, Erreger und abgestorbenes, körpereigenes Material wird mittels Phagozytose als Phagosomen in die Zelle internalisiert, in der sie durch Cathepsine, reaktive Sauerstoffmetaboliten und Stickoxide enzymatisch in niedermolekulare Fragmente zerlegt werden. Nach der intraenzymatischen Degradation werden die Fragmente in endosomalen Kompartimenten auf den Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) geladen und an die Zelloberfläche der Makrophagen transportiert. Rezeptoren der

CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten können nun die an der Oberfläche präsentierten Antigene erkennen und eine spezifische Immunantwort induzieren (Carson et al., 1998; Gordon, 2007; Ishibashi et al., 1990). Neben der Phagozytose und der Antigenpräsentation spielt die Zytokinsekretion eine weitere essentielle Rolle bei den Funktionen der Makrophagen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Immunantwort und Rekrutierung anderer Komponenten des Immunsystems. Viele dieser Aktivitäten werden durch Zytokine vermittelt. Aktivierte Makrophagen produzieren und sezernieren hierbei unter anderem Interleukine (z.B. IL-1, IL-6), Zytokine (z.B. TNFα), Enzyme (z.B. Lysozym), Komplementfaktoren (z.B. C3), Wachstumsfaktoren (z.B. GM-CSF) und reaktive Sauerstoffverbindungen (Gordon, 2007; Zito et al., 2001; Menetrier-Caux et al., 1998; Carson et al., 1998).

Neben der zentralen Rolle bei der Induktion der adaptiven und angeborenen Immunantwort sind Makrophagen ebenso während Heilungsprozessen und Nervenverletzungen von Bedeutung. Verletzungen im ZNS führen zum Absterben von betroffenen Zellen am Verletzungsort. Hierbei entstehen große Mengen an regenerationshemmenden Zellresten und inhibitorischen Myelinbestandteilen. Im Gegensatz zum PNS wird im ZNS der zelluläre Debris langsamer von Makrophagen phagozytiert, so dass die inhibitorischen Myelinreste lange am Verletzungsort verbleiben können (Lazarov-Spiegler et al., 1998; Zeev-Brann et al., 1998). Zeev-Brann et al. (1998) konnten hierbei zeigen, dass die phagozytotische Aktivität der Makrophagen durch Kontakt mit Bestandteilen des ZNS inhibiert wird. Die Folge davon ist eine verminderte inflammatorische Reaktion der Makrophagen, die mit einer geringeren Nervenregeneration einhergeht (Zeev-Brann et al., 1998). Wird durch Kontakt von peripheren Nervensegmenten die phagozytotische Aktivität von Makrophagen jedoch stimuliert, können die in die Läsionstelle des optischen Nerven transplantierten Makrophagen die Myelinreste schneller entfernen und axonale Regeneration der Nervenaxone induzieren (Lazarov-Spiegler et al., 1996). Ebenso führt eine LV zu einer starken Infiltration von aktivierten Makrophagen in das innere Auge, infolgedessen es zu einer erhöhten Anzahl überlebender RGZ und regenerierender Axone im verletzten Sehnerven kommt (Leon et al., 2000; Yin et al., 2003). Ob dieser Effekt jedoch denen das innere Auge infiltrierenden Makrophagen bzw. ihren sezernierten Faktoren zuzuschreiben ist, ist unter

anderem Gegenstand dieser Arbeit. Diese Beispiele verdeutlichen eine Relevanz der Makrophagen an axonalen Regenerationsprozessen nach einer Verletzung.

Aktivierung von Makrophagen

Unter der Aktivierung von Makrophagen versteht man die Entwicklung zur Ausübung ihrer antimikrobiellen und zytotoxischen Funktionen. Für Makrophagen sind drei unterschiedliche Stadien bekannt: ruhend, aktiviert sowie hyperaktiviert. Der Übergang von einem ruhenden über den aktivierten bis hin zum hyperaktivierten Zustand ist von verschiedenen Stimuli abhängig. Interferone, exogene Substanzen und Entzündungsmediatoren können hierbei ruhende Makrophagen aktivieren, Lipopolysaccharide (LPS) aus gram-negativen Bakterien induzieren anschließend den Übergang von aktivierten zu hyperaktivierten Makrophagen. Diese unterscheiden sich morphologisch und biochemisch, somit funktionell von den anderen beiden Stadien (Wei et al., 2006; Zito et al., 2001; Morris et al., 1991).

1.4.3 Makrophagendepletion durch Clodronat

Clodronat (Dichlormethylen-diphosphonat, Cl_2MDP) gehört zu der Stoffgruppe der Biphosphonate, die für diagnostische und therapeutische Zwecke bei verschiedenen Knochen- und Kalziumstoffwechselerkrankungen entwickelt wurden, mittlerweile jedoch auch in der Hämatologie und Onkologie eingesetzt werden (Van Rooijen and Sanders, 1997; Zito et al., 2001; Saunders et al., 2004). Freies Clodronat ist hydrophil und negativ geladen, wodurch es gering zellmembrangängig ist und rasch eliminiert werden kann. Demzufolge ist es 20-1000x geringer wirksam in der Depletion von Monozyten/Makrophagen und muss zur intrazellulären Anreicherung liposomal verkapselt werden (Polfliet et al., 2001; van Rooijen et al., 1996). Liposomen bestehen aus einer sphärischen mehrschichtigen Phospholipidmembran und werden in der Pharmakologie als Vehikel verwendet. In Liposomen verkapseltes Clodronat wird von phagozytierenden Zellen aufgenommen und löst in diesen Apoptose aus (Van Rooijen and Sanders, 1997; van Rooijen et al., 1996). Die genauen Wirkmechanismen sind derzeit noch unklar. *In vitro* Studien zeigen jedoch eine Hemmung der ADP/ATP-Translokase an der inneren mitochondrialen Membran,

wodurch diese eine erhöhte Permeabilität aufweist. Dies hat eine erhöhte Freisetzung von pro-apoptotischem *Cytochrom c* und letztlich die Induktion der Caspase-Kaskade zur Folge. Andere phagozytierende Zellen wie T-Zellen, Neutrophile und Endothelzellen sind gegenüber dem zytotoxischen Effekt von Clodronat unempfindlich (Schmitt-Weber et al., 1996; van Rooijen and Sanders, 1997).

1.5 Oncomodulin (Parvalbumin ß)

1.5.1 Kalzium-bindende Proteine

Bei zahlreichen biologischen Prozessen spielt Kalzium (Ca^{2+}) als sekundärer Botenstoff bei der Vermittlung von Signalen auf das submembranöse Zytoskelett eine essentielle Rolle. Folgen dieser Signalübertragung sind unter anderem Veränderungen in der Zellform, Modulation von intrazellulären Kontakten und Regulation von intrazellulären Membrantransportprozessen. Kalziumsignale werden hierbei oftmals durch Bindung an spezielle Effektoren (Ca^{2+}-bindende Proteine) übermittelt, die einen transienten Anstieg des intrazellulären Kalziums zur Folge haben. Ca^{2+}-bindende Proteine unterscheiden sich anhand ihrer Ca^{2+}-Bindedomäne, wobei die Mehrzahl der Ca^{2+}-bindenden Proteine zur Gruppe der EF-Hand-Proteine gezählt werden. Charakteristisch für diese Gruppe ist das Vorhandensein einer oktaedrischen Kalziumbindestruktur, die durch ein Helix-*loop*-Helix-Motiv der Polypeptide erzeugt wird. Die Namensgebung dieser EF-Domäne leitet sich aus ihrer Anordnung ab, da sich die E-Helix am N-Terminus als Zeigefinger, der *loop* als Mittelfinger und die F-Helix am C-Terminus als Daumen der rechten Hand darstellen lässt (Pauls et al., 1996; Babini et al., 2004). Der Familie der EF-Hand-Gruppe lassen sich zwei Gruppen zuordnen: Kalziumpufferproteine und Kalziumsensorproteine. Den Kalziumpufferproteinen gehören u.a. die Parvalbumine an, die Ca^{2+} ohne wesentliche Konformationsänderung binden können. Die Kalziumsensorproteine dagegen zeichnen sich durch eine signifikante Konformationsänderung nach der Bindung von Ca^{2+} ab (Henzl et al., 2003; Hackney et al., 2005; Pauls et al., 1996).

1.5.2 Oncomodulin (Parvalbumin ß)

Ratten Oncomodulin (Parvalbumin ß) ist ein kleines, 108 Aminosäuren großes Ca^{2+}-bindendes Protein und wird aufgrund seiner Sequenz- und Strukturähnlichkeit neben Parvalbumin α zu den Parvalbuminen gezählt (Pauls et al., 1996; Babini et al., 2004; Brewer et al., 1989). Oncomodulin wurde ursprünglich in einem Lebertumor der Ratten (Morris rat hepatoma 5123tc) entdeckt und isoliert (MacManus, 1979, 1980). Mittlerweile konnte es in weiteren tierischen und menschlichen Tumoren, in der Blastozyste der Placenta, in mehreren humanen Tumorzelllinien, sowie in den äußeren Haarzellen des Cortischen Organs nachgewiesen werden (Hackney et al., 2005; Babini et al., 2004; Sakaguchi et al., 1998; Leuthold et al., 1990; Sommer et al., 1989). Seine Funktion ist noch nicht eindeutig geklärt, wobei ihm als Kalziumpuffer eine gewebsspezifische Ca^{2+}-abhängige Regulatorfunktion zugesprochen wird (Henzl et al., 2003). Ebenso wird die Funktion von Oncomodulin als potenter Makrophagen-abhängiger Wachstumsfaktor für axotomierte RGZ in der Literatur postuliert (Yin et al., 2006). Yin et al. (2006) beobachteten demnach in diesem Zusammenhang, dass Oncomodulin das intrinsische axonale Regenerationsprogramm der RGZ aktivieren kann, nachdem es von aktivierten, das innere Auge infiltrierenden Makrophagen in den Glaskörper sezerniert wird. Als Folge davon können die Axone der RGZ in einen zuvor gequetschten Sehnerven regenerieren (Yin et al., 2006). Es sei jedoch anzumerken, dass die Effekte von Oncomodulin von Faktoren abhängig sind, die die intrazelluläre Konzentration von *cAMP* erhöhen (Yin et al., 2006). So führt lediglich die Kombination aus Oncomodulin und *cAMP* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer gesteigerten axonalen Regeneration (Yin et al., 2006). Die Beteiligung von Makrophagen bzw. Oncomodulin als Makrophagen-abhängiger Faktor hinsichtlich neuroprotektiver und regenerationsfördernder Effekte ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.6 Zytokine

Zytokine sind sekretorische Proteine, die neben Hormonen und Neurotransmittern eine wichtige Rolle als zentrale Botenstoffe darstellen. Als lösliche Mediatoren

sind sie an der Regulation des Immunsystems, der Hämatopoese, der Akut-Phase-Reaktion und des Nervensystems beteiligt. Sie vermitteln über spezifische Rezeptoren wichtige Signale zur Steuerung von Zellteilung, Stoffwechsel, Proliferation und Differenzierung. Zu den Zytokinen zählen die Interleukine (IL), Chemokine, Tumornekrosefaktoren (TNF), Interferone (INF), Kolonie stimulierende Faktoren (CSF), Wachstumsfaktoren und die Mitglieder der Interleukin-6 Superfamilie. Charakteristika dieser Stoffgruppe sind Pleiotropismus sowie eine hohe Rezeptoraffinität und eine kurze Halbwertszeit (Kishimoto, 2006; Gölz et al., 2006; Townsend and McKenzie, 2000).

1.6.1 Das Zytokin Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein glykolysiertes Polypeptid mit einer relativen Molekularmasse von 21-30 kDa, das neben *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), Oncostatin M (OSM), Interleukin-11 (IL-11), CNTF und Cardiotrophin zur Interleukin-6 Superfamilie gezählt wird. Hirano et al. haben 1986 IL-6 (b-cell stimulatory factor 2, BSF-2) als einen von T-Zellen sezernierten Faktor beschrieben, der die Differenzierung von aktivierten B-Zellen zu Immunglobulin sezernierenden Plasmazellen induziert (Hirano et al., 1986; Kishimoto, 2006; Heinrich et al., 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass IL-6 auch auf weitere hämatopoetische Zellen wie Vorläufer- und T-Zellen, neuronale Zellen, Thrombozyten und Osteoblasten eine regulierende Funktion aufweist. Des Weiteren kommt IL-6 eine wesentliche Rolle in der Induktion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber zu, was seine Bedeutung bei akuten entzündlichen Prozessen verdeutlicht (Hishimoto et al., 1999; Hirano et al., 1986; Park et al., 2004).

Die „Hauptquelle“ für IL-6 sind neben den Monozyten und Makrophagen, vor allem B- und T-Zellen, sowie Mast-, Kupffer-, Glia-, Mikroglia-, Endothel- und intestinale Epithelzellen. Die Expression erfolgt nach Stimulation durch verschiedene Mediatoren, die viraler oder bakterieller (z.B. LPS) Herkunft sein können, jedoch ebenso durch andere Zytokine wie IL-1, TNF-α und INFγ (Hirano et al., 2000). Dabei wirkt IL-6 sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch (Kishimoto, 2006). In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass IL-6 neuroprotektiv sein kann,

andererseits jedoch neurodegenerative Prozesse induzieren kann (Kishimoto, 2006; Sappington et al., 2006; Sanchez et al., 2003).

1.6.2 Interleukin-6-Rezeptor und Signaltransduktion

Aufgrund der pleiotrophen Wirkung von IL-6 ist davon auszugehen, dass der Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R) auf hämatopoetischen und nichthämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Vor allem bei T- und aktivierten B-Zellen, sowie für Monozyten und Hepatozyten ist der IL-6R nachgewiesen worden (Klein et al., 1995). Die Rezeptoren der IL-6 Superfamilie sind Typ-I-Membranrezeptoren, die einen zytoplasmatischen C-Terminus aufweisen und deren N-Terminus extrazellulär ist. Des Weiteren besitzen sie in der extrazellulären Domäne mindestens ein Zytokin-bindendes Modul (cytokine binding module, CBM), das aus einer N-terminalen Domäne besteht, die vier konservierte Cysteine aufweist und einer C-terminalen Domäne, die durch ein Tryptophan-Serin-X (X = beliebige Aminosäure) -Tryptophan-Serin-Motiv (WSXWS) gekennzeichnet ist (Kishimoto, 2006; Heinrich et al., 2003; Klein et al., 1995; Hirano et al., 2000).

Bei der Signaltransduktion kommt es zuerst zu einer Bindung an einen löslichen oder membranständigen Zytokin-spezifischen Rezeptor und anschließend an die gemeinsame signaltransduzierende, transmembrane Rezeptoruntereinheit Glykoprotein 130 (Gp130), die allen Mitgliedern der IL-6 Superfamilie gemeinsam ist. IL-6 signalisiert über einen Rezeptorkomplex bestehend aus einem spezifischen Rezeptor (α-Kette, Gp80), der zwar den Liganden bindet, jedoch keine Signaltransduktionsfunktion aufweist. Das transmembrane Glykoprotein Gp80 bindet gemeinsam mit IL-6 an ein Homodimer der ß-Kette (Gp130). Diese Bindung induziert die Tyrosinphosphorylierung von Gp130 und vermittelt somit das Signal in das Zellinnere, wodurch intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen aktiviert werden: zum einen den *Janus-Kinase/Signal transducers and activators of transcription 3* (JAK/Stat3)-Signalweg, zum anderen den Ras-MAP Kinase Signalweg (Kishimoto, 2006; Hirano et al., 2000; Rabe et al., 2007; Hibi et al., 1990). Der dritte Signalweg führt nach der Bindung von IL-6 zu einer Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K) (Boulton et al., 1994). Über die Bedeutung dieser Signalkaskade ist gegenwärtig wenig bekannt, so dass im

weiteren Verlauf lediglich der JAK/Stat3-Signalweg und der Ras-MAP Kinase genauer beschrieben werden (Abb.2).

Beim JAK/Stat-Signalweg werden zuerst Mitglieder der Januskinasefamilie (JAK1, JAK 2, JAK 3, Tyk 2) phosphoryliert und aktiviert, bevor im nächsten Schritt Stat-Proteine an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert werden. Anschließend dimerisieren die Stat-Proteine und translozieren in den Zellkern, wo sie die Transkription sogenannter IL-6 Zielgene aktivieren (Yang et al., 2007; Heinrich et al. 2003). Beim Ras-MAP Kinase Signalweg wird zuerst die Phosphatase SHP-2 (zytosolische Phosphotyrosin-Phosphatase 2) an Gp130 rekrutiert, so dass SHP-2 selbst tyrosinphosphoryliert werden kann und dadurch den Grb2/Sos (growth factor receptor bound protein 2/Son-of-sevenless) Komplex über die SHP-2 Domäne von Grb2 an die Membran rekrutiert. Der Nukleotid-Austauschfaktor Sos aktiviert das in der Membran verankerte Ras (Rat sarcoma), so dass die Ras/Raf/MAPK Kaskade aktiviert und die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie z.B. phosphoryliertes Stat3 induziert werden kann (Zhao et al., 2004; Heinrich et al., 2003).

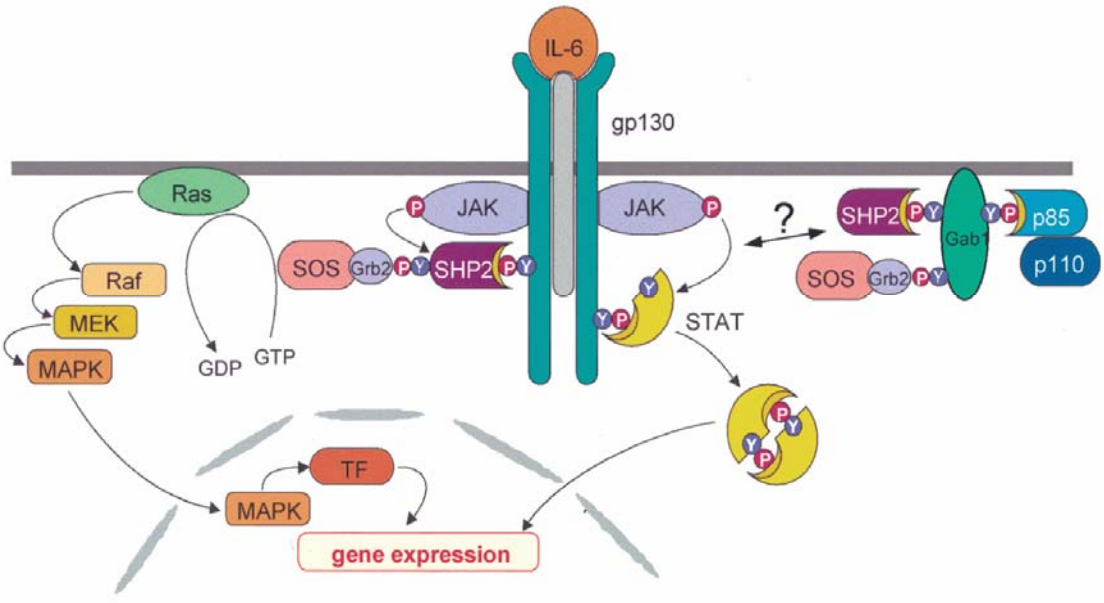


Abb. 2: IL-6 signalisiert über einen Rezeptorkomplex bestehend aus einem spezifischen Rezeptor Gp80 und Gp130. Die Signaltransduktion über den JAK/Stat- bzw. Ras-MAP Kinase Signalweg führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.
Quelle: Heinrich et al. (2003); Biochem. J.,374, 1-20.

1.7 Die Netzhaut der Ratte als Modell zur Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen

In der Literatur wurde beschrieben, dass die Netzhaut der Ratte mit der menschlichen hinsichtlich ihrer Struktur, neuronaler Verschaltung und biochemischer Prozesse weitestgehend vergleichbar ist (Quigley et al., 1995; Kaplan et al., 1990). Sie ist nicht nur morphologisch und funktionell gut charakterisiert, sondern auch experimentell gut zugänglich und ein übersichtlich strukturierter Teil des ZNS (Abb. 3). Aufgrund dessen ist sie als Modell zur Erforschung von Ursache und Verlauf zahlreicher degenerativer Nervenerkrankungen und zur Untersuchung der Regeneration zentraler Neurone etabliert (Quigley et al., 1995; Bonfanti et al., 1996; Fischer et al., 2000, 2001, 2004; Pernet and Di Polo, 2006). Der Aufbau der Netzhaut gliedert sich von außen nach innen in das Pigmentepithel, die Schicht der Photorezeptoren, das *Stratum limitans externum*, die äußere Körnerschicht (ONS), die äußere plexiforme Schicht (OPS), die inneren Körnerschicht (INS), die innere plexiforme Schicht (IPS), die Ganglienzellschicht (RGS) und letztlich in die Nervenfaserschicht gefolgt vom Stratum limitans internum (Abb. 3).

Die Netzhaut der Ratte enthält ca. 100 000 RGZ, die als typische Projektionsneurone des ZNS lange Axone gebündelt zum optischen Sehnerven ausbilden, um die Verbindung zu den visuellen Zielgebieten des Gehirns zu ermöglichen. Aufgrund ihrer anatomischen und physiologischen Eigenschaften lassen sie sich in drei Hauptgruppen einteilen: Midget- (X-Zellen), Parasol- und koniozelluläre Zellen.

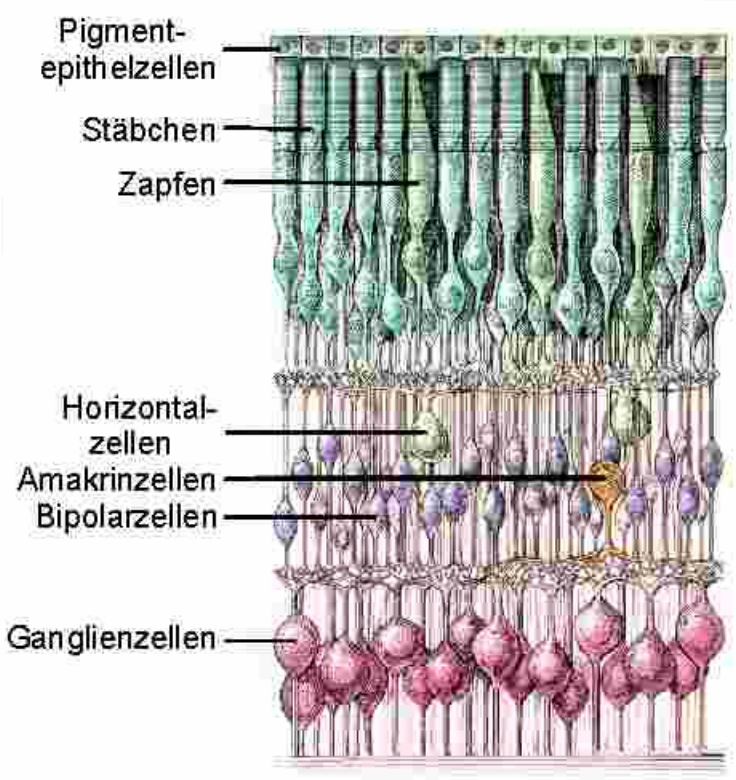


Abb. 3: Abbildung 3 zeigt den schematischen Aufbau der Netzhaut der Ratte.
Quelle: Hubel, D.H. (1989) Auge und Gehirn. Spektrum Verlag, Heidelberg.

1.8 Fragestellung

Zahlreiche Studien sind unternommen worden, um den axotomiebedingten Degenerationsprozess von RGZ zu unterbinden und axonales Wachstum zu stimulieren (Fischer et al., 2000, 2001, 2004; Leon et al., 2000; Cui et al., 1999, 2002; Lorber et al., 2002; Pernet and Di Polo, 2006; Yin et al., 2003; Harvey et al., 2006; Isenmann et al., 2003; Domeniconi and Filbin, 2005; Filbin, 2003, 2006; Yiu and He, 2006). Fischer et al. (2000) und Leon et al. (2000) sind es gelungen, den axotomiebedingten Degenerationsprozess von RGZ durch die Induktion von inflammatorischen Prozessen im Auge zu verlangsamen und die Nervenzelle in einen aktiven Regenerationszustand zu versetzen. Infolgedessen kann ein Teil der zuvor geschädigten Nervenfasern in den distalen Teil eines zuvor gequetschten Sehnerven einwachsen (Fischer et al., 2000, 2001; Leon et al., 2000). Die inflammatorischen Prozesse können durch eine Verletzung der Augenlinse oder durch eine Injektion des Hefezellwandextrakts Zymosan in den Glaskörper des Auges induziert werden (Fischer et al., 2000, 2001; Yin et al., 2003). Leon et al.

(2000) postulierten in diesem Zusammenhang, dass die neuroprotektiven und regenerationsfördernden Effekte der LV auf einer Aktivierung von Makrophagen beruht, die in den Glaskörper und in die Retina des Auges infiltrieren (Leon et al., 2000). Des Weiteren wurde postuliert, dass Oncomodulin, das aus Makrophagen freigesetzt werden soll, der Hauptmediator der LV-induzierten Effekte/ Inflammation ist (Yin et al., 2003, 2006).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Beitrag von Makrophagen an den neuroprotektiven und regenerationsfördernden Effekten der LV untersucht werden. Hierfür wurden im Einzelnen folgende experimentelle Ansätze vorgesehen:

1.) Etablierung einer Methode zur Depletion bzw. Reduzierung von Makrophagen und Mikrogliazellen im inneren Auge.

2.) Funktionelle Testung der Methode zur Depletion von Makrophagen und Mikrogliazellen im inneren Auge nach systemischer oder intravitrealer Applikation von Clodronathaltigen Liposomen (Clodrolips).

3.) Expressionsuntersuchung von Oncomodulin in aktivierten Makrophagen und im Augeninneren nach LV.

4.) Suche nach alternativen Faktoren mit neuritogener Wirkung auf RGZ.

2 Material und Methoden

2.1 Chirurgische Methoden

2.1.1 Material

Präparationsbesteck:

Pinzette Nr. 4, Nr. 5	FST Dumont, Frankreich
Chirurgische Pinzette	FST Dumont, Frankreich
Kapsulotomieschere	Hermle, Gosheim, Deutschland
Mikroschere	Hermle, Gosheim, Deutschland
Präparationsschere	Hermle, Gosheim, Deutschland
Knochenzange	Hermle, Gosheim, Deutschland
Skalpellhalter	Hermle, Gosheim, Deutschland
Fadenhalter	Hermle, Gosheim, Deutschland
Skalpell Nr. 10, Nr.11	Dahlhausen, Deutschland

Geräte:

Präparations-Stereomikroskop: Mbc-10	Carl Zeiss, Deutschland
Lichtquelle: KL 1500	Schott, Deutschland
Kryostat: CM 1900	Leica, Deutschland
Elektrodenpuller: P-97	Sutter Instruments, USA

Verbrauchsmaterial:

Kryostatklingen C35	Seidel, Deutschland
Glaskapillaren R-Serie	WPI, USA
Objektträger	VWR, Deutschland
Chirurgische Faden, 4.0 Ethicon	Johnson-Johnson Bull, Türkei
Gelfoam	Pharmacia & Upjohn, USA
Augensalbe Gentamytrex	Dr. Mann Pharma, Deutschland
Spritze (1 ml)	BD Plastipak, Spanien
Xylazin 2%	Alvetra, Deutschland
Ketamin 10% (Ketanest)	Pfizer, Deutschland
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco, Invitrogen, Deutschland
Paraformaldehyd 4% (PFA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Saccharose (Sucrose) 30%	Sigma-Aldrich, Deutschland

Einbettmedium *Tissue-Tek*	Sakura, Niederlande
Poly-D-lysine (0,1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, München, Germany
Laminin (20 µg/ml)	Sigma-Aldrich, München, Germany
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich, München, Germany
Papain (16,4 U/ml)	Worthington, Katarinen, Germany
L-Cystein (0,3 µg/ml)	Sigma-Aldrich, München, Germany
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Germany
B27	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Penicillin/ Streptomycin (100 U/ml)	Biochrom, Berlin, Germany
4-*well* Platten	Nunc, Wiesbaden, Germany
Zellsieb (40 µm)	DB Falcon, Bedfort, USA.

2.1.2 Versuchstiere

Für die durchgeführten Experimente wurden weibliche und männliche, adulte Albinoratten des Sprague-Dawley Stammes (Rattus norvegicus) verwendet, die ein Gewicht zwischen 180 bis 220 g hatten und von der Firma Charles River (USA) bezogen wurden. Die ebenso verwendeten weiblichen und männlichen Ratten des Stammes F334 (Fisher-Ratten) hatten bei Beginn der Experimente ein Gewicht von 160 bis 200 g. Die Tiere wurden bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus in Plexiglaskäfigen (Makrolonkäfig, Typ III) in Gruppen zu dritt oder viert gehalten, in denen Trockenfutter und Leitungswasser *ad libitum* vorhanden war. Alle genehmigungspflichtigen Versuche sind mit Zulassung des Regierungspräsidiums (Versuchsnummer A802) durchgeführt worden und richten sich nach den gesetzlichen Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes.

2.1.3 Operationsprotokolle

Die Ratten wurden für die operativen Eingriffe durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von 16 mg Xylazin (Xylazin 2%, Alvetra, Neumünster) und 75 mg Ketamin (Ketanest 10%, Pfizer, Karlsruhe) pro Kilogramm Körpergewicht betäubt. Nach Erreichen des Narkosestadiums, das am Erlöschen des Lidreflexes

verifiziert werden konnte, wurden die Tiere unter Zuhilfenahme einer Maulklemme an den Operationstisch fixiert. Die Hornhaut der Tiere und die bei der Operation entstandenen Nähte wurden postoperativ mit einer antibiotikumhaltigen Augensalbe (Gentamytrex, Dr. Mann Pharma) versorgt. Einem Austrocknen der Hornhaut und einer bakteriellen Infektion der Nähte wurde hierdurch entgegengewirkt. Unter den verwendeten Narkosebedingungen konnten die Tiere 2-3 h nach dem operativen Eingriff auf Verhaltensauffälligkeiten und Schmerzen untersucht werden.

2.1.3.1 Sehnervquetschung

Die Quetschung des optischen Nervens wurde 14 Tage vor Gewebeentnahme für die Regenerations– und Neuroprotektionsstudien durchgeführt. Für die Gewinnung von Gewebe für biochemische, molekularbiologische sowie immunhistochemische Versuche wurde die Sehnervquetschung 1, 2, 5 oder 7 Tage vor Gewebeentnahme durchgeführt.

Nach dem Fixieren der Ratte mittels Maulklemme wurde die Kopfhaut der Ratte mit einem Skalpell durch einen ca. 1,5 cm langen, sagittalen Schnitt entlang der Medianlinie aufgetrennt. Hierdurch konnte die Kopfhaut vorsichtig vom Schädel gelöst und der linke Kopfhautlappen mit einem chirurgischen Faden (4.0, Ethicon) über das linke Auge gespannt werden. Anschließend konnte das Bindegewebe entlang des *Os frontale* eingeschnitten werden, wodurch ein Zugang zur Orbita geschaffen wurde. Der im retrobulbären Raum befindliche Sehnerv konnte durch Durchtrennung der extrabulbären und oberen extraokularen Muskeln freigelegt werden. Der Augapfel wurde vorsichtig aus der Augenhöhle gezogen und unter Berücksichtigung der Unversehrtheit der *Arteria centralis*, die die Blutversorgung der Netzhaut sichert und in den Meningen des Sehnerven verläuft, die Meningen des optischen Nerven mit einer kleinen Schere längs aufgeschnitten. Der hierdurch hervortretende Sehnerv konnte anschließend mit einer feinen Pinzette in ca. 1 mm Abstand zum Bulbus umfasst und für ca. 10 sek gequetscht werden. Zur Kontrolle der intakten retinalen Blutversorgung erfolgte nach dem operativen Eingriff funduskopisch eine Spiegelung des Augenhintergrundes mit Hilfe eines Objektträgers. Eine Verletzung der *Arteria centralis* konnte bei einer guten Durchblutung der retinalen Gefäße ausgeschlossen werden. Bei Versuchsgruppen

mit einem zusätzlichen traumatischen Katarakt (Linsenverletzung) oder intravitrealer Injektion erfolgte dies bevor die Kopfhaut wieder durch eine Naht verschlossen wurde.

2.1.3.2 Retrograde Färbung retinaler Ganglienzellen

RGZ wurden durch den lipophilen Carbocyanin-Farbstoff 4Di-10Asp [N-4-(4-didecylaminostyryl)-N-methylpyridium iodide] (Molecular Probes, Eugene, Oregon) gefärbt. Hierfür bedient man sich der biologischen Eigenschaft lebender Zellen, Fluoreszenzmoleküle aufzunehmen und retrograd zum Zellsoma zu transportieren, in dem sie angereichert werden können. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff wurde daher eine Woche vor den unterschiedlichen Behandlungsvarianten in den rechten *Colliculus superior* (CS), der das Terminationsgebiet der linken retinalen Ganglienaxone darstellt, platziert, so dass eine spezifische retrograde Färbung der linken RGZ erreicht wurde.

Wie bei der Sehnervquetschung (Vgl. 2.1.3.1) wurde die Kopfhaut der Ratte mit einem Skalpell aufgetrennt und die Kopfhautlappen mit einem chirurgischen Faden (4.0, Ethicon) über die jeweiligen Augen weggespannt. Der Schädel wurde oberhalb des visuellen Kortex aufgebohrt und das kortikale Gewebe mit Hilfe einer Pasteurpipette samt Pumpvorrichtung abgesaugt, bis der CS gut zugänglich war. Anschließend wurden feine Stichinzisionen durch die *Pia mater* des CS gesetzt, so dass die Farbstoffkristalle mit einer feinen Pinzette in die oberflächlichen retinozeptiven Schichten gedrückt werden konnten. Der entstandene kortikale Raum wurde mit resorbierbarer, geschäumter Gelatine (Gelfoam, Pharmacia & Upjohn) aufgefüllt, wodurch die Farbstoffkristalle fixiert und die Blutstillung bedingt wurde, bevor die Kopfhaut durch eine Naht (4.0, Ethicon, Johnson-Johnson Bull) verschlossen wurde. Die Quantifizierung der RGZ und Mikrogliazellen, die nach einer Sehnervquetschung die zugrunde gegangenen RGZ samt Fluoreszenzfarbstoff phagozytiert haben, erfolgte 21 Tage nach der retrograden Markierung (Vgl. 2.2.3.2). Die unterschiedlichen Applikationen wurden 7 Tage nach der retrograden Färbung durchgeführt und sind nachfolgend dargestellt:

Tag 1: retrograde Markierung (4Di-10Asp)

Tag 7: unterschiedliche Behandlungsvarianten:

a) Linsenverletzung (LV)

b) Linsenverletzung + Clodrolips-Injektion (Clodrolips) (LV+Clo)

c) Linsenverletzung + Kontrolllliposomen-Injektion (LV+Lip)

d) Sehnervquetschung + PBS-Injektion (SQ+PBS)

e) Sehnervquetschung + Linsenverletzung + PBS-Injektion (SQ+LV+PBS)

f) Sehnervquetschung + Linsenverletzung + Liposomen-Injektion (SQ+LV+Lip)

g) Sehnervquetschung + Linsenverletzung + Clodrolips-Injektion (SQ+LV+Clo)

Tag 21: Präparation der Retina zur Quantifizierung retrograd angefärbter RGZ und Mikrogliazellen als *whole mount*-Präparat (Vgl. 2.2.3.1).

2.1.3.3 Intravitreale Injektion

Für die intravitreale Injektion wurde das intraorbitale Operationsfeld ähnlich wie bei der Sehnervquetschung (Vgl. 2.1.3.1) geöffnet. Die Applikation der zu injizierenden Lösungen in den Glaskörper erfolgte durch eine transsklerale, transretinale Injektion mittels einer Mikrokapillare und Spritze (1 ml, BD Plastipak) vom hinteren Augapfel, ca. 2 mm peripher vom Sehnervansatz. Aufgrund des intraokularen Drucks wurde zuvor eine Vorderkammerpunktion durchgeführt, um ein Volumen von 15 µl in die hintere Augenkammer injizieren zu können. Die Kapillaren wurden mit einem Elektrodenpuller (Sutter Instruments) aus Glaskapillaren (50 µl Einmalkapillaren, WPI, USA) gezogen.

Injizierte Lösungen:

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), pH 7,4	15 µl
Clodronathaltige Liposomen (Clodrolips)	20 mg/ ml
Kontrolllliposomen	20 mg/ ml
Zymosan	65 µg in 10 µl PBS
rekombinantes Interleukin-6 (rIL-6)	1,5 µg in 10 µl PBS.

Zur Untersuchung der Effekte von Makrophagen auf die axonale Regeneration nach 14 Tagen wurde eine Sehnervquetschung (SQ), eine SQ mit simultaner Linsenverletzung (SQ+LV) oder eine SQ mit simultaner intravitrealer Injektion von Kontrollliposomen (SQ+LV+Lip) bzw. Clodrolips (SQ+LV+Clo) durchgeführt. Die intravitrealen Injektionen von Kontrollliposomen und Clodrolips wurden an Tag 3 und 7 nach SQ wiederholt. Für die semi-quantitativen und quantitativen *real-time* RT-PCRs wurde die RNA aus den Retinae zu den Zeitpunkten 1, 2, 5 oder 7 Tage nach den jeweiligen Eingriffen extrahiert.

2.1.3.4 Linsenverletzung

Bei der Punktion der Linse musste zunächst das intraorbitale Operationsfeld analog zur Sehnervquetschung (Vgl. 2.1.3.1) geöffnet werden. Mit Hilfe einer Mikrokapillare wurde anschließend ein transskleraler, transretinaler Einstich in den posterioren Teil der Linse vorgenommen und somit die Linsenkapsel perforiert. Eine erfolgreiche Linsenverletzung wurde funduskopisch durch einen sichtbaren Einstichkanal in die Linse sowie der in den nachfolgenden Tagen zu beobachtenden Eintrübung der Linse sichergestellt. Die LV wurde entweder alleine, in Kombination mit einer Sehnervquetschung oder in Kombination mit einer Sehnervquetschung und zusätzlicher intravitrealer Injektion durchgeführt (Vgl. 2.1.3.3).

2.1.3.5 Dissoziierte Retinakulturen

Unter sterilen Bedingungen wurden 4-*well* Platten (Nunc) mit Poly-D-Lysin (0,1 mg/ml) für 1 h vorinkubiert, dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet, bevor sie mit Laminin (20 µg/ml) für 1 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert wurden. Nachfolgend wurden die Ratten durch eine intraperitoneale Überdosis von Chloralhydrat (14%) getötet und die Retina isoliert. Der Verdau der Retina erfolgte für 30 min bei 37°C in einer Verdaulösung bestehend aus Papain (16,4 U/ml), L-Cystein (0,3 µg/ml) und *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). Für den Verdau einer Retina wurden 5 ml Verdaulösung verwendet. Nach dem Verdau wurde die Retina zweimal mit jeweils 5 ml DMEM gewaschen, anschließend in 1 ml einer Lösung aus DMEM, B27 (1:50) und Penicillin/

Streptomycin (100 U/ml) überführt und zehnmal vorsichtig in einer Pasteurpipette hoch- und heruntergezogen (Trituration). Um Zellagglomerate zu eliminieren, wurden die dissoziierten Zellen durch ein Zellsieb (40 µm) gepresst und mit Medium (DMEM/ B27/ Penicillin/ Streptomycin) auf 5 ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde vorsichtig gemischt, mit den (rekombinanten) Proteinen der jeweiligen Gruppen versetzt und auf die vorinkubierten 4-*well* Platten (je 500 µl/*well*) ausplattiert. Hierbei wurde eine Konzentration von 200 ng/ ml für die Gruppen BSA, IL-6 und CNTF verwendet. Alle experimentellen Gruppen wurden vierfach (pro Ansatz) angesetzt und ausgewertet. Jeder Ansatz wurde mindestens dreimal wiederholt. Dissoziierte RGZ wurden für 3 Tage bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert, bevor sie fixiert und mit einem Antikörper gegen ßIII-Tubulin (1:1000) gefärbt wurden.

2.1.4 Intrakardiale Perfusion und Gefriermikrotomschnitte

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden Sprague-Dawley Ratten unterschiedlichen Alters und Geschlechts 14 Tage nach Läsion (Vgl. 2.1.3.1) durch eine intraperitoneale Injektion von 16 mg Xylazin (Xylazin 2%, Alvetra, Neumünster) und 75 mg Ketamin (Ketanest 10%, Pfizer, Karlsruhe) pro Kilogramm Körpergewicht betäubt. Nach Erreichen des Narkosestadiums, das am Erlöschen des Lidreflexes sichergestellt werden konnte, wurden die Tiere rückwärts auf einer Kunststoffplatte fixiert und die Thoraxhöhle u-förmig in kranialer Richtung ausgehend vom Sternum eröffnet. Der freiliegende Vorhof des rechten Herzens wurde zum schnelleren Austritt der Perfusionsflüssigkeiten eingeschnitten. Die Tiere wurden schließlich durch eine intrakardiale Perfusion mit zunächst 1x PBS (Gibco, Invitrogen) und anschließend mit 4% PFA (Sigma-Aldrich) fixiert. Die benötigten Gewebe wurden freipräpariert und für 6 h bei Raumtemperatur postfixiert. PFA wurde durch anschließende Inkubation in 30% Sucrose (99,5%, Sigma-Aldrich) über Nacht bei 4°C verdrängt. Die Gewebe wurden in *Tissue-Tek* (Sakura) eingebettet und longitudinale Schnitte mit einer Schnittdicke von 14 µm an einem Gefriermikrotom (Leica CM 1900) angefertigt. Bis zur weiteren Behandlung wurden die Schnitte bei -80°C gelagert.

2.2 Lichtmikroskopische Verfahren

2.2.1 Material

Präparationsbesteck:

Chirurgische Pinzette	FST Dumont, Frankreich
Kapsulotomieschere	Hermle, Gosheim, Deutschland
Präparationsschere	Hermle, Gosheim, Deutschland
Skalpell Nr. 10	Dahlhausen, Deutschland

Geräte:

Präparationsmikroskop: Mbc-10	Carl Zeiss, Deutschland
Lichtquelle: KL 1500	Schott, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Deutschland

Axiovert 200 Hal 100, Kamera Axiocam, VSG HBO 100, Fluoreszenzfilter (395–440 nm, 450–490 nm, 510–560 nm), Objektive (10x, 20x, 40x), Zählgitternetz (Okular)

Verbrauchsmaterial:

Nitrocellulosefilter (0,45 µm)	Amersham Bioscience, USA
Whatman-Papier (0,45 µm)	Schleier & Schuell, Deutschland
Petrischale (Ø 35 mm)	Sarstedt, Deutschland
Objektträger	VWR, Deutschland

Chemikalien:

Rinderserumalbumin (BSA), pH 7,0	PAA Laboratories, Deutschland
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4	Gibco, Invitrogen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA), 4%	Sigma-Aldrich, Deutschland
Methanol	Merck, Deutschland
Mowiol 4-88 Reagent	Calbiochem, USA
Chloralhydrat 14%	Merck, Deutschland
RNA*later*	Ambion, Deutschland
Tissue-Tek	Sakura, Niederlande

2.2.2 Immunhistochemie

Alle immunhistochemischen Antikörperfärbungen an Kryostatschnitten (14 µm) wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt. Die hierbei verwendeten Primär- und Sekundärantikörperlösungen enthielten eine 2% BSA/ PBS-Lösung.

1.) Fixierung der Kryostatschnitte für 10 min in Methanol (Merck)
2.) Inkubation der Schnitte für 30 min mit einer 2% BSA/ PBS-Lösung (pH 7,4) zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
3.) Inkubation der Schnitte mit der Primärantikörperlösung über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer
4.) Dreimaliges Waschen der Schnitte für 5 min in PBS (pH 7,4)
5.) Inkubation der Schnitte mit der Sekundärantikörperlösung für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer und unter Lichtausschluss
6.) Dreimaliges Waschen der Schnitte für 5 min in PBS (pH 7,4)
7.) Eindeckeln der Kryostatschnitte in *Mowiol* (Calbiochem)
8.) Optische Auswertung und Dokumentation der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss) mittels zugehöriger Bildanalysesoftware
9.) Lagerung der Schnitte bei +4°C unter Lichtausschluss.

Bei Doppelfärbungen wurden die entsprechenden Primär- und Sekundärantikörper simultan eingesetzt.

<u>Primärantikörper:</u>

Anti-ßIII-Tubulin (TUJ-1), monoklonal, Quelle: Maus	Covance, USA
Eingesetzte Verdünnung 1:1000	
Anti-CD68 (ED1), monoklonal, Quelle: Maus	Serotec, Deutschland
Eingesetzte Verdünnung 1:500	
Anti-CD11b (Ox42), monoklonal, Quelle: Maus	Serotec, Deutschland
Eingesetzte Verdünnung 1:500	
Anti-GFAP, monoklonal, Quelle: Maus	Invitrogen, Deutschland
Eingesetzte Verdünnung 1:100	
Anti-Gap43, monoklonal, Quelle: Schaf	

Eingesetzte Verdünnung 1:1000
Der Antikörper Gap43 wurde freundlicherweise von Dr. Benowitz, Children´s Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA, bereitgestellt.

Sekundärantikörper:

Ziege Anti-Maus IgG (H + L), Alexa Fluor 594, Quelle: Ziege	Invitrogen, Deutschland

Eingesetzte Verdünnung 1:500

Ziege Anti-Schaf IgG (H + L), Alexa Fluor 594, Quelle: Ziege	Invitrogen, Deutschland

Eingesetzte Verdünnung 1:500.

2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

2.2.3.1 Präparation der Retina

Die Präparation der Retina diente zum einen der Gewinnung von Gewebe zur RNA-Isolierung (Vgl. 2.4.7) bzw. *Western-Blotting* (Vgl. 2.3.3) und zum anderen zur Quantifizierung der durch den Fluoreszenzfarbstoff retrograd angefärbten RGZ und Mikrogliazellen als *whole mount*-Präparat (Vgl. 2.2.3.2).

Zur Gewinnung von Gewebe für die RNA-Isolierung bzw. *Western-blotting* wurden die Tiere nach einer Überlebenszeit von 1, 2, 5 oder 7 Tagen nach jeweiliger Behandlung mit 14% Chloralhydrat (Merck) getötet. Für die quantitative Bestimmung der retrograd angefärbten RGZ und Mikrogliazellen im *whole mount*-Präparat wurden die Tiere 14 Tage nach der jeweiligen Behandlung getötet.
Nach der Enukleation des Rattenauges erfolgte die Präparation der Retina in einer Petrischale (Sarstedt) mit 1x PBS unter einem Präparationsmikroskop. Hierzu wurde der Limbus mit einem Skalpell eingestochen, um einen Ansatzpunkt für einen zirkumferentiellen Schnitt mit einer Kapselschere zu erhalten. Nach dem Entfernen der Kornea, der Iris und der Linse wurde die Netzhaut vorsichtig von der Sklera gelöst und durch einen Schnitt hinter die Papille vollständig vom Auge getrennt. Die Retina konnte für die RNA-Isolierung in RNA*later* (Ambion) oder in Lysispuffer für das *Western-blotting* überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C eingefroren werden. Sollten Glaskörper und Retina voneinander

getrennt werden, erhielten die Retinae vor dem Ablösen von der Sklera vier radiale Einschnitte. Anschließend konnte die Retina kleeblattförmig auf dem Nitrocellulosefilter (HybondTM-C Extra, Amersham Bioscience) ausgebreitet und auf trockenes *Whatman-Papier* (0,45 µm, Schleier & Schuell) überführt werden, so dass die Flüssigkeit nach unten weggesaugt werden konnte. Mit Hilfe einer feinen Pinzette wurde der auf der Retina haftende Glaskörper entfernt und ebenso wie die Retina in RNA*later* bzw. Lysispuffer überführt und bei -80°C gelagert. Zur Quantifizierung der retrograd angefärbten RGZ und Mikrogliazellen wurde ebenfalls der Glaskörper von der Retina entfernt und diese anschließend samt Filter für 2 h in eine Petrischale (Sarstedt) mit einer 4% PFA (Sigma-Aldrich) überführt, bevor das Gewebe in *Mowiol* (Calbiochem) eingebettet wurde.

2.2.3.2 Auswertung der *whole mount*-Retina

Die Quantifizierung der mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4Di-10Asp [N-4-(4-didecylaminostyryl)-N-methylpyridium iodide] (Molecular Probes, Eugene, Oregon) retrograd markierten Ganglienzellen und den phagozytierenden Mikrogliazellen erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Carl Zeiss), in dessen Okular sich ein Zählgitternetz befand (40x Objektiv, Carl Zeiss). Durch die vier radialen Einschnitte in der Retina konnte die Zellzahl in jedem der vier gleichgroßen Quadranten separat bestimmt und auf die Gesamtfläche extrapoliert werden. Die Zellzahlen der vier Quadranten, die sich entlang einer gedachten Linie vom Zentrum der Retina aus hin zur Peripherie erstreckten, wurden gemittelt und die Zelldichte in Zellen/mm^2 angegeben.

Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode liegt darin, dass nicht nur die Effekte verschiedener Behandlungen der Retina erfasst werden können, sondern auch im gleichen Zuge die Anzahl der gefärbten Mikrogliazellen bestimmt werden kann, die nach einem Sehnervquetschung degenerierte RGZ phagozytiert haben. Die gefärbten Mikrogliazellen lassen sich in Form, Größe und Morphologie von den gefärbten Ganglienzellen unterscheiden und separat auszählen.

2.2.3.3 Quantifizierung der Regeneration und Überleben der RGZ

Die Gefriermikrotomschnitte hatten eine Schnittdicke von 14 µm und wurden mit einem Primärantikörper gegen Gap43 bzw. ßIII-Tubulin (TUJ-1, Covance) gefärbt. Die Expression von Gap43 wird in RGZ durch eine Verletzung des Sehnerven erhöht und diente daher zur Quantifizierung regenerierender Axone. Unter einem Mikroskop (40x, Carl Zeiss) wurden die Gap43-positiven Axone der gefärbten Schnitte quantifiziert, die 0,5 und 1 mm über die Läsionsstelle hinweg in den distalen Teil des Sehnervens regeneriert sind. Anschließend wurde die Breite des Sehnervens an der Stelle bestimmt, an der die regenerierenden Axone quantifiziert wurden, wodurch man die Anzahl der Axone bezogen auf die Sehnervbreite von 0,5 bzw. 1 mm erhielt. Bei jeder Gruppe wurden die regenerierenden Axone von mindestens fünf unterschiedlichen Tieren quantifiziert und gemittelt. Die Summe der regenerierenden Axone einer Gruppe ergab sich demzufolge aus der Anzahl der Axone (n), die die Läsionsstelle an den bestimmten Messpunkten (d) bei bestimmter Sehnervbreite (r) und 14 µm Schnittdicke (t) überwunden haben. Folgende Formel zur Bestimmung der Anzahl regenerierender Axone wurde verwendet:

$\sum a_d = \pi \times r^2 \times [$ Durchschnittswerte der Anzahl von regenerierender Axone (n)/ mm] / t.

Die Bestimmung der überlebenden RGZ erfolgte mit Hilfe des Primärantikörpers gegen ßIII-Tubulin (TUJ-1). Hierfür wurden die Gefriermikrotomschnitte gefärbt und die detektierbaren RGZ in der Retina quantifiziert. Entsprechend der Quantifizierung regenerierender Axone wurden bei jeder Gruppe mindestens fünf Tiere quantifiziert und die Werte gemittelt. Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen wurden wie unter 2.6. dargelegt ermittelt.

2.3 Biochemische Verfahren

2.3.1 Material

Chemikalien:

Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Deutschland
β-Mercaptoethanol, p. A.	Sigma-Aldrich, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deutschland
Enhanced Chemilumineszenz (ECL)	Amersham Bioscience, USA
Paraformaldehyd (PFA), 4%	Sigma-Aldrich, Deutschland
Glycerin p. A.	Merck, Deutschland
Glycin	Merck, Deutschland
Isobutanol	Riedel de-Haën, Deutschland
Kaliumchlorid	Applichem, Deutschland
Natriumchlorid	Applichem, Deutschland
Magermilchpulver	Carl Roth, Deutschland
N, N´- Methylenbisacrylamid (30% Acrylamid/ Bis-Lösung; 29:1, 3,3%)	Bio-Rad, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA Laboratories, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS, 10%)	Sigma-Aldrich, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Bio-Rad, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	USB Corporation, USA
Polyaethylenglycolsorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich, Deutschland

Geräte und Zubehör:

Gelgießstand für Polyacrylamidgele	Bio-Rad, USA
Gelelektrophoresekammer Mini-Protean®3	Bio-Rad, USA
Stromversorger *Power Pac* 300	Bio Rad, USA
pH-Meter pH 526	WTW, USA
pH-Elektrode STH 600	WTW, USA
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Deutschland
Photometer RS 232 C	Eppendorf, Deutschland
Röntgenfilmentwicklungsmaschine Curix 60	Agfa, Deutschland

Blockthermocycler	Biometra, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex RH 103 H	Bandelin, Deutschland
Feinwaage ISO 9001	Sartorius, Deutschland
Vortex-Gerät MS-1	Bender & Hobein, USA
Heizplatten Ikamag®RH	Janke & Kunkel, USA
Röntgenfilmkassette	Amersham Pharmacia, USA

Verbrauchsmaterial:

Nitrocellulosefilter (0,45 µm)	Amersham Bioscience, USA
Whatman-Papier (0,45 µm)	Schleier & Schuell, Deutschland
Röntgenfilme Hyperfilm™ ECL	Amersham Bioscience, USA
Sterilfilter Millex™GF (0,22 µm)	Millipore, Irland

2.3.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page) fand im Rahmen dieser Arbeit Anwendung zur Proteinauftrennung für das *Western-blotting*. Das Prinzip dieses Verfahrens ist die Auftrennung von Nukleinsäuren und Proteinen, die in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix wandern (Laemmli, 1970). Die Proteinkomplexe wurden zuvor durch Hitze (5 min, 95°C) und dem Detergens Natriumdodecylsulfat (10% SDS, Sigma-Aldrich) denaturiert, so dass die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel nur noch von dem relativen Molekulargewicht abhängig ist. Weiterhin wurde den Proben ß-Mercaptoethanol (VWR) zugegeben, das als reduzierende Substanz die Disulfidbrücken in den Proteinen spaltet.

2.3.2.1 Lösungen

Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCL, pH 6,8
	SDS 0,4%
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/ HCL, pH 8,8
	SDS 0,4%

Laufpuffer (10x):	250 mM Tris
	1920 mM Glycin
	SDS 1,0%
Probenpuffer (2x):	200 mM Tris HCl, pH 6,8
	SDS 6,0%
	ß-Mercaptoethanol 4,0%
	Bromphenolblau 0,1%
	Glycerin 20%

Die Pufferlösungen wurden steril filtriert und bei 4°C, der Probenpuffer wurde aliquotiert und ebenso bei 4°C gelagert.
Als Katalysator zur Polymerisation der Gelmatrix wurde TEMED (Bio-Rad), als Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat (APS, 20%, Sigma-Aldrich) verwendet.

2.3.2.2 Herstellung der Gele und Probenaufbereitung

Zur Herstellung der Trenngele wurde die Trenngellösung (Vgl. 2.3.2.1) zwischen zwei mit Klammern zusammengehaltenen und seitlich abgedichteten Glasplatten pipettiert und mit Isobutanol (Riedel de-Haën) überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das Isobutanol verworfen, bevor das Sammelgel aufgetragen werden konnte. Die Probentaschen wurden durch das Einschieben eines Kunststoffkammes in das noch flüssige Sammelgel ausgespart.
Nach dem Einspannen der Gele in eine Elektrophoreseapparatur wurde der innere und äußere Puffertank mit Elektrophoresepuffer (Vgl. 2.3.2.1) aufgefüllt und die Kämme vorsichtig aus dem Sammelgel entfernt. Nach der Denaturierung der Proben in einem Heizblock (95°C, 5 min) wurden die Geltaschen des Sammelgels mit Hilfe einer Pipette beladen (20 µl Probenpuffer samt Proteinlösung). Um das Molekulargewicht der Proteinbanden bestimmen zu können, wurde zusätzlich zu den Proben ein Molekulargewichtsmarker (Fullrange Rainbow Marker, Amersham Biosciences) aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei einer Stromstärke von 100 V bis die Proteine in das Trenngel übergegangen sind. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 200 V weitergeführt bis die Bromphenolblaubande des Probenpuffers das Gelende erreicht hat.

Die im Folgenden dargestellten Mengen beziehen sich jeweils auf ein Gel.

Trenngel (12%): 2342 µl H_20
2800 µl Acrylamid 30%
1750 µl Trenngelpuffer
75 µl SDS 10%
12,5 µl TEMED
6,25 µl APS 40%

Sammelgel: 1500 µl H_20
375 µl Acrylamid 30%
625 µl Sammelgelpuffer
25 µl SDS 10%
3,75 µl TEMED
7,5 µl APS 40%

2.3.3 Proteinnachweis mittels Western-blotting

2.3.3.1 Proteintransfer

Nach der Auftrennung der Proteinlösung in einem SDS-Page können die Proteine aus dem Gel durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mittels spezifischen Antikörpern selektiv nachgewiesen werden. Für den Transfer der aufgetrennten Proteine wurde das Tankblottingverfahren verwendet. Hierfür wurden 6 Stücke *Whatman*-Papier (0,45 µm, VWR) und eine Nitrocellulosemembran (HybondTM-C Extra, Amersham Bioscience) auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. In Form eines Sandwichs wurden anschließend die 3 Stücke *Whatman*-Papier, dann die Nitrocellulosemembran, das SDS-Gel und letztlich die drei weiteren *Whatman*-Papiere unter Vermeidung von Luftblasen zwischen zwei Schwammtücher zusammengefügt und in die Blockkammer eingespannt. Nachdem die Kammer mit Transferpuffer gefüllt wurde, konnte der Proteintransfer durch Anlegen einer Spannung von 52 V für 1,5 h gestartet werden. Die Proteine wandern somit in Richtung Anode aus dem Gel heraus und werden von der Membran gebunden.

Transferpuffer: 25 mM Tris
192 mM Glycin
Methanol 20%

2.3.3.2 Immunologischer Nachweis

Im Anschluss an den Transfer wurde die Nitrocellulosemembran (HybondTM-C Extra, Amersham Bioscience) für 1 h bei Raumtemperatur in einer Magermilchlösung (5%, Roth) in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween 20 (TBS-T) inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Die Membran wurde anschließend dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Primärantikörper in TBS-T über Nacht bei 4°C erfolgte. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T für 5 min wurde die Membran mit einem Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper unter Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Hierzu wurde der Antikörper in TBS-T gelöst und mit der Membran in einer Folie eingeschweißt. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal mit TBS-T für 5 min gewaschen, bevor die Detektion der Proteine mit Hilfe des *Advance Western-Blotting Detection Kit* (ECL, Amersham Bioscience) erfolgte. Hierzu wurden die beiden Komponenten ECL-1 und ECL-2 im Verhältnis 1:1 angesetzt und die Nitrocelullosemembran in dieser Lösung für 1 min inkubiert. Daraufhin wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und auf einen Röntgenfilm (Amersham Bioscience) zur Exposition in eine Röntgenfilmkassette gelegt.

Primärantikörper:

Anti-ß-Aktin (TUJ-1), monoklonal, Quelle: Kaninchen — Sigma, Deutschland
Eingesetzte Verdünnung 1:500

Anti-GFAP, monoklonal, Quelle: Kaninchen — Sigma, Deutschland
Eingesetzte Verdünnung 1:1500

Anti-Gap43, monoklonal, Quelle: Schaf
Eingesetzte Verdünnung 1:1000
Der Antikörper Gap43 wurde freundlicherweise von Dr. Benowitz, Children´s Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA, bereitgestellt.

Sekundärantikörper:

Maus Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-gekoppelt, Quelle: Maus Sigma, USA
Eingesetzte Verdünnung 1:20000

Kaninchen Anti-Maus IgG, Peroxidase-gekoppelt, Quelle: Kaninchen Sigma, USA
Eingesetzte Verdünnung 1:20000

Ziege Anti-Schaf IgG, Peroxidase-gekoppelt, Quelle: Ziege Sigma, USA
Eingesetzte Verdünnung 1:20000.

Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (TBS-T): 20 mM Tris/ HCl, pH 7,6
137 mM $NaCl_2$
Tween 20 0,1%

Magermilchlösung (5%): Magermilchpulver 5%
BSA 1%
in 100 ml TBS-T lösen

2.3.4 Herstellung von Clodronat-Liposomen

Die Kontrollliposomen und das in Liposomen verkapselte Clodronat (Clodrolips) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Schwendener, Institute of Molecular Cancer Research, University of Zürich, Schweiz, bereitgestellt.

2.4 Molekularbiologische Verfahren

2.4.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente der Amplifikation eines DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Die PCR erfolgte über unterschiedliche Zyklen, so dass die jeweiligen Proben nach 30, 35 und 37 Zyklen aus dem PCR-Heizblock genommen wurden. Die bei der PCR verwendeten Primer wurden von der Firma Thermo-Elektron (Ulm) hergestellt und sind in Tabelle 1 verzeichnet (Angaben der Primersequenz in 5´→ 3´Richtung).

Tab. 1: Primersequenzen für die jeweiligen PCRs.

Oncomodulin	*Sense*	5´- ATGAGCATCACGGACATCCT -3´
	antisense	5´- TTAAGAGTGCACCATTTCCTGG -3´
GAPDH	*Sense*	5´- GGCCAAGGTCATCCATGACAACTT -3´
	antisense	5´- CCTGCTTCACCACCTTCTTGATGT -3´
CD68	*Sense*	5´- GGTACTGCTTGTACCCCAAGGA -3´
	antisense	5´- GGTTCAATACAGAGAGGCCCCA -3´
IL-6	*Sense*	5´- CTTCCAGCCAGTTGCCTTCT -3´
	antisense	5´- GAGAGCATTGGAAGTTGGGG -3´
Gap43	*Sense*	5´- ATG CTG TGC TGT ATG AG -3´
	antisense	5´- TCA GGC ATG TTC TTG GTC -3´
GFAP	*Sense*	5´- GAA GAA AGA GGA AAG ACA GGG -3´
	antisense	5´- CCA AGG ATT CAG AGC CAA -3´
CNTF	*Sense*	5´- TTTCGCAGAGCAAACACC -3´
	antisense	5´- AACTGTGGCAGGCATCC -3´
LIF	*Sense*	5´ - GACAGAGAAGACCAAGTT -3´
	antisense	5´- CTTGCTTGTATGTCCCCA -3´

Tab. 2: Für die PCRs wurde folgendes Protokoll verwendet.

Initialdenaturierung	2 min bei 94°C
Denaturierung	30 sek bei 94°C
Annealing	30 sek bei 55°C
Extension	45 sek bei 72°C
Kühlung	4°C

Ein PCR-Reaktionsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 50 µl, der sich in die in Tabelle 3 dargestellten Komponente aufteilte. Alle für diesen Ansatz notwendigen Reagenzien sind von der Firma Invitrogen bezogen worden.

Tab. 3: Reaktionsansatz für eine PCR.

Destilliertes H_2O	36,25 µl
10 x PCR Puffer	5 µl
$MgCl_2$ 50 mM	1,5 µl
dNTP-Mix 100 mM	1 µl
Primer *sense* 10µM	2 µl
Primer *antisense* 10µM	2 µl
DNA, cDNA	1 µl
Taq-Pol 5 U/µl	0,25 µl
Gesamtvolumen	50 µl

2.4.2 Reverse Transkription (RT)

Das Umschreiben der RNA in cDNA (komplementäre DNA) wurde mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* (Invitrogen) durchgeführt. Bei der reversen Transkription wird ausgehend von einer RNA-Matrize die entsprechende einzelsträngige komplementäre DNA synthetisiert, die in einer nachfolgenden PCR amplifiziert werden kann. Oligo-(dT)-Primer können an den Poly-(A)+-Schwanz am 3´-Ende der mRNA binden und somit als Startpunkt für die reverse Transkriptase, einer RNA- abhängigen DNA-Polymerase, dienen.

200 ng isolierte Gesamt-RNA, 1 µl T7 Ryan-Primer (0,5 mg/ml, ThermoElektron, Ulm) und 1 µl dNTP-Mix (100 mM, Invitrogen) wurden mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt, für 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend schnell auf 4°C abgekühlt. Dem Gemisch wurde anschließend 4 µl 5 x RT-Puffer (Invitrogen), 2 µl DTT (Dithiothreitol, 0,1 M, Invitrogen) und 1 µl RNA*seOut* (40 U/µl, Invitrogen) zugegeben und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor das Gemisch mit 1 µl *SuperScriptTMII RT* (200 U/ml, Invitrogen) versetzt wurde. Die RT-Reaktion erfolgte 50 min lang bei 42°C. Die Reverse Transkriptase wurde anschließend durch Erhitzen (70°C, 15 min) inaktiviert. Nach Ablauf der Reversen Transkription folgte die Amplifizierung der gewünschten cDNA mittels PCR (Vgl. 2.4.1).

Nachfolgend ist die Primersequenz des verwendeten T7 Ryan-Primers dargestellt:

5´-GCATTAGCGGCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGATTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTV -3´.

2.4.3 Quantitative *real-time* RT-PCR

Für die quantitative *real-time* RT-PCR wurde das *QuantiTec SYBR green RT-PCR Kit* (Qiagen, Hilden) und das *LightCycler*-System der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Das Grundprinzip der *LightCycler* (real-time) RT-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (PCR) mit zusätzlicher Möglichkeit der Quantifizierung. Die Quantifizierung kann mittels Fluoreszenz-Messungen am Ende eines PCR-Zykluses durchgeführt und ausgewertet werden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte durch die Nutzung von *SYBR Green I*, einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, der sich wie Ethidiumbromid unspezifisch in die Doppelstrang-DNA einlagert und nach dem Einbau in der doppelsträngigen DNA fluoresziert. Durch diese Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein vielfaches verstärkt und man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zu der Anzahl der gebildeten doppelsträngen DNA ist. Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse, die im Anschluss an die PCR-Reaktion folgt, kann man die mit *SYBR Green I* markierten PCR-Produkte unterscheiden und dadurch die Spezifität bestimmen.

Für die Quantifizierung diente das Referenz-Gen GAPDH, das in jedem Lauf mit gemessen wurde, um einen relativen Mengen-Vergleich der einzelnen Proben durchzuführen. Bei allen durchgeführten Untersuchungen basiert die Normalisierung der Datenmenge auf der Expression des *Housekeeping*-Gens GAPDH (relative Quantifizierung).

Die bei der quantitativen RT-PCR verwendeten Primer wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bzw. Thermo-Elektron (Ulm) hergestellt und sind in Tabelle 4 verzeichnet (Angaben der Primersequenz in 5´→ 3´Richtung).

Tab. 4: Primer für die quantitative real-time RT-PCR.

Qiagen	Oncomodulin GAPDH	Rn_Ocm_1_SG QuantiTect® GAPDH_RN_Gapd_1_SG QuantiTect®
Thermo- Elektron	Oncomodulin *sense* Oncomodulin *antisense*	5´- AAGACCCAGACACCTTTGAAC -3´ 5´- GAACTTCTGTAGGAAATACTTGAGC -3´

Tab. 5: Für die quantitative *real-time* RT-PCR wurde folgendes Protokoll verwendet.

Reverse Transkriptase	30 min bei 50°C
Initialdenaturierung	15 min bei 95°C
Denaturierung	15 sek bei 94°C
Annealing	30 sek bei 55°C
Extension	30 sek bei 72°C
Schmelzkurve Teil 1	5 sek bei 95°C
Schmelzkurve Teil 2	15 sek bei 65°C
Schmelzkurve Teil 3	0 sek bei 95°C
Kühlung	30 sek bei 40°C

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Das Prinzip der DNA-Gelelektrophorese beruht auf der Erzeugung eines elektrischen Feldes durch eine Stromquelle, so dass negativ geladene DNA-Moleküle durch die Gelmatrix gezogen werden können. Kleinere DNA-Moleküle können sich schneller durch das Gel bewegen als größere.

Zur Detektion der DNA wurden 1%ige Gele verwendet, bei denen die Agarose (0,5 g, Carl Roth) in 50 ml TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst wurde. Anschließend wurde die Lösung mit 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma-Aldrich) versetzt, gemischt und in Gelagarosekammern (Bio-Rad) überführt. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde jede PCR-Probe mit 1-2 µl 10x Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Sichtbarmachung der DNA erfolgte nach 30 min bei 85 Volt unter einer UV-Lampe (Geldoc 1000, Bio-Rad).

TAE-Puffer (Stammlösung 50x):	121 g Tris	USB Corporation
	28,55 ml Eisessig	Riedel de-Haën
	50 ml 0,5 M EDTA, pH 8	PAA
Ladepuffer (10x):	40 mg Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
	5 ml Glycerol	Sigma-Aldrich
	5 ml dH_2O	Fresenius
	20 µl 0,5 M EDTA, pH 8	PAA

2.4.5 Klonierung von Oncomodulin

Zur Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts wurde die unter 2.4.1. beschriebene PCR verwendet. Das PCR-Produkt wurde in einem Agarosegel (1%) aufgetrennt, der interessierende Bereich mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Vier Mikroliter des aufgereinigten PCR-Produkts wurden mit 1 µl Salzlösung und 1 µl *TOPO®Cloning Vector* (pcDNA3.1/V5-His© TOPO®TA Expression Kit, Version H, Invitrogen) versetzt, vorsichtig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 µl des TOPO® Cloning-Reaktionansatzes zu *One shot®TOP10 Chemically Competent E. coli* (Invitrogen) gegeben und für 20 min bei 4°C inkubiert. Der folgende Hitzeschock erfolgte für 30 sek bei 42°C mit anschließender Inkubation auf Eis für 1 min, bevor der Transformationsansatz mit 200 µl LB-Medium (LB Broth case, Lennox L Broth Base, Invitrogen) und 2 µl Ampicillin (100 mg/ml, Invitrogen) versetzt wurde. Der Reaktionsansatz wurde daraufhin für 1 h bei 37°C inkubiert. 250 µl dieses Ansatzes wurden anschließend auf LB-Agarplatten (Lennox L Agar, Invitrogen) mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die LB-Agarplatten bis zur weiteren Verwendung mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha) abgedichtet und bei 4°C gelagert.

2.4.6 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde das *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System der Firma Promega* (USA) verwendet. Hierfür wurden die Bakterienklone, deren Plasmid isoliert werden sollte, mit einer Drahtoese von einer LB-Agarplatte (Lennox L Agar, Invitrogen) gepickt und in 10 ml LB-Medium (LB Broth case, Lennox L Broth Base, Invitrogen) überführt, das mit Ampicillin (100 mg/ml, Invitrogen) versetzt wurde. Die Lösung wurde über Nacht bei 37°C in einem Warmluftschüttler (160-180 rpm, GFL 3033, Heraeus Instruments) inkubiert, bevor 2 ml der Übernachtkultur für 5 min bei 900 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus Instruments) wurden. Die sedimentierten Bakterien wurden anschließend in 250 µl Resuspensions- und 250 µl Lysispuffer aufgenommen und viermal vorsichtig geschüttelt. Nach Hinzugabe von 10 µl alkalischer Proteaselösung wurden die Proben erneut viermal vorsichtig geschüttelt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit 350 µl Neutralisationspuffer versetzt, erneut vorsichtig geschüttelt und für 10 min bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in Säulen überführt und dreimal für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Raumtemperatur). Zwischen den einzelnen Zentrifugationsschritten wurde der Überstand jeweils verworfen und die Säule mit 750 µl Waschpuffer gewaschen. Die isolierte DNA wurde in 80 µl RNAse freiem Wasser (UltraPure, Gibco, Invitrogen) eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.4.7 RNA-Extraktion

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit dem *RNeasy®Mini Kit* (Qiagen, Hilden). Das Prinzip der RNA-Extraktion beruht auf einer Bindung der RNA an eine Silikon-Gel-Membran in den verwendeten Säulen. Die RNA wird durch mehrere Waschschritte gereinigt und anschließend mit Wasser eluiert. Diese Methode wurde für die Analysen aller untersuchten Gewebe verwendet.

Die RNA-Isolierung erfolgte aus dem Leberkarzinomgewebe (50-80 mg) der Ratte (rat Morris-Hepatoma(MH)-7777) (McManus, 1980), der Retina, dem Glaskörper und peritonealen Makrophagen. Das Gewebe wurden mit 350 µl eines mit β-

Mercaptoethanol (Fluka) komplettierten RLT-Lysis-Puffer (Verhältnis 1:100) versetzt und mittels Mörser und Einwegspritzen (1 ml, BD Plastipak) durch zehnmaliges hoch- und herunterziehen (Trituration) homogenisiert. Das Lysat wurde für die Fällung mit 500 µl 100% Ethanol (VWR) versetzt und in die *RNeasy Mini* Säulen überführt. Nach der Zentrifugation für 15 sek bei 13000 rpm wurde der Durchfluß dekantiert und nachstehende Waschschritte erfolgten nach Angaben des Herstellers anhand des *RNeasy®Mini Kit* Protokolls. Die Elution erfolgte mit 80 µl RNase freiem Wasser (Gibco, Invitrogen). Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden die Proben im Verhältnis 1:50 verdünnt. Die optische Dichte (OD) wurde bei der Wellenlänge λ = 260 nm gegen einen Leerwert gemessen (BioPhotometer, Eppendorf). Eine OD260 von 1,0 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg RNA/ ml, so dass die Konzentrationen wie folgt berechnet werden konnten:

RNA-Konzentration (µg/ µl) = A260*40 (A260= 1 ≅ 40ng RNA)*Verdünnungsfaktor/ 1000

Die Ratio der Proben konnte dadurch erhalten werden, in dem der Wert der jeweiligen Proben bei OD260 durch den Wert bei OD280 geteilt wurde. Die Ratio der entsprechenden Proben lag zwischen 1,6-1,9. Die extrahierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.8 Isolierung von peritonealer Makrophagen

Zur Isolierung peritonealer Makrophagen wurden Sprague-Dawley Ratten unterschiedlichen Alters und Geschlechts durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von 16 mg Xylazin (Xylazin 2%, Alvetra, Neumünster) und 75 mg Ketamin (Ketanest 10%, Pfizer, Karlsruhe) pro Kilogramm Körpergewicht betäubt. Anschließend wurden die Tiere auf den Rücken gelegt und es erfolgte eine Injektion von 50 ml 1x PBS (Gibco, Invitrogen) in das Peritoneum der Tiere. Die PBS-Lösung verblieb für 30 min unter sanfter Bewegung der Tiere im Bauchfell der Ratten, bevor der Bauchraum durch eine Schere (Hermle) geöffnet und die Lösung mit einer Spritze (50 ml, BD Plastipak) abgesaugt werden konnte. Die

Zellsuspension wurde anschließend für 10 min bei 900 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert und das Zellpellet in RNA*later* aufgenommen.

2.5 Zellbiologische Verfahren

2.5.1 Material

Geräte:

Sterilbank Hera Safe	Hereaeus Instruments
Begasungsbrutschrank Hera Cell	Hereaeus Instruments
Hochdruckflüssigkeitsbehälter	MIT Industriegase
Zentrifuge	Hereaeus Instruments

Chemikalien, Puffer und Lösungen:

Dulbecco´s Modified Eagles Medium (DMEM)	Gibco, Invitrogen
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco, Invitrogen
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom AG
Trypsin/ EDTA	PAA, Deutschland
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Deutschland
Phosphat-gepuffert Salzlösung (PBS)	Gibco, Invitrogen, Deutschland

Zellen:

HEK293 Zellen	Stratagene, Deutschland

Verbrauchsmaterial:

Gewebekulturschalen	Sarstedt, Deutschland
4-*well* Platten	Nunc, Deutschland
Spritze	BD Plastipak, Spanien
Kanüle	Braun Melsungen, Deutschland

2.5.2 Zellkultivierung

Die Kultivierung von HEK293 Zellen (Stratagene) erfolgte in Gewebekulturschalen (Sarstedt) bei 37°C und einem CO_2-Gehalt von 5%. Das hierbei verwendete Nährmedium der Zellen bestand aus *Dulbecco´s Modified Eagles Medium* (DMEM, Gibco, Invitrogen), dem zusätzlich 10% fötales Kälberserum (FKS, Gibco, Invitrogen) und 1% Penicillin/Streptomycin (10000 µg/ml, Biochrom AG) zugesetzt wurde. Bei einer Konfluenz der Zellen von 40% wurden diese mit 1 ml Trypsin/ EDTA (0,05%/ 0,02% in D-PBS, PAA The Cell Culture Company) für 2 min inkubiert und anschließend die vereinzelten Zellen in 5 ml Nährmedium aufgenommen. Nach der Zentrifugation (5 min, 900 rpm, Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 5 ml Nährmedium aufgenommen und die Zellen im Verhältnis 1:4 in neue Gewebekulturschalen verdünnt.

2.5.3 Transfektion von HEK293

Für die Transfektion von HEK293 Zellen diente das Lipofectamine Plus Reagenz (Lipofectamine 2000, Invitrogen). Die Transfektion erfolgte in 4-*well* Platten (Nunc) bei einer Konfluenz der Zellen von 70-80%. Fünfzig µl serumfreies Medium wurde mit 0,8 µg DNA gemischt und nach 5 min Inkubation mit 2 µl *Lipofectamine Plus* Reagenz in 50 µl serumfreiem Medium versetzt. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur, in der das Zellkulturmedium (Vgl. 2.5.2) gegen 500 µl serumfreies Medium pro *well* ausgetauscht wurde. Das Transfektionsgemisch wurde tropfenweise in die Zellkulturschalen (Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert. Nach Inkubation im Brutschrank (6 h, 37°C, 5% CO_2) wurde das serumfreie Medium gegen Nährmedium getauscht. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO_2 weiter kultiviert, bis sie nach 1 Tag geerntet und in Probenpuffer aufgenommen wurden.

2.5.4 Zellextraktion

Die HEK293 Zellen wurden nach 1 Tag mit dem Medium von den Gewebekulturschalen gelöst und bei 900 rpm für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 µl Probenpuffer (Vgl. 2.3.2.1)

aufgenommen, durch mehrfaches hoch- und herunterziehen (Trituration) mit einer Spritze mit Kanüle (Ø 0,3 x 12 mm, Braun Melsungen AG) homogenisiert und für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben vor dem Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamidgel auf Eis oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6 Statistik

Bei allen im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen quantitativen Daten wurde die Signifikanz der Ergebnisse mittels der Programme SigmaStat 3.1 (ANOVA, Systat Software, Erkrath) und Microsoft Excel ausgewertet. Ergaben sich bei einseitigen Varianzanalysen (ANalysis Of VAriance: ANOVA) Differenzen bei den Mittelwerten innerhalb eines Messparameters zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen wurden die Gruppen unter Verwendung des Student´s t-Test für unabhängige Stichproben verglichen. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) < 0,05 als statistisch signifikant betrachtet. Alle Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler in Diagrammen dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1. Die Makrophagendepletion im inneren Auge

In der Literatur gibt es zahlreiche Studien, die belegen, dass nach einer Verletzung der Augenlinse bzw. intravitrealer Applikation von Zymosan eine große Anzahl von aktivierten Makrophagen das Augeninnere (Retina, Glaskörper, Linse) infiltrieren (Fischer et al., 2000, 2001; Leon et al., 2000; Yin et al., 2003, 2006; Lorber et al., 2002; Pernet and Di Polo, 2006). Aus diesen Beobachtungen postulierte man, dass aktivierte Makrophagen die Hauptmediatoren der neuroprotektiven und regenerationsfördernden Effekte einer LV bzw. Zymosaninjektion sind (Leon et al., 2000; Yin et al., 2003, 2006). Ein direkter Beweis wurde allerdings in den oben genannten Publikationen nicht gezeigt, so dass die Frage nach dem Einfluss von aktivierten Makrophagen an den LV-induzierten Effekten nicht eindeutig geklärt ist. Die Beantwortung dieser Frage ist unter anderem Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit.

Eine Möglichkeit, dieser Frage nachzugehen, ist die Invasion von aktivierten Makrophagen in das innere Auge zu verhindern oder zumindest deren Anzahl signifikant zu reduzieren. Clodronathaltige Liposomen, sogenannte Clodrolips, lösen in phagozytierenden Makrophagen eine Apoptose aus und eliminieren diese Zellen somit aus dem Gewebe (Van Rooijen and Sanders, 1997). Aus diesem Grund sollte zunächst geklärt werden, ob sich die intravitreale (i.vit.) oder intraperitoneale (i.p.) Administration von Clodrolips zur Verminderung der Anzahl von aktivierten Makrophagen im inneren Auge eignet. Falls dies der Fall sein sollte, sollte anschließend im Regenerationsmodell der Einfluss der Makrophagen auf die axonale Regeneration hin untersucht werden. Die experimentellen Gruppen für diese Versuchsansätze sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tab. 6: Unterschiedliche Versuchsgruppen und Zeitpunkte.
K = unbehandeltes Auge, SQ = Sehnervquetschung, LV = Linsenverletzung, Lip = Kontrollliposomen, Clo = Clodronathaltige Liposomen (Clodrolips), i.vit. = intravitreale Applikation, i.p. = intraperitoneale Applikation, d = postoperative Tage.

Zeit/ Applikation	K	SQ	LV	SQ+LV	SQ+LV+ Lip i.vit.	SQ+LV+ Clo i.vit.	SQ+LV+ Lip i.p.	SQ+LV+ Clo i.p.
5 d	X	X	X	X	X	X	X	X
14 d		X		X	X	X		

Die in der Tabelle 6 gewählte Nomenklatur für die jeweiligen Applikationen hat in der ganzen Arbeit Bestand.

3.1.1 Definition von Makrophagen und Mikrogliazellen

Zur Quantifizierung der Mikrogliazellen und der in das Augeninnere einwandernden Makrophagen wurden spezifische Antikörper verwendet: für Mikrogliazellen wurde ein Primärantikörper gegen CD11b (Klon Ox42), für Makrophagen ein Primärantikörper gegen CD68 (Klon ED1) eingesetzt. Da es in der Literatur zwar Studien zur Verwendung der entsprechenden Antikörper gibt, diese jedoch Mikrogliazellen und Makrophagen nicht eindeutig voneinander unterscheiden, war die Definition dieser Zellen erforderlich. Zellen, die sowohl durch den Antikörper ED1, als auch durch den Antikörper Ox42 detektiert wurden, wurden als Mikrogliazellen bezeichnet. Dieser Zelltyp war gekennzeichnet durch eine ramifizierte (ruhend) oder amöboide (aktiviert) Morphologie und war hauptsächlich in der Retina zwischen der retinalen Ganglienzellschicht (RGS) und der inneren nukleären Schicht (INS) lokalisiert (Abb. 4 A, B). Der zweite Zelltyp wurde als Makrophagen bezeichnet. Er zeigte eine starke ED1- und eine schwache Ox42-Färbung. Diese Zellen hatten einen großen Zellkörper und eine runde Form. Sie waren vorrangig in der verletzten Linse, im Glaskörper und im Ziliarkörper zu finden. Vereinzelt waren sie auch im Nervenfasergeflecht der Retina lokalisiert (Abb. 4 C, D). Abbildung 4 gibt einen Überblick über die Definition der ED1- und Ox42-positiv gefärbten Zellen in Kryostatschnitten durch das Auge nach einer LV.

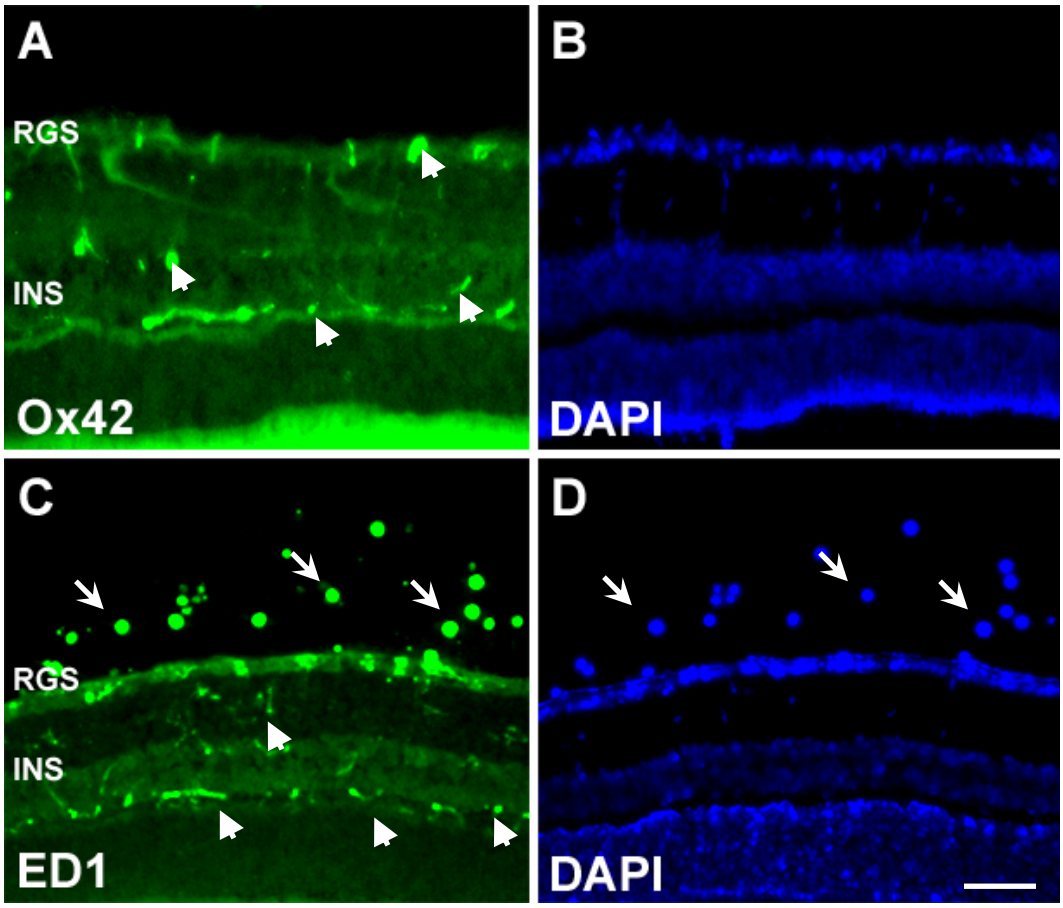


Abb. 4: Immunhistochemische Färbung von Mikrogliazellen (Ox42, ED1) und Makrophagen (ED1) in der Retina und dem Glaskörper nach einer LV (A, C). Die Färbung mit dem Antikörper Ox42 (A) zeigte einen, der Antikörper ED1 (C) zwei morphologisch unterschiedliche Zelltypen. Die Kryostatschnitte für die Ox42- (A) bzw. ED1-Färbung (C) wurden zusätzlich mit DAPI zur Visualisierung der Zellkerne gefärbt (B, D). Makrophagen sind mit Pfeilen, Mikrogliazellen mit Pfeilspitzen gekennzeichnet. RGS: Retinale Ganglienzellschicht, INS: Innere nukleäre Schicht. Maßstabsbalken: 50 µm.

3.1.2 Quantifizierung der ED1- und Ox42-positiven Zellen

Bevor die Mikrogliazellen und Makrophagen im Augeninneren 5 Tage nach der jeweiligen Behandlung quantifiziert wurden, wurden diese Zellen in den Retinae immunhistochemisch mit den entsprechenden Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD11b bzw. CD68 gefärbt (Abb. 5). Bei der unbehandelten Retina konnten im inneren Auge weder Mikrogliazellen, noch Makrophagen detektiert werden (Abb. 5 A, G, M). Eine Quetschung des Sehnervens dagegen

führte zu einer deutlichen Aktivierung von Mikrogliazellen, die hauptsächlich in der INS und vereinzelt zwischen der INS und der RGS lokalisiert waren (Abb. 5 B).

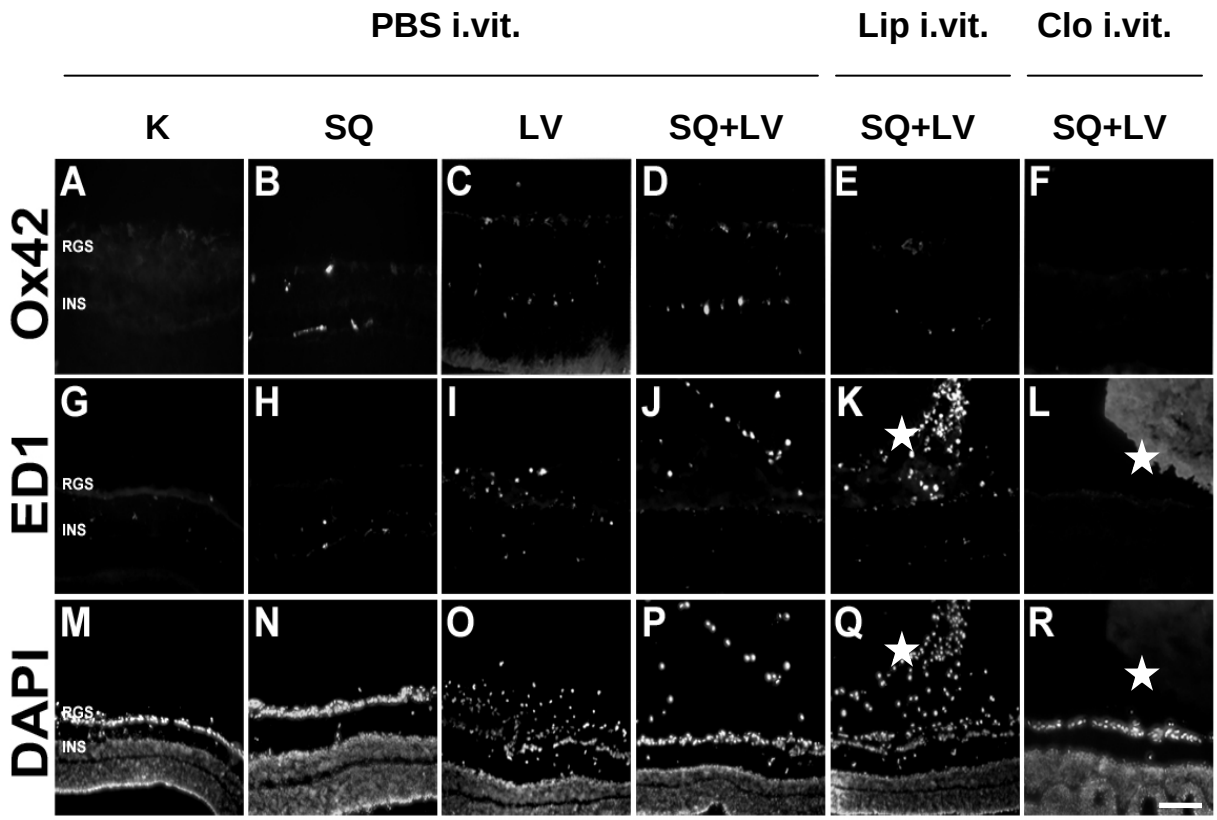
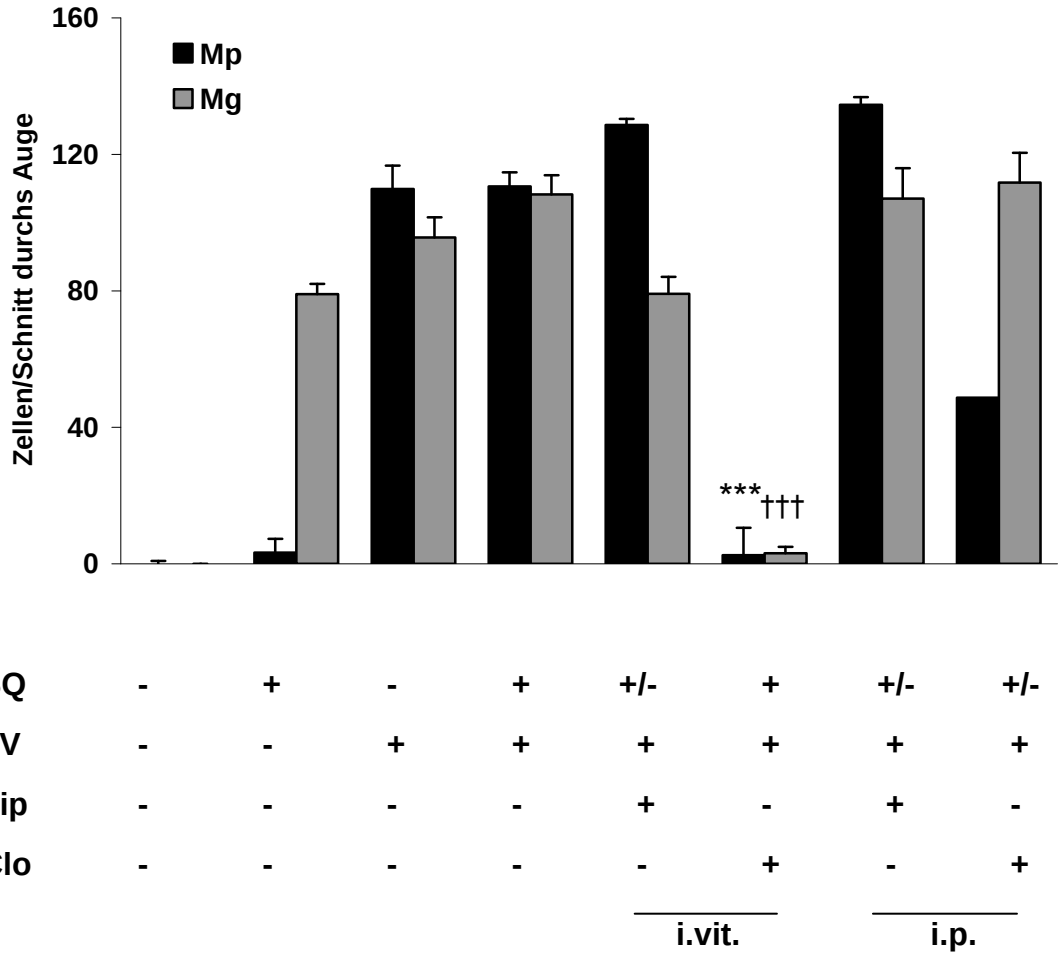


Abb. 5: Immunhistochemische Färbung der Retina 5 Tage nach der dargestellten Behandlung. Die Mikrogliazellen (A-F) wurden mit dem Antikörper Ox42 bzw. ED1, die Makrophagen (G-L) mit ED1 und die Zellkerne mit DAPI (M-R) angefärbt. K: unbehandelte Retina (A, G, M), SQ: Sehnervquetschung (B, H, N), LV: Linsenverletzung (C, I, O), SQ+LV: Sehnervquetschung/Linsenverletzung (D, J, P), SQ+LV+Lip i.vit.: SQ+LV mit simultaner intravitrealer Injektion von Kontrollliposomen (E, K, Q), SQ+LV+Clo i.vit.: SQ+LV mit simultaner intravitrealer Injektion von Clodrolips (F, L, R). Für die DAPI- und ED1-Färbung wurden gleiche Schnitte verwendet (G-R). RGS: Retinale Ganglienzellschicht, INS: Innere nukleäre Schicht, PBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung, i.vit.: intravitreale Injektion. Sterne markieren die verletzte Linse. Maßstabsbalken: 100 µm.

Durch die Antikörper Ox42 und ED1 ließen sich eine hohe Anzahl von Mikrogliazellen in und zwischen der INS und RGZ-Schicht nach Sehnervquetschung detektieren (Abb. 5 B, H). Die Färbung mit dem Antikörper

ED1 hingegen zeigte nach SQ lediglich eine moderate Anzahl von Makrophagen, die hauptsächlich im Glaskörper lokalisiert waren (Abb. 5 H). Die DAPI-Färbung bestätigt die geringe Anzahl von DAPI-positiven Zellen im Glaskörper (Abb. 5 N). Übereinstimmend mit der Literatur kam es nach einer LV bzw. SQ+LV jedoch zu einer massiven Infiltration von Makrophagen in das Augeninnere, die besonders im Glaskörper, in der verletzten Linse und vereinzelt im Nervenfasergeflecht der Retina detektierbar waren (Abb. 5 I, J) (Leon et al., 2000; Yin et al., 2003; Fischer et al., 2001; Lorber et al., 2002). In diesen ED1-positiven Bereichen des Auges wurden auch viele DAPI-positive Zellen nach LV bzw. SQ+LV nachgewiesen (Abb. 5 O, P). Nach SQ+LV mit simultaner intravitrealer Applikation von Kontrollliposomen wurde die Anzahl ED1-positiver Makrophagen im inneren Auge erhöht (Abb. 5 K, Q). Die LV und die SQ+LV führten zu einer Steigerung der Anzahl von Ox42-positiven Mikrogliazellen in der Retina im Vergleich zu einer alleinigen SQ (Abb. 5 C, D). Kontrollliposomen zeigten jedoch auf den Aktivierungsgrad von Mikrogliazellen keinen Einfluss. Nach SQ+LV mit simultaner intravitrealer Applikation von Kontrollliposomen wurde die Anzahl von Ox42-positiven Mikrogliazellen im Vergleich zu einer SQ oder SQ+LV nicht erhöht (Abb. 5 C-E). Sowohl bei den Makrophagen als auch bei den Mikrogliazellen führte die SQ+LV mit zusätzlicher Injektion von Clodrolips zu einer signifikanten Reduzierung dieser Zellen im Augeninneren (Abb. 5 F, L). Die Reduzierung der Makrophagen und Mikrogliazellen nach SQ+LV+Clo im Vergleich zur SQ+LV betrug hierbei jeweils über 97% (Abb. 6). Im Durchschnitt wurden nach SQ+LV 111 ED1-, bzw. 108 Ox42-positive Zellen im inneren Auge quantifiziert (Abb. 6). Nach Depletion mit Clodrolips wurden lediglich 2,5 Makrophagen (ED1) bzw. 3,1 Mikrogliazellen (Ox42) im Durchschnitt quantifiziert (Abb. 6). Hierbei wurden kaum DAPI-positiven Zellen im inneren Auge detektiert (Abb. 5 F, L, R). Die SQ+LV mit intraperitonealer Applikation von Clodrolips führte zu einer Reduzierung der intraokularen Makrophagen um 64%, was einem Durchschnittswert von 48,7 ED1-positiven Zellen pro Schnitt durch das Auge entsprach (Abb. 6). Die Anzahl der Mikrogliazellen im inneren Auge war durch diese Applikationsmethode nicht betroffen und erreichte daher Werte, die mit einer SQ+LV vergleichbar waren (Abb. 6).



Applikation/ Antikörper	K		SQ		LV		SQ+LV		SQ+LV+ Lip i.vit.		SQ+LV+ Clo i.vit.		SQ+LV+ Lip i.p.		SQ+LV+ Clo i.p.	
	MW	SF	MW	SF	MW	SF	MW	SF	MW	SF	MW	SF	MW	SF	MW	SF
ED1	0	0	3,3	0,8	110	4,0	111	6,8	129	4,1	2,5	1,7	135	7,9	48,7	2,2
Ox42	0	0	79	3,1	95,7	5,9	108	5,6	79,1	4,9	3,1	1,9	107	8,9	112	8,7

Abb. 6: Abb. 6 gibt die durchschnittliche Anzahl der Makrophagen und Mikrogliazellen im inneren Auge 5 Tage nach der jeweiligen Behandlung pro Schnitt durch das Auge an. Die intravitreale Injektion von Clodrolips 5 Tage nach SQ+LV führte zu einer signifikanten Reduzierung von Makrophagen und Mikrogliazellen im Augeninneren. K: unbehandeltes Auge, SQ: Sehnervquetschung, LV: Linsenverletzung, Lip: Kontrollliposomen, Clo: Clodrolips, Mp: Makrophagen, Mg: Mikrogliazellen, i.vit.: intravitreale Applikation, i.p.: intraperitoneale Applikation, MW: Mittelwert, SF: Standardfehler. Es wurden n ≥ 5 Tiere für die jeweiligen Gruppen zur Quantifizierung der Makrophagen und Mikrogliazellen verwendet. Die Effekte der jeweiligen Behandlung auf die Anzahl der Mp und Mg: Mp *** $p<0,001$ im Vergleich zur SQ+LV+Lip; Mg ††† $p<0,001$ im Vergleich zur SQ+LV+Lip.

Aufgrund dieser Befunde wurde lediglich die intravitreale Applikation von Clodrolips und Kontrollliposomen im weiteren Verlauf dieser Arbeit angewandt. Die Quantifizierung der immunhistochemisch gefärbten ED1- und Ox42-positiven Zellen zeigte die Effektivität von Clodrolips nach SQ+LV hinsichtlich der Depletion von Makrophagen und Mikrogliazellen im inneren Auge bei Sprague-Dawley Ratten (Abb. 6).

3.1.3 Einfluss der Makrophagendepletion auf die Expression von GFAP und Gap43

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die intravitreale Applikation von Clodrolips eine geeignete Methode zur Reduktion von aktivierten Makrophagen und Mikrogliazellen im Augeninneren darstellte, sollte die Frage beantwortet werden, ob die intravitreale Injektion von Clodrolips bzw. Kontrollliposomen die Expression des *Growth associated protein-43* (Gap43) und *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) in der Retina beeinflusst. Als Marker für aktivierte Astrozyten und Müllerzellen diente das Intermediärfilamentprotein GFAP, das nach einer SQ+LV in diesen retinalen Zellen verstärkt exprimiert wird (Müller et al., 2007; Sarup et al., 2004; Eng, 1985). Des Weiteren wurde die Expression des wachstumsassoziierten Proteins Gap43 nach jeweiliger Behandlung getestet, da Gap43 ein charakteristischer und etablierter Marker für wachstumsassoziierte Prozesse ist (Benowitz et al., 1990; Benowitz and Routtenberg, 1997). Zur Klärung dieser Fragen wurde eine SQ, LV, SQ+LV oder eine SQ+LV mit zusätzlicher intravitrealer Injektion von Kontrollliposomen bzw. Clodrolips durchgeführt und die RNA aus den Retinae 5 Tage nach der jeweiligen Behandlung für die semi-quantitative RT-PCR isoliert (Abb. 7, 8). Ebenso wurde die Expression von GFAP in der Retina mittels *Western-blotting* 5 Tage nach SQ+LV oder SQ+LV+Lip bzw. SQ+LV+Clo untersucht (Abb. 9). Die Expression von Gap43 in der Retina wurde 5 Tage nach SQ, LV, SQ+LV oder SQ+LV+Lip bzw. SQ+LV+Clo untersucht (Abb. 10).

Bei den semi-quantitativen RT-PCRs führte eine SQ zu einer verstärkten Expression von GFAP und Gap43 in der Retina im Vergleich zu einer unbehandelten Retina (Abb. 7, 8). Durch eine LV, besonders jedoch durch eine

SQ+LV wurde die Expression von GFAP zusätzlich verstärkt (Abb. 7). Die SQ+LV induzierte eine verstärkte Expression von Gap43 in der Retina im Vergleich zur SQ oder LV (Abb. 8). Die Signalintensität nach SQ+LV wurde weder bei GFAP noch bei Gap43 durch die SQ+LV mit zusätzlicher intravitrealer Applikation von Clodrolips oder Kontrollliposomen verändert (Abb. 7, 8).

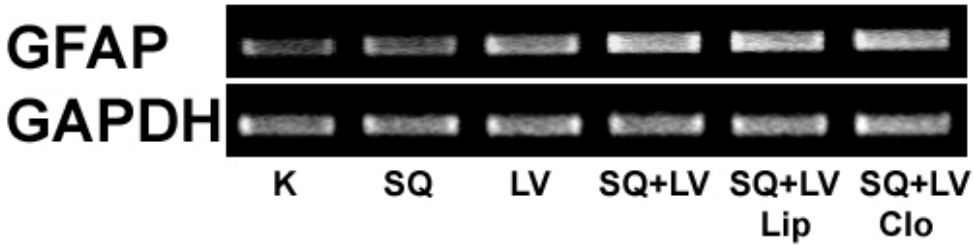


Abb. 7: RT-PCR zum Nachweis von *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) mRNA. Die RNA wurde aus Retinae extrahiert, bei denen 5 Tage zuvor eine Sehnervquetschung (SQ), Linsenverletzung (LV), SQ+LV, SQ+LV mit zusätzlicher intravitrealer Injektion von Kontrollliposomen (SQ+LV+Lip) oder Clodrolips (SQ+LV+Clo) durchgeführt wurde. Nach einer LV und SQ+LV war eine deutliche GFAP-Induktion im Vergleich zur unbehandelten Retina (K) zu erkennen. Die Signalintensität wurde durch die SQ+LV+Lip bzw. SQ+LV+Clo im Vergleich zur SQ+LV nicht verändert. GAPDH diente als Beleg für gleiche Ausgangsmengen bei den jeweiligen Proben.

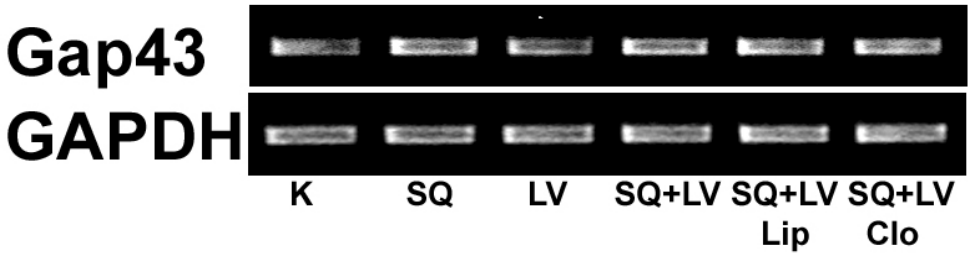


Abb. 8: RT-PCR zum Nachweis von *Growth associated protein-43* (Gap43) mRNA. Die Expressionsuntersuchung von Gap43 erfolgte 5 Tage nach Sehnervquetschung (SQ), Linsenverletzung (LV), SQ+LV, SQ+LV mit zusätzlicher intravitrealer Applikation von Kontrollliposomen (SQ+LV+Lip) oder Clodrolips (SQ+LV+Clo). Im Vergleich zur unbehandelten Retina (K) wurde nach SQ und SQ+LV eine verstärkte Expression von Gap43 induziert, wobei diese Induktion nicht durch die SQ+LV+Lip oder SQ+LV+Clo verändert wurde. GAPDH diente als Beleg für gleiche Ausgangsmengen bei den jeweiligen Proben.

Die Ergebnisse der semi-quantitativen RT-PCRs wurden durch *Western-blotting* bestätigt (Abb. 9, 10). Auch hier wurde durch eine LV eine verstärkte Expression von GFAP in der Retina im Vergleich zur unbehandelten Retina induziert (Abb. 9). Die Signalintensität wurde nicht durch die Behandlung mit Liposomen oder Clodrolips nach SQ+LV im Vergleich zur alleinigen SQ+LV verändert (Abb. 9). Ebenso induzierte eine SQ+LV eine verstärkte Expression von Gap43 in der Retina, die nicht durch Liposomen- oder Clodronatbehandlung verändert wurde (Abb. 10).

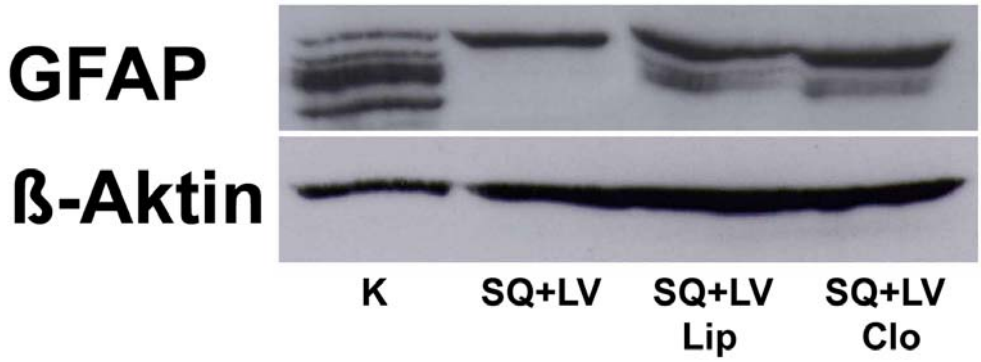


Abb. 9: *Western-blotting* mit dem Antikörper gegen *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP). Die Retina der Tiere wurde 5 Tage nach Linsenverletzung (LV) bzw. LV mit zusätzlicher Behandlung mit Kontrollliposomen (LV+Lip) oder Clodrolips (LV+Clo) entnommen. Die LV zeigte hierbei eine deutliche Expression von GFAP, die nach LV+Lip oder LV+Clo im Vergleich zur LV unverändert blieb. Beta-Aktin diente als Kontrolle und belegte, dass für das *Western-blotting* gleiche Ausgangsmengen für die jeweiligen Proben verwendet wurden.

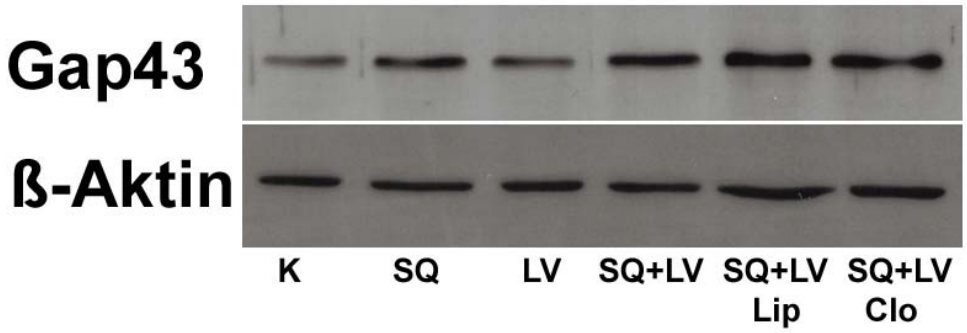


Abb. 10: *Western blotting* mit dem Antikörper gegen *Growth associated protein-43* (Gap43). Die Retina der Tiere wurde 5 Tage nach Sehnervquetschung (SQ), Linsenverletzung (LV), SQ+LV, SQ+LV mit zusätzlicher Liposomen- (SQ+LV+Lip) bzw. Clodrolipsbehandlung (SQ+LV+Clo) entnommen. Die SQ und die SQ+LV zeigten hierbei

eine deutliche Expression von Gap43 im Vergleich zur unbehandelten Retina (K). Die Expression von Gap43 wurde nicht durch eine SQ+LV+Lip oder SQ+LV+Clo im Vergleich zur alleinigen SQ+LV verändert. Beta-Aktin diente als Beleg für gleiche Ausgangsmengen der jeweiligen Proben.

Die Ergebnisse der semi-quantitativen RT-PCRs und *Western-blotting* wurden immunhistochemisch mit den Antikörpern gegen GFAP und Gap43 bestätigt (Abb. 11). In den Kryostatschnitten der Retina wurde eine Induktion der Expression von GFAP nach einer LV in den Müllerzellen sowie in den retinalen Astrozyten im Vergleich zur SQ und K detektiert (Abb. 11 M-O). Die Expression wurde durch eine SQ+LV verstärkt (Abb. 11 P). Durch eine SQ+LV mit zusätzlicher Injektion von Liposomen oder Clodrolips wurde die Expression von GFAP im Vergleich zur SQ+LV nicht verändert (Abb. 11 Q, R). Die erhöhte Gap43-Expression nach SQ, besonders jedoch nach SQ+LV im Vergleich zur K oder alleinigen LV war in den RGZ detektierbar (Abb. 11 A-D, G-J). Zur Detektion der RGZ wurde der Antikörper gegen ßIII-Tubulin verwendet (Abb. 11 A-F; Pfeile). Ebenso wie für GFAP führte eine SQ+LV mit zusätzlicher Behandlung von Liposomen oder Clodrolips im Vergleich zu einer alleinigen SQ+LV zu keiner Veränderung der Expression (Abb. 11 K, L, Q, R). Die intravitreale Applikation von Clodrolips reduzierte demnach signifikant die Anzahl der intraokularen Makrophagen im Augeninneren nach SQ+LV, beeinflusste jedoch nicht die für eine LV charakteristische Reaktion von retinalen Astrozyten und Müllerzellen.

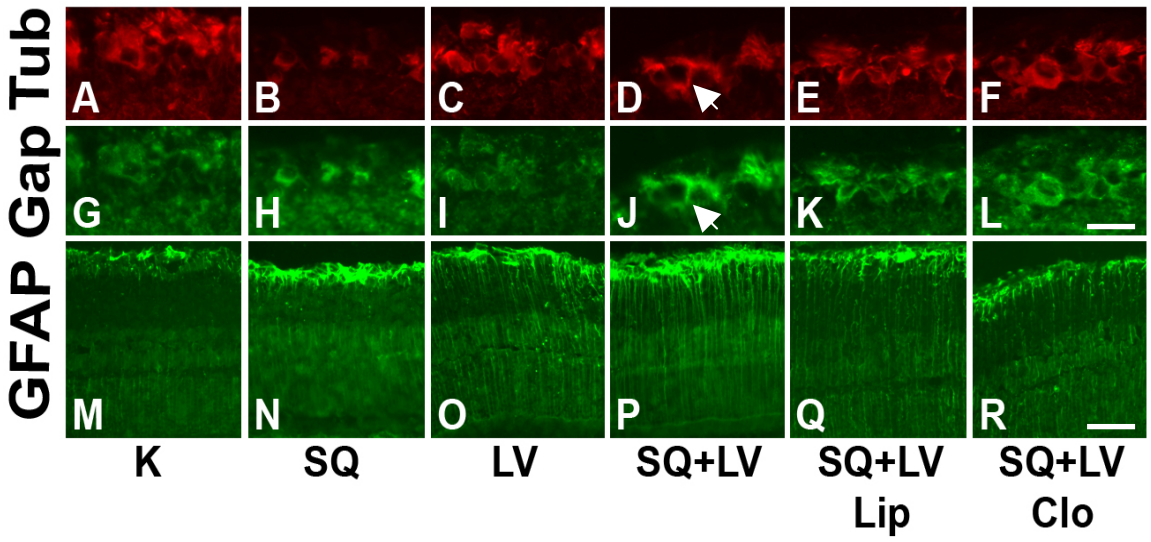


Abb. 11: Immunhistochemisch gefärbte Retinae 5 Tage nach verschiedenen Vorbehandlungen *in vivo*. RGZ wurden durch den Antikörper gegen ßIII-Tubulin (ßIII) angefärbt (A-F). K: unbehandelte Retina, SQ: Sehnervquetschung, LV: Linsenverletzung, SQ+LV+Lip: SQ+LV mit zusätzlicher intravitrealer Injektion von Kontrollliposomen, SQ+LV+Clo: SQ+LV mit zusätzlicher intravitrealer Injektion von Clodrolips. Gap43-Expression (Gap) war nach SQ (H) und SQ+LV (J) im Vergleich zur K (G) und LV (I) erhöht. Gap43 war in den RGZ detektierbar (B, D-F; H, J-L). Die SQ (N), besonders jedoch die LV (O) und die SQ+LV (P) führten zu einer Induktion der Expression von GFAP im Vergleich zur K (M). Eine veränderte Signalintensität von Gap43 und GFAP war nach SQ+LV+Lip (K, Q) oder SQ+LV+Clo (L, R) im Vergleich zur SQ+LV (J, P) nicht nachweisbar. Pfeile zeigten exemplarisch ßIII-Tubulin- und Gap43-positive RGZ nach SQ+LV (D, J). Maßstabsbalken: Gap43 (Gap) und ßIII-Tubulin (Tub) 25 µm, GFAP 75 µm.

3.2 Einfluss von Makrophagen auf das Überleben von axotomierten RGZ

Um den Einfluss der Makrophagen auf das Überleben von axotomierten RGZ zu untersuchen, wurden RGZ wie in Material und Methoden beschrieben mit dem lipophilen Carbocyanin-Farbstoff 4Di-10Asp [N-4-(4-didecylaminostyryl)-N-methylpyridium iodide] vom *Colliculus superior* (CS) aus retrograd gefärbt. Sieben Tage nach dieser Behandlung erhielten die Sprague-Dawley Ratten eine SQ, LV, LV mit intravitrealer Liposomen- oder Clodrolipsinjektion, SQ+LV oder eine SQ+LV mit zusätzlicher Liposomen- oder Clodrolipsbehandlung. Nach weiteren 14 Tagen wurden die Tiere getötet und die Retinae zur Quantifizierung der retrograd angefärbten RGZ und Mikrogliazellen als *whole mount*-Präparat präpariert (Abb. 12, 13).

Sowohl die alleinige LV als auch die LV mit zusätzlicher Behandlung mit Liposomen und Clodrolips führte zu keiner signifikanten Reduzierung der Anzahl retrograd gefärbter RGZ, wohingegen die SQ alleine wie erwartet eine dramatische Reduzierung von RGZ aufwies (Abb. 12). Bedingt durch die SQ war eine hohe Anzahl von Mikrogliazellen detektierbar, die die mit 4Di-10Asp gefärbten degenerierenden RGZ phagozytiert hatten (Abb. 12, 13). Die SQ+LV führte sowohl zu einem verbesserten Überleben von RGZ von 38%, als auch zu einer signifikanten Reduzierung von Mikrogliazellen im Vergleich zur alleinigen SQ (Abb. 12, 13). Die Anzahl an überlebenden RGZ und Mikrogliazellen war bei

SQ+LV nach zusätzlicher Behandlung mit PBS, Liposomen und Clodrolips vergleichbar hoch (Abb. 11, 13). Die SQ+LV+Clo führte zu einem Überleben von RGZ von 42% im Vergleich zum unbehandelten Auge, weshalb davon auszugehen war, dass die Makrophagendepletion die neuroprotektiven Effekte der LV nicht abschwächte (Abb. 12, 13).

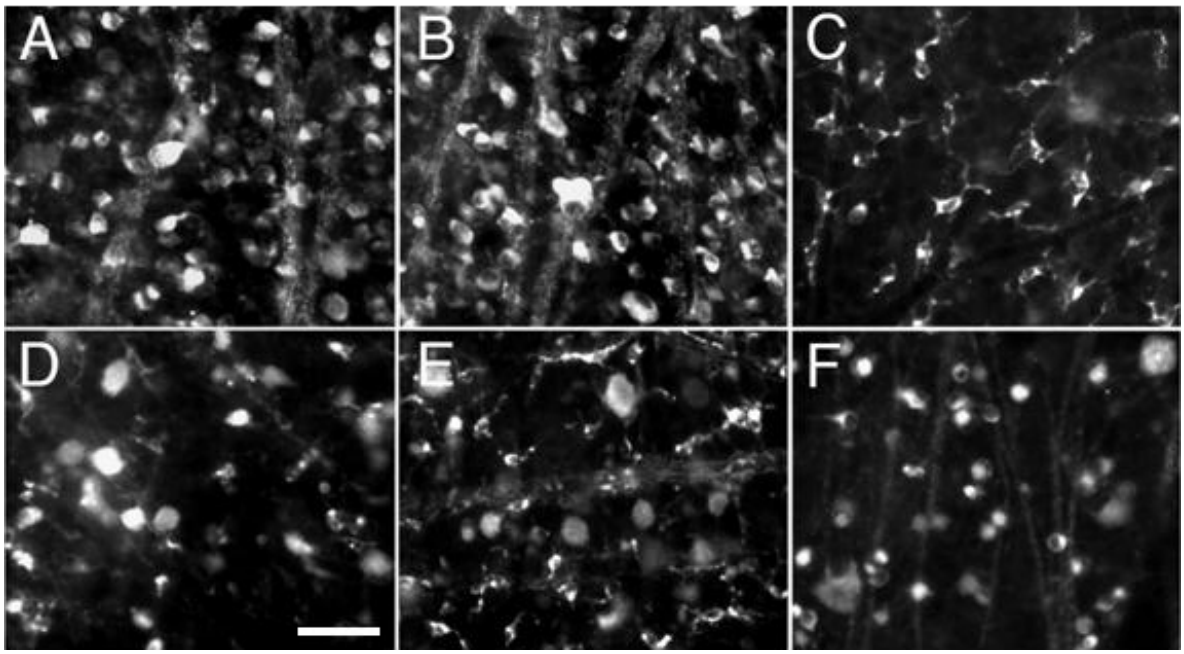
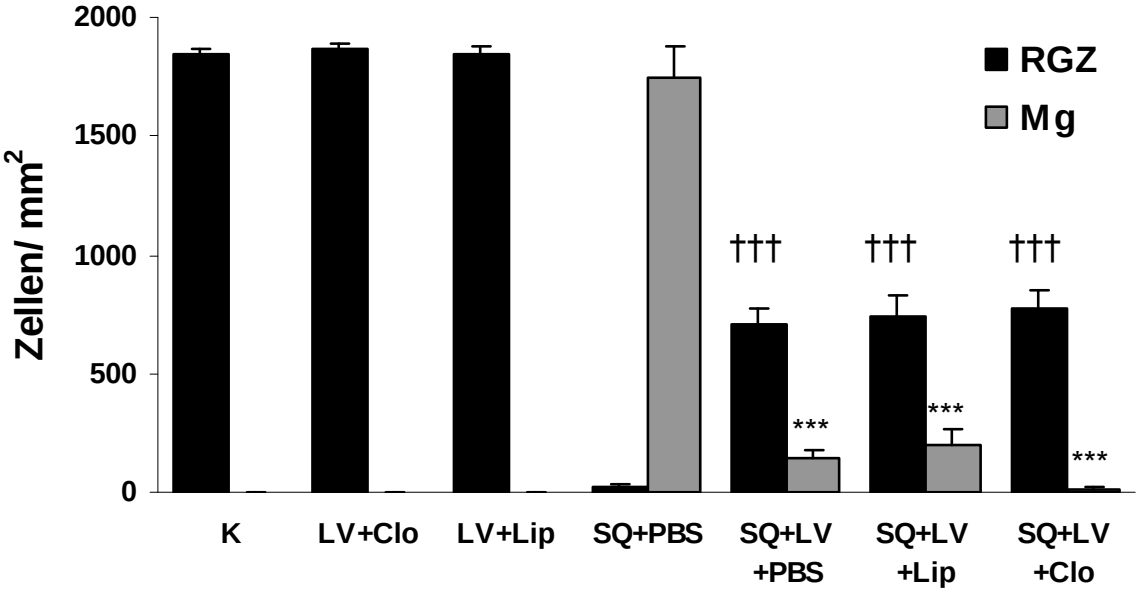


Abb. 12: *Whole mount*-Präparate der Retinae 14 Tage nach den jeweiligen Behandlungen *in vivo*. 4Di-10Asp gefärbte RGZ und Mikrogliazellen 14 Tage nach PBS-Injektion (A), Linsenverletzung mit intravitrealer Injektion von Clodrolips (LV+Clo, B), Sehnervquetschung mit intravitrealer Injektion von PBS (SQ+PBS, C), Sehnervquetschung mit simultaner Linsenverletzung und intravitrealer Injektion von PBS (SQ+LV+PBS, D), SQ+LV mit zusätzlicher intravitrealer Injektion von Kontrollliposomen (SQ+LV+Lip, E) bzw. Clodrolips (SQ+LV+Clo, F). Die LV (A), SQ+LV (D) oder LV+Clo (B) zeigte keine Reduzierung der Anzahl an retrograd gefärbten RGZ, SQ alleine hingegen führte zu einer dramatischen Abnahme von RGZ (C). Es wurden n ≥ 5 Tiere für die jeweiligen Gruppen zur Quantifizerung der RGZ und Mikrogliazellen verwendet. Maßstabsbalken: 50 µm.



Behandlung/ Quantifizierung	RGZ MW	RGZ SF	Mg MW	Mg SF
K	1845	25	1	0,4
LV+Clo	1870	22	1,4	1,7
LV+Lip	1843	30	2	2
SQ+PBS	27	10	1740,6	140
SQ+LV+PBS	703	67	144	35
SQ+LV+Lip	740	85	200	63
SQ+LV+Clo	777,8	70	14	5

Abb. 13: Quantifizierung der RGZ und Mikrogliazellen (Mg) im *whole mount*-Präparat 14 Tage nach den jeweiligen Vorbehandlungen *in vivo*. K: unbehandeltes Auge, SQ: Sehnervquetschung, LV: Linsenverletzung, Lip: intravitreale Injektion von Kontrollliposomen, Clo: intravitreale Injektion von Clodrolips, MW: Mittelwert, SF: Standardfehler. Sprague-Dawley Ratten erhielten eine LV, LV+Clo, LV+Lip, SQ+PBS, SQ+PBS, SQ+LV+Lip und SQ+LV+Clo. Es wurden n ≥ 5 Tiere für die jeweiligen Gruppen zur Quantifizerung der RGZ und Mikrogliazellen verwendet. Die Effekte der jeweiligen Behandlung auf das Überleben der RGZ im Vergleich zu SQ+PBS: ††† $p<0,001$, Effekte der jeweiligen Behandlung auf die Anzahl der Mikrogliazellen im Vergleich zur SQ+PBS: *** $p<0,001$.

3.3 Einfluss von Makrophagen auf die axonale Regeneration

Nachdem gezeigt wurde, dass die Makrophagendepletion die neuroprotektiven Effekte einer LV nicht signifikant beeinflusste (Abb. 12, 13), wurde anschließend der Einfluss der Makrophagen auf die axonale Regeneration 14 Tage nach einer LV *in vivo* untersucht (Abb. 14). Zur Beantwortung dieser Frage erhielten die Tiere eine SQ+LV oder eine SQ mit simultaner intravitrealer Injektion von PBS, Liposomen oder Clodrolips. Die Injektionen von PBS, Liposomen oder Clodrolips wurden an Tag 3 und 7 nach SQ wiederholt (Tab. 6). 2 Wochen nach der ersten Injektion wurden Kryostatschnitte präpariert und regenerierende Axone durch die Verwendung des Antikörpers gegen Gap43, RGZ durch den Antikörper gegen ßIII-Tubulin angefärbt (Abb. 14). Es wurden die Gap43-positiven Axone der angefärbten Schnitte quantifiziert, die 0,5 und 1 mm über die Läsionsstelle hinweg in den distalen Teil des gequetschten Sehnervens regeneriert sind (Abb. 15).

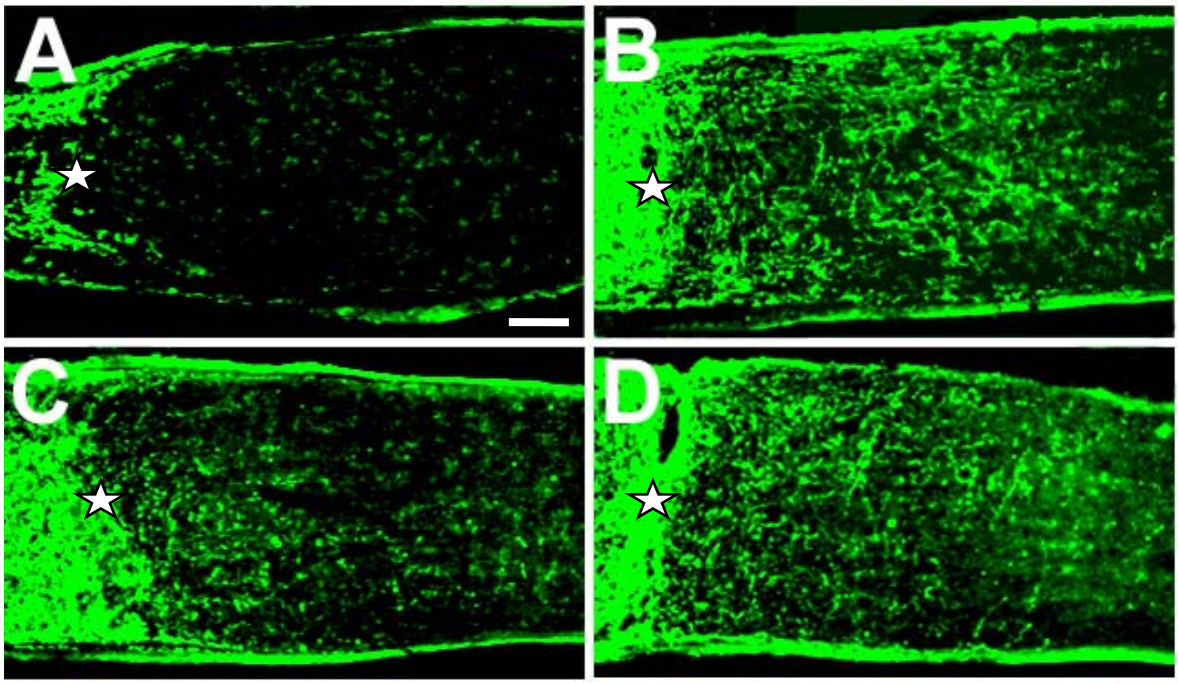
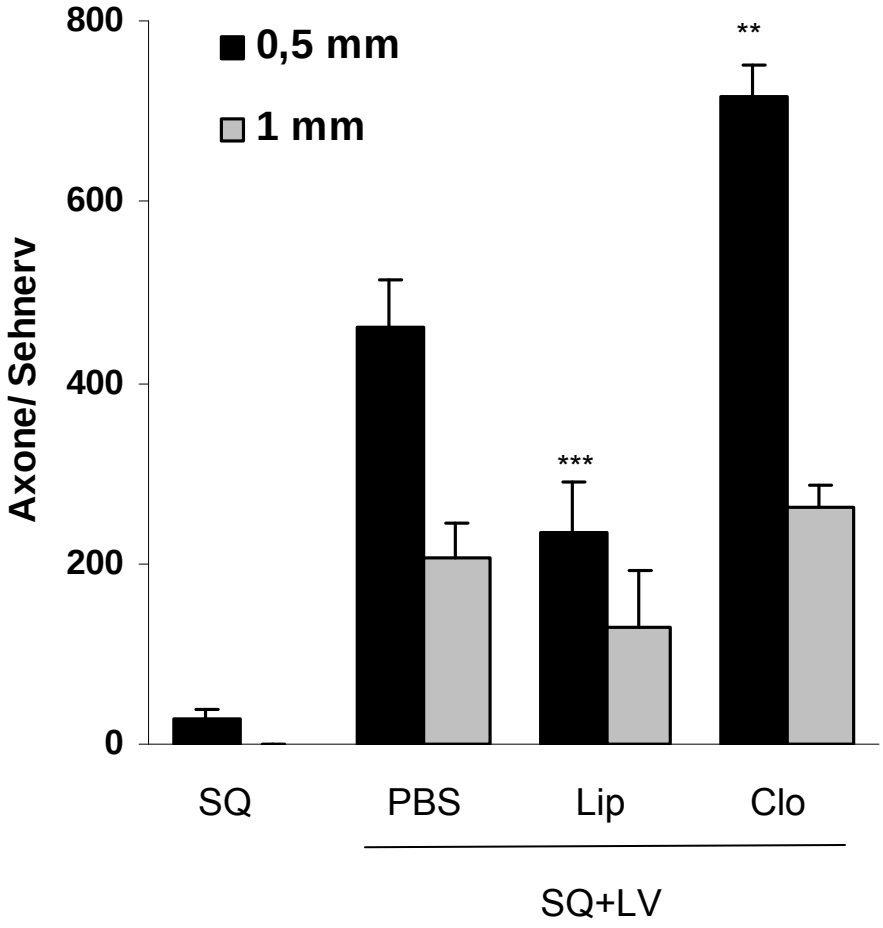


Abb. 14: Gap43-Färbung von regenerierenden Axonen 14 Tage nach SQ in 14 µm dünnen longitudinalen Schnitten durch den Sehnerv. Die alleinige SQ (A) zeigte kaum Gap43-positive Axone. Die LV mit dreimaliger intravitrealer Injektion von PBS hingegen zeigte eine gesteigerte Anzahl von Gap43-positiven Axonen im distalen Teil des zuvor gequetschten Sehnerven (B). Die SQ+LV mit dreimaliger intravitrealer Applikation von Liposomen führte zu einer Verminderung der Anzahl Gap43-positiver Axone (C).

SQ+LV+Clo hingegen führte zu einer dreifach höheren Anzahl Gap43-positiver Axone (D) im Vergleich zu C. Es wurden n ≥ 6 Tiere für die jeweiligen Gruppen zur Quantifizerung der Gap43-positiven Zellen verwendet. Der Stern markiert die Läsionsstelle. Maßstabsbalken: 100 µm.

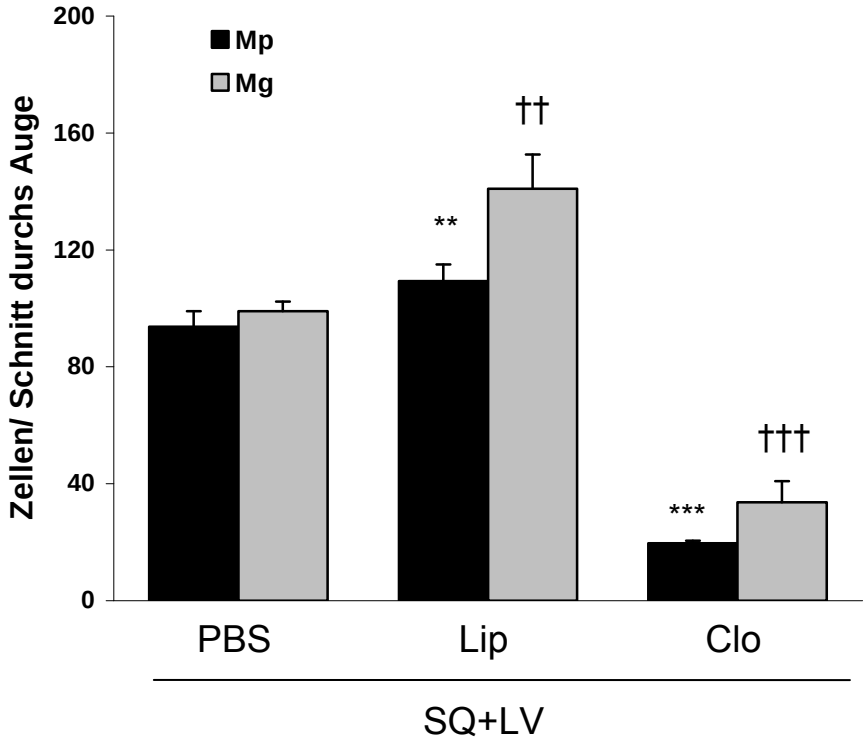
Die SQ zeigte eine geringe Anzahl von Gap43-positiven Axonen im distalen Teil des gequetschten Sehnerven (Abb. 14 A, 15). Im Einklang mit der Literatur führte eine LV zu einem deutlichen Anstieg von regenerierenden, Gap43-positiven Axonen bei den Messpunkten 0,5 und 1 mm im Vergleich zur alleinigen SQ (Abb. 14 B) (Fischer et al., 2001, 2004a, 2008; Müller et al., 2007; Leon et al., 2000). Die Anzahl der Gap43-positiven Axone betrug für den Messpunkt 0,5 mm im Durchschnitt 477 Axone, für den Messpunkt 1 mm hinter der Läsionsstelle wurden im Durchschnitt 212 Axone pro Schnitt durch den Sehnerv quantifiziert (Abb. 14, 15). Überraschenderweise zeigte die SQ+LV mit intravitrealer Injektion von Liposomen eine Reduzierung der Anzahl von Gap43-positiven Axonen im distalen Teil des Sehnerven (Abb. 14 C, 15), obwohl mehr Makrophagen und Mikrogliazellen im inneren Auge im Vergleich zur SQ+LV quantifiziert worden sind (Abb. 16). Die durchschnittliche Anzahl Gap43-positiver Axone lag für den Messpunkt 0,5 mm bei 240 Axonen pro Schnitt durch den Sehnerv bzw. 135 Axonen bei dem Messpunkt 1 mm (Abb. 15). Die SQ+LV mit zusätzlicher Behandlung von Clodrolips reduzierte zwar signifikant die Anzahl der Makrophagen und Mikrogliazellen im inneren Auge im Vergleich zur SQ+LV (Abb. 16), führte jedoch zu einem deutlichen Anstieg von Gap43-positiven Axonen im distalen Teil des gequetschten Sehnerven (Abb. 14 D). Die Anzahl der Gap43-positiven Axone betrug für den Messpunkt 0,5 mm im Durchschnitt 741 Axone, für den Messpunkt 1 mm hinter der Läsionsstelle wurden im Durchschnitt 247 Axone pro Schnitt durch den Sehnerven quantifiziert (Abb. 15). Aus diesen Ergebnissen ließ sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die Anzahl der Makrophagen und Mikrogliazellen im inneren Auge nach den unterschiedlichen Behandlungen nicht mit der Fähigkeit zur axonalen Regeneration korrelierte. Die Reduzierung der Makrophagen und Mikrogliazellen im Augeninneren durch Clodrolips führte hierbei zu einer stärkeren axonalen Regeneration im Vergleich zur Behandlung mit Kontrollliposomen oder PBS (Abb. 14-16).



Applikation/ Messpunkt	SQ		SQ+LV		SQ+LV+Lip		SQ+LV+Clo	
	MW	SF	MW	SF	MW	SF	MW	SF
0,5 mm	28,9	10,5	460,2	52,3	232,6	56,1	715,5	35,1
1 mm	0	0	205,2	40,7	130,9	59,6	262,0	24,8

Abb. 15: Quantifizierung der Gap43-positiven Axone im distalen Teil des Sehnerven 14 Tage nach Sehnervquetschung (SQ). Die SQ zeigte lediglich bei dem Messpunkt 0,5 mm nach der Läsionsstelle Gap43-positive Axone, wohingegen es bei der Sehnervquetschung mit Linsenverletzung (SQ+LV) und zusätzlicher dreimaliger Injektion von PBS zu einem deutlichen Anstieg regenerierender Axone in den distalen Teil des zuvor gequetschten Sehnerven kam. Die SQ+LV mit dreimaliger Applikation von Liposomen (SQ+LV+Lip) führte zu einer signifikanten Verminderung der Anzahl regenerierender Axone. Die SQ+LV mit dreimaliger Applikation von Clodrolips (SQ+LV+Clo) hingegen führte zu einer dreifach höheren Anzahl regenerierender Axone bei dem Messpunkt 0,5 mm im Vergleich zu SQ+LV+Lip. MW: Mittelwert, SF: Standardfehler. Es wurden n ≥ 6 Tiere für die jeweiligen Gruppen zur Quantifizerung der Gap43-positiven Zellen verwendet. Effekte der jeweiligen

Behandlung auf die axonale Regeneration im Vergleich zur SQ+LV ** p<0,01, *** p<0,001.

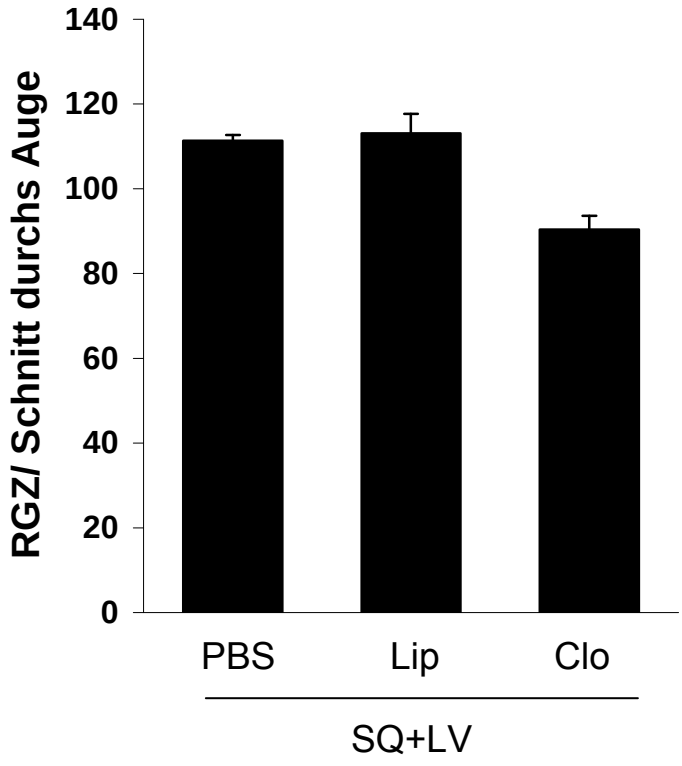


Applikation/ Zelltyp	SQ+LV+PBS		SQ+LV+Lip		SQ+LV+Clo	
	MW	SF	MW	SF	MW	SF
Mp	93,7	5,2	109,3	5,6	19,6	0,8
Mg	99,0	3,3	140,8	11,7	33,7	7,2

Abb. 16: Quantifizierung der ED1-positiven Makrophagen (Mp) und Mikrogliazellen (Mg) 14 Tage nach Sehnervquetschung und Linsenverletzung (SQ+LV). Sprague-Dawley Ratten erhielten intravitreale Injektionen von PBS, Liposomen (Lip) oder Clodrolips (Clo) simultan zur SQ+LV. Nachinjektionen von PBS, Liposomen oder Clodrolips erfolgten 3 und 7 Tage nach SQ+LV. Nach SQ+LV+Clo wurden im Auge signifikant weniger ED1-positive Zellen im Vergleich zur SQ+LV+PBS bzw. Lip quantifiziert. Es wurden n ≥ 6 Tiere für die jeweiligen Gruppen zur Quantifizerung der ED1-positiven Makrophagen und Mikrogliazellen verwendet. Effekte der jeweiligen Behandlung auf die Anzahl der Mp und Mg im Vergleich zu SQ+LV+PBS **/†† p<0,01, ***/††† p<0,001.

Zusätzlich zur Quantifizierung der axonalen Regeneration in den Sehnerven (Abb. 14, 15) wurden benachbarte Schnitte mit dem Antikörper gegen ßIII-Tubulin gefärbt und die Anzahl der RGZ 14 Tage nach SQ+LV mit zusätzlicher

Behandlung von PBS, Liposomen oder Clodrolips bestimmt (Abb. 17). 14 Tage nach SQ+LV+PBS wurden im Durchschnitt 111 ßIII-Tubulin-positive RGZ pro Schnitt durch das Auge quantifiziert (Abb. 17). Weder die Liposomen-, noch die Clodrolipsinjektion nach SQ+LV führten zu signifikanten Unterschieden in der Anzahl der RGZ (Abb. 17). Für die SQ+LV+Lip wurden im Durchschnitt 113, für die SQ+LV+Clo 90 RGZ pro Schnitt durch das Auge quantitativ bestimmt (Abb. 17). Aus diesen Ergebnissen ließ sich zum einen die Schlussfolgerungen ziehen, dass die Differenzen in der Anzahl der regenerierenden Axone nicht durch eine unterschiedliche Anzahl an überlebenden RGZ festzumachen war (Abb. 17). Zum anderen wurden hierdurch die Daten in Abb. 13 verifiziert, bei denen die Makrophagendepletion die neuroprotektiven Effekte der LV nicht abschwächte (Abb. 13).



RGZ/ Applikation	MW	SF
SQ+LV+ PBS	111,3	1,3
SQ+LV+Lip	113,1	4,6
SQ+LV+Clo	90,3	3,2

Abb. 17: Quantifizierung der ßIII-Tubulin-positiven RGZ 14 Tage nach jeweiliger Vorbehandlung *in vivo* pro Schnitt durch das Auge. RGZ wurden mit dem Antikörper gegen ßIII-Tubulin angefärbt. Sehnervquetschung simultan zu einer Linsenverletzung und zusätzlicher intravitrealer Injektion von PBS (SQ+LV+PBS), Kontrolliposomen (SQ+LV+Lip) bzw. Clodrolips (SQ+LV+Clo) an Tag 1, 3 und 7 zeigten keinen stark signifikanten Unterschied in der Anzahl der überlebenden RGZ 14 Tage nach der jeweiligen Behandlung. MW: Mittelwert, SF: Standardfehler. Zur Quantifizierung der ßIII-Tubulin-positiven RGZ wurden n ≥ 6 Tiere für die jeweiligen Gruppen verwendet.

3.4 Untersuchung der Oncomodulin-Expression

3.4.1 Einfluss der Makrophagendepletion auf die Oncomodulin-Expression

Um zu überprüfen, ob die Expression von Oncomodulin mit der Anzahl der in das Augeninnere infiltrierenden Makrophagen korrelierte, wurden sowohl semi-quantitative (Abb. 18) also auch quantitative *real-time* RT-PCRs (Abb. 19) durchgeführt. Hierfür erhielten Sprague-Dawley Ratten eine SQ+LV oder simultan zu einer SQ+LV eine intravitreale Injektionen von Kontrolliposomen bzw. Clodrolips. Die Injektion von Kontrolliposomen bzw. Clodrolips wurde 3 Tage nach SQ+LV wiederholt. Als Negativkontrollen dienten die mRNA der Retinae unbehandelter Tiere, als Positivkontrolle die Oncomodulin Plasmid-DNA.

Bei der semi-quantitativen RT-PCR wurde CD68 als Positivkontrolle für Makrophagen verwendet (Abb. 18). Im unbehandelten Auge konnten keine CD68-positiven Zellen detektiert werden. Nach SQ+LV hingegen war eine deutliche Induktion der Expression von CD68-positiven Zellen zu detektieren, was mit der Infiltration der Makrophagen in das innere Auge korrelierte (Abb. 18). Die Infiltration dieser Zellen konnte durch die SQ+LV mit zusätzlicher Applikation von Liposomen verstärkt und durch die SQ+LV mit zusätzlicher Applikation von Clodrolips deutlich reduziert werden (Abb. 18). Dies zeigte sich in der Zunahme der Expression für CD68 nach Liposomen-, und in der Signalabnahme nach Clodrolipsbehandlung (Abb. 18). Da Oncomodulin als Makrophagen-sezernierter Faktor postuliert wurde (Yin et al., 2006), müsste seine Expression mit der Zunahme bzw. Abnahme an Makrophagen im inneren Auge korrelieren. Sowohl nach SQ+LV, als auch nach zusätzlicher Behandlung mit Liposomen war keine Zunahme in der Expression von Oncomodulin in der Retina trotz deutlicher

Zunahme an Makrophagen zu detektieren (Abb. 18). Ebenso hatte die Depletion der Makrophagen und Mikrogliazellen im inneren Auge durch Clodrolips nach SQ+LV keinen Einfluss auf die Expression von Oncomodulin in der Retina (Abb. 18). Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass die Expression von Oncomodulin in der Retina nicht mit der Zunahme von Makrophagen im inneren Auge nach einer LV korrelierte (Abb. 18). Die quantitative *real-time* RT-PCR bestätigte die Daten der semi-quantitativen RT-PCR (Abb. 19). Oncomodulin wurde in der unbehandelten Retina nachgewiesen (Abb. 19). Die Expression von Oncomodulin wurde jedoch weder durch die SQ+LV, noch durch die zusätzliche Behandlung mit Liposomen oder Clodrolips im Vergleich zur unbehandelten Retina relativ zu GAPDH beeinflusst (Abb. 19).

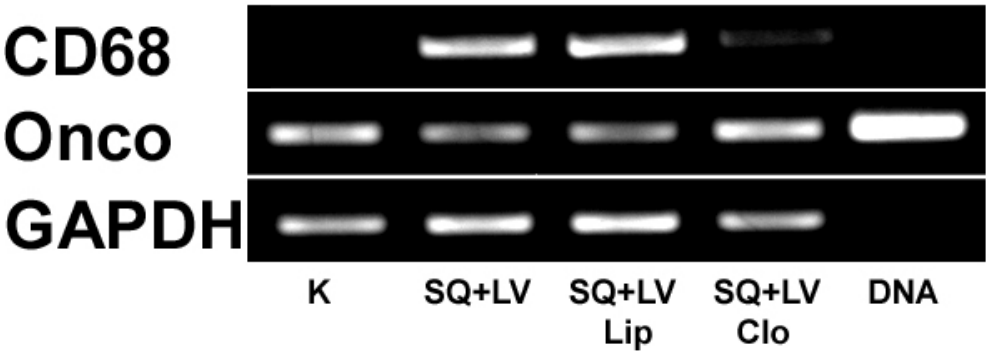


Abb. 18: RT-PCR zum Nachweis von Makrophagen/Mikrogliazellen (CD68) mRNA und Oncomodulin mRNA. Die RNA wurde aus Retinae extrahiert, bei denen 5 Tage zuvor eine SQ+LV durchgeführt wurde. Kontrollliposomen und Clodrolips wurden simultan zur SQ+LV appliziert. Die Plasmid DNA von Oncomodulin (DNA) diente als Positivkontrolle. Nach einer SQ+LV+Lip und SQ+LV+Clo war kein signifikanter Unterschied in der Oncomodulin-Expression nach 35 Zyklen im Vergleich zur unbehandelten Retina (K) und alleinigen SQ+LV zu erkennen, obwohl es nach der Behandlung mit Liposomen zu einer massiven Zunahme bzw. nach der Behandlung von Clodrolips zu einer Reduzierung von Makrophagen im inneren Auge kam. GAPDH diente als Beleg für gleiche Ausgangsmengen bei den jeweiligen Behandlungen.

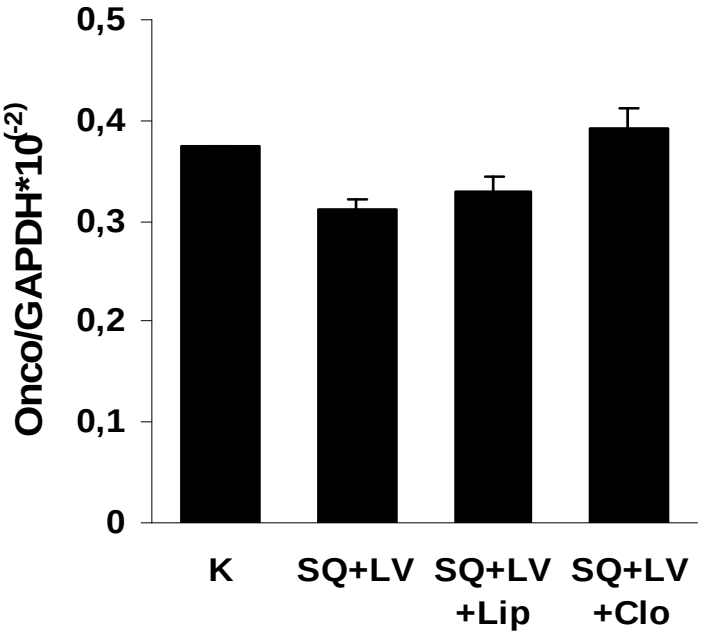


Abb. 19: Quantitative *real-time* RT-PCR zum Nachweis von Oncomodulin mRNA. Die RNA wurde 5 Tage nach SQ+LV oder SQ+LV mit zusätzlicher Behandlung von Liposomen oder Clodrolips extrahiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von Oncomodulin nach SQ+LV, SQ+LV+Lip oder SQ+LV+Clo im Vergleich zur unbehandelten Retina (K) relativ zu GAPDH detektiert werden.

Zur Validierung der Methode der quantitativen *real-time* RT-PCR wurde eine Kalibrierungskurve für Oncomodulin- und GAPDH-Primer erstellt. Die gemessenen *crossing points* (Kreuzungspunkte) für Oncomodulin und GAPDH zeigten eine enge Korrelation zu der Menge der eingesetzten RNA. Unterschiede in der Konzentration von Oncomodulin und GAPDH um das 2-fache wurden hierbei reliabel detektiert (Abb. 20).

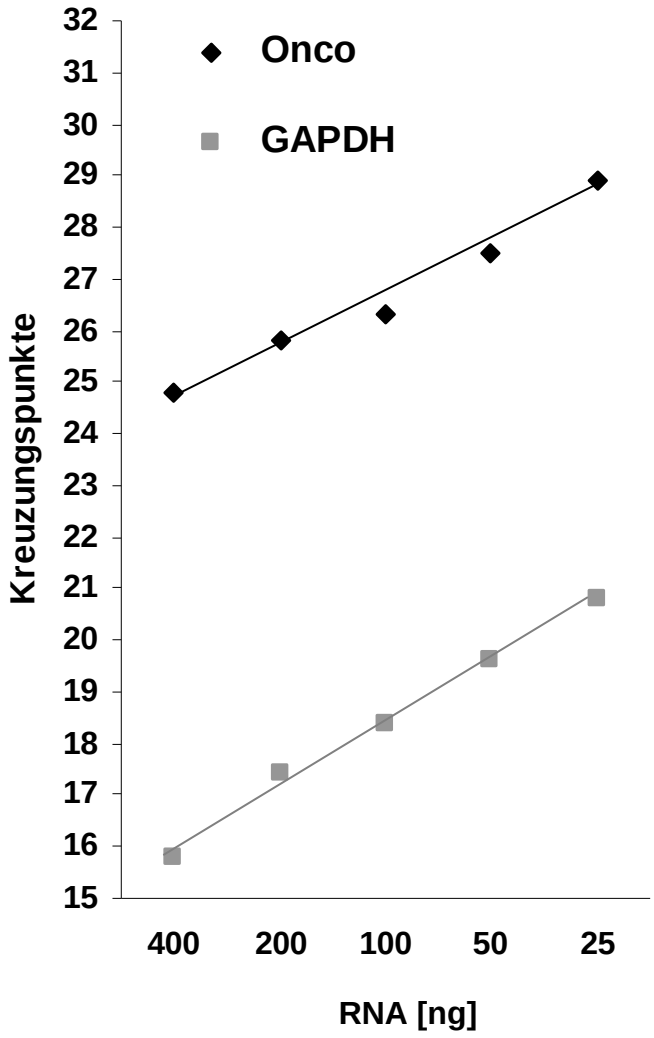


Abb. 20: Kalibrierungskurve der quantitativen *real-time* RT-PCR für Oncomodulin- und GAPDH-Primer. Die gemessenen *crossing points* (Kreuzungspunkte) für Oncomodulin und GAPDH zeigten eine enge Korrelation zu der Menge der eingesetzten RNA in Nanogramm [ng]. Unterschiede in der Konzentration von Oncomodulin und GAPDH um das 2-fache wurden hierbei reliabel detektiert.

Zusätzliche Experimente sollten bestätigen, dass die Expression von Oncomodulin nicht mit der Zunahme von aktivierten Makrophagen im inneren Auge korrelierte (Abb. 21-23). Hierfür wurde der Glaskörper als Quelle für aktivierte Makrophagen von der Retina 5 Tage nach LV, SQ+LV oder Zymosaninjektion getrennt (Abb. 21, 22). Des Weiteren wurden Makrophagen aus dem Peritoneum isoliert und ebenfalls auf Oncomodulin-Expression hin untersucht (Abb. 21-23). Die Plasmid-DNA von Oncomodulin und die mRNA aus dem Tumorgewebes der Ratte (Morris rat hepatoma 5123tc) dienten als Positivkontrollen für Oncomodulin (MacManus,

1979, 1980), die mRNA peritonealer Makrophagen diente als Positivkontrolle für CD68.

Abbildung 21 zeigte CD68-positive Zellen sowohl in der Retina, im Glaskörper, als auch in der Retina/Glaskörper-Probe nach einer LV (Abb. 21). Die peritonealen Makrophagen mRNA zeigte ebenso ein positives Signal für CD68 (Abb. 21). Oncomodulin mRNA wurde in der „Makrophagen-reichen" Retina/Glaskörper-Probe nachgewiesen, wobei jedoch keine Zunahme an Oncomodulin mRNA im Vergleich zur Retinaprobe ohne Glaskörper detektiert wurde (Abb. 21). Obwohl der Glaskörper und die PM CD68-positiv waren, wurde keine Oncomodulin mRNA in diesen Proben nachgewiesen (Abb. 21). Aus diesen Ergebnissen ließ sich die Schlussfolgerung ziehen, dass weder die das Auge infiltrierenden aktivierten Makrophagen, noch peritoneale Makrophagen für die Expression von Oncomodulin verantwortlich waren (Abb. 21).

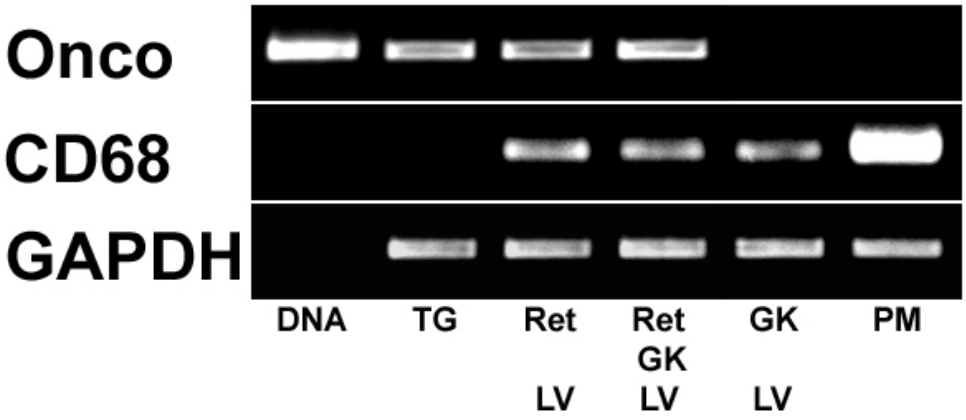


Abb. 21: RT-PCR zum Nachweis von Oncomodulin mRNA und CD68 mRNA. 5 Tage nach LV wurde der Glaskörper (GK) von der Retina (Ret) getrennt und die RNA extrahiert. Nach 30 Zyklen war ein deutliches Signal für Makrophagen (CD68) sowohl in den peritonealen Makrophagen (PM) als auch in der Retina (Ret, Ret/GK) und im GK nach LV zu detektieren. Oncomodulin RNA hingegen war weder im GK, noch in PM nachweisbar. GAPDH diente als Beleg für gleiche Ausgangsmengen bei den jeweiligen Proben.

Des Weiteren wurde die Expression von Oncomodulin nach intravitrealer Behandlung mit dem Hefezellwandextrakt Zymosan untersucht (Abb. 22). Hierfür wurde der Glaskörper von der Retina 5 Tage nach Zymosan-Behandlung getrennt und die RNA extrahiert.

Abbildung 22 zeigte zwar CD68-positive Zellen sowohl in der Glaskörper-Probe nach Zymosan-Behandlung, als auch in den PM. Oncomodulin RNA wurde jedoch in diesen Proben nicht detektiert (Abb. 22). Dieser Versuchsansatz ließ die Aussage zu, dass Oncomodulin weder in peritonealen Makrophagen (Abb. 21, 22), noch im Glaskörper nach Zymosaninjektion (Abb. 22) nachweisbar war.

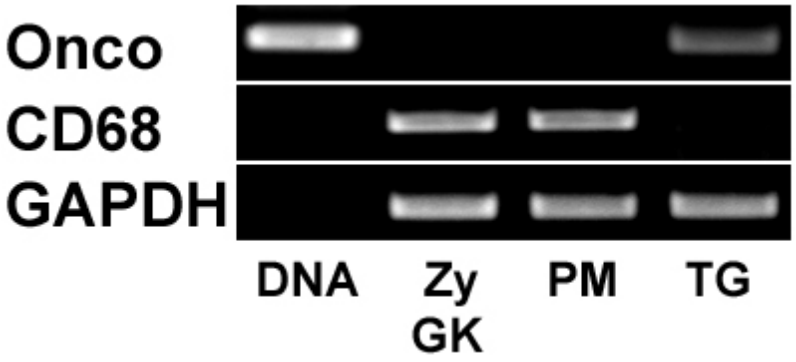


Abb. 22: RT-PCR zum Nachweis von Oncomodulin mRNA und CD68 mRNA. 5 Tage nach intravitrealer Injektion von Zymosan (Zy GK) wurde der Glaskörper von der Retina getrennt. Sowohl die peritonealen Makrophagen (PM), als auch der Glaskörper nach Zymosan-Behandlung waren CD68-positiv, jedoch war Oncomodulin in diesen Proben nicht nachweisbar. Lediglich die Oncomodulin DNA und das Tumorgewebe waren positiv für Oncomodulin. GAPDH diente als Beleg für gleiche Ausgangsmengen bei den jeweiligen Proben.

Nachdem in den semi-quantitativen RT-PCRs keine Oncomodulin RNA in peritonealen Makrophagen detektiert wurde, sollte dieser Befund anschließend immunzytochemisch verifiziert werden (Abb. 23). Hierfür wurden peritoneale Makrophagen kultiviert und mit Antikörpern gegen CD68 (ED1, 1:500) und Oncomodulin (1:200) angefärbt (Abb. 23). Abb. 23 A zeigte zwar eine Anfärbung für PM durch ED1 (Abb. 23 A). Oncomodulin hingegen wurde nicht in kultivierten ED1-positiven PM nachgewiesen (Abb. 23 B, C). Die immunzytochemische Färbung bestätigt somit die Ergebnisse der semi-quantitativen RT-PCRs (Abb. 21-23).

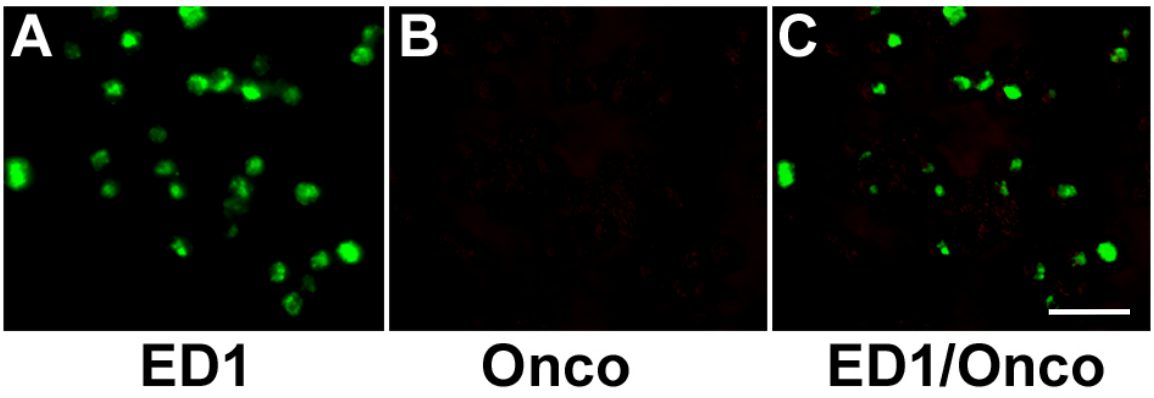


Abb. 23: Immunzytochemische Färbung von peritonealen Makrophagen durch die Antikörper gegen ED1 (1:500) und Oncomodulin (1:200). PM zeigten eine positive Anfärbung für ED1 (A). Es ist jedoch keine Färbung von Oncomodulin in PM detektierbar (B). (C) Übereinanderlagerung der Färbung für ED1 (A) und Oncomodulin (B). Maßstabsbalken: 25 µm.

Nachdem gezeigt wurde, dass aktivierte Makrophagen 5 Tage nach LV keine signifikanten Mengen an Oncomodulin exprimieren, wurde anschließend die Expression von Oncomodulin im Ziliarkörper untersucht (Abb. 24). Dieser stellt neben den Blutgefäßen in der Retina den Bereich des inneren Auges dar, durch den ein Teil der Blutmonozyten nach deren Aktivierung durch eine LV in den Glaskörper einwandern. 5 Tage nach SQ+LV wurde der Ziliarkörper von der Retina getrennt und die RNA extrahiert. Die RNA aus dem Tumorgewebe der Ratte diente hierbei als Positivkontrolle für Oncomodulin (MacManus, 1979, 1980), die RNA der peritonealen Makrophagen als Positivkontrolle für CD68 (Abb. 24, 25).

Oncomodulin RNA war in der unbehandelten Retina und im Tumorgewebe nachweisbar (Abb. 24). Der unbehandelte Ziliarkörper zeigte keine CD68-positiven Zellen (Abb. 24). Obwohl in den peritonealen Makrophagen und im Ziliarkörper nach SQ+LV CD68-positive Zellen detektiert wurden, wurde kein Nachweis für Oncomodulin RNA in dieser Probe gezeigt (Abb. 24).

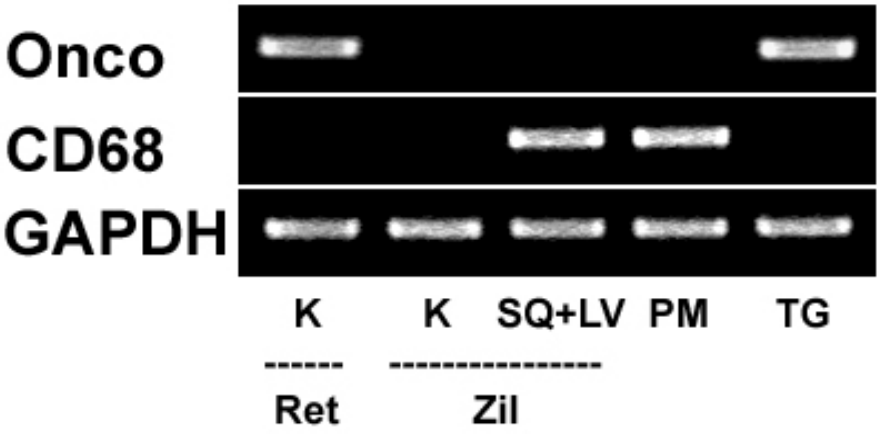


Abb. 24: RT-PCR zum Nachweis von Oncomodulin mRNA und CD68 mRNA. 5 Tage nach SQ+LV wurde der Ziliarkörper (Zil) von der Retina getrennt und die RNA extrahiert. Oncomodulin RNA war lediglich in der unbehandelten Retina (K Ret) und im Tumorgewebe (TG) nachweisbar, nicht jedoch in dem für aktivierte Makrophagen positiven Ziliarkörper (SQ+LV Zil) und in peritonealen Makrophagen (PM). Keine CD68-positiven Zellen konnten im Ziliarkörper ohne zusätzliche Behandlung (K Zil) detektiert werden. GAPDH diente als Beleg für gleiche Ausgangsmengen der jeweiligen Proben.

3.4.2 Expressionsuntersuchung von Oncomodulin im inneren Auge

Nachdem gezeigt wurde, dass die Expression von Oncomodulin nicht mit der Zunahme von aktivierten Makrophagen im Augeninneren korrelierte, wurde anschließend die Expression von Oncomodulin im inneren Auge nach SQ, LV und SQ+LV untersucht. Hierfür wurden semi-quantitative und quantitative *real-time* RT-PCRs nach den jeweiligen Behandlungen durchgeführt (Abb. 25-27). Die Plasmid-DNA von Oncomodulin und die mRNA aus dem Tumorgewebe der Ratte (Morris rat hepatoma 5123tc) dienten als Positivkontrollen für Oncomodulin (MacManus, 1979, 1980).

In der unbehandelten Retina wurde Oncomodulin RNA detektiert (Abb. 25). Weder durch die SQ, LV noch durch die SQ+LV wurde eine Erhöhung der Expression von Oncomodulin in der Retina induziert (Abb. 25). Dieses Ergebnis wurde durch die quantitative *real-time* RT-PCR bestätigt (Abb. 26). Auch hier wurde kein signifikanter Unterschied in der Expression von Oncomodulin nach einer SQ, LV oder SQ+LV im Vergleich zur unbehandelten Retina induziert (Abb. 26). Als Positivkontrolle für die quantitative *real-time* RT-PCR wurde die mRNA aus dem

Tumorgewebe (Morris rat hepatoma 5123tc) verwendet, in dem eine 8-fach höhere Menge an Oncomodulin mRNA als in der unbehandelten Kontrolle relativ zu GAPDH nachweisbar war (Abb. 26).

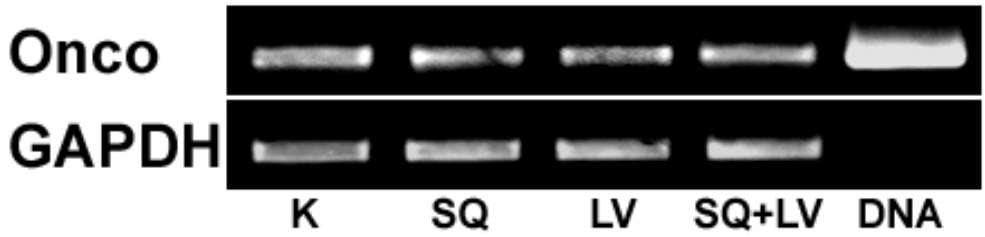


Abb. 25: RT-PCR zum Nachweis von Oncomodulin mRNA. Die RNA wurde aus einer unbehandelten Retina (K) oder aus Retinae 5 Tage nach einer SQ, LV oder SQ+LV gewonnen. Es ist keine signifikante differentielle Expression von Oncomodulin nach den jeweiligen Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle induziert worden. Die Plasmid-DNA (DNA) diente als Positivkontrolle für Oncomodulin. GAPDH diente als Beleg für gleiche Ausgangsmengen bei den jeweiligen Proben.

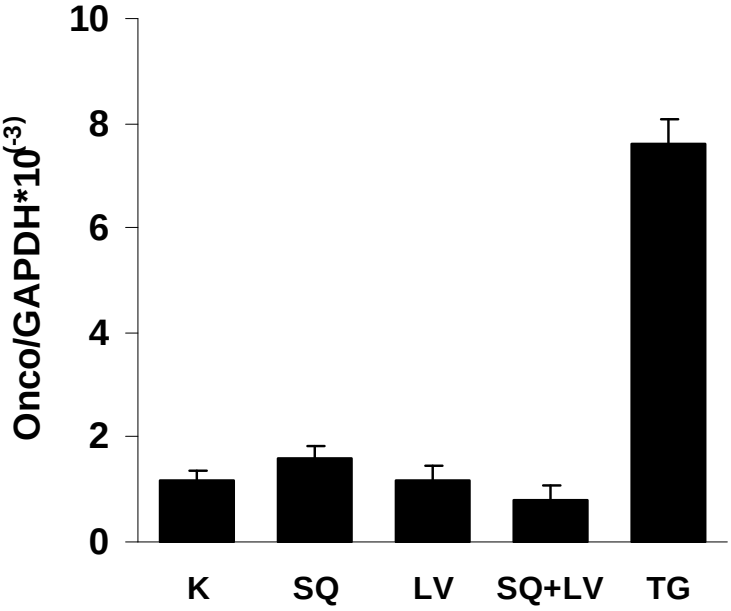


Abb. 26: Quantitative *real-time* RT-PCR zum Nachweis von Oncomodulin mRNA. Es wurde keine signifikante differentielle Expression von Oncomodulin nach einer SQ, LV oder SQ+LV im Vergleich zur unbehandelten Retina (K) detektiert. Die mRNA aus dem Tumorgewebe (TG) diente als Positivkontrolle für Oncomodulin mRNA, in dem eine 8-fach höhere Menge an mRNA als in der K relativ zu GAPDH gemessen wurde.

3.4.3 Untersuchung der Oncomodulin-Expression hinsichtlich unterschiedlicher Rattenstämme

Um Differenzen zwischen einzelnen Rattenstämmen hinsichtlich der Expression von Oncomodulin ausschließen zu können, wurden neben Sprague-Dawley Ratten ebenso Fisher Ratten untersucht (Abb. 27). Hierfür wurde die RNA 5 Tage nach SQ+LV für beide Rattenstämme isoliert (Abb. 27).

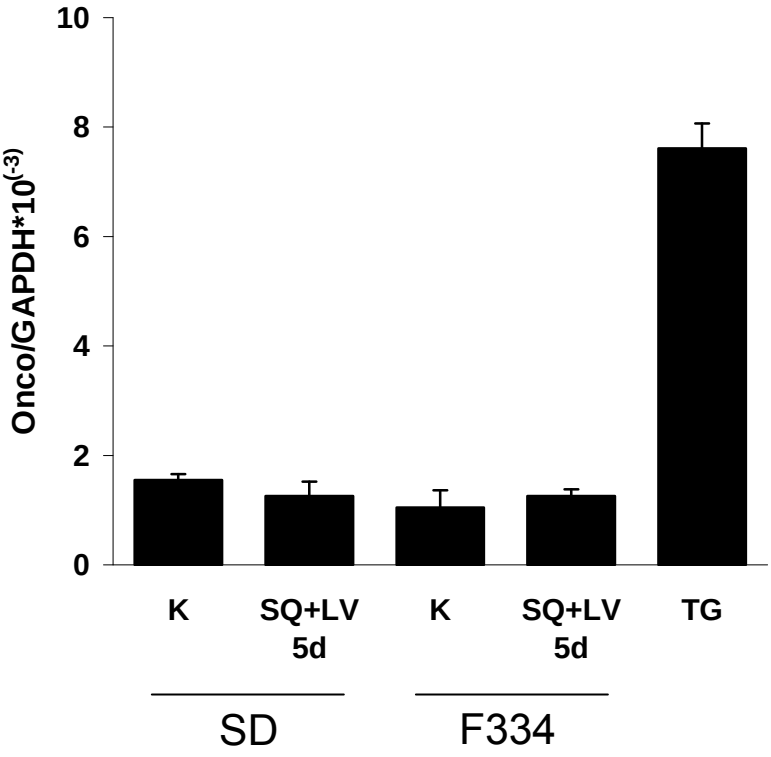


Abb. 27: Quantitative *real-time* RT-PCR zum Nachweis von Oncomodulin mRNA in der Retina von unterschiedlichen Rattenstämmen 5 Tage nach SQ+LV. Sowohl die Sprague-Dawley Ratten (SD), als auch die Fisher Ratten (F334) erhielten eine SQ+LV. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Expression von Oncomodulin nach SQ+LV in SD und F334 relativ zu GAPDH detektiert. Die RNA aus dem Tumorgewebe der Ratte (TG) diente als Positivkontrolle für Oncomodulin.

Die quantitative *real-time* RT-PCR zeigte keine differentielle Expression von Oncomodulin in beiden Rattenstämmen 5 Tage nach SQ+LV, weshalb davon ausgegangen wurde, dass die Expression von Oncomodulin in der Retina nicht abhängig ist von unterschiedlichen Rattenstämmen (Abb. 27).

3.4.4 Untersuchung der Oncomodulin-Expression hinsichtlich unterschiedlicher Zeitpunkte

Nachdem gezeigt wurde, dass die Expression von Oncomodulin in der Retina 5 Tage nach LV, SQ+LV bzw. Zymosaninjektion im Vergleich zur unbehandelten Retina nicht erhöht wird, sollten anschließend die Zeitpunkte 1, 2, 5 und 7 Tage nach SQ+LV bzw. 1, 2 und 5 Tage nach SQ mit zusätzlicher intravitrealer Injektion von Zymosan mittels quantitativer *real-time* RT-PCR untersucht werden. Die mRNA aus dem Tumorgewebe der Ratte (Morris rat hepatoma 5123tc) diente als Positivkontrolle für Oncomodulin (MacManus, 1979, 1980).

In der quantitativen *real-time* RT-PCR wurde für Oncomodulin im Tumorgewebe eine 8-fach höhere Menge an Oncomodulin mRNA als in der unbehandelten Kontrolle relativ zu GAPDH detektiert (Abb. 30). Die Menge an Oncomodulin RNA konnte jedoch nicht durch die jeweiligen Behandlungen und Zeitpunkte erhöht werden (Abb. 28). Dieses Resultat führte zur Schlussfolgerung, dass die Expression von Oncomodulin in der Retina weder durch die SQ+LV bzw. SQ mit zusätzlicher Zymosan-Behandlung, noch durch unterschiedliche Zeitpunkte beeinflusst wurde (Abb. 28).

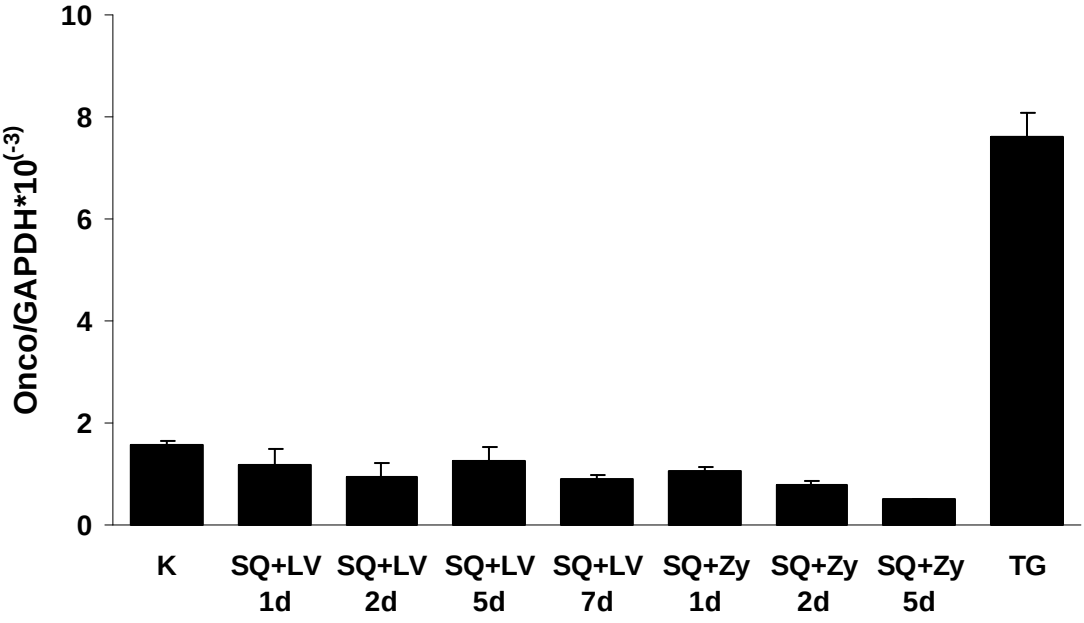


Abb. 28: Quantitative *real-time* RT-PCR zum Nachweis von Oncomodulin mRNA. Die RNA wurde aus den Retinae 1, 2, 5 oder 7 Tage nach SQ+LV oder SQ mit zusätzlicher Zymosan-Behandlung (SQ+ZY) extrahiert**.** Es wurde keine Expressionserhöhung von

Oncomodulin zu den unterschiedlichen Zeitpunkten im Vergleich zur unbehandelten Retina (K) relativ zu GAPDH induziert. Die mRNA aus dem Tumorgewebe (TG) diente als Positivkontrolle für Oncomodulin.

3.5 Untersuchung der neuritogenen Effekte von IL-6

3.5.1 Untersuchung der Expression von IL-6 in der Retina

In unserer Arbeitsgruppe wurde kürzlich gezeigt, dass die LV oder Zymosan-Behandlung die Expression von CNTF in retinalen Astrozyten Makrophagen-unabhängig induziert und der Transkriptionsfaktor Stat3 in RGZ aktiviert wird (Müller et al., 2007). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Blockierung der Aktivierung von Stat3 durch die intravitreale Applikation des JAK-2 Inhibitors AG490 nach einer LV zu einer Reduzierung der positiven Effekte der LV führte (Müller et al., 2007). Müller et al. (2007) postulierten daher, dass dem JAK/Stat3 Signalweg eine entscheidende Rolle an den regenerationsfördernden Effekten der LV zu kommt. Der JAK/Stat3 Signalweg kann durch zahlreiche Faktoren aktiviert werden. Neben CNTF aktivieren unter anderem IL-6 und LIF diesen Signalweg (Kishimoto, 2006; Hirano et al., 2000; Rabe et al., 2007; Hibi et al., 1990). Daher wurde anschließend mittels semi-quantitativer RT-PCR überprüft, ob die LV neben CNTF auch die Expression von IL-6 und LIF in der Retina induziert (Abb. 29, 30). Zur Klärung dieser Frage erhielten die Tiere keine Behandlung, eine SQ, eine alleinige LV oder eine SQ+LV (Abb. 29).

In der semi-quantitativen RT-PCR wurde CNTF und IL-6 RNA in der Retina des unbehandelten Auges nachgewiesen (Abb. 29). Die alleinige SQ induzierte im Vergleich zur K die Expression von CNTF und IL-6 in der Retina. Diese Expressionserhöhung beider Faktoren wurde durch die LV und SQ+LV zusätzlich gesteigert (Abb. 29). LIF RNA wurde zwar in der Retina des unbehandelten Auges nachgewiesen, jedoch wurde im Gegensatz zu CNTF und IL-6 keine signifikante differentielle Expression nach den jeweiligen Behandlungen detektiert (Abb. 29). Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass LIF kein entscheidender Regulator der LV-induzierten Effekte ist. Im Weiteren sollte IL-6 auf seine neuroprotektiven und regenerationsfördernden Effekte *in vitro* und *in vivo* hin untersucht werden.

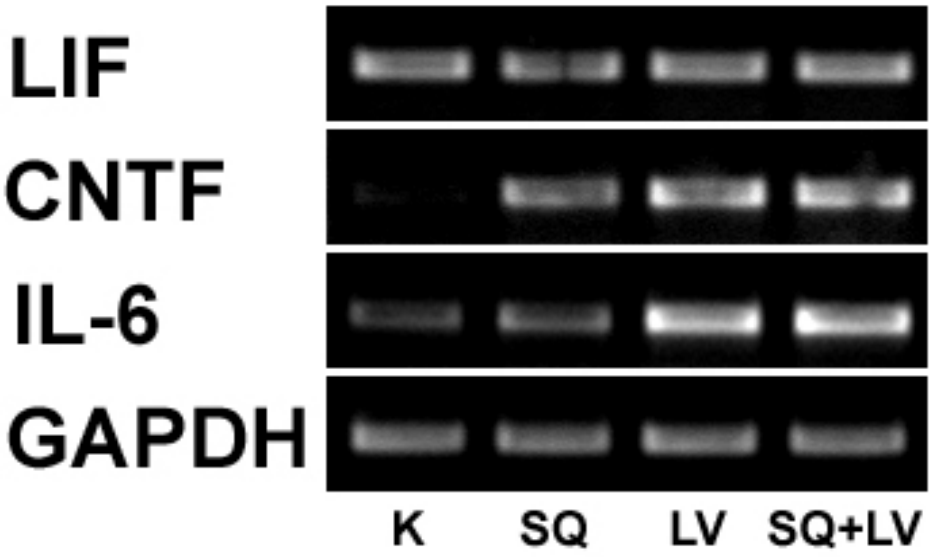


Abb. 29: RT-PCR zum Nachweis von LIF, CNTF und IL-6 RNA in der Retina. 5 Tage nach SQ, LV oder SQ+LV wurde die RNA aus den Retinae extrahiert. LIF RNA war in der unbehandelten Retina und ohne differentielle Expression nach SQ, LV oder SQ+LV nachweisbar. Die Expression von CNTF und IL-6 hingegen wurde durch die SQ induziert. Diese Expressionserhöhung beider Faktoren wurde durch die LV oder SQ+LV zusätzlich gesteigert. GAPDH diente als Beleg für gleiche Ausgangsmengen bei den jeweiligen Proben.

3.5.2 Einfluss von IL-6 auf dissoziierte RGZ

Um zu überprüfen, ob IL-6 als neuritogener Faktor für adulte RGZ fungiert, sollten seine Effekte in dissoziierten Retinakulturen untersucht werden (Abb. 30, 31). BSA wurde hierbei als Negativkontrolle verwendet. Rekombinantes CNTF diente als Positivkontrolle, da seine regenerationsfördernden Effekte in diesem Modell aus der Literatur bekannt sind (Müller et al., 2007). Die Summe der axonalen Länge pro Zellkulturschale wurde durch die Anzahl der überlebenden RGZ pro Zellkulturschale geteilt, um die durchschnittliche Axonlänge der regenerierenden RGZ zu erhalten (Abb. 31).

Drei Tage nach der jeweiligen Behandlung in Kultur wurden RGZ mit dem Antikörper gegen ßIII-Tubulin detektiert (Abb. 30 A-C). Die RGZ der BSA-Kontrolle zeigten eine schwache axonale Regeneration (Abb. 30 A), wohingegen rIL-6 und rCNTF ein stärkeres axonales Auswachsen von RGZ induzierten (Abb. 30 B, C,

31). Nach rIL-6- und rCNTF-Behandlung wurden hierbei im Durchschnitt mehr als doppelt so lange regenerierende RGZ-Axone im Vergleich zur BSA-Behandlung quantifiziert (Abb. 31). Die Ergebnisse ließen die Schlussfolgerung zu, dass sowohl IL-6, als auch CNTF als potenter neuritogener Faktor für RGZ *in vitro* fungiert.

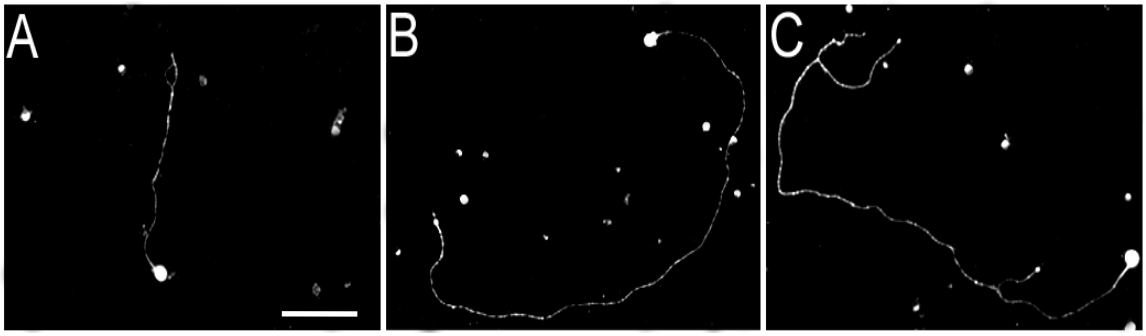
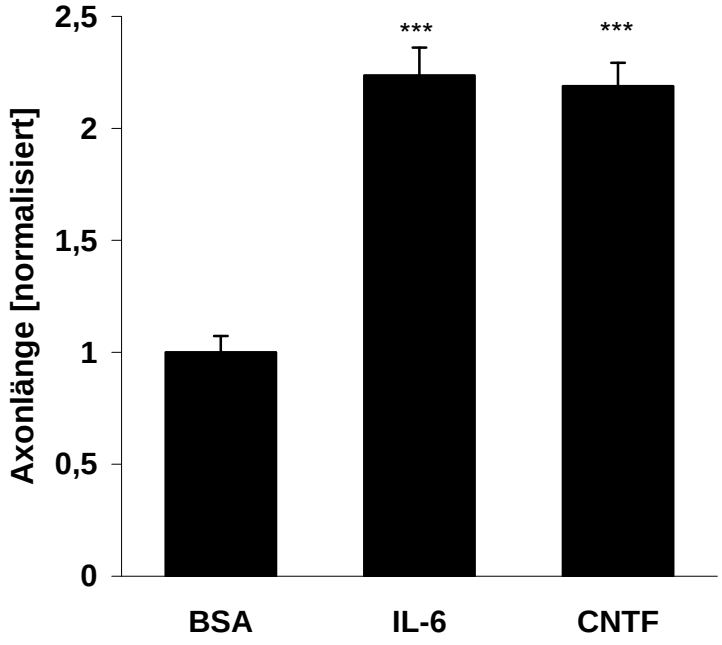


Abb. 30: Immunzytochemische Färbung von dissoziierten RGZ mit dem Antikörper gegen ßIII-Tubulin 3 Tage nach der jeweiligen Behandlung in Kultur. BSA (A), rekombinantes IL-6 (B) und rekombinantes CNTF (C) wurden in einer Konzentration von 200 ng/ ml verwendet. Die axonale Länge und das Überleben der RGZ wurden nach Anfärbung mit dem Antikörper gegen ßIII-Tubulin quantifiziert (Abb. 30 A-C, 31). Maßstabsbalken: 50 µm.



Behandlung/Axonlänge	MW	SF
BSA (normalisiert)	1	0,1
rIL-6	2,2	0,1
rCNTF	2,1	0,1

Abb. 31: Quantifizierung der Länge regenerierender ßIII-Tubulin-positiver Axone pro überlebender RGZ 3 Tage nach den jeweiligen Behandlungen in Kultur. Für BSA, rekombinantes IL-6 (rIL-6) und rekombinantes CNTF (rCNTF) wurden 200 ng/ ml eingesetzt. Nach rIL-6- und rCNTF-Behandlung wurden hierbei im Durchschnitt mehr als doppelt so lange regenerierende RGZ-Axone im Vergleich zur BSA-Behandlung quantifiziert. MW gibt den Mittelwert der Axonlänge, SF den Standardfehler an. Jeder Versuchsansatz wurde 4-fach angesetzt und mit n = 3 Tiere für die jeweiligen Gruppen ausgewertet (insgesamt 12 Werte). Die Daten sind normalisiert gegenüber der mit BSA behandelten Gruppe dargestellt. Effekte der jeweiligen Behandlung auf die Axonlänge im Vergleich zur BSA-Behandlung *** $p<0,001$.

3.5.3 Einfluss von IL-6 auf die axonale Regeneration *in vivo*

Als nächstes sollte der Beitrag von IL-6 auf die axonale Regeneration *in vivo* getestet werden (Abb. 32, 33). Zur Beantwortung dieser Frage erhielten Sprague-Dawley Ratten eine SQ, eine SQ+LV oder simultan zur SQ eine intravitreale Injektion von rIL-6. Die intravitreale Injektion von rIL-6 wurde an Tag 3 nach SQ wiederholt (SQ+rIL-6 I). Beim zweiten Applikationsschema wurde rIL-6 3 und 7 Tage nach SQ intravitreal injiziert (SQ+rIL-6 II). Nach 14 Tagen wurden vom Sehnerv Kryostatschnitte präpariert, die mit dem Antikörper gegen Gap43 zur Visualisierung regenerierender Axone bzw. mit dem Antikörper gegen ßIII-Tubulin zur Bestimmung des Überlebens der RGZ angefärbt wurden. Es wurden die Gap43-positiven Axone der gefärbten Schnitte quantifiziert, die 0,5 und 1 mm über die Läsionsstelle hinweg in den distalen Teil des Sehnervens regeneriert waren (Abb. 32, 33).

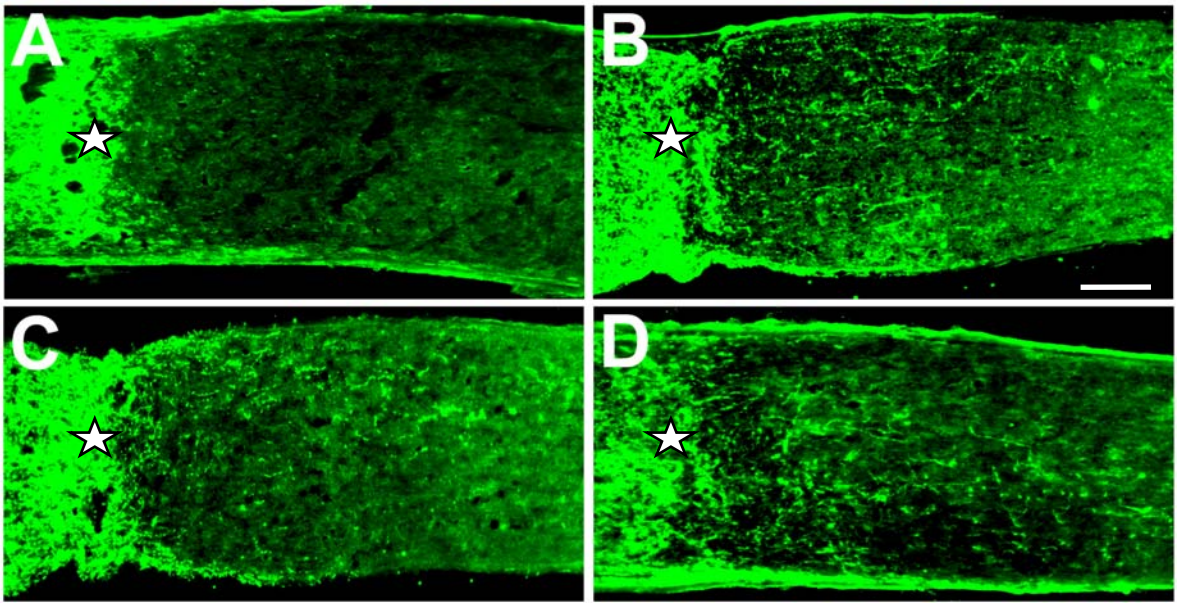
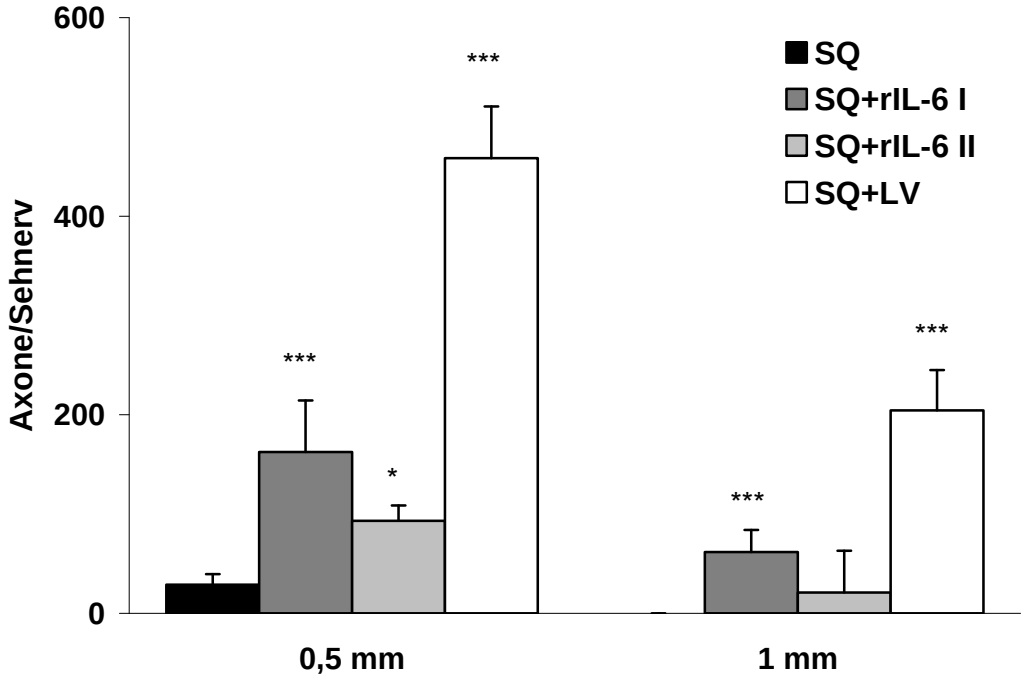


Abb. 32: Abb. 32 A-D zeigt die immunhistochemische Färbung von regenerierenden Axonen durch einen Antikörper gegen Gap43 14 Tage nach den unterschiedlichen Vorbehandlungen *in vivo*. Die Sehnervquetschung (SQ) zeigte kaum regenerierende Axone (A). Die SQ mit zusätzlicher Linsenverletzung (SQ+LV) hingegen zeigte eine deutliche Regeneration von Gap43-positiven Axonen in den distalen Teil eines zuvor gequetschten Sehnerven (D). Die SQ mit simultaner intravitrealer Applikation von rIL-6 bzw. 3 Tage nach SQ (SQ+rIL-6 I) führte zu einer Erhöhung der Anzahl regenerierender Axone (B) im Vergleich zur Injektion an Tag 3 und 7 nach SQ (SQ+rIL-6 II; C) bzw. zur alleinigen SQ (A). Zur Quantifizierung der Gap43-positiven Axone wurden n ≥ 6 Tiere für die jeweiligen Gruppen verwendet. Der Stern markiert die Läsionsstelle. Maßstabsbalken: 100 µm.

Nach einer SQ wurde eine geringe Anzahl von Gap43-positiven Axonen im distalen Teil des Sehnerven quantifiziert (Abb. 32 A, 33). Die SQ+LV hingegen zeigte einen deutlichen Anstieg von regenerierenden Axonen im Vergleich zur alleinigen SQ (Abb. 32 D, 33). Die SQ+rIL-6 I zeigte ebenfalls eine erhöhte Anzahl an regenerierenden Axonen (Abb. 32 B, 33) im Vergleich zur alleinigen SQ. Es wurden durchschnittlich 162 Axone im distalen Teil des Sehnerven bei dem Messpunkt 0,5 mm pro Schnitt durch den Sehnerven quantifiziert (Abb. 33). Interessanterweise zeigte die SQ mit zusätzlicher intravitrealer Injektion von rIL-6 an Tag 3 und 7 zwar ebenso eine gesteigerte Anzahl von Gap43-positiven Axonen (Abb. 32 C), jedoch im Vergleich zum ersten Applikationsschema für rIL-6 eine

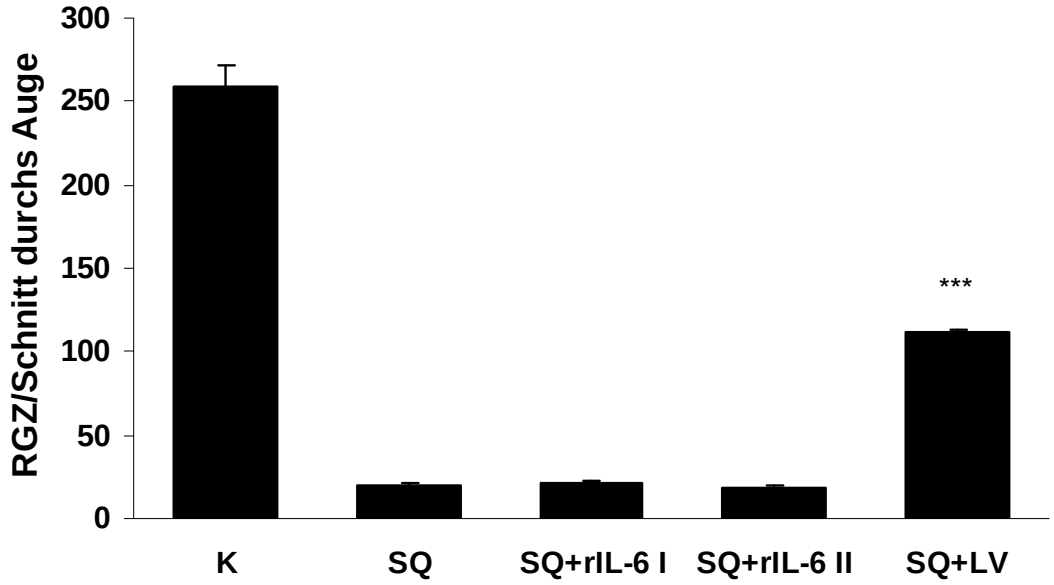
Reduzierung der Anzahl an Gap43-positiven Axonen (Abb. 32 C, 33). Es wurden für den Messpunkt 0,5 mm 93 Axone im distalen Teil des Sehnerven pro Schnitt durch den Sehnerven quantifiziert (Abb. 33). Dieses Ergebnis ließ die Schlussfolgerung zu, dass intravitreal appliziertes rIL-6 zu einer Steigerung der axonalen Regeneration *in vivo* im Vergleich zur alleinigen SQ führte (Abb. 32, 33).



Applikation/	SQ		SQ+IL-6 I		SQ+IL-6 II		SQ+LV	
Messpunkte	MW	SF	MW	SF	MW	SF	MW	SF
0,5 mm	28,8	10,5	162,4	51,9	93,2	15,4	458,4	52,1
1 mm	0	0	61,6	22,2	20,9	41,9	204,4	40,5

Abb. 33: Quantifizierung der regenerierenden RGZ-Axone 14 Tage nach Sehnervquetschung (SQ), SQ mit simultaner intravitrealer Injektion von rIL-6 und Nachinjektion an Tag 3 (SQ+rIL-6 I), SQ mit zusätzlicher intravitrealer Injektion von rIL-6 an Tag 3 und 7 (SQ+rIL-6 II) oder SQ mit zusätzlicher Linsenverletzung (SQ+LV). Die regenerierenden Axone wurden mit Gap43 angefärbt und an den Messpunkten 0,5 bzw. 1 mm distal der Läsionsstelle quantifiziert. MW gibt den Mittelwert der quantifizierten Axone, SF den Standardfehler an. Zur Quantifizierung der Gap43-positiven Axone wurden n ≥ 6 Tiere für die jeweiligen Gruppen verwendet. Effekte der jeweiligen Behandlung auf die Anzahl regenerierender Gap43-positiver Axone über die jeweilige Regenerationsstrecke in den Sehnerv: ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,1 im Vergleich zur SQ.

Um rIL-6 auf neuroprotektives Potential hin zu testen, wurden Kryostatschnitte der Retina mit dem Antikörper gegen ßIII-Tubulin als Marker für RGZ gefärbt und die durchschnittliche Anzahl an RGZ pro Schnitt quantifiziert (Abb. 34). In der unbehandelten Retina wurden im Durchschnitt 258 RGZ pro Schnitt durch das Auge quantifiziert (Abb. 34). 14 Tage nach SQ degenerierten eine Vielzahl an RGZ, so dass im Durchschnitt lediglich 20 RGZ pro Schnitt durch das Auge detektiert wurden (Abb. 34). Die Anzahl an überlebenden RGZ wurde jedoch durch die LV auf durchschnittlich 111 RGZ pro Schnitt durch das Auge erhöht (Abb. 34). Im Vergleich dazu zeigten beide Applikationsschemata der intravitrealen Applikation von rIL-6 keinen signifikanten Unterschiede in der Anzahl überlebender RGZ im Vergleich zur alleinigen SQ (Abb. 34). Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass intravitreal appliziertes rIL-6 zu keinen neuroprotektiven Effekten auf RGZ *in vivo* im Vergleich zur alleinigen SQ führte (Abb. 34).



RGZ/Behandlung	K	SQ	SQ+rIL-6 I	SQ+rIL-6 II	SQ+LV
MW	258,9	20,1	21,6	18,3	111,3
SF	13,2	1,1	1,6	2,1	1,3

Abb. 34: Quantifizierung der ßIII-Tubulin-positiven RGZ 14 Tage nach Sehnervquetschung (SQ), SQ mit zusätzlicher Linsenverletzung (SQ+LV) oder SQ mit simultaner intravitrealer Injektion von rIL-6 und Nachinjektion an Tag 3 (SQ+rIL-6 I) bzw.

SQ mit intravitrealer Injektion von rIL-6 an Tag 3 und 7 (SQ+rIL-6 II). In der unbehandelten Retina wurden im Durchschnitt 258 RGZ pro Schnitt durch das Auge quantifiziert. Keines der beiden Applikationsschemata für rIL-6 konnte eine Erhöhung der Anzahl an überlebenden RGZ im Vergleich zur alleinigen SQ induzieren. Nach LV wurden ~40% der Ausgangspopulation an RGZ in der Retina quantifiziert. Zur Quantifizierung der ßIII-Tubulin-positiven RGZ wurden n ≥ 6 Tiere für die jeweiligen Gruppen verwendet. Effekte der jeweiligen Behandlung auf die Anzahl an überlebenden RGZ im Vergleich zur SQ ***p<0,001.

4 Diskussion

Zahlreiche Studien sind unternommen worden, um den axotomiebedingten Degenerationsprozess von RGZ zu unterbinden und axonales Wachstum zu stimulieren (Cui and So, 2004; Bähr, 2000; Harvey et al., 2006; Isenmann et al., 2003; Domeniconi and Filbin, 2005; Mey and Thanos, 1993; Koeberle and Ball, 2002; Aguayo et al., 1996; Pernet and Di Polo, 2006). Fischer et al. (2000) und Leon et al. (2000) sind es gelungen, den axotomiebedingten Degenerationsprozess von RGZ durch eine LV zu verlangsamen und die adulten Nervenzellen in einen aktiven Regenerationszustand zu versetzen. In diesem Zustand zeigen RGZ eine um das 2,3 fach erhöhte axonale Wachstumsrate in Kultur, können *in vivo* bis zu 40% ihrer Axone in einen an den Sehnervstumpf angenähtes peripheres Nerventransplantat und sogar Axone in den zuvor gequetschten Sehnerven regenerieren lassen (Fischer et al., 2000, 2001; 2004b; Leon et al., 2000). Da sich die Effekte einer LV durch eine intravitreale Injektion des proinflammatorisch wirkenden Hefezellwandextrakts Zymosan immitieren ließen, nahm man an, dass die neuroprotektiven und regenerationsfördernden Effekte einer LV durch eine starke Infiltration und Akkumulation von aktivierten Makrophagen im inneren Auge mediiert sein müssten. Diese Hypothese wurde dadurch bestärkt, dass dissoziierte RGZ, die in Gegenwart von Makrophagen-Zelllinien-konditioniertem Medium kultiviert wurden, ein stärkeres axonales Auswachsen zeigten als entsprechende Kontrollen (Yin et al., 2003). Das kalziumbindende Protein Oncomodulin wurde in diesem Zusammenhang als Hauptfaktor der regenerationsfördernden Effekte des Makrophagen-Zelllinien-konditionierten Mediums identifiziert (Yin et al., 2006). Diese allgemein akzeptierte Makrophagen/Oncomodulin-Hypothese beruht demnach lediglich auf der beobachteten Korrelation zwischen einwandernden Makrophagen *in vivo* und den positiven Effekten einer LV bzw. Zymosan-Injektion sowie einem aus einer Makrophagen-Zelllinie stammenden Faktor mit neuritogenen Effekten auf dissoziierte RGZ in Kultur. Ein direkter Beweis für einen essentiellen Beitrag von Makrophagen oder Oncomodulin wie er zum Beispiel durch ein *loss of function* Experiment hätte erreicht werden können, wurde nicht gezeigt.

Auf der Grundlage der im Ergebnisteil erhobenen Daten soll der Beitrag von Makrophagen an den neuroprotektiven und regenerationsfördernden Effekten der LV diskutiert werden.

4.1 Die Makrophagendepletion im inneren Auge

Um den Beitrag von Makrophagen hinsichtlich der neuroprotektiven und regenerationsfördernden Effekte einer LV zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode zur Depletion bzw. Reduzierung von aktivierten Makrophagen und Mikrogliazellen im inneren Auge (Retina, Glaskörper, Linse) etabliert. Die Reduzierung dieser durch Zymosan- oder eine LV aktivierten Zellen im Augeninneren wurde hierbei durch die intravitreale oder intraperitoneale Applikation von clodronathaltigen Liposomen (Clodrolips) erreicht. Der Wirkmechanismus von Clodronat beruht laut van Rooijen und Sanders (1997) darauf, dass Clodrolips von Makrophagen phagozytiert werden und Apoptose in diesen Zellen induzieren (Van Rooijen and Sanders, 1997; Schmidt-Weber et al., 1996).

Die intravitreale Applikation von Clodrolips zeigte sich gegenüber der intraperitonealen Applikation als effektivere Methode zur Reduzierung von aktivierten Makrophagen im inneren Auge. Die SQ + LV mit zusätzlicher intravitrealer Applikation von Clodrolips führte 5 Tage nach der Behandlung zu einer Reduzierung auf über 97% der ED1-positiven Zellen im inneren Auge. Die Anzahl der ED1-positiven Zellen blieb auch 14 Tage nach Clodrolipsbehandlung im Vergleich zur SQ+LV mit intravitrealer Injektion von PBS reduziert (Abb. 16). Huang et al. (2007) und Cen et al. (2007) beobachteten ebenfalls eine Reduzierung von Makrophagen in der Retina nach intravitrealer Applikation von clodronathaltigen Liposomen (Huang et al., 2007; Chen et al., 2007). Die intraperitoneale Applikation von Clodrolips hingegen führte lediglich zu einer Reduzierung der intraokularen Makrophagen um 64% (Abb. 6). Die Verwendung von intraperitoneal applizierten Clodrolips als Methode zur Depletion von Makrophagen steht damit im Einklang mit früheren Studien zur systemischen Makrophagendepletion (Van Rooijen and Sanders, 1997; Saunders et al., 2004; Biewenga et al., 1995). Hierbei wurde gezeigt, dass die wiederholte

intraperitoneale Injektion von Clodrolips 80-90% der Makrophagen im Peritoneum und Omentum depletierte (Biewenga et al., 1995). Ebenso beobachteten Checchin et al. (2006) eine Reduzierung der Makrophagen um etwa 70% nach intraperitonealer Applikation (Checchin et al., 2006).

Zusätzlich zur Reduzierung der aktivierten Makrophagen im inneren Auge durch Clodrolips wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass die SQ+LV mit simultaner intravitrealer Clodrolipsinjektion ebenso zu einer Depletion von Mikrogliazellen in der Retina führte (97%). Die Anzahl der Mikrogliazellen im inneren Auge war jedoch durch die intraperitoneale Applikation nicht betroffen (Abb. 6). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass systemisch applizierte Liposomen die Blut/Retina-Schranke nicht überwinden können und somit deren Effekte auf Makrophagen außerhalb des ZNS beschränkt bleibt (Checchin et al., 2006). So beobachteten Checchin et al. (2006) in Übereinstimmung mit den hier erhaltenen Daten eine Reduzierung der Mikrogliazellen in der Retina lediglich nach intravitrealer Applikation von clodronathaltigen Liposomen (Checchin et al., 2006).

Einfluss von Clodrolips auf andere retinale Zellen

Es ist in der Literatur gut dokumentiert, dass eine LV neben der Aktivierung von Makrophagen auch mit einer Aktivierung von retinalen Astrozyten und Müllerzellen assoziiert ist. Dies manifestiert sich an einer Expressionerhöhung von GFAP in diesen Zellen (Pernet and Di Polo, 2006; Leon et al., 2000; Lorber et al., 2002). Obwohl durch eine intravitreale Applikation von Clodrolips die Anzahl von Makrophagen und Mikrogliazellen dramatisch reduziert wurde, hatte dies offensichtlich keinen Einfluss auf die gliale Reaktion nach einer LV (Abb. 7, 9, 11).

Ebenso wurde untersucht, ob die Anwesenheit von aktivierten Makrophagen für den Übergang von RGZ in den regenerativen Zustand nach einer LV entscheidend ist. Gap43 ist ein charakteristischer und etablierter Marker für wachstumsassoziierte Prozesse (Benowitz et al., 1990; Benowitz and Routtenberg, 1997), dessen Expression in RGZ nach SQ und zusätzlich nach SQ+LV erhöht wird (Fischer et al., 2004; Leon et al., 2000; Benowitz and Yin, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die SQ+LV mit zusätzlicher

Clodrolipsinjektion zwar die Anzahl der Makrophagen und Mikrogliazellen im inneren Auge reduzierte, die Expression von Gap43 in der Retina im Vergleich zur alleinigen SQ+LV jedoch nicht beeinflusste (Abb. 8, 10, 11). Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Anzahl von Makrophagen und Mikrogliazellen im inneren Auge offensichtlich nicht für den Übergang von RGZ in den regenerativen Zustand nach einer LV entscheidend ist. Des Weiteren unterstreichen diese Befunde die Spezifität der clodronathaltigen Liposomen auf phagozytierende Zellen im Auge.

4.2 Einfluss von Makrophagen auf das Überleben von axotomierten RGZ

Der axotomiebedingte Degenerationsprozess von RGZ wird durch die Applikation von neurotroph wirkenden Faktoren wie z.B. dem BDNF, CNTF und dem NGF signifikant verlangsamt (Mey and Thanos, 1993; Pernet and Di Polo, 2006; Bähr, 2000; Harvey et al., 2006; Isenmann et al., 2003; Mey and Thanos, 1993; Koeberle and Ball, 2002; Aguayo et al., 1996). Wesentlich stärkere Effekte werden jedoch nach der Induktion einer LV berichtet (Fischer et al., 2000, 2001), die angeblich durch eine Infiltration aktivierter Makrophagen ins innere Auge mediiert werden sollen (Leon et al., 2000; Yin et al., 2003, 2006).

Basierend auf den Befunden dieser Arbeit zeigte sich, dass die Reduzierung von aktivierten Makrophagen und Mikrogliazellen in der Retina die neuroprotektiven Effekte einer LV nicht signifikant beeinflusste. In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten führte die SQ+LV hierbei zu 38% mehr RGZ im Vergleich zur alleinigen SQ (Fischer et al., 2000). Nach SQ+LV mit zusätzlicher Clodrolipsbehandlung wurden 42% mehr RGZ als nach SQ quantifiziert (Abb. 13). Dieses Resultat wurde durch die Quantifizierung der axotomierten RGZ 14 Tage nach SQ+LV mit zusätzlicher Injektion von PBS, Liposomen bzw. Clodrolips *in vivo* bestätigt (Abb. 17). Hierbei wurde kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der überlebenden RGZ zwischen den jeweiligen Behandlungen quantifiziert (Abb. 17), obwohl die Anzahl der ED1-positiven Makrophagen und Mikrogliazellen 14 Tage nach Clodrolipsbehandlung in der Retina im Vergleich zur Liposomen- bzw. PBS-Behandlung signifikant reduziert war (Abb. 16). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Makrophagen nicht die Hauptmediatoren der neuroprotektiven Effekte

sind und diese Effekte im Wesentlichen durch alternative Mechanismen mediiert werden müssen.

4.3 Einfluss von Makrophagen auf die axonale Regeneration

In der Literatur wird der Einfluss von Makrophagen hinsichtlich axonaler Regenerationsprozesse kontrovers diskutiert (Leon et al., 2000; Yin et al., 2003, 2006; Lazarov-Spiegler et al., 1998). Lazarov-Spiegler et al. (1998) zeigten, dass die Transplantation von Makrophagen an einen durchtrennten Sehnerven eine axonale Regeneration induzierte, wenn die phagozytotische Aktivität dieser Makrophagen durch Preinkubation mit peripheren Nervensegmenten stimuliert wurde. Des Weiteren wurde beobachtet, dass dissoziierte RGZ, die in Gegenwart von Makrophagen-Zellllinien-konditioniertem Medium kultiviert wurden, ein stärkeres axonales Auswachsen als entsprechende Kontrollen zeigten (Yin et al., 2003). Ebenso wurde eine verbesserte axonale Regeneration von verletzten RGZ-Axonen in den distalen Teil eines zuvor gequetschten Sehnerven *in vivo* durch eine gleichzeitige Behandlung von Makrophagen-sezerniertem Oncomodulin mit *cAMP* erreicht (Yin et al., 2006). Im Gegensatz dazu wurde in Fischer et al. (2008) gezeigt, dass Krystalline der ß/γ-Superfamilie die axonale Regeneration von verletzten RGZ-Axonen in Explantaten Makrophagen-unabhängig fördern (Fischer et al., 2008). Ebenso zeigte Lorber et al. (2002) ein gesteigertes Neuritenwachstum *in vitro*, wenn dissoziierte RGZ von unbehandelten Tieren mit punktierten Augenlinsen ko-kultiviert werden (Lorber et al., 2002, 2008). Leon et al. (2000) beobachteten, dass nach intravitrealer Applikation von aktivierten Makrophagen weder eine Hochregulation von Gap43 in der Retina, noch eine verbesserte axonale Regeneration *in vivo* induziert wurde (Leon et al., 2000). Diese Daten sprechen demnach dafür, dass Makrophagen nicht für die Effekte der LV auf axotomierte RGZ verantwortlich sein können. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten untermauern diese Hypothese, denn die Makrophagendepletion hob die positiven Effekte einer LV *in vivo* nicht auf. Die SQ+LV mit zusätzlicher intravitrealer Injektion von Clodrolips führte hierbei sogar trotz signifikanter Reduzierung von Makrophagen im Augeninneren zu einer verbesserten Regeneration in den Sehnerven im Vergleich zur SQ+LV mit Liposomen- bzw. PBS-Behandlung (Abb. 15). Mögliche Erklärungsansätze für diesen Befund

könnten darin begründet sein, dass die Anzahl von aktivierten Makrophagen, der Zeitpunkt der Aktivierung und lokale Konzentrationen von sezernierten Faktoren über den positiven oder negativen Effekt von Makrophagen entscheiden könnten (Leskovar et al., 2000; Lazarov-Spiegler et al., 1998). So könnte die starke Akkumulation von aktivierten Makrophagen im Augeninneren durch die Liposomenbehandlung zu einer verstärkten Sezernierung von zytotoxischen Faktoren wie z.B. dem Tumornekrosefaktor-*α* (TNFα), Stickstoffoxid (NO) oder dem *Reactive Oxygen Species* (ROS) in den Glaskörper des Auges führen. Die Folge könnte eine Abnahme der Regeneration sein, die sich in den Ergebnissen dieser Arbeit manifestierte (Abb. 15). Übereinstimmend mit dieser Hypothese zeigte Yin et al. (2003) eine gesteigerte axonale Regeneration in einen zuvor gequetschten Sehnerven, wenn Zymosan als starker Aktivator für Makrophagen nicht simultan, sondern 3 Tage verzögert intravitreal nach SQ injiziert wurde (Yin et al., 2003). Diese Resultate führen zu der Schlussfolgerung, dass die regenerationsfördernden Effekte der LV auf axotomierte RGZ durch einen Makrophagen-unabhängigen Weg vermittelt werden.

4.4 Untersuchung der Oncomodulin-Expression

Oncomodulin (Parvalbumin ß) wurde erstmals von MacManus (1979) im Lebertumor der Ratte entdeckt und isoliert (MacManus 1979, 1980). In folgenden Studien wurde Oncomodulin als tumorspezifisches, kalziumbindendes Protein in weiteren tierischen und menschlichen Tumoren und Tumorzelllinien nachgewiesen. Durch neuere Studien musste jedoch die Tumorspezifität von Oncomodulin in Frage gestellt werden, da seine Expression ebenso in den äußeren Haarzellen des Cortischen Organs bei Sprague-Dawley Ratten, in aktivierten Makrophagen, in der Retina und in dem Sehnerven von Fisher-Ratten (F334) nachgewiesen wurde (Brewer et al., 1989; Durkin et al., 1983; Hackney et al., 2005; Yin et al., 2006). Übereinstimmend mit Yin et al. (2006) wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von Oncomodulin in der unbehandelten Retina von Fisher- und Sprague-Dawley Ratten bestätigt (Abb. 18, 19). Yin et al. (2006) zeigten jedoch des Weiteren, dass die Expression von Oncomodulin durch eine Verletzung der Linse oder durch die intravitreale Injektion des Hefezellwandextrakts Zymosan im Auge erhöht wird. Diese Expressionserhöhung

wurde durch die starke Infiltration und Akkumulation von aktivierten Makrophagen nach den jeweiligen Behandlungen im inneren Auge erklärt (Yin et al., 2006). Als Nachweis für die Notwendigkeit von aktivierten Makrophagen für die Induktion regenerativer Prozesse in RGZ wurde *in vitro* gezeigt, dass dissoziierte RGZ, die in Gegenwart von Makrophagen-Zelllinien-konditioniertem Medium kultiviert wurden, ein stärkeres axonales Auswachsen zeigten als entsprechende Kontrollen (Yin et al., 2003). Oncomodulin wurde hierbei als Hauptfaktor der regenerationsfördernden Effekte des Makrophagen-Zelllinien-konditionierten Mediums identifiziert (Yin et al. 2006). Diese allgemein akzeptierte Makrophagen/Oncomodulin-Hypothese beruht demnach lediglich auf der beobachteten Korrelation zwischen einwandernden Makrophagen *in vivo* und den positiven Effekten einer LV bzw. Zymosan-Injektion sowie einem aus einer Makrophagen-Zelllinien stammenden Faktor mit neuritogenen Effekten auf dissoziierte RGZ in Kultur. Diese Beobachtungen stellen jedoch keinen direkten Beweis für die Beteiligung von Oncomodulin an den LV- bzw. Zymosan-induzierten Effekten dar. Das einzige Indiz für eine Beteiligung von Oncomodulin an diesen Effekten ist demnach seine angebliche Expressionserhöhung in der Retina nach LV (Yin et al., 2006).

Zur Klärung dieser Beobachtungen diente in der vorliegenden Arbeit die Depletion von aktivierten Makrophagen durch Clodrolips (Van Rooijen and Sanders, 1997; Saunders et al., 2004; Biewenga et al., 1995). Falls Oncomodulin von aktivierten Makrophagen in das innere Auge sezerniert werden sollte, müsste seine Expression mit der Anzahl von Makrophagen im inneren Auge korrelieren (Yin et al., 2006). Am Beispiel von semi-quantitativen und quantitativen *real-time* RT-PCRs wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nachgewiesen, dass weder die Reduzierung der Makrophagen durch Clodrolipsbehandlung eine signifikante Expressionsverminderung, noch eine LV, eine intravitreale Zymosan- oder Liposomeninjektion eine signifikante Expressionserhöhung von Oncomodulin in der Retina von Sprague-Dawley Ratten induzierte (Abb. 18, 19). Dieser Befund wurde in Fisher Ratten bestätigt. Auch hier führte die SQ+LV zu keiner differentiellen Expression von Oncomodulin in der Retina (Abb. 27). Dieser Befund steht im direkten Widerspruch zur Studie von Yin et al. (2006), die in Fisher Ratten eine Expressionserhöhung von Oncomodulin in der Retina nach LV beobachteten

(Yin et al., 2006). Des Weiteren wurde Oncomodulin mRNA weder im Glaskörper nach LV bzw. Zymosaninjektion, noch im Ziliarkörper nach SQ+LV nachgewiesen (Abb. 21, 22, 24). ED1-positive peritoneale Makrophagen zeigten ebenso kein positives Signal für Oncomodulin (Abb. 23), so dass dies zu der Schlussfolgerung führte, dass primäre Makrophagen kein oder wenn überhaupt nur sehr geringe Mengen an Oncomodulin exprimieren. Eine mögliche Erklärung für den Unterschied zur Studie von Yin et al. (2006) könnte die Verwendung der immortalisierten Makrophagen-Zelllinien anstelle primärer Makrophagen sein, die aufgrund ihrer Immortalisierung höhere Mengen an Oncomodulin exprimieren (Yin et al., 2006). Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Expression von Oncomodulin weder 1, 2, 5 noch 7 Tage nach SQ+LV oder SQ mit zusätzlicher intravitrealer Applikation von Zymosan im inneren Auge erhöht ist (Abb. 28). Dieses Ergebnis schließt die Möglichkeit aus, dass Blutmonozyten nach ihrer Stimulierung signifikante Mengen an Oncomodulin transient exprimieren.

Zusammenfassend sind die Aussagen zu treffen, dass
(1) übereinstimmend mit Yin et al. (2006) Oncomodulin im unbehandelten Auge nachgewiesen wurden,
(2) im Widerspruch zu Yin et al. (2006) keine differentielle Expression von Oncomodulin nach LV oder Zymosaninjektion in der Retina detektiert wurden,
(3) es kein Nachweis der Expression von Oncomodulin in LV- oder Zymosan aktivierten Makrophagen, im Glaskörper, in der verletzten Linse und im Ziliarkörper erbracht wurden,
(4) weder unterschiedliche Zeitpunkte, noch unterschiedliche Rattenstämme für die Divergenz der erhobenen Resultate verantwortlich gemacht werden können.

Die in dieser Arbeit generierten Daten führten zu der Schlussfolgerung, dass die LV keine signifikante Expressionserhöhung von Oncomodulin in der Retina induzierte und Oncomodulin somit nicht der Hauptmediator der LV-induzierten Effekte sein kann, was in direktem Widerspruch zur Studie von Yin et al. (2006) steht. Bestätigt wird diese Hypothese durch die Studie von Müller et al. (2007). Hierbei führte ein intravitreal applizierter Antikörper gegen Oncomodulin simultan zu einer SQ+LV zu keiner Reduzierung des Auswachsens der RGZ-Axone im Vergleich zu SQ+LV behandelten Kontrollen (Müller et al., 2007).

Weitere Experimente sind jedoch für die Erforschung der molekularen Mechanismen der LV notwendig, um Strategien entwickeln zu können, die die axonale Regeneration *in vivo* fördern.

4.5 Untersuchung der Expression von IL-6 in der Retina

In unserer Arbeitsgruppe wurde kürzlich gezeigt, dass die LV oder Zymosan-Behandlung die Expression von CNTF in retinalen Astrozyten Makrophagen-unabhängig induziert und der Transkriptionsfaktor *Signal transducers and activators of transcription* 3 (Stat3) in RGZ aktiviert wird (Müller et al., 2007). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Blockierung der Aktivierung von Stat3 durch die intravitreale Applikation des *Janus-kinase* 2 (JAK-2) Inhibitors AG490 nach einer LV zu einer signifikanten Reduzierung der positiven Effekte der LV führte (Müller et al., 2007). Müller et al. (2007) postulierten daher, dass dem JAK/Stat3 Signalweg eine entscheidende Rolle bei den regenerationsfördernden Effekten der LV zukommt. Der JAK/Stat3 Signalweg kann durch zahlreiche Faktoren aktiviert werden. Neben CNTF aktivieren unter anderem IL-6 und *Leukemia inhibitory factor* (LIF) diesen Signalweg (Kishimoto, 2006; Hirano et al., 2000; Rabe et al., 2007; Hibi et al., 1990).

Es wurde beschrieben, dass LIF und CNTF neuroprotektive und regenerationsfördernde Effekte *in vitro* aufweisen (Jo et al., 1999). In postnatalen Retinakulturen wurde hierbei durch die Behandlung von LIF und CNTF sowohl das Überleben, als auch axonales Wachstum von RGZ stimuliert (Jo et al., 1999). Mittels semi-quantitativer RT-PCR wurde jedoch für LIF im Gegensatz zu CNTF und IL-6 keine differentielle Expression in der Retina detektiert, weshalb davon auszugehen ist, dass LIF kein entscheidender Regulator der LV-induzierten Effekte ist (Abb. 29). Für IL-6 ist beschrieben worden, dass seine Expression durch unterschiedliche Stimuli wie z.B. einer Verletzung des ZNS, einer Inflammation oder weiterer Zytokine erhöht wird (Hirano et al., 2000; Gadient and Otten, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Expressionserhöhung von IL-6 in der Retina nach LV im Vergleich zum unbehandelten Auge nachgewiesen (Abb. 29). Dieses Resultat untermauert die Hypothese, dass IL-6 ein entscheidender Regulator für die LV-induzierten Effekte sein könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit

geben jedoch keinen Aufschluss darüber, welche Zellen für diese Expressionserhöhung nach LV in der Retina verantwortlich sind. Es ist jedoch beschrieben worden, dass retinale Astrozyten, Makrophagen und Mikrogliazellen nach deren Aktivierung IL-6 exprimieren (Hirano et al., 1986, 2000; Heinrich et al., 2003; Krady et al., 2008; Sanchez et al., 2003; Sappington et al., 2006; Gadient and Otten, 1995). Die Expressionserhöhung von IL-6 nach SQ korrelierte mit der Aktivierung der Mikrogliazellen in der Retina nach SQ. Die LV führte zu einer Aktivierung von Makrophagen, die in das innere Auge infiltrieren. Demnach könnte die Expressionserhöhung von IL-6 nach LV ebenso durch die Infiltration dieser Zellen erklärt werden. Immunhistochemische Färbungen der Retina mit Antikörper gegen IL-6 und GFAP als Marker für retinale Astrozyten wurden nicht durchgeführt, so dass keine Aussage über die Beteiligung von retinalen Astrozyten an der Expressionserhöhung von IL-6 nach LV in der Retina anhand der hier erhobenen Daten getroffen werden kann.

4.6 Untersuchung der neuritogenen Effekte von IL-6

In der Literatur wird der Beitrag von IL-6 als neuritogener Faktor kontrovers diskutiert (Yin et al., 2003; Klein et al., 1997; Hirota et al., 1996; Gadient and Otten, 1997; Cao et al., 2006). Cao et al. (2006) zeigten, dass intrathekal verabreichtes IL-6 die axonale Regeneration von verletzten zentralen Rückenmarksneuronen *in vivo* förderte. Exogen appliziertes IL-6 soll demnach molekulare Veränderungen induzieren, die den axotomierten Neuronen ein Überwinden des inhibitorischen Milieus erlaubten (Cao et al., 2006). Die Beobachtungen von Cao et al. (2006) stehen im Einklang mit den Resultaten in der vorliegenden Arbeit. In dissoziierten Retinakulturen wurden für rekombinantes IL-6 (rIL-6) neuritogene Effekte auf RGZ nachgewiesen. Das Auswachsen von RGZ-Axonen wurde im Vergleich zur BSA-behandelten Kontrolle um mehr als 100% erhöht (Abb. 30, 31). Im Gegensatz dazu beobachteten Yin et al. (2003) keine neuritogenen Eigenschaften von IL-6, da in Zellkulturexperimenten bei RGZ nach Abministration von IL-6 in unterschiedlichen Konzentrationen kein Auswachsen stimuliert wurde (Yin et al., 2003). Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Divergenz könnte in der Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen

begründet sein. Yin et al. (2003) verwendeten für ihre Studie 20-100 ng/ml rIL-6, wobei in der vorliegenden Arbeit 200 ng/ml rIL-6 eingesetzt wurden.

Des Weiteren zeigen die hier erhobenen Daten deutliche neuritogene Effekte von rIL-6 im Regenerationsmodell *in vivo*, wenn rIL-6 intravitreal nach SQ appliziert wurde. Injektionen von rIL6 simultan zur SQ und zusätzlicher Applikation an Tag 3 erwiesen sich hierbei als potenter hinsichtlich axonaler Regeneration als Injektionen 3 und 7 Tage nach SQ (Abb. 32, 33). Die LV führte jedoch zu stärkeren regenerationsfördernden Effekten als die intravitreale Applikation von rIL-6, was zum einen an der Pharmakokinetik liegen könnte und zum anderen an weiteren Faktoren, die für die positiven LV-induzierten regenerativen Effekte verantwortlich sind. Wie bereits oben erwähnt, wurde in Müller et al. (2007) beschrieben, dass eine LV eine Hochregulation von CNTF in retinalen Astrozyten induziert. Dies hatte starke neuritogene Effekte auf RGZ zur Folge (Müller et al., 2007). Die intravitreale Applikation eines Antikörpers gegen CNTF zeigte eine Verminderung der neuroprotektiven und regenerationsfördernden Effekte der LV, so dass Astrozyten-abhängiges CNTF einen essentiellen Beitrag zu den neuroprotektiven und neuritogenen Effekten einer LV beisteuert (Müller et al., 2007).

Überraschenderweise zeigte rIL-6 in dem verwendeten Modell keine neuroprotektiven Eigenschaften (Abb. 34). Klein et al. (1997) beobachteten neuroprotektive Effekte für IL-6, da das Überleben von axotomierten faszialen Neuronen in IL-6 defizienten Mäusen stark reduziert war (Klein et al., 1997). Sanchez et al. (2003) haben hierbei gezeigt, dass IL-6 neuroprotektiv auf RGZ wirkt, wenn die retinalen Zellen infolge einer Ischämie in der Retina degenerieren (Sanchez et al., 2003). Diese Befunde stehen jedoch nicht in direktem Widerspruch zu den hier erhobenen Daten, da zum einen unterschiedliche Modelle verwendet wurden und sich zum anderen der axotomiebedingte Zelltod erheblich vom ischämischen unterscheidet (Klein et al., 1997; Sappington et al., 2006; Sanchez et al., 2003). Trotz allem ist es denkbar, dass zu hohe Expressionskonzentrationen bzw. zu hohe lokale Konzentrationen von IL-6 durch eine intravitreale Administration die Internalisierung des IL-6 Rezeptors (IL6R) zur Folge haben könnte. Diese Internalisierung würde einem Schutzmechanismus der

Zelle entsprechen. Vorversuche in unserer Arbeitsgruppe würden diese Hypothese stützen, da immunhistologisch eine Verminderung der Expression des IL6R in RGZ 5 Tage nach SQ+LV im Vergleich zur unbehandelten Retina gezeigt wurden.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten verdeutlichen die Notwendigkeit der weiteren Erforschung der molekularen Mechanismen der LV. Deren Kenntnis stellt eine Voraussetzung für die Entwicklung innovativer therapeutischer Strategien zur Steigerung der axonalen Regeneration dar, die vielleicht in Zukunft klinische Relevanz für unterschiedliche Forschungsbereiche (z.B. Multiple Sklerose, traumatischen Verletzung des Rückenmarks und Sehnerven) erlangen können.

5 Zusammenfassung

Retinale Ganglienzellen (RGZ) können ihr Axone nach einer intraorbitalen Verletzung des Sehnerven nicht mehr regenerieren und unterliegen einer Apoptose. Durch inflammatorische Reaktionen im Auge kann das intrinsische Regenerationsprogramm der axotomierten RGZ reaktiviert werden, was mit einer Verzögerung des Degenerationsprozesses nach Sehnervquetschung und einer axonale Regeneration assoziiert ist. Die Linsenverletzung und die Injektion von Zymosan können diese positiven Prozesse induzieren und führen zu einer starken Akkumulation von aktivierten Makrophagen im Augeninneren. Kürzlich wurde postuliert, dass von aktivierten Makrophagen sezerniertes Oncomodulin der Hauptmediator dieser Effekte sei. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass Oncomodulin weder in primären Makrophagen nachgewiesen werden konnte, noch war seine Expression in der Retina nach Linsenverletzung oder Zymosaninjektion erhöht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Depletion bzw. Reduzierung von Makrophagen und Mikrogliazellen im Augeninneren zu keiner Minderung der neuroprotektiven Effekte einer Linsenverletzung führte. Nach Reduzierung von aktivierten Makrophagen im inneren Auge wurde sogar eine verbesserte axonale Regeneration in einen zuvor gequetschten Sehnerven induziert. Die axonale Regeneration korrelierte hierbei mit der Aktivierung von retinalen Astrozyten und Müllerzellen. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten führen zur der Schlussfolgerung, dass die positiven Effekte, die einer inflammatorischen Stimulation im Auge folgen, Oncomodulin-unabhägig mediiert werden, und dass der hier zugrunde liegende Mechanismus unabhängig von der Anwesenheit aktivierter Makrophagen zu sein scheint.

Für IL-6 konnte gezeigt werden, dass eine Linsenverletzung die Expression dieses Zytokins im Augeninneren induziert. Die intravitreale Applikation von rekombinanten IL-6 führte zu einer gesteigerten axonalen Regeneration in einen zuvor gequetschten Sehnerven. Diese Resultate deuten an, dass IL-6 ein bislang nicht bekannter neuritogener Faktor für RGZ darstellt.

6 Summary

Retinal ganglion cells (RGCs) cannot regenerate their axons after injury and undergo apoptosis soon after an intraorbital injury of the optic nerve. However, RGCs reactivate their axonal growth program when inflammatory reactions occur in the eye. This enables them to survive axotomy and to regenerate lengthy axons into the lesioned optic nerve. Lens injury and zymosan injections can induce these beneficial progresses and provoke also a strong accumulation of the activated macrophages in the vitreous body. It has recently been suggested that macrophage-derived oncomodulin is the principal mediator of this phenomenon. I show here that oncomodulin is not significantly expressed in primary macrophages and that the intraocular levels of this protein do not increase after lens injury or zymosan treatment. Furthermore, greatly reducing the invasion of macrophages into the inner eye does not diminish the neuroprotective effects of lens injury, but rather increases axon regeneration into the optic nerve. Axon regeneration is correlated with the activation of retinal astrocytes and Müller cells. This data suggest that intraocular inflammation mediates its main beneficial effects through factors other than oncomodulin and that the underlying mechanism might be independent of the presence of activated macrophages.

I show here that lens injury induce upregulation of IL-6 into the inner eye. Intravitreally applied IL-6 allow RGCs to regenerate axons in the injured optic nerve. This data suggest that IL-6 is a contributor to the axon-growth-promoting effects of lens injury.

7 Literaturverzeichnis

Aguayo A, David S, Bray G (1981)
Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents.
J Exp Biol 95: 231-240.

Aguayo AJ, Rasminsky M, Bray GM, Carbonetto S, McKerracher L, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Carter DA (1991)
Degenerative and Regenerative Responses of Injured Neurons in the Central Nervous System of Adult Mammals.
Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 331: 337-343.

Ahmed Z, Suggate E, Brown E, Dent R, Armstrong S, Barrett L, Berry M, Logan A (2006)
Schwann cell-derived factor-induced modulation of NgR/p75^{NTR}/EGFR axis disinhibits axon growth through CNS myelin *in vivo* and *in vitro*.
Brain 129: 1517-1533.

Aigner L, Arber S, Kapfhammer JP, Laux T, Schneider C, Botteri F, Brenner H, Caroni P (1995)
Overespression of the neural growth-associated protein Gap43 indurces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice.
Cell 83: 269-278.

Asher RA, Morgenstern DA, Moon LDF, Fawcett JW (2001)
Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar
Progress in Brain Research.
Glial cell function, 132, pp 611-619.

Babini E, Bertini I, Capozzi F, Del Bianco C, Hollender D, Kiss T, Luchinat L, Quattrone A (2004)
Solution structure of human β-Parvalbumin and structural comparison with its paralog α-Parvalbumin and with their rats orthologs.
Biochemistry 43: 16076-16085.

Bähr M (2000)
Live or let die - retinal ganglion cell death and survival during development and in the lesioned adult CNS.
Trends in Neurosciences 23: 483-490.

Barde (1989)
Trophic factors and neuronal survival.
Neuron 2: 1525-1534.

Benfey M, Aguajo AJ (1982)
Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nerve grafts.
Nature 296: 150-2.

Benowitz LI, Routtenberg A (1997)
GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity.
Trends in Neurosciences 20: 84-91.

Bentley AP, Zottoli SJ (1993)
Central nervous system lesion triggers inappropriate
pathway choice in adult vertebrate system.
Brain Research 630: 333-336.

Biewenga J, van der Ende MB, Krist L, Borst A, Ghufron M, van Rooijen N (1995)
Macrophage depletion in the rat after intraperitoneal administration of liposome-encapsulated clodronate: depletion kinetics and accelerated repopulation of of peritoneal and omental macrophages by administration of Freund´s adjuvant.
Cell Tissue Res 280: 189-196.

Berkelaar M, Clarke D, Wang Y, Bray G, Aguayo A (1994)
Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. J Neurosci 14: 4368-4374.

Blackmore M, Letourneau PC (2005)
Changes within maturing neurons limit axonal regeneration in the developing spinal cord.
J Neurobiology Doi:10.1002/neu20244.

Bomze HM, Bulsara KR, Iskandar BJ, Caroni P, Pate Skene JH (2001)
Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons.
Nature Neuroscience 4: 38-43.

Bonfanti L, Strettoi E, Chierzi S, Cenni MC, Liu X-H, Martinou J-C, Maffei L, Rabacchi SA (1996)
Protection of Retinal Ganglion Cells from Natural and Axotomy-Induced Cell Death in Neonatal Transgenic Mice Overexpressing bcl-2.
J Neurosci 16: 4186-4194.

Bray GM, Rasminsky M, Aguayo AJ (1981)
Interactions Between Axons and their Sheath Cells.
Annual Review of Neuroscience 4: 127-162.

Brewer LM, Gillen MF, MacManus JP (1989)
Localization of mRNA for the oncotrophoblastic protein oncomodulin during implantation and early placentation in the rat.
Placenta 10: 359-375.

Brosamle C, Huber AB, Fiedler M, Skerra A, Schwab ME (2000)
Regeneration of Lesioned Corticospinal Tract Fibers in the Adult Rat Induced by a Recombinant, Humanized IN-1 Antibody Fragment.
J Neurosci 20: 8061-8068.

Cai D, Shen Y, De Bellard M, Tang S, Filbin MT (1999)
Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration via a cAMP-dependent mechanism.
Neuron 22: 89-101.

Cajal R (1928)
Degeneration und Regeneration of the Nervous System.
Oxford University Press, London.

Caroni P (1998)
NEUROSCIENCE:Driving the Growth Cone.
Science 281: 1465-1466.

Caroni P, Schwab M (1988)
Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading.
J Cell Biol 106: 1281-1288.

Caroni P, Aigner L, Schneider C (1997)
Intrinsic Neuronal Determinants Locally Regulate Extrasynaptic and Synaptic Growth at the Adult Neuromuscular Junction.
J Cell Biol 136: 679-692.

Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe G, Lo D (1998)
Mature Microglia Resemble Immature Antigen-Presenting Cells.
Glia 22: 72-85.

Cecchini M, Dominguez M, Mocci S, Wetterwald A, Felix R, Fleisch H, Chisholm O, Hofstetter W, Pollard J, Stanley E (1994)
Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse.
Development 120: 1357-1372.

Cecchin D, Sennlaub F, Levavasseur E, Leduc M, Chemtob S (2006)
Potential role of microglia in retinal blood vessel formation.
IOVS 47(8): 3595-3602.

Cen LP, Luo JM, Zhang CW, Fan YM, Song Y, So KF, van Rooijen N, Pang CP, Lam D, Cui Q (2007)
Chemotactic effect of ciliary neurotrophic factor on macrophages in retinal ganglion cell survival and axon regeneration.
IOVS 48: 4257-4266.

Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME (2000)
Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and a antigen for monoclonal antibody IN-1.
Nature 403: 434-9.

Chierzi S, Cenni MC, Maffei L, Pizzorusso T, Porciatti V, Ratto GM, Strettoi E (1998)
Protection of retinal ganglion cells and preservation of function after optic nerve lesion in bcl-2 transgenic mice.
Vision Research 38: 1537-1543.

Chun MH, Ju WK, Kim KY, Lee MY, Hofmann HD, Kirsch M, Oh SJ (2000)
Upregulation of ciliary neurotrophic factor in reactive Müller cells in the rat retina following optic nerve transection.
Brain Research 868: 358-362.

Cui Q, Lu Q, So KF, Yip HK (1999)
CNTF, not other trophic factor, promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adul hamsters.
IOVS 40: 760-766.

Cui Q, Tang LS, Hu B, So KF, Yip HK (2002)
Expression of trkA, trkB, and trkC in injured and regenerating retinal ganglion cells of adult rats.
IOVS 43(6): 1954-1964.

Cui Q, Harvey AR (2000)
CNTF promotes the regrowth of retinal ganglion cell axons into murine peripheral nerve grafts
Neuroreport 11(18): 3999-4002.

Cui Q, Yip HK, Zhao RC, So KF, Harvey AR (2003)
Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons.
MCN 22(1): 49-61.

Dacey DM (1999)
Primate retina: cell types, circuits and color opponency.
Progress in Retinal and Eye Research 18: 737-763.

Dacey DM (2000)
Parallel Pathways for Spectral Coding in Primate Retina.
Annual Review of Neuroscience 23: 743-775.

Davies SJA, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J (1997)
Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system.
Nature 390: 680-683.

Delneste Y, CharbonnierP, Herbault N, Magistrelli G, Caron G, Bonnefoy JY, Jeannin P (2003)
Interferon-ɣ switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages.
Blood 101(1): 143-150.

Domeniconi M, Filbin MT (2005)
Overcoming inhibitors in myelin to promote axonal regeneration.
J Neurol Sci 233(1-2): 43-47.

Durkin JP, Brewer LM, MacManus JP (1983)
Occurrence of the Tumor-specific, Calcium-binding Protein, Oncomodulin, in Virally Transformed Normal Rat Kidney Cells.
Cancer Res 43: 5390-5394.

Faissner A (1997)
The tenascin gene family in axon growth and guidance.
Cell and Tissue Research 290: 331-341.

Fawcett JW, Asher RA (1999)
The glial scar and central nervous system repair.
Brain Research Bulletin 49: 377-391.

Filbin MT (2003)
Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS.
Nat Rev Neurosci 4(9): 703-13.

Fischer D, Pavlidis M, Thanos S (2000)
Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cell death and promotes axonal regeneration both in vivo and in culture.
Invest Ophthalmol Vis Sci 41: 3943-3954.

Fischer D, Heiduschka P, Thanos S (2001)
Lens-injury-stimulated axonal regeneration throughout the optic pathway of adult rats.
Exp Neurol 172: 257-272.

Fischer D, He Z, Benowitz L (2004)
Counteracting the Nogo-receptor enhances optiv nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state.
Journal of Neuroscience 24(7): 1646-1651.

Fischer D, Hauk TG, Müller A, Thanos S (2008)
Cystallins of the ß/γ- superfamily mimic the effects of lens injury and promote axon regeneration.
MCN 37: 471-479.

Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM (2000)
Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonale regeneration.
Nature 409: 341-246.

Franklin R, Barnett SC (2000)
Olfactory ensheathing cells and CNS regeneration: The sweet smell of success?
Neuron 28: 15-18.

Goldberg JL, Barres BA (1998)
Neural regeneration: Extending axons from bench to brain.
Current Biology 8:R310-R312.

Goldberg JL, Espinosa J, Xu Y, Davidson N, Kovacs G, Barres BA (2002)
Retinal ganglion cells do not extend axons by default: Promotion by neurotrophic signaling and electrical activity.
Neuron 33: 689-702.

Goldberg JL, Klassen MP, Hua Y, Barres BA (2002)
Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells.
Science 296: 1860-1864.

Gordon S (2007)
The macrophage: Past, present and future.
Eur J Immunol 37: S9-17.

Graeber MB, Scheithauer BW, Kreutzberg GW (2002)
Microglia in brain tumors.
Glia 40: 252-259.

Golz G, Uhlmann L, Ludecke D, Markgraf N, Nitsch R, Hendrix S (2006)
The cytokine/neurotrophin axis in peripheral axon outgrowth.
European Journal of Neuroscience 24: 2721-2730.

GrandPre T, Li S, Strittmatter SM (2002)
Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonale regeneration.
Nature 417: 547-551.

GrandPre T, Nakamuro F, Vartanian T, Strittmatter SM (2000)
Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein.
Nature 403: 439-444.

Hackney CM, Mahendrasingam S, Penn A, Fettiplace R (2005)
The Concentrations of Calcium Buffering Proteins in Mammalian Cochlear Hair Cells.
J Neurosci 25: 7867-7875.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HS, Müller-Newen G, Schaper F (2003)
Principles of interleukin (IL)-6 type cytokine signalling and its regulation.
Biochem J 374: 1-20.

Henzl MT, Agah S, Larson JD (2003)
Characterization of the Metal Ion-Binding Domains from Rat Parvalbumins.
Biochemistry 42: 3594-3607.

Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S-i, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, Tsunasawa S, Sakiyama F, Matsui H,
Takahara Y, Taniguchi T, Kishimoto T (1986)
Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin.
Nature 324: 73-76.

Hirano T, Ishihara K, Hibi M (2000)
Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL6 family of cytokine receptors.
Oncogene 19(21): 2548-2556.

Huang Y, Li Z, van Rooijen N, Wang N, Pang CP, Cui Q
Different responses of macrophages in retinal ganglion cell survival after acute ocular hypertension in rats with different autoimmune backgrounds.
Exp Eye Res 2007 85(5): 659-66.

Huitinga I, Damoiseaux JG, van Rooijen N, Döpp EA, Dijkistra CD (1992)
Liposome mediated affection of monocytes.
Immunobiology 185(1): 11-19.

Hume DA, Ross IL, Himes SR, Sasmono RT, Wells CA, Ravasi T (2002)
The mononuclear phagocyte system revisited.
J Leukoc Biol 72: 621-627.

Hu Y, Arulpragasam A, Plant GW, Hendriks WT, Qui Q, Harvey AR (2007)
The importance of transgene and cell type on the regeneration of the adult retinal ganglion cell axons within reconstituted bridging grafts.
Exp. Neurology 207(2): 314-328.

Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y, Uchida T, Kariyone S, Maruyama Y (1990)
Effect of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on murine thrombocytopoiesis in vitro and in vivo.
Blood 75: 1433-1438.

Jiang S, Wang J, Kahn M, Middlemiss P, Salgado-Ceballos H, Werstiuk E, Wickson R, Rathbone MP (2003)
Enteric glia promote regeneration of transected dorsal root axons into spinal cord of adult rats.
Exp Neurology 181: 79-83.

Jiao J, Huang X, Feit-Leithman RA, Neve R, Snider W, Dartt DA, Chen DF (2005)
Bcl-2 enhances Ca2+ signaling to support the intrinsic regenerative capacity of CNS axons.
EMBO 24: 1068-1078.

Jo SA, Wang E, Benowitz L (1999)
Ciliary neurotrophic factor is an axogenesis factor for retinal ganglion cells.
Neuroscience 89(2): 579-591.

Kapfhammer JP, Schwab ME (1994)
Increased Expression of the Growth-associated Protein GAP-43 in the Myelin-free Rat Spinal Cord.
European Journal of Neuroscience 6: 403-411.

Kaplan E, Shapley RM (1986)
The Primate Retina Contains Two Types of Ganglion Cells, with High and Low Contrast Sensitivity.
Proceedings of the National Academy of Sciences 83: 2755-2757.

Kim JE, Li S, GrandPre T, Qiu D, Strittmatter SM (2003)
Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B.
Neuron 38: 187-199.

Kishimoto T (2006)
Interleukin-6: Discovery of a pleitrophic cytokine.
Arthritis Research doi: 10.1186/ar1916.

Klein B, Zhang X, Lu Z, Bataille R (1995)
Interleukin-6 in human multiple myeloma.
Blood 85: 863-872.

Koriyama Y, Homma K, Kato S (2006)
Activation of cell survival signals in the goldfish retinal ganglion cells after optic nerve injury.
Adv Exp Med Biol 572: 333-337.

Krady J, Lin HW, Liberto C, Basu A, Kremlev S, Levison S (2008)
Ciliary neurotrophic factor and Interleukin-6 differentially actived microglia.
J Neuroscience Research 86: 1538-1547.

Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Izumi K, Yasuoka H, Ogawa Y, Kawakami Y, Ikeda Y (2003)
Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation.
J Leukoc Biol 74: 833-845.

Lazarov-Spiegler O, Solomon A, Zeev-Brann A, Hirschberg D, Lavie V, Schwartz M (1996)
Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrqwth failure.
FASEB 10: 1296-1302.

Lazarov-Spiegler O, Solomon A, Schwartz M (1998)
Peripheral nerve-stimulated macrophages simulate a peripheral nerve-like regenerative response in rat transected optic nerve.
Glia 24: 329-337.

Lazarov-Spiegler O, Solomon A, Schwartz M (1999)
Link between optic nerve regrowth failure and macrophage stimulation in mammals.
Vision Research 39: 169-175.

Leaver SG, Cui Q, Plant GW, Arulpragasam A, Hisheh S, Verhaagen S, Harvey AR (2006)
AAV-mediated expression of CNTF promotes long-term survival and regeneration of adult rat retinal ganglion cells.
Gene Therapy 13(18): 1328-1341.

Lehtonen A, Veckman V, Nikula T, Lahesma R, Kinnunen L, Matikainen S, Julkunen I (2005)
Differential expression of INF regulatory factor 4 gene in human monocyte-derived dendritic cells and macrophages.
J Immunology 175: 6570-6579.

Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI (2000)
Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve.
J Neurosci 20: 4615-4626.

Li Y, Semaan SJ, Schlamp CL, Nickells RW (2007)
Dominant inheritance of retinal ganglion cell resistance to optic nerve crush in mice.
BMC Neuroscience doi: 10.1186/1471-2202-8-19.

Liedtke T, Naskar R, Eisenacher M, Thanos S (2007)
Transformation of adult retina from the regenerative to the axonogenesis state activates specific genes in various subsets of neurons and glia cells.
Glia 55: 189-201.

Lingor P, Tönges L, Pieper N, Bermel C, Barski I, Planchamp V, Bähr M (2008)
ROCK inhibition and CNTF interact on intrinsic signalling pathways and differentially regulate survival and regeneration in retinal ganglion cells.
Brain 131: 250-263.

Logan A, Ahmed Z, Baird A, Gonzalez AM, Berry M (2006)
Neurotrophic factor synergy is required for neuronal survival and disinhibited axon regeneration after CNS injury.
Brain doi: 10.1093//brain/awh706.

Lorber B, Berry M, Logan A, Tonge D (2002)
Effect on lens lesion on neurite outgrowth of retinal ganglion cells in vitro.
MCN 21: 301-311.

Lorber B, Berry M, Logan A (2008)
Different factors promote axonal regeneration of adult rat retinal ganglion cells after lens injury and intravitreal peripheral nerve grafting.
J Neuroscience Research 86: 894-903.

Lu P, Yang H, Jones L, Filbin MT, Tuszynski MH (2004)
Combinatorial therapy with neurotrophins and cAMP promotes axonal regeneration beyond sites of spinal cord injury.
J Neuroscience 24(28): 6402-6409.

MacManus JP (1979)
Occurrence of a Low-Molecular-Weight Calcium-binding Protein in Neoplastic Liver. Cancer Res 39: 3000-3005.

MacManus JP (1980)
The purification of a unique calcium-binding protein from Morris hepatoma 5125tc.
Biochim Biophys Acta 621(2): 296-304.

Mansour-Robaey S, Clarke D, Wang YC, Bray GM, Aguayo GJ (1994)
Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells.
PNAS 91: 1632-1636.

Markus A, Patel T, Snider W (2002)
Neurotrophic factors and axonal regrowth.
Current Opinion in Neurobiology 12: 523-531.

Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Caux C, Blay CJ (1998)
Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34+ progenitors by tumor cells: Role of IL-6 and macrophage colony-stimulating factor.
Blood 92(12): 4778-4791.

Mey J, Thanos S (1993)
Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo.
Brain Research 602: 304-317.

Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfieger FW, Barres BA (1995)
Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture.
Neuron 15: 805-819.

Meyer-Franke A, Wilkinson GA, Kruttgen A, Hu M, Munro E, Hanson MG, Reichardt LF, Barres BA (1998)
Depolarization and cAMP Elevation Rapidly Recruit TrkB to the Plasma Membrane of CNS Neurons.
Neuron 21: 681-693.

Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, Levesque M, Allaire N, Perrin S, Sands B, Crowell B, Cate R, McCoy J, Pepinsky B (2004)
LINGO-1 is a component of Nogo-66 receptor/p75 signalling complex.
Nature Neuroscience 7: 221-228.

Moalem G, Yoles I, Muller-Gilor S, Mor F, Cohen I, Schwartz M (2000)
Autoimmune T cells retard the loss of function in injured rat optic nerves.
J Neuroimmunology 106: 189-197.

Morris L, Graham C, Gordon S (1991)
Macrophages in haemopoietic and other tissues of the developing mouse detected by the monoclonal antibody F4/80.
Development 112: 517-526.

Müller A, Hauk TG, Fischer D (2007)
Astrocyte-derived CNTF switches mature RGCs to a regenerative state following inflammatory stimulation.
Brain 130(12): 3308-20.

Niemand C, Nimmersgern A, Haan S, Fischer P, Schaper F, Rossaint R, Heinrich P, Müller-Newen G (2003)
Activation of Stat3 by IL-6 and IL-11 in primary human macrophages ist differentially modulated by suppressor of cytokine signalling 3.
J Immunology 170: 3263-3272.

Oppenheim RW (1991)
Cell Death During Development of the Nervous System.
Annual Review of Neuroscience 14: 453-501.

Oppenheim RW, Houenou LJ, Johnson JE, Lin L-FH, Li L, Lo AC, Newsome AL, Prevette DM, Wang S (1995)
Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF.
Nature 373: 344-346.

Park S-J, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S-i, Kamimura D, Ueda N, Iwakura Y, Ishihara K, Murakami M, Hirano T (2004)
IL-6 Regulates In Vivo Dendritic Cell Differentiation through STAT3 Activation.
J Immunol 173: 3844-3854.

Park K, Luo J, Hisheh S, Harvey AR, Cui Q (2004)
Cellular mechanisms associated with spontaneous and ciliary neurotrophic factor-cAMP-induced survival and axonal regeneration of adult retinal ganglion cells.
J Neuroscience 24(48): 10806-10815.

Park JB, Yiu G, Kaneko S, Wang J, He Z (2005)
A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors.
Neuron 45: 345-351.

Peinado-Ramon P, Salvador M, Villegas-Perez M, Vidal-Sanz M (1996)
Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3 and Brain-derived neurotrophic factoron the survival of the adult rat retinal gangion cells.
IOVS 37: 489-500.

Pernet V, Di Polo A (2006)
Synergistic action of brain-derived neurotrophic factor and lens injury promotes retinal ganglion cell survival, but leads to optic nerve dystrophy in vivo.
Brain 129: 1014-1026.

Popovich P, Guan Z, Wei P, Huitinga I, van Roiijen N, Stokes B (1999)
Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimp recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury.
Exp Neurology 158: 351-365.

Qiu J, Cai D, Filbin MT (2000)
Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS.
Glia 29: 166-174.

Rabchevsky AG, Streit WJ (1997)
Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth.
Journal of Neuroscience Research 47: 34-48.

Rabe B, Chalaris A, May U, Waetzig G, Seegert D, Williams A, Jones S, Rose-John S, Scheller J (2007)
Transgenic blockade of interleukin-6-trans sigaling abrogates inflammation.
Blood doi: 10.1182/blood-2007-07-102137.

Ramon-Cuerto A, Avila J (1998)
Olfactory ensheathing glia: Properties and function.
Brain Research 46(3): 175-187.

Ramon-Cuerto A, Cordero M, Santos-Benito S, Avila J (2000)
Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spianl cords by olfactory ensheathing glia.
Neuron 25: 425-435.

Rieske E, Graeber MB, Tetzlaff W, Czlonkowska A, Streit WJ, Kreutzberg GW (1989)
Microglia and microglia-derived brain macrophages in culture: generation from axotomized rat facial nuclei, identification and characterization in vitro.
Brain Research 492: 1-14.

Rudge JS, Alderson RF, Pasnikovski E, McClain J, Ip NY, Lindsay RM (1992)
Expression of ciliary neurtrophic factor and the neurotrophins- nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3- in cultured rat hippocampal astrocytes.
Eur J Neuroscience 4(6): 459-471.

Sanchez R, Chan C, Garg S, Kwong J, Wong M, Sadun A, Lam T (2003)
Interleukin-6 in retinal ischemia reperfusion injury in rats.
IOVS doi: 10.1167/iovs.03-0040.

Sappington R, Chan M, Calkins D (2006)
Interleukin-6 protects retinal ganglion cells from pressure-induced death.
IOVS doi: 10.1167/iovs.05.1407.

Sarup V, Patil K, Sharma S (2004)
Ciliary neurotrophic factor and its receptor are differentially expressed in the optic nerve transected adult rat retina.
Brain Research 1013: 152-158.

Saunders Y, Ross JR, Edmonds PM, Patel S, Wonderling D, Normand C, Broadley K (2004)
A systematic review of the role of biphosphonates in metastatic disease.
Health Technology Assessment 8(4).

Savio T, Schwab M (1989)
Rat CNS white matter, but not gray matter, is nonpermissive for neuronal cell adhesion and fiber outgrowth.
J Neurosci 9: 1126-1133.

Schmidt-Weber C, Rittig M, Buchner E, Hauser I, Schmidt I, Palombo-Kinne E, Emmrich F, Kinne R (1996)
Apoptotic cell death in activated monocytes following incorporation of clodronate-liposomes.
J Leukoc Biol 60: 230-244.

Schnell L, Schwab ME (1990)
Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors.
Nature 343: 269-272.

Schwab ME (2004)
Nogo and axon regeneration.
Current Opinion in Neurobiology 14: 118-124.

Schwab ME, Caroni P (1988)
Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrate for neurite growth and fibroblast spreading in vitro.
J Neuroscience 8(7): 2381-2393.

Shao Z, Browning J, Lee X, Scot M, Allaire N, Thill G, Levesque M, Sah D, Murray B, Jung V, Pepinsky R, Mi S (2005)
TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration.
Neuron 45: 353-359.

Simonen M, Pedersen V, Weinmann O, Schnell L, Buss A, Ledermann B, Christ F, Sansig G, Putten H, Schwab ME (2003)
Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury.
Neuron 38: 201-211.

Steinmetz M, Horn K, Tom V, Miller J, Busch S, Nair D, Silver DJ, Silver J (2005)
Chronic enhancement of the intrinsic growth capacity of sensory neurons combined with the degradation of the inhibitory proteoglycans allows functional regeneration of sensory axons through the dorsal root entry site zone in the mammalian spinal cord.
J Neuroscience 25(35): 8066-8076.

Strittmatter S, Igarashi M, Fishman M (1994)
GAP-43 amino terminal peptides modulate growth cone morphology and neurite outgrowth.
J Neurosci 14: 5503-5513.

Takahashi K, Umeda S, Shultz L, Hayashi S, Nishikawa S (1994)
Effects of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on the development, differentiation, and maturation of marginal metallophilic macrophages and marginal zone macrophages in the spleen of osteopetrosis (op) mutant mice lacking functional M-CSF activity.
J Leukoc Biol 55: 581-588.

Tetzlaff W, Alexander S, Miller F, Bisby M (1991)
Response of facial and rubrospinal neurons to axotomy: changes in mRNA expression for cytoskeletal proteins and GAP-43.
J Neurosci 11: 2528-2544.

Townsend M, McKenzie A (2000)
Unravelling the net ? cytokines and diseases.
J Cell Sci 113: 3549b-3550.

Tucker KL, Meyer M, Barde Y-A (2001)
Neurotrophins are required for nerve growth during development.
Nature Neuroscience 4: 29-37.

Van Furth R, Raeburn J, van Zwet T (1979)
Characteristics of human mononuclear phagocytes.
Blood 54: 485-500.

Van Rooijen, N.; Sanders, A. (1997)
Elimination, blocking, and activation of macrophages: three of a kind?
J Leukoc Biol, 62(6): 702-9.

Verma P, Chierzi S, Codd A, Campbell D, Meyer R, Hold C, Fawcett JW (2005)
Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration.
J Neuroscience 25(2): 331-342.

Vidal-Sanz M, Bray G, Villegas-Perez M, Thanos S, Aguayo A (1987)
Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat.
J Neurosci 7: 2894-2909.

Wang K, Koprovica V, Kim J, Sivasankaran R, Guo J, Neve R, He Z (2002)
Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo-receptor ligand that inhibits neurite outgrowth.
Nature 417: 941-944.

Wang K, Kim J, Sivasankaran R, Sega R, He Z (2002)
P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and Omgp.
Nature 420: 74-78.

Watanabe M, Fukuda Y (2002)
Survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells in adult cats.
Progress in Retinal and Eye Research 21: 529-553.

Wei S, Dai X-M, Stanley ER (2006)
Transgenic expression of CSF-1 in CSF-1 receptor-expressing cells leads to macrophage activation, osteoporosis, and early death.
J Leukoc Biol 80: 1445-1453.

Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR (2007) Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NF{kappa}B.
Genes Dev 21: 1396-1408.

Yin Y, Cui Q, Li Y, Irwin N, Fischer D, Harvey AR, Benowitz LI (2003)
Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration.
J Neurosci 23: 2284-2293.

Yin Y, Henzl MT, Lorber B, Nakazawa T, Thomas TT, Jiang F, Langer R, Benowitz LI (2006)
Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells.
Nature Neurosci 9(6): 843-852.

Zeev-Brann AB, Lazarov-Spiegler O, Brenner T, Schwartz M (1998)
Differential effects of central and peripheral nerves on macrophages and microglia.
Glia 23: 181-190.

Zhang C, Lu Q, You S, Zhi Y, Yip H, Wu W, So K, Cui Q (2005)
CNTF and BDNF have similar effects on retinal ganglion cell survival but differential effects on nitric oxide synthase expression soon after optic nerve ijury.
IOVS 46(4): 1497-1503.

Zhao L, Hart S, Cheng J, Melenhorst JJ, Bierie B, Ernst M, Stewart C, Schaper F, Heinrich PC, Ullrich A, Robinson GW, Hennighausen L (2004)
Mammary Gland Remodeling Depends on gp130 Signaling through Stat3 and MAPK.
J Biol Chem 279: 44093-44100.

Ziegler-Heitbrock L (2007)
The CD14+ and CD16+ blood monocyte: their role in infection and inflammation.
J Leukoc Biol 81: 584-592.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Fischer, Arbeitsgruppenleiter der Experimentellen Neurologie der Universität Ulm, für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung. Anregende Diskussionen und eine enge Zusammenarbeit haben zum Gelingen dieser Arbeit und zur Faszination der Regenerationsforschung beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Horn, Abteilung für Neurobiologie, danke ich recht herzlich für sein Interesse an dieser Arbeit. Ebenso bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn PD Dr. Stein für die Begutachtung dieser Arbeit und für die gute Zusammenarbeit.

Ebenso ein besonderer Dank den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fischer für die gute Zusammenarbeit, Unterstützung und gute Arbeitsatmosphäre.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meiner Frau, die mich stets mit einem offenen Ohr begleitet haben und ohne deren Unterstützung, Studium und Promotion nicht möglich gewesen wäre.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name:	Hauk, geb. Warzok
Vorname:	Thomas Georg
Adresse:	Wollmarktstrasse 22
	73230 Kirchheim u. Teck
Geburtstag:	14.12.1976
Geburtsort:	Ratibor / OS
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schule und akademische Ausbildung:

08/1983 – 07/1987	Geschwister-Scholl-Grundschule in Mannheim
08/1987 – 07/1997	Lessing-Gymnasium in Mannheim
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
10/1998 – 07/1999	Studium der Allgemeinen Agrarwissenschaften
	an der Universität Stuttgart-Hohenheim
10/1999 – 08/2004	Wechsel zum Studium der Biologie an der
	Universität Stuttgart-Hohenheim
	Abschluss: Diplom-Biologe
11/2004 – aktuell	Promotionsstudent an der Universität Ulm,
	Klinik für Neurologie

Veröffentlichungen

Wissenschaftliche Publikationen:

Hauk T.G., Müller A., Lee J., Schwendener R., Fischer D. (2008)
Neuroprotective and axon growth promoting effects of intraocular inflammation do not depend on oncomodulin or on the presence of large numbers of activated macrophages.
Exp Neurology 209(2): 469-482.

Fischer D., Hauk T.G., Müller A., Thanos S. (2008)
Cystallins of the ß/γ- superfamily mimic the effects of lens injury and promote axon regeneration.
MCN 37(3): 471-479.

Müller A., Hauk T.G., Fischer D. (2007)
Astrocyte-derived CNTF switches mature RGCs to a regenerative state following inflammatory stimulation.
Brain 130(12): 3308-3320.

Abstracts/Symposium:

D. Fischer, T.G. Hauk, J. Lee, R. Schwendener
Neuroprotective and growth promoting effects of a lens injury on retinal ganglion cells are not mediated by activated macrophages.
7th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, 29.03. – 01.04.2007

J. Lee[1], T.G. Hauk[1], L. Nonnenmacher, T.M. Böckers, D. Fischer
Characterization of LINA a new axonal regeneration promoting factor.
7th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, 29.03. – 01.04.2007
[1] Erstautor

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Ulm, den 21 Mai 2008