

Vergleich des retinalen Ganglienzelltods im experimentellen  
autoimmunen Glaukom Tiermodell nach systemischer  
Immunisierung mit aufgereinigten retinalen Proteinen

---

**Jennifer Schiwek**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin  
Klinik für Kleintiere (Chirurgie)  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

und

der Abteilung für experimentelle Ophthalmologie  
der Augenklinik des Fachbereichs Medizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Franz Grus

Vergleich des retinalen Ganglienzelltods im  
experimentellen autoimmunen Glaukom Tiermodell  
nach systemischer Immunisierung mit aufgereinigten  
retinalen Proteinen

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

**Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Jennifer Schiwiek**

Tierärztin aus Kaiserslautern

Gießen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Prof. Dr. Dr. Franz Grus

Tag der Disputation: 02.07.2012

Für meine Eltern  
und Jörn N. Gukenbiehl

*„Alles Große in unserer Welt geschieht nur, weil jemand mehr tut,  
als er muß.“*

*Hermann Gmeiner*



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>3</b>
2.1 Das Auge	3
2.1.1 Allgemeine Übersicht der okulären Anatomie der Haussäugetiere	3
2.1.2 Spezielle Anatomie und Physiologie ausgewählter okulärer Strukturen bei Haussäugetieren	5
2.1.3 Anatomische Unterschiede des Auges bei Mensch, Hund, Katze und Ratte	6
2.1.4 Histologischer Aufbau der Retina der Haussäugetiere	7
2.1.4.1 Die retinale Ganglienzelle	11
2.2 Das Glaukom	14
2.2.1 Ätiologie und Pathogenese	14
2.2.2 Diagnostische Mittel	15
2.2.3 Klassifizierung des Glaukoms bei Hund und Katze	15
2.2.3.1 Primärglaukome	16
2.2.3.2 Sekundärglaukome	19
2.2.3.3 Kongenitales Glaukom	22
2.2.3.4 Das absolute Glaukom	23
2.3 Glaukom Modelle	23
2.3.1 Modelle mit erhöhtem Augeninnendruck	24
2.3.1.1 Konstante Beleuchtung	24
2.3.1.2 Episclerale Injektion hypertoner Salzlösungen	24
2.3.1.3 Laser Photokoagulation der Kammerwasserabflusswege	25
2.3.1.4 Kauterisierung der extraokulären Venen	25
2.3.1.5 Intracamere Injektion von Hyaluronsäure	26
2.3.1.6 Intracamere Injektion von Mikrosphären	26
2.3.2 Modelle mit physiologischem Augeninnendruck	27
2.3.2.1 Intravitreale Injektion von stimulierenden Aminosäuren	27
2.3.2.2 Schädigung des Nervus opticus	27
2.3.2.3 Ischämie Modell	28

2.3.2.4	Endothelin bedingte optische Neuropathien	29
2.3.3	Experimentelles autoimmunes Glaukom Modell	29
2.4	Immunsystem und Autoimmunität	30
2.4.1	Autoimmune Beteiligung am Glaukom	32
2.4.2	Das Immunprivileg des Auges	34
<b>3.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>35</b>
3.1	Studiengestaltung	35
3.1.1	Studie zum experimentellen autoimmunen Glaukom Tiermodell	35
3.2	Versuchstiere	37
3.2.1	Gewichtskontrolle	38
3.3	Messung des Augeninnendruckes	38
3.4	Funduskopie	39
3.5	Blutabnahme	41
3.5.1	Blutabnahme aus der Schwanzvene	41
3.5.2	Blutentnahme durch Herzpunktion	42
3.6	Immunisierung	43
3.7	Tötung der Versuchstiere	44
3.8	Kammerwasserentnahme	45
3.9	Organentnahme	45
3.9.1	Verwendete Lösungen	45
3.9.2	Entnahme von Augen und Sehnerven	45
3.9.3	Entnahme von Gehirn und Rückenmark	46
3.10	Flatmountpräparation	46
3.11	Kresylviolett Färbung	47
3.11.1	Verwendete Lösungen	48
3.12	Flatmountausmessung	49
3.13	Flatmountfotografie und Zellauszählung	51
3.14	Statistische Verfahren	53
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>56</b>
4.1	Versuchstiere	56



4.1.1	Gewichtskontrolle der Versuchstiere	56
4.2	Augeninnendruckmessung	56
4.3	Funduskopie	60
4.4	Ergebnisse der Flatmountausmessung	61
4.5	Ergebnisse der Kresylviolett Färbung und Flatmountfotografie	64
4.6	Ergebnisse der Zellauszählung	65
4.6.1	Auswertung der Anzahl der Neurone	66
4.6.2	Auswertung der Anzahl der parvozellulären Neurone	69
4.6.3	Auswertung der Anzahl der magnozellanen Neurone	72
4.6.4	Auswertung der Anzahl der Gliazellen	76
4.6.5	Auswertung der Anzahl der Endothelzellen	78
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>82</b>
5.1	Intraokularer Druck (IOP)	82
5.2	Funduskopie	85
5.3	Bewertung der Zellauszählung nach Zellklassen	87
5.4	Betrachtung der Zellzahlen	91
5.5	Mögliche Pathomechanismen nach der $\beta$ -Aktin Immunisierung	93
5.6	Mögliche pathologische Vorgänge nach der Immunisierung mit saurem Gliafaser Protein (GFAP)	95
5.7	Einfluss der Tubulin Immunisierung auf retinale Ganglienzellen	97
5.8	Mögliche pathologische Vorgänge nach der Immunisierung mit dem Gliazell-abgeleiteten neurotrophen Faktor (GDNF)	99
5.9	Mögliche Pathomechanismen nach der Immunisierung mit dem calciumbindenden Protein S100	102
5.10	Mögliche Mechanismen nach der Immunisierung mit Kombinationen von Hitzeschockprotein 27 mit S100 oder GDNF	104
5.11	Vergleich des experimentellen autoimmunen Glaukom Modell mit dem Glaukom	107
<b>6.</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN</b>	<b>108</b>

<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>110</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>113</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>116</b>
<b>10.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>149</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACAID	Anterior chamber associated immune device
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANOVA	Analysis of variance
Apaf-1	Apoptose aktivierender Faktor-1
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ARVO	Association for research in vision and ophthalmology
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
Daxx	death-domain-associated protein
DGfAE	Deutsche Gesellschaft für Autoimmun-Erkrankungen
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EAAT	Excitatory Amino Acid Transporter
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalitis
EAG	experimentelles autoimmunes Glaukom
EAU	experimentelle autoimmune Uveitis
EGS	European Glaucoma Society
<i>g</i>	1 <i>g</i> = 9,81 m/s <sup>2</sup> = Erdbeschleunigung
g	Gramm
GDNF	Glia cell-line derived neurotrophic factor (Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor)
GFAP	Glia fibrillary acid protein (Saures Gliafaserprotein)
HSP 27	Hitzeschockprotein 27
IOP	intraocular pressure
IPA	Isopropanol
l	Liter
kDa	Kilodalton
Lsg.	Lösung
M.	Musculus

## Verzeichnisse

---

mg	Milligramm
min	Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µm <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mol	Einheitszeichen der SI-Basiseinheit der Stoffmenge
N.	Nervus
n.	nervi
NaCl	Natriumchlorid
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
NMDA-R	N-Methyl-D-aspartat-Rezeptor
nmol	Nano mol
NO	Stickoxid
NTG	normal tension glaucoma
OCT	okulare Kohärenz Tomographie
PBS	phosphate buffered saline
pHSP 27	phosphoryliertes Hitzeschockprotein 27
POAG	primary open-angle glaucoma
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
RGA	retinale Ganglienzelle A
RGB	retinale Ganglienzelle B
RGC	retinale Ganglienzelle C
RGZ	retinale Ganglienzelle
ROS	Reactive oxygen species
S100	calciumbindendes Protein S100
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
sek.	Sekunde
TGF	Transforming growth factor

## Verzeichnisse

---

TSchG	Tierschutzgesetz
XEM	Xylool Ersatzmedium
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1:</b>	Schematische Darstellung des Augapfels der Haussäugetiere	4
<b>Abbildung 2:</b>	Schematische Darstellung des vorderen Augenabschnitts der Haussäugetiere	5
<b>Abbildung 3:</b>	Die funktionelle Verknüpfung der Retinazellen	10
<b>Abbildung 4:</b>	Aussehen und die Größenverhältnisse der alpha-, beta-, gamma- und delta-Zellen in der Retina der Katze	12
<b>Abbildung 5:</b>	Messung des intraokularen Druckes mit dem Tonopen	39
<b>Abbildung 6:</b>	Narkotisierte Ratte mit Narkosemaske (links); Blick auf den Fundus (rechts)	40
<b>Abbildung 7:</b>	Ratte in der Rattenblutentnahmehalterung (links); Punktion einer der lateralen Venen (rechts)	42
<b>Abbildung 8:</b>	Beispiel einer Flatmountausmessung	50
<b>Abbildung 9:</b>	Schematische Darstellung der vier zentralen und der vier peripheren Areale die von jedem Flatmount fotografiert wurden	52
<b>Abbildung 10:</b>	Darstellung eines mit Markern versehenen Flatmountfoto (links); mit dazugehöriger Zellzahl des jeweiligen Markertyps (rechts)	53
<b>Abbildung 11:</b>	Berechnungsformel des arithmetischen Mittelwertes	53
<b>Abbildung 12:</b>	Berechnungsformel der Standardabweichung	54
<b>Abbildung 13:</b>	Berechnungsformel des Standardfehlers	55
<b>Abbildung 14:</b>	Verlauf des IOP der $\beta$ -Aktin-, GFAP-, Tubulin-Gruppe und der Kontrollgruppe	59
<b>Abbildung 15:</b>	Verlauf des IOP der GDNF+HSP 27-, S100+HSP 27-, GDNF-, S100-Gruppe und Kontrollgruppe	60
<b>Abbildung 16:</b>	Fundusaufnahmen eines Auges zu verschiedenen Studienzeitpunkten	61
<b>Abbildung 17:</b>	Mittlere Schrumpfung der $\beta$ -Aktin-, GFAP-, Tubulin-Gruppe und der Kontrollgruppe	63
<b>Abbildung 18:</b>	Mittlere Schrumpfung der GDNF+HSP 27-, S100+HSP 27-, GDNF-, S100-Gruppe und Kontrollgruppe	64

<b>Abbildung 19:</b>	Vergleich der Fotos aus zentralen und peripheren Arealen	65
<b>Abbildung 20:</b>	Vergleich der Fotos zentraler und peripherer Areale zwischen verschiedenen Immunisierungsgruppen	66
<b>Abbildung 21:</b>	Mittlere Anzahl der Neurone pro mm <sup>2</sup> der Gruppen β-Aktin, GFAP, Tubulin und der Kontrolle	68
<b>Abbildung 22:</b>	Mittlere Anzahl der Neurone pro mm <sup>2</sup> der Gruppen S100, GDNF, S100+HSP 27, GDNF+HSP 27 und der Kontrolle	69
<b>Abbildung 23:</b>	Mittlere Anzahl der parvozellulären Neurone pro mm <sup>2</sup> der Gruppen β-Aktin, GFAP, Tubulin und der Kontrolle	71
<b>Abbildung 24:</b>	Mittlere Anzahl der parvozellulären Neurone pro mm <sup>2</sup> der Gruppen S100, GDNF, S100+HSP 27, GDNF+HSP 27 und der Kontrolle	72
<b>Abbildung 25:</b>	Mittlere Anzahl der magnozellanen Neurone pro mm <sup>2</sup> der Gruppen β-Aktin, GFAP, Tubulin und der Kontrolle	74
<b>Abbildung 26:</b>	Mittlere Anzahl der magnozellanen Neurone pro mm <sup>2</sup> der Gruppen S100, GDNF, S100+HSP 27, GDNF+HSP 27 und der Kontrolle	75
<b>Abbildung 27:</b>	Mittlere Anzahl der Gliazellen pro mm <sup>2</sup> der Gruppen β-Aktin, GFAP, Tubulin und der Kontrolle	77
<b>Abbildung 28:</b>	Mittlere Anzahl der Gliazellen pro mm <sup>2</sup> der Gruppen S100, GDNF, S100+HSP 27, GDNF+HSP 27 und der Kontrolle	78
<b>Abbildung 29:</b>	Mittlere Anzahl der Endothelzellen pro mm <sup>2</sup> der Gruppen β-Aktin, GFAP, Tubulin und der Kontrolle	80
<b>Abbildung 30:</b>	Mittlere Anzahl der Endothelzellen pro mm <sup>2</sup> der Gruppen S100, GDNF, S100+HSP 27, GDNF+HSP 27 und der Kontrolle	81

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1:</b>	Immunisierungsschema der einzelnen Gruppen der EAG Studie mit genauer Angabe der Bestandteile, ihres Volumens und ihrer Konzentrationen	44
<b>Tabelle 2:</b>	Zusammensetzungen der Lösungen der Alkoholreihe	49
<b>Tabelle 3:</b>	Zusammensetzungen der Pufferlösungen und Färbelösungen	49
<b>Tabelle 4:</b>	Mittelwerte, Standardabweichungen (SD) und Standardfehler (SE) der IOP Messungen für alle Gruppen zu den jeweiligen Studienzeitpunkten	57
<b>Tabelle 5:</b>	Mittelwerte der gemessenen Schrumpfung für jede Gruppe in Prozent mit Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SE)	62
<b>Tabelle 6:</b>	Mittlere Anzahl der Neurone pro mm <sup>2</sup> der einzelnen Gruppen	67
<b>Tabelle 7:</b>	Mittlere Anzahl der parvozellulären Neurone pro mm <sup>2</sup> der einzelnen Gruppen	70
<b>Tabelle 8:</b>	Mittlere Anzahl der magnozöllulären Neurone pro mm <sup>2</sup> der einzelnen Gruppen	73
<b>Tabelle 9:</b>	Mittlere Anzahl der Gliazellen pro mm <sup>2</sup> der einzelnen Gruppen	76
<b>Tabelle 10:</b>	Mittlere Anzahl der Endothelzellen pro mm <sup>2</sup> der einzelnen Gruppen	79



## 1 EINLEITUNG

Das Glaukom wird in der Humanmedizin global als zweithäufigste Ursache einer irreversiblen Erblindung gewertet (Quigley 1996). Weltweit werden im Jahre 2020 vermutlich 80 Millionen Menschen an einer Glaukomerkrankung leiden (Quigley und Broman 2006). Beim Hund liegt die Gesamtprävalenz für ein Glaukom bei ca. einem Prozent (Gelatt und MacKay 2004b). Bei der Katze ist die Prävalenz zwar insgesamt geringer, jedoch sind Rassekatzen deutlich häufiger betroffen (Ridgway und Brightman 1989). Dabei ist anzumerken, dass ein Glaukom gerade beim Tier oft unerkannt bleibt, da die Anzeichen für diese Erkrankung vom Besitzer meist nicht wahrgenommen werden.

Beim Menschen wird selbst in hochentwickelten Industrieländern die Zahl der unerkannten Glaukomerkrankungen auf bis zu 50% geschätzt (Pfeiffer 2001). Nur 60-75% der Glaukumpatienten weisen einen erhöhten intraokularen Druck (IOP) von über 21 mmHg auf (Sommer et al. 1991). Bei circa 30% der an Glaukom erkrankten Menschen können glaukombedingte Schädigungen des Auges festgestellt werden, obwohl der IOP im physiologischen Bereich liegt (Quigley 1993). Deshalb ist der erhöhte IOP mittlerweile nicht mehr Bestandteil der Glaukomdefinition. Er gilt jedoch weiterhin als bedeutendster Risikofaktor. Die European Glaucoma Society (EGS) definiert das Glaukom derzeit als Gruppe okulärer Erkrankungen, welche sich hauptsächlich durch einen irreversiblen und fortschreitenden Untergang von retinalen Ganglienzellen (RGZ) mit letztendlichem Verlust visueller Funktionen auszeichnen (EGS 2008). Dabei sind die Ursachen, die ein Glaukom auslösen können, von völlig unterschiedlicher Natur.

Derzeit wird viel über eine autoimmune Beteiligung an der Pathogenese des Glaukoms diskutiert. Es gibt bereits verschiedene Studien, in denen eine Erhöhung von Autoantikörpertitern während des Glaukoms gemessen wurde und die damit die Hypothese stützen, dass das Glaukom bei manchen Patienten eine Autoimmunkrankheit sein könnte.

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, weitere Erkenntnisse darüber zu erlangen, welche Antigene in der Pathogenese des Glaukoms von Bedeutung sind und den Untergang retinaler Ganglienzellen verursachen. Letztendlich sollen die Ergebnisse dieser Studie dazu beitragen, die Früherkennung des Glaukoms,

eventuell über spezifische Antikörpertiterbestimmung im Blutserum, zu verbessern. Dies wäre auch in der Tiermedizin von großem Vorteil.

Beispielsweise klagen Patienten mit einem Normaldruckglaukom bereits über Gesichtsfeldausfälle, während keine weiteren Symptome für ein Glaukom festzustellen sind (EGS 2008). Diesen wichtigen Hinweis für den behandelnden Arzt können Tiere in dieser Form nicht geben, was Diagnose und Therapie der Erkrankung deutlich erschwert. Die Verbesserung der Früherkennung, möglicherweise auch ohne sonstige Hinweise des betroffenen Patienten, stellt somit für die Tiermedizin einen äußerst wichtigen Fortschritt dar und eröffnet die Möglichkeit für neuere und frühzeitigere Behandlungsmethoden, die das Tier vor weiteren Schäden und der Erblindung bewahren könnten.

Um die Auswirkungen verschiedener Antigene auf retinale Ganglienzellen zu ermitteln, wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines experimentellen autoimmunen Glaukom Tiermodells (EAG) verschiedene, für die Pathogenese des Glaukoms wichtige Parameter gemessen und ausgewertet. Dazu zählen die Messung des IOP, die Bewertung der Funduskopie, sowie das Bestimmen der Anzahl Neurone der Retina für jedes Auge zum Studienendpunkt mit Hinblick auf das verabreichte Antigen. Die Ergebnisse werden statistisch ausgewertet und abschließend diskutiert.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Das Auge

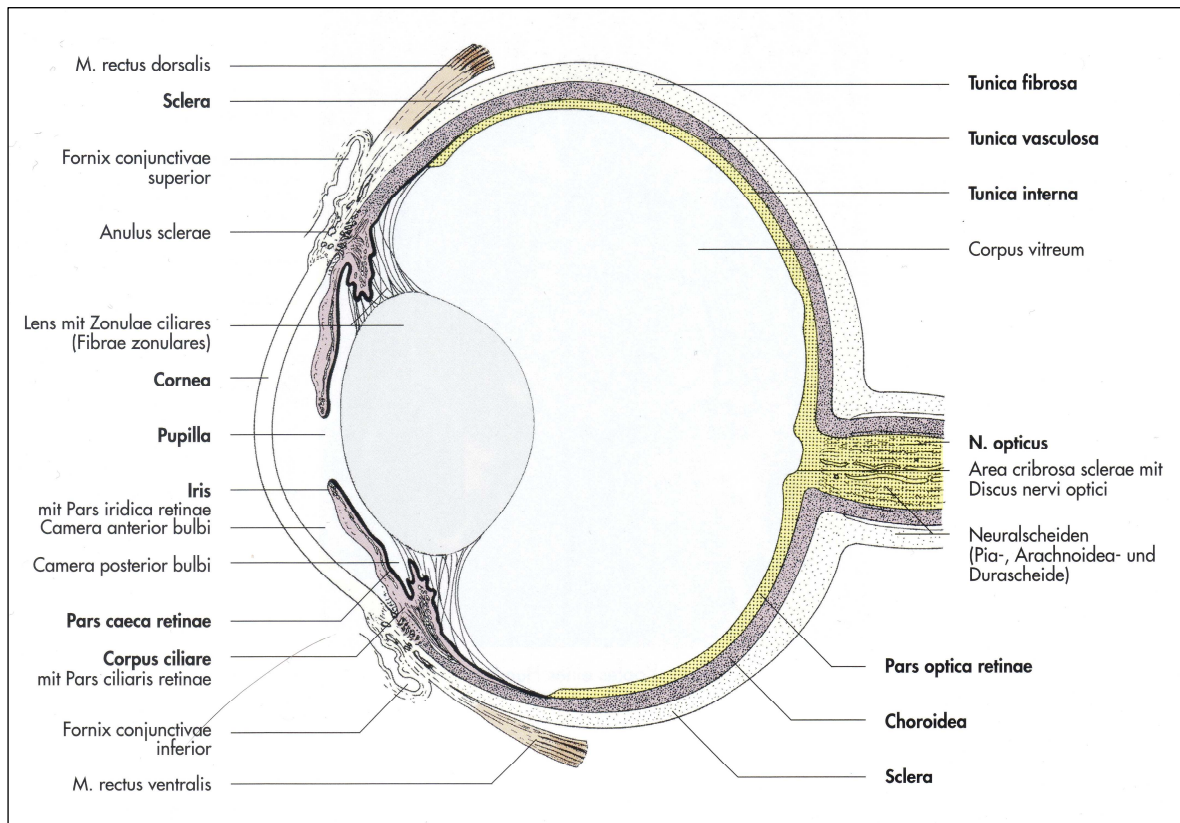
#### 2.1.1 Allgemeine Übersicht der okulären Anatomie der Haussäugetiere

Die Wand des Augapfels ist, wie in Abbildung 1 ersichtlich, aus drei konzentrischen Schichten aufgebaut, die zusammen eine Hohlkugel bilden (Nickel et al. 2004; König und Liebich 2005; Walde et al. 2008; Tóth et al. 2010).

Die äußere Augenhaut (Tunica fibrosa bulbi) stellt eine formgebende, derb-fibröse bindegewebige Hülle dar. Sie setzt sich aus der durchsichtigen Hornhaut (Cornea) im vorderen Abschnitt des Auges und der undurchsichtigen, weißen Lederhaut (Sclera) im hinteren Teil des Auges zusammen (Nickel et al. 2004; König und Liebich 2005).

Die mittlere Augenhaut (Tunica vasculosa bulbi oder Uvea) ist eine dünne Bindegewebshaut, die Gefäße, Pigmentzellen, Nervengeflechte und elastische Fasern enthält (König und Liebich 2005). Im hinteren Abschnitt des Augapfels bildet sie die Aderhaut (Choroidea). Unmittelbar vor der Übergangsstelle der Lederhaut in die Hornhaut verdickt sich die mittlere Augenhaut zu einem ringartigen Wulst, dem sogenannten Strahlenkörper bzw. Ziliarkörper (Corpus ciliare). Im vordersten Abschnitt des Bulbus bildet die Uvea im Anschluss an den Strahlenkörper das Stützgerüst der Regenbogenhaut (Iris). Die Iris begrenzt als verstellbare Blende die Pupille (Nickel et al. 2004; Walde et al. 2008).

Die innere Augenhaut (Tunica interna bulbi) oder auch Netzhaut (Retina) ist entwicklungsgeschichtlich als spezifische Abwandlung der embryonalen Vorderhirnwand zu verstehen (Nickel et al. 2004; Tóth et al. 2010). Die Netzhaut lässt sich in zwei Schichten aufteilen. Dabei wird das äußere, einschichtige Pigmentepithel (Stratum pigmentosum retinae) und das innere, vielschichtige Nervenblatt (Stratum nervosum retinae) unterschieden. Die Retina besteht aus einem optisch reizbaren, lichtempfindlichen Teil (Pars optica retinae) und einem optisch nicht reizbaren Abschnitt (Pars caeca retinae) (Nickel et al. 2004; König und Liebich 2005; Walde et al. 2008). Letzterer überzieht den Corpus ciliare und die Iris an ihrer inneren Oberfläche. Am Augenhintergrund vereinigen sich die aus der Pars optica retinae stammenden afferenten Nervenfasern konvergierend zum Discus nervi optici. Diese Nervenfasern bilden nach dem Durchtritt durch die Area cribrosa sclerae die Nervenfaserbündel des Nervus opticus (Nickel et al. 2004).



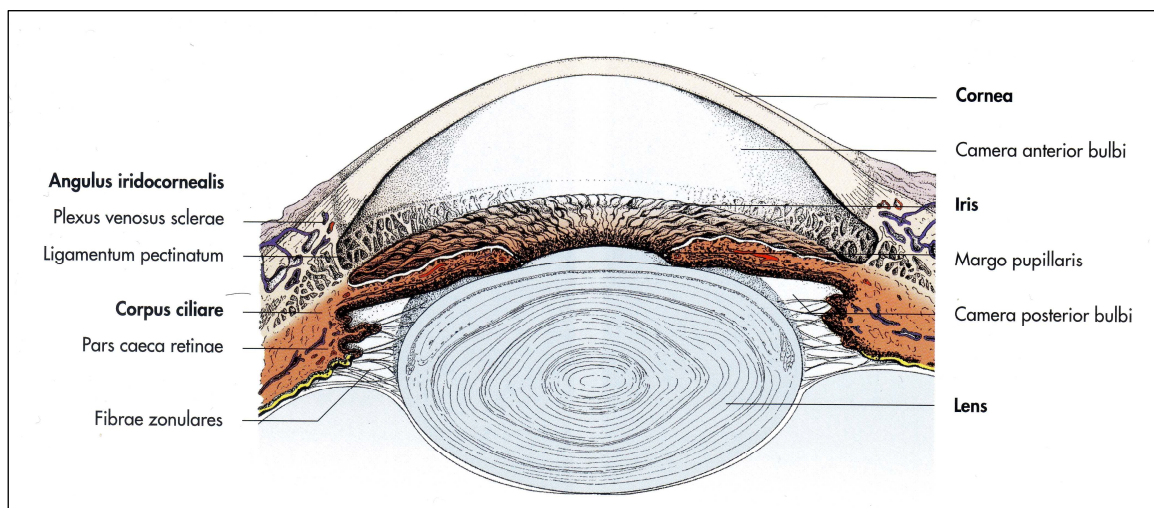
**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Augapfels der Haussäugetiere (Vertikalschnitt). Quelle: König und Liebich (2005)

Die Linse (Lens) befindet sich zwischen der Iris und dem Glaskörper und ist mit den Zonularfasern (Zonula ciliaris) am Ziliarkörper befestigt (Walde et al. 2008; Tóth et al. 2010). Sie separiert die, mit Kammerwasser (Humor aquosus) gefüllten, im vorderen Augenabschnitt befindlichen Augenkammern vom dahinter gelegenen Glaskörperraum (Camera vitrea bulbi). Der Glaskörperraum nimmt den größten Teil des Augenvolumens ein und ist durch den gallertartigen Glaskörper (Corpus vitreum) ausgefüllt (Nickel et al. 2004). Die vordere Augenkammer (Camera anterior bulbi) befindet sich zwischen Vorderfläche der Iris und der Cornea. Die hintere Augenkammer (Camera posterior bulbi) liegt zwischen der Linse bzw. den Zonularfasern und der Hinterfläche der Iris. Beide Augenkammern stehen über die Pupille miteinander in Verbindung (siehe Abbildungen 1 und 2) (Nickel et al. 2004; König und Liebich 2005; Walde et al. 2008).

## 2.1.2 Spezielle Anatomie und Physiologie ausgewählter okulärer Strukturen bei Haussäugetieren

### Kammerwinkel

Das bindegewebige Grundgerüst der Iris geht am Margo ciliaris direkt in das des Corpus ciliare über (Abb. 2). Dabei treten feine, pigmentierte Bindegewebsbalken mit Cornea und Sclera in Verbindung und erzeugen so den Kammerwinkel (Angulus iridocornealis). Das Trabekelwerk in diesem Winkel wird als Ligamentum pectinatum anguli iridocornealis bezeichnet und enthält kleine spaltenförmige Hohlräume, die Spatia anguli iridocornealis oder Fontanasche Räume. Diese Hohlräume stehen mit der vorderen Augenkammer in Verbindung und enthalten das Kammerwasser. Der Kammerwinkel ist für die Regulation des Augeninnendruckes von großer Bedeutung (Nickel et al. 2004).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des vorderen Abschnitts des Augapfels der Haussäugetiere. Quelle: König und Liebich (2005)

### Produktion und Abfluss des Kammerwassers

Der epitheliale Überzug der Ziliarfortsätze bildet das Kammerwasser, welches passiv durch die Pupille in die vordere Augenkammer gelangt (König und Liebich 2005). Das Kammerwasser wird durch Diffusion, Ultrafiltration und aktive Sekretion gebildet (Gum et al. 1999; Walde et al. 2008). Über Diffusion können fettlösliche Verbindungen aus einem Gebiet mit höherer Konzentration in Gebiete gelangen, die niedrigere Konzentrationen der Verbindungen aufweisen. Wenn mit hydrostatischer Kraft Stoffverbindungen durch die Zellmembran geschleust werden, spricht man von

Ultrafiltration. Die aktive Sekretion bezeichnet einen Vorgang, bei dem unter Energieverbrauch der Transport eines Stoffes gegen das Konzentrationsgefälle stattfindet. Letzterer ist der bedeutenste Mechanismus der Kammerwasserproduktion. Dabei werden Natriumionen aktiv in die hintere Augenkammer transportiert. Durch Osmose folgt der Einstrom von Wasser (Walde et al. 2008). Je nach Tierspezies werden unterschiedliche Mengen an Kammerwasser produziert. Im Hundeaugen werden im physiologischen Zustand zwei Mikroliter ( $\mu\text{l}$ ) Kammerwasser pro Minute (min) erzeugt, im Katzenauge hingegen 14-20  $\mu\text{l}/\text{min}$  (Pfeiffer et al. 1999).

Der Kammerwasserabfluss erfolgt über in der Sclera gelegene, mit Endothel ausgekleidete Spalten. Diese werden als Plexus venosus sclerae bezeichnet, da sie Anschluss zu scleralen Venen haben (Nickel et al. 2004). Neben dem konventionellen Abflussweg über den Kammerwinkel gibt es noch einen weiteren. Dabei dringt das Kammerwasser direkt in das Stroma der Iris, den Ziliarkörper und die Choroidea ein, von wo aus es über Venen abtransportiert wird (Gum et al. 1999). Die Aufgabe des Kammerwassers besteht in der Ernährung der Strukturen im Auge, die keine Blutgefäße besitzen (König und Liebich 2005).

### **2.1.3 Anatomische Unterschiede des Auges bei Mensch, Hund, Katze und Ratte**

In der Relation zur Körpergröße besitzt die Katze unter den Haussäugetieren den größten Augapfel, gefolgt vom Hund (Clerc und Krähenmann 1990; König und Liebich 2005). Beim Menschen ist der Augapfel im Verhältnis zur Größe des Körpers eher klein. Die Pupille von Mensch und Hund ist sowohl im geweiteten, als auch im verengten Zustand weitgehend rund, während die der Katze nur in maximaler Mydriasis rund ist und bei Miosis spaltförmig erscheint. Dies geschieht, da sich bei Mensch und Hund das Gewebe der Iris beim Pupillenspiel gleichmäßig rafft oder dehnt, wohingegen sich bei der Katze die Pupille nur entlang der Längsseiten rafft oder dehnt. An den Enden des Sehspalts der Pupille der Katze kreuzen sich die Fasern des M. sphincter pupillae gitterartig und verursachen so gut wie keine Raffung oder Dehnung (Nickel et al. 2004).

Der zwischen dem bei Carnivoren besonders ausgeprägten Sclerawulst und dem Anulus sclerae befindliche Plexus venosus sclerae entspricht dem Sinus venosus

sclerae (Schlemmscher Kanal) des Menschen und reguliert ebenso wie dieser den Bulbusinnendruck (Nickel et al. 2004).

Das Tapetum lucidum fehlt dem Menschen und dem Schwein. Es besteht bei Carnivoren aus mehreren Schichten abgeplatteter Zellen, die als besonders spezialisierte Melanozyten anzusehen sind (Tapetum cellulosum). Bei einfallenden Lichtstrahlen kommt es zu schillernden Farbeffekten am Augenhintergrund und Aufleuchten des Auges im Dunkeln. Das Tapetum der Katze, welches den Discus n. optici ventral umgibt, erscheint gelbgrünlich mit blaugrünlichem Rand. Für diese gelbgrünliche Fluoreszenz wird bei der Katze das Vitamin B<sub>2</sub>, das Riboflavin, verantwortlich gemacht. Beim Hund zeigt sich das Tapetum in einem Farbspektrum von goldgrün, über metallisch schillernd, bis hin zu weiß oder graublau (Nickel et al. 2004).

Beim Menschen bildet die Austrittsstelle des N. opticus eine leichte Erhebung, weshalb sie auch als Papilla n. optici bezeichnet wird. Da diese Erhebung bei den Haussäugetieren fehlt, wird diese Stelle bei ihnen schlicht als Discus n. optici bezeichnet. Bei der Katze besitzt der Discus n. optici eine rundliche, beim Hund eher eine dreieckige, aber oft auch eine rassebedingte ovale oder rundliche Form. Die Vertiefung in der Mitte des Discus n. optici, die Excavatio disci, ist beim Menschen deutlicher ausgeprägt als bei den Haussäugetieren (Nickel et al. 2004).

Der Punkt des schärfsten Sehens wird beim Menschen aufgrund seiner gelblichen Färbung als Macula lutea bezeichnet. Zudem besitzt er eine leichte Eindellung (Fovea centralis). Sowohl diese Eindellung, als auch die gelbliche Farbe fehlen bei Hund und Katze, weshalb der Punkt des schärfsten Sehens bei ihnen als Area centralis retinae bezeichnet wird (Nickel et al. 2004).

Bei der Ratte ist die Möglichkeit zum Scharfsehen sehr eingeschränkt. In der Netzhaut der Ratte finden sich als Photorezeptoren nur die Stäbchen, Zapfen sind nicht vorhanden. Die Stäbchen ermöglichen lediglich das Schwarz-Weiß Sehen. Sie sind aber lichtempfindlicher als die Zapfen und verhelfen der Ratte zu einer ausgezeichneten Sehkraft in der Dämmerung (Ludwig 2008).

### **2.1.4 Histologischer Aufbau der Retina der Haussäugetiere**

Das Stratum pigmentosum der Netzhaut liegt zwischen den Außengliedern der Photorezeptoren und der Bruch-Membran der Choroidea. Nur im Bereich des Discus

n. optici und der Ora serrata steht das einschichtige Pigmentepithel der Retina mit dem Stratum nervosum retinae in fester Verbindung (Liebich 1998; König und Liebich 2005). Wie in Abbildung 3 dargestellt, wird das Stratum nervosum der Retina von drei hintereinandergeschalteten Neuronen gebildet, die in ein Stützgerüst aus modifizierten Neurogliazellen gehüllt sind. Diese Gliazellen werden als Müllersche Stützzellen bezeichnet und durchziehen senkrecht zur Oberfläche alle Schichten des Stratum nervosum (Nickel et al. 2004). Sie bilden die äußere und innere Grenzmembran (Stratum limitans externa und interna) (Liebich 1998), zwischen denen noch sechs weitere Schichten liegen. Neben den Müllerschen Stützzellen finden sich auch Astrozyten in der Retina, die besonders häufig am Discus n. optici anzutreffen sind (Nickel et al. 2004). Die Nervenzellen befinden sich, wie in der folgenden Auflistung dargestellt, in strukturell klar voneinander abgegrenzten Schichten und stellen insgesamt drei hintereinander geschaltete Neurone dar (Liebich 1998).

### I. Neuron

- Stratum neuroepitheliale (Schicht der Stäbchen und Zapfen)
- Stratum limitans externum (äußere Grenzmembran)
- Stratum nucleare externum (äußere Körnerschicht)
- Stratum plexiforme externum (äußere plexiforme Schicht)

### II. Neuron

- Stratum nucleare internum (innere Körnerschicht)
- Stratum plexiforme internum (innere plexiforme Schicht)

### III. Neuron

- Stratum ganglionare nervi optici (Ganglienzellschicht)
- Stratum neurofibrarum (Nervenfaserschicht)
- Stratum limitans internum (innere Grenzmembran)

Aufzählung in Anlehnung an König und Liebig (2005)

## **I. Neuron**

Das Stratum neuroepitheliale besteht aus Fortsätzen von Nervenzellen, die im engeren Sinne die Photorezeptoren repräsentieren. Sie lassen sich in ein Innen- und Außenglied unterteilen. Es können funktionell und strukturell zwei Photorezeptorarten



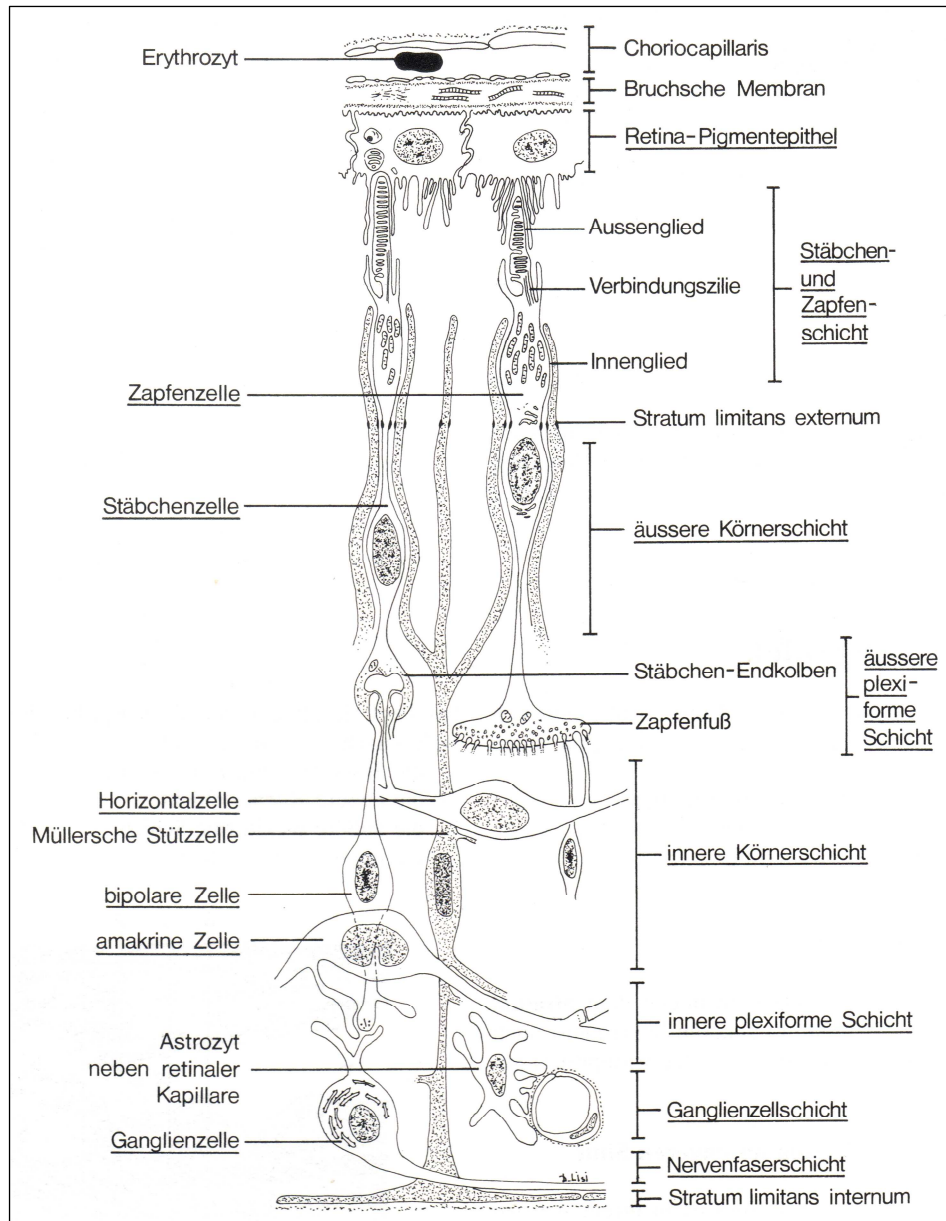
unterschieden werden: die Stäbchen und die Zapfen (siehe Abbildung 3) (Liebich 1998). Die zahlenmäßig den Zapfen weit überlegenen Stäbchen ermöglichen das Dämmerungssehen und vermitteln hauptsächlich Helligkeitsunterschiede. Die Zapfenzellen sind für das Formen- und Farbsehen verantwortlich (Nickel et al. 2004; König und Liebich 2005). Im Außenglied schließen die Stäbchen dicht gestapelte Membranscheiben (Disci) ein, welche den Sehpurpur (Rhodopsin) in sich tragen. Das Innenglied stellt das metabolische Zentrum der Energiegewinnung für die Rezeptorschicht dar und ist die Bildungsstätte der Proteine der Disci. Der Grundaufbau der Zapfen ähnelt dem der Stäbchen. Das Innenglied der Zapfen ist ein wenig größer als das der Stäbchen und das Außenglied etwas keulenartiger. Die Außenglieder enthalten den Sehfärbstoff Jodopsin. Das Innenglied ist den Stäbchen gegenüber leicht vergrößert (Liebich 1998). Es gibt keine feste Verbindung der Außenglieder der Rezeptorzellen mit dem Pigmentepithel. Lediglich kolloidosmotische Kräfte halten die Retina in Position. Deshalb kommt es bei Veränderungen des intraokularen Druckes leicht zu einer Ablösung der Netzhaut (Mosimann und Kohler 1990). Die äußere Körnerschicht wird von den kernhaltigen Zellkörpern der Photorezeptoren gebildet. Ihre Fortsätze formen mit den Dendriten der bipolaren Nervenzellen die äußere plexiforme Schicht (Liebich 1998; König und Liebich 2005).

### **II. Neuron**

Die Perikarya der bipolaren Nervenzellen bilden zusammen mit assoziierenden Horizontalzellen die innere Körnerschicht, während ihre Axone sich mit den Dendriten der Ganglienzellschicht zur inneren plexiformen Schicht verflechten. An ihrer äußeren Grenze finden sich zusätzlich eingelagerte Amakrine Assoziationszellen (siehe Abbildung 3) (Liebich 1998).

### **III. Neuron**

Die Ganglienzellschicht wird von kleineren und größeren, multipolaren Nervenzellen gebildet (Nickel et al. 2004). In der Nervenfaserschicht (Stratum neurofibrarum) bündeln sich die Axone der Ganglienzellschicht und ziehen zum Discus n. optici. Die Faserbündel verbinden sich nach der Passage der Areae cribrosa zum Nervus opticus und verlaufen hirnwärts (siehe Abbildung 3) (Liebich 1998).



**Abbildung 3:** Die funktionelle Verknüpfung der Retinazellen, schematisch. Quelle: Mosimann und Kohler (1990)

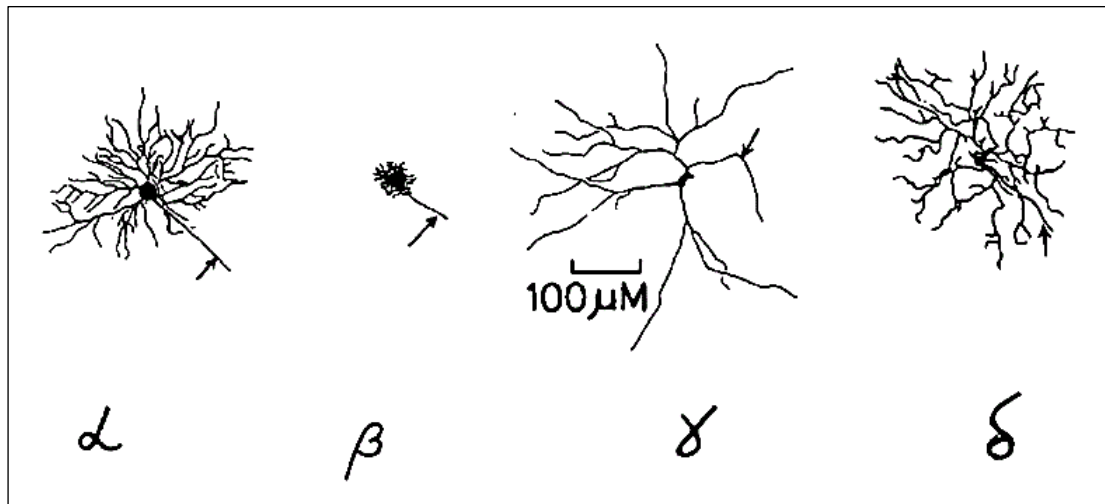
Die Perikaryen der Nervenzellen bilden nur die äussere und innere Körnerschicht, sowie die Ganglienzellschicht. Die restlichen Schichten enthalten dagegen nur die Fortsätze dieser Zellen. Der Aufbau der Retina macht deutlich, dass das Licht alle Retinaschichten durchdringen muss, um die Photorezeptoren zu erreichen (Mosimann und Kohler 1990).

#### **2.1.4.1 Die retinale Ganglienzelle**

Die Ganglienzellen bilden als innerste Schicht der Retina bei den Haussäugetieren eine einfache Zelllage. Nur in der Area centralis besteht die Ganglienzellschicht aus zwei bis drei, bei Primaten sogar aus sechs bis neun Zellschichten (Samuelson 1999). Embryonen besitzen im Allgemeinen doppelt so viele retinale Ganglienzellen wie ein erwachsener Vertebrat (Nickells 1996).

Dogiel gelingt es 1891 als erstem Wissenschaftler die Morphologie der menschlichen retinalen Ganglienzelle zu beschreiben. Er unterscheidet anhand der Verzweigungsebene und der Dendritenbaumgröße drei Ganglienzelltypen: Klasse I (Wide-field-Zellen), Klasse II (Parasolzellen) und Klasse III (Midget-Zellen) (Dogiel 1891). Nach intensiver Forschung wird festgestellt, dass es eine große morphologische Vielfalt der retinalen Ganglienzellen der Wirbeltiere gibt (Cajál 1893). Neben der Klassifizierung nach morphologischen Kriterien versuchen die Forscher die retinalen Ganglienzellen der Katze auch nach physiologischen Merkmalen in Klassen einzuteilen. Lange Zeit sind nur die On- und Off-Center Zellen stellvertretend für zwei physiologische Ganglienzellklassen in der Katzenretina bekannt (Kuffler 1952; Kuffler 1953). 1966 können zwei weitere Gruppen von Ganglienzellen klassifiziert werden, von denen vermutet wird, dass sie sich mit den On- und Off-Center Zellen decken. Sie werden als X- und Y-Zellen bezeichnet (Enroth-Cugell und Robson 1966). Die später in der Katzenretina entdeckten W-Zellen unterscheiden sich physiologisch von den bereits klassifizierten und fallen vor allem durch langsame Signalübertragungsgeschwindigkeiten auf (Stone und Hoffmann 1972).

Wie in Abbildung 4 dargestellt unterscheiden Boycott und Wässle (1974) anhand der Größe ihres rezeptiven Feldes bei der Katze die alpha-, beta- und gamma-Ganglienzellen. Diese Einteilung nach morphologischen Merkmalen stimmt mit den nach physiologischen Kriterien eingeteilten Gruppen der Y-, X- und W-Zellen überein (Boycott und Wässle 1974; Levick 1975). Auch beim Hund können, wie bei der Katze, alpha-, beta- und gamma-Ganglienzellen unterschieden werden. Dabei weisen die caninen Ganglienzellen fast die identische Morphologie, wie die felines Ganglienzellen auf. Dies lässt vermuten, dass das Repertoire an Ganglienzellen für Carnivoren weitestgehend identisch ist (Peichl 1992).



**Abbildung 4:** Die Abbildung zeigt das Aussehen und die Größenverhältnisse der alpha-, beta-, gamma- und delta-Zellen in der Retina der Katze. Der Pfeil an jeder Zelle markiert das Axon. Quelle: Boycott und Wässle (1974) modifiziert nach Enroth-Cugell und Robson (Enroth-Cugell und Robson 1984).

Die alpha- bzw. Y-Zellen, welche einen eher kleinen Dendritenbaum und einen großen Zellkern besitzen, kommen vor allem in den peripheren Bereichen der Retina vor (Samuelson 1999). Beim Hund variiert die Anzahl der alpha-Zellen deutlich. Sie machen abhängig von der Lokalisation ca. drei bis 14% der Gesamtzahl der retinalen Ganglienzellen aus (Peichl 1992). Die beta- bzw. X-Zellen sind kleiner als die alpha- bzw. Y-Zellen, haben aber mehr Dendritenäste. Sie befinden sich gehäuft in der Area centralis und sind zahlenmäßig den alpha-Zellen deutlich überlegen (Samuelson 1999). Die gamma- bzw. W-Zellen, welche einen kleinen Zellkern und dünne Dendriten haben, befinden sich wie die beta-Zellen auch vor allem in der Area centralis und sind insgesamt sehr zahlreich (Stone und Keens 1980). Neben den bereits genannten Ganglienzelltypen werden in der Katzenretina beispielsweise auch delta-Zellen als eine Subklasse der gamma-Zellen (Boycott und Wässle 1974), zeta-Zellen (Berson et al. 1998), eta-Zellen (Berson et al. 1999) und theta-Zellen (Isayama et al. 2000) identifiziert.

Bei der Ratte können anhand physiologischer Merkmale ebenfalls drei Gruppen von Ganglienzellen unterschieden werden. Die als L- (large), M- (middle) und S- (small) Zellen bezeichneten Zellen sind in ihren Eigenschaften den Y-, X- und W-Zellen der Katzenretina sehr ähnlich (Fukuda 1977). Anhand morphologischer Kriterien lassen sich die retinalen Ganglienzellen der Ratte ebenfalls in drei Klassen einteilen. Sie werden als RGA, RGB und RGC Zellen bezeichnet und haben jeweils mehrere

Untergruppen. Die RGA Zellen haben einen großen Zellkörper und ein großes, radiär verzweigtes dendritisches Feld. Sie lassen sich weiter in RGA1 und RGA2 Zellen klassifizieren. Die RGB Zellen weisen einen kleinen Zellkörper und ein kleines dendritisches Feld auf. Sie lassen sich in drei Subklassen (RGB1, RGB2, RGB3) unterteilen. Die RGC Zellen bilden die dritte morphologische Klasse der Ganglienzellen in der Rattenretina. Sie besitzen einen kleinen bis mittelgroßen Zellkörper und ein mittelgroßes bis großes dendritisches Feld. Auch hier lassen sich zwei Subklassen (RGC1, RGC2) differenzieren (Huxlin und Goodchild 1997).

Beim Menschen können die magno- und parvozellulären Ganglienzellen unterschieden werden. Die magnozellularen (großzelligen) Ganglienzellen haben einen großen Dendritenbaum, über den sie Informationen von vielen Sinneszellen (vorwiegend Stäbchenzellen) erhalten. Dadurch ist ihr rezeptives Feld in der Retina sehr groß und damit die optische Auflösung der vermittelten visuellen Information geringer (Trepel 2008). Sie sind nicht farbempfindlich und vermitteln Helligkeitszustände (Benninghoff und Drenckhahn 2004). Die parvozellulären (kleinzelligen) Ganglienzellen haben einen kleinen Dendritenbaum, mit welchem sie nur Informationen von wenigen Sinneszellen (vorwiegend Zapfenzellen) erhalten. Sie können hochauflösende und farblich definierte visuelle Informationen vermitteln, da ihr rezeptives Feld entsprechend klein ist (Trepel 2008).

Die parvozellulären Ganglienzellen, welche funktionell den X-Zellen der Katze entsprechen, machen circa 80% der Ganglienzellen aus. Während die funktionell den Y-Zellen der Katze entsprechenden magnozellularen Ganglienzellen nur zehn Prozent der retinalen Ganglienzellen ausmachen. Sie projizieren in die jeweilige Schicht des Corpus geniculatum laterale. Die restlichen zehn Prozent der menschlichen retinalen Ganglienzellen bilden eine aus unterschiedlichen Zelltypen, mit verschiedenen rezeptiven Feldeigenschaften bestehende, heterogene Gruppe, die funktionell zu den W-Zellen gezählt werden können (Benninghoff und Drenckhahn 2004).

Die bipolaren Zellen der Haussäugetiere bilden indirekt oder direkt Synapsen zwischen den Photorezeptoren und den Ganglienzellen aus. Sie können aufgrund ihrer Reaktion auf Lichteinfall in das Zentrum ihres rezeptiven Feldes in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die On-Center Zellen depolarisieren, wenn ihr Zentrum durch Lichteinfall stimuliert wird, während die Off-Center Zellen mit Hyperpolarisation auf einen Lichtreiz im Zentrum reagieren. Die Peripherie des rezeptiven Feldes

verhält sich jeweils antagonistisch zum Zentrum. Die bipolaren Zellen der Zapfen können direkt eine Synapse zu den Ganglienzellen ausbilden, während die bipolaren Zellen der Stäbchen meist über die Amakrinen Zellen mit den Ganglienzellen in synaptische Verbindung treten (Ofri 1999). Die On- und Off-Center Zellen des Menschen reagieren bei Lichteinfall genauso mit De- bzw. Hyperpolarisation wie die der Haussäugetiere (Benninghoff und Drenckhahn 2004; Trepel 2008).

## **2.2 Das Glaukom**

### **2.2.1 Ätiologie und Pathogenese**

Sowohl beim Mensch als auch beim Tier ist das Glaukom oder der so genannte grüne Star ein weit verbreitetes Krankheitsgeschehen.

Das Glaukom ist ein Sammelbegriff, unter welchem man eine Vielzahl ätiologisch uneinheitlicher Augenerkrankungen versteht (Walde 1984).

Die Erkrankung ist meist durch einen erhöhten IOP, eine Schädigung im Bereich des Sehnervenkopfes und eine langsam fortschreitende Erblindung gekennzeichnet (Jourdan 1950; Magrane 1957a; Gelatt und Brooks 1999). Wie in der Einleitung bereits erwähnt, gilt ein erhöhter IOP zwar als bedeutender Risikofaktor, ist aber nicht mehr Teil der Glaukomdefinition (EGS 2008). Die Ursache für eine IOP Erhöhung kann entweder eine Störung des Kammerwasserabflusses oder eine vermehrte Produktion des Kammerwassers durch den Ziliarkörper sein. In seltenen Fällen treten der gestörte Abfluss und die gesteigerte Produktion des Kammerwassers zusammen auf (Barnett 1970; Watson 1970; Bedford 1980a). Ein wichtiger Punkt in der Pathogenese des Glaukoms ist der Verlust retinaler Ganglienzellen (Nickells 1996; Drance 1997; Gottanka et al. 1997). Neueren Beobachtungen zufolge setzen die zerstörten Zellen Glutamat frei. Dieses verursacht ohne Beziehung zum IOP die Schädigung benachbarter, gesunder Bereiche in der Retina (McInlay et al. 2004). Des Weiteren treten bei Hunden und Katzen häufig folgende Symptome bei einem Glaukom auf: eine getrübe Cornea infolge eines Hornhautödems, eine getrübe vordere Augenkammer, eine dilatierte Pupille (Mydriasis), vermehrt gefüllt erscheinende Episcleralgefäße, Hydrophthalmus und eine Atrophie der Iris und der Retina (Jourdan 1950; Magrane 1957a; Walde et al. 2008). Ein Hydrophthalmus tritt bei Hunden, Katzen, Pferden, Rindern und Hasen

auf. Beim Menschen dagegen ist dieser nur bei Kleinkindern und Babys festzustellen, da der Augapfel beim Menschen mit der Zeit seine Dehnungsfähigkeit verliert (Gelatt und Brooks 1999). Die klinischen Anzeichen für ein Glaukom gleichen sich weitestgehend bei Hund und Katze (Ridgway und Brightman 1989; Wilcock et al. 1990). Wobei man beachten muss, dass die Symptome beim Hund wesentlich ausgeprägter sind als bei der Katze (Hampson et al. 2002).

### **2.2.2 Diagnostische Mittel**

Beim Mensch und beim Tier sind die drei wichtigsten diagnostischen Methoden zur Feststellung eines Glaukoms die Tonometrie, die Gonioskopie und die Ophthalmoskopie. Die Tonometrie ermöglicht die nicht invasive Messung des Augeninnendruckes und unterstützt dadurch die Diagnose und die Verlaufskontrolle eines Glaukoms. Durch die Gonioskopie kann eine Klassifikation der Glaukome anhand des Zustands des Iridocornealen Winkels und des ziliaren Spalts vorgenommen werden. Diese Methode ermöglicht auch Veränderungen in diesem Bereich aufzudecken, bei denen es noch nicht zu einer Erhöhung des IOP gekommen ist. Bei der Ophthalmoskopie oder Funduskopie kann der Augenhintergrund mit besonderem Augenmerk auf den Discus n. optici betrachtet werden. Diese diagnostische Methode hat schon in frühen Glaukomstadien Aussagekraft und lässt die Beurteilung des Sehnervenkopfes im Hinblick auf bereits entstandene Schäden zu (Gelatt und Brooks 1999).

### **2.2.3 Klassifizierung des Glaukoms bei Hund und Katze**

Das Glaukom kann auf der Basis der möglichen Ursache, dem gonioskopischen Befund des Kammerwinkels der vorderen Augenkammer und der Dauer bzw. des Stadiums der Erkrankung eingeteilt werden. Da kein Schema zur vollständigen Befriedigung führt, werden üblicherweise Kombinationen der drei Einteilungsmöglichkeiten verwendet (Gelatt und Brooks 1999). Die eindeutige Abgrenzung zwischen Primär- und Sekundärglaukom wird erschwert, da sich unabhängig von der jeweiligen Ätiologie die Folgezustände nicht unterscheiden (Walde 1984).

### **2.2.3.1 Primärglaukome**

Unter dem Begriff Primärglaukom versteht man eine Glaukomform, der keine Schädigungen oder Erkrankungen des Auges vorangegangen sind oder gleichzeitig bestehen (Jourdan 1950). Der Hund ist die Tierart, die am häufigsten an einem primären Glaukom erkrankt (Gelatt et al. 1998a; Gelatt et al. 1998b). Schon vor mehr als 60 Jahren wird eine Rassedisposition für den Cocker Spaniel vermutet (Magrane 1957b; Lovekin 1964). Auch in neueren Studien kann diese Rassedisposition vor allem beim Cocker Spaniel bestätigt werden (Gelatt und MacKay 2004). Bei Katzen wird die erste Rasseprädisposition bezüglich des Primärglaukoms bei der Siamkatze vermutet (Pfeiffer 1982). Das mittlere Altersspektrum der betroffenen Hunde wird mit 3,5 bis 9 Jahren angegeben. Akute Glaukomanfälle treten beim Tier gehäuft in den kälteren Monaten von Oktober bis März auf (Magrane 1957b). Es ist nachgewiesen, dass beim Mensch und beim Hund das zweite, gesunde Auge eine erhöhte Anfälligkeit für einen primären Glaukomanfall hat, wenn das erste Auge bereits erkrankt ist (Winter 1955; Magrane 1957b). Barnett ordnet das Primärglaukom des Hundes generell als bilaterales Geschehen ein, bei dem allerdings der Beginn der Erkrankung in beiden Augen einen zeitlichen Unterschied aufweisen kann (Barnett 1970). Bei der Katze hingegen tritt das Primärglaukom auch unilateral auf (Hampson et al. 2002). Durch die gonioskopische Untersuchung wird das beim Hund früher selten gesehene Krankheitsbild des Primärglaukoms bei 47% der mit Glaukom vorgestellten Patienten nachgewiesen (Walde 1984). Mittlerweile ist bei 45 Hunderassen (Gelatt und Brooks 1999) und 4 Katzenrassen (Dietrich 2005) ein Primärglaukom diagnostiziert. Am häufigsten betroffene Hunderassen sind American Cocker Spaniel, English Cocker Spaniel, Smooth and Wire Fox Terrier, Basset Hound, Sealyham Terrier, Toy-Poodle und Beagle (Gelatt und Brooks 1999). Bei den Katzen erkranken am häufigsten die Siam Katze (Pfeiffer 1982), Perser Katze, Europäisch Kurzhaarkatze (Walde und Rapp 1992) und die Burmesische Katze (Hampson et al. 2002) an einem Primärglaukom. Insgesamt kommen Primärglaukome häufiger bei reinrassigen Hunden (Martin 1977) und reinrassigen Katzen (Gelatt et al. 1998a) vor, als bei Mischlingen, was mit progressiver Rein- und Inzucht zusammenhängen könnte (Gelatt et al. 1998a).



## **Offenwinkelglaukom**

### ***Primäres Offenwinkelglaukom***

Das primäre Offenwinkelglaukom ist durch schmerzfreie, leicht vergrößerte Augen mit zunehmendem Verlust der Sehkraft gekennzeichnet. Der IOP steigt nur moderat an, was die Diagnose der Erkrankung erschwert. Da der Iridocorneale Winkel unverändert offen bleibt, ist der verminderte Abfluss des Kammerwassers und der dadurch geringgradig erhöhte IOP die Folge von Defekten im trabekulären Netzwerk und/oder der inneren Schichten der Sclera. Es erkranken meist gleichzeitig beide Augen (Bedford 1980a). Diese Glaukomform wird beim Menschen sehr häufig diagnostiziert, während sie beim Tier vergleichsweise selten gesehen wird (Stades et al. 2006). Bei histopathologischen Untersuchungen der Augen von 1100 an Glaukom erkrankten Katzen kann nur bei acht Katzen ein primäres Offenwinkelglaukom diagnostiziert werden (Jacobi und Dubielzig 2008).

### ***Normaldruckglaukom***

Bei einem Teil der Glaukopatienten in der Humanmedizin kommt es zu keiner Erhöhung des intraokularen Druckes. Das Glaukom macht sich bei diesen Patienten meist erst durch einen Gesichtsfeldausfall bemerkbar. Diese Glaukomform wird als Untergruppe der Offenwinkelglaukome angesehen und als Normaldruckglaukom bezeichnet (EGS 2008). Ähnlich diesem Normaldruckglaukom könnte es bei Beagles, bedingt durch das autosomal-rezessiv vererbte primäre Offenwinkelglaukom, zu IOP unabhängigen Funktionsstörungen retinaler Ganglienzellen und deren Axone kommen, die der klinischen Manifestation und dem Druckanstieg vorausgehen (Ofri et al. 1994). Auch andere Autoren vermuten, gestützt durch die Tatsache, dass es trotz Absenkung des IOP weiterhin zur Degeneration des Sehnervenkopfes kommt, dass IOP unabhängige Faktoren eine wichtige Rolle beim Glaukom des Hundes spielen (Brubaker 1996; Brooks et al. 1997; Gelatt et al. 1998a).

## **Engwinkelglaukom und Winkelblockglaukom**

Bedford sieht beim Hund die Entstehung des Winkelblockglaukoms, bei welchem der Iridocorneale Winkel völlig verschlossen ist, bedingt durch eine angeborene Dysgenese mit oder ohne Dysplasie des Ligamentum pectinatum (Bedford 1980a).

Angeborene Winkelanomalien treten beim Hund stets in beiden Augen auf, auch wenn der Zeitpunkt der Erkrankung unterschiedlich ist. Als häufigste Formen der Winkelanomalien gelten die bereits genannte Dysplasie des Ligamentum pectinatum und der seltener auftretende verengte Kammerwinkel (Walde 1984). Das Ligamentum pectinatum gilt als dysplastisch, wenn der Spalt zwischen Irisbasis und Pigmentband nicht durch vom Ligamentum pectinatum ausgebildeten Iristrabekel, sondern durch ein durchgehendes Bindegewebsblatt ganz oder nur teilweise überbrückt wird.

Bei einem verengten Kammerwinkel ohne ein dysplastisches Ligamentum pectinatum finden sich zwar Iristrabekel, jedoch sind sie kürzer ausgebildet und der Ziliarspalt ist demzufolge deutlich enger (Schmidt 1988). Sowohl beim Hund (Gelatt und Brooks 1999) als auch bei der Katze kommt das primäre Engwinkelglaukom vor (Hampson et al. 2002).

Watson (1970) gibt als Ursache für den erhöhten IOP bei dieser Glaukomform eine mechanische Blockade des Abflusswinkels durch die Iris an. Da sich die Linse kontinuierlich während des ganzen Lebens vergrößert, drückt sie die Iris an die Cornea und verhindert den Abfluss des Kammerwassers im Winkel der vorderen Augenkammer. Ebenso kann es durch Neoplasien, Linsenluxationen oder durch das Kammerwasser selbst bei einer Iris bombata zu einem derartigen Verschluss des Iridocornealen Winkels kommen. Die genannten Ursachen lassen die Frage aufkommen, inwieweit das Engwinkel- und Winkelblockglaukom auch als sekundär eingestuft werden können (Stades et al. 2006).

### **Akuter Glaukomanfall**

Als akute Form des caninen Glaukoms werden Fälle angesehen bei denen der Beginn des Glaukomanfalls in den letzten 48 Stunden stattfand und sich alle für dieses Stadium typischen Symptome zeigen (Magrane 1957b). Es kommt zu einem Verschluss des Abflusswinkels in der vorderen Augenkammer (Lovekin 1964), was zu einer drastischen Erhöhung des IOP mit eventuell irreversiblen Schäden am Auge führen kann, wenn nicht frühzeitig therapiert wird (Bedford 1980a). Die Erkrankung tritt meist bei Hunden mittleren Alters und älteren Hunden auf (Bedford 1980a). Beim Menschen wird angenommen, dass ein verengter Winkel zwischen Iris und Hornhaut eine Prädisposition für ein akutes Glaukom ist. Durch diese Verengung wird der Kammerwasserabfluss vermindert oder sogar verhindert, was zu einem stark

erhöhten IOP führt (Magrane 1957b). Beim Hund besteht eine Prädisposition für das akute Glaukom bei Rassen mit bereits vorhandener Goniodyplasie (Stades et al. 2006).

### **Chronisches Glaukom nach Glaukomanfall**

Diese Variante tritt hauptsächlich bei Hunden im mittleren Alter auf und ist durch Schmerzfreiheit gekennzeichnet (Jourdan 1950). Die Diagnose wird gestellt, wenn der Glaukomanfall bereits mehrere Tage oder Wochen zurückliegt und die Symptome gegenüber dem akuten Glaukom nicht so stark ausgeprägt sind (Magrane 1957b). Jede Glaukomform muss nach spätestens einer Woche als chronische Erkrankung angesehen werden (Stades et al. 2006). Es kann auch zu mehreren, aber insgesamt schwächeren Glaukomanfällen ohne völlige Blockierung des Kammerwasserabflusses kommen (Lovekin 1964). Meist erkranken beide Augen gleichzeitig (Bedford 1980a).

### **2.2.3.2 Sekundärglaukome**

Wenn eine Ursache für den erhöhten IOP gefunden ist, bezeichnet man diese Art des Glaukoms als Sekundärglaukom (Jourdan 1950). Etwa 7% der mit einer Augenerkrankung zur tierärztlichen Untersuchung vorgestellten Hunde leiden an einem Sekundärglaukom (Johnsen et al. 2006). Es erkranken 2-3 mal mehr Hunde an einem sekundären als an einem primären Glaukom (Pfeiffer et al. 1999). Bei den Katzen sind ebenfalls die meisten Glaukome sekundärer Natur (Wilcock et al. 1990). In einem Zeitraum von 13 Jahren wurden in der Augenklinik der Veterinärmedizinischen Universität Wien bei Katzen 31 (81,6%) Sekundärglaukome und lediglich sieben (18,4%) Primärglaukome diagnostiziert (Walde und Rapp 1992). Es sind fast ausschließlich Hunde mittleren Alters betroffen (Johnsen et al. 2006). Während das canine Primärglaukom ein bilaterales Geschehen ist, tritt das canine Sekundärglaukom sehr oft nur unilateral auf (Barnett 1970).

### **Glaukom als Folge von Subluxation und Luxation der Linse**

Zur Luxation kommt es, wenn der Halteapparat der Linse komplett zerrissen ist. Bei der Subluxation sind nur Teile des Halteapparates defekt und die Linse verlagert sich nicht vollständig (Magrane 1957c).

Bei einer Verlagerung der Linse in die vordere Augenkammer kann es zum Verschluss der Pupille oder des Abflusswinkels durch die Linse selbst oder durch den ebenfalls verlagerten Glaskörper kommen. Auch bei der Verlagerung der Linse in die hintere Augenkammer kann der Glaskörper vorfallen und so den Kammerwasserdurchfluss in der Pupillarebene und den Kammerwasserabfluss im Abflusswinkel hemmen (Stades et al. 2006).

Subluxationen und Luxationen der Linse sind die am häufigsten gesehenen Ursachen für Sekundärglaukome beim Hund (Magrane 1957c; Barnett 1970; Gelatt und Brooks 1999). Dabei ist die Linse meist in die Vorderkammer verlagert, während sie beim Mensch häufiger in die hintere Kammer verlagert ist (Watson 1970).

Bei der Katze spielt diese Ätiologie eine untergeordnete Rolle (Wilcock et al. 1990).

### **Glaukom als Folge einer Uveitis**

Eine Entzündung der Uvea bewirkt durch die eingedrungenen Entzündungsprodukte eine Viskositätserhöhung des Kammerwassers. Dies erschwert den Abfluss desselben und führt nach Abklingen der Entzündung zu Verwachsungen und Verklebungen im Winkel der vorderen Augenkammer (Stades et al. 2006).

Durch diese Verklebungen, unter anderem auch zwischen Linsenkapsel und Iris, kommt es zu mangelnder Zirkulation des Kammerwassers zwischen hinterer und vorderer Augenkammer. Wenn es zu einer vollständigen Adhaesion zwischen den beiden erwähnten Strukturen kommt, entsteht die sogenannte Iris bombata. Dabei wird jegliche Zirkulation des Kammerwassers von der hinteren in die vordere Augenkammer verhindert (Magrane 1957c). Die Iris wölbt sich napfkuchenartig vor und die vordere Augenkammer ist abgeflacht, wodurch der Kammerwinkel verengt wird (Stades et al. 2006).

Beispielsweise können Erkrankungen wie feline Leukämie, Parvovirose (Walde und Rapp 1992), feline infektiöse Peritonitis, feline Immundefizienz (Glaze und Gelatt 1999), Hundestaupe, Virushepatitis und Toxoplasmose (Bedford 1980a) über eine Entzündung im Auge zu einem Glaukom führen.

Die chronische lymphozytäre-plasmazytäre Uveitis ist bei Katzen die häufigste Ursache für ein sekundäres Glaukom (Wilcock et al. 1990; Glaze und Gelatt 1999). In einer Studie wird nachgewiesen, dass etwa bei 40% der feline Sekundärglaukome eine Uveitis vorausgeht (Wilcock et al. 1990). Mit 29% ist der

zweithäufigste Auslöser eines Sekundärglaukoms bei Katzen eine Neoplasie (Wilcock et al. 1990).

### **Glaukom als Folge von Neoplasien**

Neoplasien können den Abflussweg des Kammerwassers verstopfen (Jourdan 1950) oder sogar den Ziliarkörper zu einer vermehrten Kammerwasserproduktion veranlassen und so ein Sekundärglaukom auslösen. Ein generalisiertes Lymphosarkom tritt beim Hund stets bilateral auf und führt durch Anschwellung der Iris zu einem Glaukom (Barnett 1970). Eine weitere häufig vorkommende Neoplasie im caninen Auge ist das maligne Melanom der mittleren Augenhaut. Diese Tumoren gehen in der Regel vom pigmentierten Epithel aus. Sie werden meist erst entdeckt, wenn schon sekundäre Krankheitszustände wie Glaukom, Kammerblutung oder Linsenluxation durch sie verursacht wurden (Krahenmann 1978). Das iridale Melanom stellt bei der Katze die zweit häufigste Ursache eines Sekundärglaukoms dar (Wilcock et al. 1990), wobei auch das uveale Lymphom oder Lymphosarkom nicht selten gesehene Auslöser sind (Glaze und Gelatt 1999). Des Weiteren nennt Bedford (1980a) das Hämangiosarkom, das Epitheliom und das Adenokarzinom als Glaukomursachen beim Hund. Als primäre intraokulare Neoplasien der Katze sind das intraokulare Melanom, das Gliom der Papilla optica und das posttraumatische Osteochondrosarkom beschrieben (Walde und Rapp 1992).

### **Glaukom als Folge der Katarakt**

Die infolge einer Katarakt vergrößerte Linse (Intumescens) kann die Iris nach vorne in Richtung Cornea drücken und so den Augenwinkel der vorderen Augenkammer verengen oder verschließen, was den Abfluss des Kammerwassers behindert (Jourdan 1950). Eine derartige Linsenschwellung tritt vor allem bei diabetischen Katarakten auf (Stades et al. 2006).

### **Glaukom als Folge eines Traumas**

Wenn nach einem Trauma eine Einblutung in das Auge stattgefunden hat oder es sich in Folge eines perforierenden Traumas infiziert hat, können Abbauprodukte des Blutes bzw. Entzündungsprodukte den Abflusskanal verstopfen (Jourdan 1950; Magrane 1957c). Vor allem bei der Katze kommt es zu cornealen Perforationen, die

eine anteriore Synechie bedingen und den Kammerwasserabfluss behindern (Wilcock et al. 1990).

### **Glaukom als Folge von Irisatrophie**

Die Degeneration der Iris entsteht durch die verminderte Resorptionskapazität der Iris und führt dann zum Verschluss des Abflusskanals durch anfallende Irisdebris (Magrane 1957c). Diese Form des Sekundärglaukoms tritt beim Tier äußerst selten in Erscheinung (Stades et al. 2006).

### **Glaukom als Folge von Intraokularchirurgie**

Nach Operationen verbliebene Gewebsreste, Blutungen oder entstehende Fisteln im Auge können auch Glaukomursachen sein (Magrane 1957c). Als Folge von Operationen am Auge kann es zu Entzündungen und dadurch zu Synechien okulärer Strukturen kommen, die nachträglich durch Störungen der Kammerwasserzirkulation ein Glaukom auslösen (Jourdan 1950). Speziell bei der extrakapsulären Linsenextraktion ist es unvermeidbar, dass Partikel des Linsenproteins in den vordersten Abschnitt des Auges gelangen und dort Entzündungsreaktionen auslösen. Die Gefahr des Glaskörpervorfalls ist vor allem bei der intrakapsulären Linsenextraktion gegeben, da hierbei die Linse samt ihrer Kapsel entfernt wird und so keine Barriere mehr zwischen vorderer und hinterer Augenkammer vorhanden ist. Der Glaskörper kann in die vordere Augenkammer vorfallen und dort den Kammerwasserabfluss durch die Pupillaröffnung oder den Abflusswinkel erschweren oder sogar blockieren (Stades et al. 2006). Die Inzidenz für eine postoperative Hypertension wird durch Extrakapsulärer- oder Phakoemulsifikations-Operationstechnik nicht beeinflusst. Allerdings steigt der IOP bei Augen, die mit Phakoemulsifikationstechnik operiert wurden, wesentlich schneller an (Gelatt und Brooks 1999).

### **2.2.3.3 Kongenitales Glaukom**

Während Jourdan (1950) das kongenitale Glaukom beim Hund als eine Sonderform des Sekundärglaukoms ansieht, stufen es Barnett (1970) und Watson (1970) als ein Primärglaukom ein. Andere Autoren sehen das kongenitale Glaukom jedoch als eigenständige Form neben Primär- und Sekundärglaukom (Magrane 1957b; Lovekin

1964; Gelatt und Brooks 1999; Glaze und Gelatt 1999). Pfeiffer und Mitarbeiter (1999) sehen allgemein Glaukome ,die bei der Geburt oder im frühen Lebensabschnitt auftreten, als kongenital an, unabhängig davon ob die Ursache primär oder sekundär ist. In der Humanmedizin gilt das kongenitale Glaukom als eine Form des primären Glaukoms (EGS 2008).

Beim kongenitalen Glaukom kommt es während der Entwicklung des Auges zu einer Fehlbildung, bei der anstelle des trabekulären Netzwerkes fibröses Gewebe im Augenwinkel der vordern Augenkammer bestehen bleibt. Teilweise fehlt der Abflusskanal komplett (Jourdan 1950). Diese Glaukomform kann unilateral oder bilateral, isoliert oder mit anderen systemischen Anomalien auftreten. Zu einer Erhöhung des Augeninnendruckes kommt es meist in einem Alter von drei bis sechs Monaten. Da die Sclera des immaturren Auge noch viele Elastinfasern enthält, fällt die deutliche Vergrößerung des noch elastischen Welpen-Augapfels als erstes Symptom auf (Gelatt und Brooks 1999).

#### **2.2.3.4 Das absolute Glaukom**

Ein absolutes Glaukom ist das Endergebnis einer Glaukomerkrankung, unabhängig vom ursprünglichen Typ und gleichgültig ob sie nicht oder erfolglos therapiert wurde. (Jourdan 1950; Magrane 1957b; Stades et al. 2006). Das betroffene Auge ist vollkommen und irreversibel erblindet. Bei diesem Stadium der Erkrankung bedeutet das Ziel der Therapie nur noch eine Schmerzfreiheit zu erreichen (Linek et al. 2008).

### **2.3 Glaukom Modelle**

Um die molekularen pathogenetischen Prozesse bei glaukombedingten Schäden bei Mensch und Tier besser zu verstehen und bessere Therapiemöglichkeiten zu erforschen, sind Tiermodelle von enormer Bedeutung (Weinreb und Lindsey 2005). Da immer häufiger Nagemodelle verwendet werden, ist es wichtig, die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Anatomie des Auges zu kennen. So haben die Augen von Ratten und Mäusen einen dem menschlichen Auge sehr ähnlichen Aufbau des iridocornealen Winkels (van der Zypen 1977; Morrison et al. 1995; Smith et al. 2001), wohingegen die Anatomie der Lamina cribrosa etwas abweicht (Morrison et al. 1995). Der Vorteil bei Nagern besteht darin, dass es

kostengünstig möglich ist eine große Tierzahl zu halten und damit eine höhere Aussagekraft der Forschungsergebnisse zu gewährleisten. Zudem sind diese Tiere speziell beim Ermitteln des IOP leicht zu handhaben und benötigen dafür keine Narkose (Morrison 2005).

### **2.3.1 Modelle mit erhöhtem Augeninnendruck**

#### **2.3.1.1 Konstante Beleuchtung**

Eine relativ geringgradige IOP Erhöhung kann bei Ratte und Maus durch eine konstante Beleuchtung ohne Dunkelphasen erreicht werden (Pang et al. 2005; Sugimoto et al. 2006). Durch das Fehlen des circadianen Rhythmus kommt es zu einer Überproduktion des Kammerwassers. Dieses Modell führt allerdings wegen der geringen Erhöhung des IOPs auch nach zehn Monaten Lichtexposition nicht zu Schäden in der Retina oder des Nervus opticus (Pang et al. 2005).

#### **2.3.1.2 Episclerale Injektion hypertoner Salzlösungen**

Die Injektion hypertoner Salzlösungen in eine der Episcleralvenen der Ratte bewirkt eine Sklerosierung der Abflusswege des Kammerwassers. Dies führt zu einem verminderten Abfluss des Kammerwassers und damit zu einer Erhöhung des IOP. Dazu wird ein Plastikring hinter dem Limbus des Auges einer narkotisierten Ratte so angebracht, dass er alle bis auf eine Episcleralvene verschließt. Es werden 50 µl einer hypertonen Natriumchlorid (NaCl) Lösung in die nicht gestaute Vene injiziert. Die Lösung verteilt sich dann in den Schlemmschen-Kanal, das trabekuläre Netzwerk und die vordere Augenkammer. Bedingt durch die ausgelöste Entzündung kommt es zu Narbenbildung und schließlich Sklerosierung der betroffenen Gewebe. In der Regel kommt es nach sieben bis zehn Tagen zu einer Erhöhung des IOP, welche bis zu 200 Tage andauern kann (Morrison et al. 1997). Zwischen der Höhe des IOP und dem Ganglienzellverlust besteht ein eindeutiger Zusammenhang. So werden in Augen mit physiologischem IOP keine Ganglienzellverluste festgestellt, wohingegen in Augen mit zweifach erhöhtem Druck ein Verlust von bis zu 90 % der Ganglienzellen zu erkennen ist (Schlamp et al. 2001).



### **2.3.1.3 Laser Photokoagulation der Kammerwasserabflusswege**

Nach einer Injektion von India Tinte in die vordere Augenkammer wird durch die Photokoagulation mit einem Laser das trabekuläre Netzwerk so verändert, dass der Abfluss des Kammerwassers behindert ist, der IOP steigt und chronisch erhöht bleibt (Ueda et al. 1998). Meistens sind zur chronischen IOP Erhöhung mehrere Laserbehandlungen notwendig. Auch bei diesem Modell kommt es zu Ganglienzelltod durch Apoptose (Lam et al. 2003; Maeda et al. 2004), Ausdünnung der Nervenfaserschicht und Reduzierung der Axone des N. opticus (Ishii et al. 2003). Der Vergleich verschiedener Laser Modelle, wie zum Beispiel die translimbale Laserbehandlung des trabekulären Netzwerks und die Behandlung des trabekulären Netzwerks gepaart mit dem Lasern der Episcleralvenen, ergab, dass die Dauer der IOP Erhöhung bei diesen Modellen durchschnittlich 21 Tage beträgt (Levkovitch-Verbin et al. 2002). Das Modell der Laser Photokoagulation gibt zwar viele Charakteristika eines normalen Glaukoms wieder, ist aber technisch schwer durchzuführen. Es werden 60-80 Laserstrahlen benötigt um das gesamte trabekuläre Netzwerk zu behandeln. Dabei ist es wegen der geringen Größe des Rattenauges äußerst schwer in jedem Auge vergleichbare Behandlungen zu erzielen. Dies führt zu einer großen Varianz des IOP in den verschiedenen Augen (Pang und Clark 2007).

### **2.3.1.4 Kauterisierung der extraokulären Venen**

Viele Arbeitsgruppen kauterisieren in ihren Modellen drei Venen, wobei die Höhe des IOP mit der Anzahl der kauterisierten Venen korreliert. Es kommt zu Ganglienzelltod durch Apoptose, Ausdünnung der Nervenfaserschicht, Schädigung der Sehnervenpapille, sowie Degeneration des Nervus opticus (Garcia-Valenzuela et al. 1995; Sawada und Neufeld 1999; Mittag et al. 2000; Grozdanic et al. 2003). Dieses Modell ist einfacher durchzuführen als das Laser Photokoagulations-Modell und ermöglicht eine gleichbleibende IOP Erhöhung. Es kommt aber neben der Druckerhöhung auch zu Ischämieerscheinungen und druckunabhängigen Veränderungen am Auge, welche die Ergebnisse beeinflussen. Nach 2-3 Monaten erreicht der IOP wieder Normalwerte. Dies kann durch die Neubildung von Venen zur Überbrückung der kauterisierten Blutwege erklärt werden (Mittag et al. 2000).

### **2.3.1.5 Intracamerale Injektion von Hyaluron Säure**

Ausgeprägte Akkumulation von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Glukosaminoglykane, im trabekulären Netzwerk reduzieren den Abfluss des Kammerwassers. Eine einzige Injektion von 25 µl (10 mg/ml) Hyaluronsäure reicht aus, um eine drastische IOP Erhöhung für die Dauer von einer Woche auszulösen. Bei wöchentlicher Injektion der Hyaluronsäure kann so eine konstante IOP Erhöhung über zehn Wochen aufrecht erhalten werden (Benozzi et al. 2002).

### **2.3.1.6 Intracamerale Injektion von Mikrosphären**

Urcola und Mitarbeiter können in einer Studie nachweisen, dass eine wöchentliche Injektion von Latex Mikrosphären mit oder ohne Hydroxypropylmethylcellulose in die vordere Augenkammer der Ratte eine IOP Erhöhung bewirkt. Vier bis sechs Wochen nach der ersten Injektion beginnt die IOP Erhöhung und bleibt für ca. 30 Wochen erhalten. Der Verlust der retinalen Ganglienzellen steht im Zusammenhang mit der Höhe des Augeninnendruckes. Dies ist zwar ein interessantes Glaukom Modell, hat aber wegen der wöchentlichen Injektionen einen hohen Arbeitsaufwand (Urcola et al. 2006). In Anlehnung an dieses Modell verwendet eine andere Arbeitsgruppe Styropor Mikrobeads mit einem Durchmesser von 15 µm um eine Erhöhung des IOP zu erreichen (Sappington et al. 2010). Dabei ist wichtig, dass die Höhe des IOPs und die Dauer der Erhöhung leicht zu beeinflussen sind. Die Mikrobeads sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff beschichtet, sodass man erkennen kann, dass sich ein Großteil der Mikrobeads 30 Minuten nach der Injektion in die vordere Augenkammer im trabekulären Netzwerk ablagert. Dies führt in Abhängigkeit vom injizierten Volumen zu einem IOP Anstieg um 21-34% gegenüber einer Kontrollgruppe. Der erhöhte intraokuläre Druck resultiert aus der Verstopfung der Kammerwasserabflusswege durch Mikrobeads und bleibt für 2 Wochen erhalten. Durch eine erneute Injektion kann der IOP für lange Zeit auf einem gewünschten Level gehalten werden (Sappington et al. 2010).

## **2.3.2 Modelle mit physiologischem Augeninnendruck**

### **2.3.2.1 Intravitreale Injektion von stimulierenden Aminosäuren**

Die intravitreale Injektion von stimulierenden Aminosäuren, Glutamat und N-Methyl-D-aspartat (NMDA), welche einen retinalen Ganglienzelltod ohne IOP Erhöhung verursachen, werden genutzt um den potentiell durch Übererregung verursachten Schaden genauer zu untersuchen (Pang und Clark 2007). Systemische Applikationen haben keinen signifikanten Effekt, da das Glutamat nicht die Blut-Retina-Schranke überwinden kann (Levin 2001). Glutamat und NMDA führen dosisabhängig zu einer Apoptose von retinalen Ganglienzellen (Li et al. 2002). Es werden bei der Ratte meist zwischen 20 und 200 nmol Glutamat oder 5 µl NMDA als Bolus in den Glaskörper injiziert, um einen Ganglienzelltod zu provozieren. Bei der Maus reduziert sich das Volumen wegen des kleineren Auges auf 2-3 µl (Pang und Clark 2007). Im Maus-Modell wird der Höhepunkt des Apoptosevorgangs durchschnittlich zwei Tage nach der Injektion erreicht, wobei erste Anzeichen schon nach einer Stunde zu sehen sein können. Das Maximum des retinalen Ganglienzelltods wird in der Regel sechs Tage nach Injektion beobachtet (Li et al. 1999). Dieses Tiermodell ist technisch sinnvoll, leicht durchzuführen und liefert dabei reproduzierbare Ergebnisse, daher haben es viele Labore bereits angewandt, um das Potential von Neuroprotektoren zu erforschen (Pang und Clark 2007).

### **2.3.2.2 Schädigung des Nervus opticus**

Dies ist ein Modell um in vivo den Ganglienzelltod auszulösen. Es eignet sich dazu, die pathologischen Veränderungen nach einem mechanischen Trauma des N. opticus beim Glaukom darzustellen. Sowohl beim Schnitt durch den N. opticus, als auch bei dessen Quetschung, muss darauf geachtet werden, dass die Blutversorgung des Auges erhalten bleibt um nicht einen Ischämie bedingten Schaden der Retina auszulösen (Pang und Clark 2007). Bei Durchtrennung des N. opticus hängt die Dauer bis der erste Schaden in der Retina auftritt vom Abstand des Schnitts zur Retina ab. So tritt bei einer intraorbitalen Durchtrennung der Schaden schneller auf als bei einer intracranialen Durchtrennung (Domenici et al. 1991). Wegen der einfachen Durchführung wird die intraorbitale Transsektion häufig

verwendet (Pang und Clark 2007). Eine Woche nach dem Eingriff sind bereits 50 % der Ganglienzellen in der Rattenretina zugrunde gegangen. Nach zwei Wochen erstreckt sich der Verlust auf 80-100% der retinalen Ganglienzellen der Ratte. Eine Schädigung des N. opticus kann, wie oben bereits erwähnt, auch durch eine Quetschung herbeigeführt werden. Dabei werden gegenüber der Durchtrennung nicht alle Axone unterbrochen, sondern in unterschiedlicher Weise geschädigt. Dies entspricht mehr den Schädigungen, die auch während eines Glaukoms festgestellt werden können. Allerdings gestaltet sich die Reproduzierbarkeit der exakt gleichen Schädigung und damit der Ergebnisse schwierig (Klocker et al. 2001; Ohlsson et al. 2004).

### **2.3.2.3 Ischämie Modell**

Bei diesem Modell wird durch Hypertension eine retinale Ischämie verursacht. Diese Technik wird schon seit den 50er Jahren angewandt (Smith und Baird 1952). Mit einer Nadel, die mit einem mit physiologischer Lösung gefüllten Behälter verbunden ist, wird in die vordere Augenkammer eingestochen. Je höher der Behälter gehalten wird, desto höher wird der Druck im Inneren des Auges. Wenn der IOP höher wird als der systolische Blutdruck, wird die Blutzufuhr zum Auge verhindert. Die meisten Autoren halten den erhöhten Augendruck samt Ischämie über 45 min bis 60 min aufrecht und ermöglichen dann eine Reperfusion des Auges von mehreren Wochen. In der Rattenretina bewirkt eine Ischämie einen Ganglienzellverlust durch Apoptose (Lam et al. 1994; Selles-Navarro et al. 1996; Lafuente et al. 2002), eine Schädigung des N. opticus, sowie die Degeneration der Axone und Funktionsverlust der Myelinscheiden (Adachi et al. 1996). Eine andere Methode, um eine Ischämie im Auge zu erzeugen, ist die Ligatur des N. opticus. Dabei wird ein Faden um den chirurgisch freipräparierten N. opticus gelegt und so lange zusammen gezogen, bis der Blutfluß in der Zentralarterie und den Ziliararterien sistiert (Stefansson et al. 1988). Nach 30 bis 60 Minuten erfolgt die Reperfusion durch Lösen der Nahtschlinge. Dieses Modell führt zu einem retinalen Ödem (Szabo et al. 1991) und apoptosebedingten Ganglienzelltod (Vidal-Sanz et al. 2001; Chintala et al. 2002). Dabei werden neben den Ischämie assoziierten Schäden auch Einflüsse durch die mechanische Schädigung des N. opticus registriert, welche die Studienergebnisse beeinflussen (Pang und Clark 2007). Eine weitere Möglichkeit, eine Ischämie im

Auge hervorzurufen, ist die nicht invasive Photothrombose. Dabei wird Bengalrosa, eine ionisierte Farbe, intravenös injiziert. Wenn nun durch das Auge die Zentralarterie der Retina mit grünem Licht bestrahlt wird, setzt das Bengalrosa singulären molekularen Sauerstoff frei, welcher Thrombozyten aktiviert, die einen lokalisierten transluminalen Thrombus bilden (Mosinger und Olney 1989). Die Degeneration der Retina mit Zellschwellung und Apoptose kann in der inneren nuclearen Schicht und der Ganglienzellschicht der Retina bereits nach 30 Minuten nachgewiesen werden (Mosinger et al. 1991; Moroni et al. 1993). Die Ischämie durch die Photothrombose kann durch die intravenöse Injektion von Gewebstreptase, die den Thrombus auflösen, aufgehoben werden (Daugeliene et al. 2000).

### **2.3.2.4 Endothelin bedingte optische Neuropathien**

Endothelin-1, ein potenter Vasokonstriktor, welcher in den Endothelzellen der Gefäße produziert wird, wird mit der Glaukomerkrankung in Verbindung gebracht. So kann beispielsweise im Plasma und Kammerwasser von Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom, besonders bei solchen die schon Sehfeldeinschränkungen haben, eine deutlich höhere Konzentration von Endothelin-1 gemessen werden als in der Kontrollgruppe (Sugiyama et al. 1995; Noske et al. 1997; Tezel et al. 1997). Für die Ratte gibt es ein Modell, bei dem Endothelin-1 kontinuierlich durch eine chirurgisch implantierte Pumpe in den intraorbitalen N. opticus, 1 mm vom Augapfel entfernt, appliziert wird. Bei diesem Modell können zeitabhängige aber dosisunabhängige Verluste von retinalen Ganglienzellen registriert werden, welche mit den Verlusten von Axonen des N. opticus korrelieren (Chauhan et al. 2004).

### **2.3.3 Experimentelles autoimmunes Glaukom Modell**

Der Nachweis der Beteiligung bestimmter Antikörper an einem Krankheitsgeschehen wird im experimentellen autoimmunen Glaukom Modell durch die Immunisierung mit selektiven Immunogenen erbracht, welche die zu untersuchende Krankheit auslösen (Joachim et al. 2009). Beispiele für bereits etablierte autoimmune Tiermodelle sind: die experimentelle autoimmune Encephalitis (EAE) (Raijmakers et al. 2006; Zhu et

al. 2006), die experimentelle autoimmune Uveitis (EAU) (Augustin et al. 1999; Grus et al. 2001; Sakai et al. 2006), die experimentelle Arthritis (Courtenay et al. 1980; Kuhn et al. 2006) und das Modell der Alzheimer Erkrankung (Schenk et al. 1999). Im ersten Tiermodell zum experimentellen autoimmunen Glaukom kann nach der Immunisierung von Ratten mit Hitzeschockprotein 27 (HSP 27) ein deutlicher Verlust an retinalen Ganglienzellen und deren Axone verzeichnet werden (Wax et al. 2002). Beim experimentellen autoimmunen Glaukom Modell wird neben dem Antigen auch inkomplettes Freund's Adjuvant und Pertussis Toxin injiziert (Joachim et al. 2009). Das inkomplette Freund's Adjuvant besteht aus den Komponenten Paraffinöl und Mannose und dient zur Stimulierung des Immunsystems. Die Antigene werden wegen der Depotwirkung des im Freund's Adjuvant enthaltenen Paraffinöl erst verzögert freigesetzt. Dadurch wird die Antigenpräsentation gegenüber dem Immunsystem verlängert (Nicklas W. et al. 1997). Pertussis Toxin ist das Exotoxin des Bakteriums *Bordetella pertussis* und kann durch die Fähigkeit zur Schädigung der Bluthirnschranke die Migration von Immunzellen in das ZNS und damit den Ausbruch der erwarteten Krankheit fördern (Hofstetter et al. 2002; Kugler et al. 2007).

### **2.4 Immunsystem und Autoimmunität**

Eine spezifische Immunantwort gegen körpereigene Antigene wird als Autoimmunität bezeichnet. Diese stellt einen Toleranzverlust gegenüber zellulären Antigenen oder körpereigenem Gewebe dar, was zu einer überschießenden Aktivität von autoreaktiven Effektorzellen des immunologischen Systems führt. Die Autoimmunität kann systemisch, organspezifisch oder lokalisiert auftreten und sowohl durch autoreaktive T-Lymphozyten als auch durch Autoantikörper vermittelt werden. Für die Diagnose einer Autoimmunkrankheit eignet sich unter anderem der indirekte Nachweis. Dabei wird zunächst das Antigen identifiziert, danach isoliert um anschließend in einem Tiermodell, nach Gabe des Antigens, die Krankheit zu reproduzieren (McGavin und Zachary 2007). Diese Methode wird bei der vorliegenden Studie angewendet, um durch die verabreichten Antigene eine Degeneration der retinalen Ganglienzellen auszulösen, wie sie beim Glaukom auftritt. Bei der Immunologischen Toleranz fehlt eine funktionelle Immunantwort bei einer Antigenexposition. Es wird in eine zentrale und eine periphere Toleranz

unterschieden. Die zentrale Toleranz wird während der T-Zell Entwicklung im Thymus ausgebildet. Dabei werden T- und B- Lymphozyten, welche für körpereigene Antigene hochaffine Rezeptoren exprimieren, von jeglicher Weiterentwicklung ausgeschlossen (McGavin und Zachary 2007). Bei der peripheren Toleranz kommt es durch regulatorische T-Lymphozyten mit Hilfe von Zytokinen zur Verminderung der Aktivität von autoreaktiven T-Lymphozyten (Ansorge 2007). Autoimmunität gehört zu den physiologischen Eigenschaften des Körpers. Jeder intakte Organismus kann eine geringe Anzahl Antikörper, T- und B-Zellen aufweisen, welche eine spezifische Reaktion gegen körpereigene Antigene auslösen (Roitt I.M. et al. 1991). Allerdings beugt die periphere Toleranz schädlichen Reaktionen vor, weshalb Autoantikörper ohne Krankheitsanzeichen bei Gesunden vorkommen können (Kohler et al. 2003). Zur Ausbildung dieses speziellen Antikörper-Musters kommt es während den ersten zwei bis vier Lebensjahren (Lacroix-Desmazes et al. 1998). Dabei ist die natürliche Autoimmunität beim Gesunden weitestgehend konstant (Nobrega et al. 1993). Bricht jedoch die zentrale und periphere Toleranz zusammen, so entstehen Autoimmunkrankheiten (Ansorge 2007). Autoimmunerkrankungen sind demnach Krankheiten, deren Ursache eine überschießende Reaktion des Immunsystems gegen körpereigenes Gewebe ist. Irrtümlicherweise wird körpereigenes Gewebe vom Immunsystem als fremdartig angesehen und bekämpft. Dies führt zu schweren Entzündungsreaktionen, welche Schädigungen an den betroffenen Organen hervorrufen. Ohne Behandlung läuft der irrtümliche Angriff auf körpereigenes Gewebe ein Leben lang oder bis das angegriffene Gewebe vollkommen zerstört ist (DGfAE 2011).

Es werden, im Vergleich mit Gesunden, signifikante Unterschiede des Antikörperprofils bei Patienten mit endokriner Orbitopathie (Zimmermann et al. 1989), Myasthenia gravis (Zimmermann und Weiss 1987), Guillan-Barre Syndrom (Dziewas et al. 2001) und Tourette Syndrom (Wendlandt et al. 2001) nachgewiesen. Bei Diabetes mellitus Typ I, Multiple Sklerose, Vaskulitiden und ähnlichen rheumatologischen Erkrankungen kann ein vermehrtes Auftreten ganz bestimmter Autoantikörper festgestellt werden (Renz-Polster et al. 2008). Bei den meisten Autoimmunerkrankungen ist die Ätiologie bisher jedoch noch unbekannt. Häufig sind multiple Faktoren an der Entstehung beteiligt, so können beispielsweise auch bestimmte genetische Voraussetzungen oder Einflüsse der Umwelt eine Rolle spielen (McGavin und Zachary 2007).

### 2.4.1 Autoimmune Beteiligung beim Glaukom

Die Beweise dafür, dass das Glaukom bei manchen Patienten eine autoimmune Erkrankung ist, werden in den letzten beiden Jahrzehnten in vielen Patientenstudien und Tiermodellen von verschiedenen Laboratorien gesammelt (Wax 2010).

Als erster Hinweis für eine autoimmune Beteiligung gilt die Entdeckung, dass bei Patienten mit Normaldruckglaukom eine erhöhte Prävalenz einer monoklonalen Paraproteinämie gegenüber Patienten mit primären Offenwinkelglaukom oder der Kontrollgruppe vorliegt. Bereits 1992 ziehen Forscher des Bascom Palmer Eye Instituts einen epidemiologischen Zusammenhang zwischen einem Normaldruckglaukom und einer Immunkrankheit in Betracht, da sie bei 30% der Glaukompatienten eine bereits bestehende Immunkrankheit nachweisen können (Cartwright et al. 1992). Wax (2000) zeigt, dass auch bei Normaldruckglaukom-Patienten ohne andere autoimmune Vorerkrankung Antikörper gegen okuläre Strukturen auftreten können. Bei diesen Patienten wird angenommen, dass das Glaukom eine Autoimmunkrankheit auslöst, die für einen immunbedingten, lokalen Gewebeuntergang verantwortlich ist. Es können bereits erhöhte Antikörpertiter gegen das Hitzeschockprotein HSP 60 bei Glaukompatienten festgestellt und damit HSP 60 als relevantes Autoantigen bei Normaldruckglaukompatienten in Betracht gezogen werden (Wax et al. 1998b; Wax 2000). In einer Studie mit Bulben von Hunden wird nachgewiesen, dass die HSP 60 Expression als Folge des chronischen Charakters des Glaukoms abnimmt (Savagian et al. 2008). Die Akkumulation von HSP 27 bei neurologischen Erkrankungen lässt eine fundamentale Rolle des HSP 27 bei der Überlebensrate von Neuronen vermuten. Die Immunisierung mit Antikörpern gegen kleine Hitzeschockproteine wie HSP 27, alpha A- und alpha B- Crystallinen führt zur Apoptose von neuronalen Zellen (Tezel et al. 1998). Des Weiteren werden bei Patienten mit Normaldruckglaukom und Paraproteinämie in post mortem Untersuchungen eine Ablagerung von Immunglobulinen in der retinalen Ganglienzellschicht gefunden (Wax et al. 1998a). Ebenfalls werden in den letzten Jahren im Serum von Glaukompatienten erhöhte Antikörpertiter gegen Sehnervenkopfantigene wie Glycosaminoglycane (Tezel et al. 1999) und retinale Antigene wie Rhodopsin (Romano et al. 1995), gamma-Enolase (Maruyama et al. 2000), Glutathion S-Transferase (Yang et al. 2001), alpha-Fodrin (Grus et al. 2006)



und Phosphatidylserin (Kremmer et al. 2001) festgestellt. Neben den erhöhten Serumantikörpertitern gegen einzelne Antigene wird im Serum und im Kammerwasser von Glaukumpatienten ein signifikanter Unterschied von ganzen Antikörpermustern gegen okuläre Zellen im Vergleich zu den Mustern bei der gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen (Joachim et al. 2003; Grus et al. 2004; Joachim et al. 2005; Joachim et al. 2007a; Joachim et al. 2007c). Die Mehrheit dieser Studien zeigt, dass erhöhte Antikörpertiter häufiger bei Patienten mit Normaldruckglaukom auftreten (Joachim et al. 2005). Jedoch wird wegen der Erkenntnis, dass bei Patienten mit Normaldruckglaukom und primärem Offenwinkelglaukom eine von den übrigen Gruppen unterschiedliche Antikörper Reaktion stattfindet, davon ausgegangen, dass sowohl bei Patienten mit erhöhtem als auch bei Patienten mit physiologischem IOP der autoimmune Mechanismus eine Rolle spielt (Joachim et al. 2003; Grus et al. 2004). Neben den Hinweisen auf eine Beteiligung von humoralen und zellulären Komponenten der adaptiven Immunität ist auch eine angeborene Immunantwort beim Glaukom ersichtlich. So können verschiedene immunhistologische Analysen in experimentellen autoimmunen Tiermodellen die gleiche Erhöhung von Komplementsystem-Komponenten zeigen wie sie beim menschlichen Glaukom vorkommen (Tezel et al. 2010). Es wird sogar vermutet, dass die Komplement Kaskade direkt im Zusammenhang mit neurodegenerativen Schäden beim Glaukom steht (Stevens et al. 2007). Der Beginn, die Entwicklung und Beendigung einer Gewebsspezifischen Immunantwort sind im Wesentlichen durch die Interaktionen zwischen gewebsinfiltrierenden T-Zellen, retinalen Ganglienzellen, Astrozyten, Müller Zellen und Gewebsmakrophagen wie Mikroglia gesteuert (Tezel und Wax 2007). Gewebsstress, wie er beim Glaukom auftritt, scheint eine entscheidende Rolle für die Balance zwischen protektiver Immunität und fortschreitender Neurodegeneration durch Autoimmunität zu spielen (Tezel und Wax 2004; Tezel und Wax 2007). Besonders den T-Zellen und den Hitzeschockproteinen wird bei einem leichten Titer Anstieg eine Schutzfunktion für retinale Zellen zugesprochen. Jedoch wird gleichzeitig erwähnt, dass ein übermäßiger und dauerhafter Anstieg dieser Immunkomponenten ein Fortschreiten der Krankheit bis hin zu einer für Autoimmunerkrankungen typischen, sekundären ,Antigen bedingten Neurotoxizität führen kann. So wirkt die Immunregulation sowohl neuroprotektiv als auch –destruktiv (Tezel und Wax 2004).

### **2.4.2 Das Immunprivileg des Auges**

Das Phänomen des Immunprivileg zeichnet sich durch eine erhöhte Überlebenszeit von fremdem Gewebe an bestimmten Orten im Organismus aus (Grisanti 1998; Augustin 2001). Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wird entdeckt, dass die Überlebensrate von implantiertem Fremdgewebe in der vorderen Augenkammer im Vergleich zu anderen Körperstellen deutlich verlängert ist (Van Dooremal 1873). Man nimmt an, dass das Immunprivileg als Schutzmechanismus an lebenswichtigen Organen ausgeprägt ist, welche durch eine normale Immunantwort deutlich in ihrer Funktion eingeschränkt wären. Speziell im Auge gelten die vordere Augenkammer, der Glaskörper und der subretinale Raum als immunprivilegiert. Zunächst wurde das Phänomen auf morphologische Besonderheiten im Auge, wie z.B. die Blut-Kammerwasser-Schranke, die Blut-Retina-Schranke und das Fehlen von immunkompetenten Zellen und Lymphdrainage zurückgeführt (Augustin 2001). Mitte des 20. Jahrhunderts wird vermutet, dass durch den Mangel einer okulären Lymphdrainage das fremde Gewebe sequestriert wird und es damit zu keiner Immunsensibilisierung und Immunantwort kommt (Medawar 1948). Durch weitere Studien erweist sich diese Vermutung aber als falsch (Grisanti 1998). Die Abweichung der Immunantwort ist in der vorderen Augenkammer am größten und wird auch als „anterior chamber associated immune deviation“ (ACAID) bezeichnet. Neben dem Ausbleiben einer Immunreaktion bei Fremdartigen in der vorderen Augenkammer wird zusätzlich ein antigenspezifischer, immunsuppressiver Effekt ausgelöst (Augustin 2001). Dadurch soll die Induktion einer immunbedingten Entzündungsreaktion limitiert werden, um eine mögliche Beeinträchtigung der Sehfunktion zu verhindern (Streilein 1999; Augustin 2001).

### **3 MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Studiengestaltung**

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein experimentelles autoimmunes Glaukom Tiermodell durchgeführt. Als Antigene zur Immunisierung wurden  $\beta$ -Aktin, das saure Gliafaserprotein (GFAP), Tubulin, der Gliazell-abgeleitete neurotrophe Faktor (GDNF), das calciumbindende Protein S100 und das Hitzeschockprotein 27 (HSP 27) verwendet. Die Kontrollgruppe erhielt anstelle des Antigens 0,9%ige Natriumchlorid Lösung (NaCl). Die Immunisierung erfolgte intraperitoneal in den rechten unteren Quadranten des Abdomens. Zur Erleichterung der Arbeitsabläufe wurde die große Tierzahl von insgesamt 47 Lewis Ratten in zwei Gruppen unterteilt und die Untersuchungen wurden in den zwei Teilabschnitten zeitlich versetzt durchgeführt. Im ersten Teilabschnitt wurden 23 Tiere nach vorher festgelegtem Studiendesign untersucht und behandelt. Nach vollständigem Abschluss dieses Teilabschnittes folgte der zweite Abschnitt mit den Untersuchungen an weiteren 24 Tieren. Im Anschluss an die in vivo Arbeiten erfolgte unmittelbar die histologische Weiterverarbeitung der entnommenen Augen. Alle Tiere wurden nach den ARVO (Association for research in vision and ophthalmology) Richtlinien für die Verwendung von Tieren in der Forschung für die Augenheilkunde behandelt. Die Studie zur „Antikörperbeteiligung im experimentellen autoimmunen Glaukom Modell EAG2009“, Aktenzeichen 23 177-07/G09-1-044, wurde durch die lokale Tierschutzbehörde genehmigt und überwacht.

##### **3.1.1 Studie zum experimentellen autoimmunen Glaukom Tiermodell**

47 männliche Lewis Ratten

###### 2 Wochen vor Immunisierung:

Allgemeine Untersuchung, wiegen, Einteilung der Gruppen mit Markierung der Tiere, Training der Augeninnendruckmessung zur Gewöhnung der Tiere an Mitarbeiter und Material.

### 1 Woche vor Immunisierung (Baseline):

Zum Ausschluss von angeborenen oder erworbenen körperlichen Schäden, sowie zur Ermittlung der Ausgangswerte wurden eine allgemeine Untersuchung, eine Gewichtsermittlung, eine Augeninnendruckmessung und eine Blutentnahme aus der Schwanzvene durchgeführt. Im zweiten Teilabschnitt der Studie erfolgte zu diesem Zeitpunkt bei 24 Tieren zusätzlich eine Funduskopie, um mit einer weiteren wichtigen Untersuchungsmethode eventuelle Schäden am Sehnervenkopf oder dem Augenhintergrund auszuschließen.

### Tag 0 Immunisierung (intraperitoneal):

Gruppe 1 (n=4):	β-Aktin	+ Freund`s Adjuvant+ Pertussis Toxin
Gruppe 2 (n=4):	GFAP	+ Freund`s Adjuvant+ Pertussis Toxin
Gruppe 3 (n=4):	Tubulin	+ Freund`s Adjuvant+ Pertussis Toxin
Gruppe 4 (n=6):	GDNF+HSP 27	+ Freund`s Adjuvant+ Pertussis Toxin
Gruppe 5 (n=6):	S100+HSP 27	+ Freund`s Adjuvant+ Pertussis Toxin
Gruppe 6 (n=8):	S100	+ Freund`s Adjuvant+ Pertussis Toxin
Gruppe 7 (n=8):	GDNF	+ Freund`s Adjuvant+ Pertussis Toxin
Gruppe 8 (n=7):	NaCl	+ Freund`s Adjuvant+ Pertussis Toxin

### Tag 1 nach Immunisierung:

Allgemeine Untersuchung.

### 1 Woche nach Immunisierung:

Allgemeine Untersuchung, Gewichtskontrolle.

### 2 Wochen nach Immunisierung:

Allgemeine Untersuchung, Gewichtskontrolle, Augeninnendruckmessung, Blutentnahme aus der Schwanzvene. Im zweiten Teilabschnitt erfolgte zu diesem Zeitpunkt zusätzlich eine Funduskopie bei 24 Tieren.

### 3 Wochen nach Immunisierung:

Allgemeine Untersuchung, Gewichtskontrolle.

### 4 Wochen nach Immunisierung:

Allgemeine Untersuchung, Gewichtskontrolle, Augeninnendruckmessung. Im zweiten Teilabschnitt erfolgte zu diesem Zeitpunkt zusätzlich eine Funduskopie bei 24 Tieren. Tötung der Tiere, Blutentnahme durch Herzpunktion, Kammerwasserabnahme, Augen- und Sehnerventnahme, sowie Gehirn- und Rückenmarkentnahme.

### **3.2 Versuchstiere**

Für die Studie wurden als Versuchstiere männliche Lewis Ratten aus den Charles River Laboratorien verwendet. Die Lewis Ratten wurden zu Beginn der fünfziger Jahre von Doktor Magaret Reed Lewis im Wistar Institut in Philadelphia (USA), gezüchtet. Ausgehend vom Wistar Stamm erreichte der Lewis Rattenstamm 1956 die achte Inzuchtgeneration (Lindsey und Baker 2006). Im Jahr 1970 kam der Stamm in der F34-Generation aus Tulane (USA) in die Charles River Laboratorien. Sie zeichnen sich durch besonders ruhiges, nicht aggressives Verhalten, geringe Fertilität und Albinismus aus (CharlesRiver 2008). Durch einen angeborenen Defekt ist bei diesen Ratten die Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse gestört. Dies führt dazu, dass sie ihre Kortikosteroidwerte im Blutserum nicht ausreichend an physiologischen Stress anpassen können. Deswegen haben sie eine besonders hohe Anfälligkeit für autoimmune und inflammatorische Erkrankungen, wie beispielsweise die Adjuvant indizierte Arthritis (Sternberg et al. 1989). Die Lewis Ratte konnte schon erfolgreich in Studien zur experimentellen autoimmunen Uveitis (Nussenblatt et al. 1981; Augustin et al. 1999; Grus et al. 2001) und zur experimentellen autoimmunen Enzephalitis (Flad et al. 1968; Ludowyk et al. 1993; Mannie et al. 2009) eingesetzt werden. Auch in vorangegangenen Studien zum experimentellen autoimmunen Glaukom erwiesen sich die Lewis Ratten als besonders geeignete Versuchstiere (Wax et al. 2002; Wax et al. 2008; Joachim et al. 2009; Joachim et al. 2010).

Nach Ankunft der Tiere in der zentralen Versuchstierhaltung der Universität Mainz wurden sie gewogen und einer allgemeinen Untersuchung unterzogen. Zur Unterscheidung der Ratten wurden diese mit einem Permanentmarker an der Schwanzwurzel markiert. Untergebracht waren die Tiere in der Rattenexperimenthaltung der zentralen Versuchstiereinrichtung der Universität Mainz

bei konstanten 23°C Raumtemperatur und einem zwölf Stunden Tag/Nacht Beleuchtungsrythmus. Je vier Tiere teilten sich einen standardisierten Käfig mit Versteckmöglichkeiten und Spielzeug. Sie erhielten die für Labornager übliche Pelletnahrung und Wasser ad libitum.

Die Tiere wurden täglich auf ihr Wohlbefinden kontrolliert und wöchentlich gewogen. Jede Woche erfolgten zudem eine eingehende Untersuchung der Ratten und die Dokumentation der Befunde. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf eventuelle Rötungen, Schwellungen, sowie sonstige pathologischen Veränderungen am Auge gerichtet. Des Weiteren wurde das Verhalten, das Koordinationsvermögen, die Atmung, der Kotabsatz und die Injektionsstelle der Immunisierung kontrolliert. Die Ratten wurden auch auf eingerissene Nägel, eventuelle Blutungen, Haarausfall oder andere Auffälligkeiten untersucht.

### **3.2.1 Gewichtskontrolle der Versuchstiere**

Um festzustellen, ob die Tiere wie anzunehmen kontinuierlich an Körpermasse zunahmen, wurden diese wöchentlich gewogen und die Gewichte über den gesamten Studienverlauf verglichen. Dies diente auch dem Ausschluss eines Krankheitsgeschehens oder einer hohen Stressbelastung, bei denen die Gewichtszunahme beeinträchtigt gewesen wäre. Außerdem konnte so auch sichergestellt werden, dass das Körpergewicht der Ratten groß genug war, um die Abnahmemenge von einem Milliliter Blut pro Entnahmezeitpunkt problemlos zu überstehen.

### **3.3 Messung des Augeninnendruckes**

Die Messung des intraokularen Druckes (IOP) erfolgte mit dem Tonopen XL, einem Applanationstonometer. Das Messgerät besitzt in seiner Spitze einen druckempfindlichen Sensor, welcher mit einer Schutzhülle überzogen wurde. Das Vorgehen beim Messen des IOPs mit dem Tonopen wurde in Anlehnung an die Methode von Cuny und Kollegen (2010) durchgeführt. Durch kurzes, vorsichtiges Betupfen der Cornea des leicht aufgehaltene, lokal anästhesierten (Novesine) Rattenauges erhielt man einen Messwert (siehe Abb. 5). Die Messungen wurden immer am Vormittag von derselben Person durchgeführt. Dabei erfolgten je zehn

Messungen pro Auge, um einen aussagekräftigen Mittelwert, die Standardabweichung und den statistischen Fehler für jedes Tier errechnen zu können.

Diese Messmethode ist nicht invasiv und kann ohne Narkose durchgeführt werden. Auch wiederholte Messungen beeinflussen das Überleben von retinalen Ganglienzellen nicht (Cuny et al. 2010). Durch die Trainingsphase vor Beginn der Studie konnten sich die Tiere an das Handling und das Gerät gewöhnen und tolerierten die Messungen gut.

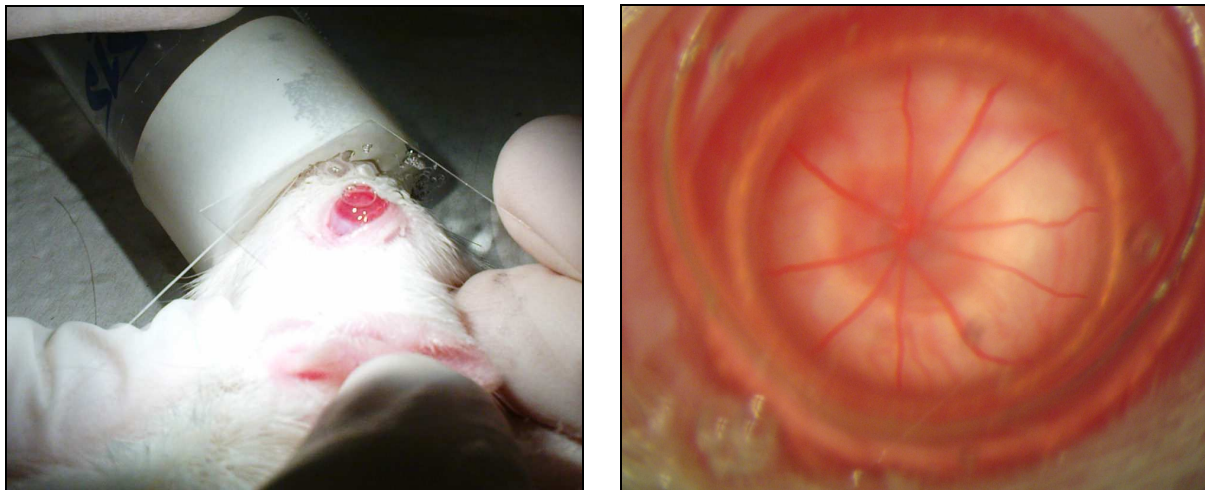


**Abbildung 5:** Messung des intraokularen Druckes mit dem Tonopen XL.

### 3.4 Funduskopie

Im zweiten Teilabschnitt der Studie wurden zur Dokumentation von eventuellen Veränderungen an den Fundi, eine Woche vor der Immunisierung, sowie zwei und vier Wochen danach, Fotos des Augenhintergrundes jedes Auges gemacht (siehe Abb. 6). Die Bilder wurden, wie bereits in zwei vorangegangenen Studien (Cuny et al. 2010; Gramlich et al. 2011) erprobt, über die gesamte Dauer der Studie vergleichend auf Abweichungen hin analysiert. Zur Durchführung der Fundus Untersuchung war die Narkotisierung der Tiere notwendig. Im Unterschied zu Cuny et al. (2010) und Gramlich et al. (2011) wurde zur Narkose der Tiere in dieser Arbeit keine Mischung aus Ketamin und Xylazin injiziert, sondern Isofluran per Inhalationsnarkosegerät verabreicht. Dazu wurde eine Narkose Box mit einem Gasmischung aus fünf

prozentigem Isofluran und 0,6 Liter Sauerstoff pro Minute angeflutet. Danach wurde eine Ratte hineingesetzt und solange in der Box belassen, bis eine ausreichende Narkostiefe erreicht war. Zur Erhaltung der Narkose wurde der Ratte eine Maske über Mund und Nase gelegt, durch die ein Gasgemisch aus 1-2 prozentigem Isofluran und 0,3 Liter Sauerstoff pro Minute strömten. Die zu untersuchenden Augen wurden vor der Narkoseeinleitung mit einem Mydriatikum (Mydriatikum Stulln) beträufelt. Dies diente der Weitstellung der Pupille, um einen möglichst großen Bereich des Augenhintergrundes auf Veränderungen untersuchen zu können. Wie bei Cuny et al. (2010) beschrieben wurde das Auge kurz vor der Funduskopie mit Augentropfen lokal anästhesiert (Novesine). Um die natürliche Krümmung der Cornea zu begradigen und einen uneingeschränkten Blick auf den Augenhintergrund zu erhalten, wurde wie in Abbildung 6 zu sehen, ein Deckgläschen für Objektträger mit leichtem Druck auf das Auge aufgelegt.



**Abbildung 6:** Narkotisierte Ratte mit Narkosemaske über Mund und Nase und aufgelegtem Deckgläschen zur Begradigung der Krümmung der Cornea (links). Blick auf den Fundus durch das zusätzliche Okular am Operationsmikroskop (rechts).

Um das Auge vor Austrocknung zu schützen und als Kopplungsmedium zwischen Deckglas und Cornea wurde Methocel auf das Auge aufgetragen. Durch ein weiteres, seitlich am Operationsmikroskop montiertes Okular konnte eine zweite Person mit einer Digitalkamera die Fotos zur Dokumentation machen (siehe Abb. 6). Während der Funduskopie lagen die Tiere auf einer Heizmatte, um ein Auskühlen in der Narkose zu vermeiden. Um die Aufwachphase einzuleiten wurde das Isofluran abgestellt und 0,6 Liter Sauerstoff pro Minute in die Maske geleitet, bis die Ratte



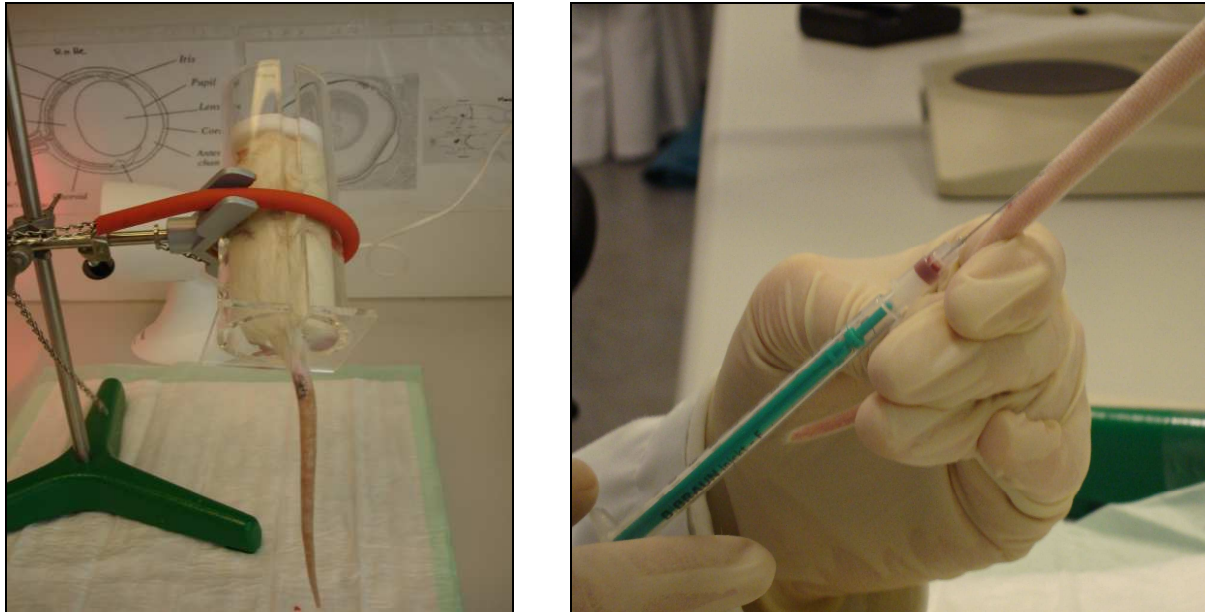
aufrecht sitzen konnte. Danach wurde das Tier bis zum völligen Erwachen einzeln in einem separaten Käfig gehalten und ständig überwacht. Um einer Entzündung vorzubeugen, bekamen die Ratten nach der Funduskopie eine antibiotische Augensalbe (Floxal) verabreicht.

### **3.5 Blutabnahme**

#### **3.5.1 Blutabnahme aus der Schwanzvene**

Für weitere Untersuchungen wurde eine Woche vor der Immunisierung, sowie zwei Wochen danach je ein Milliliter Blut pro Tier aus der Schwanzvene entnommen. Dazu wurden die Versuchstiere einzeln für ca. fünf Minuten in einer Nagertransportbox zur Erwärmung und Dilatation der peripheren Gefäße mit einer Infrarotlampe bestrahlt. Anschließend wurde das jeweilige Tier in eine Rattenblutentnahmevorrichtung gesetzt. Die Vorrichtung wurde verschlossen und an einem Dreibeinstativ fixiert. Die Blutentnahmevorrichtung ist eine Röhre aus durchsichtigem Kunststoff mit einer Öffnung am Boden, durch die der Rattenschwanz heraushängen kann (siehe Abb. 7). Die Vorrichtung kann durch einen Längsspalt an der Seite der Röhre mit einem Schraubdeckel individuell der Tiergröße angepasst verschlossen werden. Im Schraubdeckel befindet sich eine kleine Öffnung, um das Tier zusätzlich zum Längsspalt mit Atemluft zu versorgen. Die Versuchstiere waren so ausreichend fixiert, um eine ordnungsgemäße Blutentnahme zu gewährleisten, hatten aber genug Raum für die uneingeschränkte Atmung.

Mit warmem Wasser und Kosmetiktüchern wurde der Schwanz gut gesäubert. Dies förderte zusätzlich die Durchblutung und die Weitstellung der Gefäße im Rattenschwanz, so dass sich die Venen unter der hellen Haut gut abzeichneten. Der Schwanz wurde zur Blutabnahme aus einer der lateral verlaufenden Venen mit der linken Hand fixiert. Die Punktion erfolgte mit einer in der rechten Hand gehaltenen ein Milliliter fassenden Tuberkulinspritze mit einer 27 Gauge Kanüle. Um ein Kollabieren des Blutgefäßes zu verhindern, erfolgte die Abnahme von einem Milliliter Blut je Tier sehr langsam.



**Abbildung 7:** Ratte in der Rattenblutentnahmehalterung (links). Quelle: Oliver Gramlich. Punktion einer der lateralen Schwanzvenen einer Ratte (rechts).

Nach Entfernen der Kanüle wurde die Blutung durch Kompression mit einem Kosmetiktuch zum Sistieren gebracht. Danach konnten die Versuchstiere ohne Beeinträchtigung zurück zu ihren Artgenossen in die jeweiligen Käfige gesetzt werden. Das entnommene Blut wurde in markierte Eppendorfgefäße gefüllt und für ca. eine Stunde auf Eis gelagert, bevor es in der kühlbaren Heraeus biofuge 25 Minuten bei 12500g und 7°C zentrifugiert wurde. Der Serumüberstand wurde in ein neues, unverwechselbar markiertes Eppendorfgefäß abpipetiert und bei -80°C zur Verwendung in anderen Studien tiefgefroren.

### 3.5.2 Blutentnahme durch Herzpunktion

Vier Wochen nach der Immunisierung erfolgte die Tötung der Tiere durch Kohlendioxid-Begasung. Das genaue Vorgehen bei der Tötung der Versuchstiere wird unter 3.7 näher erleutert. Anschließend wurde die Ratte durch Punktion des Herzens weitestgehend entblutet. Zum Auffinden der korrekten Punktionsstelle wurde die tote Ratte auf den Rücken gelegt. Ca. 0,3 cm unterhalb einer gedachten Linie zwischen beiden Ellenbogen wurde links neben dem Sternum, mit einer ein Milliliter fassenden Luer-Lok Spritze mit einer 20 Gauge Kanüle, direkt ins Herz eingestochen. Die Entnahme erfolgte langsam, um ein Nachfließen des Blutes aus

dem Körperkreislauf in das Herz zu ermöglichen. Zum zwischenzeitlichen Entleeren der Spritze in bereitgestellte Eppendorfgefäße, konnte diese von der Kanüle abgedreht werden. Um die Lage der Kanüle dabei nicht zu verändern wurde sie mit einer Hand fixiert. Es wurde soviel Blut wie möglich abgenommen und in Eppendorfgefäßen circa eine Stunde lang auf Eis gelagert, bevor es in der kühlbaren Heraeus biofuge 25 Minuten bei 12500g und 7°C zentrifugiert wurde. Es folgte das Abpipetieren des Serumüberstandes in ein neues, unverwechselbar markiertes Eppendorfgefäß und das Einfrieren des Überstandes zur Verwendung in anderen Studien bei -80°C.

### **3.6 Immunisierung**

Bei beiden Teilen der Studie folgte die Immunisierung einem vorher speziell festgelegten Schema. Die aus den drei Komponenten, Pertussis Toxin, Freund's Adjuvant und Antigen bestehende Immunisierungsdosis wurde, wie in Tabelle 1 dargestellt, unmittelbar vor der Verabreichung gemischt und in einer ein Milliliter fassenden Luer-Lock Spritze aufgezogen. Die intraperitoneale Immunisierung erfolgte bei jedem Tier mit einer 20 Gauge Kanüle in den rechten unteren Quadranten des Abdomens. Um eine Verletzung innerer Organe bei der Applikation zu vermeiden, wurde das Tier durch eine Hilfsperson an den Hinterbeinen, den Schultern und am Kopf fixiert. Nach der Immunisierung wurden die Versuchstiere eine Stunde lang engmaschig auf ihr Wohlbefinden kontrolliert. Es folgten weiter tägliche Kontrollen der Ratten mit besonderem Augenmerk auf Blutungen, Bewegungsstörungen, Knotenbildungen und Inflammationen an und um die Injektionsstelle.

**Immunisierungsschema der experimentellen autoimmunen Glaukom Studie**

Gruppe	Antigen	Pertussis Toxin	Freund's Adjuvant
β-Aktin	200 µg / 200 µl β-Aktin	3 µg / 120 µl	200 µl
GFAP	200 µg / 200 µl GFAP	3 µg / 120 µl	200 µl
Tubulin	200 µg / 200 µl Tubulin	3 µg / 120 µl	200 µl
GDNF+HSP 27	100 µg / 100 µl GDNF + 100 µg / 100 µl HSP 27	3 µg / 120 µl	200 µl
S100+HSP 27	100 µg / 100 µl S100 + 100 µg / 100 µl HSP 27	3 µg / 120 µl	200 µl
S100	200 µg / 200 µl S100	3 µg / 120 µl	200 µl
GDNF	200 µg / 200 µl GDNF	3 µg / 120 µl	200 µl
Kontrolle	200 µl 0,9% NaCl	3 µg / 120 µl	200 µl

**Tabelle 1:** Das Immunisierungsschema der Gruppen β-Aktin, saures Gliafaserprotein (GFAP), Tubulin, Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF), calciumbindendes Protein S100 und die Kombination der beiden letztgenannten mit dem Hitzeschockprotein 27 (HSP 27) sowie der Kontrollgruppe mit genauer Angabe der Bestandteile, ihres Volumens in Mikroliter (µl) und ihrer Konzentrationen in Mikrogramm pro Mikroliter (µg/µl). Die Kontrollgruppe erhielt anstelle des Antigens 0,9 prozentige (%) Kochsalzlösung (NaCl).

### 3.7 Tötung der Versuchstiere

Um einen schnellen und schmerzlosen Tod aller Versuchstiere herbeizuführen, wurden die Tiere einzeln mit Kohlendioxid vergast. Dabei wurden alle Vorgaben nach § 4 des Tierschutzgesetzes (TSchG) beachtet. Jedes Tier wurde einzeln in einen Plastikexikator gesetzt, in welchen die Einleitung des Kohlendioxids erfolgte. Das Gas wurde erst abgestellt, wenn durch den durchsichtigen Deckel keine Lebenszeichen der jeweiligen Ratte mehr zu registrieren waren. Nach ausreichend langer Kohlendioxid Exposition wurde das Ausbleiben der Atmung, das Fehlen eines regelmäßigen Herzschlags und der Reflexe bei jeder Ratte überprüft. Wenn alle diese Vitalzeichen bei der Überprüfung fehlten, wurde sofort mit der Blutentnahme durch Herzpunktion begonnen. Es folgte unmittelbar die Kammerwasser- und Organentnahme.

### **3.8 Kammerwasserentnahme**

Nach dem Entbluten der Versuchstiere wurde sofort mit der Abnahme des Kammerwassers begonnen. Dazu wurde das Auge am peribulbären Gewebe im nasalen Winkel mit einer chirurgischen Pinzette fixiert. Die Punktion der vorderen Augenkammer erfolgte mit einer 10 µl Hamiltonspritze mit einer sehr feinen Nadel. Die durchschnittlich entnommenen 10 µl Kammerwasser wurden in kleinen Eppendorfgefäßen bei -80°C zur Verwendung in anderen Studien tiefgefroren.

### **3.9 Organentnahme**

Für die histologische Aufarbeitung wurden bei allen Ratten die Augen samt Sehnerv entnommen. Das Gehirn und das Rückenmark wurden für spätere Studien herauspräpariert.

#### **3.9.1 Verwendete Lösungen**

Zur Herstellung einer vierprozentigen Formaldehydlösung wurden vier Gramm des pulverförmigen Paraformaldehyds in 100 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelöst und bis zum völligen auflösen auf einer Heizplatte unter dem Abzug aufgeköcht.

Die vierprozentige Formalinlösung wurde durch Verdünnen einer gesättigten Formalinlösung (4 ml) im entsprechenden Mischverhältnis mit PBS (96 ml) angemischt. Die Lösungen wurden bis zum Gebrauch in mit Aluminiumfolie umwickelten Schraubdeckelflaschen bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

#### **3.9.2 Entnahme von Augen und Sehnerven**

Durch einen Einschnitt des oberen Augenlides wurde mehr Platz zur Eukleation des Bulbus geschaffen. Mit einer chirurgischen Pinzette wurde das Auge durch Erfassen des periorbitalen Bindegewebes fixiert. Mit einer feinen Präparierschere erfolgte die vorsichtige Befreiung des Auges vom umgebenden Binde- und Fettgewebe. Daraufhin konnten die Augenmuskeln unter Schonung des Sehnervs durchtrennt werden. Danach wurde, durch leichten Zug am Auge, die Sicht auf den N. opticus frei

und dieser soweit caudal wie möglich durchtrennt. Das enukleierte Auge wurde in einer mit PBS gefüllten Petrischale unter dem Operationsmikroskop vom restlichen, störenden Gewebe befreit. Die Augen lagerten zunächst für zwei Stunden zur Fixierung in vierprozentiger Formaldehydlösung und anschließend bis zur zeitnahen Flatmountpräparation in einem mit PBS gefüllten Schraubdeckelfläschchen.

### **3.9.3 Entnahme von Gehirn und Rückenmark**

Es wurde ein medianer Hautschnitt von der Nase bis zum Becken angelegt. Nach ausreichender Freilegung der Wirbelsäule und der Schädeldecke durch Abpräparieren der umgebenden Muskeln und Haut wurde die Wirbelsäule im Lendenwirbelbereich durchtrennt. So konnte man in den Wirbelkanal einsehen und die einzelnen Wirbelkörper unter Schonung des Rückenmarks zwischen Processus transversum und Processus spinosus mit einer Schere durchtrennen. Am Schädel angelangt, wurde dieser mit zwei vom Foramen magnum ausgehenden Temporalschnitten rechts und links bis hin zu den Orbitae eingeschnitten. Durch vorsichtiges Heben der Schädeldecke mit einer Pinzette am Os occipitale konnte die Schädeldecke nach nasal umgeklappt werden. Das Rückenmark wurde im Bereich der Cauda Equina mit einer anatomischen Pinzette erfasst und angehoben. Die abgehenden Nerven wurden vorsichtig auf der gesamten Länge des Rückenmarks abgetrennt. Das Gehirn wurde mit einer stumpfen, gebogenen Pinzette vorsichtig aus der Schädelkapsel gelöst. Gehirn und Rückenmark verblieben zur Fixation und Lagerung für weitere Studien in einem 30 ml Schnappdeckelglas mit vierprozentiger Formalinlösung.

### **3.10 Flatmountpräparation**

In einer mit PBS gefüllten Petrischale wurden unter dem Operationsmikroskop die Retinae aus den Augen herauspräpariert. Dazu wurde der Sehnerv samt Sehnervenkopf vom Auge abgetrennt und zurück in das mit PBS gefüllte Schraubdeckelglas gegeben. Die Sclera wurde an dem so entstandenen Loch mit einer feinen Pinzette erfasst und mit vier Schnitten in gleichem Abstand bis hin zum Übergang von der Sclera in die Cornea eingeschnitten. Die vier so entstandenen Segel der Sclera konnten nach vorne umgeklappt und die Linse samt

aufsitzender Retina mit zwei feinen Pinzetten vorsichtig aus Sclera und Cornea herausgeschält werden. Mit Hilfe von kleinen Pinseln wurde die Retina von der Linse abpräpariert. Die schalenförmige Netzhaut wurde ebenfalls mit vier Schnitten kleeblattartig eingeschnitten und vorsichtig auf einen beschrifteten Objektträger ausgebreitet. Es folgte mit Hilfe von Pinseln und Pinzetten die Entfernung des gelartigen Glaskörpers von der Retina. Die so hergestellten Präparate trockneten über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

### **3.11 Kresylviolett Färbung**

Die Kresylviolett färbung nach Nissl gehört zu den etablierten Färbetechniken zur Darstellung von Zellkernen (Hermeijer et al. 2010), insbesondere solchen aus neuronalem Gewebe (Mulisch und Welsch 2010). An der Anfärbung der Zellen sind vor allem Bestandteile des Zellkerns und die in das Zytoplasma eingelagerten Nissl Schollen beteiligt. Letztere sind heute als Stapel des rauhen endoplasmatischen Retikulums identifiziert. Somit stellen Ribonukleoproteine das Substrat der Färbung dar und es kann davon ausgegangen werden, dass sich ausschließlich in intakten Zellen Ribosomen und Kernbestandteile anfärben. Da sich beim Abwaschen des überflüssigen Farbstoffes die Fasern des Gewebes schneller entfärben als die zellulären Bestandteile, stellt sich das intensiv gefärbte Zellmaterial deutlich abgehoben vom farblosen Untergrund dar. Die Nissl Schollen, die Kernmembranen und die Nukleolen färben sich kräftig blau oder violett, wohingegen sich das Zytoplasma der Ganglienzellen und die Gliazellen nur schwach blau färben. Die Zellfortsätze bleiben komplett ungefärbt (Romeis und Böck 1989). Das getrocknete Retina-Präparat wurde zunächst kurz in Aqua destillata (Aqua dest.) getaucht und dann in einer in der Konzentration ansteigenden Isopropanol Alkoholreihe (IPA Lsg.) und Xylol-Ersatzmedium (XEM) dehydriert.

- 70 prozentige IPA Lsg.+ 3 Tropfen Eisessig
  - 80 prozentige IPA Lsg.+ 3 Tropfen Eisessig
  - 100 prozentige IPA Lsg.+ 3 Tropfen Eisessig
  - 100 prozentige IPA Lsg.+ 3 Tropfen Eisessig
  - XEM (Xylol Ersatzmedium)
- } Präparate verblieben  
jeweils 3 min in jeder  
Lösung und XEM

Anschließend erfolgte die Rehydratation in absteigenden Alkoholkonzentrationen.

- 100 prozentige IPA Lsg.+ 3 Tropfen Eisessig
  - 100 prozentige IPA Lsg.+ 3 Tropfen Eisessig
  - 80 prozentige IPA Lsg.+ 3 Tropfen Eisessig
  - 70 prozentige IPA Lsg.+ 3 Tropfen Eisessig
  - Aqua dest.
- } Präparate verblieben  
jeweils 3 min in jeder  
Lösung und Aqua dest.

Danach wurden die Präparate für 15 Minuten in der Kresylviolett-färbelösung inkubiert. Die Differenzierung erfolgte in Aqua dest. und den folgenden aufsteigenden Alkoholkonzentrationen:

- Aqua dest.
  - 70 prozentige IPA Lsg.+ 3 Tropfen Eisessig
  - 80 prozentige IPA Lsg.+ 3 Tropfen Eisessig
  - 100 prozentige IPA Lsg.+ 3 Tropfen Eisessig
  - 100 prozentige IPA Lsg.+ 3 Tropfen Eisessig
- } Präparate jeweils 15-20 sek.  
in Aqua dest. und jede  
Lösung tauchen

Zur Fixierung verblieben die Flatmounts auf den Objektträgern noch fünf Minuten im Xylol-Ersatzmedium, bevor sie, ohne auszutrocknen, mit Eukitt Eindeckmedium und Deckgläschen eingedeckt und konserviert wurden.

### 3.11.1 Verwendete Lösungen

Die verwendeten Alkohollösungen und das Xylol-Ersatzmedium wurden für jeden Färbedurchgang bei Raumtemperatur frisch angesetzt. Die Ansäuerung aller Alkohollösungen erfolgte mit je drei Tropfen Eisessig. Die Kresylviolettlösung wurde für alle Färbedurchgänge eines Studienteilabschnittes verwendet und in einer



geschlossenen Flasche gelagert. In den Tabellen 2 und 3 sind die genauen Zusammensetzungen der Lösungen aufgeführt.

Lösung	Enthaltene Substanzen	Menge
70 prozentige Isopropanol Lösung	Isopropanol, $\geq 99,5\%$	140 ml
	Aqua destillata	60 ml
80 prozentige Isopropanol Lösung	Isopropanol, $\geq 99,5\%$	160 ml
	Aqua destillata	40 ml
100 prozentige Isopropanol Lösung	Isopropanol, $\geq 99,5\%$	200 ml
Xylol-Ersatzmedium		200 ml

**Tabelle 2:** Zusammensetzungen der Lösungen der Alkoholreihe mit der Angabe der jeweiligen Konzentration in Prozent (%) und Menge in Millilitern (ml).

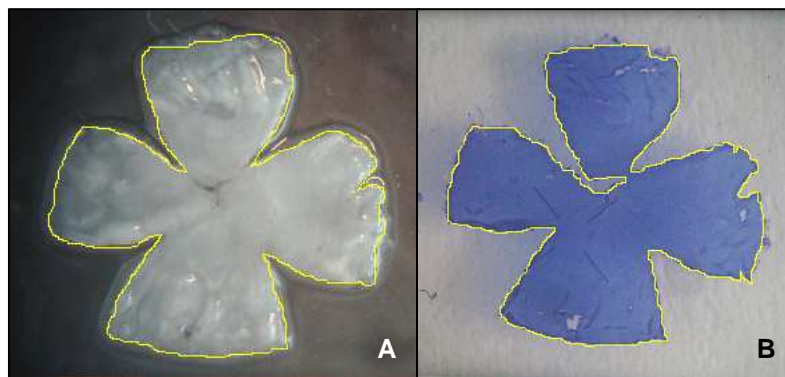
Lösung	Enthaltene Substanzen	Menge
Natriumacetatlösung 0,1 mol	Natriumacetat	8,2 g
	Aqua destillata	1 l
Essigsäure 0,1 mol	Essigsäure	5,8 ml
	Aqua destillata	994,2 ml
Acetatpufferlösung	Natriumacetatlösung 0,1 mol	15 ml
	Essigsäure 0,1 mol	185 ml
Kresylblaustammlösung	Kresylblau	0,1 g
	Aqua destillata	75 ml
Kresylblaufärbelösung	Kresylblaustammlösung	24 ml
	Acetatpuffer	200 ml

**Tabelle 3:** Zusammensetzungen der Pufferlösungen und Färbelösungen mit Angabe der jeweiligen molaren Konzentration (mol) und der Menge in Millilitern (ml) und Litern (l) sowie Gramm (g).

### 3.12 Flatmountausmessung

Da die Retinapräparate während der Trocknung auf dem Objektträger über Nacht Feuchtigkeit verloren und damit schrumpften, erfolgte die Ausmessung der jeweiligen Fläche des Flatmounts vor der Trocknung und nach der Kresylviolett-färbung. Dazu

wurden die frisch präparierten, noch feuchten Flatmounts in einer 2,5 fachen Vergrößerung unter einem Olypmuskop in ihrem gesamten Ausmaß fotografiert. Die Fotos wurden markiert, um zu gewährleisten, dass sie eindeutig zuzuordnen sind und mit den entsprechenden Fotos nach der Färbung verglichen werden konnten. Nach der Kresylviolettärbung wurden die Flatmounts ebenfalls in einer 2,5 fachen Vergrößerung unter dem gleichen Mikroskop fotografiert. Mit Hilfe des Computerprogramms Image J konnte, wie in Abbildung 8 dargestellt, die jeweilige Fläche des Flatmounts vor der Trocknung und nach dem Färben ermittelt werden. Mit diesen beiden Werten konnte die Schrumpfung für jeden einzelnen Flatmount errechnet und in Prozent angegeben werden.



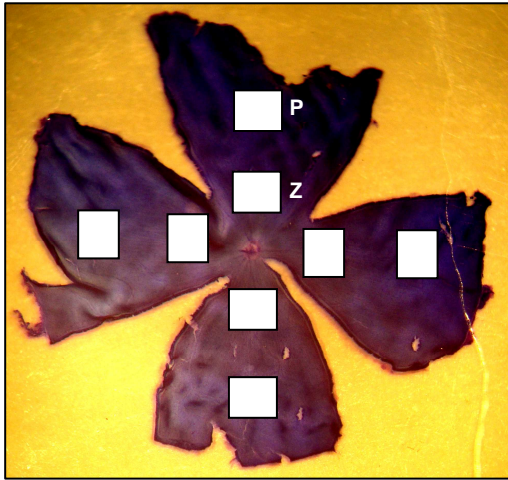
**Abbildung 8:** Die Abbildung zeigt ein Beispiel einer Flatmountausmessung. Auf dem linken Bild (A) ist ein Flatmount direkt nach der Präparation und vor der Trocknung zu sehen. Auf dem rechten Bild (B) ist derselbe Flatmount nach der Färbung dargestellt. Die Umrisse der Flatmounts wurden mit einer gelben Linie manuell nachgezeichnet und die Pixel der Fläche innerhalb der gelben Umrandung durch das Computerprogramm Image J berechnet. Im vorliegenden Beispiel ergab die Berechnung eine Anzahl von 1.215.503 Pixel für den ungefärbten Flatmount auf dem linken Bild (A) und eine Anzahl von 1.075.139 Pixel für den gefärbten Flatmount auf dem rechten Bild (B). Dies entspricht einer Schrumpfung von 11,6%.

Um die Anzahl der gezählten Zellen auf den in 40 facher Vergrößerung fotografierten Bildausschnitten pro  $\text{mm}^2$  zu erhalten erfolgte folgende Berechnung. Die Fläche des in 40 facher Vergrößerung fotografierten Flatmountausschnittes zum manuellen Zählen der Zellen beträgt  $203,5 \mu\text{m}$  Breite mal  $153,5 \mu\text{m}$  Länge, also  $31237,25 \mu\text{m}^2$ . Da das Retinapräparat aber um eine gewisse Prozentzahl geschrumpft ist, befänden sich die Zellen des Bildausschnittes in vivo auf einer Fläche, die um diese Prozentzahl größer wäre. Nehmen wir für die Beispielrechnung die in Abbildung 8 errechnete Schrumpfung von 11,6% an, würden sich die ausgezählten Zellen des

Bildausschnittes auf einer Fläche, die 1,116 mal so groß ist wie die fotografierte Fläche von  $31237,25 \mu\text{m}^2$  bzw.  $0,03123725 \text{mm}^2$  befinden. Deshalb erfolgte die Multiplikation von  $0,03123725 \text{mm}^2$  mit 1,116 ( $=0,03486077 \text{mm}^2$ ), um die Fläche zu erhalten, auf der sich die Zellen ohne die durch die Trocknung bedingte Schrumpfung befinden würden. Um letztendlich die Dichte der Zellen pro  $\text{mm}^2$  zu erhalten, wurde errechnet, wie oft die Fläche  $0,03486077 \text{mm}^2$  in  $1 \text{mm}^2$  passt. Damit erhielt man einen Faktor für das jeweilige Präparat, mit dem die Anzahl jedes Zelltyps der ausgezählten Zellen pro Bildausschnitt multipliziert wurde, um die Anzahl der Zellen pro  $\text{mm}^2$  zu erhalten. Da die Berechnung der Schrumpfung für jeden Flatmount einzeln durchgeführt wurde, konnte für jedes Präparat der exakte Wert der Zelldichte ermittelt werden.

### **3.13 Flatmountfotografie und Zellauszählung**

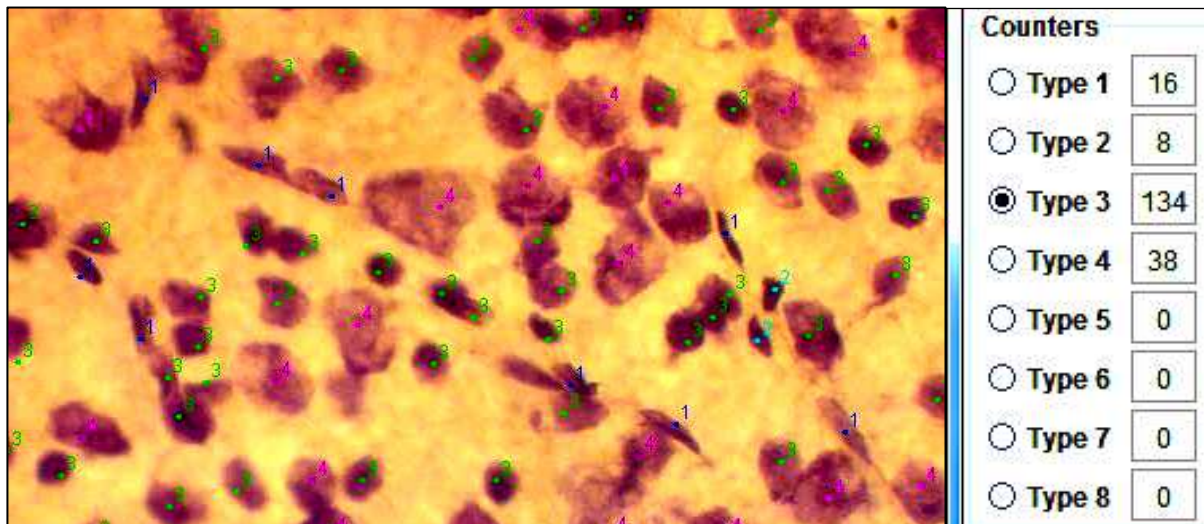
Von jedem Retinapräparat wurden, wie in Abbildung 9 dargestellt, je vier periphere und vier zentrale Areale fotografiert. Als Aufnahmegerät diente eine Hitachi Mikroskop Kamera die direkt an einem Olympus Mikroskop angebracht war. Die Kamera war zusätzlich mit einem Diskus Histologie-Computerprogramm auf einem externen Rechner verbunden. Zuerst wurde im Mikroskop in der vierfachen Vergrößerungsstufe das gewünschte Areal ausgewählt und dann in der 40 fachen Vergrößerung scharf gestellt. Somit ergab sich im Diskus Histologie-Programm ein Bildausschnitt von  $203,5 \mu\text{m}$  Breite und  $153,5 \mu\text{m}$  Länge, welcher vor Auslösen der Kamera hinsichtlich Qualität und Position optimiert werden konnte. Das Bild wurde mit Hilfe des Programms unverwechselbar markiert und gespeichert. Dieser Vorgang war für alle acht Areale pro Flatmount identisch. Es musste darauf geachtet werden, dass kein Areal doppelt fotografiert oder vergessen wurde.



**Z = zentrales Areal**  
**P = peripheres Areal**

**Abbildung 9:** Die weißen Rechtecke auf dem Flatmountpräparat in der Abbildung stellen beispielhaft die Lage der vier zentralen und der vier peripheren Areale dar, die bei jedem Flatmount fotografiert wurden.

Die Auszählung der Zellkerne erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Image J. Das Programm ermöglicht es, wie in Abbildung 10 zu sehen, verschiedene Zellarten mit unterschiedlichen Farben und Nummern per Mausklick manuell auf dem ausgewählten Bild zu markieren. So konnten Doppelzählungen vermieden werden. Es wurden vier verschiedene Zelltypen beim Auszählen unterschieden: die Endothelzellen, die Gliazellen, die magno- und parvozellulären Neurone. Das Programm gab automatisch die entsprechende Anzahl der Mausklicks pro Zelltyp und somit die Anzahl der ausgezählten Zellekerne pro Bild und Zellkategorie an. Um die Gesamtzahl der Neurone pro Bild zu erhalten wurden in einem Excel Tabellenkalkulationsprogramm die parvo- und magnozellanen Neurone zusammengezählt. Sowohl das mit den verschiedenen Markierungen versehene ausgezählte Bild, als auch die dazugehörige Anzahl der gezählten Zellkerne wurde gespeichert und waren so für Kontrollen zugänglich.



**Abbildung 10:** Darstellung eines mit Markern versehenen Flatmountfotoausschnitts (links) mit dazugehöriger Zellanzahl des jeweiligen Markertyps (rechts). In dieser Abbildung wurden die Endothelzellen mit dem Markertyp 1 (blau), die Gliazellen mit dem Markertyp 2 (türkis), die parvozellulären Neurone mit dem Markertyp 3 (grün) und die magnozellularären Neurone mit dem Markertyp 4 (rot) markiert.

### 3.14 Statistische Verfahren

Die Auswertungen erfolgten mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft EXCEL und dem t-Test des Statistikprogramms Statistica (Version 8.0). Die in der vorliegenden Studie verwendeten statistischen Verfahren sollen hier kurz erläutert werden.

#### Mittelwert:

Der arithmetische Mittelwert  $\bar{x}$  ist für quantitative Merkmale das gebräuchlichste Längenmaß. Er gibt den Schwerpunkt jeder Messreihe an und wird nach der in Abbildung 11 dargestellten Formel berechnet (Trampisch und Windeler 2000; Hartung et al. 2005).

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

**Abbildung 11:** Berechnungsformel des arithmetischen Mittelwertes ( $\bar{x}$ ). Dabei bezeichnet  $\sum$  die Summe der Werte  $x_1+x_2+\dots+x_n$  und  $n$  die Anzahl der Beobachtungen. Mit  $i$  und  $n$  sind die Grenzen für den Laufindex definiert. Quelle: Hartung et. al (2005)

Aus der Formel wird deutlich, dass der Mittelwert sehr anfällig für Ausreißerwerte ist, da jedem Messwert die gleiche Gewichtung zukommt (Trampisch und Windeler 2000; Hartung et al. 2005).

### Standardabweichung:

Die Standardabweichung (S) ist ein Streuungsmaß, welches die Abweichung der Messdaten von ihrem Mittelwert  $\bar{x}$  angibt. Sie wird nach der Formel in Abbildung 12 berechnet (Trampisch und Windeler 2000; Hartung et al. 2005).

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

**Abbildung 12:** Berechnungsformel der Standardabweichung (S). Dabei bezeichnet  $\bar{x}$  den arithmetischen Mittelwert,  $\sum$  die Summe der Werte  $x_1+x_2+\dots+x_n$  und n die Anzahl der Beobachtungen. Mit i und n sind die Grenzen für den Laufindex definiert. Quelle: Hartung et. al (2005)

Gegenüber der Varianz hat die Standardabweichung den Vorteil, dass Standardabweichung und Messwerte die gleiche Dimension und damit die gleiche wie  $\bar{x}$  besitzen. Die Standardabweichung ist auch ein Maß für die Homogenität bzw. Heterogenität der Messwerte, d.h. je kleiner die Standardabweichung, desto homogener sind die Daten (Trampisch und Windeler 2000; Hartung et al. 2005).

### Standardfehler:

Der Standardfehler ( $S_{\bar{x}}$ ) ist eine Standardabweichung des Mittelwertes vom Erwartungswert. Je größer der Stichprobenumfang ist, desto geringer ist der statistische Fehler. Er ist stets kleiner als die Standardabweichung und berechnet sich wie in Abbildung 13 ersichtlich (Trampisch und Windeler 2000; Hartung et al. 2005).

$$\bar{x} \pm s_{\bar{x}} \quad \text{mit} \quad s_{\bar{x}} = \frac{1}{\sqrt{n}} s = \frac{1}{\sqrt{n}} \cdot \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

**Abbildung 13:** Berechnungsformel des Standardfehlers ( $S_{\bar{x}}$ ). Dabei bezeichnet  $S$  die Standardabweichung,  $\bar{x}$  den arithmetischen Mittelwert,  $\sum$  die Summe der Werte  $x_1+x_2+\dots+x_n$  und  $n$  die Anzahl der Beobachtungen. Mit  $i$  und  $n$  sind die Grenzen für den Laufindex definiert. Quelle: Hartung et. al (2005)

### t-Test:

Bei Verteilungen die nahe bei der Normalverteilung liegen, was für die meisten annähernd symmetrischen Verteilungen der Fall ist, ist der t-Test die trennschärfste Methode. Mit dem t-Test kann der Einfluss auf die Messwerte abhängiger Stichproben nachgewiesen werden. Dabei wird ein Vergleich eines Erwartungswertes mit einem fest definierten Wert durchgeführt (Trampisch und Windeler 2000; Hartung et al. 2005).

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Versuchstiere**

Die Studie umfasste insgesamt 47 männliche Lewis Ratten, die zur Arbeitserleichterung in zwei Teilgruppen zu 23 bzw. 24 Tieren aufgeteilt waren. Während der gesamten Studiendauer zeigte keines der Tiere bei den regelmäßig durchgeführten Untersuchungen irgendwelche Auffälligkeiten oder Krankheitsanzeichen an den Augen oder an sonstigen Organen. Auch nach der Immunisierung konnten keine Knoten an den Injektionsstellen, keine Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens oder neurologische Ausfälle wie beispielsweise Paralysen, festgestellt werden.

#### **4.1.1 Gewichtskontrolle der Versuchstiere**

Die Ratten wogen eine Woche vor der Immunisierung zwischen 198g und 279g. Bis auf ein Tier nahmen alle während der gesamten Studiendauer kontinuierlich zu. Bei dem Tier, das nicht kontinuierlich zunahm, handelte es sich um eine Ratte aus der GDNF+HSP 27-Gruppe. Diese Ratte nahm am Anfang der Studie ganz normal an Gewicht zu. Zwischen der ersten und zweiten Woche nach der Immunisierung verlor sie jedoch drei Gramm Körpergewicht. Bis zum Ende der Studie nahm sie wieder an Gewicht zu. Ihr Endgewicht betrug 329g. Die Körpergewichte aller Versuchstiere zum Endzeitpunkt der Studie lagen zwischen 278g und 373g.

### **4.2 Augeninnendruckmessung**

Sowohl im ersten als auch im zweiten Teilabschnitt konnte jeweils zu den geplanten Zeitpunkten eine Woche vor der Immunisierung, sowie zwei und vier Wochen danach der Augeninnendruck der Versuchstiere gemessen werden. Die Messungen wurden immer zur gleichen Tageszeit von derselben Person, der Doktorandin, getätigt. Es fanden je zehn Messungen pro Auge statt, aus denen ein Mittelwert für das jeweilige Auge errechnet wurde. Aus Tabelle 4 können die Mittelwerte des IOP der einzelnen Gruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt sowie die Standardabweichungen (SD), der Standardfehler (SE) und die p-Werte entnommen werden.



## Ergebnisse

	Co	β-Aktin	GFAP	Tubulin	GDNF	S100	GDNF+ HSP27	S100+ HSP27
<b>Baseline</b>								
Mittelwert [mmHg]	<b>12,1</b>	<b>13,3</b>	<b>14,1</b>	<b>13,6</b>	<b>12,7</b>	<b>12,8</b>	<b>10,9</b>	<b>11,1</b>
± SD	1,5	0,5	0,9	2,2	2,0	2,3	0,4	0,2
± SE	0,6	0,3	0,4	1,1	0,7	0,8	0,1	0,1
p-Wert	—	0,2	<b>0,04</b>	0,2	0,5	0,5	0,1	0,1
<b>2 Wochen</b>								
Mittelwert [mmHg]	<b>12,1</b>	<b>12,5</b>	<b>13,8</b>	<b>15,1</b>	<b>12,0</b>	<b>11,4</b>	<b>11,2</b>	<b>12,0</b>
± SD	0,5	1,6	2,4	2,0	0,7	0,6	0,4	0,6
± SE	0,2	0,8	1,2	1,0	0,2	0,2	0,2	0,2
p-Wert	—	0,5	0,1	<b>0,003</b>	0,7	<b>0,02</b>	<b>0,005</b>	0,7
<b>4 Wochen</b>								
Mittelwert [mmHg]	<b>12,0</b>	<b>12,2</b>	<b>12,5</b>	<b>12,9</b>	<b>12,3</b>	<b>12,5</b>	<b>11,5</b>	<b>11,4</b>
± SD	1,3	0,5	1,8	1,4	1,2	1,4	0,8	0,5
± SE	0,5	0,2	0,9	0,7	0,4	0,5	0,3	0,2
p-Wert	—	0,8	0,6	0,4	0,7	0,5	0,4	0,3

**Tabelle 4:** Die Tabelle zeigt die Mittelwerte in Millimeter Quecksilber (mmHg), die Standardabweichungen (SD) und die Standardfehler (SE) der Augeninnendruckmessungen Messungen der Gruppen β-Aktin, saures Gliafaserprotein (GFAP), Tubulin, Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF), calciumbindendes Protein S100 und die Kombination der beiden letztgenannten mit dem Hitzeschockprotein 27 (HSP27) sowie der Kontrollgruppe (Co) eine Woche vor der Immunisierung (Baseline) sowie zwei und vier Wochen danach. Die rot markierten Zahlen zeigen an, dass bei dieser Gruppe im t-Test ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe bestand. (Signifikanzwert  $p < 0,05$ ).

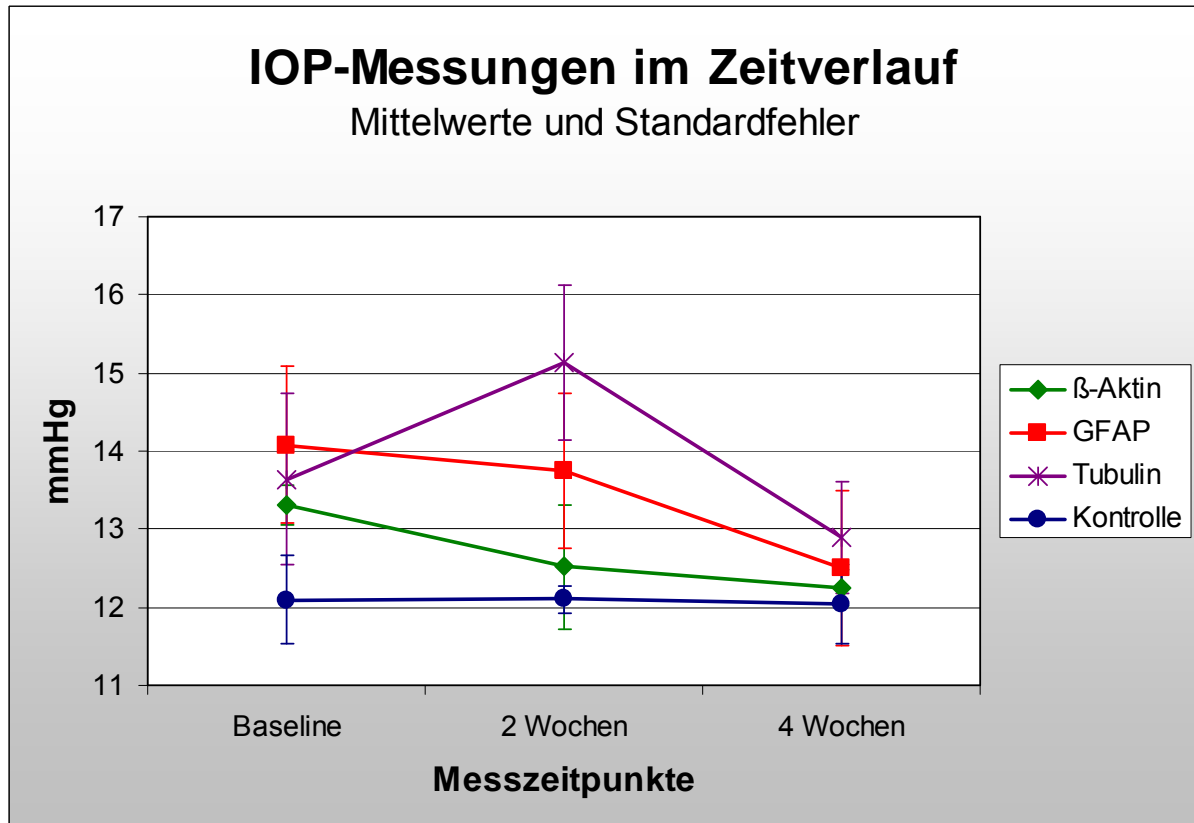
Der Mittelwert aller Gruppen über den gesamten Zeitraum lag bei 12,3 mmHg mit einer Standardabweichung von 1,5 mmHg und einem Standardfehler von 0,1. Dabei lagen die Werte einzelner Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten zwischen 10,9

mmHg (GDNF+HSP27-Gruppe) und 15,1 mmHg (Tubulin-Gruppe). Zum Baseline-Messzeitpunkt wies mit 10,9 mmHg die GDNF+HSP27-Gruppe den niedrigsten IOP und die GFAP-Gruppe mit 14,1 mmHg den höchsten auf. Die Werte der Standardabweichung lagen weit auseinander und reichten von 0,2 mmHg bei der S100+HSP27-Gruppe bis hin zu 2,3 mmHg bei der S100-Gruppe. Auch die Standardfehler wiesen mit 0,1 bei der S100+HSP27- und der GDNF+HSP27-Gruppe bis hin zu 1,1 bei der Tubulin-Gruppe große Schwankungen auf. Jedoch zeigte nur die GFAP-Gruppe mit 14,1 mmHg und  $p=0,04$  zum Baseline-Messzeitpunkt eine signifikante IOP-Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe (12,1 mmHg).

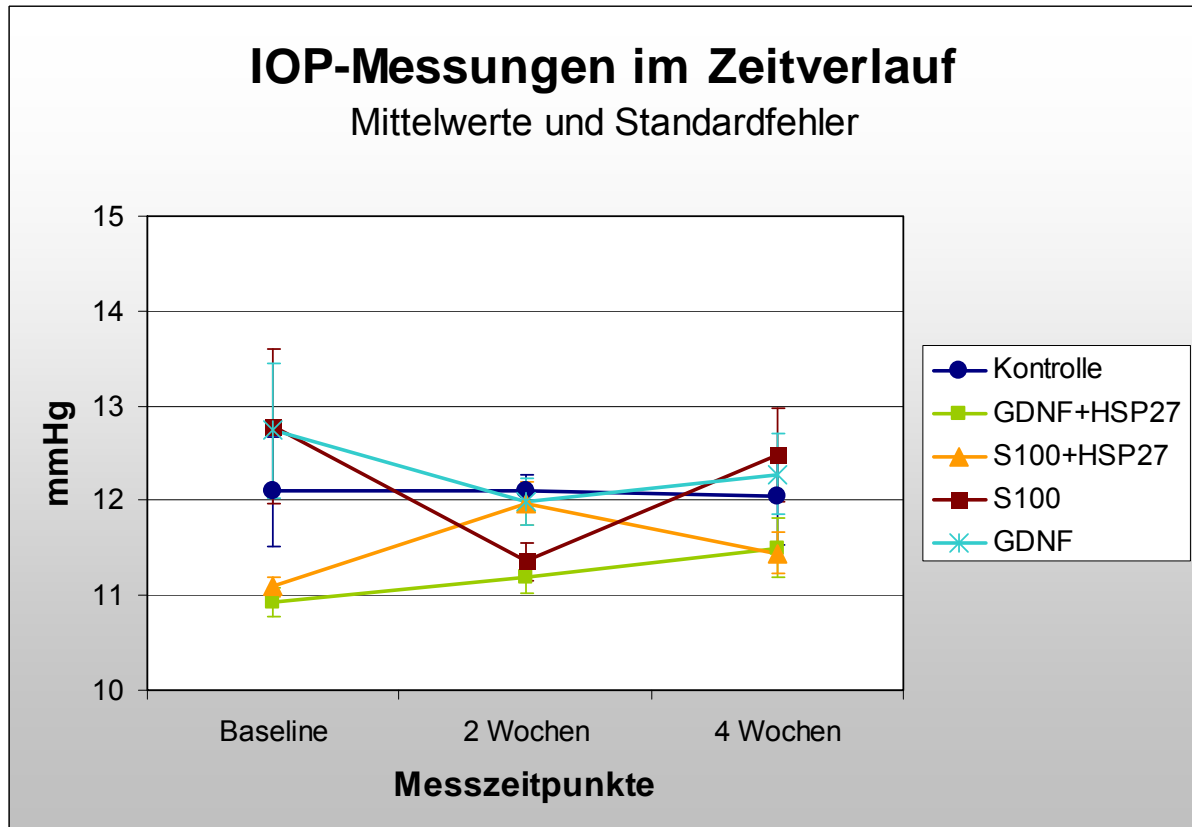
Am zweiten Messzeitpunkt, zwei Wochen nach der Immunisierung, konnten IOP Werte zwischen 11,2 mmHg (GDNF+HSP27-Gruppe) und 15,1 mmHg (Tubulin-Gruppe) ermittelt werden. Die geringste Standardabweichung wies mit 0,4 mmHg die GDNF+HSP27-Gruppe auf, die größte mit 2,4 mmHg die GFAP-Gruppe. Gleich bei fünf Gruppen wurde ein Standardfehler von 0,2 ermittelt, welcher zu diesem Messzeitpunkt der kleinste war. Der größte Standardfehler zeigte sich mit 1,2 bei der GFAP-Gruppe. Zu diesem Messzeitpunkt wiesen drei Gruppen eine signifikante Abweichung zur Kontrollgruppe mit einem IOP von 12,1 mmHg auf. Dabei stieg der IOP der Tubulin-Gruppe mit 15,1 mmHg ( $p=0,003$ ) gegenüber der Kontrollgruppe signifikant an, während bei der S100-Gruppe mit 11,4 mmHg ( $p=0,02$ ) und der GDNF+HSP27-Gruppe mit 11,2 mmHg ( $p=0,005$ ) ein signifikanter Abfall des IOP zu verzeichnen war.

Zum letzten Messzeitpunkt, vier Wochen nach der Immunisierung, konnten keine signifikanten Unterschiede mehr festgestellt werden. Der höchste Augeninnendruck konnte zu diesem Zeitpunkt mit 12,9 mmHg bei der Tubulin-Gruppe und der niedrigste mit 11,4 mmHg bei der S100+HSP27-Gruppe gemessen werden. Die Standardabweichungen lagen zwischen 1,8 mmHg bei der GFAP-Gruppe und 0,5 mmHg bei der  $\beta$ -Aktin- sowie der S100+HSP27-Gruppe. Der größte Standardfehler konnte mit 0,9 bei der GFAP-Gruppe und der kleinste mit 0,2 bei der  $\beta$ -Aktin- und der S100+HSP27-Gruppe ermittelt werden.

In den Abbildungen 14 und 15 sind die Mittelwerte und Standardfehler des IOP graphisch dargestellt. Zur besseren Übersicht sind die sieben Antigengruppen auf zwei Graphen aufgeteilt, in denen jeweils die Kontrollgruppe zum Vergleich mit aufgeführt ist.



**Abbildung 14:** Die Abbildung zeigt den Verlauf des Augeninnendruckes (IOP) der Gruppen  $\beta$ -Aktin, saures Gliafaserprotein (GFAP), Tubulin und der Kontrolle eine Woche vor der Immunisierung (Baseline) sowie zwei und vier Wochen danach in Millimeter Quecksilber (mmHg). Der Standardfehler ist durch die senkrechten Linien dargestellt und verdeutlicht die Heterogenität der Messungen an den ersten beiden Messzeitpunkten sowie die Homogenität am letzten Messzeitpunkt.

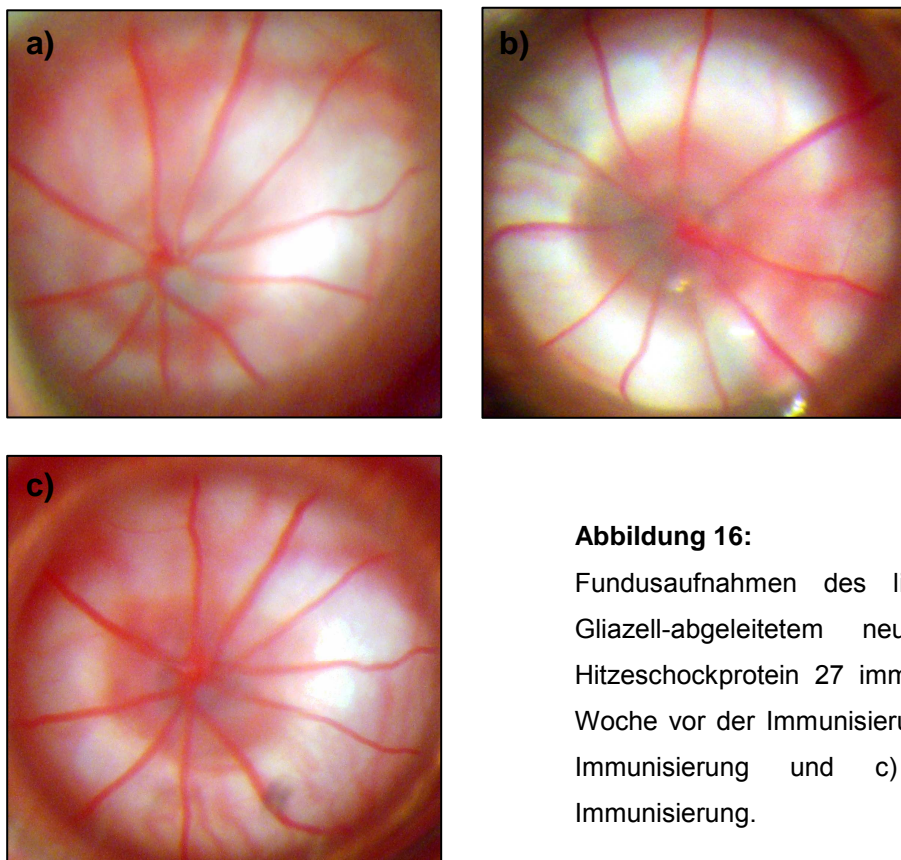


**Abbildung 15:** Die Abbildung zeigt den Verlauf des Augeninnendruckes (IOP) der Gruppen Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF), calciumbindendes Protein S100 und die Kombination der beiden genannten mit dem Hitzeschockprotein 27 (HSP 27) sowie der Kontrollgruppe eine Woche vor der Immunisierung (Baseline) sowie zwei und vier Wochen danach in Millimeter Quecksilber (mmHg). Der Standardfehler ist durch die senkrechten Linien dargestellt und verdeutlicht die Heterogenität der Messungen zum Baselinezeitpunkt, sowie die Homogenität der Messungen am zwei und vier Wochen Messzeitpunkt.

### 4.3 Funduskopie

Die Funduskopie wurde im zweiten Teilabschnitt der Studie an 24 Tieren je eine Woche vor, sowie zwei und vier Wochen nach der Immunisierung durchgeführt. Alle Versuchstiere vertrugen die Narkose gut und hatten zur Untersuchung die gewünschte Narkosetiefe. Die Narkose wurde mittels Inhalationsnarkose über eine Narkosemaske für die gesamte Dauer der Untersuchung aufrecht erhalten. In der Aufwachphase und nach dem vollständigen Erwachen zeigte keines der Tiere Anzeichen eines gestörten Allgemeinbefindens. Die Tiere konnten zeitnah nach dem Erwachen aus der Aufwachbox zurück in den Käfig zu den Artgenossen gesetzt werden. Das Mydriatikum führte bei allen Ratten zu einer, für die Untersuchung,

optimalen Dilatation, die sich bis spätestens zum nächsten Morgen vollständig zurückgebildet hatte. Keines der Tiere entwickelte einen Hornhautdefekt oder sonstige Schäden am Auge, welche die Untersuchung eingeschränkt hätten. So konnten alle Tiere zu den geplanten Zeitpunkten untersucht und die Fundi zur Dokumentation fotografiert werden (siehe Abbildung 16). Der Discus n. optici wurde in jedem einzelnen Auge hinsichtlich der Größe, Form, eventuelle Neovaskulation und Anzeichen für eine Exkavation untersucht. Bei keinem der Tiere konnten während dem Verlauf der Studie derartige Veränderungen festgestellt werden.



**Abbildung 16:**

Fundusaufnahmen des linken Auges eines mit Gliazell-abgeleitetem neurotrophen Faktor und Hitzeschockprotein 27 immunisierten Tieres a) eine Woche vor der Immunisierung b) zwei Wochen nach Immunisierung und c) vier Wochen nach Immunisierung.

#### 4.4 Ergebnisse der Flatmountausmessung

Für die Flatmountausmessung wurden von jedem Präparat vor der Trocknung und nach dem Färben Fotos gemacht. Bis auf je ein Flatmount aus der Tubulin-, der  $\beta$ -Aktin- der GFAP-Gruppe und der Kontrolle konnte für jedes Präparat individuell der Betrag der Schrumpfung ausgerechnet werden. Bei diesen vier Präparaten waren die Fotos vor der Trocknung wegen der Bildqualität nicht ausmessbar. Da der Betrag der Schrumpfung zwischen den beiden Augen eines Tieres meist nur geringe

## Ergebnisse

Abweichungen aufwies, wurde für diese vier Präparate der gleiche Betrag der Schrumpfung wie für das jeweilige andere Auge des entsprechenden Tieres angenommen.

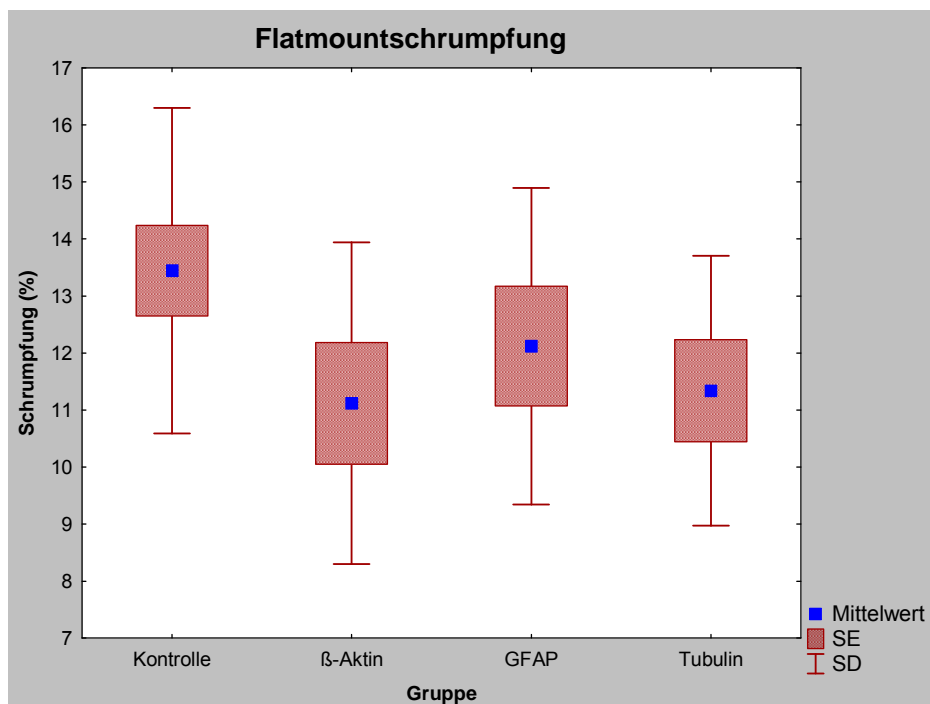
Die Prozentzahl, um welche der Flatmount geschrumpft ist, wurde für jeden Flatmount einzeln berechnet. Zum besseren Vergleich und der Übersicht wird in Tabelle 5 die mittlere Schrumpfung für jede Antigengruppe angegeben.

Gruppe	Mittlere Schrumpfung in Prozent	± SD	± SE	p-Werte
Kontrolle	13,4	2,9	0,8	-----
β-Aktin	11,1	2,8	1,1	0,1
GFAP	12,1	2,8	1,0	0,3
Tubulin	11,3	2,4	0,9	0,1
GDNF	11,5	1,7	0,4	<b>0,04</b>
S100	12,2	3,6	0,9	0,3
GDNF+HSP27	12,9	1,3	0,4	0,5
S100+HSP27	12,3	1,7	0,5	0,3

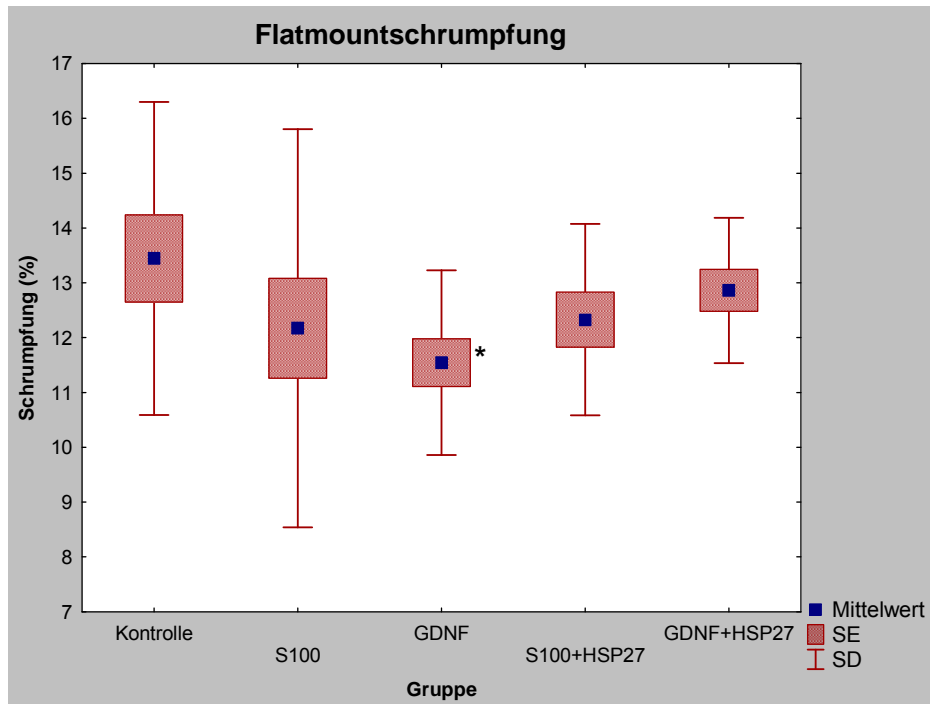
**Tabelle 5:** Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der gemessenen Schrumpfung für die Gruppen β-Aktin, saures Gliafaserprotein (GFAP), Tubulin, Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF), calciumbindendes Protein S100 und die Kombination der beiden letztgenannten mit dem Hitzeschockprotein 27 (HSP27) sowie der Kontrollgruppe in Prozent mit Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SE). Die rot markierten Zahlen zeigen an, dass bei dieser Gruppe im t-Test ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe bestand (Signifikanzwert  $p < 0,05$ ).

Allgemein war festzustellen, dass die Flatmounts, welche präparationsbedingte Risse aufwiesen, stärker geschrumpft sind als die übrigen. Die kleinste gemessene Schrumpfung betrug 7,3%, die größte 21,5%. Diese beiden Retinapräparate stammen aus der S100-Gruppe, was die große Standardabweichung dieser Gruppe erklärt. Bei einem Präparat aus der GDNF-Gruppe wurde zwar eine noch größere Schrumpfung als die bereits erwähnte gemessen, jedoch wies dieses Präparat nach der Färbung eine sehr ungewöhnliche Farbe und Konsistenz auf. Es konnte auch nicht für die Auszählung der Zellen unter dem Mikroskop verwendet werden. Wegen des ungewöhnlichen Aussehens und der außergewöhnlich hohen Schrumpfung von

34,8% wurde dieser Flatmount aus der statistischen Auswertung der Schrumpfung und der Zellkernauszählung herausgenommen. Bei dem Präparat aus der S100-Gruppe mit der größten Schrumpfung fiel im direkten Vergleich der Fotos vor der Trocknung und nach der Färbung auf, dass es sich um ein Präparat mit vielen präparationsbedingten Löchern handelte, die wie bereits erwähnt generell eine größere Schrumpfung als Präparate ohne Löcher aufwiesen. Aus Tabelle 5 wird deutlich, dass nur die GDNF-Gruppe mit einem p-Wert von 0,04 im t-Test gegenüber der Kontrolle einen signifikanten Unterschied zeigte. In der Übersicht der Gruppenmittelwerte zeigte sich die geringste Schrumpfung mit 11,1% bei der  $\beta$ -Aktin-Gruppe und die größte Schrumpfung fand sich bei der Kontrollgruppe mit 13,4%. Die mittlere Schrumpfung aller Flatmounts betrug unabhängig von ihrer Gruppe 12,2%. In Abbildung 17 und 18 sind die prozentualen Schrumpfungswerte graphisch dargestellt. Zur besseren Übersicht sind die Gruppen auf zwei Graphen aufgeteilt. In beiden Graphen ist die Kontrollgruppe zum Vergleich abgebildet.



**Abbildung 17:** Die Abbildung zeigt die mittlere Schrumpfung in Prozent (%), die Standardabweichung (SD) und den Standardfehler (SE) der Kontroll-,  $\beta$ -Aktin-, saures Gliafaserprotein- (GFAP) und Tubulin-Gruppe.



**Abbildung 18:** Die Abbildung zeigt die mittlere Schrumpfung in Prozent (%), die Standardabweichung (SD) und den Standardfehler (SE) der Kontrollgruppe sowie der Gruppen calciumbindendes Protein S100, Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF) und die Kombination der beiden letztgenannten mit dem Hitzeschockprotein 27 (HSP 27). \* Kennzeichnet die Gruppe, die im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikante Abweichung aufwies (Signifikanzwert  $p < 0,05$ ).

#### 4.5 Ergebnisse der Kresylviolett Färbung und Flatmountfotografie

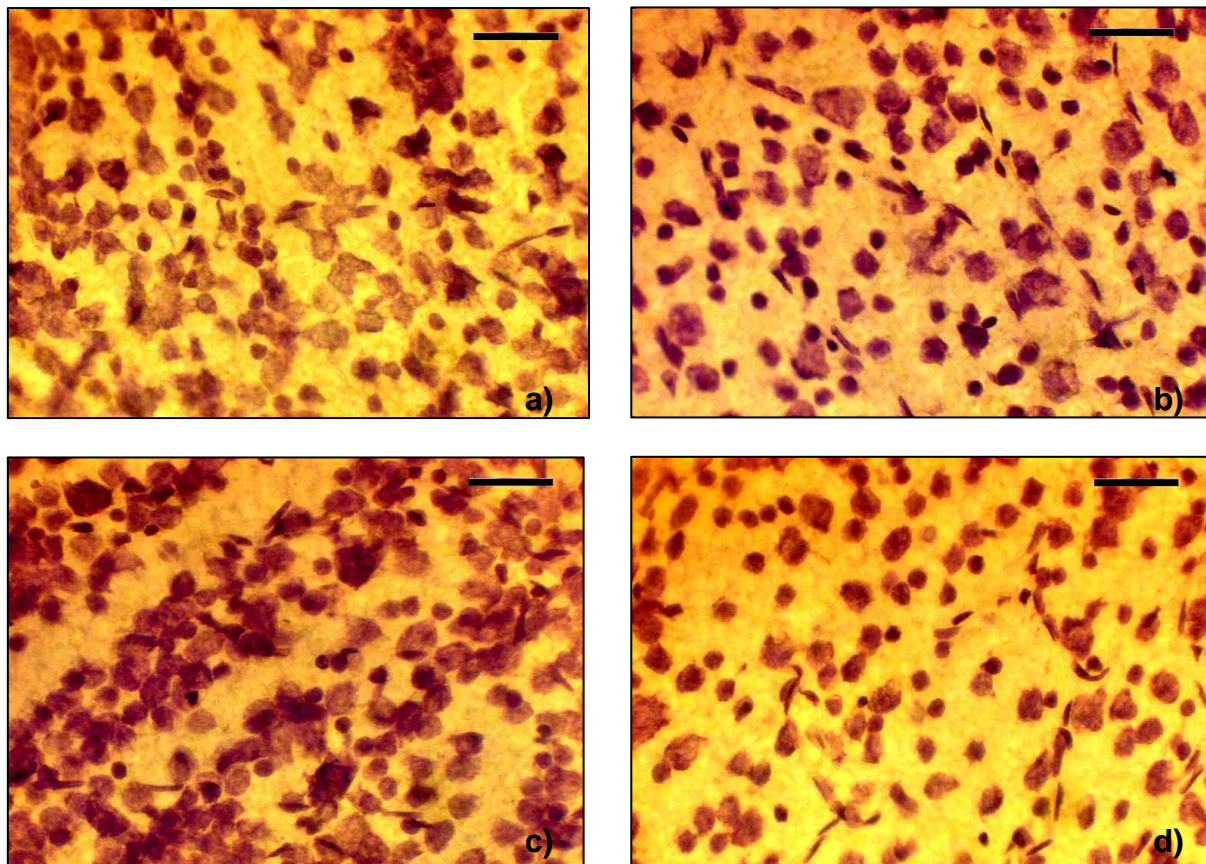
Alle Flatmountpräparate konnten nach der Präparation und Trocknung gefärbt werden. Es kam nicht bei allen Flatmounts zu einer gleichmäßigen Anfärbung der Zellen, sodass es nicht möglich war von jedem Flatmount alle acht Areale in der 40 fachen Vergrößerung zu fotografieren und auszuwerten. Insgesamt konnten von der  $\beta$ -Aktin-Gruppe 53 von 64 möglichen Fotos, bei der GFAP-Gruppe 61 von 64, bei der GDNF-Gruppe 108 von 128, bei der S100-Gruppe 121 von 128, bei GDNF+HSP 27-Gruppe 82 von 96, bei S100+HSP 27-Gruppe 88 von 96 und bei der Kontrollgruppe 91 von 112 möglichen Fotos gemacht werden. Nur bei der Tubulin-Gruppe war es möglich von jedem Flatmount alle vier zentralen und alle vier peripheren Areale zu fotografieren. So konnten von 752 möglichen Fotos insgesamt 668 ausgewertet werden.



#### 4.6 Ergebnisse der Zellauszählung

Auf allen ausgezählten Fotos konnten Endothelzellen, Gliazellen, parvozelluläre Neurone und magnozellularne Neurone differenziert werden.

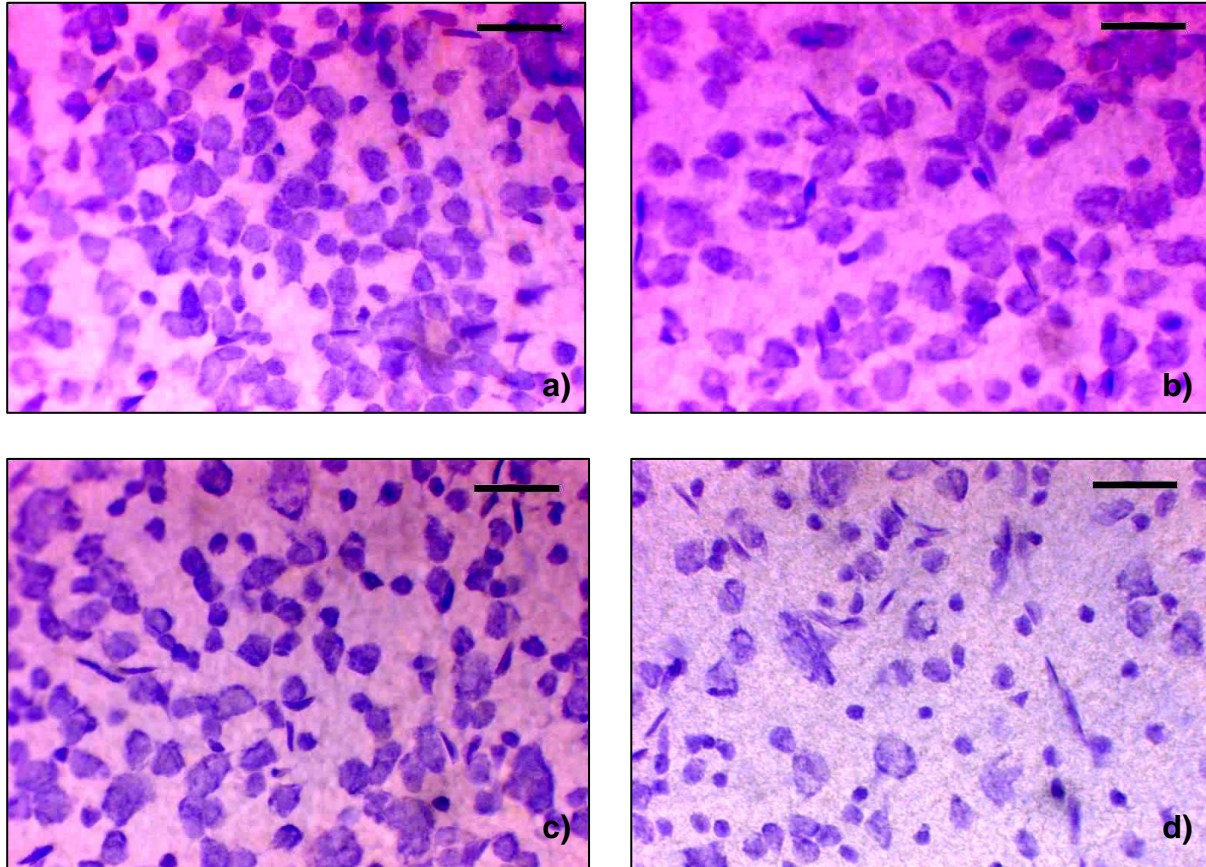
Bei der Auszählung der Zellen fiel auf, dass die Fotos der peripheren Areale stets geringere Zellzahlen als die zentralen Areale aufwiesen. Dies war teilweise schon beim bloßen Anblick der Fotos ersichtlich (siehe Abb. 19).



**Abbildung 19:** Die Abbildung zeigt beispielhaft zwei Fotos von zentralen Arealen (a und c) und zwei Fotos von peripheren Arealen (b und d) von Flatmountpräparaten aus verschiedenen Gruppen. a) ein zentrales Areal von einem Tier aus der Tubulin-Gruppe. b) ein peripheres Areal von dem gleichen Tier aus der Tubulin-Gruppe. c) ein zentrales Areal von einem Kontrolltier d) ein peripheres Areal des gleichen Tieres aus der Kontrollgruppe. Die lila gefärbten Zellkerne der retinalen Ganglienzellen und die länglichen, zigarrenartigen Zellkerne der Endothelzellen sind auf allen Bildern deutlich zu erkennen. Es fällt auf, dass auf den Bildern aus den zentralen Arealen deutlich mehr Zellkerne als auf den Bildern aus den peripheren Arealen zu sehen sind. Skalierung: 30  $\mu$ m.

Es kam bei der Durchsicht der Fotos auch die Vermutung auf, dass es Unterschiede hinsichtlich der Zellzahl in den gleichen Arealen zwischen Flatmounts verschiedener

Gruppen gibt (siehe Abb. 20). Dies konnte durch die statistische Auswertung der Zellzahlen bestätigt werden.



**Abbildung 20:** Die Abbildung zeigt beispielhaft zwei Fotos von zentralen Arealen (a und b) und zwei Fotos von peripheren Arealen (c und d) von Flatmountpräparaten aus verschiedenen Gruppen. a) zeigt ein zentrales Areal eines Tieres aus der calciumbindendes Protein S100-Gruppe. b) zeigt ein zentrales Areal eines Tieres aus der Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor plus Hitzeschockprotein 27-Gruppe. c) zeigt ein peripheres Areal eines Tieres aus der Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor -Gruppe und d) zeigt ein peripheres Areal eines Tieres aus der calciumbindendes Protein S100 plus Hitzeschockprotein 27-Gruppe. Die lila gefärbten Zellkerne der retinalen Ganglienzellen und die länglichen, zigarrenartigen Zellkerne der Endothelzellen sind auf allen Bildern deutlich zu erkennen. Es fällt auf, dass auf den Bildern a) und c) deutlich mehr Zellkerne als auf den Bildern b) und d) zu sehen sind, welche aus den jeweils gleichen Flatmountarealen von Flatmounts unterschiedlicher Gruppen stammen. Skalierung: 30 µm.

### 4.6.1 Auswertung der Anzahl der Neurone

Die GFAP-, die Tubulin-, die GDNF-, die S100-, die GDNF+HSP 27- und die S100+HSP 27-Gruppe zeigten im Hinblick auf die mittlere Anzahl der Neurone

## Ergebnisse

(parvozelluläre + magnozellanuläre Neurone) pro mm<sup>2</sup> eine signifikant kleinere Anzahl als die Kontrollgruppe. Bei der  $\beta$ -Aktin-Gruppe war zwar auch ein Neuronenverlust zu verzeichnen, dieser war aber nicht signifikant. In Tabelle 6 sind die mittleren Anzahlen der Neurone pro mm<sup>2</sup> sowie die Standardabweichungen und die Standardfehler für die einzelnen Gruppen dargestellt.

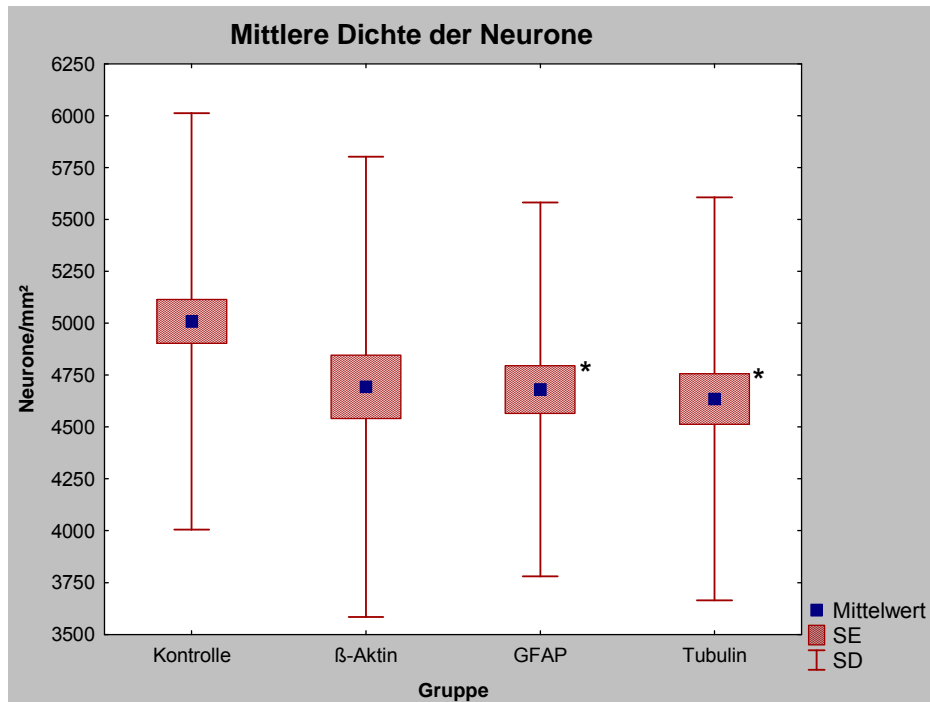
Gruppe	Anzahl der Neurone/mm <sup>2</sup>	$\pm$ SD	$\pm$ SE	p-Werte
Kontrolle	5008	1003	105	-----
$\beta$ -Aktin	4693	1109	152	0,08
GFAP	4681	900	115	<b>0,04</b>
Tubulin	4635	971	121	<b>0,02</b>
GDNF	4563	894	86	<b>0,001</b>
S100	4636	930	85	<b>0,005</b>
GDNF+HSP27	4488	897	99	<b>0,0004</b>
S100+HSP27	4496	922	98	<b>0,0005</b>

**Tabelle 6:** Es ist die mittlere Anzahl der Neurone pro Quadratmillimeter (mm<sup>2</sup>) für die Gruppen  $\beta$ -Aktin, saures Gliafaserprotein (GFAP), Tubulin, Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF), calciumbindendes Protein S100 und die Kombination der beiden letztgenannten mit dem Hitzeschockprotein 27 (HSP 27) sowie der Kontrollgruppe aufgeführt. Die Werte der Standardabweichung (SD) und des Standardfehlers (SE) sind mit aufgetragen. Dabei sind die Anzahl der parvozellulären Neurone und die Anzahl der magnozellanulären Neurone für jedes Areal addiert worden. Von dieser Gesamtzahl der Neurone pro Areal wurde, wie bereits beschrieben, die Anzahl der Neurone pro Quadratmillimeter für jede Gruppe getrennt errechnet. Beim Errechnen des Mittelwertes wurde nicht in periphere oder zentrale Areale unterschieden. Die rot markierten Felder zeigen an, dass bei dieser Gruppe im t-Test ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe bestand (Signifikanzwert  $p < 0,05$ ).

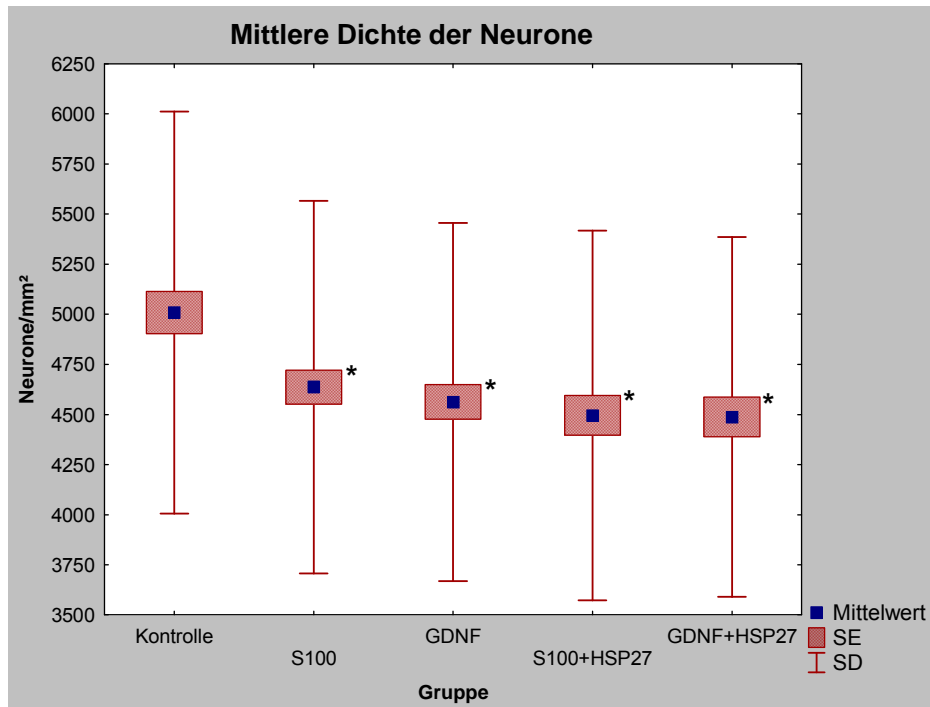
Wie aus Tabelle 6 ersichtlich, hatte die Kontrollgruppe mit einer mittleren Neuronendichte von 5008 Zellen pro mm<sup>2</sup> nach dem Studienzeitraum von vier Wochen die größte Anzahl an Neuronen. Bei allen anderen Gruppen, außer der  $\beta$ -Aktin-Gruppe mit 4693 Neurone pro mm<sup>2</sup> und  $p=0,08$ , kam es im Vergleich mit der Kontrollgruppe zu einem gruppenspezifischen, signifikanten Zelluntergang ( $p < 0,05$ ). Den größten Verlust an Neuronen wies mit 4488 Neurone pro mm<sup>2</sup> die GDNF+HSP 27-Gruppe auf ( $p=0,0004$ ), den geringsten aber noch signifikanten Verlust zeigte sich

## Ergebnisse

mit 4681 Neuronen pro  $\text{mm}^2$  bei der GFAP-Gruppe ( $p=0,04$ ). Die größte Standardabweichung von 1109 Neurone pro  $\text{mm}^2$  und den größten Standardfehler mit 152 wies die  $\beta$ -Aktin-Gruppe auf. Die mittlere Dichte der Neurone ist in den Abbildungen 21 und 22 mit Standardabweichung und Standardfehler dargestellt. Zur besseren Übersicht sind die Gruppen auf zwei Abbildungen aufgeteilt, in denen jeweils zum Vergleich die Kontrollgruppe aufgeführt ist.



**Abbildung 21:** Die Abbildung zeigt die mittlere Anzahl der Neurone pro Quadratmillimeter ( $\text{mm}^2$ ) der Kontrollgruppe sowie der Gruppen  $\beta$ -Aktin, saures Gliafaserprotein (GFAP) und Tubulin mit den jeweiligen Standardabweichungen (SD) und Standardfehlern (SE). \* Kennzeichnet die Gruppen, die im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikante Abweichung aufwiesen (Signifikanzwert  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 22:** Die Abbildung zeigt die mittlere Anzahl der Neurone pro Quadratmillimeter (mm<sup>2</sup>) der Kontrollgruppe sowie der Gruppen calciumbindendes Protein S100, Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF) und die Kombination der beiden letztgenannten mit dem Hitzeschockprotein 27 (HSP 27) mit den jeweiligen Standardabweichungen (SD) und Standardfehlern (SE). \* Kennzeichnet die Gruppen, die im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikante Abweichung aufwiesen (Signifikanzwert  $p < 0,05$ ).

In den Abbildungen 21 und 22 wird der Unterschied der mit Antigen immunisierten Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe sehr deutlich. Auch der teilweise geringe Unterschied zwischen den einzelnen Antigen-Gruppen ist ersichtlich.

#### 4.6.2 Auswertung der Anzahl der parvozellulären Neurone

Die Neurone wurden getrennt nach ihrer Größe in magno- und parvozelluläre Neurone ausgezählt. Die parvozellulären Neurone besitzen einen kleineren Zellkörper und sind zahlreicher als die magnozellanen Neurone. Hinsichtlich der parvozellulären Neurone zeigten alle Gruppen eine signifikant niedrigere Anzahl als die Kontrollgruppe (siehe Tabelle 7). Am größten war der Verlust von Zellen dieses Zelltyps gegenüber der Kontrollgruppe mit 4053 Zellen pro mm<sup>2</sup> bei der S100+HSP 27-Gruppe mit 3374 Zellen pro mm<sup>2</sup>, gefolgt von der GDNF+HSP 27-Gruppe mit 3425 Zellen pro mm<sup>2</sup>. Diese beiden Gruppen wiesen auch mit 783 Zellen pro mm<sup>2</sup> (GDNF+HSP 27) und 839 Zellen pro mm<sup>2</sup> (S100+HSP 27) die geringste

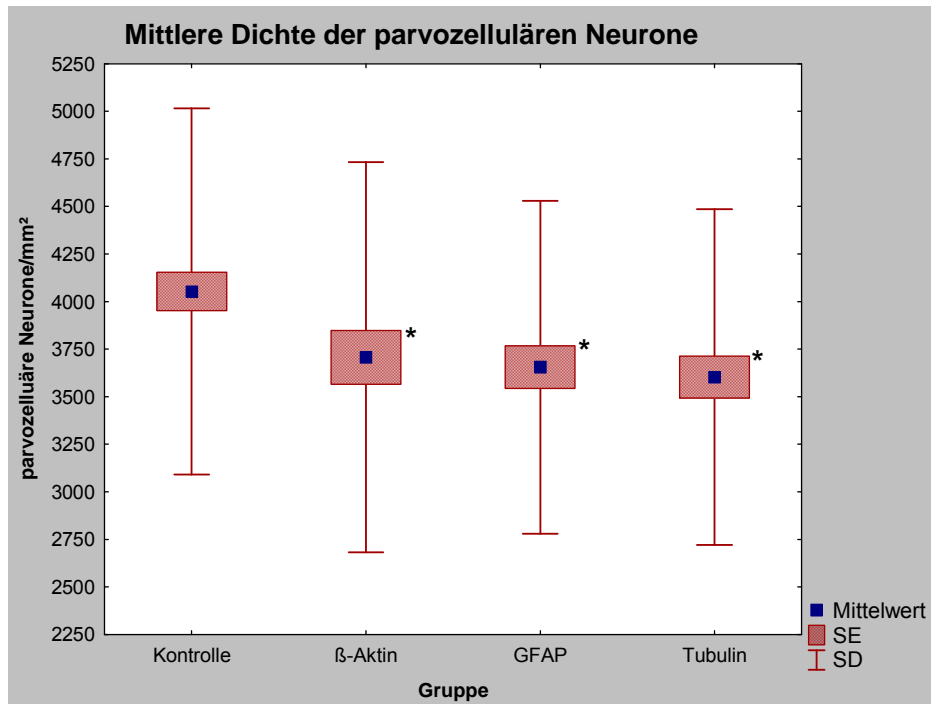
## Ergebnisse

Standardabweichung auf. Die  $\beta$ -Aktin-Gruppe zeigte mit 3707 Zellen pro  $\text{mm}^2$  den geringsten Untergang an parvozellulären Neuronen, jedoch war auch dieser Wert noch mit  $p=0,04$  auf dem Signifikanzniveau von 5 % gegenüber der Kontrollgruppe signifikant. Wie bereits bei der Auswertung der Gesamtzahl der Neurone fanden sich auch hier die größte Standardabweichung mit 1025 Zellen pro  $\text{mm}^2$  und der größte Standardfehler mit 141 bei der  $\beta$ -Aktin-Gruppe.

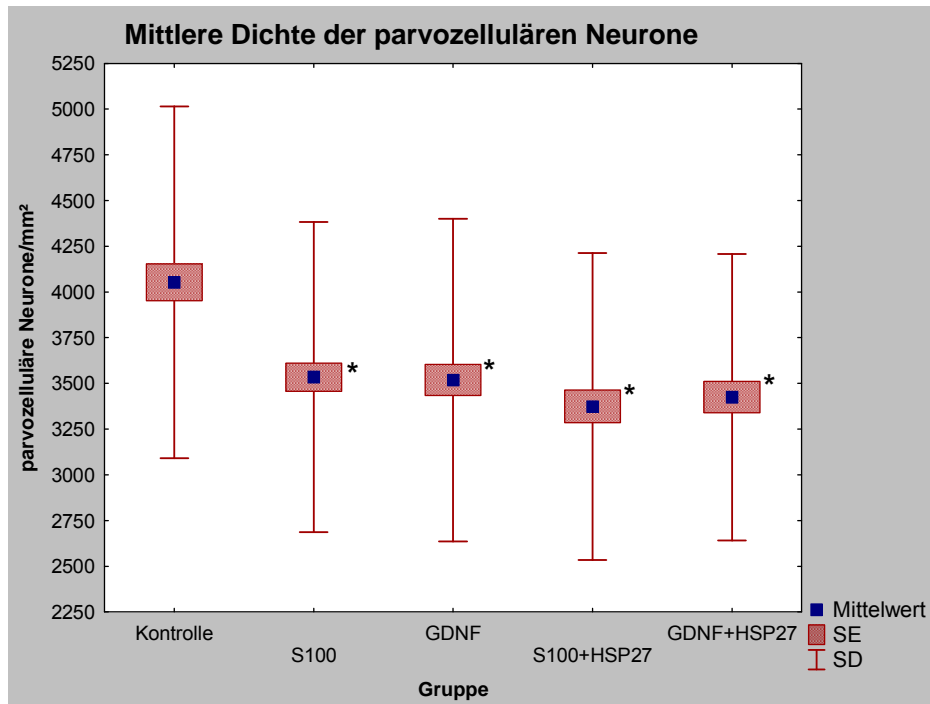
Gruppe	Anzahl der parvozellulären Neurone/ $\text{mm}^2$	$\pm$ SD	$\pm$ SE	p-Werte
Kontrolle	4053	962	101	-----
$\beta$ -Aktin	3707	1025	141	<b>0,04</b>
GFAP	3655	875	112	<b>0,01</b>
Tubulin	3604	882	110	<b>0,003</b>
GDNF	3519	882	85	<b>0,00006</b>
S100	3535	848	77	<b>0,00004</b>
GDNF+HSP27	3425	783	87	<b>0,000006</b>
S100+HSP27	3374	839	89	<b>0,000001</b>

**Tabelle 7:** Die Tabelle zeigt die mittlere Anzahl der parvozellulären Neurone pro Quadratmillimeter ( $\text{mm}^2$ ) der Gruppen  $\beta$ -Aktin, saures Gliafaserprotein (GFAP), Tubulin, Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF), calciumbindendes Protein S100 und die Kombination der beiden letztgenannten mit dem Hitzeschockprotein 27 (HSP 27) sowie der Kontrollgruppe mit Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SE). Beim Errechnen des Mittelwertes wurde nicht in periphere oder zentrale Areale unterschieden. Die rot markierten Zahlen zeigen an, dass bei dieser Gruppe im t-Test ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe bestand (Signifikanzwert  $p < 0,05$ ).

Um einen besseren Überblick zu schaffen sind die Ergebnisse aus Tabelle 7 hier noch einmal in den Abbildungen 23 und 24 graphisch dargestellt. Die Kontrollgruppe ist zum Vergleich in beiden Abbildungen zu sehen.



**Abbildung 23:** Die Abbildung zeigt die mittlere Anzahl der parvozellulären Neurone pro Quadratmillimeter ( $\text{mm}^2$ ) der Gruppen  $\beta$ -Aktin, saures Gliafaserprotein (GFAP), Tubulin und der Kontrolle mit den jeweiligen Standardabweichungen (SD) und Standardfehlern (SE). \* Kennzeichnet die Gruppen, die im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikante Abweichung aufwiesen (Signifikanzwert  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 24:** Die Abbildung zeigt die mittlere Anzahl der parvozellulären Neurone pro Quadratmillimeter (mm<sup>2</sup>) der Kontrollgruppe sowie der Gruppen calciumbindendes Protein S100, Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF) und die Kombination der beiden letztgenannten mit dem Hitzeschockprotein 27 (HSP27) mit den jeweiligen Standardabweichungen (SD) und Standardfehlern (SE). \* Kennzeichnet die Gruppen, die im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikante Abweichung aufwiesen (Signifikanzwert  $p < 0,05$ ).

Die Abbildungen 23 und 24 verdeutlichen ebenfalls die Unterschiede der mit Antigen immunisierten Gruppen zu der Kontrollgruppe. Dabei ist die Verteilung der Mittelwerte der parvozellulären Neurone denen der Gesamtzahl der Neurone sehr ähnlich. Dies liegt daran, dass die parvozellulären Neurone den größten Anteil der errechneten mittleren Gesamtzahl der Neurone ausmachen. Dies wird auch beim Vergleich der Tabellen 6 und 7 deutlich, in denen die Mittelwerte der Gesamtzahl der Neurone und der parvozellulären Neurone in Zahlen angegeben sind. So machten beispielsweise die parvozellulären Neurone 4053 Zellen/mm<sup>2</sup> von der Gesamtzahl der Neurone von 5008 Zellen/mm<sup>2</sup> der Kontrollgruppe aus. Bei der GDNF-Gruppe waren 3519 Zellen/mm<sup>2</sup> der 4563 Neurone/mm<sup>2</sup> parvozelluläre Neurone.

#### 4.6.3 Auswertung der Anzahl der magnozellularen Neurone

Bei der Auswertung der Anzahl der magnozellularen Neurone fiel auf, dass hier die Kontrollgruppe mit 959 Zellen pro mm<sup>2</sup> diejenige mit der geringsten Zellzahl war. Die



## Ergebnisse

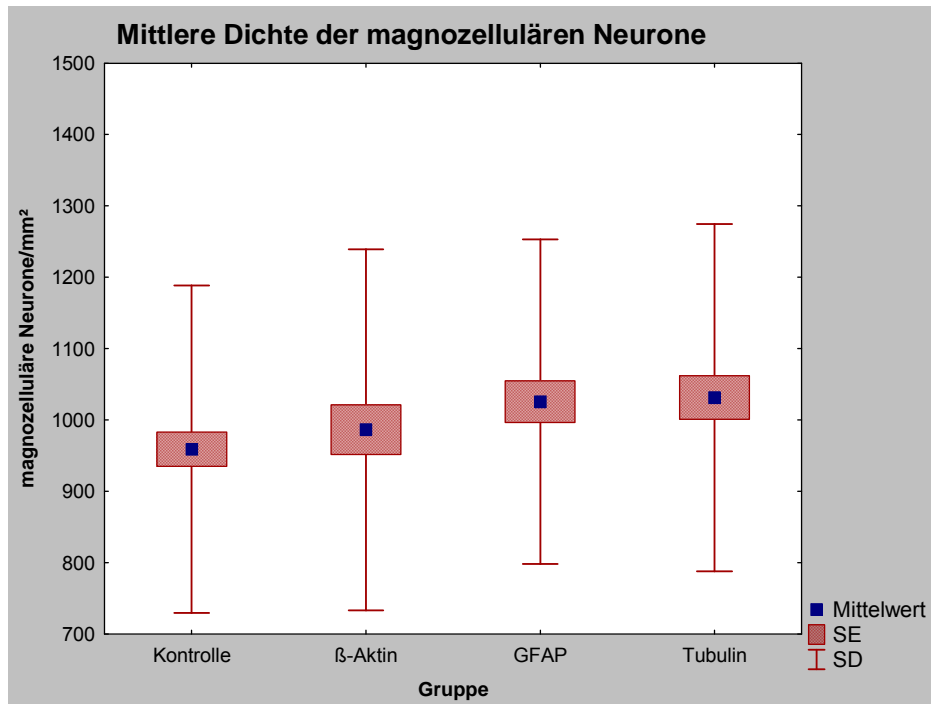
$\beta$ -Aktin-Gruppe liegt mit 986 magnozellulären Neurone pro  $\text{mm}^2$  nur wenig darüber. Die meisten Zellen dieses Neuronentyps fanden sich mit 1121 Zellen pro  $\text{mm}^2$  bei der S100+HSP 27-Gruppe, gefolgt von der S100- Gruppe mit 1102 magnozellulären Neuronen pro  $\text{mm}^2$ . Wie in Tabelle 8 ersichtlich, unterschieden sich bei diesem Neuronentyp weniger Gruppen als bei den vorherigen Kategorien signifikant von der Kontrollgruppe.

Gruppe	Anzahl der magnozellulären Neurone/ $\text{mm}^2$	$\pm$ SD	$\pm$ SE	p-Werte
Kontrolle	959	229	24	-----
$\beta$ -Aktin	986	253	35	0,5
GFAP	1026	227	29	0,08
Tubulin	1031	243	30	0,06
GDNF	1044	253	24	<b>0,01</b>
S100	1102	282	26	<b>0,0001</b>
GDNF+HSP27	1063	305	34	<b>0,01</b>
S100+HSP27	1121	267	28	<b>0,00002</b>

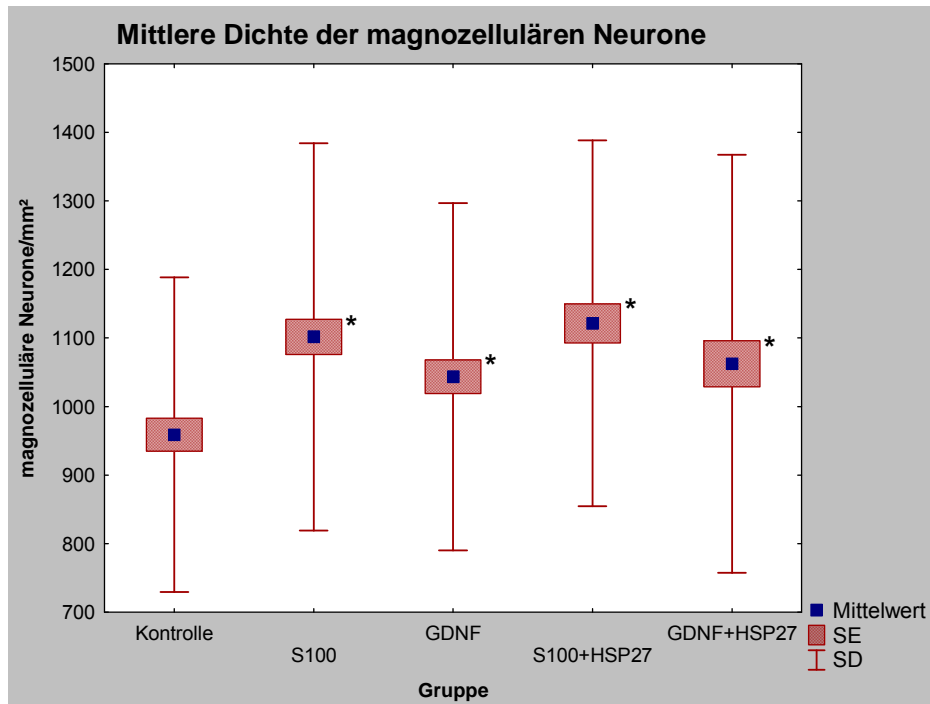
**Tabelle 8:** Die Tabelle zeigt die mittlere Anzahl der magnozellulären Neurone pro Quadratmillimeter ( $\text{mm}^2$ ) für die Gruppen  $\beta$ -Aktin, saures Gliafaserprotein (GFAP), Tubulin, Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF), calciumbindendes Protein S100 und die Kombination der beiden letztgenannten mit dem Hitzeschockprotein 27 (HSP27) sowie der Kontrollgruppe mit Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SE). Beim Errechnen des Mittelwertes wurde nicht in periphere oder zentrale Areale unterschieden. Die rot markierten Zahlen zeigen an, dass bei dieser Gruppe im t-Test ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe bestand (Signifikanzwert  $p < 0,05$ ).

Im t-Test zeigten die GDNF-Gruppe und die GDNF+HSP 27-Gruppe mit jeweils  $p=0,01$ , die S100-Gruppe mit  $p=0,0001$  und die S100+HSP 27-Gruppe mit  $p=0,00002$  einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die geringste Standardabweichung zeigte mit 227 Zellen pro  $\text{mm}^2$  die GFAP- Gruppe, die größte zeigte die GDNF+HSP 27-Gruppe mit 305 Zellen pro  $\text{mm}^2$ . Der kleinste Standardfehler fand sich mit 24 bei der Kontrollgruppe, der höchste bei der  $\beta$ -Aktin-Gruppe mit 35. In den Abbildungen 25 und 26 ist die unterschiedliche mittlere Anzahl

der magnozellularen Neurone pro  $\text{mm}^2$  für die einzelnen Gruppen dargestellt. Die Kontrollgruppe ist zum besseren Vergleich in beiden Abbildungen zu sehen.



**Abbildung 25:** Die Abbildung zeigt die mittlere Anzahl der magnozellularen Neurone pro Quadratmillimeter ( $\text{mm}^2$ ) der Gruppen  $\beta$ -Aktin, saures Gliafaserprotein (GFAP), Tubulin und der Kontrolle mit den jeweiligen Standardabweichungen (SD) und Standardfehlern (SE).



**Abbildung 26:** Die Abbildung zeigt die mittlere Anzahl der magnozellulären Neurone pro Quadratmillimeter (mm<sup>2</sup>) der Gruppen Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF), calciumbindendes Protein S100 und die Kombination der beiden letztgenannten mit dem Hitzeschockprotein 27 (HSP27) sowie der Kontrollgruppe mit den jeweiligen Standardabweichungen (SD) und Standardfehlern (SE). \* Kennzeichnet die Gruppen, die im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikante Abweichung aufwiesen (Signifikanzwert  $p < 0,05$ ).

Aus den Abbildungen 25 und 26 wird deutlich, dass hier die Kontrollgruppe die geringste Anzahl an magnozellulären Neurone im Vergleich mit den mit Antigen immunisierten Gruppen hatte. Dies steht im Gegensatz zu den im vorangegangenen Abschnitt ermittelten Anzahlen der parvozellulären Neurone. In den Abbildungen 23 und 24 ist ersichtlich, dass die Kontrollgruppe die höchste Anzahl an parvozellulären Neurone hatte.

In Abbildung 26 ist auffällig, dass sich ein fast identischer Zellzahl-Unterschied zwischen den Gruppen S100 und GDNF sowie den Gruppen S100+HSP 27 und GDNF+HSP 27 abzeichnete. Bei Betrachtung der Zahlen aus Tabelle 8 wird deutlich, dass sowohl zwischen der S100- und der GDNF-Gruppe als auch zwischen den beiden mit HSP 27 kombinierten Gruppen eine Differenz von 58 Zellen lag. Vergleicht man die Zellzahlen der GDNF- sowie der GDNF+HSP 27-Gruppe sowie der S100- und S100+HSP 27-Gruppe fällt auf, dass jeweils zwischen beiden Gruppen eine Differenz von 19 Zellen bestand.

#### 4.6.4 Auswertung der Anzahl der Gliazellen

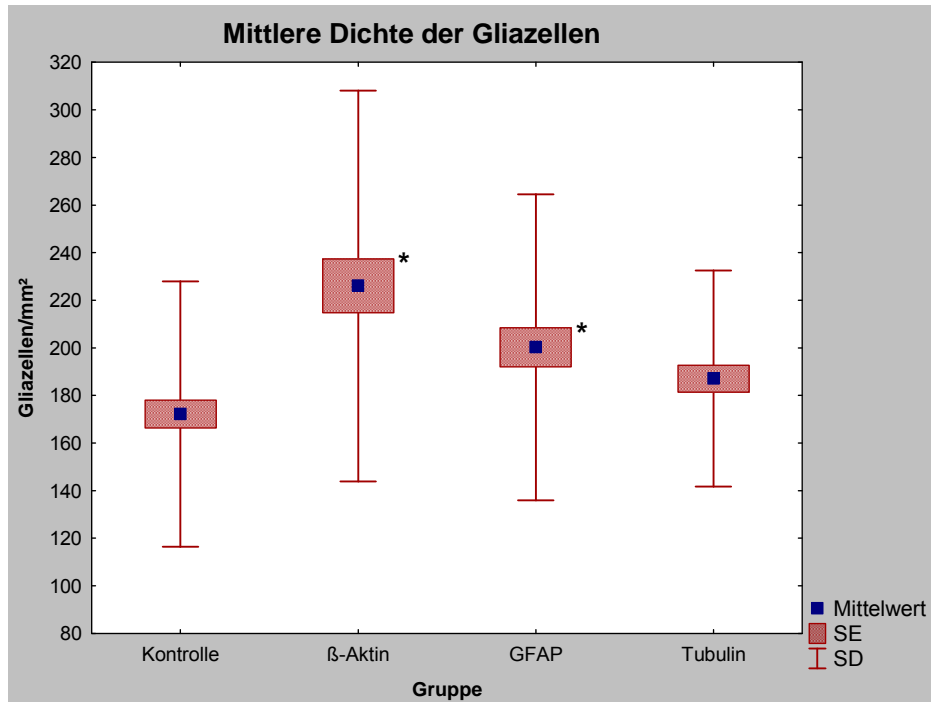
Bei der Auswertung der Gliazellen wiesen die Kontrollgruppe und die GDNF+HSP 27-Gruppe mit durchschnittlich 172 Gliazellen pro mm<sup>2</sup> die geringste Anzahl auf. Die meisten Gliazellen fanden sich mit durchschnittlich 226 Gliazellen pro mm<sup>2</sup> bei der  $\beta$ -Aktin-Gruppe, gefolgt von der GFAP-Gruppe mit 200 Gliazellen pro mm<sup>2</sup>. Dabei wies die  $\beta$ -Aktin Gruppe auch die größte Standardabweichung mit 82 Zellen pro mm<sup>2</sup> und den größten Standardfehler mit 11 auf. Die geringste Standardabweichung mit 45 Zellen pro mm<sup>2</sup> und den geringsten Standardfehler mit 6 zeigte die Tubulin-Gruppe. Die Kontrollgruppe und die S100-Gruppe wiesen ebenfalls einen Standardfehler von 6 auf, hatten aber größere Werte beim Standardfehler als die Tubulin-Gruppe. Wie in Tabelle 9 dargestellt, zeigte sich im t-Test bei der S100-Gruppe mit  $p=0,03$ , der GFAP-Gruppe mit  $p=0,005$  und der  $\beta$ -Aktin-Gruppe mit  $p=0,000007$  ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.

Gruppe	Anzahl der Gliazellen/mm <sup>2</sup>	$\pm$ SD	$\pm$ SE	p-Werte
Kontrolle	172	56	6	-----
$\beta$ -Aktin	226	82	11	<b>0,000007</b>
GFAP	200	64	8	<b>0,005</b>
Tubulin	187	45	6	0,08
GDNF	187	73	7	0,1
S100	190	63	6	<b>0,03</b>
GDNF+HSP27	172	79	9	1,0
S100+HSP27	177	67	7	0,6

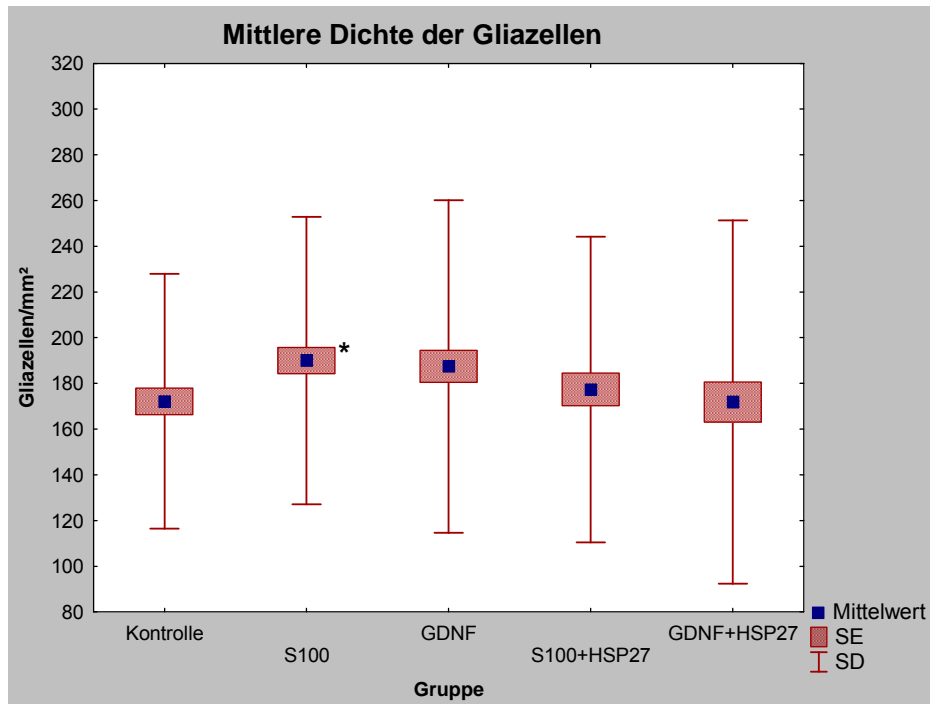
**Tabelle 9:** Die Tabelle zeigt die mittlere Anzahl der Gliazellen pro Quadratmillimeter (mm<sup>2</sup>) für die Gruppen  $\beta$ -Aktin, saures Gliafaserprotein (GFAP), Tubulin, Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF), calciumbindendes Protein S100 und die Kombination der beiden letztgenannten mit dem Hitzeschockprotein 27 (HSP27) sowie der Kontrollgruppe mit Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SE). Beim Errechnen des Mittelwertes wurde nicht in periphere oder zentrale Areale unterschieden. Die rot markierten Felder zeigen an, dass bei dieser Gruppe im t-Test ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe bestand (Signifikanzwert  $p<0,05$ ).

## Ergebnisse

Die Mittelwerte der Anzahl der Gliazellen für jede Gruppe sind in den Abbildungen 27 und 28 zur besseren Übersicht dargestellt. Um die mit Antigen immunisierten Gruppen besser mit der Kontrolle vergleichen zu können, ist diese in beiden Abbildungen dargestellt.



**Abbildung 27:** Die Abbildung zeigt die mittlere Anzahl der Gliazellen pro Quadratmillimeter ( $\text{mm}^2$ ) der Gruppen  $\beta$ -Aktin, saures Gliafaserprotein (GFAP), Tubulin und der Kontrolle mit den jeweiligen Standardabweichungen (SD) und Standardfehlern (SE). \* Kennzeichnet die Gruppen, die im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikante Abweichung aufwiesen (Signifikanzwert  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 28:** Die Abbildung zeigt die mittlere Anzahl der Gliazellen pro Quadratmillimeter (mm<sup>2</sup>) der Gruppen Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF), calciumbindendes Protein S100 und die Kombination der beiden letztgenannten mit dem Hitzeschockprotein 27 (HSP27) sowie der Kontrollgruppe mit den jeweiligen Standardabweichungen (SD) und Standardfehlern (SE).

\* Kennzeichnet die Gruppen, die im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikante Abweichung aufwiesen (Signifikanzwert  $p < 0,05$ ).

In Abbildung 27 sind hinsichtlich der durchschnittlichen Anzahl der Gliazellen deutliche Unterschiede der Antigen-Gruppen gegenüber der Kontrolle zu sehen. Auch die größere Standardabweichung der  $\beta$ -Aktin-Gruppe gegenüber den übrigen Gruppen ist zu erkennen. Bei den in Abbildung 28 dargestellten Gruppen wies die mittlere Anzahl der Gliazellen keine großen Unterschiede auf. Lediglich die unterschiedlich großen Standardabweichungen fielen hier ins Auge.

#### 4.6.5 Auswertung der Anzahl der Endothelzellen

Bei der Auswertung der Anzahl der Endothelzellen hatte die  $\beta$ -Aktin-Gruppe mit durchschnittlich 492 Endothelzellen pro mm<sup>2</sup> die meisten Gefäßwandzellen. Die Kontrollgruppe lag mit durchschnittlich 456 Endothelzellen pro mm<sup>2</sup> im Mittelfeld aller Gruppen, hatte aber mit 168 Zellen pro mm<sup>2</sup> die größte Standardabweichung. Die geringste Anzahl an Endothelzellen hatte mit 408 Zellen pro mm<sup>2</sup> die GFAP-Gruppe. Die Standardabweichungen lagen für alle Gruppen zwischen 129 (S100+HSP 27)

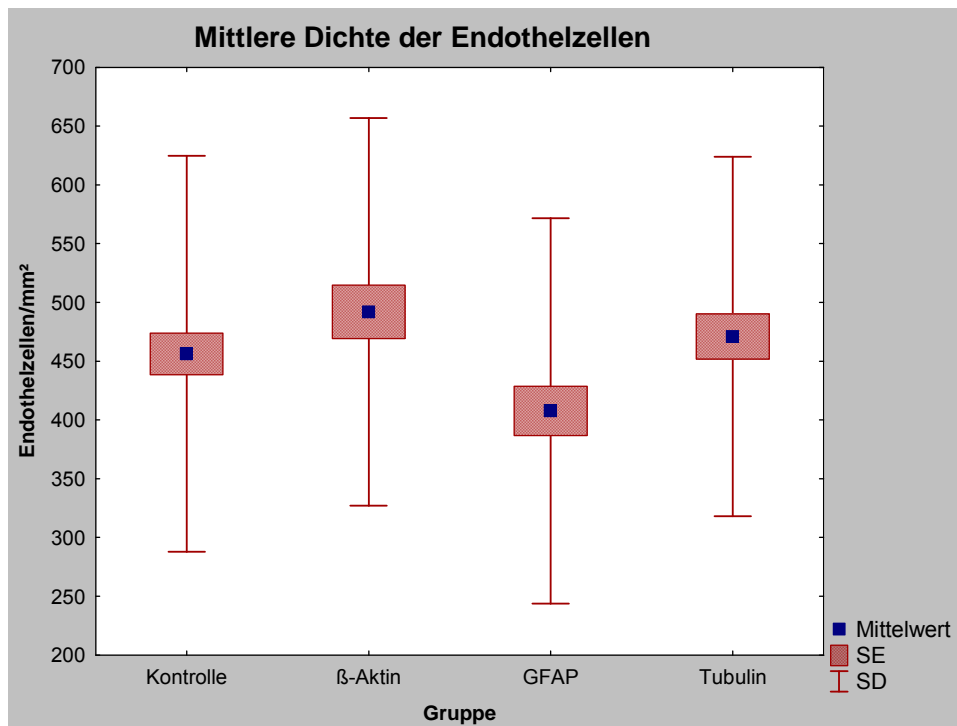
## Ergebnisse

und 168 (Kontrollgruppe) Endothelzellen pro mm<sup>2</sup> und der Standardfehler zwischen 14 (S100+HSP 27) und 23 (β-Aktin). Wie an den p-Werten aus Tabelle 10 ersichtlich, zeigte keine der Gruppen einen Wert kleiner als 0,05 und damit keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. In Abbildung 29 und 30 ist die mittlere Anzahl der Endothelzellen pro mm<sup>2</sup> für die einzelnen Gruppen graphisch dargestellt. Die Kontrollgruppe ist zum besseren Vergleich in beiden Abbildungen zu sehen. Während in Abbildung 29 noch recht deutliche Unterschiede der Gruppen hinsichtlich der mittleren Anzahl der Endothelzellen zu sehen sind, erscheinen die Gruppen in Abbildung 30 weitestgehend homogen.

Gruppe	Anzahl der Endothelzellen/mm <sup>2</sup>	± SD	± SE	p-Werte
Kontrolle	456	168	18	-----
β-Aktin	492	165	23	0,2
GFAP	408	164	21	0,08
Tubulin	471	153	19	0,6
GDNF	437	152	15	0,4
S100	479	160	15	0,3
GDNF+HSP27	427	135	15	0,2
S100+HSP27	427	129	14	0,2

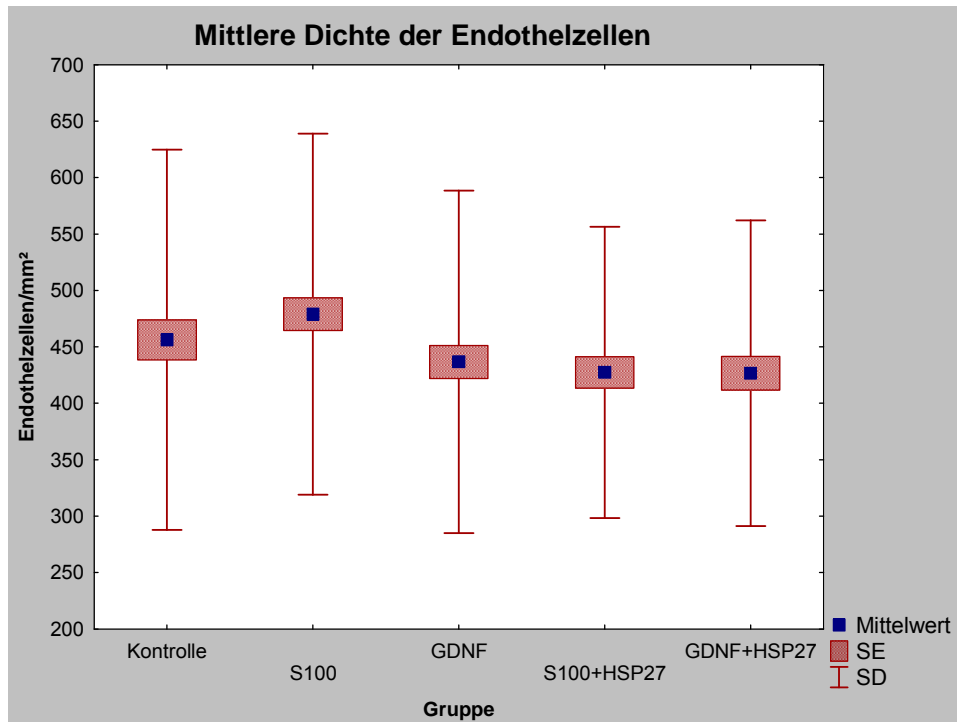
**Tabelle 10:** Die Tabelle zeigt die mittlere Anzahl der Endothelzellen pro Quadratmillimeter (mm<sup>2</sup>) für die Gruppen β-Aktin, saures Gliafaserprotein (GFAP), Tubulin, Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF), calciumbindendes Protein S100 und die Kombination der beiden letztgenannten mit dem Hitzeschockprotein 27 (HSP27) sowie der Kontrollgruppe mit Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SE). Beim Errechnen des Mittelwertes wurde nicht in periphere oder zentrale Areale unterschieden. (Signifikanzwert p< 0,05)

## Ergebnisse



**Abbildung 29:** Die Abbildung zeigt die mittlere Anzahl der Endothelzellen pro Quadratmillimeter ( $\text{mm}^2$ ) der Gruppen  $\beta$ -Aktin, saures Gliafaserprotein (GFAP), Tubulin und der Kontrolle mit den jeweiligen Standardabweichungen (SD) und Standardfehlern (SE).





**Abbildung 30:** Die Abbildung zeigt die mittlere Anzahl der Endothelzellen pro Quadratmillimeter (mm<sup>2</sup>) der Gruppen Gliazell-abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF), calciumbindendes Protein S100 und die Kombination der beiden letztgenannten mit dem Hitzeschockprotein 27 (HSP27) sowie der Kontrollgruppe mit den jeweiligen Standardabweichungen (SD) und Standardfehlern (SE).

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Intraokularer Druck

Die Messung des intraokularen Druckes ist eines der wichtigsten diagnostischen Mittel zur Feststellung eines Glaukomrisikos. Zudem kann durch permanente Kontrolle des Augeninnendruckes der Therapieerfolg bei den Glaukomformen mit erhöhtem IOP ermittelt und pathologische Veränderungen eventuell verhindert werden (Barnett 1970). Aus diesen Gründen erfolgt auch in der vorliegenden Studie die Messung des intraokularen Druckes. Zwar liegt jeder einzelne gemessene Wert in dem von Goldblum und Mitarbeiter (2002) ermittelten Normalbereich von 9-20 mmHg für das Rattenauge, jedoch können teilweise signifikante Unterschiede zwischen den mit Antigen immunisierten Gruppen und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu anderen Studien mit dem experimentellen autoimmunen Glaukom Modell (Joachim et al. 2009; Joachim et al. 2010). Beispielsweise kann bei mit HSP 27 immunisierten Ratten zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied des Augeninnendruckes zur Kontrollgruppe festgestellt werden, obwohl es auch hier zu einem signifikanten Untergang retinaler Ganglienzellen, verglichen mit der Kontrollgruppe, kommt (Joachim et al. 2009).

Da es bei der Studie im Rahmen dieser Dissertation sowohl zu signifikanten Erhöhungen des IOP bei der GFAP- und Tubulin-Gruppe, als auch zu einem signifikant verringerten Augeninnendruck bei der S100- und der GDNF+HSP 27-Gruppe kommt, stellt sich die Frage, inwieweit diese Druckveränderungen im Zusammenhang mit dem Verlust an Neuronen in der Retina stehen. Denn bei der GFAP-, der Tubulin- und der S100-Gruppe können mit die geringsten und bei der GDNF+HSP 27 Gruppe die größten Neuronenverluste gemessen werden. Zudem ist der IOP-Wert der GFAP-Gruppe bereits zum Baselinezeitpunkt gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Da die Tiere zu diesem Zeitpunkt noch nicht immunisiert waren, kann diese Abweichung nicht durch GFAP ausgelöst worden sein. Aufgrund der geringen Anzahl von Tieren pro Immunisierungsgruppe, lassen sich aus den signifikant abweichenden IOP Messwerten nur Tendenzen ableiten, die durch weitere Studien abgesichert werden müssen.

Um bei Katzen und Hunden einen aussagekräftigen IOP-Wert zu erhalten, sollten mindestens drei Messungen pro Auge vorgenommen und davon das arithmetische

Mittel gebildet werden (Krahenmann 1978). Wenn der IOP an verschiedenen Tagen gemessen wird, darf die Abweichung für ein gesundes Auge nicht mehr als 7 mmHg zur vorangegangenen Messung betragen und der Unterschied des Augeninnendruckes zwischen beiden Augen eines Tieres sollte an einem Tag nicht höher als 8 mmHg sein (Lovekin 1964). Bei Ermittlung des intraokularen Druckes mit dem Tonopen werden am Rattenauge sogar 10-15 Messungen empfohlen. Dies soll dazu dienen, durch den Anwender bedingte Fehler zu minimieren (Moore et al. 1993), da der Tonopen ursprünglich für den Menschen entwickelt wurde (Midelfart und Wigers 1994) und der Messkopf für das Rattenauge recht groß ist (Goldblum et al. 2002). Um eine exakte Messung des IOP am kleinen Rattenauge zu ermöglichen, sollte der Arbeitsplatz gut beleuchtet sein, damit das Messköpfchen exakt im rechten Winkel auf die Cornea aufgesetzt werden kann (Moore et al. 1993). Dabei hängt die Beständigkeit der Messungen auch von der Erfahrung der jeweilig durchführenden Person ab (Goldblum et al. 2002). In einer Studie zum Vergleich zweier Tonometer müssen erfahrene Anwender zwischen 50 und 70 mal die Hornhaut mit dem Tonopen berühren um zehn brauchbare Messwerte zu erhalten (Pease et al. 2006). Zum Ausschluss aller genannten Fehlerquellen werden zu jedem Messzeitpunkt zehn Messungen pro Auge von ein und derselben geübten Person an einem hellen Arbeitsplatz durchgeführt. Da auch im Tagesverlauf Schwankungen des intraokularen Druckes nachgewiesen werden können (Moore et al. 1996), erfolgen die Messungen immer im gleichen Tagesabschnitt. Jedoch gibt es auch Faktoren, die bei Studien an lebenden Tieren nicht einfach zu beeinflussen sind. So können Stress durch zahlreiche Messungen (Motolko et al. 1982), Veränderungen im Blutdruck, im Puls, in der Atmung und die steigende Angst der Tiere in kurzer Zeit zu signifikanten Fluktuationen des intraokularen Druckes führen (Moses und Liu 1968; Lichter und Bergstrom 1976; Moses und Arnzen 1983; Boothe et al. 1988). Zwar wird durch das Training versucht, die Tiere an die Prozedur der IOP Messung zu gewöhnen, dennoch ist es bei der Arbeit mit lebenden Individuen nicht immer möglich alle Einflussfaktoren zu standardisieren.

Auch der Einfluss des Pertussis Toxins auf die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke kann nicht außer Acht gelassen werden. Das Toxin wird bereits häufig für biochemische und pharmakologische Studien eingesetzt. Dennoch ist seine Rolle bei der Entstehung systemischer Erkrankungen noch nicht vollkommen geklärt. Ein wichtiger Faktor bei Pertussis bedingten Krankheiten ist die Unversehrtheit der

cerebelaren Barrieren. Durch die intakten tight junctions wird die Passage von kleinen gelösten Stoffen aus dem Blut in das zentral nervöse System verhindert (Wegener und Galla 1996; Franke et al. 1999). Eine erhöhte Permeabilität der cerebralen Gefäße bei Mäusen innerhalb von 24 Stunden nach intravenöser Verabreichung von inaktivierten Pertussis Organismen ist nachweisbar (Amiel 1976). Um die Entstehung von autoimmunen Erkrankungen in experimentellen Tiermodellen zu verstärken, wird Pertussis Toxin häufig in immunologischen Studien eingesetzt (Munoz 1985). So könnten durch die geschädigte Blut-Hirn-Schranke auch vermehrt osmotisch wirksame Teilchen aus dem Blut ins Kammerwasser gelangen und eine Erhöhung des Augeninnendruckes nach sich ziehen. Dieser Anstieg stünde nicht im Zusammenhang mit den Auswirkungen einzelner Antigene, sondern wäre bedingt durch den Versuchsaufbau. Deshalb sollte auch diese Möglichkeit für die Veränderung des Augeninnendruckes beachtet werden.

Zur Bedeutung des Augeninnendruckes und einer möglichen autoimmunen Komponente beim Glaukom gibt es verschiedene Theorien. Wax und Kollegen (1998a) vermuten, dass beim Normaldruckglaukom die autoimmunen Prozesse eine größere Rolle als bei Glaukomformen mit erhöhtem IOP spielen, da es auch beim Normaldruckglaukom zum Verlust retinaler Ganglienzellen kommt, der aber nicht wie bei Glaukomformen mit erhöhtem Augeninnendruck mechanisch bedingt sein kann. Sowohl bei Patienten mit Normaldruckglaukom, als auch bei solchen mit einem Offenwinkelglaukom werden komplexe Autoantikörperprofile gefunden, die untereinander und gegenüber der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede aufweisen (Reichelt et al. 2008).

In der Studie von Bakalash et al. (2002) wird der Augeninnendruck bei Ratten aus zwei verschiedenen Stämmen experimentell durch Laserbehandlungen erhöht. Anschließend kann trotz fast identisch hohem IOP ein signifikant unterschiedlicher Verlust an retinalen Ganglienzellen zwischen den verschiedenen Rattenstämmen nachgewiesen werden. Dies erklären die Autoren mit dem unterschiedlichen immunologischen Potential der beiden Rattenstämme (Bakalash et al. 2002). In weiteren experimentellen Studien mit Tiermodellen kann ein Zusammenhang des Untergangs retinaler Ganglienzellen und der Funktion der protektiven T-Zell vermittelten Immunität nachgewiesen werden. So ist der Ganglienzellverlust in Abwesenheit reifer T-Zellen größer (Kipnis et al. 2001; Schori et al. 2001; Schwartz und Kipnis 2001).

Aufgrund der oben beschriebenen Theorien und der Tatsache, dass es zwar signifikante Unterschiede bei den IOP Werten gibt, jedoch kein einziger Wert außerhalb des Normalbereiches liegt, ist anzunehmen, dass der Untergang der retinalen Neurone in dieser Studie durch eine vom Augeninnendruck unabhängigen autoimmunen Komponente verursacht werden könnte. Ob die signifikanten IOP Unterschiede tatsächlich durch das jeweilig verabreichte Antigen ausgelöst werden oder durch einen anderen Mechanismus bedingt sind, bleibt in folgenden Studien zu klären. Da der Wert der IOP Messung einen äußerst wichtigen diagnostischen Befund darstellt, sollte die Messung des Augeninnendruckes auch in folgenden Studien durchgeführt werden. Eventuell sollte bei folgenden Studien die Anzahl der Tiere pro Gruppe erhöht und die Studienlaufzeit verlängert werden. Dies dient vor allem der Absicherung der Daten gegenüber Messungenauigkeiten oder sonstigen Einflüssen, die nichts mit dem eigentlichen Versuchsaufbau zu tun haben. Eine mögliche Beeinträchtigung des Überlebens von retinalen Ganglienzellen durch häufige IOP Messungen kann bisher nicht nachgewiesen werden (Cuny et al. 2010).

### **5.2 Funduskopie**

Die Fundusuntersuchung gehört neben der Tonometrie und der Gonioskopie zu den wichtigsten Untersuchungen für die Diagnosestellung und das klinische Management von Glaukompatienten (Gelatt und Brooks 1999). Bei der Betrachtung des Augenhintergrundes können pathologische Veränderungen der Netzhaut und ihres Blutgefäßsystems, sowie des Discus n. optici, des retinalen Pigmentepithels, der Choroidea und partiell von der Sclera beurteilt werden (Walde et al. 2008). Besonderes Augenmerk sollte auf eine eventuell schon vorhandene Ausdünnung und napfkuchenartige Einziehung des Sehnervenkopfes gerichtet werden. Mit einem Rotlichtfilter besteht zusätzlich die Möglichkeit, Defekte der Nervenfaserbündel in der Nervenfaserschicht festzustellen (Gelatt und Brooks 1999).

Durch die fotografische Dokumentation aller Fundi zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten wird eine Verlaufskontrolle durchgeführt, die es ermöglicht eventuelle pathologische Auffälligkeiten im direkten Vergleich der Aufnahmen festzustellen. Jedoch werden in der vorliegenden Studie bei keinem Tier Veränderungen im Bereich des Augenhintergrundes und des Sehnervenkopfes festgestellt.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen zweier vorangegangenen Studien mit dem experimentellen autoimmunen Glaukom Modell, bei denen ebenfalls zu verschiedenen Zeitpunkten Aufnahmen der Fundi gemacht und verglichen werden. Auch hier werden keine pathologischen Veränderungen am Fundus festgestellt (Joachim et al. 2009; Joachim et al. 2010). Bedingt durch die kurzen Laufzeiten der Studien der Arbeitsgruppe von Joachim et al. (2009 und 2010) mit sechs und acht Wochen und der Studie im Rahmen dieser Dissertation mit vier Wochen kann es nur zur Entstehung von Frühschäden im Zusammenhang mit dem Glaukom kommen. Glaukomatöse Schäden am Fundus werden aber meist erst im längeren Krankheitsverlauf sichtbar (Grehn 2007) und sind bei Ratten auch nicht in der Form und dem Ausmaß zu sehen, wie sie beim Menschen gefunden werden. Deshalb sind die Ergebnisse der Funduskopie beider Studien nicht verwunderlich. Dennoch ist es wichtig und sinnvoll in nachfolgenden Studien die Fundi weiterhin zu untersuchen und die Bilder zu dokumentieren, da es bei längeren Studienlaufzeiten und/oder Erhöhung der Immunisierungsdosis durchaus möglich sein könnte, dass sichtbare Schäden am Augenhintergrund auftreten.

Beispielsweise können in Augen, in denen Hämorrhagien am Sehnervenkopf auftreten, lokalisierte Ganglienzellverluste nachgewiesen werden, was nahe legt, dass ein solcher Befund bei der Augenhintergrundbetrachtung ein klinisches Anzeichen für ein pathologisches Geschehen in der Netzhaut ist (Jeoung et al. 2008). Solche Befunde wären in nachfolgenden Studien denkbar.

Da sowohl in der vorliegenden Studie als auch bei mit Hitzeschockprotein 27 (Joachim et al. 2009) und Hitzeschockprotein 60 (Joachim et al. 2010) immunisierten Ratten in früheren Studien ein deutlicher Verlust retinaler Ganglienzellen festgestellt wird, ist bewiesen, dass sehr wohl Veränderungen am Fundus vorliegen, die jedoch durch das Verfahren der Funduskopie nicht nachgewiesen werden können. Folglich wäre es wünschenswert, in der Zukunft ein erheblich sensitiveres Verfahren benutzen zu können.

Ein denkbare Verfahren wäre die okuläre Kohärenz Tomographie (OCT). Dieses moderne bildgebende Untersuchungsverfahren ermöglicht es, ähnlich wie bei der Computertomographie, hochauflösende Schnittbilder des Augenhintergrundes zu machen. Jedoch werden dazu nur Lichtstrahlen und nicht wie bei der Computertomographie Röntgenstrahlen benötigt (Schuman et al. 1995). Auf den Schnittbildern kann eine Ausdünnung der Nervenfaserbündel des Sehnervenkopfes

schon einige Jahre vor der Manifestation von Gesichtsfeldausfällen bei Glaukompatienten erkannt werden. Eine solche Ausdünnung wäre bei der Funduskopie noch nicht auffällig (Chen und Lee 2007). Zusätzlich liefert die okuläre Kohärenz Tomographie Informationen zum Sauerstoffgehalt im Gewebe der Netzhaut und dem Blutfluss in Netzhautgefäßen (van Velthoven et al. 2007). Das genannte Verfahren könnte sich auch zur Feststellung der Dicke der retinalen Schichten und zum Nachweis des Untergangs retinaler Ganglienzellen im experimentellen autoimmunen Glaukom Modell eignen. Es hat sich bereits in einer Studie an Ratten zur chirurgisch induzierten okulären Hypertension bei der Analyse von Strukturen in der Retina und am Sehnervenkopf bewährt (Guo et al. 2005).

Ein weiteres sensitives und objektives Verfahren der Frühdiagnose von retinalen Ganglienzellverlusten und zur Kontrolle der Therapie ist die Laser Polarimetrie, bei dem durch scannen der Netzhaut die Dicke der Nervenfaserschicht bestimmt wird (Zeimer et al. 1996). So können in einer Studie signifikante Unterschiede in der Netzhautdicke von gesunden und sich im Frühstadium eines Glaukoms befindlichen Augen von Cocker Spaniel nachgewiesen werden. Dies weist bereits auf einen Verlust von retinalen Ganglienzellen und ihren Axonen hin (Brooks et al. 1999). Die nicht invasive Methode der Messung der Netzhautdicke ist vor allem für die Arbeit mit Tieren von großer Bedeutung, da hier die Feststellung von Gesichtsfeldausfällen schwierig ist (Garcia-Sanchez et al. 2007).

### **5.3 Bewertung der Zellauszählung nach Zellklassen**

#### **Magnozelluläre und parvozelluläre Neurone**

Häufig wird ein selektiv höherer Verlust der magnozellulären Neurone im Glaukom Modell festgestellt (Glovinsky et al. 1991; Glovinsky et al. 1993; Shou et al. 2003). Aber auch an Augen von Glaukompatienten kann ein solch selektiver Verlust nachgewiesen werden (Asai et al. 1987; Quigley et al. 1989). Dieser zellgrößenspezifische Verlust beginnt meist schon in frühen Stadien der Glaukomerkrankung und ist zu diesem Zeitpunkt auch am deutlichsten, während er in fortgeschrittenen Stadien nachlässt (Glovinsky et al. 1991). Der größere Verlust von magnozellulären Neuronen korrespondiert mit einem deutlichen Verlust größerer Axone im Nervus opticus (Quigley et al. 1987; Quigley et al. 1988), wobei die Zellkörper der Ganglienzellen noch circa drei bis vier Wochen nach Axonverlust

überleben (Quigley et al. 1977). Neben dem größeren Verlust an magnozellulären Neuronen wird in einer Studie bei Katzen ein signifikantes Schrumpfen der verbleibenden Ganglienzellen registriert (Shou et al. 2003). In der vorliegenden Studie wird weder ein größerer Verlust an magnozellulären Neuronen, noch ein Schrumpfen der Neurone festgestellt. Es wird im Gegensatz zu den bereits genannten Beobachtungen anderer Studien eine signifikante Erhöhung der Zahl der magnozellulären Neurone bei den meisten Immunisierungsgruppen der vorliegenden Studie gesehen. Dies deckt sich mit neueren Studien zum Glaukom. In diesen Studien wird eine Vergrößerung des dendritischen Feldes und des Zellsomas der retinalen Ganglienzellen der Ratte festgestellt (Rousseau et al. 1999; Ahmed et al. 2001). Bei der Ratte wird nach einer Axotomie zunächst eine Vergrößerung der Zellkörper gesehen, bevor diese wieder fast ihre normale Größe erreichen (Moore und Thanos 1996). Im Verlaufe einer Glaukomerkrankung entstehen durch das Absterben von Ganglienzellen Lücken in der Netzhaut. Es besteht die Möglichkeit, dass verbleibende Ganglienzellen durch diese Lücken in der Retina angeregt werden ihre Zellkörper zu vergrößern, um die Lücken zu schließen (Kirby und Chalupa 1986). Dieses Phänomen wird beispielsweise bei der frühen Entwicklung der Retina gesehen (Wingate 1996). Übereinstimmend mit diesen Vermutungen wird in einem Glaukom Modell mit Primaten eine Vergrößerung des dendritischen Feldes zu Beginn der glaukombedingten Schäden gefunden (Weber et al. 1998). Vielleicht gerade wegen diesen überlappenden rezeptiven Feldern, die die Sehfunktion des Auges zunächst aufrechterhalten (Quigley et al. 1989), ist es mit den derzeit verfügbaren Tests zur Erfassung des visuellen Feldes nicht möglich, einen beginnenden Ganglienzellverlust festzustellen (Brenton und Drum 1989).

Die Zellzahlen der magnozellulären Neurone sind in der hier vorliegenden Arbeit bei allen Immunisierungsgruppen im Vergleich mit der Kontrolle am Studienende erhöht. Dahingegen sind die Zellzahlen der parvozellulären Neurone und die Gesamtzahl der Neurone gegenüber der Kontrollgruppe deutlich verringert. Dies unterstützt die Theorie, dass die verbleibenden Zellen zur Überbrückung der durch Krankheitsbedingte Zellverluste entstandenen Lücken ihre Zellkörper vergrößern.

Jedoch könnte auch eine weitere Ursache für die vermehrt auftretenden Zellen mit großem Zellkörper darin liegen, dass einige Zellen anschwellen bevor sie zu Grunde gehen. Um zu unterscheiden, ob es sich bei den Zellen mit großem Zellkörper tatsächlich um intakte Zellen mit lediglich vergrößertem Zellsoma oder um Zellen



handelt, die bereits zu Grunde gehen, sollten in folgenden Studien spezifische Apoptose Marker eingesetzt werden.

### **Gliazellen**

Es gibt drei Haupttypen von Gliazellen in der Retina: die Müller Zellen, die Astrozyten und die Mikroglia (Tezel 2009). Die Müller Zellen und die Astrozyten werden zusammen als Makrogliazellen bezeichnet und sind für die Kontrolle des extrazellulären Umfelds und die Aufrechterhaltung der Glutamat- und Ionen-Balance sowie für die Abpufferung des oxidativen Stresses zuständig. Die Mikrogliazellen agieren als ansässige Makrophagen der Retina und des Sehnervenkopfes (Tezel 2009). Obwohl die genaue Rolle der Mikrogliazellen im Krankheitsgeschehen des Glaukoms noch nicht so umfassend untersucht wurde wie die anderer retinaler Gliazellen, gibt es Berichte über die Proliferation und Hypertrophie der Mikrogliazellen im experimentell induzierten Glaukom (Wang et al. 2000; Tezel und Wax 2003b). Die Gliazellen, vor allem die Mikrogliazellen, spielen eine bedeutende Rolle in der lokalen Immunabwehr und Immunkontrolle. Diese Immunregulation kann wichtige Verbindungen mit dem systemischen Immunsystem herstellen und einen Dialog zwischen Glia- und T-Zellen auslösen. Eine weitere wichtige Rolle der Gliazellen besteht in der Aufrechterhaltung von perivaskulären Barrieren und dem Schutz der Neurone vor inflammatorischen Immunreaktionen (Tezel 2009). Die Mikrogliazellen verändern während einem neurodegenerativen Geschehen bei einem Glaukom auffällig ihre Größe, ihre Verteilung und die Zellzahl. Sie reagieren sofort auf eine Schädigung und stellen in der Retina und am Sehnervenkopf die erste Abwehrlinie dar (Tezel et al. 2003a). Neben der angeborenen Immunantwort haben die Gliazellen die Fähigkeit, die adaptive Immunantwort durch Expressieren von Haupthistokompatibilitätskomplexen der Klasse II (Matsubara et al. 1999), die für die Antigenpräsentation gegenüber der T-Zellen benötigt werden, auszulösen (Tezel 2009). Die Präsenz von reaktiven Gliazellen wird allgemein als Erkennungszeichen für einen neuroinflammatorischen Prozess im zentralen Nervensystem angesehen, welcher bei längerem Vorhandensein zu Gewebsschäden durch proinflammatorische Zytokine führen kann (Tezel und Wax 2000a). So werden beispielsweise in einer Studie an postnatalen Katzenretinas Parallelen zwischen einem erhöhten Verlust an retinalen Ganglienzellen und dem Vorhandensein einer großen Anzahl von Mikrogliazellen gesehen (Pearson et al. 1993). Wegen der kontinuierlichen Präsenz

von reaktiven Gliazellen in der Retina und im Sehnervenkopf während der Glaukomerkrankung wird vermutet, dass die Aktivierung der Gliazellen sowohl protektive als auch destruktive Effekte auslöst (Tezel 2009). Die Anzahl der Gliazellen ist in dieser Studie bei allen Gruppen bis auf die GDNF+HSP 27-Gruppe, die die gleiche Anzahl wie die Kontrollgruppe aufweist, erhöht. Bei der  $\beta$ -Aktin-, der GFAP- und der S100-Gruppe kann sogar eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Gruppen mit den geringsten Anzahlen an Gliazellen sind gleichzeitig die mit den höchsten Verlusten an Neuronen. Die Gruppen mit den geringsten Neuronenverluste weisen hingegen die höchste Anzahl an Gliazellen auf. Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass bei den Gruppen mit den niedrigen Gliazellanzahlen die Neurodegeneration schon weitestgehend abgeschlossen ist, während sie bei den Gruppen mit hohen Gliazellanzahlen noch im Gange ist. Um diese Vermutung zu bestätigen, wäre eine Überprüfung der Zellzahlen in einer Studie mit längerer Laufzeit für die Gruppen mit wenig Neuronenverlust, aber viel Gliazellen und eventuell eine kürzere Studienlaufzeit für die Gruppen mit viel Neuronenverlust und geringen Gliazellzahlen notwendig. Es wäre eventuell auch sinnvoll in weiteren Studien spezielle Marker zur Differenzierung von Mikrogliazellen und Makrogliazellen einzusetzen um zu sehen, welcher Gliazelltyp den größten Anteil beim Anstieg der Zellzahl der Gliazellen ausmacht. Dies könnte Rückschlüsse auf mögliche Mechanismen beim retinalen Zelluntergang zu lassen. In der vorliegenden Arbeit ist es nicht möglich, eine Aussage hinsichtlich eines protektiven oder destruktiven Einflusses der Gliazellen auf den Neuronenverlust zu treffen.

### **Endothelzellen**

Es gibt verschiedene Studien, die auf einen eventuell veränderten Blutfluss und Schäden an Blutgefäßen in der Retina von Hunden mit Primärglaukom hinweisen (Smedes und Dubielzig 1994). Bei Beagles mit Offenwinkelglaukom kann ein veränderter Blutfluss bereits vor einer Erhöhung des intraokularen Druckes festgestellt werden (Gelatt et al. 2003). Dieser veränderte Blutfluss und die vaskulären Schäden können eventuell zu einer Ischämie und damit zu pathologischen Veränderungen beim Primärglaukom in allen Schichten der caninen Retina führen (Whiteman et al. 2002; McInay et al. 2004). In einer Studie an Retinae von Hunden mit Primärglaukom kann ein signifikanter Verlust von Kapillargefäßen, vor allem in Gebieten mit großen Schäden, im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt

werden. Von diesem Verlust bleiben die größeren Gefäße unberührt. Dies lässt vermuten, dass die Zahl der Kapillaren mit dem Grad der Schädigung der inneren nuclearen Schicht zusammenhängt und weiter abnimmt, wenn die Schädigungen fortschreiten (Alyahya et al. 2007). Da in der vorliegenden Studie kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Endothelzellzahl der Gruppen gegenüber der Kontrolle festgestellt wird, kann ein ischämiebedingter Verlust retinaler Neurone ausgeschlossen werden.

### **5.4 Betrachtung der Zellzahlen**

Die Ergebnisse der Zellkernauszählung dieser Studie ergeben bei allen Immunisierungsgruppen außer bei der  $\beta$ -Aktin-Gruppe einen signifikanten Verlust an Neuronen. Da allen Tieren, inklusive der Kontrolltiere, zum gleichen Zeitpunkt die gleiche Menge Pertussis Toxin und Freund's Adjuvant appliziert wird, die Neuronenverluste aber unterschiedlich groß sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Zahl der zugrundegegangenen Zellen für jedes Antigen spezifisch ist. Der verantwortliche Mechanismus für den Zelluntergang bleibt hier zunächst unentdeckt. In anderen experimentellen Studien zum Glaukom wird nachgewiesen, dass die Zellen durch Apoptose absterben, wobei auch hier die Autoren die Möglichkeit des programmierten Zelltods nicht als einzigen Modus für das Absterben der retinalen Zellen während einer Glaukomerkrankung ansehen (Quigley et al. 1995). Jedoch ist die Fähigkeit zur Apoptose in jeder Ganglienzelle genetisch programmiert, da während der fetalen Entwicklung der Retina, verglichen mit der adulten Retina, wesentlich mehr Ganglienzellen vorhanden sind. Die nicht benötigten Ganglienzellen sterben durch Apoptose. Dies stellt einen ganz normalen Entwicklungsvorgang dar (Farkas und Grosskreutz 2001).

Die errechnete Gesamtneuronenzahl liegt mit durchschnittlich 5008 Zellen/mm<sup>2</sup> bei der Kontrollgruppe etwas über den Zahlen, die andere Arbeitsgruppen ermittelt haben. So werden in früheren Studien Zellzahlen von durchschnittlich über 3000 Zellen/mm<sup>2</sup> für die Kontrollgruppe nach Färbung mit Brn 3a ermittelt (Wax et al. 2008; Joachim et al. 2009). Die größere Anzahl an Zellen in der vorliegenden Studie ist vor allem dadurch zu begründen, dass auf den fotografierten Arealen alle sichtbaren Zellen, unabhängig davon ob sie nur halb auf dem Bild sind oder nicht, mitgezählt werden. Da diese Neuronenzahl von jedem fotografierten Areal, unter

Berücksichtigung der jeweiligen Schrumpfung des Flatmounts, mit einem Faktor von 26,35-29,83 auf 1 mm<sup>2</sup> hochgerechnet wird, vergrößerte sich auch die Zahl der Zellen, deren Zellkern nicht vollständig auf den Bildern zu sehen ist und die damit eigentlich mehrfach mitberechnet werden. Deshalb dürfte die genauere Zellzahl der Neurone etwas unterhalb der hier errechneten Werte liegen. Da aber alle Bilder gleichermaßen ausgezählt werden, verschiebt sich das Verhältnis zwischen den Gruppen nicht. Ein weiterer wichtiger Grund für die unterschiedlichen Zellzahlen könnte auch in den unterschiedlich verwendeten Färbemethoden liegen. Wax et al. (2008) und Joachim et al. (2009) verwenden Brn-3a zur Färbung der Zellen, während in der vorliegenden Arbeit Kresylviolett eingesetzt wird.

An der Anfärbung der Zellen mit Kresylviolett sind vor allem Bestandteile des Zellkerns und die in das Zytoplasma eingelagerten Nissl Schollen beteiligt. Letztere sind heute als Stapel des rauhen endoplasmatischen Retikulums identifiziert. Somit stellen Ribonukleoproteine das Substrat der Färbung dar und es kann davon ausgegangen werden, dass sich ausschließlich in intakten Zellen Ribosomen und Kernbestandteile anfärben (Romeis und Böck 1989). Es wird jedoch in histologischen Untersuchungen der Retina nachgewiesen, dass neben den retinalen Ganglienzellen in der retinalen Ganglienzellschicht auch eine Subpopulation an Amakrinzellen vorkommt. Sie werden als „displaced“ Amakrinzellen bezeichnet (Perry 1981). Anhand ihrer Morphologie können diese displaced Amakrinzellen nicht von retinalen Ganglienzellen unterschieden werden (Gramlich 2011). Aus diesem Grund werden diese Zellen in der vorliegenden Studie als retinale Ganglienzellen bzw. Neurone mitgezählt und haben vermutlich so zu den insgesamt höheren Zellzahlen verglichen mit vorangegangenen Studien, die mit Brn-3a als Marker arbeiten (Wax et al. 2008; Joachim et al. 2009), beigetragen.

Bei dem immunhistologischen Verfahren der Brn-3 Färbung werden spezifisch Kernproteine von retinalen Ganglienzellen markiert (Kwong et al. 2010). Jedoch bergen die anspruchsvollen immunhistologischen und automatisierten Verfahren große Risiken, da Präparate zerstört werden oder verloren gehen können. Es gibt insgesamt drei Subtypen in der Brn-3 Gruppe (Brn-3a, Brn-3b und Brn-3c). Diese sind jeweils nur für eine bestimmte Subpopulation von retinalen Ganglienzellen spezifisch. Aus diesem Grund können maximal nur 80% der retinalen Ganglienzellen mit dieser Färbemethodik dargestellt werden (Xiang et al. 1995; Leahy et al. 2004). Diese Tatsache stellt eine mögliche Begründung für die insgesamt höheren

Zellzahlen bei der Anfärbung mit Kresylviolett in der vorliegenden Arbeit dar. Vor allem wenn man bedenkt, dass, wie oben bereits erwähnt, bei der Kresylviolettfärbung bedingt durch die fehlende Abgrenzbarkeit neben den retinalen Ganglienzellen auch die Amakrinenzellen mitgezählt werden.

### **5.5 Mögliche Pathomechanismen nach der $\beta$ -Aktin Immunisierung**

Aktin gehört zu einer Familie von hochkonservierten zytoskelettalen Proteinen, die eine fundamentale Rolle bei nahezu allen Aspekten der eukaryotischen Zellbiologie spielen. Bei Vertebraten sind bisher sechs verschiedene Isoformen des Aktins nachgewiesen: Zwei in der glatten Muskulatur ( $\alpha$ - und  $\gamma$ -smooth muscle actin), eine in der Skelettmuskulatur ( $\alpha$ -skeletal actin), eine in der Herzmuskulatur ( $\alpha$ -cardiac actin) und zwei im Zytoplasma ( $\beta$ - und  $\gamma$ -cytoplasmic actin) (Vandekerckhove und Weber 1978). Die Muskelaktine sind gewebsspezifisch und in kontraktile Einheiten organisiert, während die beiden Zytoplasmaformen des Aktins ubiquitär vorkommen und essentiell für das Überleben der Zellen sind (Harborth et al. 2001).  $\beta$ -Aktin spielt beim intrazellulären Austausch, bei Veränderungen der Zellform, Zellmotilität, Zytokinese, Endozytose und Zelladhäsion eine wichtige Rolle (Brakebusch und Fassler 2003; Engqvist-Goldstein und Drubin 2003; Suetsugu und Takenawa 2003; Ascough 2004). Dugina und Mitarbeiter (2009) beobachten eine bevorzugte Verteilung von  $\beta$ -Aktin in den ventralen Stressfasern. Sie können auch erstmals eine Segregation von  $\beta$ -Aktin und  $\gamma$ -Aktin im Zytoplasma von mesenchymalen und epithelialen Zellen während der Zytokinese, der Fortbewegung und der Ruhe beobachten. Speziell bei der Zellmigration wird festgestellt, dass die mit  $\beta$ -Aktin beladenen Fibroblasten sich signifikant langsamer fortbewegten als nicht beladene Zellen. Bei der Zellkontraktion bei  $\beta$ -Aktin beladenen epithelialen Zellen kommt es zu einer Polynukleation, was mit der Annahme übereinstimmt, dass  $\beta$ -Aktin in der Formation des Kontraktilen Ringes involviert ist. Dies spricht für eine bedeutende Rolle von  $\beta$ -Aktin bei kontraktile Aktivitäten und bei der Formation von filamentösen Netzwerken, welche für die Flexibilität der Zellform notwendig sind (Dugina et al. 2009). Des Weiteren wird eine Beteiligung von  $\beta$ -Aktin in der RNA Polymerase III Transkription vermutet (Hu et al. 2004). In Neuronen ist  $\beta$ -Aktin in das Wachstum der Neuriten und die Formation von Synapsen involviert (Smith 1988). Vor allem bei der Regulation der Funktion der neuronalen Plasmamembran inklusive der Aktivität der

Ionenkanäle wird  $\beta$ -Aktin eine wichtige Rolle zuteil (Johnson und Byerly 1993; Rosenmund und Westbrook 1993). Es wird vermutet, dass Veränderungen in der Organisation der Aktin Filamente ein neuer intrazellulärer Signalmechanismus für die neuronale Ionenkanalregulation darstellt (Maguire et al. 1998). Auch die Kontrolle der Neurotransmitterausschüttung und die Synapsen-assoziierten Signale, welche zur neuronalen Funktion beitragen, unterliegen dem Einfluss von  $\beta$ -Aktin (Smith 1988). Die Immunisierung mit  $\beta$ -Aktin führt in der vorliegenden Studie zu keinem signifikanten Verlust an Neuronen ( $p=0,08$ ). Dies lässt vermuten, dass  $\beta$ -Aktin bzw. Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin keine bedeutende Rolle in der Pathogenese des Glaukoms zukommt. Jedoch wird bei dieser Gruppe die höchste Anzahl an Gliazellen gezählt ( $p=0,000007$ ). Da die Gliazellen die erste Abwehrlinie darstellen (Tezel et al. 2003a), rechtfertigt dies die Annahme, dass ein Abwehrvorgang gerade im Gang ist und Schäden vielleicht zu einem späteren Zeitpunkt sichtbar werden. Bei allen anderen Immunisierungsgruppen sind die Zellverluste größer, die Zahl der Gliazellen aber geringer. Daraus könnte geschlossen werden, dass  $\beta$ -Aktin erst nach längerer Dauer Schäden verursacht. Durch die vielfältigen Aufgaben und Funktionen von  $\beta$ -Aktin in einer Zelle bieten sich sehr viele Angriffspunkte um die Zelle zu schädigen. Ob eine Überexpression von  $\beta$ -Aktin nach der Immunisierung sich negativ auf den Erhalt der Plasmamembran und die Aktivität der Ionenkanäle auswirken kann und dadurch die Neuronen zum Zelluntergang bringt, bleibt zu überprüfen. Jedoch wären dies mögliche Ansatzpunkte um einen Verlust an Neuronen herbeizuführen, da durch eine geschädigte Plasmamembran oder einen gestörten Ionenhaushalt das Milieu der Zelle so verändert werden könnte, dass diese aufgrund osmotischer Inbalance zu Grunde geht. Auch die Beeinflussung der Neurotransmitterausschüttung oder der Synapsen-assoziierten Signale durch eine veränderte  $\beta$ -Aktin Konzentration bzw. durch das vermehrte Auftreten von Antikörpern gegen  $\beta$ -Aktin könnten zur Schädigung von Zellen während einem Glaukom führen. Eventuell können falsche Signale die Apoptose von Zellen einleiten. Es sollten deshalb Studien mit längeren Laufzeiten folgen, um die Entwicklung der Zellzahlen zu beobachten und festzustellen ob es zu weiteren Zellverlusten kommt.

## **5.6 Mögliche pathologische Vorgänge nach der Immunisierung mit saurem Gliafaser Protein (GFAP)**

Das saure Gliafaserprotein wird als erstes in Multiple Sklerose Plaques entdeckt (Eng et al. 1970) und kommt hauptsächlich in Astrozyten vor (Lazarides 1982). Es ist das Hauptprotein der Gliafilamente in differenzierten Astrozyten des zentralen Nervensystems (Eng et al. 1971; Eng 1985). Das Molekulargewicht des sauren Gliafaserproteins beträgt 52 kDa (Joachim et al. 2007b) und es ist nicht Spezies spezifisch. Es werden Kreuzreaktionen zwischen menschlichen Proteinen und solchen von Säugetieren wie Hunde, Hasen, Meerschweinchen und Ratten gesehen (Bignami et al. 1972). Polyklonale und monoklonale Antikörper gegen GFAP werden bereits intensiv genutzt um normale protoplastische und fibröse Astrozyten, astrozytische Gehirntumoren und speziell um aktivierte Astrozyten während eines pathologischen Vorgangs im Gehirn zu identifizieren (Eng und Shiurba 1988). Allgemein gilt eine erhöhte Expression des sauren Gliafaserproteins durch Gliazellen als nicht spezifischer Marker von neuronalen Schädigungen (O'Callaghan 1991). In früheren Studien wird bereits von morphologischen Veränderungen und Erhöhung von GFAP in Astrozyten des Nervus opticus bei Menschen mit primären Offenwinkelglaukom (Quigley et al. 1981; Neufeld et al. 1997) und in Retinae beim Sekundärglaukom (Hiscott et al. 1984; Tuccari et al. 1986) berichtet. Die Hochregulierung von GFAP in Astrozyten des Nervus Opticus bei einem Glaukom steht beim Menschen im Zusammenhang mit den Veränderungen der Expression verschiedener extrazellulärer Matrixproteine, sowie einer Erhöhung der Nitrit-Oxid-Synthase (Elkington et al. 1990; Ricard et al. 2000). Ein chronisch erhöhter intraokularer Druck führt ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der GFAP Expression in der Retina (Jiang et al. 2007), wobei dies in experimentellen Glaukom Modellen vor allem zwischen dem 15. Tag und der achten Woche nach der Erhöhung des IOP verzeichnet wird und die Expression danach wieder abnimmt (Wang et al. 2002). Des Weiteren wird bei Krankheiten wie Multiple Sklerose (Norgren et al. 2004), Lupus erythematosus (Sanna et al. 2000) und altersbedingter Makuladegeneration (Wu et al. 2003) eine Erhöhung von GFAP nachgewiesen. Bei der Makula Degeneration (Joachim et al. 2007b) und bei Patienten mit Autismus (Singh et al. 1997) stellt man erhöhte Antikörpertiter gegen GFAP im Serum fest. Es wird vermutet, dass der erhöhte GFAP Level nach Schädigungen durch einen

steigenden Augeninnendruck dazu dient, die Struktur des Zytoskeletts in betroffenen Astrozyten zu erhalten (Lam et al. 2003). Dadurch, dass es in den eigenen Untersuchungen in der vorliegenden Studie aber nach Immunisierung mit GFAP zu einem signifikanten Verlust von Neuronen in der Retina kommt, ohne dass eine Erhöhung des intraokularen Druckes registriert wird, kann GFAP nicht nur ein positiver Einfluss auf das Überleben von Neuronen bzw. Ganglienzellen zugesprochen werden.

So wird einerseits vermutet, dass die vermehrte GFAP Expression in reaktiven Astrozyten während eines Glaukoms eine verstärkte Synthese von kleinen Hitzeschockproteinen bedingt, welche zytoprotektive Effekte haben (Tezel et al. 2000c). Andererseits gibt es die These, dass die GFAP Erhöhung eine vermehrte Ausschüttung von Tumornekrosefaktoren auslöst, welche zytotoxische Effekte auf retinale Ganglienzellen und deren Axone haben (Tezel und Wax 2000a). Da in der Studie im Rahmen dieser Dissertation die Immunisierung mit dem sauren Gliafaserprotein zu dem zweitgeringsten, aber dennoch signifikanten Verlust an Neuronen in der Retina führt ( $p=0,04$ ), kommt die Vermutung auf, dass dieses Protein nur eine geringe Beteiligung an der Pathogenese des EAG Modells hat. Der oben vermutete Mechanismus, dass bedingt durch GFAP eine vermehrte Ausschüttung von Tumornekrosefaktoren stattfindet und dadurch die Verluste der Neurone entstehen, kann in der vorliegenden Arbeit mangels entsprechender Analysen nicht bestätigt werden, wäre aber denkbar und sollte daher überprüft werden. Da auch für kleine Hitzeschockproteine wie HSP 27 nicht nur protektive (Samali und Orrenius 1998) sondern auch destruktive (Tezel et al. 1998; Tezel und Wax 2000b) Einflüsse auf Ganglienzellen diskutiert werden, könnte auch eine erhöhte Expression von HSP 27, bedingt durch GFAP, zu einer Schädigung der retinalen Ganglienzellen führen. Die durch Hochregulierung von GFAP in den Astrozyten ausgelöste erhöhte Abgabe von Nitrit-Oxid-Synthase könnte zu einer vermehrten Produktion von Stickoxid (NO) führen, welches laut Hu et al. (1997) ebenfalls eine Apoptose von Neuronen auslösen kann. Da GFAP in einer neueren Studie auch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke zugestanden wird (Pekny et al. 1998), könnten erhöhte Werte von Antikörpern gegen GFAP zu einer Permeabilitätssteigerung oder gar einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke führen. Dies würde den Zugang für andere, eventuell schädigende,



Moleküle zu neuronalen Strukturen erleichtern, welche dann einen Verlust von Neuronen in der Retina auslösen könnten.

Zudem kommt es bei einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke zu einer Dissoziation der sonst straffen Bündel der Gliafilamenten, was dazu führt, dass mehr Epitope für GFAP Antikörper exponiert werden (Eng et al. 1989). Dies wiederum könnte derart zur Schädigung bzw. Beeinträchtigung der Funktion des Zytoskeletts führen, dass es zur Apoptose der neuronalen Zelle kommt.

Zu beachten ist auch, wie bei der  $\beta$ -Aktin-Gruppe, dass die Zahl der Gliazellen im Verhältnis zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ist ( $p=0,005$ ). Dies spricht für ein aktives Abwehrgeschehen in der Retina. Eventuell kommt es auch bei der GFAP-Gruppe nach längerer Studienlaufzeit noch zu höheren Zellverlusten.

### **5.7 Einfluß der Tubulin Immunisierung auf retinale Ganglien Zellen**

$\alpha$ - und  $\beta$ -Tubuline haben jeweils ein Molekulargewicht von 55 kDa (Bryan und Wilson 1971) und sind Polymere, welche als Bausteine der Mikrotubuli in allen eukaryotischen Zellen vorkommen. Als Bestandteile des Zytoskeletts sind die Mikrotubuli an verschiedenen Prozessen wie beispielsweise Mitose, Zellmotilität, intrazellulärer Transport, Sekretion und Erhaltung der Zellform beteiligt. Speziell in Neuronen sind die Mikrotubuli in die Polarisierung, die Organisation der intrazellulären Komponenten, das Reparieren der Dendriten und den Austausch von Molekülen zwischen prä-, post- und extrasynaptischen Domänen involviert (Janke und Kneussel 2010). Zudem sind Mikrotubuli essentiell für das Wachstum der Neuriten während der Entwicklung (Sharma und Netland 2007). Bisher sind sechs verschiedene Tubulin-Isotypen in Geweben von Säugetieren isoliert (Sullivan und Cleveland 1986). Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Tubulin-Isotypen bei einem Schaden oder der Regeneration des zentralen Nervensystems in unterschiedlicher Weise betroffen sind, so wie es im peripheren Nervensystem der Fall ist. Es wird aber bereits beschrieben, dass es bei einer intraorbitalen Schädigung der retinalen Ganglienzellen zu einer gleichartigen Verminderung der mRNA Level für alle Isotypen kommt, während bei der Regeneration von Schädigungen über eine lange Distanz nur mRNA Level spezifischer Isotypen erhöht sind. Ebenfalls noch nicht vollständig geklärt ist, ob die Tubulin Expression in geschädigten Neuronen durch die

Präsenz von neurotrophischen Faktoren im nicht neuronalen extrazellulären Umfeld nach einer Schädigung beeinflusst wird (Fournier und McKerracher 1997).

Viele neurodegenerative Erkrankungen sind durch einen veränderten, auf Mikrotubuli basierenden Transport in Neuronen charakterisiert, welcher oft mit einer Akkumulation von Protein-Aggregaten vergesellschaftet ist (Kamal et al. 2001; Pigino et al. 2003; Stokin et al. 2005; Goedert et al. 2006). Bei der Alzheimererkrankung wird bereits die Rolle der Tubulin-Acetylierung untersucht und vermutet, dass die post-translationale Modifikation des Tubulins an der Pathogenese dieser Erkrankung beteiligt ist. Jedoch bleibt noch zu klären, ob die Erhöhung des modifizierten Tubulins negative (Chen et al. 2005; Perez et al. 2009) oder positive (Hempfen und Brion 1996; Kim et al. 2007; Green et al. 2008) Effekte auslöst. Auch bei der Huntington Erkrankung kann die Acetylierung von Tubulin eine Rolle spielen, da ein Merkmal der Degeneration bei dieser Erkrankung die Beeinträchtigung des mikrotubuliabhängigen Transports von Vesikeln ist (Gauthier et al. 2004; Caviston und Holzbaur 2009). Eine Abnahme der Tubulin-Acetylierung ist bereits bei Patienten mit Huntington Erkrankung nachgewiesen (Dompiere et al. 2007).

Bei der Parkinson Erkrankung bewirken Parkinson Toxine neben der erhöhten Anzahl an falsch gefalteten Tubulinen eine Depolimerisation der Mikrotubuli (Brinkley et al. 1974; Marshall und Himes 1978; Cappelletti et al. 2001), welche die Unterbrechung des vesikulären Transportes und damit die Akkumulation dieser Vesikel im Zellsoma zur Folge hat (Feng 2006). Da Vesikel, die Neurotransmitter enthalten, von Natur aus undicht sind (Floor et al. 1995; Liu und Edwards 1997), kommt es im Zytosol der Zelle zu einer Erhöhung der Neurotransmitterkonzentration (Feng 2006). Zudem führt eine Depolimerisation der Mikrotubuli zu einem Abbau des normal langlebigen Tubulins (Cleveland 1989).

In den Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation kann nach der Immunisierung von Ratten mit Tubulin zwar ein signifikanter Verlust an Neuronen in der Retina verzeichnet werden ( $p=0,02$ ), jedoch bleibt der Mechanismus, welcher den Zellverlust ausgelöst hat, wie bei den oben bereits genannten Krankheiten weitestgehend ungeklärt. Durch die vielfältigen Aufgaben, die Tubulin in einer Zelle zukommen gibt es eine große Reihe von möglichen Angriffspunkten, die einen Zelltod auslösen könnten. Eine Unterbrechung des Vesikeltransportes, welcher zu einer erhöhten Konzentration an Neurotransmittern in der Zelle führt, wie es bei der Parkinsonerkrankung der Fall ist (Feng 2006), könnte eine denkbare Ursache für den

Zelluntergang sein. Auch eine Abnahme der Acetylierung von Tubulin könnte eine wichtige Rolle beim Zelluntergang spielen, da es dadurch zur Instabilität und Zusammenbruch des Zytoskeletts kommen kann. Der Austausch von Molekülen zwischen prä-, post- und extrasynaptischen Domänen, in den Tubulin involviert ist (Janke und Kneussel 2010), könnte, durch die nach der Immunisierung mit Tubulin vermehrt auftretenden Antikörper gegen Tubulin, gestört werden. Dadurch werden Signale falsch weitergeleitet und in manchen Zellen wird die Apoptose eingeleitet.

Darüber hinaus vertreten Verhey und Gaertig die Hypothese, dass allein die Modifikation des Tubulins das Potential hat komplexe molekulare Signale zu generieren, die als Code an die Mikrotubuli weitergeleitet werden (Verhey und Gaertig 2007). Je nach Modifikation des Tubulins, könnte daraus eventuell ein Code zum programmierten Zelltod an die Mikrotubuli weitergeleitet werden. Auch das Weiterleiten eines Codes der zur Auflockerung der Mikrotubulstruktur führt, könnte dazu beitragen, dass das Milieu in der Zelle derart verändert wird, dass sie zu Grunde geht.

### **5.8 Mögliche pathologische Vorgänge nach der Immunisierung mit dem Gliazell-abgeleiteten neurotrophen Faktor (GDNF)**

Der Gliazell-abgeleitete neurotrophische Faktor ist ein 20 kDa schweres glykosiliertes Homodimer und gehört zur Superfamilie der transformierenden Wachstumsfaktoren- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Als Erstes kann GDNF in Astrozyten identifiziert werden (Lin et al. 1993). Mittlerweile ist die GDNF Expression auch in Makrophagen und in Entzündungszellen in beschädigten Gehirnen (Hashimoto et al. 2005), sowie in Gliazellen des zentralen Nervensystems nachgewiesen (Batchelor et al. 1999). Bei der Parkinson Erkrankung gilt GDNF als wichtiger neurotrophischer Faktor für dopaminerge Neuronen (Lin et al. 1993) und daher als wichtiger Therapieansatz bei diesem Krankheitsbild (Stahl et al. 2011). Es ist bewiesen worden, dass das Überleben der Neuronen nach Spinalnervenabriss bei der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis der Ratte einen Zusammenhang mit erhöhten Werten der GDNF mRNA in T-Zellen und natürlichen Killer-Zellen in den betroffenen Regionen hat (Hammarberg et al. 2000). Auch bei der experimentellen autoimmunen Neuritis kann GDNF als wichtiger Faktor für protektive Mechanismen gegen neuronale Schäden identifiziert werden (Ahn et al. 2010). Neueren Untersuchungen

zufolge wird GDNF durch aktivierte Makrophagen induziert und der ansteigende GDNF Level in diesen Zellen wirkt sich positiv auf die Verhinderung von neuronalen Schäden aus (Hashimoto et al. 2005). Die intraokulare Verabreichung von GDNF bei Mäusen verhindert die Degeneration von Photorezeptoren und trägt so zum Erhalt der Sehfunktion bei (Frasson et al. 1999). Intravitreal appliziert kann GDNF retinale Ganglienzellen vor axotomiebedingten Schäden und Zelltod bewahren. Dieser Effekt ist in peripheren Regionen der Netzhaut größer als in zentraleren Arealen. Aus diesen Ergebnissen wird abgeleitet, dass GDNF eine mögliche Therapiefunktion beim glaukombedingten Zelluntergang von retinalen Ganglienzellen haben könnte (Yan et al. 1999). Auch die intravitreale Injektion von GDNF beladenen Mikrosphären wirkt sich im Ratten Glaukom Modell positiv auf den Erhalt von retinalen Ganglienzellen aus (Jiang et al. 2007). Im experimentellen autoimmunen Glaukom Tiermodell im Rahmen dieser Arbeit kommt es, im Gegensatz zu den oben genannten protektiven Effekten von GDNF auf retinale Ganglienzellen und andere Neurone, zu einem signifikanten Verlust an Neuronen bei den mit GDNF immunisierten Tieren ( $p=0,001$ ) im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Es besteht die Möglichkeit, dass durch die erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn- und Blut-Retina-Schranke durch die Verabreichung von Pertussis Toxin andere Stoffe zur Netzhaut gelangen, die den Schaden ausgelöst haben könnten.

In anderen Studien zur Colitis wird nachgewiesen, dass GDNF die erhöhte Durchlässigkeit der Epithelbarriere im Zuge einer Entzündung reduziert (Zhang et al. 2010). Insofern sollte die Immunisierung mit GDNF auch den Effekt des Pertussis Toxins im vorliegenden Versuch abschwächen und so die Möglichkeit für andere Substanzen, die Blut-Hirn- und Blut-Retina-Schranke zu überwinden und Schäden zu verursachen, einschränken.

Eventuell hängt der protektive Effekt aber auch von der Höhe der verabreichten GDNF Dosis ab. Jiang und Mitarbeiter (2007) ermitteln in ihrer Studie bei Ratten einen dosisabhängigen Effekt von GDNF beladenen Mikrosphären auf das Überleben von retinalen Ganglienzellen. Sie stellen nach einer intravitrealen Verabreichung von 25 ng GDNF pro Auge verglichen mit unbehandelten Augen eine fast 30% höhere Überlebensrate von retinalen Ganglienzellen fest. Mit einer Dosis von 5 ng GDNF pro Auge kann die Arbeitsgruppe hingegen nur 5% mehr intakte neuronale Zellen als bei der Kontrollgruppe ermitteln.

In einer weiteren Studie an Ratten, die 5 µg GDNF intravitreal erhalten, werden mehr als 50% der retinalen Ganglienzellen vor dem Zelltod bewahrt. Es kann aber bereits schon mit der Verabreichung von 1 µg GDNF eine signifikante Reduktion des Ganglienzellverlustes nach Axotomie erreicht werden (Yan et al. 1999). In Augen, die mit 1 µg GDNF behandelt werden, ist zehn und 14 Tage nach einer Axotomie des Sehnerven eine Überlebensrate der retinalen Ganglienzelle von 64% bzw. 46% nachweisbar (Koeberle und Ball 1998). Auch bei Mäusen wird eine erhöhte Langzeit-Überlebensrate von retinalen Ganglienzellen nach der Verabreichung von 0,707 ng GDNF pro Auge ermittelt (Ward et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit werden 200 µg GDNF pro Ratte intraperitoneal injiziert, was eventuell vermuten lässt, dass die Höhe der Dosis für den negativen Einfluss von GDNF auf Neurone in der vorliegenden Arbeit verantwortlich sein könnte. Um dies zu bestätigen, sollte untersucht werden, ab welcher Dosis sich GDNF negativ auf das Überleben der retinalen Ganglienzellen auswirkt.

Bei einer Untersuchung der Augen von Glaukompatienten fällt auf, dass diese Augen eine deutlich geringere Anzahl der beiden Glutamatrezeptoren EAAT-1 (excitatory amino acid transporter) und NMDA-R1 (N-methyl-D-aspartate receptor) aufweisen als die Kontrollgruppe. Augen, die mit GDNF behandelt werden, weisen hingegen eine deutlich erhöhte Anzahl an EAAT-1 und NMDA-R1 auf (Naskar et al. 2000). Diese vermehrte Expression von Glutamat Rezeptoren könnte dem Glutamat, welches auch beim normalen, altersbedingten Absterben von Zellen freigesetzt wird, die Möglichkeit bieten schnell viele Rezeptoren intakter Zellen zu besetzen.

Das Glutamat verursacht ohne Beziehung zum IOP die Schädigung gesunder Neurone in der Retina (McIlroy et al. 2004). Dadurch wird wiederum Glutamat freigesetzt, was erneut an die, bedingt durch die GDNF-Behandlung, reichlich vorhandenen Glutamat Rezeptoren andocken könnte. Dies würde eine Kettenreaktion auslösen und zum Absterben vieler neuronaler Zellen in der Retina führen. Auch dieser Mechanismus wäre als Ursache für den Neuronen Verlust in der vorliegenden Arbeit denkbar und sollte in weiteren Studien überprüft werden.

## **5.9 Mögliche Pathomechanismen nach der Immunisierung mit dem calciumbindenden Protein S100**

Bereits 1965 wird S100 als Proteinfraction im Gehirn entdeckt (Moore 1965). Einige Jahre später wird nachgewiesen, dass sich die Proteinfraction vorwiegend aus den sehr ähnlichen Molekülen S100A1 und S100B zusammensetzt (Isobe und Okuyama 1978; Isobe und Okuyama 1981).

Das in dieser Arbeit verwendete S100B ist ein kleines, saures, 10 kDa schweres, calciumbindendes Protein, das in hohen Konzentrationen vorwiegend in den Astrogliazellen des zentralen Nervensystems (Donato 1986) und in den Schwann Zellen des peripheren Nervensystems (Spreca et al. 1989) vorkommt. Die Interaktion von S100B mit Zielproteinen ist calciumabhängig. Die Calciumbindung bewirkt bei S100B eine Konformationsänderung, wodurch dem Protein eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von Calcium zuteil wird (Donato 1991; Zimmer et al. 1995). Allgemein hat S100B zahlreiche wichtige extrazelluläre und intrazelluläre Funktionen wie beispielsweise die Regulation der Zell-Zell Kommunikation, des Zellwachstums und Zellüberlebens, des Energie-Metabolismus, der Enzymaktivität und der intrazellulären Signaltransduktion (Kligman und Hilt 1988; Baudier et al. 1992; Zimmer et al. 1995; Goncalves et al. 2000). Es wird in Erwägung gezogen, dass S100B sowohl extrazellulär als auch intrazellulär eine wichtige Rolle bei der Regulation von Mikroglia-Aktivitäten spielt (Adami et al. 2001). Des Weiteren lassen die erhöhten Werte von S100B während der Gliazellproliferation und der neuronalen Differenzierung (Zuckerman et al. 1970; Cicero et al. 1972) vermuten, dass S100B einen positiven Einfluss auf die Entwicklung des zentralen Nervensystems hat (Selinfreund et al. 1991). Daneben werden bei einer Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen erhöhte Werte von S100B festgestellt, die eine Beteiligung des Proteins bei der Pathogenese dieser Erkrankungen vermuten lassen. So sind in Gehirnen von Patienten mit Down Syndrom oder Alzheimererkrankung erhöhte S100B Werte nachweisbar (Griffin et al. 1989). Auch bei Schizophrenie (Rothermundt et al. 2001), Epilepsie (Griffin et al. 1995), dem erworbenen Immundefektsyndrom AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) (Stanley et al. 1994) und Tumorgeschehen (Ferrari et al. 1987) wird eine Beteiligung von S100B am Krankheitsgeschehen diskutiert. Bei Lewis Ratten kann nach intracerebraler Verabreichung von S100B eine autoimmune Panencephalitis festgestellt werden,

was vermuten lässt, dass S100B eine wichtige Rolle bei derartigen autoimmunen Prozessen spielen könnte (Kojima et al. 1994). Da das Glaukom ebenfalls eine neurodegenerative Erkrankung ist (Nickells 1996; Drance 1997; Gottanka et al. 1997), liegt es nahe, den Effekt von S100B auf retinale Ganglienzellen zu überprüfen. Es kommt in der vorliegenden Arbeit zu einem signifikanten Verlust an retinalen Neuronen gegenüber der Kontrollgruppe ( $p=0,005$ ), bei einer Immunisierungsdosis von 200  $\mu\text{g}$  S100B. Dies deckt sich mit anderen Untersuchungen, da bekannt ist, dass S100B in mikromolaren Konzentrationen die Fähigkeit besitzt, die Apoptose von Neuronen auszulösen und pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 $\beta$ , Tumornekrose Faktor  $\alpha$  und stressinduzierte Enzyme wie Stickoxidsynthase zu aktivieren (Hu et al. 1997; Donato 2001; Koppal et al. 2001). In nanomolaren Konzentrationen hingegen fördert S100B das Neuritenwachstum und das Überleben von Neuronen (Hu et al. 1997; Donato 2001; Koppal et al. 2001). Interessanterweise hat die S100B-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe in der vorliegenden Studie eine signifikant erhöhte Anzahl an Gliazellen ( $p=0,03$ ). Dies lässt sich vermutlich damit begründen, dass S100B die Fähigkeit besitzt über Bindung an den RAGE-Rezeptor (Receptor for advanced glycation end products) der Mikrogliazellen diese zu aktivieren (Donato et al. 2009). Es wird berichtet, dass S100B ab einer Konzentration von mehr als 500 nmol über den RAGE-Rezeptor durch Überproduktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einen toxischen Effekt auf Neurone hat (Huttunen et al. 2000). Die durch S100B bedingte erhöhte Abgabe von Stickoxid (NO) durch Astrozyten führt ebenfalls zur Apoptose von Neuronen (Hu et al. 1997). Daneben könnte eine durch S100B bedingte gestörte Calciumregulation in den Zellen zu einem Zelluntergang führen. S100 B reguliert in den Astrogliazellen die Calcium Level. Einmal durch Calcium aktiviert interagiert S100B mit Intermediärfilamenten wie Vimentin und GFAP (Sorci et al. 1998; Sorci et al. 2000). Diese Interaktion führt zu einer Inhibition der Polymerisation der Filamente, was Veränderungen im Zytoskelett und der Morphologie der Astrogliazellen bewirkt (Bianchi et al. 1994; Garbuglia et al. 1998). Bedingt durch diese Veränderungen der Zellstruktur könnte es zum Untergang neuronaler Zellen kommen.

S100B agiert intrazellulär als Regulator, extrazellulär aber als Signal. Es wird vorwiegend von Astrozyten und beschädigten Zellen ausgeschieden und wirkt dann in einer autokrinen, parakrinen und endokrinen Weise regulatorisch auf eine Vielzahl

von Zellen. Über den RAGE- Rezeptor kann S100B je nach Zelltyp auf dem sich der Rezeptor befindet und je nach Konzentration verschiedenste positive und negative Effekte auslösen (Donato et al. 2009). Aufgrund der vielfältigen Einflussmöglichkeiten von S100B auf neuronale Zellen lassen die eigenen Ergebnisse vermuten, dass S100B über mehrere der oben erwähnten Mechanismen einen Untergang der retinalen Neurone ausgelöst haben könnte.

### **5.10 Mögliche Mechanismen nach der Immunisierung mit Kombinationen von Hitzeschockprotein 27 mit S100 oder GDNF**

Hitzeschockproteine werden erstmals 1962 nachgewiesen (Ritossa 1962). Das HSP 27 gehört mit einem Molekulargewicht von 27 kDa zur Familie der ubiquitären Stressproteine, den sogenannten kleinen Hitzeschockproteinen, die fast in allen Organismen von Prokaryonten bis Säugetieren vorkommen (Arrigo und Mehlen 1994). Verschiedenste biologische, chemische und physikalische Stimuli wie oxidativer Stress, Schwermetalle, Aminosäureanaloga, osmotischer Stress und metabolische Toxine können Hitzeschockproteine induzieren und es kommt zu einer Überproduktion dieser Proteine (Lindquist und Craig 1988). In Zellen exprimierte Hitzeschockproteine arbeiten als Chaperone, welche die Proteinhomöostase durch Förderung der Faltung, Aggregatbildung und Transport von Polypeptiden aufrecht erhalten. Während einer Stressphase erhöhen sich die Werte der intrazellulären Hitzeschockprotein-Level bedingt durch die hohe Konzentration an falsch gefalteten Proteinen sehr schnell. Diese induzierte Hitzeschockprotein Expression wird als zytoprotektiv erachtet und bewahrt die Zellen vor toxinbedingten Schäden und Zelltod (Samali und Orrenius 1998). Neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) gehen mit molekularen Mechanismen, assoziiert mit falscher Proteinfaltung einher. Hitzeschockproteine können diese falsch gefalteten Proteine wieder korrigieren und sind daher sehr potente Supressoren der Neurodegeneration in Tiermodellen zu den genannten Erkrankungen (Sherman und Goldberg 2001; Muchowski und Wacker 2005). HSP 27 verhindert die Abgabe von Cytochrom C durch die Mitochondrien (Paul et al. 2002) und bindet dieses, um eine Interaktion mit dem apoptoseaktivierenden Faktor-1 (Apaf-1) zu verhindern (Garrido et al. 1999; Bruey et al. 2000). Seit bekannt ist, dass die Freisetzung von Cytochrom C und die Komplex



Formation mit Apaf-1 notwendig sind, um die Caspase-9 und damit eine Apoptose zu aktivieren, wird klar, dass HSP 27 diese Aktivierung und damit den Apoptosevorgang verhindert. Daneben ist nachgewiesen, dass HSP 27 mit dem Daxx Protein, einem Mediator der Fas-induzierten Apoptose, interagiert. Dies legt nahe, dass HSP 27 auch einen Einfluss auf den Caspase-8 Apoptoseweg hat (Charette et al. 2000). Da Caspase-8 und Caspase-9 zu einer Aktivierung von Caspase-3 führen, wird deutlich, dass auch diese Caspase durch eine Überexpression von HSP 27 beeinflusst wird (Benn et al. 2002).

Eine Erhöhung des intraokularen Druckes führt bei retinalen Ganglienzellen zur erhöhten Expression von HSP 27 und dessen phosphorylierten Form (pHSP 27), welche unter normalem Augeninnendruck kein phosphoryliertes HSP 27 exprimieren. Auch pHSP 27 tritt mit dem Adapterprotein Daxx in Interaktion und kann so die Apoptose verhindern (Huang et al. 2007).

In einer Studie von Wax und Mitarbeitern führt eine Immunisierung von Ratten mit HSP 27 zur Degeneration von retinalen Ganglienzellen und Axonverlust, was die Vermutung aufkommen lässt, dass HSP 27 als antigenetischer Stimulus zur Aktivierung einer Immunantwort während der Neurodegeneration beim Glaukom führen könnte.

Es gibt umstrittene Hinweise, die zeigen, dass Autoantikörper in lebende Zellen penetrieren und dort mit ihren intrazellulären Zielantigenen die Zellfunktion verändern können, was zum Zelltod durch Apoptose in einigen autoimmunen Erkrankungen führt (Alarcon-Segovia und Llorente 1983; Reichlin 1995; Alarcon-Segovia et al. 1996; Reichlin 1998). Im Serum von Glaukompatienten wird bereits ein erhöhter Autoantikörpertiter gegen HSP 27 festgestellt (Tezel et al. 1998), wobei davon ausgegangen wird, dass diese Erhöhung von pathogener Bedeutung ist (Tezel und Wax 2000b). Exogen verabreichte Antikörper gegen HSP 27, in der gleichen Konzentration wie sie bei Glaukompatienten vorkommen, fördern in Zellkulturen den retinalen Ganglienzelltod durch Apoptose (Tezel et al. 1998). Dabei dringen die Antikörper durch einen Endozytose-Mechanismus in die neuronalen Zellen der Retina ein und bewirken durch DNA Fragmentation und Aktivierung von Caspasen den apoptotischen Zelltod. Nach Eindringen von HSP 27 Antikörpern in die Zelle finden diese sich meist Co-lokalisiert zum Aktin-Zytoskelett, was dosisabhängig zu einer Depolimerisation und Proteolyse von Aktin führt. Dies lässt vermuten, dass der durch erhöhte Titer von HSP 27 Antikörpern ausgelöste Zusammenbruch der Aktin-

Mikrofilamente das Schlüsselereignis für den Apoptosevorgang in retinalen Ganglienzellen ist (Tezel und Wax 2000b). Das Binden der Antikörper an intrazelluläres HSP 27 könnte dessen protektive Funktionen durch Beeinflussung der strukturellen Organisation, Oligomerisation oder Phosphorylierung von HSP 27, welche ausschlaggebend für diese Funktion sind, abschwächen oder sogar inaktivieren (Lavoie et al. 1995; Mehlen et al. 1997). Die Vermutung, dass HSP 27 zur Apoptose von Neuronen führen kann, deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da es in den Gruppen, die mit Kombinationen aus GDNF und HSP 27, sowie S100 und HSP 27 immunisiert werden zu einer Erhöhung des Neuronenverlustes in der Retina gegenüber der Gruppen, die nur mit GDNF und S100 immunisiert werden, kommt. Hätte HSP 27 eine neuroprotektive Funktion, müsste sich der Verlust verringern bzw. dürfte zumindest nicht größer werden. Auch in zwei vorausgegangenen Studien kann, ebenfalls nach intraperitonealer Immunisierung von Ratten, mit der gleichen Dosis HSP 27 ein signifikanter Ganglienzellverlust verzeichnet werden (Wax et al. 2008; Joachim et al. 2009). Dabei nehmen Wax und Mitarbeiter (2008) unter anderem an, dass die Erhöhung von HSP 27 Konzentrationen als Warnsignal das Auffinden und Beseitigen von beschädigten retinalen Ganglienzellen durch das Immunsystem erleichtert. Dadurch könnte eine unkontrollierte Immunaktivität wie eine T-Zell medierte Zytotoxizität gegenüber RGZs und ihren Axonen zum Fortschreiten der Neurodegeneration führen (Wax et al. 2008). Joachim und Mitarbeiter (2009) können eine Erhöhung von Antikörpern gegen HSP 27 als Konsequenz der Immunisierung mit diesem Hitzeschockprotein nachweisen. Letztendlich bleibt festzuhalten, dass HSP 27 bzw. dessen Antikörper bei einer Glaukomerkrankung zu einer Schädigung der retinalen Ganglienzellen führen und sich nicht positiv auf deren Überleben auswirken. Der erhöhte Neuronenverlust bei den Tieren, die eine Kombination aus Antigenen erhalten haben gegenüber denen, die nur eines der Antigene aus der Kombination erhalten haben, könnte damit begründet werden, dass die verschiedenen Antigene über unterschiedliche Angriffspunkte und Mechanismen zum Zelltod führen und so die Überlebenschance der Neurone verringert wird. Da jedoch nur ein geringgradig größerer Verlust an Neuronen bei den Gruppen GDNF+HSP 27 und S100+HSP 27 verzeichnet werden kann, ist nicht davon auszugehen, dass sich die pathologischen Effekte der Antigene in der Kombination komplett addieren. Dies könnte auch eventuell damit zusammenhängen, dass die Wirkung eines Antigens erst später einsetzt als die des

anderen Antigenen aus der Kombination. Daher sollte in Studien mit längeren Laufzeiten überprüft werden, ob es zu einem deutlichen Anstieg des Neuronenverlustes kommt.

### **5.11 Vergleich des experimentellen autoimmunen Glaukom Modell mit dem Glaukom**

Die Pathogenese des Glaukoms hat einen langen, teilweise über Jahre dauernden, schleichenden Verlauf, bei dem die Schädigung der retinalen Ganglienzellen nur sehr langsam voranschreitet. Im Vergleich dazu wird die immunologische Reaktion in der Studie künstlich durch die Verabreichung von Antigenen in nur sehr kurzer Zeit hervorgerufen. Das ebenfalls injizierte Freund's Adjuvant führt zu einer Verstärkung der Immunreaktion. Zusätzlich greift das in der Immunisierungsdosis enthaltene Pertussis Toxin die physiologischen Barrieren der Blut-Retina- und Blut-Hirnschranke an, was dem applizierten Antigen und dessen Antikörpern in großer Menge die Möglichkeit bietet, in eigentlich immunprivilegierte Areale des Körpers vorzudringen. Im Gegensatz dazu kommt es beim Glaukom nur langsam und durch wiederholte Ischämien, lokale Entzündungen und oxidativen Stressoren nach Reperfusion zu einer Schädigung der Barrieren und der okularen Strukturen, welche sich durch das wiederkehrende Auftreten selbst verstärken (Gugleta 2009). Dies bietet den Antikörpern einen langen Zeitraum um sich zu entwickeln, zu vermehren, die entsprechenden Zielorte anzugreifen und Schäden zu verursachen.

Da es sowohl beim Glaukom, als auch beim experimentellen autoimmunen Glaukom Modell zum nachweislichen Verlust an retinalen Ganglienzellen kommt, scheint das Modell geeignet zu sein, um die Pathogenese des Glaukoms besser zu untersuchen. Um das in vivo Modell allerdings noch besser an den Verlauf einer chronischen Glaukomerkrankung anzupassen, sollten die Studienlaufzeiten verlängert werden.

## 6 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Es konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass es vier Wochen nach der Immunisierung mit verschiedenen aufgereinigten Proteinen, wie Tubulin ( $p=0,02$ ), GFAP ( $p=0,04$ ), GDNF ( $p=0,04$ ), S100 ( $p=0,005$ ) und mit Kombinationen von Hitzeschockprotein 27 mit S100 ( $p=0,0005$ ) bzw. GDNF ( $p=0,0004$ ) zu einem signifikanten Neuronenverlust in der Retina kommt. Der Verlust der Zellen stand in keinem Zusammenhang mit der Höhe des IOP. Bei der  $\beta$ -Aktin-Gruppe kam es auch zu einem Verlust an Neuronen in der Retina, jedoch war dieser nicht signifikant ( $p=0,08$ ). Da vor allem bei der GFAP- und der  $\beta$ -Aktin-Gruppe der Verdacht nahe liegt, dass aufgrund der erhöhten Anzahl der Gliazellen noch eine immunologische Reaktion im Gange ist, sollte in folgenden Studien die Laufzeit verlängert werden, um die Entwicklung der Zellzahlen zu beobachten und Schlussfolgerungen hinsichtlich der Beteiligung dieser Antigene bzw. deren Antikörper an der Pathogenese des Glaukoms zu ziehen. Eine längere Laufzeit der Studie würde auch dem chronischen Verlauf einer Glaukomerkrankung näher kommen.

Da das Vorkommen von Autoantikörpern im Kammerwasser (Joachim et al. 2007a; Joachim et al. 2007c) und Serum (Joachim et al. 2003; Grus et al. 2004; Joachim et al. 2005; Joachim et al. 2008; Joachim et al. 2009) gegen verschiedene okuläre Strukturen bereits bewiesen ist, sollten die entnommenen Serum- und Kammerwasserproben hinsichtlich des Antikörperprofils und Antikörpertiters untersucht werden. Die Serumproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Dies bietet die Möglichkeit anhand der Werte eine Verlaufskurve zu ermitteln, welche eventuell Rückschlüsse auf das Vorkommen und die Konzentration der Antikörper zu den verschiedenen Studienzeitpunkten zulässt. Bei den Kammerwasserproben ist nur eine Bestimmung der Werte zum Endzeitpunkt möglich. Jedoch könnten auch dadurch noch einmal Unterschiede zwischen den verschiedenen Immunisierungsgruppen und zwischen den Werten aus Kammerwasser und Blutserum festgestellt werden. Mit einem Vergleich der Messwerte aus Kammerwasser und Blutserum, wie er beispielsweise bereits von Boehm und Mitarbeiter (2011) für manche okuläre Antikörper durchgeführt wurde, (Boehm et al. 2011), könnte überprüft werden, inwieweit sich die Immunantwort nach der systemischen Immunisierung ins Auge und damit über die Blut-Hirn- und Blut-Kammerwasser-Schranke fortgesetzt hat. Das experimentelle autoimmune Glaukom

Modell eignet sich für diese Untersuchungen, da in früheren Studien mit diesem Modell schon komplexe Protein-Profile im Serum nachgewiesen werden konnten (Joachim et al. 2009).

Des Weiteren könnten durch immunhistologische Untersuchungen der Retinae und der Sehnerven beispielsweise Immunglobulinablagerungen nachgewiesen werden. Solche Ablagerungen wurden bereits post mortem bei Patienten mit Normaldruckglaukom in Form von Immunglobulin G und A festgestellt (Wax et al. 1998a).

In verschiedenen Studien wurde schon bewiesen, dass auch T-Zellen, welche durch verschiedene nicht-neuronale Antigene aktiviert werden, in neurodegenerativen Erkrankungen mit autoimmuner Komponente eine Rolle spielen können (Linnington et al. 1988; Andersen et al. 1993). Zudem wiesen T-Zellen, die aus Studientieren mit erhöhtem intraokularem Druck isoliert wurden, eine Verstärkung der Immunantwort auf retinale Proteine auf (Tezel 2009). Üblicherweise ist ein Überwinden der Blut-Hirn-Schranke von Leukozyten nicht ohne Weiteres möglich und wird stark reguliert. Nur eine geringe Menge von aktivierten T-Lymphozyten, welche durch exklusive Adhäsionsmoleküle und Oberflächenenzyme ausgezeichnet sind, kann die Barriere überwinden und in das zentrale Nervensystem vordringen (Xu et al. 2004; Crane et al. 2006). In einer Studie vermuteten Wax und Kollegen, dass durch HSP 27 und HSP 60 aktivierte T-Zellen die Blut-Hirn- bzw. die Blut-Retina-Schranke überwinden können und sich destruktiv auf das retinale Parenchym auswirken. So wäre das Verhindern der Migration von T-Zellen in die Retina eine wichtige neuroprotektive Strategie (Wax et al. 2008). Aus diesem Grund sollte in der Retina die Verteilung von T-Zellen untersucht werden, um herauszufinden, ob die Beeinflussung der T-Zell Migration ein möglicher neuer Therapieansatz bei einer Glaukomerkrankung wäre.

Die Anzahl der Tiere pro Immunisierungsgruppe ist in der vorliegenden Studie mit vier bis acht Tieren sehr gering. Zur Absicherung der hier erlangten Erkenntnisse sollten weitere Studien mit mehr Tieren folgen. Durch die histologische bzw. immunhistologische Aufarbeitung und Untersuchung der entnommenen Sehnerven, Gehirne und des Rückenmarks können die Auswirkungen der Immunisierungen auf diese Strukturen genauer erforscht werden, was eventuell Rückschlüsse auf die Permeabilität der Bluthirnschranke und vielleicht entstandene Ablagerungen in bestimmten Regionen erlaubt.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Das Glaukom stellt weltweit die zweithäufigste Ursache für eine Erblindung dar. Es handelt sich dabei um eine Vielzahl ätiologisch unterschiedlicher Krankheitsbilder, von denen meist noch sehr wenig zur Pathogenese bekannt ist. In den letzten Jahren wurde häufig über die Beteiligung einer autoimmunen Komponente am Glaukom diskutiert, da es bei vielen Patienten in der Humanmedizin ohne erhöhten intraokularen Druck (IOP) zu Ganglienzellverlusten und Gesichtsfeldausfällen kam. Auch beim Glaukom des Hundes wird vermutet, dass IOP unabhängige Faktoren eine wichtige Rolle spielen, da es trotz Absenkung des IOP bei einer Glaukomerkrankung weiterhin zur Degeneration des Sehnervenkopfes kam.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen verschiedener Antigene und deren Kombination auf den Untergang retinaler Ganglienzellen zu untersuchen. Hierzu wurde das experimentelle autoimmune Glaukom Tiermodell durchgeführt, welches auf der Immunisierung von Lewis Ratten mit potentiellen Antigenen in Kombination mit Pertussis Toxin und inkompletten Freund`s Adjuvant basiert. Als Antigene dienten  $\beta$ -Aktin (n=4), saures Gliafaserprotein (GFAP) (n=4), Tubulin (n=4), Gliazell-abgeleiteter neutropher Faktor (GDNF) (n=8), das calciumbindende Protein S100 (n=8) sowie die Kombination von Hitzeschockprotein 27 mit GDNF bzw. S100 (jeweils n=6). Die Kontrollgruppe (n=7) erhielt anstelle des Antigens physiologische Kochsalzlösung. Die IOP Messungen und Funduskopien fanden eine Woche vor der Immunisierung, sowie zwei und vier Wochen danach statt. Am Ende der Studie erfolgte die Flatmountpräparation der Retinae. Diese wurden mit Kresylviolett angefärbt, sowie vor und nach der Färbung zur Ermittlung der trocknungsbedingten Flächenschrumpfung vermessen. Im Anschluss daran wurden unter einem Mikroskop vier zentrale und vier periphere Areale der Flatmounts fotografiert. Die Zellen dieser Areale wurden in der Image J Software manuell ausgezählt, wobei in parvo- und magnozelluläre Neurone, Gliazellen und Endothelzellen differenziert wurde.

Die Messungen des Augeninnendruckes ergaben, verglichen mit der Kontrollgruppe, abhängig vom Messzeitpunkt bei der GFAP- ( $p=0,04$ ) und der Tubulin-Gruppe ( $p=0,003$ ) eine signifikante IOP Erhöhung, während bei der S100- ( $p=0,02$ ) und der GDNF+HSP27-Gruppe ( $0,005$ ) ein signifikant niedrigerer IOP gemessen wurde. Alle IOP Werte lagen trotz signifikanter Unterschiede im physiologischen Bereich.

Aufgrund der geringen Anzahl von Tieren pro Immunisierungsgruppe lassen sich aus den signifikant abweichenden IOP Messwerten nur Tendenzen ableiten, die durch weitere Studien abgesichert werden müssen.

Die Untersuchung der Fundi ergab bei keinem Tier einen Hinweis auf pathologische Veränderungen. Die mittlere Schrumpfung der Faltnounts betrug 12,21%, wobei nur bei der GDNF-Gruppe ( $p=0,04$ ) ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden konnte. Bei der Auswertung der Neurone wiesen bis auf die  $\beta$ -Aktin-Gruppe ( $p=0,08$ ), alle Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe einen signifikanten Untergang neuronaler Zellen in der Retina auf. Hinsichtlich der parvozellulären Neurone zeigte sich bei allen Gruppen, angefangen bei  $\beta$ -Aktin ( $p=0,04$ ) bis hin zu S100+HSP 27 ( $p=0,000001$ ), ein signifikanter Verlust von Zellen verglichen mit der Kontrolle. Bei den magnozellularen Neuronen konnte zwar bei allen Gruppen eine Erhöhung der Zellzahl gegenüber der Kontrollgruppe ermittelt werden, jedoch war diese nur bei den Gruppen GDNF ( $p=0,01$ ), S100 ( $p=0,0001$ ), GDNF+HSP 27 ( $p=0,01$ ) und S100+HSP27 ( $p=0,00002$ ) signifikant. In der Kategorie der Gliazellen wiesen die Gruppen  $\beta$ -Aktin ( $p=0,000007$ ), GFAP ( $p=0,005$ ) und S100 ( $p=0,03$ ) eine signifikante Erhöhung im Vergleich mit der Kontrolle auf. Hinsichtlich der Endothelzellen zeigten sich keine signifikanten Auffälligkeiten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass der Untergang retinaler Ganglienzellen im experimentellen autoimmunen Glaukom Modell nicht im Zusammenhang mit der Höhe des IOP steht. Die Funduskopie scheint nicht sensibel genug zu sein, um derartige Schäden erkennen zu können.

Die vermuteten Mechanismen, über die die Antigene einen Zelluntergang bewirken, sind vielfältig. Bei GFAP könnte eine vermehrte Produktion von Stickoxid oder eine Schädigung der Bluthirnschranke und der Zellmembran für den Zellverlust verantwortlich sein, während sich bei Tubulin vermutlich ein veränderter Signal- bzw. Vesikeltransport negativ auswirken könnte. Auch bei  $\beta$ -Aktin könnten fehlgeleitete Signale und Neurotransmitter oder eine geschädigte Plasmamembran den Zelltod auslösen. Bei GDNF und S100 spielt die Höhe der verabreichten Dosis wahrscheinlich eine entscheidende Rolle beim Untergang der Neurone. Jedoch wird auch das Einwirken bestimmter Rezeptoren, wie dem RAGE-Rezeptor bei S100 und zweier Glutamaterezeptoren bei GDNF, in Betracht gezogen. S100 könnte ebenso über eine Erhöhung der Produktion von Stickoxid oder Beeinträchtigung des Zytoskeletts negative Auswirkungen auf Neurone haben. HSP 27 nimmt, wie bei

GFAP und S100 auch vermutet, Einfluss auf Bestandteile des Zytoskeletts und kann so die Apoptose auslösen. Daneben könnte HSP 27 auch eine überschießende Immunantwort auslösen, bei der eine T-Zell medierte Toxizität zum Tod der Zellen führt.

In folgenden Arbeiten sollte der Mechanismus, der bei der Immunisierung mit den verwendeten Antigenen zum Ganglienzellverlust geführt hat, intensiver untersucht werden. Des Weiteren wäre von Interesse, ab welchen Konzentrationen und Studienlaufzeiten sich manche Antigene positiv oder negativ auf das Überleben der Zellen auswirken und wie dies durch Mehrfach-Kombinationen der Antigene beeinflusst wird.



## 8 SUMMARY

Glaucoma is the second leading cause of blindness worldwide. There is a variety of aetiological different disease patterns, of which very little is known about the pathogenesis. In recent years, the participation of an autoimmune component in glaucoma has been discussed frequently, since many patients in human medicine without increased intraocular pressure (IOP) experience ganglion cell loss and visual field defects. Even in glaucoma of dogs it is suspected that IOP-independent factors play an important role, because despite lowering of IOP in these glaucomatous dogs degeneration of the optic nerve head continues.

The aim of this study was to investigate the effects of different antigens and their combination on the loss of retinal ganglion cells. For this, the experimental autoimmune glaucoma animal model based on the immunization of Lewis rats with potential antigens in combination with pertussis toxin and incomplete Freund's adjuvant was conducted.  $\beta$ -Actin (n=4), glial fibrillary acidic protein (GFAP) (n=4), tubulin (n=4), glial-derived neutrophils factor (GDNF) (n=8), the calcium-binding protein S100 (n=8) and the combination of heat shock protein 27 (HSP 27) with GDNF or S100 (n=6) were used as antigens. The control-group (n=7) received physiological saline instead of an antigen. One week before the immunization took place and two and four weeks after this the IOP measurements and fundus-examinations were performed. At the end of the study flatmounts of all retinae were prepared. These were stained with cresyl violet and measured before and after staining to determine the surface shrinkage due to the drying procedure. Subsequently four central and four peripheral areas of the flatmounts were photographed under a microscope. The cells of these areas were counted manually by using Image J software. The following cell types were differentiated: parvo- and magnocellular neurons, glial cells and endothelial cells.

The IOP measurements were compared with the control group and depending on the point in time at which IOP was measured the GFAP- ( $p=0.04$ ) and the tubulin-group ( $p=0.003$ ) showed a significant IOP increase, while the S100- ( $p=0.02$ ) and the GDNF+HSP 27-group ( $p=0.005$ ) showed a significantly lower IOP. In spite of significant differences, all IOP values were in the physiological range. Due to the small number of animals per immunization group, only tendencies of the significant different IOP measurements can be derived and have to be verified by other studies. The examination of the fundi revealed no evidence of pathological changes in any

animal. The average shrinking of flatmounts was 12.21%, only in the GDNF-group ( $p=0.04$ ) a significant difference from control could be found. In the evaluation of the neurons all groups, respectively  $\beta$ -actin ( $p=0.08$ ), showed a significant decline of neuronal cells in the retina compared with the control-group. A significant loss of parvocellular neurons in all groups compared to the control-group, starting with  $\beta$ -actin ( $p=0.04$ ) to S100+HSP 27 ( $p=0.000001$ ) was observed. Regarding the number of magnocellular neurons in all groups an increase in the number of cells was determined with respect to the control group, but only in the GDNF- ( $p=0.01$ ), S100- ( $p=0.0001$ ), GDNF+HSP 27- ( $p=0.01$ ) and S100+HSP 27-group ( $p=0.00002$ ) this increase was significant. In the category of glial cells, the groups  $\beta$ -actin ( $p=0.000007$ ), GFAP ( $p=0.005$ ) and S100 ( $p=0.03$ ) showed a significant increase compared with the control. Regarding the endothelial cells no significant differences were determined.

The results of this study suggest that the decline of retinal ganglion cells in experimental autoimmune glaucoma model is not related to the height of the IOP. The funduscopy seems to be not sensitive enough to detect such damage.

The potential mechanisms by which antigens cause cell death are manifold. In GFAP-group increased production of nitric oxide or damage to the blood brain barrier and the cell membrane could be responsible for cell loss, while in tubulin-group presumably an altered signaling and vesicle trafficking could have negative effects. Also in the  $\beta$ -actin-group misrouted signals and neurotransmitter or a damaged plasma membran could trigger cell death. In GDNF- and S100-group the amount of the administered dose could probably play a critical role in the demise of neurons. However, even the effect of certain receptors, such as the RAGE receptor in S100- and two glutamate receptors in GDNF-group will be considered. S100 could also have a negative impact on neurons by increase of nitric oxide production or the impairment of the cytoskeleton. HSP 27 takes effect on components of the cytoskeleton, suspected as well as for GFAP and S100, which can trigger apoptosis. HSP 27 could also trigger an excessive immune response in which a T cell-mediated toxicity leads to cell death.

In following studies, the details of the mechanism that has resulted in ganglion cell loss after the immunization with the used antigens should be further investigated. In addition, it would be of interest, from which concentration and study periods, some

## Summary

---

antigens have a positive or negative effect on the survival of cells and how it is influenced by multiple combinations of antigens.

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

ADACHI M, TAKAHASHI K, NISHIKAWA M, MIKI H, UYAMA M (1996):  
High intraocular pressure-induced ischemia and reperfusion injury in the optic nerve and retina in rats, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234(7): 445-451.

ADAMI C, SORCI G, BLASI E, AGNELETTI AL, BISTONI F, et al. (2001):  
S100B expression in and effects on microglia, *Glia* 33(2): 131-142.

AHMED FA, CHAUDHARY P, SHARMA SC (2001):  
Effects of increased intraocular pressure on rat retinal ganglion cells, *Int J Dev Neurosci* 19(2): 209-218.

AHN M, JIN JK, MOON C, MATSUMOTO Y, KOH CS, et al. (2010):  
Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed by inflammatory cells in the sciatic nerves of Lewis rats with experimental autoimmune neuritis, *J Peripher Nerv Syst* 15(2): 104-112.

ALARCON-SEGOVIA D, LLORENTE L (1983):  
Antibody penetration into living cells. IV. Different effects of anti-native DNA and anti-ribonucleoprotein IgG on the cell cycle of activated T gamma cells, *Clin Exp Immunol* 52(2): 365-371.

ALARCON-SEGOVIA D, RUIZ-ARGUELLES A, LLORENTE L (1996):  
Broken dogma: penetration of autoantibodies into living cells, *Immunol Today* 17(4): 163-164.

ALYAHYA K, CHEN CT, MANGAN BG, GIONFRIDDO JR, LEGARE ME, et al. (2007):  
Microvessel loss, vascular damage and glutamate redistribution in the retinas of dogs with primary glaucoma, *Vet Ophthalmol* 10 Suppl 1: 70-77.

AMIEL SA (1976):  
The effects of Bordetella pertussis vaccine on cerebral vascular permeability, *Br J Exp Pathol* 57(6): 653-662.

ANDERSEN O, LYGNER PE, BERGSTROM T, ANDERSSON M, VAHLNE A (1993):  
Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study, *J Neurol* 240(7): 417-422.

ANSORGE S (2007):  
"Immunsystem" in: *Biochemie und Pathobiochemie* 8. Auflage, Löffler G., Petrides P.E., Berlin: Springer Verlag: S. 1103-1140

ARRIGO AP, MEHLEN P (1994):

"Expression and function of the low molecular weight heat shock proteins" in: The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones, Morimoto R., Tissieres A., New York: Cold Spring Harbor Laboratory press: pp. 335-373.

ASAI T, KATSUMORI N, MIZOKAMI K (1987):

[Retinal ganglion cell damage in human glaucoma. 2. Studies on damage pattern], Nippon Ganka Gakkai Zasshi 91(12): 1204-1213.

ASCOUGH KR (2004):

Endocytosis: Actin in the driving seat, Curr Biol 14(3): R124-126.

AUGUSTIN AJ (2001):

Augenheilkunde, 2. komplett überarbeitete und erweiterte Auflage, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag: pp. 1167-1170.

AUGUSTIN AJ, LOEFFLER KU, SEKUNDO W, GRUS FH, LUTZ J (1999):

Effects of systemically applied allopurinol and prednisolone on experimental autoimmune uveitis, Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 237(6): 508-512.

BAKALASH S, KIPNIS J, YOLES E, SCHWARTZ M (2002):

Resistance of retinal ganglion cells to an increase in intraocular pressure is immune-dependent, Invest Ophthalmol Vis Sci 43(8): 2648-2653.

BARNETT KC (1970):

Glaucoma in the dog, J Small Anim Pract 11(2): 113-128.

BATCHELOR PE, LIBERATORE GT, WONG JY, PORRITT MJ, FRERICHS F, et al. (1999):

Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor, J Neurosci 19(5): 1708-1716.

BAUDIER J, DELPHIN C, GRUNWALD D, KHOCHBIN S, LAWRENCE JJ (1992):

Characterization of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S100b-binding protein, Proc Natl Acad Sci U S A 89(23): 11627-11631.

BEDFORD PG (1980a):

The aetiology of canine glaucoma, Vet Rec 107(4): 76-82.

BENN SC, PERRELET D, KATO AC, SCHOLZ J, DECOSTERD I, et al. (2002):

Hsp27 upregulation and phosphorylation is required for injured sensory and motor neuron survival, Neuron 36(1): 45-56.

BENNINGHOFF A, DRENCKHAHN D (2004):

Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie Bd.2, München: Elsevier.

BENOZZI J, NAHUM LP, CAMPANELLI JL, ROSENSTEIN RE (2002):  
Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(7): 2196-2200.

BERSON DM, ISAYAMA T, PU M (1999):  
The Eta ganglion cell type of cat retina, *J Comp Neurol* 408(2): 204-219.

BERSON DM, PU M, FAMIGLIETTI EV (1998):  
The zeta cell: a new ganglion cell type in cat retina, *J Comp Neurol* 399(2): 269-288.

BIANCHI R, VERZINI M, GARBUGLIA M, GIAMBANCO I, DONATO R (1994):  
Mechanism of S100 protein-dependent inhibition of glial fibrillary acidic protein (GFAP) polymerization, *Biochim Biophys Acta* 1223(3): 354-360.

BIGNAMI A, ENG LF, DAHL D, UYEDA CT (1972):  
Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence, *Brain Res* 43(2): 429-435.

BOEHM N, WOLTERS D, THIEL U, LOSSBRAND U, WIEGEL N, et al. (2011):  
New insights into autoantibody profiles from immune privileged sites in the eye: A glaucoma study, *Brain Behav Immun*.

BOOTHE WA, LEE DA, PANEK WC, PETTIT TH (1988):  
The Tono-Pen. A manometric and clinical study, *Arch Ophthalmol* 106(9): 1214-1217.

BOYCOTT BB, WÄSSLE H (1974):  
The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina, *J Physiol* 240(2): 397-419.

BRAKEBUSCH C, FASSLER R (2003):  
The integrin-actin connection, an eternal love affair, *EMBO J* 22(10): 2324-2333.

BRENTON ME, DRUM BA (1989):  
"Functional testing in glaucoma: Visual psychophysics and electrophysiology" in: *The glaucomas*, Ritch R., Shields M.B., Krupin T., St. Louis: CV Mosby.

BRINKLEY BR, BARHAM SS, BARRANCO SC, FULLER GM (1974):  
Rotenone inhibition of spindle microtubule assembly in mammalian cells, *Exp Cell Res* 85(1): 41-46.

BROOKS DE, GARCIA GA, DREYER EB, ZURAKOWSKI D, FRANCO-BOURLAND RE (1997):  
Vitreous body glutamate concentration in dogs with glaucoma, *Am J Vet Res* 58(8): 864-867.

BROOKS DE, KOMAROMY AM, KÄLLBERG ME (1999):  
Comperative optic nerve physiology: implications for glaucoma, neuroprotection and neuroregeneration, *Veterinary Ophthalmology* 2(1): 13-25.

BRUBAKER RF (1996):  
Delayed functional loss in glaucoma. LII Edward Jackson Memorial Lecture, *Am J Ophthalmol* 121(5): 473-483.

BRUEY JM, DUCASSE C, BONNIAUD P, RAVAGNAN L, SUSIN SA, et al. (2000):  
Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c, *Nat Cell Biol* 2(9): 645-652.

BRYAN J, WILSON L (1971):  
Are cytoplasmic microtubules heteropolymers?, *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(8): 1762-1766.

CAJÁL SR (1893):  
La rétine des vertébrés, *La cellule* 9: 119-257.

CAPPELLETTI G, PEDROTTI B, MAGGIONI MG, MACI R (2001):  
Microtubule assembly is directly affected by MPP(+)*in vitro*, *Cell Biol Int* 25(10): 981-984.

CARTWRIGHT MJ, GRAJEWSKI AL, FRIEDBERG ML, ANDERSON DR, RICHARDS DW (1992):  
Immune-related disease and normal-tension glaucoma. A case-control study, *Arch Ophthalmol* 110(4): 500-502.

CAVISTON JP, HOLZBAUR EL (2009):  
Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking, *Trends Cell Biol* 19(4): 147-155.

CHARETTE SJ, LAVOIE JN, LAMBERT H, LANDRY J (2000):  
Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27, *Mol Cell Biol* 20(20): 7602-7612.

CHARLES RIVER (2008):  
Lewis rats, Charles River Laboratories  
<http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/Lewis%20Rat.pdf> letzter Zugriff 23.03.2011.

CHAUHAN BC, LEVATTE TL, JOLLIMORE CA, YU PK, REITSAMER HA, et al. (2004):  
Model of endothelin-1-induced chronic optic neuropathy in rat, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(1): 144-152.

CHEN J, LEE L (2007):

Clinical applications and new developments of optical coherence tomography: an evidence-based review, *Clin Exp Optom* 90(5): 317-335.

CHEN J, ZHOU Y, MUELLER-STEINER S, CHEN LF, KWON H, et al. (2005):  
SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling, *J Biol Chem* 280(48): 40364-40374.

CHINTALA SK, ZHANG X, AUSTIN JS, FINI ME (2002):

Deficiency in matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) protects against retinal ganglion cell death after optic nerve ligation, *J Biol Chem* 277(49): 47461-47468.

CICERO TJ, FERRENDELLI JA, SUNTZEFF V, MOORE BW (1972):

Regional changes in CNS levels of the S-100 and 14-3-2 proteins during development and aging of the mouse, *J Neurochem* 19(9): 2119-2125.

CLERC B, KRÄHENMANN A (1990):

Augenheilkunde Hund und Katze, Berlin und Hamburg, Verlag Paul Parey.

CLEVELAND DW (1989):

Autoregulated control of tubulin synthesis in animal cells, *Curr Opin Cell Biol* 1(1): 10-14.

COURTENAY JS, DALLMAN MJ, DAYAN AD, MARTIN A, MOSEDALE B (1980):

Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice, *Nature* 283(5748): 666-668.

CRANE IJ, XU H, WALLACE C, MANIVANNAN A, MACK M, et al. (2006):

Involvement of CCR5 in the passage of Th1-type cells across the blood-retina barrier in experimental autoimmune uveitis, *J Leukoc Biol* 79(3): 435-443.

CUNY CS, JOACHIM SC, GRAMLICH OW, GOTTSCHLING PF, PFEIFFER N, et al. (2010):

Repeated intraocular pressure measurement in awake Lewis rats does not bias retinal ganglion cell survival, *Curr Eye Res* 35(11): 1034-1039.

DAUGELIENE L, NIWA M, HARA A, MATSUNO H, YAMAMOTO T, et al. (2000):

Transient ischemic injury in the rat retina caused by thrombotic occlusion-thrombolytic reperfusion, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(9): 2743-2747.

DGFAE (2011):

Deutsche Gesellschaft für Autoimmun-Erkrankungen e.V.,  
<http://www.autoimmun.org/erkrankungen.php> letzter Zugriff 27.01.2011.

DIETRICH U (2005):

Feline glaucomas, *Clin Tech Small Anim Pract* 20(2): 108-116.



- DOGIEL AS (1891):  
Über die nervösen Elemente in der Retina des Menschen, Archiv für Mikroskopie und anatomische Entwicklungsmechanik 38: 317-344.
- DOMENICI L, GRAVINA A, BERARDI N, MAFFEI L (1991):  
Different effects of intracranial and intraorbital section of the optic nerve on the functional responses of rat retinal ganglion cells, Exp Brain Res 86(3): 579-584.
- DOMPIERRE JP, GODIN JD, CHARRIN BC, CORDELIERES FP, KING SJ, et al. (2007):  
Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation, J Neurosci 27(13): 3571-3583.
- DONATO R (1986):  
S-100 proteins, Cell Calcium 7(3): 123-145.
- DONATO R (1991):  
Perspectives in S-100 protein biology. Review article, Cell Calcium 12(10): 713-726.
- DONATO R (2001):  
S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles, Int J Biochem Cell Biol 33(7): 637-668.
- DONATO R, SORCI G, RIUZZI F, ARCURI C, BIANCHI R, et al. (2009):  
S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal, Biochim Biophys Acta 1793(6): 1008-1022.
- DRANCE SM (1997):  
Glaucoma: a look beyond intraocular pressure, Am J Ophthalmol 123(6): 817-819.
- DUGINA V, ZWAENEPOEL I, GABBIANI G, CLEMENT S, CHAPONNIER C (2009):  
Beta and gamma-cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity, J Cell Sci 122(Pt 16): 2980-2988.
- DZIEWAS R, KIS B, GRUS FH, ZIMMERMANN CW (2001):  
Antibody pattern analysis in the Guillain-Barre syndrome and pathologic controls, J Neuroimmunol 119(2): 287-296.
- EGS (2008):  
Terminologie und Handlungsrichtlinien für die Glaukome, European Glaucoma Society 3. Auflage.
- ELKINGTON AR, INMAN CB, STEART PV, WELLER RO (1990):  
The structure of the lamina cribrosa of the human eye: an immunocytochemical and electron microscopical study, Eye (Lond) 4 ( Pt 1): 42-57.

ENG LF (1985):

Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes, *J Neuroimmunol* 8(4-6): 203-214.

ENG LF, D'AMELIO FE, SMITH ME (1989):

Dissociation of GFAP intermediate filaments in EAE: observations in the lumbar spinal cord, *Glia* 2(5): 308-317.

ENG LF, GERSTL B, VANDERHAEGHEN JJ (1970):

A study of proteins in old multiple sclerosis plaques, *Trans Am Soc Neurochem* 1: 42.

ENG LF, SHIURBA RA (1988):

"Glial fibrillary acidic protein: A review of structure, function, and clinical application" in: *Neuronal and Glial Proteins: Structure, Function, and Clinical Application*, P.J. Marangos, I.C. Campbell, R.M Cohen, San Diego, CA: Academic Press: pp. 339-359.

ENG LF, VANDERHAEGHEN JJ, BIGNAMI A, GERSTL B (1971):

An acidic protein isolated from fibrous astrocytes, *Brain Res* 28(2): 351-354.

ENGQVIST-GOLDSTEIN AE, DRUBIN DG (2003):

Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals, *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 287-332.

ENROTH-CUGELL C, ROBSON JG (1966):

The contrast sensitivity of retinal ganglion cells of the cat, *J Physiol* 187(3): 517-552.

ENROTH-CUGELL C, ROBSON JG (1984):

Functional characteristics and diversity of cat retinal ganglion cells. Basic characteristics and quantitative description, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25(3): 250-267.

FARKAS RH, GROSSKREUTZ CL (2001):

Apoptosis, neuroprotection, and retinal ganglion cell death: an overview, *Int Ophthalmol Clin* 41(1): 111-130.

FENG J (2006):

Microtubule: a common target for parkin and Parkinson's disease toxins, *Neuroscientist* 12(6): 469-476.

FERRARI S, CALABRETTA B, DERIEL JK, BATTINI R, GHEZZO F, et al. (1987):

Structural and functional analysis of a growth-regulated gene, the human calcyclin, *J Biol Chem* 262(17): 8325-8332.

FLAD HD, PATERSON PY, MISCHER PA (1968):

In vitro effects of phytohemagglutinin and brain antigen on cell transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats, *J Immunol* 100(3): 647-653.

FLOOR E, LEVENTHAL PS, WANG Y, MENG L, CHEN W (1995):  
Dynamic storage of dopamine in rat brain synaptic vesicles in vitro, *J Neurochem* 64(2): 689-699.

FOURNIER AE, MCKERRACHER L (1997):  
Expression of specific tubulin isotypes increases during regeneration of injured CNS neurons, but not after the application of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), *J Neurosci* 17(12): 4623-4632.

FRANKE H, GALLA HJ, BEUCKMANN CT (1999):  
An improved low-permeability in vitro-model of the blood-brain barrier: transport studies on retinoids, sucrose, haloperidol, caffeine and mannitol, *Brain Res* 818(1): 65-71.

FRASSON M, PICAUD S, LEVEILLARD T, SIMONUTTI M, MOHAND-SAID S, et al. (1999):  
Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(11): 2724-2734.

FUKUDA Y (1977):  
A three-group classification of rat retinal ganglion cells: histological and physiological studies, *Brain Res* 119(2): 327-334.

GARBUGLIA M, VERZINI M, DONATO R (1998):  
Annexin VI binds S100A1 and S100B and blocks the ability of S100A1 and S100B to inhibit desmin and GFAP assemblies into intermediate filaments, *Cell Calcium* 24(3): 177-191.

GARCIA-SANCHEZ GA, GIL-CARRASCO F, ROMAN JJ, BROOKS DE, ALVAREZ-CLAU A, et al. (2007):  
Measurement of retinal nerve fiber layer thickness in normal and glaucomatous Cocker Spaniels by scanning laser polarimetry, *Vet Ophthalmol* 10 Suppl 1: 78-87.

GARCIA-VALENZUELA E, SHAREEF S, WALSH J, SHARMA SC (1995):  
Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma, *Exp Eye Res* 61(1): 33-44.

GARRIDO C, BRUEY JM, FROMENTIN A, HAMMANN A, ARRIGO AP, et al. (1999):  
HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9, *FASEB J* 13(14): 2061-2070.

GAUTHIER LR, CHARRIN BC, BORRELL-PAGES M, DOMPIERRE JP, RANGONE H, et al. (2004):  
Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules, *Cell* 118(1): 127-138.

GELATT KN, BROOKS DE (1999):

The canine glaucomas, in Gelatt KN (ed): *Veterinary Ophthalmology* (ed 3), Baltimore, Lippincott, Williams&Wilkins: pp. 701-751.

GELATT KN, BROOKS DE, SAMUELSON DA (1998a):

Comparative glaucomatology. I: The spontaneous glaucomas, *J Glaucoma* 7(3): 187-201.

GELATT KN, BROOKS DE, SAMUELSON DA (1998b):

Comparative glaucomatology. II: The experimental glaucomas, *J Glaucoma* 7(4): 282-294.

GELATT KN, MACKAY EO (2004):

Prevalence of the breed-related glaucomas in pure-bred dogs in North America, *Vet Ophthalmol* 7(2): 97-111.

GELATT KN, MACKAY EO (2004b):

Prevalence of the breed-related glaucomas in pure-bred dogs in North America, *Vet Ophthalmol* 7(2): 97-111.

GELATT KN, MIYABAYASHI T, GELATT-NICHOLSON KJ, MACKAY EO (2003):

Progressive changes in ophthalmic blood velocities in Beagles with primary open angle glaucoma, *Vet Ophthalmol* 6(1): 77-84.

GLAZE MB, GELATT KN (1999):

Feline Ophthalmology, in Gelatt KN (ed): *Veterinary Ophthalmology* (ed 3). Baltimore, Lippincott, Williams&Wilkins: pp. 997-1052.

GLOVINSKY Y, QUIGLEY HA, DUNKELBERGER GR (1991):

Retinal ganglion cell loss is size dependent in experimental glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(3): 484-491.

GLOVINSKY Y, QUIGLEY HA, PEASE ME (1993):

Foveal ganglion cell loss is size dependent in experimental glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(2): 395-400.

GOEDERT M, KLUG A, CROWTHER RA (2006):

Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease, *J Alzheimers Dis* 9(3 Suppl): 195-207.

GOLDBLUM D, KONTIOLA AI, MITTAG T, CHEN B, DANIAS J (2002):

Non-invasive determination of intraocular pressure in the rat eye. Comparison of an electronic tonometer (TonoPen), and a rebound (impact probe) tonometer, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 240(11): 942-946.

GONCALVES DS, LENZ G, KARL J, GONCALVES CA, RODNIGHT R (2000):

Extracellular S100B protein modulates ERK in astrocyte cultures, *Neuroreport* 11(4): 807-809.

GOTTANKA J, JOHNSON DH, MARTUS P, LUTJEN-DRECOLL E (1997):  
Severity of optic nerve damage in eyes with POAG is correlated with changes in the trabecular meshwork, *J Glaucoma* 6(2): 123-132.

GRAMLICH OW (2011):  
"Pathomechanische Analysen zum Untergang retinaler Ganglienzellen im Experimentellen Autoimmunen Glaukom Modell" Dissertation zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.

GRAMLICH OW, JOACHIM SC, GOTTSCHLING PF, LASPAS P, CUNY CS, et al. (2011):  
Ophthalmopathology in rats with MBP-induced experimental autoimmune encephalomyelitis, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 249(7): 1009-1020.

GREEN KN, STEFFAN JS, MARTINEZ-CORIA H, SUN X, SCHREIBER SS, et al. (2008):  
Nicotinamide restores cognition in Alzheimer's disease transgenic mice via a mechanism involving sirtuin inhibition and selective reduction of Thr231-phosphotau, *J Neurosci* 28(45): 11500-11510.

GREHN F (2007):  
*Glaukom, Augenheilkunde*, 30. Auflage, Springer Verlag, Berlin: S. 295-318.

GRIFFIN WS, STANLEY LC, LING C, WHITE L, MACLEOD V, et al. (1989):  
Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(19): 7611-7615.

GRIFFIN WS, YERALAN O, SHENG JG, BOOP FA, MRAK RE, et al. (1995):  
Overexpression of the neurotrophic cytokine S100 beta in human temporal lobe epilepsy, *J Neurochem* 65(1): 228-233.

GRISANTI S (1998):  
[Immune privilege of the eye], *Ophthalmologie* 95(2): 124-135.

GROZDANIC SD, BETTS DM, SAKAGUCHI DS, KWON YH, KARDON RH, et al. (2003):  
Temporary elevation of the intraocular pressure by cauterization of vortex and episcleral veins in rats causes functional deficits in the retina and optic nerve, *Exp Eye Res* 77(1): 27-33.

GRUS FH, AUGUSTIN AJ, LOEFFLER K, DICK B, LUTZ J, et al. (2001):  
Allopurinol has immunomodulating activity following topical and systemic application in experimental autoimmune uveitis, *Eur J Ophthalmol* 11(3): 252-260.

GRUS FH, JOACHIM SC, BRUNS K, LACKNER KJ, PFEIFFER N, et al. (2006):  
Serum autoantibodies to alpha-fodrin are present in glaucoma patients from Germany and the United States, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(3): 968-976.

- GRUS FH, JOACHIM SC, HOFFMANN EM, PFEIFFER N (2004):  
Complex autoantibody repertoires in patients with glaucoma, *Mol Vis* 10: 132-137.
- GUGLETA K (2009):  
[Vascular risk factors in glaucoma - diagnostics], *Praxis (Bern 1994)* 98(4): 201-207.
- GUM G, GELATT KN, OFRI R (1999):  
Physiology of the Eye, in Gelatt KN (ed): *Veterinary Ophthalmology* (ed 3), Baltimore, Lippincott, Williams&Wilkins: pp. 151-181.
- GUO L, TSATOURIAN V, LUONG V, PODOLEANU AG, JACKSON DA, et al. (2005):  
En face optical coherence tomography: a new method to analyse structural changes of the optic nerve head in rat glaucoma, *Br J Ophthalmol* 89(9): 1210-1216.
- HAMMARBERG H, LIDMAN O, LUNDBERG C, ELTAYEB SY, GIELEN AW, et al. (2000):  
Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells, *J Neurosci* 20(14): 5283-5291.
- HAMPSON EC, SMITH RI, BERNAYS ME (2002):  
Primary glaucoma in Burmese cats, *Aust Vet J* 80(11): 672-680.
- HARBORTH J, ELBASHIR SM, BECHERT K, TUSCHL T, WEBER K (2001):  
Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs, *J Cell Sci* 114(Pt 24): 4557-4565.
- HARTUNG J, ELPELT B, KLÖSENER K-H (2005):  
*Statistik*, 14. Auflage, München, Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH.
- HASHIMOTO M, NITTA A, FUKUMITSU H, NOMOTO H, SHEN L, et al. (2005):  
Inflammation-induced GDNF improves locomotor function after spinal cord injury, *Neuroreport* 16(2): 99-102.
- HEMPEN B, BRION JP (1996):  
Reduction of acetylated alpha-tubulin immunoreactivity in neurofibrillary tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease, *J Neuropathol Exp Neurol* 55(9): 964-972.
- HERMEY G, MAHLKE C, SCHWAKE M, SOMMER T (2010):  
*Der Experimentator Neurowissenschaften*, Spektrum Akademische Verlag Heidelberg.
- HISCOTT PS, GRIERSON I, TROMBETTA CJ, RAHI AH, MARSHALL J, et al. (1984):  
Retinal and epiretinal glia--an immunohistochemical study, *Br J Ophthalmol* 68(10): 698-707.

- HOFSTETTER HH, SHIVE CL, FORSTHUBER TG (2002):  
Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells, *J Immunol* 169(1): 117-125.
- HU J, FERREIRA A, VAN ELDIK LJ (1997):  
S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes, *J Neurochem* 69(6): 2294-2301.
- HU P, WU S, HERNANDEZ N (2004):  
A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription, *Genes Dev* 18(24): 3010-3015.
- HUANG W, FILETA JB, FILIPPOPOULOS T, RAY A, DOBBERFUHL A, et al. (2007):  
Hsp27 phosphorylation in experimental glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(9): 4129-4135.
- HUTTUNEN HJ, KUJA-PANULA J, SORCI G, AGNELETTI AL, DONATO R, et al. (2000):  
Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation, *J Biol Chem* 275(51): 40096-40105.
- HUXLIN KR, GOODCHILD AK (1997):  
Retinal ganglion cells in the albino rat: revised morphological classification, *J Comp Neurol* 385(2): 309-323.
- ISAYAMA T, BERSON DM, PU M (2000):  
Theta ganglion cell type of cat retina, *J Comp Neurol* 417(1): 32-48.
- ISHII Y, KWONG JM, CAPRIOLI J (2003):  
Retinal ganglion cell protection with geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, in a rat glaucoma model, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(5): 1982-1992.
- ISOBE T, OKUYAMA T (1978):  
The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP I-b protein) and its relation to the calcium-binding proteins, *Eur J Biochem* 89(2): 379-388.
- ISOBE T, OKUYAMA T (1981):  
The amino-acid sequence of the alpha subunit in bovine brain S-100a protein, *Eur J Biochem* 116(1): 79-86.
- JACOBI S, DUBIELZIG RR (2008):  
Feline primary open angle glaucoma, *Vet Ophthalmol* 11(3): 162-165.

JANKE C, KNEUSSEL M (2010):

Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton, *Trends Neurosci* 33(8): 362-372.

JEOUNG JW, PARK KH, KIM JM, KANG SH, KANG JH, et al. (2008):

Optic disc hemorrhage may be associated with retinal nerve fiber loss in otherwise normal eyes, *Ophthalmology* 115(12): 2132-2140.

JIANG C, MOORE MJ, ZHANG X, KLASSEN H, LANGER R, et al. (2007):

Intravitreal injections of GDNF-loaded biodegradable microspheres are neuroprotective in a rat model of glaucoma, *Mol Vis* 13: 1783-1792.

JOACHIM SC, BRUNS K, LACKNER KJ, PFEIFFER N, GRUS FH (2007a):

Antibodies to alpha B-crystallin, vimentin, and heat shock protein 70 in aqueous humor of patients with normal tension glaucoma and IgG antibody patterns against retinal antigen in aqueous humor, *Curr Eye Res* 32(6): 501-509.

JOACHIM SC, BRUNS K, LACKNER KJ, PFEIFFER N, GRUS FH (2007b):

Analysis of IgG antibody patterns against retinal antigens and antibodies to alpha-crystallin, GFAP, and alpha-enolase in sera of patients with "wet" age-related macular degeneration, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245(5): 619-626.

JOACHIM SC, GRUS FH, KRAFT D, WHITE-FARRAR K, BARNES G, et al. (2009):

Complex antibody profile changes in an experimental autoimmune glaucoma animal model, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(10): 4734-4742.

JOACHIM SC, GRUS FH, PFEIFFER N (2003):

Analysis of autoantibody repertoires in sera of patients with glaucoma, *Eur J Ophthalmol* 13(9-10): 752-758.

JOACHIM SC, PFEIFFER N, GRUS FH (2005):

Autoantibodies in patients with glaucoma: a comparison of IgG serum antibodies against retinal, optic nerve, and optic nerve head antigens, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243(8): 817-823.

JOACHIM SC, REICHEL T, BERNEISER S, PFEIFFER N, GRUS FH (2008):

Sera of glaucoma patients show autoantibodies against myelin basic protein and complex autoantibody profiles against human optic nerve antigens, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246(4): 573-580.

JOACHIM SC, WAX MB, SEIDEL P, PFEIFFER N, GRUS FH (2010):

Enhanced characterization of serum autoantibody reactivity following HSP 60 immunization in a rat model of experimental autoimmune glaucoma, *Curr Eye Res* 35(10): 900-908.

JOACHIM SC, WUENSCHIG D, PFEIFFER N, GRUS FH (2007c):

IgG antibody patterns in aqueous humor of patients with primary open angle glaucoma and pseudoexfoliation glaucoma, *Mol Vis* 13: 1573-1579.



JOHNSEN DA, MAGGS DJ, KASS PH (2006):  
Evaluation of risk factors for development of secondary glaucoma in dogs: 156 cases (1999-2004), *J Am Vet Med Assoc* 229(8): 1270-1274.

JOHNSON BD, BYERLY L (1993):  
A cytoskeletal mechanism for Ca<sup>2+</sup> channel metabolic dependence and inactivation by intracellular Ca<sup>2+</sup>, *Neuron* 10(5): 797-804.

JOURDAN RH (1950):  
Pathogenesis of canine glaucoma, *J Am Vet Med Assoc* 117(884): 419-422.

KAMAL A, ALMENAR-QUERALT A, LEBLANC JF, ROBERTS EA, GOLDSTEIN LS (2001):  
Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP, *Nature* 414(6864): 643-648.

KIM D, NGUYEN MD, DOBBIN MM, FISCHER A, SANANBENESI F, et al. (2007):  
SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis, *EMBO J* 26(13): 3169-3179.

KIPNIS J, YOLES E, SCHORI H, HAUBEN E, SHAKED I, et al. (2001):  
Neuronal survival after CNS insult is determined by a genetically encoded autoimmune response, *J Neurosci* 21(13): 4564-4571.

KIRBY MA, CHALUPA LM (1986):  
Retinal crowding alters the morphology of alpha ganglion cells, *J Comp Neurol* 251(4): 532-541.

KLIGMAN D, HILT DC (1988):  
The S100 protein family, *Trends Biochem Sci* 13(11): 437-443.

KLOCKER N, ZERFOWSKI M, GELLRICH NC, BAHR M (2001):  
Morphological and functional analysis of an incomplete CNS fiber tract lesion: graded crush of the rat optic nerve, *J Neurosci Methods* 110(1-2): 147-153.

KOEBERLE PD, BALL AK (1998):  
Effects of GDNF on retinal ganglion cell survival following axotomy, *Vision Res* 38(10): 1505-1515.

KOHLER H, BAYRY J, NICOLETTI A, KAVERI SV (2003):  
Natural autoantibodies as tools to predict the outcome of immune response?, *Scand J Immunol* 58(3): 285-289.

KOJIMA K, BERGER T, LASSMANN H, HINZE-SELCH D, ZHANG Y, et al. (1994):  
Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 beta molecule, a calcium binding protein of astroglia, *J Exp Med* 180(3): 817-829.

KÖNIG HE, LIEBICH H-G (2005):

Anatomie der Haussäugetiere, 3. Auflage, Stuttgart, Schattauer GmbH.

KOPPAL T, LAM AG, GUO L, VAN ELDIK LJ (2001):

S100B proteins that lack one or both cysteine residues can induce inflammatory responses in astrocytes and microglia, *Neurochem Int* 39(5-6): 401-407.

KRAHENMANN A (1978):

[Secondary glaucoma in the dog. Etiology, pathogenesis and clinical aspects], *Schweiz Arch Tierheilkd* 120(2): 67-80.

KREMMER S, KREUZFELDER E, KLEIN R, BONTKE N, HENNEBERG-QUESTER KB, et al. (2001):

Antiphosphatidylserine antibodies are elevated in normal tension glaucoma, *Clin Exp Immunol* 125(2): 211-215.

KUFFLER SW (1952):

Neurons in the retina; organization, inhibition and excitation problems, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 17: 281-292.

KUFFLER SW (1953):

Discharge patterns and functional organization of mammalian retina, *J Neurophysiol* 16(1): 37-68.

KUGLER S, BOCKER K, HEUSIPP G, GREUNE L, KIM KS, et al. (2007):

Pertussis toxin transiently affects barrier integrity, organelle organization and transmigration of monocytes in a human brain microvascular endothelial cell barrier model, *Cell Microbiol* 9(3): 619-632.

KUHN KA, KULIK L, TOMOOKA B, BRASCHLER KJ, AREND WP, et al. (2006):

Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis, *J Clin Invest* 116(4): 961-973.

KWONG JM, CAPRIOLI J, PIRI N (2010):

RNA binding protein with multiple splicing: a new marker for retinal ganglion cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(2): 1052-1058.

LACROIX-DESMAZES S, KAVERI SV, MOUTHON L, AYOUBA A, MALANCHERE E, et al. (1998):

Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals, *J Immunol Methods* 216(1-2): 117-137.

LAFUENTE MP, VILLEGAS-PEREZ MP, SELLES-NAVARRO I, MAYOR-TORROGLOSA S, MIRALLES DE IMPERIAL J, et al. (2002):

Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult, *Neuroscience* 109(1): 157-168.

- LAM TT, KWONG JM, TSO MO (2003):  
Early glial responses after acute elevated intraocular pressure in rats, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(2): 638-645.
- LAM TT, TAKAHASHI K, TSO MO (1994):  
The effects of naloxone on retinal ischemia in rats, *J Ocul Pharmacol* 10(2): 481-492.
- LAVOIE JN, LAMBERT H, HICKEY E, WEBER LA, LANDRY J (1995):  
Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27, *Mol Cell Biol* 15(1): 505-516.
- LAZARIDES E (1982):  
Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins, *Annu Rev Biochem* 51: 219-250.
- LEAHY KM, ORNBERG RL, WANG Y, ZHU Y, GIDDAY JM, et al. (2004):  
Quantitative ex vivo detection of rodent retinal ganglion cells by immunolabeling Brn-3b, *Exp Eye Res* 79(1): 131-140.
- LEVICK WR (1975):  
Form and function of cat retinal ganglion cells, *Nature* 254(5502): 659-662.
- LEVIN LA (2001):  
Models of neural injury, *J Glaucoma* 10(5 Suppl 1): S19-21.
- LEVKOVITCH-VERBIN H, QUIGLEY HA, MARTIN KR, VALENTA D, BAUMRIND LA, et al. (2002):  
Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(2): 402-410.
- LI Y, SCHLAMP CL, NICKELLS RW (1999):  
Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(5): 1004-1008.
- LI Y, SCHLAMP CL, POULSEN GL, JACKSON MW, GRIEP AE, et al. (2002):  
p53 regulates apoptotic retinal ganglion cell death induced by N-methyl-D-aspartate, *Mol Vis* 8: 341-350.
- LICHTER PR, BERGSTROM TJ (1976):  
Premature ventricular systole detection by applanation tonometry, *Am J Ophthalmol* 81(6): 797-803.
- LIEBICH H-G (1998):  
Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, 3. Auflage, Stuttgart, F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH.

LIN LF, DOHERTY DH, LILE JD, BEKTESH S, COLLINS F (1993):  
GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons, *Science* 260(5111): 1130-1132.

LINDQUIST S, CRAIG EA (1988):  
The heat-shock proteins, *Annu Rev Genet* 22: 631-677.

LINDSEY JR, BAKER HJ (2006):  
Historical Foundations in M.A. Suckow, S.H. Weisbroth, C.L. Franklin (Hrsg) *The laboratory rat*, second edition, Elsevier Academic Press, Burlington, San Diego: pp.1-53.

LINEK J, MAGGIO F, PIZZIRANI S (2008):  
Ophthalmologie auf den Punkt gebracht, Ein Leitfaden für die Kleintierpraxis, 1. Auflage, VBS VetVerlag, Buchhandel und Seminar GmbH, Babenhausen.

LININGTON C, BRADL M, LASSMANN H, BRUNNER C, VASS K (1988):  
Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein, *Am J Pathol* 130(3): 443-454.

LIU Y, EDWARDS RH (1997):  
The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration, *Annu Rev Neurosci* 20: 125-156.

LOVEKIN LG (1964):  
Primary Glaucoma in Dogs, *J Am Vet Med Assoc* 145: 1081-1091.

LUDOWYK PA, HUGHES W, HUGH A, WILLENBORG DO, ROCKETT KA, et al. (1993):  
Astrocytic hypertrophy: an important pathological feature of chronic experimental autoimmune encephalitis in aged rats, *J Neuroimmunol* 48(2): 121-134.

LUDWIG G (2008):  
Meine Ratte, GU GRÄFE UND UNZER VERLAG GmbH München.

MAEDA K, SAWADA A, MATSUBARA M, NAKAI Y, HARA A, et al. (2004):  
A novel neuroprotectant against retinal ganglion cell damage in a glaucoma model and an optic nerve crush model in the rat, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(3): 851-856.

MAGRANE WG (1957a):  
Canine glaucoma. I. Methods of diagnosis, *J Am Vet Med Assoc* 131(7): 311-314.

MAGRANE WG (1957b):  
Canine glaucoma. II. Primary classification, *J Am Vet Med Assoc* 131(8): 372-374.

MAGRANE WG (1957c):

Canine glaucoma. III. Secondary classification, J Am Vet Med Assoc 131(8): 374-378.

MAGUIRE G, CONNAUGHTON V, PRAT AG, JACKSON GR, JR., CANTIELLO HF (1998):

Actin cytoskeleton regulates ion channel activity in retinal neurons, Neuroreport 9(4): 665-670.

MANNIE MD, ABBOTT DJ, BLANCHFIELD JL (2009):

Experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: IFN-beta acts as a tolerogenic adjuvant for induction of neuroantigen-dependent tolerance, J Immunol 182(9): 5331-5341.

MARSHALL LE, HIMES RH (1978):

Rotenone inhibition of tubulin self-assembly, Biochim Biophys Acta 543(4): 590-594.

MARTIN CL (1977):

Glaucoma, Am Anim Hosp Assoc Proc 44: 301-303.

MARUYAMA I, OHGURO H, IKEDA Y (2000):

Retinal ganglion cells recognized by serum autoantibody against gamma-enolase found in glaucoma patients, Invest Ophthalmol Vis Sci 41(7): 1657-1665.

MATSUBARA T, PARARAJASEGARAM G, WU GS, RAO NA (1999):

Retinal microglia differentially express phenotypic markers of antigen-presenting cells in vitro, Invest Ophthalmol Vis Sci 40(13): 3186-3193.

MCGAVIN MD, ZACHARY JF (2007):

Pathologic Basis of Veterinary Disease, fourth Edition, St. Louis, Missouri: Mosby, Elsevier.

MCILNAY TR, GIONFRIDDO JR, DUBIELZIG RR, POWELL CC, MADL JE (2004):

Evaluation of glutamate loss from damaged retinal cells of dogs with primary glaucoma, Am J Vet Res 65(6): 776-786.

MEDAWAR PB (1948):

Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye, Br J Exp Pathol 29(1): 58-69.

MEHLEN P, HICKEY E, WEBER LA, ARRIGO AP (1997):

Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells, Biochem Biophys Res Commun 241(1): 187-192.

MIDELFART A, WIGERS A (1994):

Clinical comparison of the ProTon and Tono-Pen tonometers with the Goldmann applanation tonometer, *Br J Ophthalmol* 78(12): 895-898.

MITTAG TW, DANIAS J, POHORENEC G, YUAN HM, BURAKGAZI E, et al. (2000):

Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(11): 3451-3459.

MOORE BW (1965):

A soluble protein characteristic of the nervous system, *Biochem Biophys Res Commun* 19(6): 739-744.

MOORE CG, JOHNSON EC, MORRISON JC (1996):

Circadian rhythm of intraocular pressure in the rat, *Curr Eye Res* 15(2): 185-191.

MOORE CG, MILNE ST, MORRISON JC (1993):

Noninvasive measurement of rat intraocular pressure with the Tono-Pen, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(2): 363-369.

MOORE S, THANOS S (1996):

Differential increases in rat retinal ganglion cell size with various methods of optic nerve lesion, *Neurosci Lett* 207(2): 117-120.

MORONI F, LOMBARDI G, PELLEGRINI-FAUSSONE S (1993):

Photochemically-induced lesion of the rat retina: a quantitative model for the evaluation of ischemia-induced retinal damage, *Vision Res* 33(14): 1887-1891.

MORRISON J, FARRELL S, JOHNSON E, DEPPMEIER L, MOORE CG, et al. (1995):

Structure and composition of the rodent lamina cribrosa, *Exp Eye Res* 60(2): 127-135.

MORRISON JC (2005):

Elevated intraocular pressure and optic nerve injury models in the rat, *J Glaucoma* 14(4): 315-317.

MORRISON JC, FRAUNFELDER FW, MILNE ST, MOORE CG (1995):

Limbal microvasculature of the rat eye, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(3): 751-756.

MORRISON JC, MOORE CG, DEPPMEIER LM, GOLD BG, MESHUL CK, et al. (1997):

A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage, *Exp Eye Res* 64(1): 85-96.

MOSES RA, ARNZEN RJ (1983):

Instantaneous tonometry, *Arch Ophthalmol* 101(2): 249-252.

MOSES RA, LIU CH (1968):

Repeated applanation tonometry, *Am J Ophthalmol* 66(1): 89-91.

MOSIMANN W, KOHLER T (1990):

Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere, Berlin, Hamburg: Paul Parey Verlag.

MOSINGER JL, OLNEY JW (1989):

Photothrombosis-induced ischemic neuronal degeneration in the rat retina, *Exp Neurol* 105(1): 110-113.

MOSINGER JL, PRICE MT, BAI HY, XIAO H, WOZNIAK DF, et al. (1991):

Blockade of both NMDA and non-NMDA receptors is required for optimal protection against ischemic neuronal degeneration in the in vivo adult mammalian retina, *Exp Neurol* 113(1): 10-17.

MOTOLKO MA, FELDMAN F, HYDE M, HUDY D (1982):

Sources of variability in the results of applanation tonometry, *Can J Ophthalmol* 17(3): 93-95.

MUCHOWSKI PJ, WACKER JL (2005):

Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones, *Nat Rev Neurosci* 6(1): 11-22.

MULISCH M, WELSCH U (2010):

Romeis Mikroskopische Technik 18. Auflage, Spektrum Akademische Verlag Heidelberg.

MUNOZ JJ (1985):

Biological activities of pertussigen (pertussis toxin), *Pertussis Toxin* (ed. R.D. Sekura, J. Moss and M. Vaughan): New York: Academic Press. pp. 1-18.

NASKAR R, VORWERK CK, DREYER EB (2000):

Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(7): 1940-1944.

NEUFELD AH, HERNANDEZ MR, GONZALEZ M (1997):

Nitric oxide synthase in the human glaucomatous optic nerve head, *Arch Ophthalmol* 115(4): 497-503.

NICKEL R, SCHUMMER A, SEIFERLE E (2004):

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band IV Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen, Stuttgart: Gerhard Böhme, Parey Verlag.

NICKELLS RW (1996):

Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why, and the maybe, *J Glaucoma* 5(5): 345-356.

NICKLAS W., CUßLER K., J. H (1997):

Tierschutzaspekte bei der Immunisierung  
von Versuchstieren, 4. Merkblatt Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V.

NOBREGA A, HAURY M, GRANDIEN A, MALANCHERE E, SUNDBLAD A, et al.  
(1993):

Global analysis of antibody repertoires. II. Evidence for specificity, self-selection and the immunological "homunculus" of antibodies in normal serum, *Eur J Immunol* 23(11): 2851-2859.

NORGREN N, SUNDSTROM P, SVENNINGSSON A, ROSENGREN L,  
STIGBRAND T, et al. (2004):

Neurofilament and glial fibrillary acidic protein in multiple sclerosis, *Neurology* 63(9): 1586-1590.

NOSKE W, HENSEN J, WIEDERHOLT M (1997):

Endothelin-like immunoreactivity in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma and cataract, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235(9): 551-552.

NUSSENBLATT RB, RODRIGUES MM, WACKER WB, CEVARIO SJ, SALINAS-CARMONA MC, et al. (1981):

Cyclosporin a. Inhibition of experimental autoimmune uveitis in Lewis rats, *J Clin Invest* 67(4): 1228-1231.

O'CALLAGHAN JP (1991):

Assessment of neurotoxicity: use of glial fibrillary acidic protein as a biomarker, *Biomed Environ Sci* 4: 197-206.

OFRI R (1999):

Optics and Physiology of Vision, in Gelatt KN (ed): *Veterinary Ophthalmology* (ed 3), Baltimore, Lippincott, Williams&Wilkins: pp. 183-216.

OFRI R, SAMUELSON DA, STRUBBE DT, DAWSON WW, BROOKS DE, et al.  
(1994):

Altered retinal recovery and optic nerve fiber loss in primary open-angle glaucoma in the beagle, *Exp Eye Res* 58(2): 245-248.

OHLSSON M, WESTERLUND U, LANGMOEN IA, SVENSSON M (2004):

Methylprednisolone treatment does not influence axonal regeneration or degeneration following optic nerve injury in the adult rat, *J Neuroophthalmol* 24(1): 11-18.

PANG IH, CLARK AF (2007):

Rodent models for glaucoma retinopathy and optic neuropathy, *J Glaucoma* 16(5): 483-505.



- PANG IH, WANG WH, CLARK AF (2005):  
Acute effects of glaucoma medications on rat intraocular pressure, *Exp Eye Res* 80(2): 207-214.
- PAUL C, MANERO F, GONIN S, KRETZ-REMY C, VIROT S, et al. (2002):  
Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release, *Mol Cell Biol* 22(3): 816-834.
- PEARSON HE, PAYNE BR, CUNNINGHAM TJ (1993):  
Microglial invasion and activation in response to naturally occurring neuronal degeneration in the ganglion cell layer of the postnatal cat retina, *Brain Res Dev Brain Res* 76(2): 249-255.
- PEASE ME, HAMMOND JC, QUIGLEY HA (2006):  
Manometric calibration and comparison of TonoLab and TonoPen tonometers in rats with experimental glaucoma and in normal mice, *J Glaucoma* 15(6): 512-519.
- PEICHL L (1992):  
Morphological types of ganglion cells in the dog and wolf retina, *J Comp Neurol* 324(4): 590-602.
- PEICHL L (1992):  
Topography of ganglion cells in the dog and wolf retina, *J Comp Neurol* 324(4): 603-620.
- PEKNY M, STANNESS KA, ELIASSON C, BETSHOLTZ C, JANIGRO D (1998):  
Impaired induction of blood-brain barrier properties in aortic endothelial cells by astrocytes from GFAP-deficient mice, *Glia* 22(4): 390-400.
- PEREZ M, SANTA-MARIA I, GOMEZ DE BARREDA E, ZHU X, CUADROS R, et al. (2009):  
Tau--an inhibitor of deacetylase HDAC6 function, *J Neurochem* 109(6): 1756-1766.
- PERRY VH (1981):  
Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina, *Neuroscience* 6(5): 931-944.
- PFEIFFER N (2001):  
Glaukom: Grundlagen-Diagnostik-Therapie-Compliance, Pfeiffer, N. (Hrsg.) Stuttgart und New York: Georg Thieme Verlag,.
- PFEIFFER R (1982):  
Inherited ocular diseases of the dog and cat, *Compend Contin Educ Pract Vet* 4: 152-165.
- PFEIFFER RL, WILCOCK BP, DUBIELZIG RR, RENDER JA, WHITELEY HE (1999):  
Fundamentals of Veterinary Ophthalmic Pathology, in Gelatt KN (ed): *Veterinary Ophthalmology* (ed3), Baltimore, Lippincott, Williams&Wilkins: pp 355-425.

PIGINO G, MORFINI G, PELSMAN A, MATTSON MP, BRADY ST, et al. (2003): Alzheimer's presenilin 1 mutations impair kinesin-based axonal transport, *J Neurosci* 23(11): 4499-4508.

QUIGLEY HA (1993): Open-angle glaucoma, *N Engl J Med* 328(15): 1097-1106.

QUIGLEY HA (1996): Number of people with glaucoma worldwide, *Br J Ophthalmol* 80(5): 389-393.

QUIGLEY HA, ADDICKS EM, GREEN WR, MAUMENEE AE (1981): Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage, *Arch Ophthalmol* 99(4): 635-649.

QUIGLEY HA, BROMAN AT (2006): The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020, *Br J Ophthalmol* 90(3): 262-267.

QUIGLEY HA, DAVIS EB, ANDERSON DR (1977): Descending optic nerve degeneration in primates, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16(9): 841-849.

QUIGLEY HA, DUNKELBERGER GR, GREEN WR (1988): Chronic human glaucoma causing selectively greater loss of large optic nerve fibers, *Ophthalmology* 95(3): 357-363.

QUIGLEY HA, DUNKELBERGER GR, GREEN WR (1989): Retinal ganglion cell atrophy correlated with automated perimetry in human eyes with glaucoma, *Am J Ophthalmol* 107(5): 453-464.

QUIGLEY HA, NICKELLS RW, KERRIGAN LA, PEASE ME, THIBAUT DJ, et al. (1995): Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(5): 774-786.

QUIGLEY HA, SANCHEZ RM, DUNKELBERGER GR, L'HERNAULT NL, BAGINSKI TA (1987): Chronic glaucoma selectively damages large optic nerve fibers, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28(6): 913-920.

RAIJMAKERS R, VOGELZANGS J, RAATS J, PANZENBECK M, CORBY M, et al. (2006): Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in peptidylarginine deiminase 2 knockout mice, *J Comp Neurol* 498(2): 217-226.

REICHELT J, JOACHIM SC, PFEIFFER N, GRUS FH (2008): Analysis of autoantibodies against human retinal antigens in sera of patients with glaucoma and ocular hypertension, *Curr Eye Res* 33(3): 253-261.

REICHLIN M (1995):

Cell injury mediated by autoantibodies to intracellular antigens, Clin Immunol Immunopathol 76(3 Pt 1): 215-219.

REICHLIN M (1998):

Cellular dysfunction induced by penetration of autoantibodies into living cells: cellular damage and dysfunction mediated by antibodies to dsDNA and ribosomal P proteins, J Autoimmun 11(5): 557-561.

RENZ-POLSTER H, KRAUTZIG S, BÄTGE B (2008):

"Immunsystem" in: Basislehrbuch Innere. 4.Auflage. , München: Elsevier, Urban und Fischer: S.354-386.

RICARD CS, KOBAYASHI S, PENA JD, SALVADOR-SILVA M, AGAPOVA O, et al. (2000):

Selective expression of neural cell adhesion molecule (NCAM)-180 in optic nerve head astrocytes exposed to elevated hydrostatic pressure in vitro, Brain Res Mol Brain Res 81(1-2): 62-79.

RIDGWAY MD, BRIGHTMAN AH (1989):

Feline Glaucoma: A Retrospective Study of 29 Clinical Cases, Journal of the American Animal Hospital Association 25: 485-490.

RITOSSA F (1962):

A new puffing pattern induced by temperature and DPN in Drosophila, Experimentia 18: 571-573.

ROITT I.M., BROSTOFF J., D.K. M (1991):

"Autoimmunität und Autoimmunerkrankungen" in: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Deutsche Übersetzung von Harabacz. 2.Auflage., Stuttgart, Thieme Verlag.

ROMANO C, BARRETT DA, LI Z, PESTRONK A, WAX MB (1995):

Anti-rhodopsin antibodies in sera from patients with normal-pressure glaucoma, Invest Ophthalmol Vis Sci 36(10): 1968-1975.

ROMEIS B, BÖCK P (1989):

Mikroskopische Technik, 17., völlig neu überarbeitete Auflage, Hrsg. P. Böck, München-Wien-Baltimore: Urban und Schwarzenberg.

ROSENMUND C, WESTBROOK GL (1993):

Calcium-induced actin depolymerization reduces NMDA channel activity, Neuron 10(5): 805-814.

ROTHERMUNDT M, MISSLER U, AROLT V, PETERS M, LEADBEATER J, et al. (2001):

Increased S100B blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology, Mol Psychiatry 6(4): 445-449.

ROUSSEAU V, ENGELMANN R, SABEL BA (1999):  
Restoration of vision III: soma swelling dynamics predicts neuronal death or survival after optic nerve crush in vivo, *Neuroreport* 10(16): 3387-3391.

SAKAI T, KOHNO H, ISHIHARA T, HIGAKI M, SAITO S, et al. (2006):  
Treatment of experimental autoimmune uveoretinitis with poly(lactic acid) nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate, *Exp Eye Res* 82(4): 657-663.

SAMALI A, ORRENIUS S (1998):  
Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis, *Cell Stress Chaperones* 3(4): 228-236.

SAMUELSON DA (1999):  
Ophthalmic Anatomy, in Gelatt KN (ed): *Veterinary Ophthalmology* (ed 3), Baltimore, Lippincott, Williams&Wilkins: pp. 31-150.

SANNA G, PIGA M, TERRYBERRY JW, PELTZ MT, GIAGHEDDU S, et al. (2000):  
Central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus: cerebral imaging and serological profile in patients with and without overt neuropsychiatric manifestations, *Lupus* 9(8): 573-583.

SAPPINGTON RM, CARLSON BJ, CRISH SD, CALKINS DJ (2010):  
The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(1): 207-216.

SAVAGIAN CA, DUBIELZIG RR, NORK TM (2008):  
Comparison of the distribution of glial fibrillary acidic protein, heat shock protein 60, and hypoxia-inducible factor-1alpha in retinas from glaucomatous and normal canine eyes, *Am J Vet Res* 69(2): 265-272.

SAWADA A, NEUFELD AH (1999):  
Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure, *Exp Eye Res* 69(5): 525-531.

SCHENK D, BARBOUR R, DUNN W, GORDON G, GRAJEDA H, et al. (1999):  
Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse, *Nature* 400(6740): 173-177.

SCHLAMP CL, JOHNSON EC, LI Y, MORRISON JC, NICKELLS RW (2001):  
Changes in Thy1 gene expression associated with damaged retinal ganglion cells, *Mol Vis* 7: 192-201.

SCHMIDT V (1988):  
*Augenkrankheiten der Haustiere*, 2. Auflage, Jena: VEB Gustav Fischer Verlag Jena.

- SCHORI H, YOLES E, SCHWARTZ M (2001):  
T-cell-based immunity counteracts the potential toxicity of glutamate in the central nervous system, *J Neuroimmunol* 119(2): 199-204.
- SCHUMAN JS, HEE MR, ARYA AV, PEDUT-KLOIZMAN T, PULIAFITO CA, et al. (1995):  
Optical coherence tomography: a new tool for glaucoma diagnosis, *Curr Opin Ophthalmol* 6(2): 89-95.
- SCHWARTZ M, KIPNIS J (2001):  
Protective autoimmunity: regulation and prospects for vaccination after brain and spinal cord injuries, *Trends Mol Med* 7(6): 252-258.
- SELINFREUND RH, BARGER SW, PLEDGER WJ, VAN ELDIK LJ (1991):  
Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(9): 3554-3558.
- SELLES-NAVARRO I, VILLEGAS-PEREZ MP, SALVADOR-SILVA M, RUIZ-GOMEZ JM, VIDAL-SANZ M (1996):  
Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(10): 2002-2014.
- SHARMA RK, NETLAND PA (2007):  
Early born lineage of retinal neurons express class III beta-tubulin isotype, *Brain Res* 1176: 11-17.
- SHERMAN MY, GOLDBERG AL (2001):  
Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases, *Neuron* 29(1): 15-32.
- SHOU T, LIU J, WANG W, ZHOU Y, ZHAO K (2003):  
Differential dendritic shrinkage of alpha and beta retinal ganglion cells in cats with chronic glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(7): 3005-3010.
- SINGH VK, WARREN R, AVERETT R, GHAZIUDDIN M (1997):  
Circulating autoantibodies to neuronal and glial filament proteins in autism, *Pediatr Neurol* 17(1): 88-90.
- SMEDES SL, DUBIELZIG RR (1994):  
Early degenerative changes associated with spontaneous glaucoma in dogs, *J Vet Diagn Invest* 6(2): 259-263.
- SMITH GG, BAIRD CD (1952):  
Survival time of retinal cells when deprived of their blood supply by increased intraocular pressure, *Am J Ophthalmol* 35(5:2): 133-136.

SMITH RS, ZABALETA A, SAVINOVA OV, JOHN SW (2001):  
The mouse anterior chamber angle and trabecular meshwork develop without cell death, *BMC Dev Biol* 1: 3.

SMITH SJ (1988):  
Neuronal cytomotility: the actin-based motility of growth cones, *Science* 242(4879): 708-715.

SOMMER A, TIELSCH JM, KATZ J, QUIGLEY HA, GOTTSCH JD, et al. (1991):  
Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey, *Arch Ophthalmol* 109(8): 1090-1095.

SORCI G, AGNELETTI AL, BIANCHI R, DONATO R (1998):  
Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells, *Biochim Biophys Acta* 1448(2): 277-289.

SORCI G, AGNELETTI AL, DONATO R (2000):  
Effects of S100A1 and S100B on microtubule stability. An in vitro study using triton-cytoskeletons from astrocyte and myoblast cell lines, *Neuroscience* 99(4): 773-783.

SPRECA A, RAMBOTTI MG, RENDE M, SACCARDI C, AISA MC, et al. (1989):  
Immunocytochemical localization of S-100b protein in degenerating and regenerating rat sciatic nerves, *J Histochem Cytochem* 37(4): 441-446.

STADES FC, NEUMANN W, BOEVÉ MH, SPIESS B, WYMAN M (2006):  
*Praktische Augenheilkunde für den Tierarzt*, 3. überarb. und erw. Aufl., Hannover: Schlütersche.

STAHL K, MYLONAKOU MN, SKARE O, AMIRY-MOGHADDAM M, TORP R (2011):  
Cytoprotective effects of growth factors: BDNF more potent than GDNF in an organotypic culture model of Parkinson's disease, *Brain Res* 1378: 105-118.

STANLEY LC, MRAK RE, WOODY RC, PERROT LJ, ZHANG S, et al. (1994):  
Glial cytokines as neuropathogenic factors in HIV infection: pathogenic similarities to Alzheimer's disease, *J Neuropathol Exp Neurol* 53(3): 231-238.

STEFANSSON E, WILSON CA, SCHOEN T, KUWABARA T (1988):  
Experimental ischemia induces cell mitosis in the adult rat retina, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29(7): 1050-1055.

STERNBERG EM, HILL JM, CHROUSOS GP, KAMILARIS T, LISTWAK SJ, et al. (1989):  
Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(7): 2374-2378.

STEVENS B, ALLEN NJ, VAZQUEZ LE, HOWELL GR, CHRISTOPHERSON KS, et al. (2007):

The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination, *Cell* 131(6): 1164-1178.

STOKIN GB, LILLO C, FALZONE TL, BRUSCH RG, ROCKENSTEIN E, et al. (2005):  
Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Science* 307(5713): 1282-1288.

STONE J, HOFFMANN KP (1972):

Very slow-conducting ganglion cells in the cat's retina: a major, new functional type?, *Brain Res* 43(2): 610-616.

STONE J, KEENS J (1980):

Distribution of small and medium-sized ganglion cells in the cat's retina, *J Comp Neurol* 192(2): 235-246.

STREILEIN JW (1999):

Immunologic privilege of the eye, *Springer Semin Immunopathol* 21(2): 95-111.

SUETSUGU S, TAKENAWA T (2003):

Regulation of cortical actin networks in cell migration, *Int Rev Cytol* 229: 245-286.

SUGIMOTO E, AIHARA M, OTA T, ARAIE M (2006):

Effect of light cycle on 24-hour pattern of mouse intraocular pressure, *J Glaucoma* 15(6): 505-511.

SUGIYAMA T, MORIYA S, OKU H, AZUMA I (1995):

Association of endothelin-1 with normal tension glaucoma: clinical and fundamental studies, *Surv Ophthalmol* 39 Suppl 1: S49-56.

SULLIVAN KF, CLEVELAND DW (1986):

Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(12): 4327-4331.

SZABO ME, DROY-LEFAIX MT, DOLY M, CARRE C, BRAQUET P (1991):

Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina. Demonstration of a free radical-mediated mechanism, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(5): 1471-1478.

TEZEL G (2009):

The role of glia, mitochondria, and the immune system in glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(3): 1001-1012.

TEZEL G, CHAUHAN BC, LEBLANC RP, WAX MB (2003a):

Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(7): 3025-3033.

- TEZEL G, EDWARD DP, WAX MB (1999):  
Serum autoantibodies to optic nerve head glycosaminoglycans in patients with glaucoma, *Arch Ophthalmol* 117(7): 917-924.
- TEZEL G, HERNANDEZ R, WAX MB (2000c):  
Immunostaining of heat shock proteins in the retina and optic nerve head of normal and glaucomatous eyes, *Arch Ophthalmol* 118(4): 511-518.
- TEZEL G, KASS MA, KOLKER AE, BECKER B, WAX MB (1997):  
Plasma and aqueous humor endothelin levels in primary open-angle glaucoma, *J Glaucoma* 6(2): 83-89.
- TEZEL G, SEIGEL GM, WAX MB (1998):  
Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(12): 2277-2287.
- TEZEL G, WAX MB (2000a):  
Increased production of tumor necrosis factor-alpha by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells, *J Neurosci* 20(23): 8693-8700.
- TEZEL G, WAX MB (2000b):  
The mechanisms of hsp27 antibody-mediated apoptosis in retinal neuronal cells, *J Neurosci* 20(10): 3552-3562.
- TEZEL G, WAX MB (2003b):  
Glial modulation of retinal ganglion cell death in glaucoma, *J Glaucoma* 12(1): 63-68.
- TEZEL G, WAX MB (2004):  
The immune system and glaucoma, *Curr Opin Ophthalmol* 15(2): 80-84.
- TEZEL G, WAX MB (2007):  
Glaucoma, *Chem Immunol Allergy* 92: 221-227.
- TEZEL G, YANG X, LUO C, KAIN AD, POWELL DW, et al. (2010):  
Oxidative stress and the regulation of complement activation in human glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(10): 5071-5082.
- TÓTH J, HOLLERRIEDER J, SÓTONYI P (2010):  
*Augenheilkunde beim Pferd Lehrbuch und Atlas*, Schattauer GmbH, Stuttgart.
- TRAMPISCH HJ, WINDELER J (2000):  
*Medizinische Statistik, zweite Auflage*, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- TREPEL M (2008):  
*Neuroanatomie Struktur und Funktion*, München: Elsevier.



TSCHG Tierschutzgesetz in der Fassung vom 18. Mai 2006, zuletzt geändert 9.12.2010, <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/tierschg/gesamt.pdf> letzter Zugriff 18.03.2011.

TUCCARI G, TROMBETTA C, GIARDINELLI MM, ARENA F, BARRESI G (1986): Distribution of glial fibrillary acidic protein in normal and gliotic human retina, *Basic Appl Histochem* 30(4): 425-432.

UEDA J, SAWAGUCHI S, HANYU T, YAOEDA K, FUKUCHI T, et al. (1998): Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink, *Jpn J Ophthalmol* 42(5): 337-344.

URCOLA JH, HERNANDEZ M, VECINO E (2006): Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death, *Exp Eye Res* 83(2): 429-437.

VAN DER ZYPEN E (1977): Experimental morphological study on structure and function of the filtration angle of the rat eye, *Ophthalmologica* 174(5): 285-298.

VAN DOOREMAL JC (1873): Die Entwicklung der in fremden Grund versetzten lebenden Gewebe, *Albrecht von Graefes Arch Ophthalmol* 19: 358-373.

VAN VELTHOVEN ME, FABER DJ, VERBRAAK FD, VAN LEEUWEN TG, DE SMET MD (2007): Recent developments in optical coherence tomography for imaging the retina, *Prog Retin Eye Res* 26(1): 57-77.

VANDEKERCKHOVE J, WEBER K (1978): At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide, *J Mol Biol* 126(4): 783-802.

VERHEY KJ, GAERTIG J (2007): The tubulin code, *Cell Cycle* 6(17): 2152-2160.

VIDAL-SANZ M, LAFUENTE MP, MAYOR-TORROGLOSA S, AGUILERA ME, MIRALLES DE IMPERIAL J, et al. (2001): Brimonidine's neuroprotective effects against transient ischaemia-induced retinal ganglion cell death, *Eur J Ophthalmol* 11 Suppl 2: S36-40.

WALDE I (1984): [Classification of glaucoma in the dog], *Tierarztl Prax* 12(1): 65-78.

WALDE I, NELL B, SCHÄFFER EH, KÖSTLIN RG (2008):  
Augenheilkunde Lehrbuch und Atlas Hund, Katze, Kaninchen und Meerschweinchen,  
Stuttgart; New York, Schattauer.

WALDE I, RAPP E (1992):  
Das Glaukom der Katze- klinische und morphologische Aspekte (Retrospektive  
Studie an 38 Fällen), Wiener Tierärztliche Monatsschrift 79: 309-328.

WANG L, CIOFFI GA, CULL G, DONG J, FORTUNE B (2002):  
Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma, Invest  
Ophthalmol Vis Sci 43(4): 1088-1094.

WANG X, TAY SS, NG YK (2000):  
An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinae of rats  
with experimental glaucoma, Exp Brain Res 132(4): 476-484.

WARD MS, KHOUBEHI A, LAVIK EB, LANGER R, YOUNG MJ (2007):  
Neuroprotection of retinal ganglion cells in DBA/2J mice with GDNF-loaded  
biodegradable microspheres, J Pharm Sci 96(3): 558-568.

WATSON P (1970):  
Comparative aspects of glaucoma, J Small Anim Pract 11(2): 129-140.

WAX MB (2000):  
Glaucoma: An Autoimmune Disease in Some Patients?, Reserach to prevent  
blindness.

WAX MB (2010):  
The case for autoimmunity in glaucoma, Exp Eye Res.

WAX MB, TEZEL G, EDWARD PD (1998a):  
Clinical and ocular histopathological findings in a patient with normal-pressure  
glaucoma, Arch Ophthalmol 116(8): 993-1001.

WAX MB, TEZEL G, SAITO I, GUPTA RS, HARLEY JB, et al. (1998b):  
Anti-Ro/SS-A positivity and heat shock protein antibodies in patients with normal-  
pressure glaucoma, Am J Ophthalmol 125(2): 145-157.

WAX MB, TEZEL G, YANG J, PENG G, PATIL RV, et al. (2008):  
Induced autoimmunity to heat shock proteins elicits glaucomatous loss of retinal  
ganglion cell neurons via activated T-cell-derived fas-ligand, J Neurosci 28(46):  
12085-12096.

WAX MB, YANG J, TEZEL G, PENG G, PATIL RV, et al. (2002):  
A model of experimental autoimmune glaucoma in rats elicited by immunization with  
heat shock protein 27, ARVO E-Abstract 2884.

- WEBER AJ, KAUFMAN PL, HUBBARD WC (1998):  
Morphology of single ganglion cells in the glaucomatous primate retina, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(12): 2304-2320.
- WEGENER J, GALLA HJ (1996):  
The role of non-lamellar lipid structures in the formation of tight junctions, *Chem. Physiol. Lipids*. 81(2): 229-255.
- WEINREB RN, LINDSEY JD (2005):  
The importance of models in glaucoma research, *J Glaucoma* 14(4): 302-304.
- WENDLANDT JT, GRUS FH, HANSEN BH, SINGER HS (2001):  
Striatal antibodies in children with Tourette's syndrome: multivariate discriminant analysis of IgG repertoires, *J Neuroimmunol* 119(1): 106-113.
- WHITEMAN AL, KLAUSS G, MILLER PE, DUBIELZIG RR (2002):  
Morphologic features of degeneration and cell death in the neurosensory retina in dogs with primary angle-closure glaucoma, *Am J Vet Res* 63(2): 257-261.
- WILCOCK BP, PEIFFER RL, JR., DAVIDSON MG (1990):  
The causes of glaucoma in cats, *Vet Pathol* 27(1): 35-40.
- WINGATE RJ (1996):  
Retinal ganglion cell dendritic development and its control. Filling the gaps, *Mol Neurobiol* 12(2): 133-144.
- WINTER FC (1955):  
The second eye in acute, primary, shallow-chamber angle glaucoma, *Am J Ophthalmol* 40(4): 557-558.
- WU KH, MADIGAN MC, BILLSON FA, PENFOLD PL (2003):  
Differential expression of GFAP in early v late AMD: a quantitative analysis, *Br J Ophthalmol* 87(9): 1159-1166.
- XIANG M, ZHOU L, MACKE JP, YOSHIOKA T, HENDRY SH, et al. (1995):  
The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons, *J Neurosci* 15(7 Pt 1): 4762-4785.
- XU H, MANIVANNAN A, JIANG HR, LIVERSIDGE J, SHARP PF, et al. (2004):  
Recruitment of IFN-gamma-producing (Th1-like) cells into the inflamed retina in vivo is preferentially regulated by P-selectin glycoprotein ligand 1:P/E-selectin interactions, *J Immunol* 172(5): 3215-3224.
- YAN Q, WANG J, MATHESON CR, URICH JL (1999):  
Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF), *J Neurobiol* 38(3): 382-390.

- YANG J, TEZEL G, PATIL RV, ROMANO C, WAX MB (2001):  
Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(6): 1273-1276.
- ZEIMER R, SHAHIDI M, MORI M, ZOU S, ASRANI S (1996):  
A new method for rapid mapping of the retinal thickness at the posterior pole, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(10): 1994-2001.
- ZHANG DK, HE FQ, LI TK, PANG XH, CUI DE J, et al. (2010):  
Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis, *J Pathol* 222(2): 213-222.
- ZHU B, GULERIA I, KHOSROSHAHI A, CHITNIS T, IMITOLA J, et al. (2006):  
Differential role of programmed death-ligand 1 [corrected] and programmed death-ligand 2 [corrected] in regulating the susceptibility and chronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol* 176(6): 3480-3489.
- ZIMMER DB, CORNWALL EH, LANDAR A, SONG W (1995):  
The S100 protein family: history, function, and expression, *Brain Res Bull* 37(4): 417-429.
- ZIMMERMANN CW, EBLEN F, HERZAU V, REINAUER KM (1989):  
The diagnostic value of serum autoantibodies in endocrine orbitopathy and idiopathic ocular myositis, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 227(6): 521-525.
- ZIMMERMANN CW, WEISS G (1987):  
Antibodies not directed against the acetylcholine receptor in myasthenia gravis. An immunoblot study, *J Neuroimmunol* 16(2): 225-236.
- ZUCKERMAN JE, HERSCHMAN HR, LEVINE L (1970):  
Appearance of a brain specific antigen (th S-100 protein) during human foetal development, *J Neurochem* 17(2): 247-251.

## 10 ANHANG

### Verwendete Materialien und Chemikalien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Acetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Alkohol 70% (Hautdesinfektion)	Nedalco, Heilbronn
Aqua dest.	Apotheke, Uniklinik Mainz
Bechergläser	Schott, Mainz
β-Aktin (β-actin)	Biotrend, Köln
Deckgläser	Diagonal, Münster
Diskus PC-Programm 4.30.5	Technisches Büro Hilgers, Königswinter
Einmalhandschuhe	MaiMed, Neuenkirchen
Einmalnadeln 20 G 0,9x4mm	BD, Heidelberg
Einmalnadeln 27 G 0,4x25mm	Braun, Melsungen
Einmalpasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalskalpelle (steril)	Feather, Osaka, Japan
Einmalspritzen Injekt-F 1ml	Braun, Melsungen
Einmalspritzen, Luer-Lok 1 ml	BD, Heidelberg
Eppendorftube-Ständer	Fisher, Frankfurt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Eukitt (Eindeckmedium)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Exikator	Kartell, Binasco, Italien
Floxal Augensalbe	Bausch & Lomb GmbH, Berlin
Forene (Isofluran)	Abott, Wiesbaden
Formalin 4%	Apotheke, Uniklinik Mainz
Freund`s Adjuvant, inkomplett	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr premium, Biberach
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Hanau
GDNF	Biotrend, Köln
GFAP	Biotrend, Köln
Heiz- und Magnetrührer, VarioMag	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Heizkissen	Breuer, Ulm
Histogefäße	Labor, Uniklinik Mainz

HPLC-Wasser	J.T. Baker, Deventer, Holland
HSP 27	AtGen, Yatap-dong, Südkorea
Image J 1.42q	National institutes of Health, USA
Infrarotlampe	Philips, Drachten, Holland
Inhalationsnarkosegerät, Trajan 808	Dräger, Wiesbaden
2-Propanol (Isopropanol)	Merck, Darmstadt
Kaltlichtquelle Macrospot 1500	Kaiser Fototechnik, Buchen
Kamera Cyber Shot 7.2 M Pixel	Sony, Berlin
Kamera Hitachi HV-C20 A	Hitachi, Tokyo, Japan
Kohlendioxidflasche	AirLiquide Medical GmbH, Düsseldorf
Kresylblau	Merck, Darmstadt
Lewis Ratten	Charles River Laboratorien, Sulzfeld
Methocel 2%	Omni Vision, Puchheim
Mikroliter Syringe	Hamilton, Bonadur, Schweiz
Mikroskop	Olympus, Japan
MS Office 2003 und XP	Microsoft, USA
Mydriatikum Stulln	Pharma Stull, Stulln
NaCl- Lösung 0,9%	Braun, Melsungen
Nagertransportbox	Zoohandlung, Mainz
Novesine 0,4% (Lokalanästhetikum)	Omni Vision GmbH, Puchheim
Objektträger Superfrost plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Op-Mikroskop	Zeiss, Dresden
Papiertücher (Kleenex)	igefa, Ahrensfelde OT Blumberg
Paraformaldehyd	Apotheke, Uniklinik Mainz
Personal Computer	Samsung, Korea
Pertussis Toxin	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	Invitrogen, Paisley, England
Pinzetten	neoLab, Heidelberg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Präparierbesteck	Geuder AG, Heidelberg
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen
Probenfläschchen, Wheaton 4ml	Neolab, Heidelberg
Rattenblutentnahmehalterung	VWR, Dietikon, Schweiz

S100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Safe Lock Tubes versch. Größen	Eppendorf, Hamburg
Saugunterlagen Molinea 60x40 cm	Hartmann, Heidenheim
Sauerstoffflasche	AirLiquide Medical GmbH, Düsseldorf
Schnappdeckelgläser 30 ml	VWR, West Chester, PA, USA
Schutzbrille	Uvex, Fürth
Sharpsafe Sammelbehälter	Frontier Medical Products, Köln
Statistica Version 8.0	Statsoft, Hamburg
Stoppuhr	Fisher, Frankfurt
Tonopen	Medtronic, Jacksonville, USA
Tonopen Tip Covers	Medtronic Jacksonville, USA
Tubulin (Bovine brain)	Cytoskeleton Inc., Denver , USA
Waage	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Xylol Ersatzmedium	national diagnostics, Dia Tec, Bamberg
Zentrifuge, Biofuge primo R	Heraeus, Hanau

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Kramer für seine ständige selbstverständliche Hilfe und seine stetige, unermüdliche Geduld bei der Betreuung dieser Arbeit und die allzeit schnelle Beantwortung meiner vielen Fragen bedanken.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Grus herzlich für die freundliche Unterstützung, die gute Betreuung und die Ermöglichung dieser Arbeit im Labor der Experimentellen Ophthalmologie der Uniklinik Mainz danken.

Ein weiteres großes „Dankeschön“ geht an Frau Dr. Joachim für die unermüdliche Hilfe, wissenschaftliche Beratung und Betreuung bei der Laborarbeit.

An dieser Stelle möchte ich mich ebenfalls bei allen Mitarbeitern der Experimentellen Ophthalmologie der Uniklinik Mainz und der Klinik für Kleintiere (Chirurgie) der Uni Gießen bedanken, die mich während der Entstehung dieser Arbeit unterstützt und immer wieder ermutigt haben.

Ich danke Jörn für die selbstverständliche Hilfe bei vielen technischen Problemen mit dem Laptop, verschiedenen Computerprogrammen, das wiederholte Korrekturlesen und die Aufmunterung sowie die konstruktive Kritik wann immer ich sie brauchte.

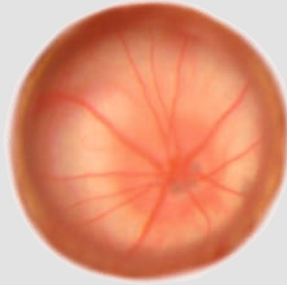
Meinen Eltern danke ich für viel Verständnis, Hilfe und Aufmunterung während der Anfertigung dieser Arbeit.



## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Jennifer Schiwiek



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5920-0



9 783835 195920 0