



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Characterization of the retinal neurovascular unit in zebrafish

Autor: Chiara Simone Middel
Institut / Klinik: European Center for Angioscience (ECAS)
Doktorvater: Prof. Dr. J. Kroll

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) ist in den letzten Jahren ein etabliertes Tiermodell für Netzhauterkrankungen geworden. In einem Großteil der Studien wurde hierbei der Fokus auf vaskuläre und neuronale Pathologien gelegt. Bei vielen Netzhauterkrankungen, wie beispielsweise der diabetischen Retinopathie, ist allerdings bekannt, dass die gesamte neurovaskuläre Einheit, bestehend aus Neuronen, retinalen Makro- (insbesondere Müller Glia) und Mikroglia sowie den Zellen der Blutgefäßwand (Endothelzellen und Gefäßwandzellen/Perizyten), von den Veränderungen betroffen ist.

Diese Dissertation hatte dementsprechend das Ziel herauszufinden, ob alle Zellen der neurovaskulären Einheit auch in der Zebrafisch Retina vorhanden sind, sowie Methoden zu etablieren, die im Zebrafisch verwendet werden können, um die neurovaskuläre Einheit in der Retina zu analysieren. Diese Methoden wurden danach angewandt, um die Retinae von *pdx1^{+/-}* Zebrafischmutanten zu analysieren, da diese Mutante in den letzten Jahren als potenzielles Tiermodell für diabetische Retinopathie etabliert wurde.

Das Protokoll, das in den Retinae von Säugetieren verwendet wird, um den Verlust von Neuronen darzustellen, konnte ohne Veränderungen für den Zebrafisch übernommen werden. Es wurden Retinae von *pdx1^{+/-}* Zebrafisch zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (4 Monate nach der Fertilisation (mpf = months post fertilisation), 12mpf und 20mpf). Die Dicke der Gesamtretina war sowohl zum Zeitpunkt 4mpf als auch zum Zeitpunkt 12mpf bei *pdx1^{+/-}* Zebrafischen verringert. Diese Veränderung war zum Zeitpunkt 20mpf nicht mehr nachweisbar, was wiederum dafürspricht, dass dazwischen Regeneration stattgefunden haben muss. Dementsprechend ist es im Zebrafisch schwierig, potenzielle Zeichen der Neurodegeneration abzubilden.

Für den Nachweis von proliferierenden Zellen in der Retina wurde der etablierte Marker „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) verwendet. In der Retina von *pdx1^{+/-}* Mutanten konnte keine erhöhte Rate an proliferierenden Zellen festgestellt werden.

Bei der Analyse der Müller Glia stellten wir fest, dass im Gegensatz zu Säugetieren, deren Müller Glia den Marker „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) nur exprimieren, wenn sie aktiviert sind, die Müller Glia in der Zebrafischretina dauerhaft GFAP exprimieren. Um dennoch feststellen zu können, ob die Müller Glia in der Zebrafischretina aktiviert waren, modifizierten wir das im Säugetier etablierte Protokoll. Um einen Vergleich zwischen den Gruppen zu ermöglichen, zählten wir die GFAP positiven Zellen in den jeweiligen Gruppen. Bei der *pdx1^{+/-}* Zebrafischlinie konnten wir keinen Unterschied in der Anzahl der GFAP-positiven Zellen zwischen Mutanten und Kontrollen feststellen.

Als Marker für die Identifikation von Mikroglia wurde L-Plastin verwendet. In den Retinae von *pdx1^{+/-}* Zebrafischen waren nicht mehr L-Plastin positive Zellen zu finden als in der Kontrollgruppe.

In der Retina von *pdx1^{+/-}* Zebrafischen wurde bereits nachgewiesen, dass verstärkte Angiogenese ab dem Alter von 18mpf festgestellt werden kann. Um quantifizieren zu können, ob die Zellen der Gefäßwände im Zebrafisch beeinträchtigt waren, wurde das Digestionsprotokoll, das in der Säugerretina regelhaft verwendet wird, auf den Zebrafisch angepasst. Die Endothelzellen und Gefäßwandzellen wurden identifiziert und es wurde ausgewertet, wie viele Endothelzellen und Gefäßwandzellen normalerweise in der adulten Zebrafischretina pro Quadratmillimeter vorkommen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte bei *pdx1^{+/-}* Zebrafischen kein Endothelzell- oder Gefäßwandzellverlust nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass alle beteiligten Zellen der neurovaskulären Einheit, die aus der Retina von Säugetieren bekannt sind, auch in der Retina von Zebrafischen vorkommen. Allerdings scheint es, als würden sie zumindest in der *pdx1^{+/-}* Zebrafischlinie nicht so interagieren, wie dies von Experimenten in Säugetieren zu erwarten wäre. Dies ist ein Hinweis, dass die Reaktion der Zebrafischretina auf Umgebungseinflüsse wie Hyperglykämie eventuell anders ausfällt als dies aus der Retina von Säugetieren bekannt ist. An dieser Stelle ist weitere Forschung von Nöten. Um zukünftige Arbeiten an der Zebrafischretina zu erleichtern, werden mit dieser Dissertation detaillierte und nachvollziehbare Protokolle zur Verfügung gestellt, um die Komponenten der retinalen neurovaskulären Einheit zu analysieren.