Universität Rostock Traditio et Innovatio

Universitätsmedizin Rostock

Aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Markus Tiedge

Altersabhängige Auswirkungen eines RAGE-Knockout in Bezug auf den B6/J Mausstamm mit Fokus auf die Retina

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZIN

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

ERSTGUTACHTER: PROF. DR. RER. NAT. OLIVER STACHS

EINRICHTUNG: KLINIK UND POLIKLINIK FÜR AUGENHEILKUNDE, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

ZWEITGUTACHTER: PROF. DR. OLIVER SCHMITT

EINRICHTUNG: INSTITUT FÜR ANATOMIE, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DRITTGUTACHTER: PROF. DR. STEPHAN SCHERNECK

EINRICHTUNG: INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE, TOXIKOLOGIE UND KLINISCHE PHARMAZIE, TECHNISCHE UNIVERSITÄT BRAUNSCHWEIG

VORGELEGT VON:

MAX VOM BROCKE | GEB. AM (26.05.1996) IN (LÜDENSCHEID)

AUS (LAUFENBURG)

ROSTOCK | (15.08.2021)

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004286

DOKTORARBEIT

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

1 Inhaltsverzeichnis

2 Einleitung ... 1

2.1 Alterung und altersbedingte Erkrankungen ... 1

2.1.1 Demografischer Wandel ... 1

2.1.2 Gesundheit und Krankheit im Alter ... 1

2.1.2.1 kardiovaskuläre Erkrankungen ... 2

2.1.2.2 Demenz ... 3

2.1.2.3 Diabetes mellitus ... 4

2.1.2.4 Diabetes mellitus Typ II ... 5

2.2 Komplikationen des Diabetes mellitus ... 6

2.3 kardiovaskuläre Erkrankungen ... 6

2.4 Diabetische Nephropathie ... 7

2.5 Retina Aufbau und Strukturen ... 8

2.5.1 Histologischer Aufbau der Retina ... 8

2.5.2 Blutgefäßversorgung der Retina ... 10

2.5.3 Pathologien der Retina ... 11

2.5.3.1 altersbedingte Makuladegeneration ... 12

2.5.3.2 diabetische Retinopathie ... 13

2.5.3.2.1 Neurovaskuläre Einheit in der diabetischen Retinopathie ... 13

2.5.3.2.2 AGEs-RAGE System in der diabetischen Retinopathie ... 15

2.5.3.3 Frühgeborenenretinopathien ... 15

2.5.4 Entwicklung der Gefäßversorgung ... 16

2.6 AGEs-RAGE System ... 17

2.6.1 Pathomechanismus ... 19

2.7 Fragestellung ... 24

3 Material und Methoden ... 25

3.1 Materialien ... 25

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien ... 25

3.1.2 Antikörper ... 25

3.1.3 Verbrauchsmaterialien ... 25

3.1.4 Geräte ... 25

3.1.5 Software ... 26

3.2 Tierexperimentelles Modell ... 26

3.3 Organentnahme und Blutentnahme ... 27

3.3.1 Präparation der Retina ... 27

3.4 Blutanalytik ... 27

3.4.1 Glukose ... 27

3.4.2 HbA1c ... 28

3.4.3 ADVIA ... 28

3.4.4 Reflotron ... 28

3.5 Immunfluoreszenz 29
3.5.1 Immunfluoreszenz der Gefäße 29
3.5.2 Immunfluoreszenz der Gliazellen 29
3.6 Eindecken der Retina 30
3.7 Fluoreszenzmikroskopie mit dem Fluoview 10i 30
3.8 Bildbearbeitung mittels Imaris 31
3.9 Statistische Auswertung 32

4 Ergebnisse 33
4.1 Blutanalytik 33
4.1.1 Blutzucker 33
4.1.2 HbA1c 34
4.1.3 Blutfettwerte 35
4.1.3.1 Triglyceride 35
4.1.3.2 HDL 36
4.1.4 Blutbild 37
4.2 Gewichtsverlauf 40
4.3 Retina 40
4.3.1 Oberflächlicher Gefäßplexus 43
4.3.2 Intermediärer Gefäßplexus 46
4.3.3 Tiefer Gefäßplexus 49
4.3.4 Vergleich der Schichten des Gefäßplexus über die Zeit in den Stämmen 52
4.3.5 Vergleich des gesamten Gefäßplexus zwischen den Stämmen 54
4.3.6 Pericyten 55
4.3.7 Fluoreszenzmikroskopische Bilder der Astrozyten 56
4.4 Genexpression 59
4.4.1 Enzyme der antioxidativen Abwehr in der Retina 59
4.4.2 Expression des RAGE in der Retina 62

5 Diskussion 63
5.1 Blutanalytik 64
5.1.1 Blutzucker und HbA1c der RAxYFP Tiere im Vergleich mit den YFP Tieren 64
5.1.2 Fettstoffwechsel und Gewicht der RAxYFP Tiere im Vergleich mit den YFP-Tieren 64
5.1.3 Das Blutbild der RAxYFP Tiere im Vergleich mit den YFP-Tieren 65
5.2 Das retinale Gefäßsystem der RAxYFP Tiere im Vergleich mit den YFP-Tieren 67
5.3 Die antioxidative Abwehr in der Retina der RAxYFP Tiere im Vergleich mit den YFP-Tieren 69
5.4 Die Expression des RAGE in der Retina der RAxYFP Tiere im Vergleich mit den YFP Tieren 71
5.5 Ausblick 72

6 Zusammenfassung 72

7 Thesen 75

8 Anhang 76

8.1 Enzyme der antioxidativen Abwehr in der Cornea 76

9 Literatur 79

10 Danksagung 89

12 Eidesstattliche Versicherung 90

13 Lebenslauf 91

Abkürzungsverzeichnis

A	Arteria
Aa	Arteriae
AGE	Advanced Glycation Endproducts
Akt	protein kinase B
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
BMI	Body Mass Index
BRB	Blut-Retina-Schranke
Cdc42	Zellteilungskontrollprotein - Homolog 42
CFH	Complement Factor H
DCP	tiefer Gefäßplexus
DM	Diabetes mellitus
DMII	Typ-2-Diabetes
DN	Diabetische Nephropathie
DR	diabetische Retinopathie
DVC	tiefer Gefäßkomplex
Egr1	Early growth response protein 1
EPC	Endothelial Progenitor Zellen
Erk	extracellular-signal regulated kinase
ET-1	Endothelin-1
GABA	γ-Aminobuttersäure
GCL	Ganglionzellschicht
HDL	High Density Lipoprotein
Hif-1α	Hypoxia-inducible Factor 1 alpha
HMGB1	high mobility group box-1
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1
ICP	intermediärer Gefäßplexus
IGF-1	Insulin-like-growth factor
IL-1β	Interleukin-1β
INL	innere Körnerschicht
IPL	innere plexiforme Schicht
JAK	Januskinase
KHK	koronare Herzkrankheit

LADA	latent autoimmune diabetes in adults
LDL	Low density lipoprotein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monozyten chemoattractant Protein 1
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
N	Nervus
NF-κB	nukleäre Transkriptionsfaktoren
NFL	Nervenfaserschicht
NO	Stickstoffmonoxid
OCTA	Optische Kohärenztomographie Angiographie
ONL	äußere Körnerschicht
OPL	äußere plexiforme Schicht und Henle‘s Faserschicht
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PR	Photorezeptorenschicht
RAAS	renin-angiotensin-aldosterone-system
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
RhoA	Ras homolog family member A
ROP	Frühgeborenenretinopathie
ROS	reaktive Sauerstoffspezies,
RPCP	radial peripapillary capillary plexus
RPE	retinales Pigmentepithel
SGLT2	sodium glucose Transporter 2
sRAGE	soluble receptor for advanced glycation endproducts
STAT	signal transducers and activators of transcription
SVC	oberflächlicher Gefäßkomplex
SVP	oberflächlicher Gefäßplexus
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Vena
VCAM-1	Vascular Zelladhäsionsmolekül 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 2-1: Anzahl 65- bis 79- jährige bzw. 80- jährige und älter kommen auf 1000 Einwohner im erwerbsfähigen Alter (20 bis 64 Jahre)..... 1
Abbildung 2-2: Die zehn häufigsten Diagnosen für Krankenhausbehandlungen ab 65 Jahren 3
Abbildung 2-3: Prävalenz von Diabetes mellitus nach Alter und Geschlecht..... 5
Abbildung 2-4: Risikoerhöhung kardiovaskulärer Erkrankungen durch Diabetes 7
Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der Schichtung von Retina und Aderhaut.....10
Abbildung 2-6: Anatomische Lokalisation des Gefäßplexus in der menschlichen Retina im Bereich der Macula lutea. 11
Abbildung 2-7: Prozentuale Darstellung der Erblindungsursachen (Rheinland 2006) 11
Abbildung 2-8: Die neurovaskuläre Einheit und beispielhaft deren Veränderungen bei der diabetischen Retinopathie 14
Abbildung 2-9: Entwicklung des oberflächlichen Gefäßplexus in der Maus.....17
Abbildung 2-10: Bildung von advanced glycation endproducts und die Effekte der Bindung von verschiedenen AGE-Rezeptoren AGE-R1= AGE Rezeptor R1; AGE-R2= AGE Rezeptor R2; AGE-R3= AGE Rezeptor R3; RAGE= Rezeptor für advanced glycation endproducts; sRAGE= soluble-form RAGE (52). 19
Abbildung 2-11: RAGE Liganden.....20
Abbildung 2-12: GPX-1 wandelt Wasserstoffperoxid in Wasser um (47).....22
Abbildung 2-13: Zelluläre und molekulärer Pathomechanismus ausgewählter AGE-RAGE Interaktion 23
Abbildung 3-1: Indirekte Immunhistochemie (Färbung der Gliazellen). Modifiziert nach (81). 30
Abbildung 3-2: Einschneiden der Retina (79) 30
Abbildung 3-3: Charakterisierung von Pericyten [modifiziert nach (84)] (links) und Auszählung der Pericyten (markiert mit Pfeilen) im „Slice-View“ exemplarisch gezeigt an einer 9 Monate alten RAxYFP Maus (rechts). 32
Abbildung 4-1: Blutglukose von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen 34
Abbildung 4-2: HbA1c von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen 35
Abbildung 4-3: Triglyceride von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen 36
Abbildung 4-4: HDL von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen 37

Abbildung 4-5: Blutbild von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen 39
Abbildung 4-6: Gewichtsverlauf von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen, Weibchen (w) versus Männchen (m).....40
Abbildung 4-7: Darstellung der Bildbearbeitung und Auswertung der mittels Isolectin B4 + Alexa 594 angefärbten Gefäße in der Retina am Beispiel einer 9 Monate alten weiblichen Maus des YFP-Kontrollstamm.....42
Abbildung 4-8 Das Volumen des oberflächlichen Gefäßplexus von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen 43
Abbildung 4-9: Exemplarische Darstellung des oberflächlichen Gefäßplexus jeweils eines RAxYFP (linke Spalte) und YFP (rechte Spalte) Tiers im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen. 45
Abbildung 4-10: Das Volumen des intermediären Gefäßplexus von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen 46
Abbildung 4-11: Exemplarische Darstellung des intermediären Gefäßplexus jeweils eines RAxYFP (linke Spalte) und YFP (rechte Spalte) Tiers im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen. 48
Abbildung 4-12: Das Volumen des tiefen Gefäßplexus von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen.....49
Abbildung 4-13: Exemplarische Darstellung des tiefen Gefäßplexus jeweils eines RAxYFP (linke Spalte) und YFP (rechte Spalte) Tiers im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen.....51
Abbildung 4-14: Das Volumen der einzelnen Schichten des retinalen Gefäßplexus im Alterungsprozess des RAxYFP Stammes.....52
Abbildung 4-15: Das Volumen der einzelnen Schichten des retinalen Gefäßplexus im Alterungsprozess des YFP Stammes 53
Abbildung 4-16: Das Volumen des gesamten retinalen Gefäßplexus im Alterungsprozess der RAxYFP (orange) und YFP (schwarz) Stammes 54
Abbildung 4-17: Die Anzahl der Pericyten von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tiere im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen.....55
Abbildung 4-18: Exemplarische Darstellung der mittels GFAP angefärbten Astrozyten (blau) und deren Interaktion mit dem oberflächlichen Gefäßplexus (rot) jeweils eines RAxYFP (linke Spalte) und YFP (rechte Spalte) Tiers im Alter von 12, 36 und 72 Wochen. 58
Abbildung 4-19: Genexpressionsanalyse der Retina von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen.....61
Abbildung 4-21: Genexpressionsanalyse des membranären Anteil des RAGE in der Retina von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen.....62

Abbildung 5-1 Altersvergleich zwischen Maus (in Wochen) und Mensch (in Jahren) [modifiziert nach (94)] 64
Abbildung 5-2: Übersicht über die signifikanten Unterschiede des RAxYFP- im Vergleich mit YFP-Stamm in den Altersgruppen der 4,12, 36 und 72 Wochen alten Tieren. 67
Abbildung 8-1: Genexpressionsanalyse der Cornea von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen 78

2 Einleitung

2.1 Alterung und altersbedingte Erkrankungen

2.1.1 Demografischer Wandel

Seit Ende des 19 Jahrhunderts hat sich durch verbesserte Lebensbedingungen in Deutschland, vor allem durch gestiegenem materieller Wohlstand, Fortschritte in der medizinischen Versorgung, Hygiene, Ernährung sowie der Arbeits- und Wohnsituation, die Lebenserwartung mehr als verdoppelt (1). Die Zahl der Menschen im Alter ab 67 Jahren stieg zwischen 1990 und 2018 um 54 % von 10,4 Millionen auf 15,9 Millionen. In den nächsten 20 Jahren wird diese Zahl um weitere 5 bis 6 Millionen auf mindestens 20,9 Millionen wachsen (1). Auch die Altersgruppe der Menschen über 80 Jahre wird weiter steigen. Durch die geringe Geburtenrate und dem älter werden der geburtenstarken Jahrgänge kommt es zu einer alternden Gesellschaft, bei der in Deutschland der Anteil der alten Menschen größer wird. Die Gesundheit und vor allem Prävention und Behandlung von Krankheiten der alternden Gesellschaft wird einer wachsenden Bedeutung zukommen.

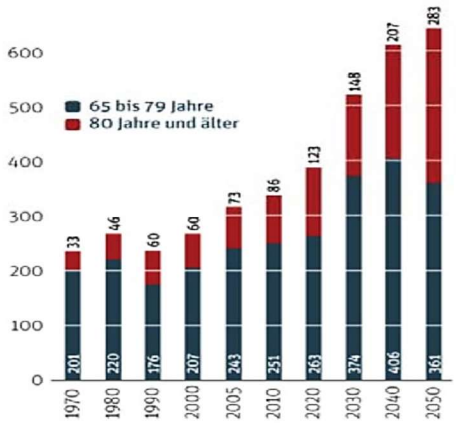


Abbildung 2-1: Anzahl 65- bis 79- jährige bzw. 80- jährige und älter kommen auf 1000 Einwohner im erwerbsfähigen Alter (20 bis 64 Jahre)
In der alternden Gesellschaft wird es zu einem größeren Anteil der Ruheständler kommen. Während 2005 316 Ruheständler auf 1000 erwerbstätige Personen gekommen sind, werden es 2050 644 Ruheständler sein (2).

2.1.2 Gesundheit und Krankheit im Alter

Im fortgeschrittenen Alter steigt die Erkrankungswahrscheinlichkeit und der körperliche, kognitive Abbau, sodass die Gesundheit und damit die Lebensqualität durch zunehmende Hilfs- und Pflegebedürftigkeit abnimmt (3). In der Gerontologie wird der Beginn des Alters häufig zwischen 60 und 65 Jahren angesetzt (4). Bei der Gesundheitsberichterstattung des Bundes vom RKI: "Gesundheit und Krankheit im Alter", werden zwei Altersgruppen

unterschieden. Auf der einen Seite die Gruppe der "jungen Alten" zwischen 65 und 85 Lebensjahren. Ab 85 Jahren beginnt die Gruppe der "alten Alten" (4). 1946 wurde die Gesundheit von der WHO als "einen Zustand vollkommenen körperlichen, geistigen und sozialen Wohlbefindens und nicht alleine das Fehlen von Krankheit und Gebrechen" definiert (4). Eine Möglichkeit die Krankheit als Terminus zu definieren lautet: „Störung derjenigen Lebensvorgänge, die den Organismus eines Menschen oder Teile davon so verändern, dass dieser klinisch oder sozial hilfsbedürftig wird“ (5). Diese oben genannten Definitionen zeigen die Mehrdimensionalität von Gesundheit und Krankheit auf. Es lässt sich unter anderem zwischen somatischer und psychischer Gesundheit, funktionale Gesundheit und subjektive Gesundheit unterscheiden (4). Im Alter treten vermehrt chronische Erkrankungen und Multimorbidität auf. Ein klassisches Beispiel einer chronischen Erkrankung ist Diabetes mellitus, welche zu Komplikationen wie beispielsweise der diabetischen Retinopathie, diabetischen Neuropathie und/oder diabetischen Nephropathie führen kann (siehe Diabetes mellitus). Auch psychische Erkrankung wie die Alzheimer-Demenz korrelieren in Ihrer Prävalenz mit einem erhöhten Lebensalter (4). Im höheren Alter treten vermehrt kardiovaskuläre Erkrankung auf. Beispielhaft kann ein Apoplex mit residueller Hemiparese zu einer Gefährdung der funktionellen Gesundheit führen (4).

Unter der funktionalen Gesundheit versteht man die Fähigkeit, selbständig die eigenen Grundbedürfnisse (Essen, Körperpflege etc.) zu befriedigen und das meistern alltäglicher Aufgaben wie das Einkaufen und die Wohnungsreinigung (4). Des Weiteren konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die subjektive Gesundheit (Bewertung des eigenen Gesundheitszustandes) mit der medizinisch messbaren Gesundheit im hohen Alter, im Vergleich mit der jüngeren Altersgruppe, am geringsten übereinstimmen. Eine Seite des Erklärungsansatzes besteht in dem physiologische Alterungsprozess, der von älteren Personen oftmals als Einschränkung der Gesundheit wahrgenommen wird (4). Im höheren Lebensalter sind die selbstbestimmte Lebensführung und der Erhalt von wichtigen, alltagsrelevanten Funktionen wichtig und durch Erkrankungen gefährdet. Körperfunktionen und –strukturen, Alltagsaktivitäten und Teilhabe stehen sowohl untereinander, als auch mit möglichen Gesundheitsproblemen in Wechselwirkung und beeinflussen entscheidend die subjektive Gesundheit und Lebensqualität (3).

2.1.2.1 kardiovaskuläre Erkrankungen

Im Laufe des Lebens kommt es durch zelluläre und molekulare Mechanismen des Alterns zur Schädigung der Gefäße. In der Konsequenz entstehen altersabhängige kardiovaskuläre Erkrankungen (6). Kardiovaskuläre Erkrankungen, vor allem die koronare Herzkrankheit (KHK) und der Schlaganfall, sind nach wie vor die häufigste Todesursache und verursachen die höchsten Krankheitskosten (3). „Ab dem 65. Lebensjahr gehen bei Frauen 46,7 % und bei Männern 39,1 % der Todesfälle auf Krankheiten des Kreislaufsystems zurück (rund 190.000

beziehungsweise 130.000 Sterbefälle), ab dem 80. Lebensjahr sogar 52,6 % der Todesfälle bei Frauen und 45,5 % bei Männern (rund 120.000 beziehungsweise 50.000 Sterbefälle)“ (3). Des Weiteren sind kardiovaskuläre Erkrankungen, gerade im fortgeschrittenen Alter, die Hauptursache für Krankenhausaufenthalte (7).

RANG 2013	FRAUEN			MÄNNER		
	Diagnose (ICD-Code)	Fälle 2000	Fälle 2013	Diagnose (ICD-Code)	Fälle 2000	Fälle 2013
1	Herzinsuffizienz (I50)	128.782	189.521	Ischämische Herzkrankheiten (I20–I25)	280.516	260.001
2	Krankheiten der Wirbelsäule und des Rückens (M40–M54)	61.964	165.700	Herzinsuffizienz (I50)	80.674	162.661
3	Ischämische Herzkrankheiten (I20–I25)	220.657	159.886	Herzrhythmusstörungen (I47–I49)	69.789	123.749
4	Arthrose (M15–M19)	124.918	157.293	Krebs der Verdauungsorgane (C15–C26)	119.079	121.309
5	Herzrhythmusstörungen (I47–I49)	95.401	141.663	Krankheiten der Arterien, Arteriolen und Kapillaren (I70–I79)	75.774	107.856
6	Sonstige Krankheiten des Darmes (K55–K63)	89.620	138.834	Schlaganfall (I60–I64, ohne I62)	88.220	102.233
7	Hypertonie (Hochdruckkrankheit) (I10–I15)	81.293	137.635	Krankheiten der Wirbelsäule und des Rückens (M40–M54)	32.788	100.103
8	Verletzungen der Hüfte und des Oberschenkels (S70–S79)	101.563	122.367	Sonstige Krankheiten des Darmes (K55–K63)	49.508	96.408
9	Schlaganfall (I60–I64, ohne I62)	134.291	120.395	Episodische und paroxysmale Krankheiten des Nervensystems (G40–G47)	57.814	88.648
10	Krebs der Verdauungsorgane (C15–C26)	113.350	86.351	Krebs der Atmungsorgane und sonstiger Organe im Brustkorb (C30–C39)	74.217	82.856

Abbildung 2-2: Die zehn häufigsten Diagnosen für Krankenhausbehandlungen ab 65 Jahren
Im Alter ab 65 Jahren sind kardiovaskuläre Erkrankungen bei Männern und Frauen die Hauptursachen für Krankenhausaufenthalte (3).

Durch verbesserte Therapie und Diagnostik konnte unter anderem die Sterblichkeitsrate der kardiovaskulären Erkrankungen gesenkt werden. Außerdem ist durch verbessertes Gesundheitsverhalten und Präventionen die Inzidenzrate gesunken. Durch diese Entwicklungen konnte die Lebenserwartungen weiter steigen (siehe Demografischer Wandel) (3).

2.1.2.2 Demenz

Nach ICD-10 wird die Demenz als Syndrom, welches durch Krankheiten des Gehirns mit Störungen höherer kortikaler Funktionen einhergeht, definiert. Diese Symptome müssen über mindestens 6 Monate bestehen (8). Anhand der klinischen Symptomatik und daraus abgeleiteten Kriterien, werden die Demenzen ätiologisch zugeordnet. Demnach unterscheidet man die Demenz bei Alzheimer-Krankheit, die Vaskuläre Demenz, die gemischte Demenz, die frontotemporale Demenz, Demenz bei Morbus Parkinson und die Lewy-Körperchen-Demenz (8). Die Demenzerkrankungen sind in der Häufigkeit im hohen Maße altersabhängig. So beträgt die altersspezifische Prävalenz ab 65 Jahren 6-9%. Bei Menschen über 90 Jahre sind über 30% an Demenz erkrankt (3). Durch den demografischen Wandel ist mit einer steigenden Anzahl demenzerkrankter Personen zu rechnen (3). Demenz Erkrankung gehen mit einem hohen Pflegebedarf einher und stellen die Gesellschaft im Rahmen des demografischen Wandels vor eine Herausforderung (3). Obwohl sich die Pathophysiologie der verschiedenen Demenzformen unterscheidet, gibt es auch Überschneidungen. Eine zerbrovaskuläre

Dysfunktion ist bei allen Demenzformen von Bedeutung (9). Unter anderem metabolische Störungen, Hypoxie, Minderdurchblutung und die zerebrale Hämodynamik führen zur Schädigung der zerebralen Gefäße, die neurotoxisch wirken und eine Demenzerkrankung begünstigen (9). Die mit dem Alter assoziierten Erkrankungen wie Fettleibigkeit, Diabetes und Alzheimer Erkrankung haben überschneidende pathophysiologische Vorgänge. Vor allem oxidativer Stress/ mitochondriale Dysfunktion und Entzündung zeigen sich in den unterschiedlichen Krankheitsentitäten (10). Beispielsweise konnte eine erhöhte Konzentration von AGEs im Gehirn von Alzheimer Patienten festgestellt werden. AGEs begünstigen die Bildung von Amyloid Plaques und erhöhen deren Zytotoxizität. Außerdem führt eine erhöhte Konzentration von AGEs zu einer vermehrten Expression von RAGE, der unter anderem auch Amyloid Beta als Liganden bindet (10). Dies verdeutlicht, dass Diabetes mellitus und das Alter, die jeweils mit einer Erhöhung der AGEs einhergehen (45), auch als Risikofaktor für die Entwicklung einer Demenz gelten.

2.1.2.3 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) ist die gemeinsame Bezeichnung für heterogene Stoffwechselerkrankungen, deren gemeinsames Merkmal eine chronische Hyperglykämie ist (11). Die Klassifikation des DM unterscheidet zwischen Typ-1-Diabetes, Typ-2-Diabetes (siehe Diabetes mellitus Typ II (DMII)), anderen spezifischen Diabetesformen und dem Gestationsdiabetes. Dem Typ-1-Diabetes liegt ein absoluter Insulinmangel aufgrund einer immunologisch vermittelten B-Zell-Zerstörung zugrunde. Auch der LADA (latent autoimmune diabetes in adults) wird zum Typ-1-Diabetes gezählt. Unter anderen spezifischen Diabetesformen werden Erkrankungen des exokrinen Pankreas (z.B. Pankreatitis, Pankreaskarzinom), Endokrinopathien (z.B. Cushing-Syndrom zumeist medikamentös induziert durch Glukokortikoide), Infektionen, seltene Formen eines Diabetes im Rahmen anderer Autoimmunerkrankungen und genetische Defekte der B-Zell Funktion (z.B. MODY) oder der Insulinwirkung zusammengefasst. Der Gestationsdiabetes ist eine diagnostizierte Glukoseverwertungsstörung, die erstmals während der Schwangerschaft auftritt (12). Die Prävalenz des Diabetes mellitus steigt in der ganzen Welt. Dies liegt unter anderem in einer zunehmend ungesunden Lebensweise mit Übergewicht, in einer zunehmenden Alterung der Population aber auch einer besseren Therapie und daraus resultierendem längeren Überleben begründet. Durch die steigende Rate an übergewichtigen Kindern, tritt DMII auch vermehrt bereits im Kindesalter auf (13). Insgesamt korreliert die Prävalenz des Diabetes mellitus mit einem zunehmenden Lebensalter (13). Das metabolische Syndrom ist ein bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung des DMII und für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen (siehe kardiovaskuläre Erkrankungen). Das metabolische Syndrom umfasst den Symptomkomplex der abdominellen Adipositas (oder BMI > 30kg/m²) plus mindestens

zwei aus folgenden Faktoren: Blutdruck > 130/85 mmHg, Nüchtern-Blutzucker > 100 mg/dl, HDL-Cholesterin < 50 mg/dl (w) oder < 40 mg/dl (m) und Triglyceride > 150 mg/dl (14).

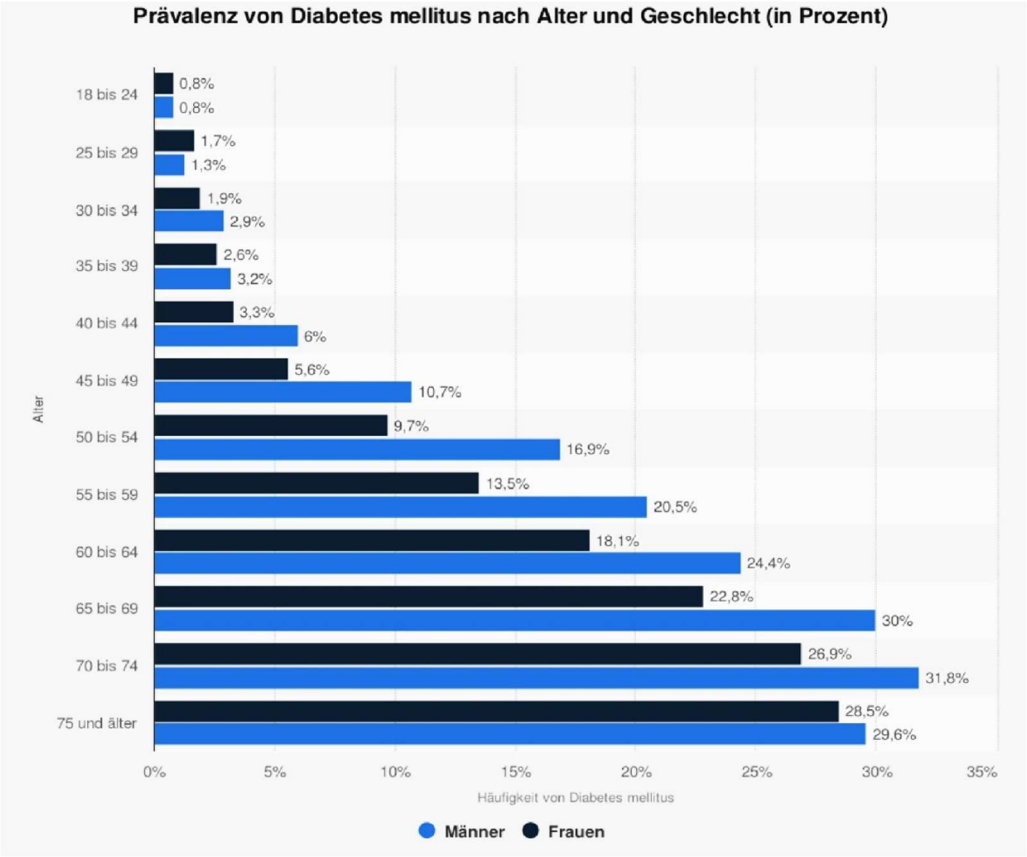


Abbildung 2-3: Prävalenz von Diabetes mellitus nach Alter und Geschlecht
Die Prävalenz des DM steigt mit dem Lebensalter (15).

2.1.2.4 Diabetes mellitus Typ II

DMII ist mit etwa 90% die häufigste Form des Diabetes (13). Die Symptome des Diabetes mellitus können sich vielfältig äußern. Neben unspezifischen Allgemeinsymptomen wie Müdigkeit und Leistungsminderung können auch Polyurie, Durst und Polydipsie als Folge der Hyperglykämie und Glukosurie mit osmotischer Diurese auftreten. Des Weiteren leiden Diabetiker an nächtlichen Wadenkrämpfen und Sehstörung. Neben Hauterscheinungen mit Pruritus und Mykosen können auch Potenzstörungen und Amenorrhö auftreten. DMII manifestiert sich, im Gegensatz zum Diabetes mellitus Typ I, schleichend und bleibt lange unbemerkt (16). In der Entstehung des DMII sind neben Umweltfaktoren auch eine starke erbliche Komponente von Bedeutung. Die Vererbung verläuft multifaktoriell, mit Genmerkmalen, die für eine Insulinresistenz oder Beta-Zell Funktionsstörung prädisponieren (17). Wenn ein Elternteil an DMII leidet, liegt die Wahrscheinlichkeit bei 40%, dass das Kind im Laufe des Lebens auch an DMII oder zumindest einer pathologischen Glukosetoleranz erkranken wird (17). Neben der genetischen Prädisposition führt eine Insulinresistenz zur reaktiven Steigerung der Insulinproduktion. Wenn diese durch die Beta-Zellen nicht mehr

aufrecht erhalten werden kann, kommt es zu einer Hyperglykämie (13). Neben einer quantitativen Störung kommt es auch zu einer qualitativen Störung der Insulinproduktion. Im Laufe der Erkrankung kann es so zu einem fortschreitenden Verlust der Beta-Zell Funktion, mit der Notwendigkeit einer Insulintherapie, kommen (17). Die Behandlung des DMII ist komplex und bedarf ein individualisiertes Therapieregime nach partizipativer Entscheidungsfindung. Neben Basismaßnahmen, wie Gewichtsreduktion, Ernährungsumstellungen, Schulungen und Tabakentwöhnung kommt eine Pharmakotherapie infrage. Wenn Antidiabetika alleine oder in Kombination keinen ausreichenden Effekt erreichen kann auf eine Insulintherapie eskaliert werden (18).

2.2 Komplikationen des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus hat durch seine zahlreichen Folgekrankheiten einen stark mindernden Einfluss auf die Lebensqualität. Es stellt eine besondere medizinische als auch pflegerische Herausforderung dar, Komplikationen und Folgen des Diabetes mellitus frühzeitig mithilfe eines Screenings zu diagnostizieren und dann entsprechend zu behandeln. Neben makroangiophathischen Beschwerden z.B.: KHK, pAVK und ischämische Schlaganfälle, leiden Diabetiker unter mikroangiopathischen Folgen wie der diabetischen Retinopathie, diabetischen Neuropathie und diabetischen Nephropathie. Unter anderem in Folge der zahlreichen Komplikation ist trotz der verbesserten Therapiemöglichkeiten 2019 alle acht Sekunden ein Mensch zwischen 20-79 Jahren an den Folgen des Diabetes mellitus gestorben (13).

2.3 kardiovaskuläre Erkrankungen

Diabetes mellitus und eine hohe Blutzuckerkonzentration erhöhen das Risiko an einer kardiovaskulären Krankheit zu leiden um etwa das Doppelte (13). Viele der klassischen kardiovaskulären Erkrankungen, wie die KHK, die pAVK, die zerebrovaskuläre Krankheit und auch Herzinsuffizienz sind mit dem Diabetes mellitus vergesellschaftet. Diese Erkrankungen sind in Form von Herzinfarkten und Schlaganfällen nicht nur ein häufiger Grund für eine Krankenhausbehandlung sondern auch für das Versterben (vgl. kardiovaskuläre Erkrankungen) (13). Die bei Diabetes mellitus gesteigert vorkommenden AGEs führen zu multiplen Veränderungen der Gefäße. In Tiermodellen mit einem RAGE Knockout zeigte sich eine deutlich verminderte Proliferation von glatten Muskelzellen, Migration und neointimaler Expansion und in der Konsequenz deutlich reduziert vorkommenden atherosklerotischen Plaques (19). Durch eine AGE-induzierte gestörte Plasma Clearance des Low density lipoprotein (LDL) kommt es zu einer erhöhten Konzentration von LDL, welches als zentraler Risikofaktor für die Entwicklung von Atherosklerose gilt (19). Über die Bindung von AGEs an RAGE kommt es zur vermehrten Bildung von ROS und NF-κB (siehe AGE-RAGE-System). In Folge der vermehrten Bildung des Transkriptionsfaktor NF-κB entstehen Moleküle (ICAM-1;

VCAM-1, MCP-1, PAI-1 tissue factor, VEGF und RAGE), die mit Atherosklerose assoziiert sind (19). Außerdem bilden die AGEs eine extrazelluläre Matrix, die zu einer herabgesetzten Elastizität der Gefäße führen (19). Des Weiteren führt unter anderem ein erhöhter oxidativer Stress zu einer Störung der NO-vermittelten Vasodilatation (19). Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass endotheliale progenitor Zellen (EPCs) bei Diabetikern über das AGE-RAGE-System geschädigt werden. EPCs werden vermehrt apoptotisch, an der Migration, Adhäsion gehindert und in ihrem Wachstum gestört. In der Folge ist die Funktion der vaskulären Reparatur durch die EPCs gestört (19). Außerdem werden über AGEs die osteoblastische Differenzierung der mikrovaskulären Pericyten gefördert und führen in der Konsequenz zur Kalzifikation (19).

Outcome	Impact	Data systems / study	Reference
Prevalence of cardiovascular diseases	Any cardiovascular disease: 32% Coronary heart disease: 21% Myocardial infarction: 10% Stroke: 7.6%	57 cross-sectional studies	Einarson et al., 2018[14]
Coronary heart disease	160% increased risk	102 prospective studies	Emerging Risk Factors Collaboration, 2010[12]
Ischaemic heart disease	127% increased risk	102 prospective studies	Emerging Risk Factors Collaboration, 2011[13]
Haemorrhagic stroke	56% increases risk	102 prospective studies	
Cardiovascular diseases death	132% increased risk	97 prospective studies	
Years of life lost	5.8 years for men age 50 6.4 years for women age 50	97 prospective studies	

Abbildung 2-4: Risikoerhöhung kardiovaskulärer Erkrankungen durch Diabetes
Im Rahmen des DM gibt es eine hohe Prävalenz an kardiovaskulären Erkrankungen (32%). Es konnten 6,4 Jahre für 50-jährige Frauen und 5,8 Jahre für 50-jährige Männer an Lebenszeitverkürzung festgestellt werden (13).

2.4 Diabetische Nephropathie

Die Diabetische Nephropathie (DN) ist in Europa und den USA die häufigste Ursache für die Dialyse (16). Die DN umfasst als klinisches Syndrom eine persistierende Albuminurie, erhöhte Blutdruckwerte, eine erniedrigte glomeruläre Filtrationsrate und ein erhöhtes Risiko an kardiovaskulären Erkrankungen zu erkranken und/oder zu sterben (20). Aufgrund der Hyperglykämie kommt es zu hämodynamischen Änderungen, einer erhöhten Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosterone-Systems (RAAS), Entzündungen und Ischämie, die letztendlich im Endstadium der DN zu einer Nierenfibrose führen (20). Erhöhte Blutzuckerwerte führen über Insulin-Like Growth Factor (IGF-1), Glucagon, Stickstoffmonoxid (NO), VEGF und Prostaglandinen zu einer Dilatation der afferenten Arteriolen. Durch eine Hochregulation der Sodium Glucose Transporter 2 (SGLT2) kommt es zu einer erhöhten Natrium Konzentration und durch den Feedback Mechanismus zu einer Dilatation der afferenten Arteriole und Konstriktion der efferenten Arteriole, was zu einer glomerulären Hypertonie führt (20). Des Weiteren führen die Veränderungen bei Diabetes mellitus auch an

der Niere zu einer Erhöhung von ROS, aktivierter Proteinkinase C (PKCs) und AGEs. In der Summe führt dies zu einer Endotheldysfunktion, wodurch Mediatoren wie Endothelin-1 (ET-1) erhöht sind. Diese Erhöhung ist assoziiert mit Vasokonstriktion, Podocytenverlust, oxidativen Stress, Entzündung und Fibrose (20). Bei der fortgeschrittenen DN kommt es über mehrere Mechanismen zu einer reduzierten Produktion von NO. In der Folge wird mehr hypoxia-inducible factor frei, welches die Nierenfibrosierung begünstigt (20). Außerdem führen ROS, AGEs, TNF und NF-κB zu einer Entzündungsreaktion in der Niere. In der Folge wird die tubulointerstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie begünstigt (20). Auch das hochregulierte RAAS spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der DN. Durch eine Blockade des RAAS konnte gezeigt werden, dass die Progredienz der DN, unabhängig von der Blutdrucksenkung, verlangsamt wird (20–22). Neuere Untersuchungen zeigen, dass genetische und epigenetische Risikofaktoren, sowie Podocyten Autophagie und Mitochondriendysfunktion einen pathophysiologischen Einfluss auf die DN haben (20). Aufgrund der hohen Rate an dialysepflichtigen Patienten und der erhöhten kardiovaskulären Mortalität bei Patienten mit DN ist das regelmäßige und frühzeitige Screening essentiell (23). Neben Lebensstilmodifikationen, ist unter anderem medikamentös die Normalisierung von Blutzucker, Blutdruck und Fettstoffwechselstörungen zu erreichen (23).

2.5 Retina Aufbau und Strukturen

Die Retina (tunica interna bulbi) teilt sich auf in eine Pars optica retinae und eine Pars caeca retinae. Diese beiden Anteile sind voneinander durch die Ora serrata getrennt. Die Pars caeca retinae lässt sich unterteilen in eine Pars ciliaris retinae (unpigmentiert), die den Ziliarkörper bedeckt und eine Pars iridica retinae (pigmentiert), welche die Rückseite der Iris bekleidet. Die gesamte Pars caeca retinae ist nicht lichtempfindlich. Die Pars optica retinae hingegen ermöglicht nach Lichteinfall eine neuronale Bildverarbeitung. Die elektrischen Signale werden über den N. opticus zum Sehzentrum des Gehirns weitergeleitet und ermöglichen den Sinneseindruck eines Bildes (24). Das Zentrum der Retina enthält gelbes Pigment (Macula lutea) und ist grubenförmig eingesenkt (Fovea centralis). In der Fovea centralis kommen ausschließlich Zapfen vor, die nur mit einer bipolaren Zelle und Ganglienzelle verschaltet sind. Dadurch wird eine höchstmögliche Sehschärfe realisiert. In der Netzhautperipherie hingegen konvergieren viele Fotorezeptoren auf eine Ganglienzelle und das Auflösungsvermögen ist deutlich schlechter (siehe histologischer Aufbau der Retina) (25).

2.5.1 Histologischer Aufbau der Retina

Histologisch besteht die Retina aus mehreren Schichten, denen man gleichartige Strukturen zuordnen kann. Von außen nach innen kommt zunächst die Bruch-Membran als Membran zwischen Retina und Aderhaut. Danach folgt das Stratum pigmentosum, welche verbrauchte Teile der Photorezeptoren phagozytiert, der Ernährung des Sinnesepithels dient und durch

seinen hohen Melaningehalt die Bildauflösung und Sehschärfe beeinflusst (24). Das Stratum neuroepitheliale umfasst die Schicht der Stäbchen und Zapfen, sowie die äußere Körnerschicht. Die Stäbchen und Zapfen wandeln Licht in elektrochemische Signale um. Die Zellkerne der Photorezeptoren bilden die äußere Körnerschicht. Dem Stratum neuroepitheliale schließt sich die äußere plexiforme Schicht (Synapsen zwischen den Axonen der Photorezeptoren und den Dendriten der Bipolarzellen) an, dem folgt die innere Körnerschicht (Zellkerne der Bipolarzellen). Die Bipolarzellen bilden das zweite Neuron der Sehbahn. Der darauffolgenden inneren plexiformen Schicht mit Synapsen zwischen Bipolarzellen und Ganglienzellen, schließt sich das Stratum ganglionare an. Die darin vorkommenden Ganglienzellen enthalten als drittes Neuron der Sehbahn Signale von den Bipolarzellen. Das Stratum neurofibrarum enthält die Axone der Ganglienzellen und das Stratum limitans internum, die Gliagrenzschicht dient zur Abgrenzung zum Glaskörper (24, 25). Neben den Neuronen der Sehbahn, kommen Interneurone vor. Die Horizontalzellen führen durch eine laterale Hemmung zur Kontrastverstärkung. Die heterogenen amakrinen Zellen haben gemeinsam, dass sie modulierend auf die Signalübertragung in der Retina wirken (24). Die Müllerzellen, als Gliazellen der Retina, haben ihre Funktion in der Sicherung des Ionenaustausches und bei der Wiederaufnahme der Neurotransmitter GABA und Glutamat (24).

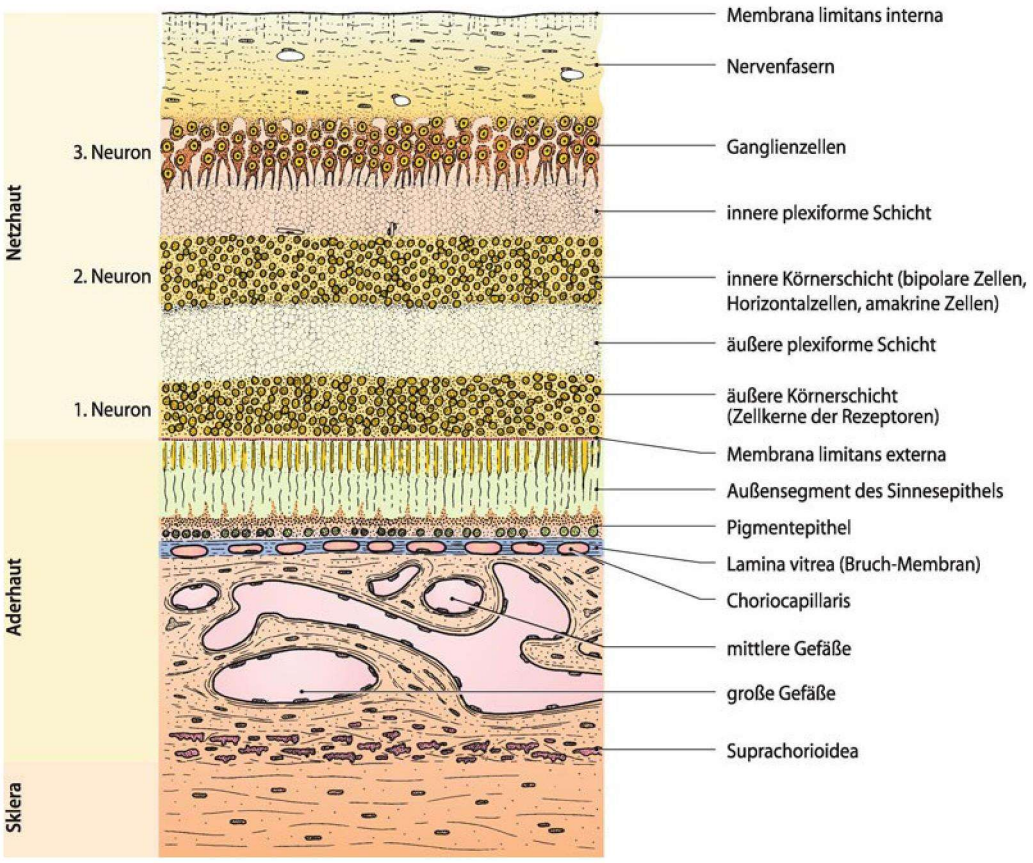


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der Schichtung von Retina und Aderhaut
Links sind die Netzhaut mit ihren drei Neuronen der Sehbahn und die Aderhaut aufgetragen. Rechts zeigt sich eine detaillierte Darstellung der einzelnen Strukturen (25).

2.5.2 Blutgefäßversorgung der Retina

Die Blutversorgung der Retina erfolgt über die aus der Arteria ophtalmica entspringenden A. centralis retinae und den Aa. chorioideae. Die A. centralis verläuft mit dem N. opticus zur Papille, zweigt sich auf und versorgt die inneren Anteile der Netzhaut. Die äußeren Schichten der Retina werden durch die Lamina choricocapillaris der Aderhaut versorgt. Die Papille wird über 3-4 hintere Ziliararterien gespeist. Der Blutabfluss erfolgt über die Netzhautvenolen, die sich zur V. centralis retinae vereinigen und mit den Sehnerven den Augapfel verlässt um in die V. Ophtamlica superior zu münden (25). Das retinale Gefäßnetzwerk kann man in einen oberflächlichen, intermediären und tiefen Gefäßplexus unterteilen. Der oberflächliche Gefäßplexus wird von der A. centralis retinae gespeist und liegt primär in der Ganglienzellschicht. Der intermediäre bzw. tiefe Gefäßplexus ist topografisch über bzw. unter der inneren Körnerschicht zu verorten (26). Neben diesen drei Gefäßschichten, die durch vertikale Aussprossung des oberflächlichen Gefäßplexus entstehen (vgl. Entwicklung des Gefäßplexus), besteht in der Nervenfaserschicht ein weiteres Gefäßnetzwerk. Die Gefäße des radial peripapillary capillary plexus verlaufen parallel zu den Axonen der Nervenfaserschicht (26).

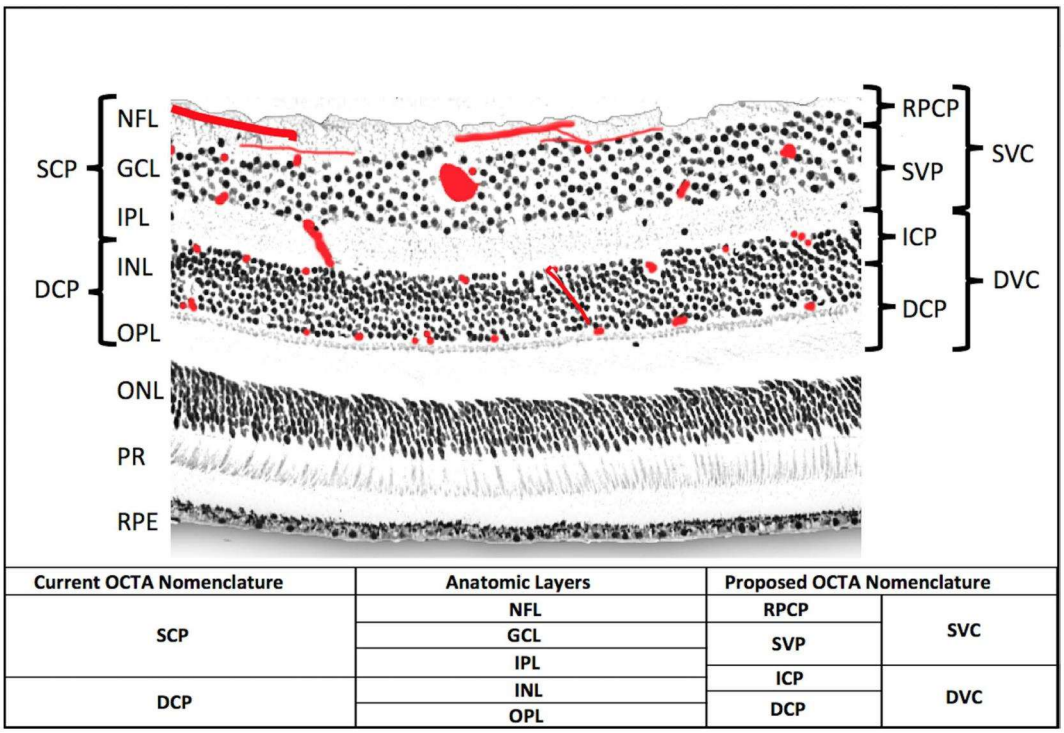


Abbildung 2-6: Anatomische Lokalisation des Gefäßplexus in der menschlichen Retina im Bereich der Macula lutea.
In der Abbildung zeigt sich ein histologischer Schnitt mit seinen einzelnen Schichten (aufgetragen auf der linken Seite) und in Bezug dazu der Gefäßplexus und seine Unterteilung in einzelne Schichten (aufgetragen auf der rechten Seite). Des Weiteren zeigt sich die aktuelle Nomenklatur im OCTA und eine neu vorgeschlagene, angepasste Nomenklatur. In der aktuellen Nomenklatur wird lediglich zwischen dem oberflächlichen- und tiefen Gefäßplexus unterschieden (SCP und DCP), während in der vorgeschlagenen, neuen Nomenklatur zwischen vier Schichten des Gefäßplexus unterschieden werden kann. (SVC= oberflächlicher Gefäßkomplex, DVC= tiefer Gefäßkomplex, RPCP= radial peripapillary capillary plexus, SVP= oberflächlicher Gefäßplexus, ICP= intermediärer Gefäßplexus, DCP= tiefer Gefäßplexus, NFL= Nervenfaserschicht, GCL= Ganglionzellschicht, IPL= innere plexiforme Schicht, INL= innere Körnerschicht, OPL= äußere plexiforme Schicht und Henle's Faserschicht, ONL= äußere Körnerschicht, PR= Photorezeptorenschicht, RPE= retinales Pigmentepithel, OCTA= Optische Kohärenztomographie Angiographie) (26).

2.5.3 Pathologien der Retina

Der Großteil der Erblindungen und Seheinschränkungen in Europa ist auf altersabhängige Erkrankungen der Retina zurückzuführen (27).

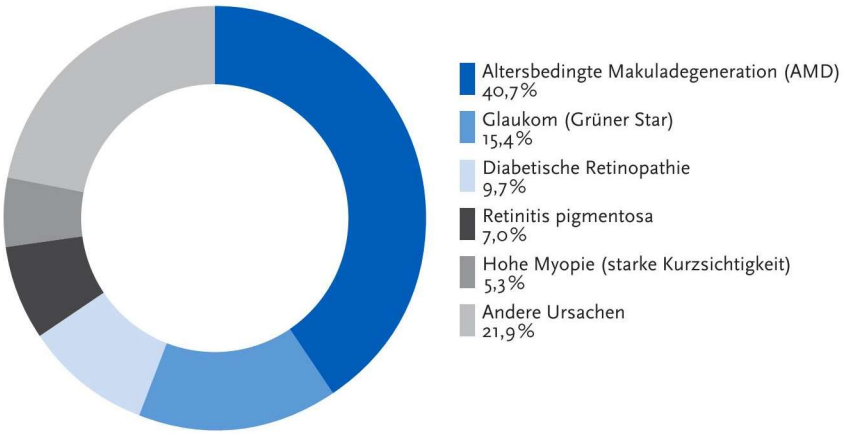


Abbildung 2-7: Prozentuale Darstellung der Erblindungsursachen (Rheinland 2006)
Während die altersbedingte Makuladegeneration die häufigste Erblindungsursache darstellt, ist die DR die dritthäufigste Ursache und die häufigste bei Personen im erwerbsfähigen Alter (siehe Diabetische Retinopathie) (28).

2.5.3.1 altersbedingte Makuladegeneration

Die Prävalenz der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) nimmt insbesondere aufgrund der steigenden Lebenserwartung zu und ist Ursache für 8.7% der Blindheit weltweit (29). Sie betrifft vor allem Menschen über 55 Jahre und ist in den Industrieländern die häufigste Ursache für Blindheit (30). Es wird zwischen einer trockenen- (atrophen) und feuchten Makuladegeneration (choroidalen Neovaskularisationen) unterschieden (30). Die Pathophysiologie der AMD ist nicht vollständig verstanden. Es wird eine multifaktorielle Genese angenommen. Der AMD scheint eine metabolische Dysfunktion, genetische Störung und Umweltfaktoren zugrunde zu liegen (31). Im Alter akkumulieren im retinalen Pigmentepithel (RPE) intrazelluläre Residualkörper die Lipofuscin enthalten. In der Folge dekompensiert die Stoffwechselleistung des retinalen Pigmentepithels und es kommt zur Ausbildung von Drusen. Diese Drusen führen zu einer Verdickung der Kollagenfasern, einer Degeneration von Elastin, Kollagen und deren Kalzifikation in der Bruch-Membran (31). In Zwillings-Studien konnte gezeigt werden das die familiäre Belastung ein Risikofaktor für die Entwicklung einer AMD sein kann. Es konnten Polymorphismen in Genen identifiziert werden, welche protektiv wirken aber auch solche, die als Risikofaktor gelten (31). Als Beispiel wurden bestimmte Haplotypen für CFH gefunden, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung der AMD zeigen. Das veränderte CFH führt zu einer Disinhibition des Komplementsystems. In diesem Zusammenhang wurde ein vermehrtes Vorkommen von Drusen beobachtet. Des Weiteren zeigt sich eine erhöhte Konzentration von CFH bei Rauchern und liefert so eine mögliche Erklärung für die erhöhte Inzidenz der AMD im Vergleich zu Nichtrauchern (31). Im weiteren Verlauf der Erkrankung führt die Dysfunktion des RPE neben einer Dysfunktion der Bruch Membran zu einem Absterben der Photorezeptoren. Durch die gestörte Funktion der Bruch Membran kommt es zu einer Hochregulierung von VEGF. In der Konsequenz kommt es zur Ausbildung von choroidalen Gefäßen und schließlich im Endstadium der feuchten AMD zu einem permanenten Verlust des zentralen Sehens (31). Dadurch, dass das RPE keine Regenerationsfähigkeit besitzt, sind die Behandlungsmöglichkeiten oftmals begrenzt. Allerdings hat sich die Behandlung der feuchten Makuladegeneration durch die Einführung der intravitrealen anti-VEGF Injektion deutlich verbessert (25). Eine Detektion der Erkrankung in frühen Stadien und rechtzeitiger Behandlungsbeginn sind essentiell, um die Fähigkeit des Sehens zu erhalten (30). Bei der trockenen Makuladegeneration können in individuellen Fällen eine Einnahme von Nahrungsergänzungsmittel (Lutein, Zink, Karotinoide oder Omega-3-Fettsäuren) von Vorteil sein. Die Behandlung der trockenen Makuladegeneration ist momentan nach wie vor unbefriedigend (25). Supportiv können Hilfsmittel wie z.B. eine beleuchtete Leselupe, Lupenbrillen oder eine Videolupe eingesetzt werden (25).

2.5.3.2 diabetische Retinopathie

Die diabetische Retinopathie (DR) ist in Deutschland die häufigste Erblindungsursache für Personen im erwerbsfähigen Alter (25). Bei Patienten mit Diabetes ist eine frühe augenärztliche Vorstellung wichtig um einen schweren Visusverlust zu vermeiden. Durch eine gut eingestellte Stoffwechsellage und Behandlung mittels Laserkoagulation und anti-VEGF Injektionen kann die Erblindung in vielen Fällen verhindert werden (25). Bei der DR unterscheidet man die leichte- und mittelgradige nicht proliferative Retinopathie, bei der erste diabetische Veränderung in Form von Mikroaneurysmen, intraretinalen Punkt- und Fleckblutungen und beginnenden Lipidablagerungen zu erkennen sind von der schweren nicht proliferativen Retinopathie, bei der die mikroangiopathischen Schäden an der Retina stärker ausgebildet sind (unter anderem Cotton-wool Flecken, retinale Blutungen und avaskuläre Zonen) (25). In weiter fortgeschrittenen Stadien ist die Blutversorgung von größeren Abschnitten in der Retina gestört. Neben der Ischämie kommt es zur vermehrten Bildung von VEGF und dadurch wird der Übergang in die proliferative Form gefördert (32). Etwa die Hälfte der schweren nicht proliferativen diabetischen Retinopathien gehen innerhalb eines Jahres in die proliferative Form über. Dieses Stadium ist gekennzeichnet durch Neovaskularisationen, intraretinale Blutungen, Glaskörperblutungen und Traktionsablatio. Dadurch kann es beim Patienten zu einer Erblindung kommen (25). Unabhängig vom Stadium der Retinopathie kann es durch Ödeme, Ablagerungen und Ischämie in der Makula zur diabetischen Makulopathie mit deutlicher Einschränkung des Sehvermögens kommen (32).

2.5.3.2.1 Neurovaskuläre Einheit in der diabetischen Retinopathie

Die neurovaskuläre Einheit ist Zentrum für viele biochemische Vorgänge, die zur Entwicklung der DR führen (33). Sie beschreibt die funktionelle Kopplung von Neuronen, Gliazellen und Gefäßen, die die retinale Funktion beeinflussen und so unter anderem den retinalen Blutfluss regulieren (36). Im Rahmen der diabetischen Retinopathie kommt es zu zahlreichen pathologischen Veränderungen der neurovaskulären Einheit. Durch ein besseres Verständnis der Vorgänge könnten neue Therapiemöglichkeiten entwickelt werden (32, 34). Eine verminderte Kontrastempfindlichkeit und Einschränkungen des Farbensehens, die bereits vor mikrovaskulären Veränderungen bei Patienten mit DR festgestellt werden, verdeutlichen zugrunde liegende neuronale Veränderungen (34). In Studien konnte gezeigt werden, dass die innere Körnerschicht im OCT bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und minimaler DR bereits ausgedünnt ist. Außerdem zeigten sich die retinalen Ganglionzellen und Amakrinzellen vermehrt apoptotisch. Retinale Neurone, wie die Photorezeptoren wurden als Quelle für oxidativen Stress identifiziert (34). Auch die Gliazellen (Astrozyten und Müller Zellen) unterliegen Veränderungen bei Patienten mit Diabetes mellitus. Müller Zellen sterben vermehrt ab und unterliegen einer reaktiven Gliose. Zusätzlich unterstützen die pathologisch veränderten Müller-Zellen eine Störung der Blut-Retina-Schranke (BRB) (34). Diabetes

mellitus führt in der Retina zur subklinischen Entzündung. Unter anderem werden durch eine verstärkte Leukozyten-Endothel Interaktion die retinalen Gefäße und das umliegende Gewebe geschädigt. Des Weiteren unterstützt eine vermehrte Aktivierung von Mikrogliazellen das proinflammatorische Milieu z.B. durch vermehrte Produktion von VEGF, IL-1β und TNF-α. Neben der vermehrten Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen werden Adhäsionsmoleüle wie E-Selectin und ICAM-1 stärker gebildet (34). In den Gefäßen kommt es zur Leckage und Okklusion infolge einer Erkrankung mit Diabetes mellitus (35). Durch eine vermehrte Bildung von VEGF durch die Gliazellen kommt es über die Proteinkinase Cβ zu einer ubiquitin-vermittelte Endozytose von Komponenten der tight-junction und in der Konsequenz zur erhöhten vaskulären Permeabilität (35). Außerdem wird bei der DR ein Verlust von Pericyten, die für die Aufrechterhaltung der BRB wichtig sind beobachtet (35).

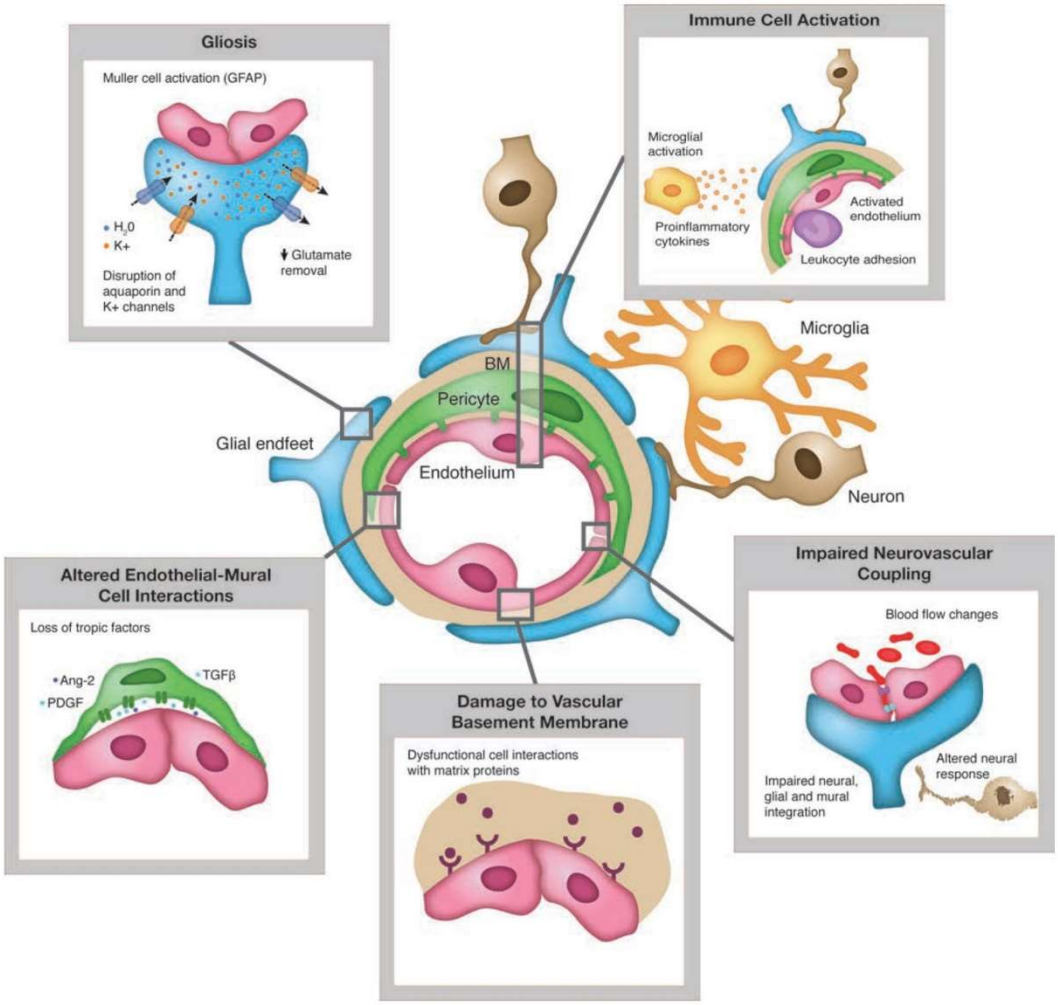


Abbildung 2-8: Die neurovaskuläre Einheit und beispielhaft deren Veränderungen bei der diabetischen Retinopathie
In der Abbildung ist die neurovaskuläre Einheit mit Veränderungen bei der DR dargestellt. Die neurovaskuläre Einheit besteht aus den Gefäßen (Endothelzellen und Pericyten), der Basalmembran, Gliazellen, Mikrogliazellen und Neuronen. Neben einer Gliosis, kommt es zu einer Aktivierung der Immunzellen mit vermehrter Leukozytenadhäsion. Außerdem zeigt sich eine gestörte neurovaskuläre Kopplung, die in einem veränderten Blutfluss mündet. Die Schädigung der vaskulären Basalmembran führt zu einer dysfunktionalen Zell Interaktion mit Matrixproteinen. Des Weiteren läuft die Pericyten-Endothel Interaktion gestört ab (34).

2.5.3.2.2 AGEs-RAGE System in der diabetischen Retinopathie

Es konnte gezeigt werden, dass Pericyten AGEs akkumulieren. Durch das AGE-RAGE System kommt es zu ROS, die den Zelltod der Pericyten induzieren (36). Der Pericytenverlust ist ein frühes Anzeichen für die Entwicklung der diabetischen Retinopathie. Es wird postuliert, dass der Verlust von Pericyten neben der gestörten mikrovaskulären Homöostase zur Neovaskularisation führt (36). Neben der apoptotischen Wirkung auf die Pericyten, fördern AGEs die Expression von VEGF in Pericyten. VEGF spielt wiederum eine entscheidende Rolle in der Entstehung der proliferativen Retinopathie, sowie bei der Dysfunktion der Blut-Retina-Schranke (36). Im Rahmen einer negativen Feedbackschleife kann es über die Akkumulation von AGEs zu einer Hochregulierung des RAGE kommen und zu einem Anstieg von ROS. Damit wird der zytopathische Effekt der AGEs exponentiell verstärkt (36). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass AGEs die Expression vom intrazelluläres Zelladhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) steigert und damit die Leukozytenadhäsion in den retinalen mikrovaskulären Endothelzellen fördert. Neben ICAM-1 wird durch AGEs ein monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) vermehrt gebildet. Die Konzentration von MCP-1 in der Glaskörperflüssigkeit korreliert mit der Schwere der proliferativen diabetischen Retinopathie (36). Außerdem wird durch die Bindung von AGEs an RAGE die Produktion von Prostacyklinen inhibiert und der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) induziert. Dadurch wird durch AGEs die Plättchenaggregation und Fibrinstabilisation beeinflusst und die kapilläre Obliteration und retinale Ischämie gefördert (36). Untersuchungen konnten zeigen, dass das AGE-RAGE-System über den Ras mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalweg nuclear factor-κB (NF-κB) aktiviert und so die VEGF-Gen Transkription in den mikrovaskulären Endothelzellen fördert. Damit wird ein wichtiger Mediator der Angiogenese verstärkt gebildet (36). Diese Vorgänge legen einen großen Einfluss des AGE-RAGE-Systems auf die Entwicklung der diabetischen Retinopathie nahe. Eine Blockade des AGE-RAGE-Systems und den assoziierten Signalwegen (siehe AGE-RAGE-System), könnte eine vielversprechende therapeutische Komponente werden (36).

2.5.3.3 Frühgeborenenretinopathien

Die Frühgeborenenretinopathie (ROP) ist eine der Hauptursachen für Sehminderung im Kindesalter. Sie tritt meist bei Frühgeburten vor der 32 Gestationswoche (ca. 1% aller Lebendgeburten) auf (37). Es besteht kein Unterschied in der Erkrankungswahrscheinlichkeit zwischen den Geschlechtern. Mit einem niedrigen Geburtsgewicht und Gestationsalter steigt das Risiko für die ROP. In den USA haben 3-4% der Frühgeborenen einen Visus von unter 0,1 infolge der ROP (37). Die ROP geht mit proliferativen Gefäßveränderungen in der Retina einher. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen ähneln denen der Netzhautveränderungen bei Diabetes mellitus (37). Die Pathogenese der ROP wird in zwei Phasen eingeteilt. In der ersten Phase wird aufgrund einer relativen Hyperoxie (durch exogene

Sauerstoffzufuhr und/oder frühzeitiger Beginn der Lungenatmung) das Gefäßwachstum in die Peripherie, Richtung Ora serrata, gestört (37). In der zweiten Phase der ROP, ab der 32 Woche postmenstruellen Alters, kommt es in Kombination, mit dem aus der ersten Phase gestörtem Gefäßwachstum in die Peripherie und der daraus resultierenden avaskulären Zone, und dem während des Ausreifungsprozesses erhöhten metabolischen Bedarfs zu einer Gewebehypoxie (37). Infolge der Gewebehypoxie kommt es zum Anstieg von z.B. Hypoxia-inducible factor 1 alpha (Hif-1α). Neben dem Hypoxie getriggerten Anstieg wird dieser Faktor zusätzlich langsamer abgebaut und diffundiert in den Zellkern. Dort induziert er als Transkriptionsfaktor unter anderem die Bildung von VEGF (37). VEGF bindet an Endothelzellen an den VEGF-Rezeptor 2. Dies führt unter anderem zu einer Aktivierung der Endothelzellen, Ausbildung der Filopodien, einer erhöhten Gefäßpermeabilität und schließlich zu einer pathologisch gesteigerten Blutgefäßneubildung (37). Protektive Faktoren stellen dagegen Omega-3-Fettsäuren mit ihren antiangiogenen Effekt und der systemische Wachstumsfaktor IGF-1 dar, die entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung und den Schweregrad der ROP haben (37). Die Behandlung der ROP erfolgt abhängig vom Stadium der Erkrankung. Die anti-VEGF-Behandlung zeigt in Studien eine gute Wirksamkeit. Die Lasertherapie gilt nach wie vor als Standardtherapie. Abschließende Ergebnisse unter anderem zur genauen Dosisfindung und Langzeitsicherheit sind noch offen (38).

2.5.4 Entwicklung der Gefäßversorgung

Die Gefäßentwicklung in der Retina läuft in der Maus und im Menschen unterschiedlich ab. Während bei einem termingerecht geborenen Menschen die Retina bei Geburt vollständig entwickelt ist, entwickelt sich die Gefäßversorgung der Retina in der Maus erst postnatal. Dadurch ist die Maus für Experimente zur Untersuchung der Angiogenese gut geeignet (39). Die Gefäßentwicklung bei der Maus unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Stämmen. Die folgende Darstellung bezieht sich auf den C57B1/6-Stamm: In den ersten Tagen nach der Geburt wachsen die Gefäße vom Nervus opticus in die Peripherie zur Ora serrata. Dieser Vorgang erfolgt in etwa bis zum achten Tag postnatal. Ab dem siebten postnatalen Tag wachsen vertikale Gefäße von dem sich zuerst ausbildenden, oberflächlichen Gefäßplexus in die Tiefe. Für die Aussprossung der vertikalen Gefäße spielen die Astrozyten, welche in der oberflächlichen Schicht vorkommen eine entscheidende Rolle. Die Astrozyten sekretieren den dafür wichtigen Botenstoff Fibronectin. Im Gegensatz zum oberflächlichen Gefäßplexus, besitzen der mittlere und tiefe Gefäßplexus keine Verbindung zu den Astrozyten (40). Dort bildet sich bis zum zwölften Tag die tiefe Gefäßschicht in der äußeren plexiformen Schicht. Der mittlere Gefäßplexus entwickelt sich als letzter zwischen dem zwölften und 15. Tag. Am Ende der dritten Woche ist die retinale Angiogenese abgeschlossen und die Gefäße reif (39). Die retinale Angiogenese beginnt beim Menschen in der 16. Gestationswoche. In den frühen Stadien organisieren sich die Gefäße ausgehend vom Nervus opticus. Unter anderem

durchqueren die Gefäße den primitiven Glaskörper in die vorderen Abschnitte des Auges. In der weiteren Entwicklung durchlaufen die in den frühen Stadien gebildeten hyaloiden Gefäße eine so genannte "hyaloid regression" (39). Diese hyaloide regression wird unter anderem durch intraokuläre Makrophagen, der VEGF-Konzentration und einer veränderten Hämodynamik beeinflusst. Die hyaloide regression wird ausgelöst durch eine Apoptose der Endothelzellen und findet beim Menschen in der Mitte der Schwangerschaft statt, während sie bei Nagetieren erst kurz vor der termingerechten Geburt abgeschlossen ist. (41). Die nasalen Abschnitte sind etwa in der 36- und die temporalen Abschnitte in der 40 Gestationswochen vollständig ausgebildet (39).

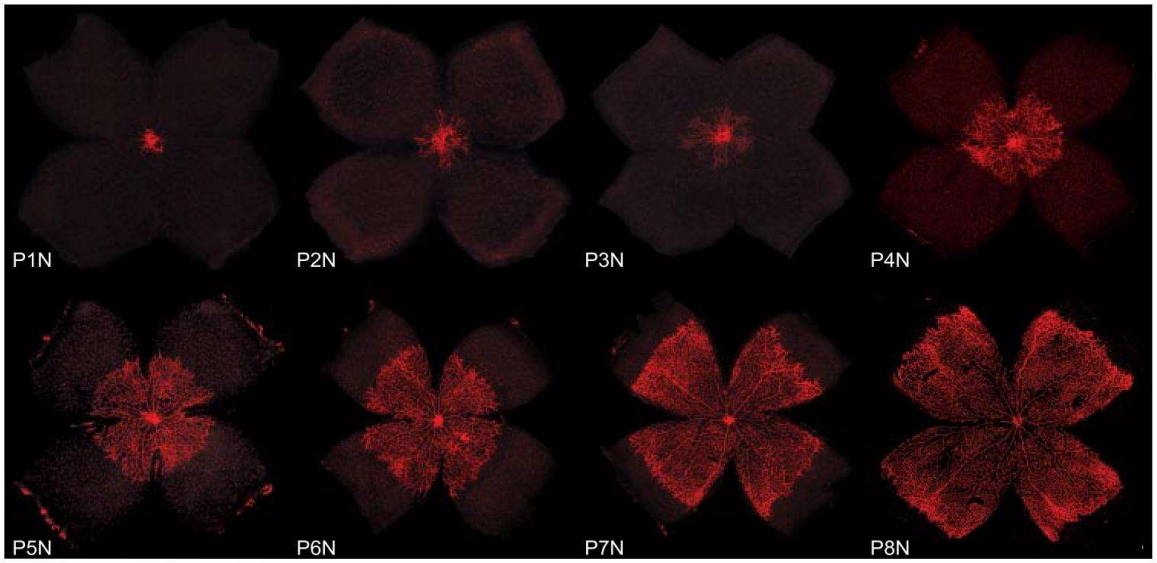


Abbildung 2-9: Entwicklung des oberflächlichen Gefäßplexus in der Maus
Die Entwicklung des oberflächlichen Gefäßplexus beginnt am ersten postnatalen Tag (P1N). Die Gefäße wachsen vom N. opticus ausgehend in die Peripherie zur Ora serrata (39).

2.6 AGEs-RAGE System

Über eine nichtenzymatische Glykierung (Maillard Reaktion) entstehen AGEs, welche bei Patienten mit Diabetes verstärkt akkumulieren. Sie binden an den RAGE und initiieren einen Signalweg, der zu zellulären Stress, zellulärer Dysfunktion, Organschäden und Komplikationen bei Diabetes führt (42). Neben dem Diabetes mellitus kommt es im Rahmen des Alterungsprozesses zu einer verstärkten Bildung von AGEs. Des Weiteren können AGEs mit der Nahrung aufgenommen werden und treten gehäuft bei Urämie und der Alzheimer Demenz auf (43). Endprodukte der Maillard Reaktion sind die AGEs. Durch eine Reaktion von reduzierten Zuckern mit Aminosäuren von Makromolekülen (Proteine, Lipide oder auch Nukleinsäure) entsteht, über den Zwischenschritt der Bildung einer Schiff´schen Base, das Amadori-Produkt (I-Aminodesoxyketose). Diese Schritte laufen jeweils nicht enzymatisch ab (44). Dieses Amadori- Produkt kann durch Oxidation, Elimination, Kondensation sowie Dehydrierung in ein AGE umgewandelt werden (43).

Die AGEs sind proteaseresistent und können vom Organismus nur schlecht abgebaut werden (43). Die Bildung der AGEs hängt unter anderem von der Höhe und der Dauer der

Glukosekonzentration und des biologischen Lebensalters des Proteins ab (44). Ein Beispiel für die nichtenzymatische Glykierung in Abhängigkeit der Blutzuckerkonzentration und des Lebensalters des Proteins stellt die Glykierung des N-terminalen Valins der Beta-Globinkette von Hämoglobin (HbA1c) dar (44). Der HbA1c spiegelt die Blutzuckerkonzentration der letzten 120 Tage (Lebensdauer Erythrozyten) wieder, wobei die Blutzuckerkonzentration der letzten 30 Tage vor der Messung 50% des HbA1c-Wertes ausmacht (45). Das HbA1c kann unter anderem zur Diagnosestellung eines Diabetes mellitus verwendet werden (12). Außerdem dient der HbA1c als Maß für die Blutzuckereinstellung der letzten Woche und wird im Therapiemonitoring des Diabetes mellitus eingesetzt (18).

Der RAGE ist ein 35kDa großes Polypeptid, welcher als zellmembranständiger Rezeptor zur Superfamilie der Immunoglobuline gehört. Der RAGE besteht aus einer V-Typ und zwei C-Typ Domänen, welche extrazellulär liegen. Eine 19 hydrophobe Aminosäuren lange transmembranöse Region, schließt sich eine hochgeladene intrazelluläre Domäne an, welche die intrazelluläre Signalkaskade einleitet. Am N-terminalen Ende der V-Typ Domäne bindet der RAGE die AGEs (46)5, 49). Neben RAGE können die AGEs unter anderem an dem AGE-R1, AGE-R2, AGE R3 und/oder den Macrophage scavanger receptor binden (47). Des Weiteren gibt es einen sRAGE, welcher als löslicher Rezeptor die Auslösung, der Signalkaskade an der Zielzelle verhindert, indem er den Liganden vor Bindung an den Rezeptor abfängt (42, 48).

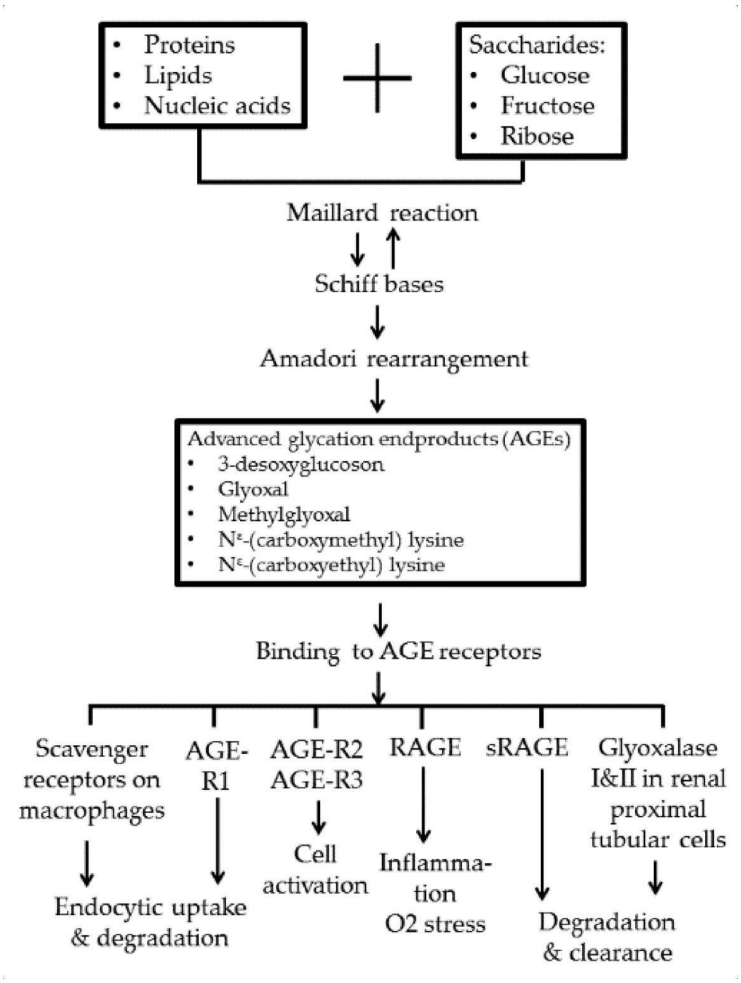


Abbildung 2-10: Bildung von advanced glycation endproducts und die Effekte der Bindung von verschiedenen AGE-Rezeptoren AGE-R1= AGE Rezeptor R1; AGE-R2= AGE Rezeptor R2; AGE-R3= AGE Rezeptor R3; RAGE= Rezeptor für advanced glycation endproducts; sRAGE= soluble-form RAGE (49).

In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit sRAGE zu einer signifikanten Senkung der vaskulären Läsionen führte (50). RAGE kommen unter anderem auf Monozyten/ Makrophagen, Lymphozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Neurone, Hepatocyten, Kardiomyocyten, Podocyten und den Pneumocyten vor (48). Es gibt verschiedene Isoformen des RAGE. Die unterschiedlichen Isoformen entstehen infolge von alternativem Splicen und metalloproteasen-vermittelter Spaltung. Diese Isoformen unterscheiden sich beispielsweise in der Ligandenbindung und ihrer pathophysiologischen Konsequenz (51). Außerdem unterscheidet sich die sRAGE/RAGE Ratio in den verschiedenen Geweben (52, 53).

2.6.1 Pathomechanismus

An den RAGE können mehrere Liganden binden. Unter anderem binden AGEs, aber auch S100/calgranulins, high mobility group box-1 (HMGB1) (54) oder Amyloid β an den RAGE (55).

Diabetic complications	AGEs S100/calgranulins
Amyloidoses	β-sheet fibrils S100/calgranulins AGEs
Immune/inflammatory disorders	S100/calgranulins Amphoterin AGEs
Tumor biology	Amphoterin

Abbildung 2-11: RAGE Liganden
Neben AGEs binden andere Liganden im Zusammenhang mit vielen Erkrankungen an den RAGE (56).

Eine dauerhafte Stimulation des RAGE führt zu einer Hochregulation des Rezeptors an den Geweben (50). Der RAGE führt durch die Bindung seiner Liganden zu zellulärer Dysfunktion. In vielen chronischen Erkrankungen wie dem Diabetes mellitus, der Amyloidose oder auch Tumorerkrankungen konnte ein Einfluss des RAGE beobachtet werden. In Tierstudien konnte nachgewiesen werden, dass der RAGE zu der Entwicklung von diabetischen Komplikationen wie der diabetischen Neuropathie, - Nephropathie und makrovaskulären Erkrankungen beiträgt (57).

Der Effekt des AGE-RAGE Systems auf das Altern wird kritisch diskutiert. Auf der einen Seite wird postuliert, dass AGEs das Altern beschleunigt. Auf der anderen Seite besteht die Hypothese, dass das AGE-RAGE System eine entscheidende Rolle beim physiologischen Alter hat. Unzweifelhaft besteht jedoch ein Zusammenhang zwischen den AGEs und dem oxidativen Stress (58).

Im Rahmen der Bildung von AGEs kommt es zu oxidativem Stress. Ein Beispiel, wodurch dies verdeutlicht wird, sind die bei der Oxidation von Glukose zu Dicarbonyl-Intermediaten (3-Deoxyglucason und Methylglyoxal), entstehenden Superoxidradikalen. Diese können zu Hydrogenperoxid dismutieren und bei Vorhandensein von Übergangsmetallen zu dem hoch reaktiven Hydroxylradikal reagieren (43). Außerdem werden AGEs bei Vorhandensein von oxidativem Stress vermehrt gebildet (43, 50). Durch die Aktivierung von RAGE kommt es zur Bildung von intrazellulärem oxidativem Stress. Durch die Bindung eines Liganden, aber auch durch den oxidativen Stress wird NF-κB aktiviert (43).

Die Signalkaskade beinhaltet beispielsweise JAK/STAT, PKC/PI3K/Akt, MAPK/Erk und Src/RhoA/Cdc42 welche NF-κB aber auch den Transkriptionsfaktor Egr1 aktivieren können (48). Nach Aktivierung des RAGE kommt es zu einer Phosphorylierung und Degradation des zytosolischen Inhibitors IkBα. Anschließend wird NF-κB in den Zellkern transloziert (57). Im Zellkern fördert NF-κB die Transkription von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, prothrombotische-, vasokonstriktive Genprodukte und RAGE selber. Des Weiteren werden antiapoptotische wirkende Genprodukte wie Bcl-Xl und Bcl-2 durch die Aktivierung von NF-κB beeinflusst (57). Außerdem wird auch vermehrt NF-κB selbst gebildet (57). Eine Besonderheit der Aktivierung von NF-κB durch RAGE ist die Dauer der Aktivierung. So konnte gezeigt

werden, dass die RAGE-vermittelte NF-κB Aktivierung in vitro beim Endothel länger als sechs Tage andauerte (43).

In der Mitochondria free radical theory of aging (MFRTA) wird ein Zusammenhang zwischen dem vermehrten Vorkommen von ROS und dem Altern gesehen (59, 60). Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass ROS nicht als Initiatoren des Alterns dienen und die Beziehung zwischen ROS und dem physiologischen Alterungsprozess weit komplexer sind (59). Bis zu einem bestimmten Level sind ROS notwendig, da sie als Mediatoren für Prozesse dienen, welche nachfolgend die Adaptation des Stoffwechsels ermöglichen (60). Kommt es darüber hinaus zu einer weiteren Erhöhung von ROS werden dagegen toxische Prozesse ausgelöst. Um dies zu verhindern ist die Expression von antioxidativen Enzymen und Proteinen für den Organismus essentiell. Hier sind insbesondere die Superoxiddismutase (SOD), Catalase, Glutathionperoxidase (GPX), Crystallin AB und DJ1 zu nennen. Durch die SOD werden zwei Superoxide durch die Disproportionierung in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid umgewandelt (44).

$$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

Die SOD kann durch oxidativen Stress induziert werden (61). Man unterscheidet drei Isoformen der Superoxiddismutase. Die SOD1 befindet sich größtenteils im Cytoplasma, während die SOD2 mitochondrial und die SOD3 extrazellulär vorkommt (44).

Die Catalase katalysiert die Umwandlung von Wasserstoffperoxid in Sauerstoff und Wasser (61).

$$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$$

Eine Störung der Funktion der Catalase wird in Zusammenhang mit einer Vielzahl an altersbedingten degenerativen Erkrankungen gebracht. Unter anderem mit der Pathogenese von einer Alzheimer Demenz, Parkinson-Erkrankung oder DM ist eine Malfunktion der Catalase vergesellschaftet (62). Die β-Zellen des Pankreas reagieren empfindlich auf oxidativen Stress. Durch fehlende oder verminderte antioxidative Abwehr, durch Störung der Funktion der Catalase kann es zu einem Untergang der β-Zellen und damit zu einer Entwicklung eines DM kommen (62).

Die Glutathionperoxidase (GPX-1) wandelt Wasserstoffperoxid in Wasser um. Dabei wird Glutathion über die GSSH-Reduktase in oxidiertes Glutathion umgewandelt. Die GSSG-Reduktase arbeitet $NADPH/H^+$ abhängig, welches zu einem großen Teil über die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase zur Verfügung gestellt wird (44).

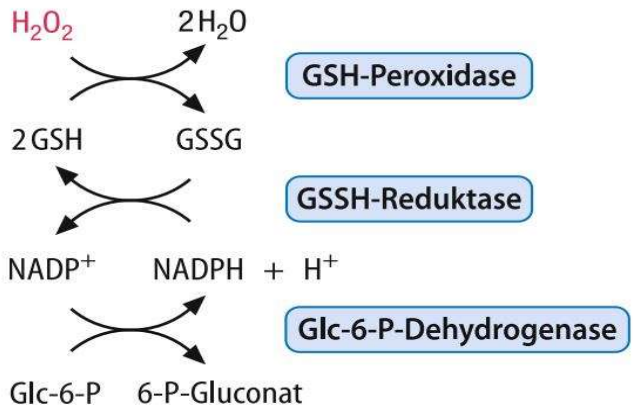


Abbildung 2-12: GPX-1 wandelt Wasserstoffperoxid in Wasser um (44).

GPX-1 findet sich in allen Zellen und ist sowohl im Zytosol, den Mitochondrien als auch den Peroxisomen lokalisiert (63).

Crystallin-AB gehört zu der Familie der kleinen Hitzeschockproteine. Es dient als molekulares Chaperon und hat antiapoptotische Eigenschaften. Dadurch schützt Crystallin-AB die Zellen vor Schädigungen (64). Crystallin-AB wird als Chaperon für VEGF in Bezug auf die proliferative diabetische Retinopathie als potentielles therapeutisches Target weitergehend untersucht (65).

Homozygote Mutationen im DJ-1 konnten mit einem autosomal-rezessiven primären Parkinsonismus in Verbindung gebracht werden (66). Man geht davon aus, dass DJ-1 wie ein Chaperon Proteine bei der Faltung unterstützt und so die Zellen vor ROS schützt (66).

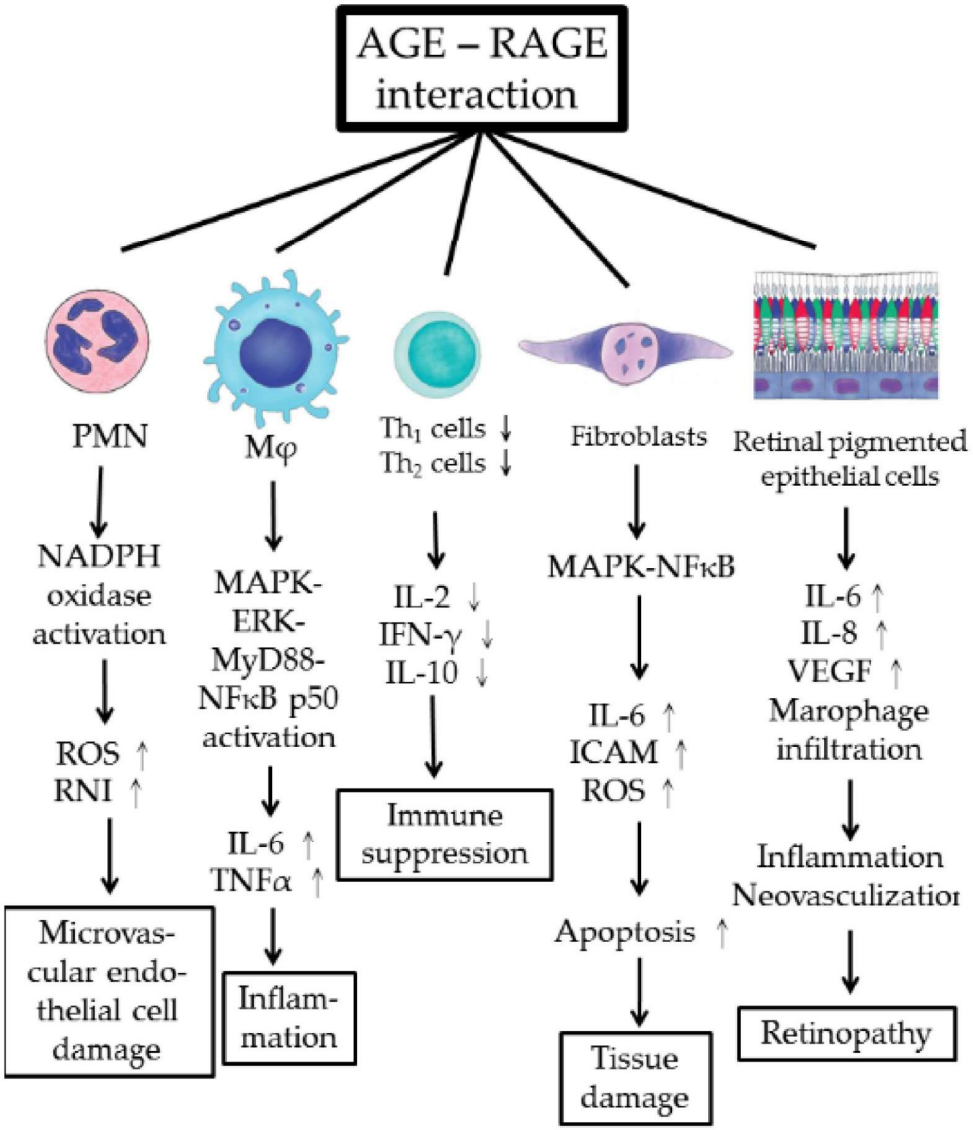


Abbildung 2-13: Zelluläre und molekulärer Pathomechanismus ausgewählter AGE-RAGE Interaktion
PMN= polymorphkernige Leukozyten; NAPDH= Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat; ROS= reaktive Sauerstoffspezies; RNI= reaktive Stickstoffspezies; MAPK= Mitogen-activated protein kinase; ERK= extracellular-signal regulated Kinases; MyD88= Myeloid differentiation primary response 88; NFkB= nukleärer Transkriptionsfaktor; IL-6= Interleukin-6; TNFalpha= Tumornekrosefaktor alpha; IL-2= Interleukin-2; IFN-gamma= Interferon gamma; IL-10= Interleukin-10; ICAM= intercellular adhesion molecule; IL-8= Interleukin-8; VEGF= vascular endothelial growth factor (58).

2.7 Fragestellung

Der Einfluss des AGEs-RAGE System auf Erkrankungen, die eine hohe Progredienz im höheren Lebensalter besitzen, wie beispielsweise das metabolische Syndrom und Diabetes mellitus, ist bislang nicht zufriedenstellend geklärt. Zu den Spätkomplikationen des Diabetes mellitus gehört die diabetische Retinopathie. Aktuelle Studien beschäftigen sich damit, inwieweit der RAGE und das AGE-RAGE System als Zielstruktur für therapeutische Maßnahmen geeignet ist (67). Insbesondere für die diabetische Retinopathie werden hier Ansätze diskutiert (36). Hinsichtlich der Entwicklung einer Atherosklerose konnte im Tiermodell bereits gezeigt werden, dass eine Behandlung mit sRAGE zu einer Suppression führt (68). Insgesamt wird der Einfluss der AGEs auf den Alterungsprozess kontrovers diskutiert, eine AGE arme Diät sowie eine medikamentöse Blockade als eine mögliche Strategie eines gesunden Alterns aber immer wieder postuliert (69). Dabei ist auch die Beziehung zwischen ROS und Alterung Gegenstand aktueller Untersuchungen (59). Es gibt Hinweise darauf, dass die Stimulierung des AGE-RAGE Systems zu oxidativem Stress führt (43). Bereits 1956 hat Harman eine Verbindung des Alterns und degenerativen Erkrankungen mit den freien Radikalen beschrieben und postuliert (70). Mittlerweile wird die Beziehung zwischen ROS und dem physiologischen Alterungsprozess akzeptiert, aber keine direkte Korrelation, sondern ein komplexer Mechanismus angenommen, der bislang nicht vollständig verstanden ist (59).
Um den Einfluss des AGEs-RAGE System mit Fokus auf die Retina im Alterungsprozess zu untersuchen, wurde der B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J RAGE -/- (RAxYFP) mit dem B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J (YFP) zu verschiedenen Alterszeitpunkten (4, 12, 36 und 72 Wochen) verglichen. Die beiden Stämme unterscheiden sich durch fehlende Expression der extrazellulären Domäne des RAGE im RAxYFP Stamm. Hierzu wurden folgende Parameter untersucht:

1. Bestimmung von Gewicht, Blutzucker, HbA1c und Triglyceride im Serum
2. Fluoreszenzmikroskopische Analyse des retinalen Gefäßplexus mit nachfolgender Differenzierung in die einzelnen Schichten und Quantifizierung des Volumens
3. Fluoreszenzmikroskopische Beurteilung von Pericyten und Astrozyten in den retinalen Gefäßen
4. Analyse der Genexpression des membranären Abschnittes des RAGE sowie der antioxidative Enzyme und Proteine SOD1, SOD2, GPX1, Catalase, Crystallin AB, DJ1 in der Retina

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
PBS	PAA Laboratories
PBS 10x	Lonza Group
BSA (Bovine Serume Albumine; Albumin Fraktion V)	Carl Roth
Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Sigma Ultra
Roti®Mount FluorCare	Carl Roth

3.1.2 Antikörper

	Antikörper	Spezies	Hersteller
Primärer Antikörper	Isolectin GS-IB4 Ak, Alexa Fluor 594	Griffonia simplicifolia	ThermoFisher
	Anti GFAP antibody (polyklonal)	Huhn	Abcam
Sekundärer Antikörper	Alexa Fluor ® 405 Anti-Huhn-IgY	Ziege	Abcam

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
1,5 ml Reagiergefäß	Sarstedt AG & Co. KG
2 ml Reagiergefäß	Sarstedt AG & Co. KG
Deckglas	Gerhard Menzel B. V. & Co. KG
Objektträger	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH
Pipetten Gelb/Grau/Blau	Eppendorf
FreeStyle Blutzucker Teststreifen	Abbott Laboratoeries
Fluoview-Immersionsöl F40CC Typ F	Olympus
EDTA-Röhrchen	Sarstedt AG & Co. KG
BD Microlance 3 30G, REF: 304000	Becton Dickinson GmbH
BD Microlance 3 25G, REF: 300400	Becton Dickinson GmbH
Omnifix®-F Solo 1 ml, REF: 9161406V	B. Braun Melsungen AG
Reagenzkassetten, DCA ® HbA1c Reagnet Kit	Siemens Healthcare Diagnostics Ltd.
Reflotron Cholesterin Teststreifen	Roche Diagnostics Gmbh
Reflotron HDL Teststreifen	Roche Diagnostics Gmbh
Reflotron Triglycerid Teststreifen	Roche Diagnostics Gmbh

3.1.4 Geräte

Geräte	Hersteller
ADVIA®2120/120	Siemens Healthineers AG
Reflotron ® Plus	Hoffmann-La Roche AG
HbA1c-POC, DCA Vantage Analyzer	Siemens Healthcare Diagnostics Ltd.

FluoView FV10i	Olympus
Mikroskop, Carl Zeiss OPMI MD Universal S3	Carl Zeiss AG
Mikroskop, Carl Zeiss Stemi 2000	Carl Zeiss AG
Lampe, Olympus Highlight 3001	Olympus
Bindehautpinzette Modell Krefeld, 100mm, chirurgisch G-31230	Geuder AG
Irispinzette Modell Bonn, 8mm, abgewinkelt, anatomisch, G-18911	Geuder AG
Irishäkchen nach Jacobi, G-16180	Geuder AG
Chirurgische Schere	Aesculap
Chirurgische Pinzette	Krauth + Timmermann
bauchiges Skalpell, Präzisa Figur 11/21	Dahlhausen Medizintechnik GmbH
Kataraktmesser	Paramount® Surgimed LTD.
Mikro-Federschere	Aesculap AG
Schütteltisch	UniEquip Gmbh
Schüttelinkubator TH30, SM30	Edmund Bühler GmbH
Schütteltisch	Janke & Kunkel
Präzisionswaage	Sartorius Basic
Vortexer, Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH & CO.

3.1.5 Software

Software	Hersteller
Imaris	Oxford Instruments
Citavi 6	Swiss Academic Software
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation
GraphPad Prism 5	GraphPad Software

3.2 Tierexperimentelles Modell

Um den Einfluss des RAGE auf die Alterung zu untersuchen wurden der B6.Cg-Tg (Thy1-YFP)16Jrs/J Stamm des Jackson Laboratory und der B6.Cg-Tg (Thy1-YFP)16Jrs/J RAGE -/- Stamm gegenübergestellt. Letzterer wurde im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universitätsmedizin Rostock (IBIO) durch Kreuzung auf Basis des B6 RAGE-/- Stamms der Forschergruppe um Prof Nawroth (Heidelberg) generiert. Dabei wurden Tiere der Altersgruppe von 4 Wochen, 3 Monate, 9 Monate und 18 Monate männlichen und weiblichen Geschlechts verwendet. Die Tierversuche wurden entsprechend dem geltenden Tierschutzgesetz und der Nutzerordnung der Zentralen Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt. Die Mäuse bekamen Nagetierfutter (SSNIFF der Firma Soest) und Wasser frei zur Verfügung.

3.3 Organentnahme und Blutentnahme

Die Mäuse wurden gewogen und anschließend mittels CO_2 getötet. Danach wurde der Brustkorb der Maus mit einer chirurgischen Schere eröffnet und das Herz mit einer Kanüle punktiert und das Blut in eine Spritze aufgesogen. Das aspirierte Blut wurde zu einer Hälfte in ein EDTA-Röhrchen, zur Blutbildanalytik mittels ADVIA, und die andere Hälfte in ein vorbereites Reagiergefäß gefüllt. Dieses Reagiergefäß wurde später mit dem Vortexer Reax 2000 zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und bei -20°C gelagert. Mit dem Skalpell wurde ein Zentimeter des Schwanzendes der Maus abgetrennt und in 700µl TailBuffer inkubiert. Dieses Material diente zum Nachweis des RAGE Knockout mittels Southern-Blotting im IBIO. Die Probe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.1 Präparation der Retina

Die Augen der Maus wurden weit geöffnet und mit der Pinzette wurde hinter das Auge gegriffen. Durch leichten Zug konnte das Auge hervorgezogen werden um mit der Federschere das Auge aus der Augenhöhle herauszulösen. Danach wurde das Auge für 3-5 Minuten in einer 2% Formalinlösung inkubiert. Danach konnte die Sklera und Choroidea vom Sehnerv ausgehend eingeschnitten und die freigelegte Retina mit dem Irishäckchen in die vorbereiteten Reagiergefäße gelegt werden. Für die Immunfluoreszenz wurde die präparierte Retina für etwa 16 Stunden über Nacht in Formalin inkubiert, bevor mit der Färbung begonnen wurde. Für die Genexpression wurde sie in einer in RLT-Puffer mit Mercaptoethanol aufgenommen. Dieses Reagiergefäß wurde an Herrn Justus Hosseini übergeben, der die RNA Isolation, cDNA-Synthese und finale quantitative Real Time PCR durchführte. Hierzu verwendete er FAM markierte Gensonden der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) für AgeR (Mm01134790_g1), Catalase (Mm01340247_m1), Crystallin AB (Mm00515567_m1), DJ1 (Mm00498538_m1), GPX1 (Mm00656767_g1), SOD1 (Mm01700393_g1) und SOD2 (Mm00690588_m1) sowie G6pdx (Mm00656735) als Referenzgen.

3.4 Blutanalytik

3.4.1 Glukose

Die Glukose im Blut wurde mit dem FreeStyle Freedom Blutzucker Messsystem bestimmt. Nach Aufforderung zum Blutauftrag auf dem Messgerät wurde direkt nach der Blutentnahme (siehe 3.2) ein Tropfen Vollblut auf den Probenbereich des Teststreifens aufgetragen. Die Glukosekonzentration wurde mittels der Coulometrie-Technologie bestimmt. Bei der Coulometrie werden die Elektronen gemessen, die aus der Reaktion auf dem Teststreifen entstehen. Auf dem Teststreifen befindet sich das Enzym Glukose-Dehydrogenase (GDH) mit dem Coenzym Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD). Wenn Blut auf den Teststreifen aufgetragen wird, wird Glukose durch die GDH zu Gluconsäure/Gluconolacton oxidiert und das Coenzym

FAD durch Übertragung von Elektronen und Wasserstoff zu $FADH_2$ reduziert. $FADH_2$ reagiert mit der oxidierten Form des Mediators (Med_{ox}) zur reduzierten Form des Mediators (Med_{red}). Durch den angelegten Polarisationsstrom am Messgerät wird die Med_{red} wieder zur Med_{ox} und die freigesetzten Elektronen werden gemessen. Die Menge der gemessenen Elektronen ist somit proportional zur Glukosekonzentration (71).

3.4.2 HbA1c

Das Hämoglobin $A1_c$ wurde mit dem DCA™ Vantage Analysesystem gemessen. 1 µl Vollblut wurde direkt nach der Blutentnahme (siehe 2.3) in die Glaskapillare des Kapillarhalters gefüllt. Der Kapillarhalter wurde in die Kassette des Hämoglobin $A1_c$-Reagenzkit eingesetzt. Die Kassette wurde gescannt und in den DCA Vantage eingesetzt. Das Gesamthämoglobin wird gemessen, indem das Hämoglobin mit Kalium-Eisencyanid zu Methämoglobin oxidiert. Dieses Methämoglobin reagiert mit Thiocyanat zum gefärbten Thiocyanat-Methämoglobin. Die Farbentwicklung des Thiocyanat-Methämoglobin bei einer Wellenlänge von 531nm wird durch den DCA Vantage gemessen und ist proportional zur Gesamt-Hämoglobinkonzentration. Zur Messung des $HbA1_c$ verwendet das System einen Agglutinator mit immunreaktiven Stellen für $HbA1_c$. Dieser Agglutinator agglutiniert mit Latex, welches mit $HbA1_c$ spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpern beschichtet ist. Das $HbA1_c$ aus der Blutprobe konkurriert mit dem antikörperbeladenen Latex um die Bindungsstellen am Agglutinator. Dies hat eine geringere Agglutination, somit auch eine geringere Streuung und folglich einer verringerten Absorption des Lichtes bei 531nm zur Folge. Dieser Wert kann mithilfe einer Kalibrationskurve in eine $HbA1_c$-Konzentration quantifiziert werden. Der prozentuale HbA1c Anteil wird mit der folgenden Formel berechnet: (72, 73)

$$\%HbA1c = \frac{[HbA1c]}{[Gesamthämoglobin]} x\ 100$$

3.4.3 ADVIA

Nach der Blutentnahme (siehe 2.3) wurde das EDTA Blut über Nacht in den Kühlschrank bei +8°C gelagert. Am Folgetag erfolgte die Blutanalytik am ADVIA®2120/120. Dazu wurden die zu untersuchenden Blutproben, sowie die Kontrollblutproben aus dem Kühlschrank genommen und mit einem Überkopfschüttler mindestens zehn Minuten auf Raumtemperatur gebracht. Nach der Messung der Kontrollblutproben, welche zur internen Eichung führte, wurde das Blutbild aus der zu untersuchenden Blutprobe erstellt. Dazu benötigte man 180µl Vollblut pro Probe, die automatisiert durchflusszytometrisch analysiert wurden.

3.4.4 Reflotron

Das HDL, das Cholesterin und die Triglyceride wurden mit EDTA Blut am Reflotron®Plus bestimmt. Das Messprinzip des Reflotrons beruht auf der Reflexionsmessung in Abhängigkeit von der Farbentwicklung der Teststreifen. Das Blut, welches am Vortag abgenommen und im

Kühlschrank bei +8°C gelagert wurde, ist auf die entsprechenden Teststreifen pipettiert (30µl) und dann in die Messkammer eingeführt worden (74).

3.5 Immunfluoreszenz

Die Anfärbung der Retinagefäße wurde ,basierend auf der Arbeit von Milde et al. mittels Immunfluoreszenz, entwickelt (40). In Ergänzung hierzu wurden ebenfalls die Gliazellen angefärbt. Da es sich hierbei um eine Neuentwicklung handelt, die erst im Laufe der Arbeit entstanden ist, erfolgte die Färbung nur exemplarisch bei einigen Tieren. Die im Folgenden vorgestellte Methode ergab sich nach Vorversuchen mit verschiedenen Verdünnungen. Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden auf Vorrat angesetzt und vor Gebrauch auf Haltbarkeit überprüft.

3.5.1 Immunfluoreszenz der Gefäße

Nachdem die Retina präpariert war, wurde diese in zweiprozentiger Formalinlösung bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Retina dreimal für zehn Minuten mit PBS (phosphate buffered saline) bei Raumtemperatur auf dem Schütteltisch von Resten der Choroidea und Sklera befreit. Anschließend wurde die Retina mit PBS-0,1%Triton X100-1%BSA (PBS-TX-BSA) für zwei Stunden blockiert. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Retina mit einer Verdünnung von 1:200 mit Isolectin B4 + Alexa 594 über Nacht bei 4°C dunkel gelagert. Das Isolectin IB4 ist ein 114 kDa großes Glykoprotein, welches von den Samen der tropischen Hülsenfrucht Griffonia simplicifolia isoliert wird. Es kann als Sonde für die spezifischen Markierung von Endothelzellen dienen. Die B Untereinheit bindet an α-D-Galactosyl Reste, die sich unter anderem auf Erythrocyten der Blutgruppe B und den Endothelzellen befinden. Durch die Konjugation des Isolectins mit Alexa 594 können diese Strukturen über die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden (75). Am nächsten Tag wurde die Retina viermal für dreißig Minuten bei Raumtemperatur mit PBS-0,1%Triton X100 (PBS-TX) auf dem Schüttler inkubiert, bevor die Retina eingedeckt werden konnte (40).

3.5.2 Immunfluoreszenz der Gliazellen

Um die Gliazellen mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar machen zu können, wurde die Retina, nachdem sie in zweiprozentiger Formalinlösung über Nacht inkubierte, dreimal mit PBS und anschließend über zwei Stunden mit PBS-TX auf dem Schüttler gewaschen. Danach wurde die Retina mit dem Anti-GFAP Antikörper, mit einer Verdünnung von 1:500 über Nacht bei 4°C im Kühlschrank, inkubiert. Dieser primäre Antikörper bindet an das GFAP der Astrozyten in der Retina. Am nächsten Tag wurde die Retina erst dreimal für 20 Minuten mit PBS-TX-BSA bearbeitet, bevor sie mit Alexa 405 Goat Anti-Chicken IgY (Verdünnung: 1:1000) für eine Stunde abgedunkelt eingelegt wurde. Das Alexa 405 Goat Anti-Chicken IgY bindet als sekundärer Antikörper an den Anti-GFAP Antikörper und bringt die Astrozyten unter dem

Fluoreszenzmikroskop zum fluoreszieren. Im nächsten Arbeitsschritt wurde das Präparat dreimal für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen und dann mit dem Isolectin B4 (wie unter 3.4.1 beschrieben) über Nacht im Kühlschrank gelassen. Abschließend wurde die Retina mit PBS-TX-BSA dreimal für 20 Minuten gewaschen und dann eingedeckt.

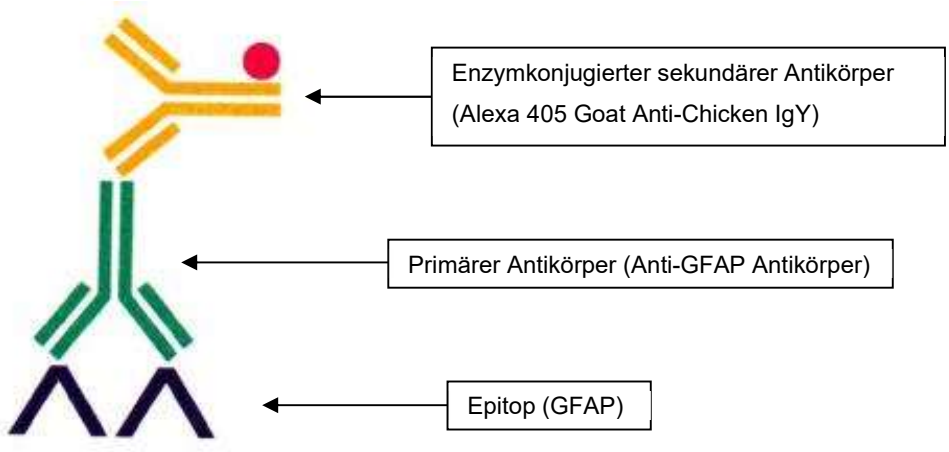


Abbildung 3-1: Indirekte Immunhistochemie (Färbung der Gliazellen). Modifiziert nach (76).

3.6 Eindecken der Retina

Zum Eindecken der Retina wurde das Zeiss Stemi 2000 Mikroskop zusammen mit der Olympus Highlight 3001 Lampe genutzt. Das Präparat wurde mit der Wölbung nach unten auf den Objektträger gelegt und dann viermal eingeschnitten (wie in Abbildung 3-2 dargestellt). Die entstanden „Flügel“ wurden glattgestrichen und die übrig gebliebene Flüssigkeit mit Zellstoffpapier aufgesogen. Danach wurde ein Tropfen des Roti-Mount Fluor Care auf die Retina getropft und mit einem Deckgläschen unter Vermeidung von entstehenden Luftblasen bedeckt. Nachdem das Präparat angetrocknet war, wurden die Ränder mit Nagellack fixiert.

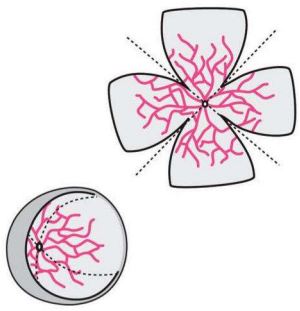


Abbildung 3-2: Einschneiden der Retina (40).

3.7 Fluoreszenzmikroskopie mit dem Fluoview 10i

Bei der konfokalen Laserscanning Mikroskopie wird das Präparat zur Erstellung des Gesamtbildes mittels eines Scans untersucht. Dadurch erfolgt die Anregung jeweils nur punktuell mittels des Lasers, wodurch die Entstehung von Streulicht minimiert wird. Das sogenannte "Pinhole", eine Lochblende vor dem Detektor blendet das Licht außerhalb des

Focus zusätzlich aus. So erreicht nahezu nur Licht aus der Focus-Ebene den Detektor. Durch multiple Aufnahmen in Z wird auch in dieser Achse eine gute Auflösung erreicht und eine 3D-Rekonstruktion der untersuchten Gewebeabschnitte ermöglicht (77).

Das verwendete Fluoview10i System von Olympus ist ein automatisches konfokales Laserscanning Mikroskop (78). Nach der Auswahl der benötigten Anregungswellenlängen, in Abhängigkeit von der Art der Färbung (LD Laser 405nm mit 22 mW für Alexa Fluor 405 und LD Laser 559nm mit 18 mW für Alexa Fluor 594), wurde durch den Autofocus die richtige Ebene aufgefunden.

Durch Bestrahlung kommt es zu einer Anregung eines Elektrons im Fluorophor, welches dadurch in eine höhere Schale und damit in einen instabilen Zustand fällt. Beim Übergang von diesem instabilen Zustand in den stabilen Zustand kommt es zu einer Energiefreisetzung. Die resultiert in einem fluoreszierenden Licht mit längerer Wellenlänge (77).

Es wurden pro Präparat zwei Bildmodalitäten aufgenommen. In der 10-fach Vergrößerung (Luftobjektiv) wurde zunächst automatisiert eine Mappe von 3 x 3 Einzelbildern aufgenommen, sodass ein zusammenhängendes größeres Bild der Retina über den Computer generiert werden konnte. In der 60-fach Vergrößerung wurde von jedem Flügel (siehe Abbildung 3-2), mittels des Ölimmersionsobjektiv (NA 1.35, UPLSAPO 60x O), ein Bild mit einer Auflösung von 1024x1024 Pixel (x, y) eines möglichst repräsentativen Abschnitts erstellt. Die Schichtdicke des z-Stapels zur Aufnahme des gesamten Gefäßplexus betrug 1µm.

3.8 Bildbearbeitung mittels Imaris

Die Bildbearbeitung erfolgte mittels des Programms Imaris (Oxford Instruments). Das am Fluoview10i generierte 3D-Bild wurde in Imaris geöffnet. Im sogenannten „Slice View“ konnte das Bild (x,y) in den einzelnen z-Schichten schrittweise betrachtet und die Pericyten manuell ausgezählt werden.

Dabei wurde darauf geachtet, dass Pericyten, die in mehrere Schichten auftreten, lediglich einmal gezählt wurden. Des Weiteren konnte durch die fehlende Anfärbung nur sicher identifizierte kapilläre und postkapilläre Pericyten gezählt werden.

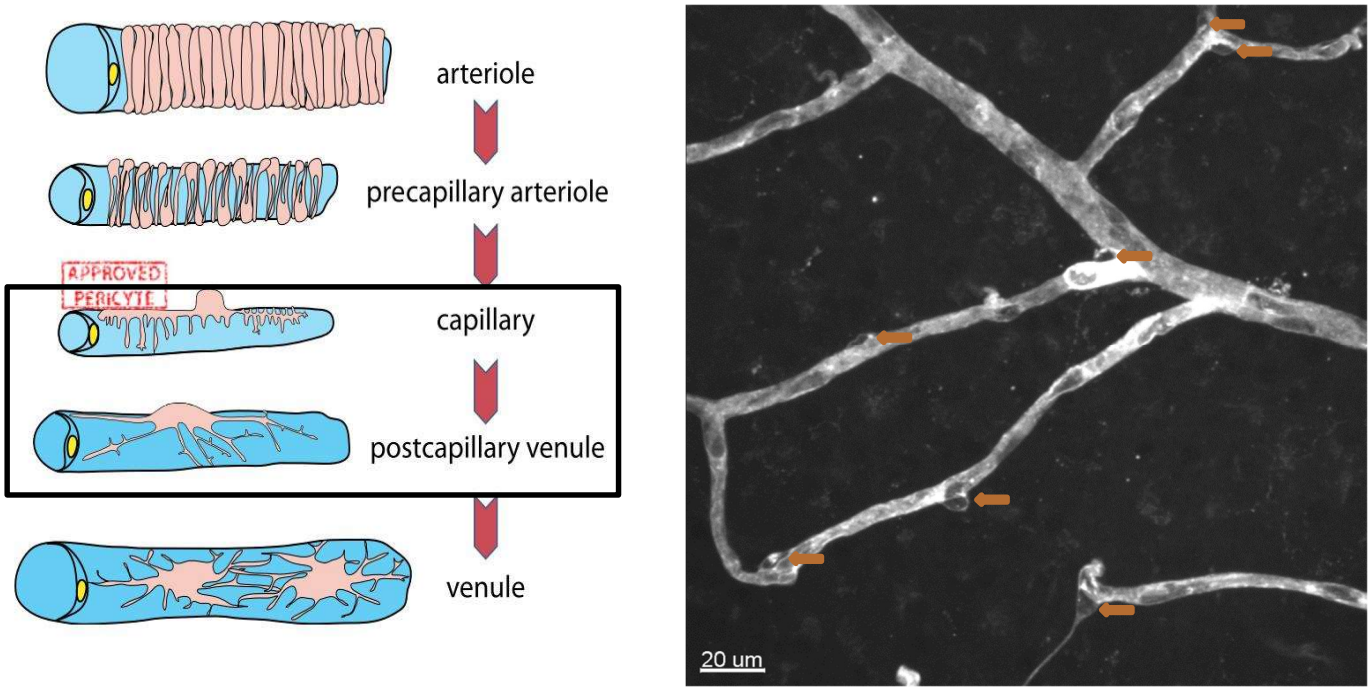


Abbildung 3-3: Charakterisierung von Pericyten [modifiziert nach (79)] (links) und Auszählung der Pericyten (markiert mit Pfeilen) im „Slice-View“ exemplarisch gezeigt an einer 9 Monate alten RAxYFP Maus (rechts).

Anschließend wurde der Gefäßplexus in drei verschiedenen Schichten eingeteilt: oberflächlicher (siehe 4.3.1) – intermediärer (siehe 4.3.2) – tiefer Gefäßplexus (siehe 4.3.3). Aufgrund von unvermeidbaren Unebenheiten im Präparat wurde die Einteilung manuell vorgenommen und die jeweilige Region (region of interest, ROI) markiert. Nachfolgend wurde die ROI im „Surface-Tool“ des Programms genutzt um automatisiert eine Oberfläche des jeweiligen Gefäßplexus zu generieren. Die farbliche Markierung kann im Programm frei gewählt werden. Zur besseren Auffindbarkeit wurde in dieser Arbeit einheitlich der obere Gefäßplexus grün, der intermediäre blau und der tiefe rot markiert (siehe Abbildung 4-7). Imaris berechnet das Volumen der Gefäßplexus, die in einer Excel-Tabelle als Number of voxels ausgegeben wurden und zur graphischen Darstellung und statistischen Auswertung der Resultate in das Programm GraphPad Prism 5 übertragen wurden.

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 5. In dem vorliegenden Studiendesign handelt es sich um parametrisch verteilte, stetige Zielgrößen. Des Weiteren sind die Altersgruppen unverbunden, da die Tiere für die Untersuchungen getötet werden mussten und so nur eine einmalige Messung zu einem Zeitpunkt pro Tier möglich war. Um die Werte zwischen den Stämmen und/oder der Alterskohorte zu bestimmen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) (80) in Form eines 1way- (Einfluss des Stammes) oder 2way ANOVA (Einfluss des Stammes und Alter) durchgeführt. Anschließend wurde ein Bonferroni-post Test angewendet, um die fälschliche Annahme einer Hypothese zu minimieren (81).

4 Ergebnisse

In dieser Studie wurden der B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J (YFP) Stamm des Jackson Laboratory und der B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J RAGE -/- (RAGExYFP) Stamm gegenübergestellt. Die Tiere waren 4-, 12-, 36- oder 72 Wochen alt. So konnte der Einfluss des RAGE Knockout altersabhängig untersucht werden.

Für eine größere Stichprobe wurden die Werte der Blutanalytik mit den Messwerten von Herrn Justus Hosseini zusammengeführt und in die Statistik mit einbezogen.

Im Folgenden werden der RAxYFP (schwarze Säulen) mit dem YFP (weiße Säulen) der verschiedenen Altersgruppen miteinander verglichen. Die Abbildungen zeigen den Mittelwert $\pm$ den Standartfehler (SEM). Die Signifikanzen zwischen den Stämmen wurden mit „*“ markiert, während mit „+“ Unterschiede zwischen den Altersgruppen hervorgehoben wurden. Eine Tendenz wurde bei $0.1 \geq p > 0.5$ festgestellt. Des Weiteren wurde zwischen $p < 0.05$ (* oder +), $p < 0.01$ (** oder ++) und $p < 0.001$ (*** oder +++) unterschieden.

In den folgenden Abschnitt genannte Werte sind, solange nicht anders beschrieben, die Mittelwerte der jeweiligen Untersuchung.

4.1 Blutanalytik

4.1.1 Blutzucker

Im Alter von 4 Wochen lag der Mittelwert der Blutglukose bei den RAxYFP Tieren bei 8,7 mmol/l und damit um 1,8 mmol/l höher als die Blutglukose der 4 Wochen alten YFP Tiere (6.9 mmol/l). Die relativ hohe Blutglukose der RAxYFP Tiere im Alter von 4 Wochen (8,7 mmol/l) sank mit der Alterung ab. Die YFP Tiere zeigen einen gegenläufigen Trend. So ergab die Auswertung bei den 12 Wochen alten Tieren keinen signifikanten Unterschied zwischen den Stämmen, während bei den 36 Wochen alten Tieren die Blutglukose der YFP Tiere (8,9 mmol/l) um 1,9 mmol/l höher war als bei den RAxYFP Tieren (7,0 mmol/l). Auch in der Altersgruppe der 72 Wochen alten Tiere war die Blutglukose der YFP Tiere (8,7 mmol/l) höher als die der RAxYFP Tiere (6,9 mmol/l).

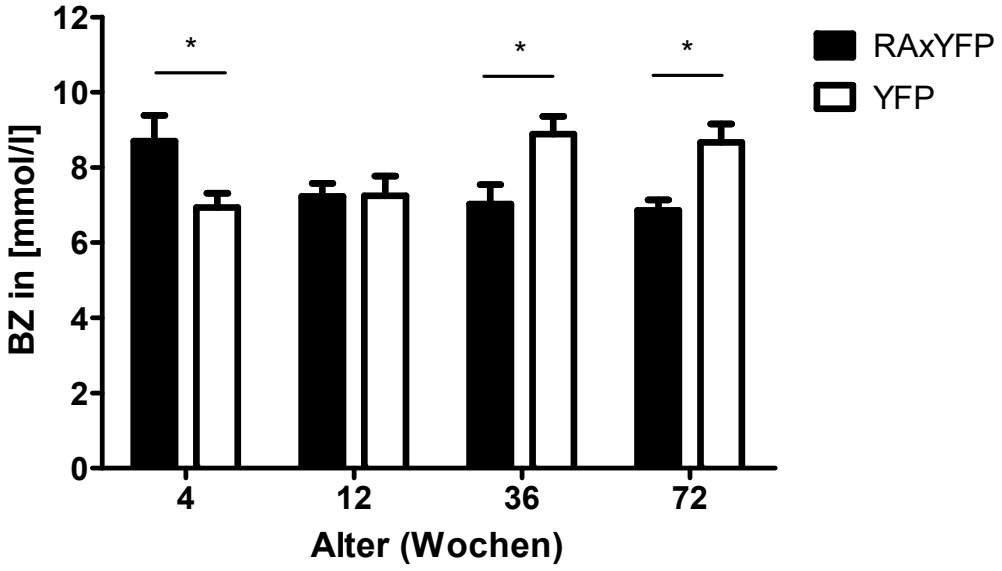


Abbildung 4-1: Blutglukose von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen
4 Wochen (n= 19-20); 12 Wochen (n= 17-34); 36 Wochen (n= 22-23); 72 Wochen (n= 13-30); *, $p<0.05$; 1way ANOVA/ Bonferroni Korrektur.

4.1.2 HbA1c

Der HbA1c zeigte sich korrelierend zur Blutglukose bei den RAxYFP Mäusen im Alter von 4 Wochen (9,9 mmol/l) und 12 Wochen (22,8 mmol/l) höher als bei den YFP Tieren der gleichen Altersgruppe (4 Wochen YFP bei 6,5 mmol/l und 12 Wochen YFP bei 19,4 mmol/l). Bei den 36 Wochen alten Tieren gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Stämmen. Analog zur Blutglukose gab es eine Umkehr im höheren Alter. Im Alter von 72 Wochen zeigten sich die Werte der YFP Tiere (24,1 mmol/l) um 3,9 mmol/l höher als die Werte der RAxYFP Mäuse (20,2 mmol/l).

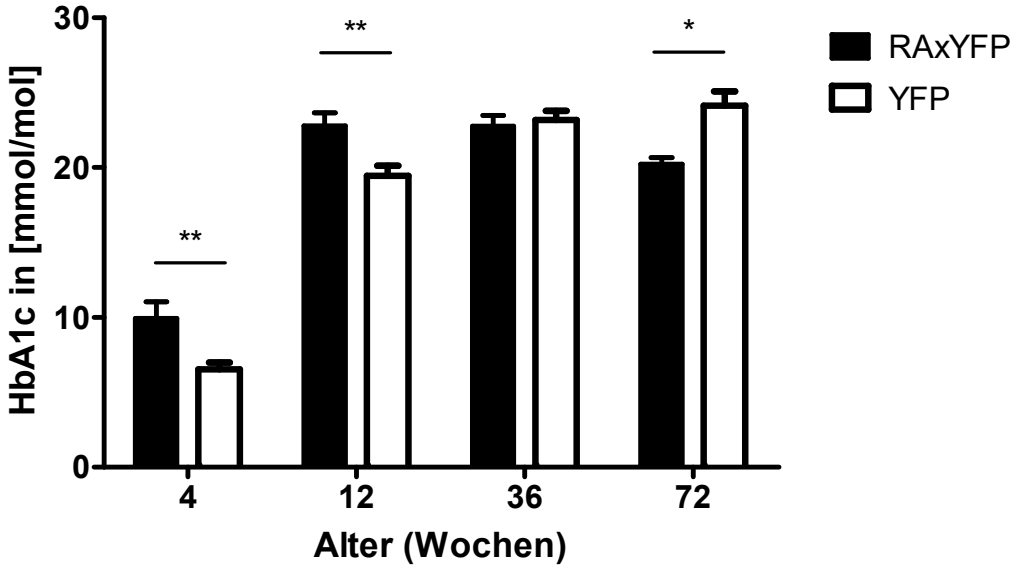


Abbildung 4-2: HbA1c von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen
4 Wochen (n= 17-20); 12 Wochen (n= 17-28); 36 Wochen (n= 15-20); 72 Wochen (n= 10-27); *, p<0,05; **, p<0,01; 1way ANOVA/ Bonferroni Korrektur.

4.1.3 Blutfettwerte

4.1.3.1 Triglyceride

Bei den Triglyceriden gab es bei den 4 Wochen alten Tieren keinen signifikanten Unterschied zwischen den Stämmen. Mit der Alterung der Tiere stiegen die Triglycerid-Werte des RAxYFP Stammes deutlich, während die Triglyceride des YFP-Stammes auf einem ähnlichen Niveau verblieben. So ergab sich, dass im Alter von 12 Wochen die Werte der RAxYFP Tiere (140,9 mg/dl) signifikant höher waren als die Werte des YFP Stammes (108,7 mg/dl). Auch im Alter von 36 Wochen verblieben die Werte des RAxYFP Stammes signifikant höher als die Triglyceride des YFP-Stammes. In der Altersgruppe der 72 Wochen alten Tieren lag mit 56,4 mg/dl der größte Unterschied zwischen den Stämmen (RA-YFP (154,1 mg/dl); YFP(97,7 mg/dl)) vor.

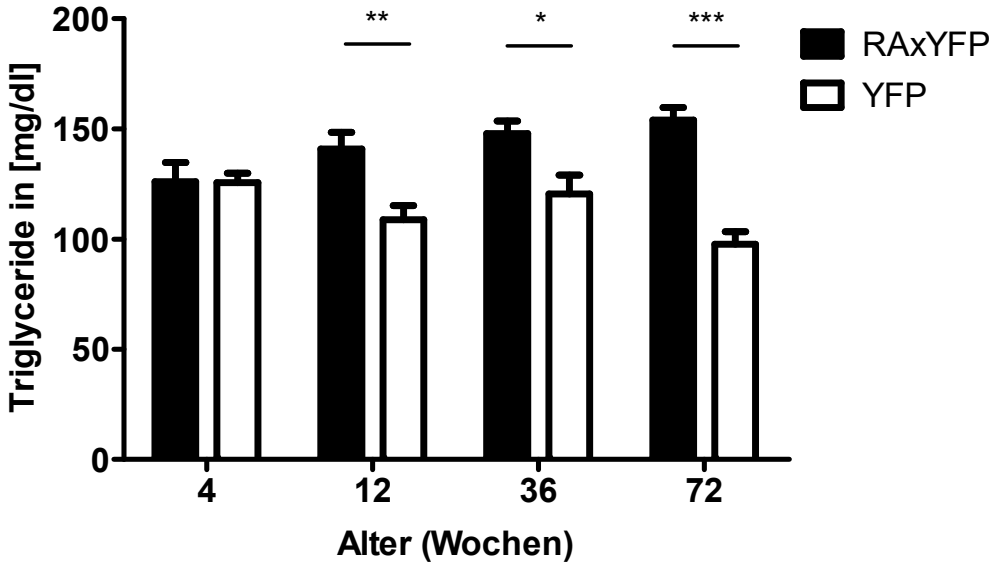


Abbildung 4-3: Triglyceride von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen
4 Wochen (n= 13-21); 12 Wochen (n= 16-21); 36 Wochen (n= 15-21); 72 Wochen (n= 18-30); *, p<0,05; **, p<0,01, ***, p<0,001; 1way ANOVA/ Bonferroni Korrektur.

4.1.3.2 HDL

Die HDL waren bei den RAxYFP Tieren insgesamt höher als bei den YFP Tieren. Generell zeigte sich im Rahmen der Alterung bei beiden Stämmen ein ähnlicher Verlauf. Die HDL-Werte waren bei den 4 Wochen alten Tieren am niedrigsten und nehmen mit der Alterung zu. Bei den 36 Wochen alten Tieren erreichten beide Stämme ihr Maximum (RAxYFP= 49.0 mg/dl; YFP= 39,9 mg/dl), bevor die HDL bei den 72 Wochen alten Tieren wieder abnahmen. Bei keiner Alterskohorte konnte jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden.

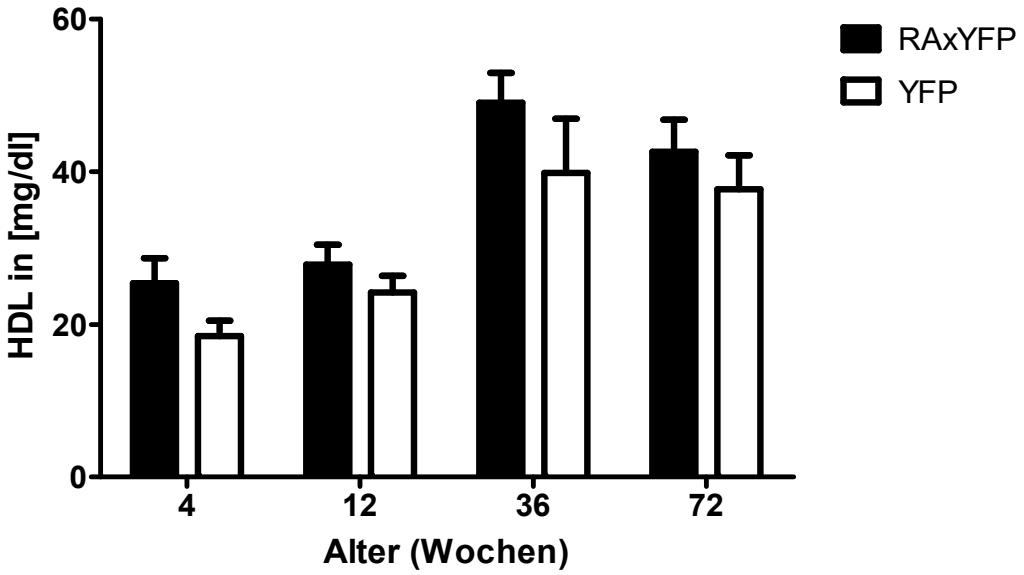


Abbildung 4-4: HDL von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen
4 Wochen (n= 14-18); 12 Wochen (n= 16-22); 36 Wochen (n= 15-21); 72 Wochen (n= 18-30); 1way ANOVA/ Bonferroni Korrektur

4.1.4 Blutbild

Das Blutbild wurde mit dem ADVIA®2120/120 aus dem abgenommenen EDTA-Blut erstellt. Das Hämoglobin stieg von 8,4 g/dl (4 Wochen) auf 11,1 g/dl (12 Wochen) bei den RAxYFP Mäusen. Das entspricht einem prozentualen Anstieg von 32,14%. Bei dem YFP Stamm zeigte sich ein vergleichbarer Anstieg des Hämoglobins von den 4 Wochen alten Tieren (8,3 mg/dl) zu den 12 Wochen (11,4 mg/dl) alten Tieren um 37,35%. Der Hämoglobinwert blieb während der Alterung auf einem ähnlichen Wert wie bei den 12 Wochen alten Tieren und zeigte zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den Stämmen.

Die weißen Blutkörperchen (white blood cells, WBC) waren im Alter von 4 und 12 Wochen bei den RAxYFP Tieren jeweils signifikant höher als bei den YFP Tiere. Bei den 4 Wochen alten RAxYFP Mäusen lagen die WBC bei 9,8x10^3/µl und blieben bis zum Alter von 12 Wochen konstant (10x10^3/µl). In der weiteren Alterung sank der Wert um 20% auf 8x10^3/µl. Bei den 36 und 72 Wochen alten Mäusen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Stämmen. Beim YFP-Stamm zeigten sich die WBC relativ konstant. Zwischen den 4 Wochen alten YFP Tieren (7,8x10^3/µl) und den 72 Wochen alten Tieren (7,4x10^3/µl) des gleichen Stammes lag lediglich ein Unterschied von 5,13% vor.

Bei den Neutrophilen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Stämmen. Bei beiden Stämmen zeigte sich, dass die Neutrophilen im Rahmen der Alterung zunahmen. Je älter die Tiere beider Stämme, desto höher wurde auch der prozentuale Anteil der Neutrophilen. Bei den 4 Wochen alten Tieren lag der prozentuale Anteil der Neutrophilen bei 5,2% (RAxYFP) bzw. 5,9% (YFP). Mit der Alterung kam es beim RAxYFP Stamm im Vergleich

zwischen den 4 Wochen alten Tieren und den 72 Wochen alten Tieren zu einem Anstieg von 155,8% auf 13,3%. Bei dem YFP Stamm kam es im gleichen Zeitraum zu einem Anstieg von 137,3%.

Die Monozyten zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Stämmen. Der prozentuale Anteil der Monozyten lag bei jeder Altersgruppe beim YFP-Stamm höher als beim RAxYFP-Stamm. Bei beiden Stämmen war der Anteil der Monozyten bei den 72 Wochen alten Mäusen mit 3,1% am höchsten.

Die Lymphozyten zeigen bei den Mäusen im Vergleich zum Menschen einen hohen prozentualen Anteil. Im Alter von 4 Wochen lag der prozentuale Anteil der Lymphozyten beim RAxYFP Stamm um 5,66% signifikant höher als beim YFP Stamm. Mit der Alterung nahm der Anteil der Lymphozyten bei beiden Stämmen ab. Bei den 72 Wochen alten Tieren lag der Wert bei 78,1% (RAxYFP) und 75,3% (YFP) und damit um 12% bzw. 9,7 % niedriger als bei dem 4 Wochen alten Tieren.

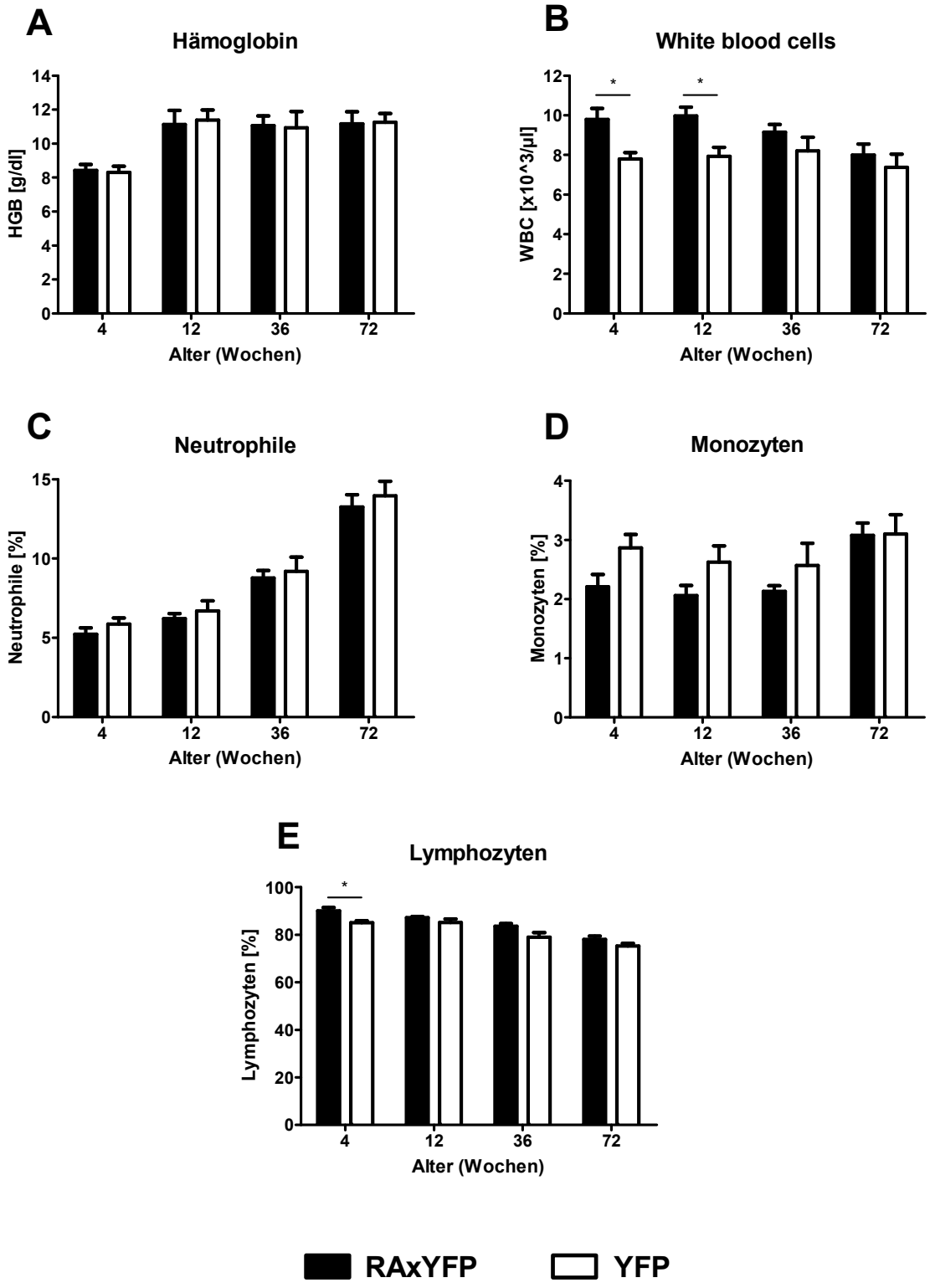


Abbildung 4-5: Blutbild von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen
A: Hämoglobin: 4 Wochen (n= 15-17); 12 Wochen (n= 10-22); 36 Wochen (n= 14-23); 72 Wochen (n= 16-28)
B: White blood cells: 4 Wochen (n= 15-17); 12 Wochen (n= 10-22); 36 Wochen (n= 14-23); 72 Wochen (n= 16-28)
C: Neutrophile: 4 Wochen (n= 15-17); 12 Wochen (n= 10-22); 36 Wochen (n= 14-23); 72 Wochen (n= 16-28)
D: Monozyten: 4 Wochen (n= 15-17); 12 Wochen (n= 10-22); 36 Wochen (n= 14-23); 72 Wochen (n= 16-28)
E: Lymphozyten: 4 Wochen (n= 15-17); 12 Wochen (n= 10-22); 36 Wochen (n= 14-19); 72 Wochen (n= 16-28)
*, $p<0,05$; **, $p<0,01$, ***, $p<0,001$; 1way ANOVA/ Bonferroni Korrektur

4.2 Gewichtsverlauf

Der Gewichtsverlauf zeigte sich bei beiden Geschlechtern vergleichbar. Mit zunehmendem Alter nahmen die Mäuse bei beiden Geschlechtern und Stämmen an Gewicht zu und waren mit 72 Wochen am schwersten. Die RAxYFP Tiere waren in allen Altersgruppen schwerer. Bei den 72 Wochen alten weiblichen Tieren war dieser Unterschied signifikant. Die 72 Wochen alten RAxYFP Tiere waren mit 32,8g um 6,3g schwerer als die YFP Tiere der gleichen Altersgruppe. Bei den Männchen waren die 4 Wochen alten RAxYFP Tieren signifikant schwerer als die YFP Mäuse. Ebenso zeigte sich bei den 36 und 72 Wochen alten Tiere ein Unterschied. Die RAxYFP Tiere waren mit 34,4g (36 Wochen) bzw. 38,0g (72 Wochen) signifikant schwerer als die YFP Tiere (30,5g (36 Wochen) bzw. 34,6g (72 Wochen)).

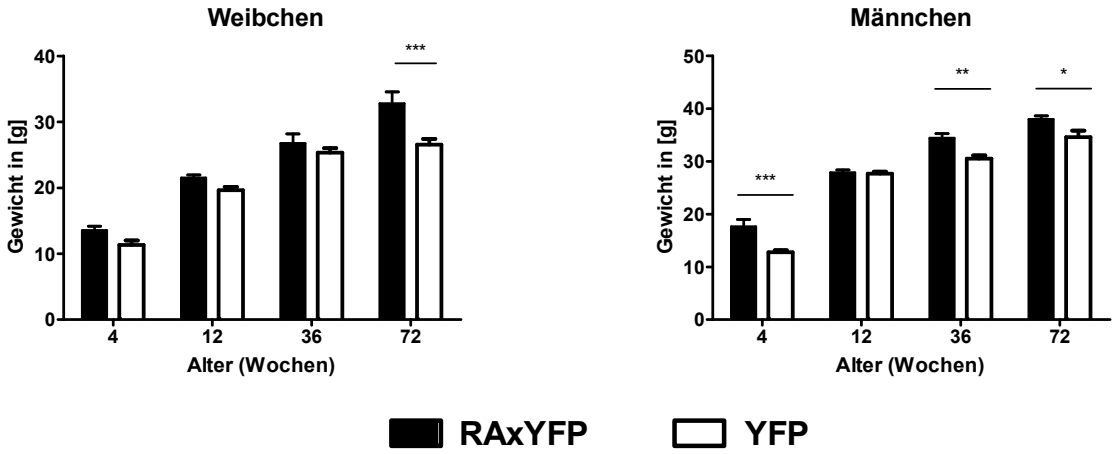
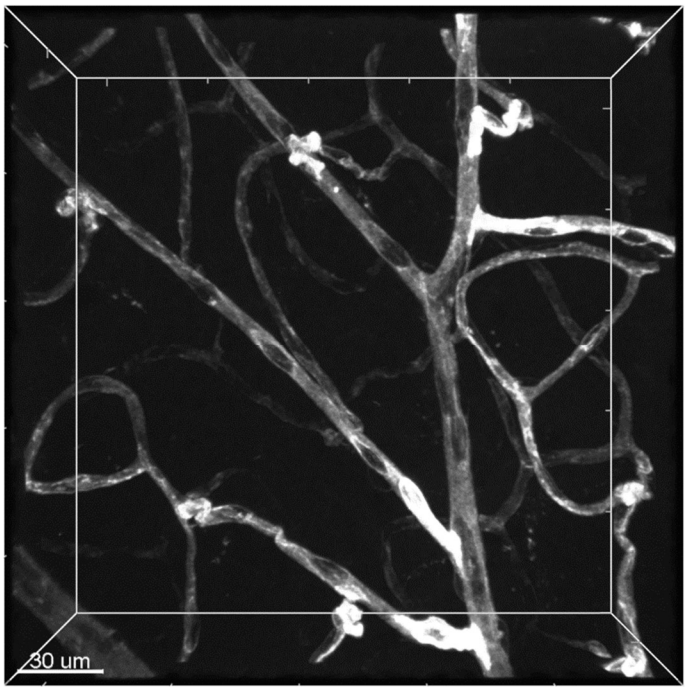


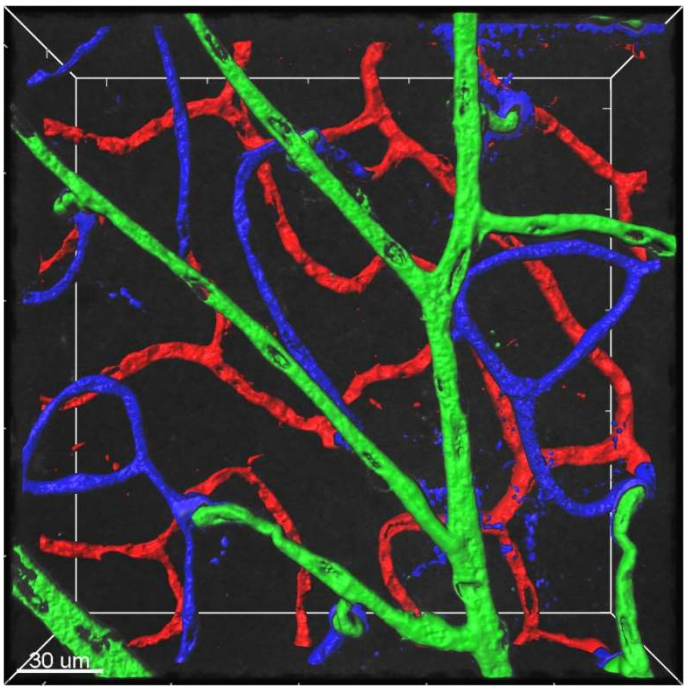
Abbildung 4-6: Gewichtsverlauf von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen, Weibchen (w) versus Männchen (m)
4 Wochen w (n= 10-11), m (n= 9); 12 Wochen w (n= 12-19), m (n=5-15); 36 Wochen w (n= 6-10), m (n= 11-14); 72 Wochen w (n= 6-11), m (n= 7-19); *, p<0,05; **, p<0,01, ***, p<0,001; 1way ANOVA/ Bonferroni Korrektur.

4.3 Retina

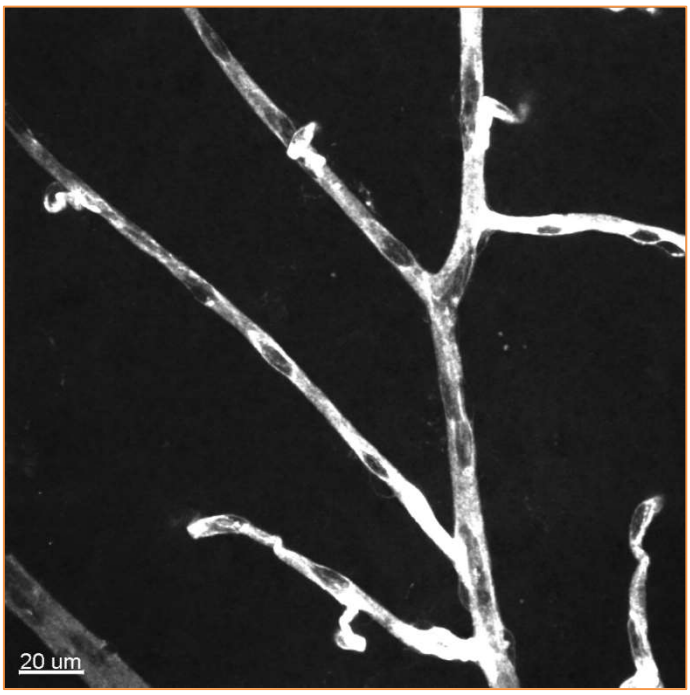
Die am Fluoview10i (Olympus) mit 60-facher Vergrößerung aufgenommenen 3D Bilder wurden wie unter 3.6 beschrieben im Programm Imaris (Oxford Instruments) ausgewertet. Die Festlegung der Oberflächen erfolgte manuell, während das Programm nachfolgend aus den generierten Oberflächen automatisch das Volumen berechnete (Number of Voxels). Im Folgenden ist ein Beispiel der Aufteilung in die drei Gefäßplexus und die Bearbeitung mit Imaris gezeigt.

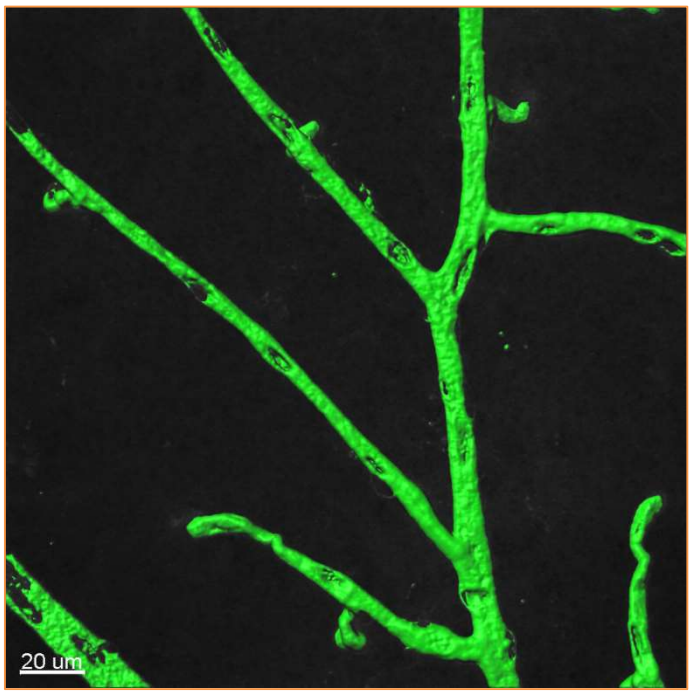
GG





OG





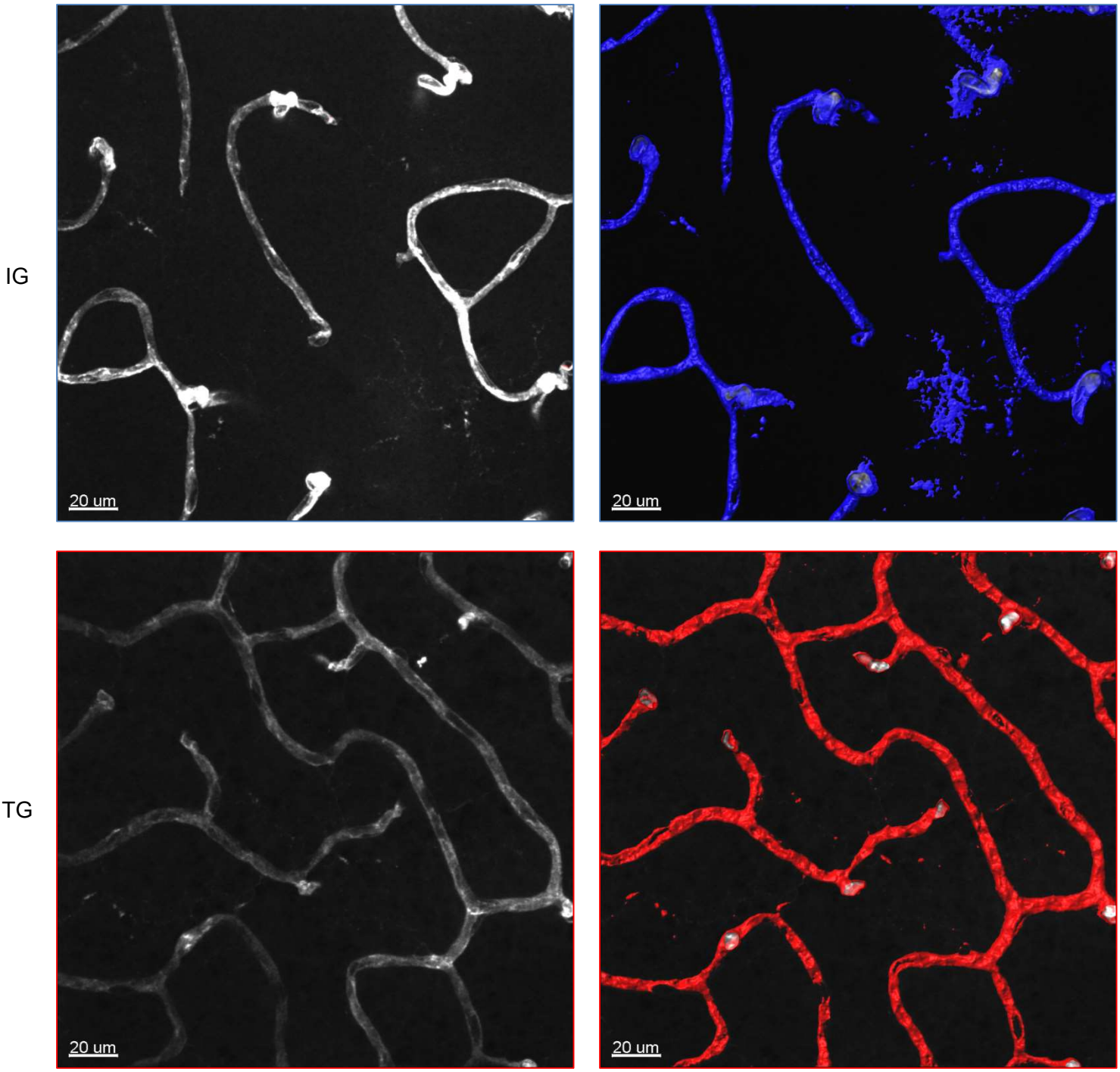


Abbildung 4-7: Darstellung der Bildbearbeitung und Auswertung der mittels Isolectin B4 + Alexa 594 angefärbten Gefäße in der Retina am Beispiel einer 9 Monate alten weiblichen Maus des YFP-Kontrollstamm.
Die erste Zeile zeigt den dreidimensionalen, gesamten Gefäßplexus (GP). Die nächste Zeile stellt den oberflächlichen Gefäßplexus (OG) dar. Darunter befindet sich die Darstellung des intermediären Gefäßplexus (IG) und ganz unten des tiefen Gefäßplexus (TG). Links ist jeweils das unbearbeitete Bild dargestellt, während rechts das mittels des Surface Tool von Imaris (Oxford Instruments) bearbeitete Bild zu sehen ist.

4.3.1 Oberflächlicher Gefäßplexus

Beim oberflächlichen Gefäßplexus zeigte sich bei den 4 Wochen alten Tieren ein signifikant höheres Volumen im RAxYFP als im YFP Stamm. In der Altersgruppe der 12 Wochen alten Mäusen war das Volumen bei den YFP Tiere höher als das Volumen der RAxYFP Tiere. Bei den 36 Wochen alten Tieren kam es wiederum zu einer Umkehr und das Volumen der RAxYFP Tiere überstieg das Volumen der YFP Tiere. Die Unterschiede in den beiden Alterskohorten waren jeweils nicht signifikant. Bei den alten Tieren (72 Wochen) gab es auch tendenziell keine Unterschiede zwischen den Stämmen. Altersabhängig zeigten beide Stämme ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

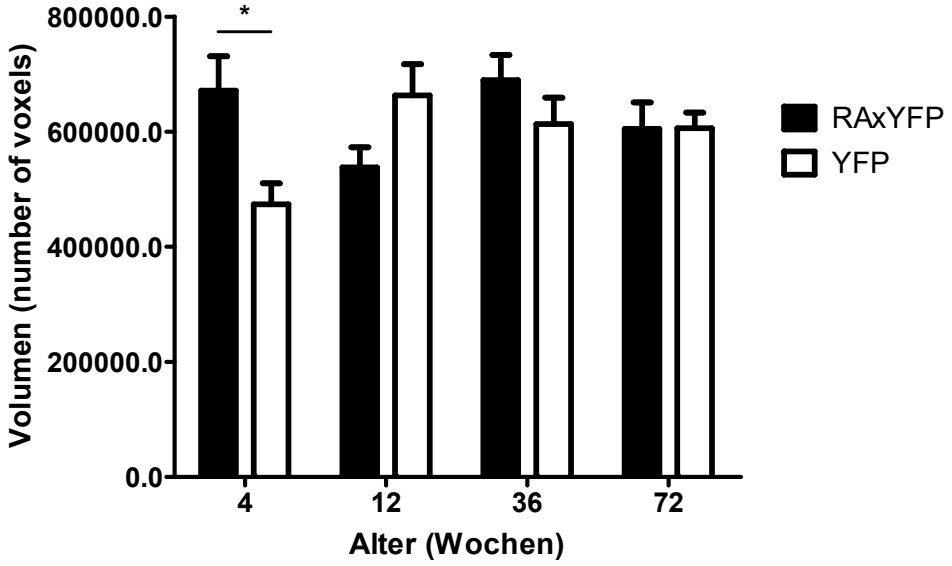
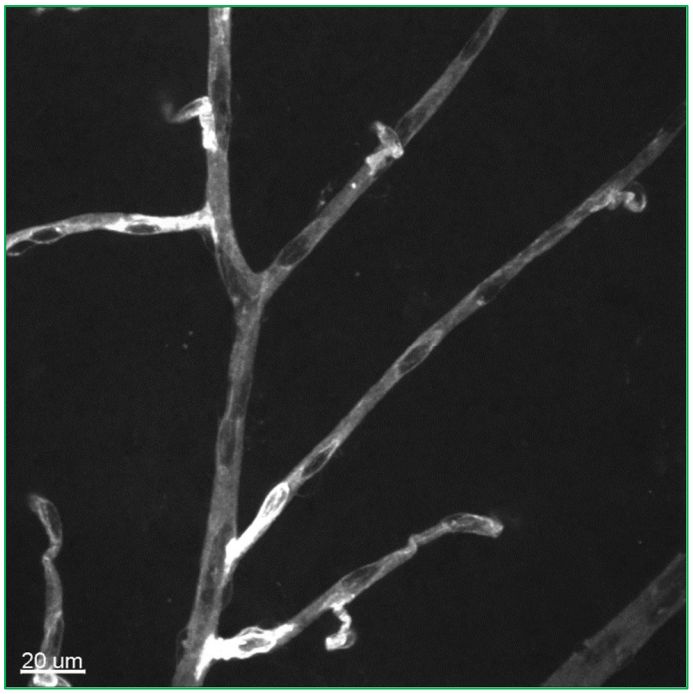
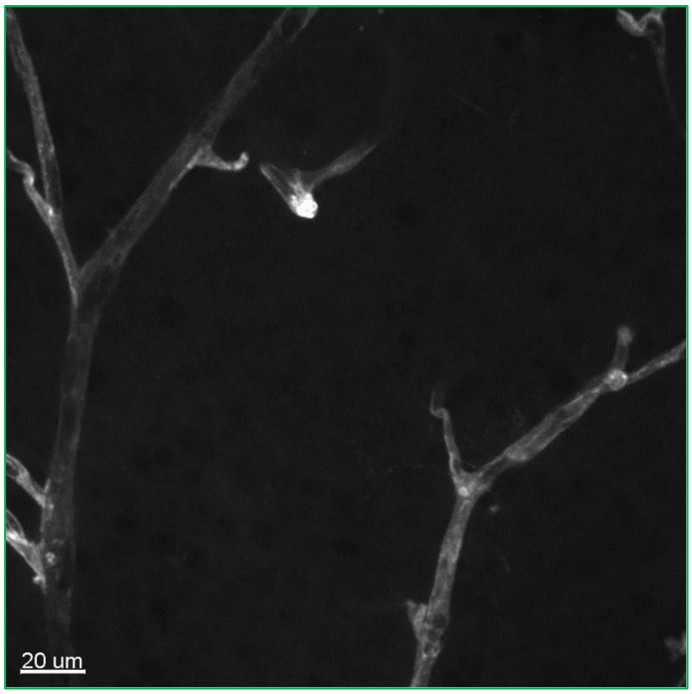


Abbildung 4-8 Das Volumen des oberflächlichen Gefäßplexus von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen
4 Wochen (n= 32-33); 12 Wochen (n= 28-30); 36 Wochen (n= 30-35), 72 Wochen (n= 32); *, p<0,05; Tendenz= 0.1≥p>0.5; 1way ANOVA/ Bonferroni Korrektur.

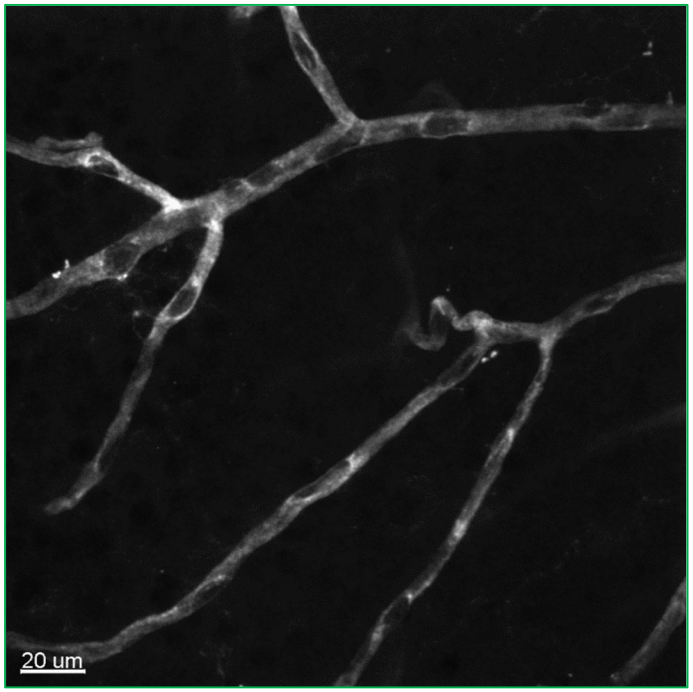
RAxYFP YFP

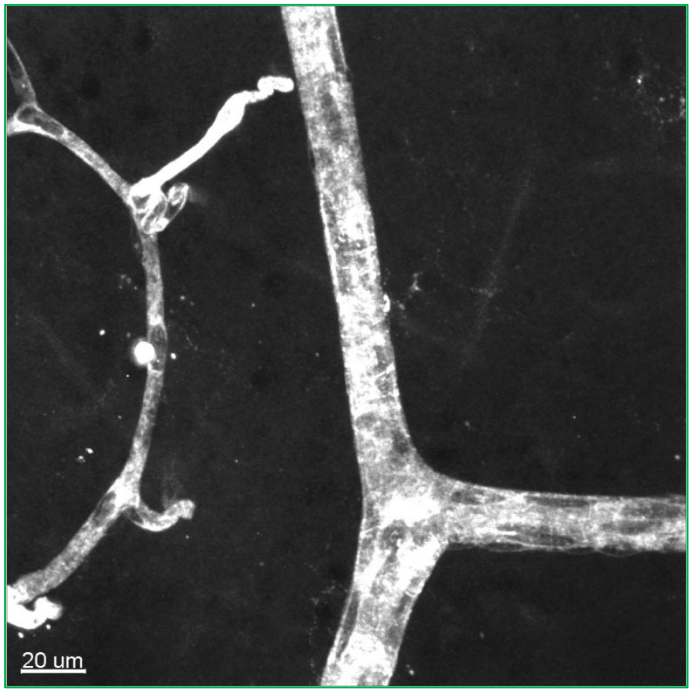
4





12





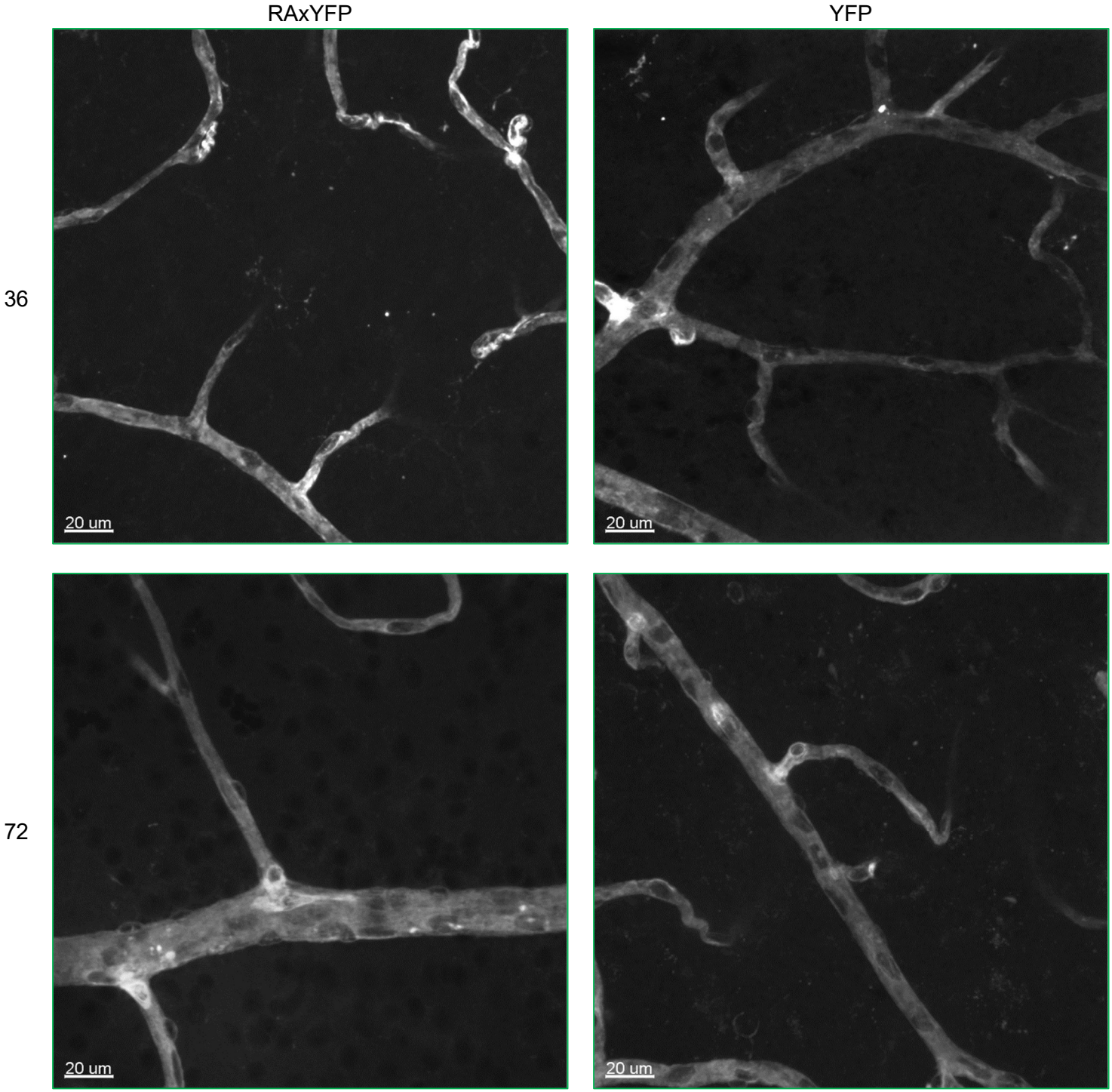


Abbildung 4-9: Exemplarische Darstellung des oberflächlichen Gefäßplexus jeweils eines RAxYFP (linke Spalte) und YFP (rechte Spalte) Tiers im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen.

4.3.2 Intermediärer Gefäßplexus

Im Intermediären Gefäßplexus gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Stämmen der gleichen Alterskohorte. Während in den Altersgruppen von 4- und 12 Wochen jeweils der RAxYFP Stamm ein größeres Volumen hatte, kam es in der Altersgruppe von 36 Wochen zu einer Angleichung der Volumina. In dieser Altersgruppe lag das Volumen der YFP Tiere mit 374118 number of voxels höher als das Volumen der RAxYFP Tiere mit 357418 number of voxels. In der Altersgruppe von 72 Wochen war die Differenz mit 81691 number of voxels zugunsten des YFP Stammes größer, jedoch nicht signifikant. Des Weiteren zeigte sich die signifikante Abnahme des Volumens im RAxYFP Stamm in der Altersgruppe von 12 Wochen im Vergleich mit den 36 Wochen alten Tieren des gleichen Stammes.

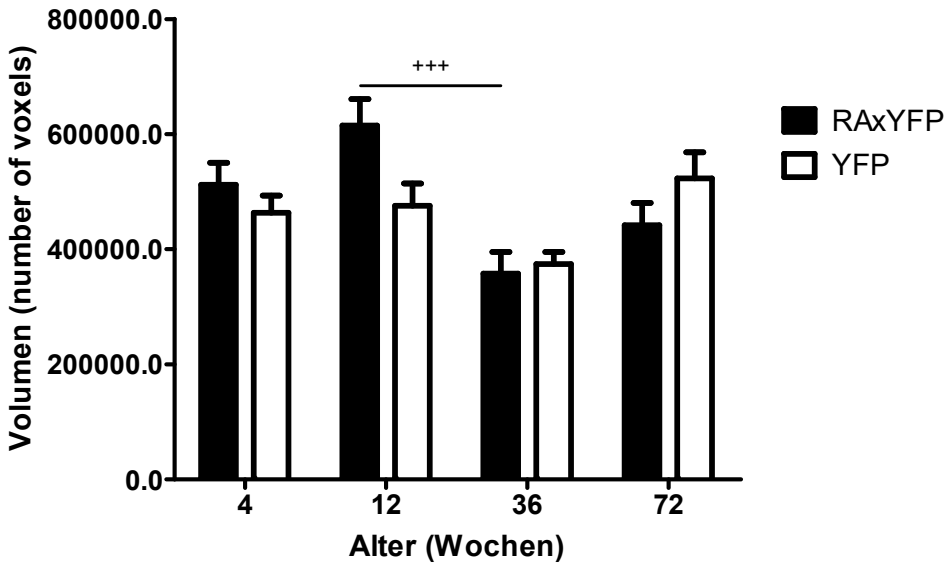
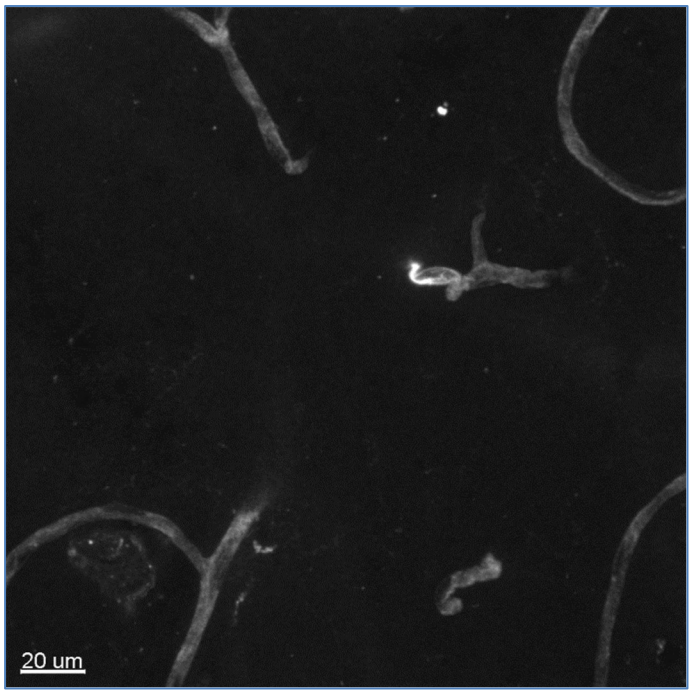
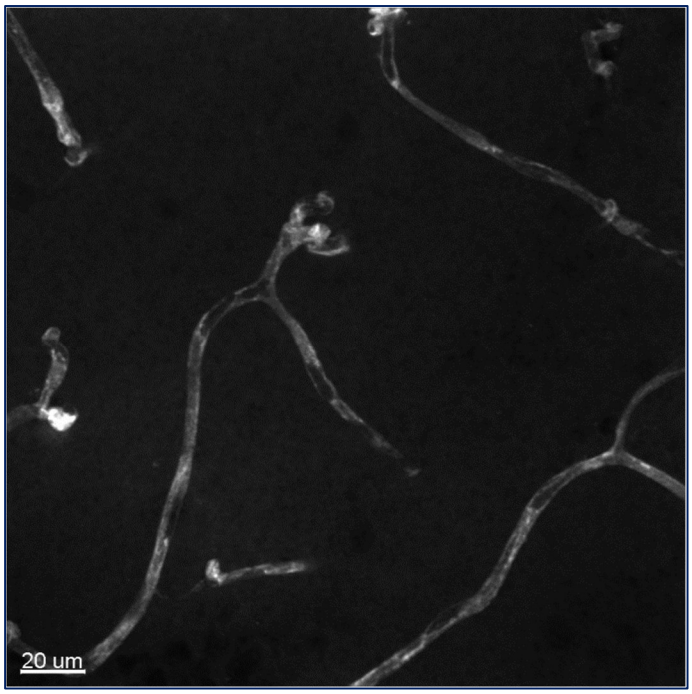


Abbildung 4-10: Das Volumen des intermediären Gefäßplexus von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen
4 Wochen (n= 32-34); 12 Wochen (n= 28-30), 36 Wochen (n= 30-35); 72 Wochen (n= 32); +++, p<0,001; 1way ANOVA/ Bonferroni Korrektur.

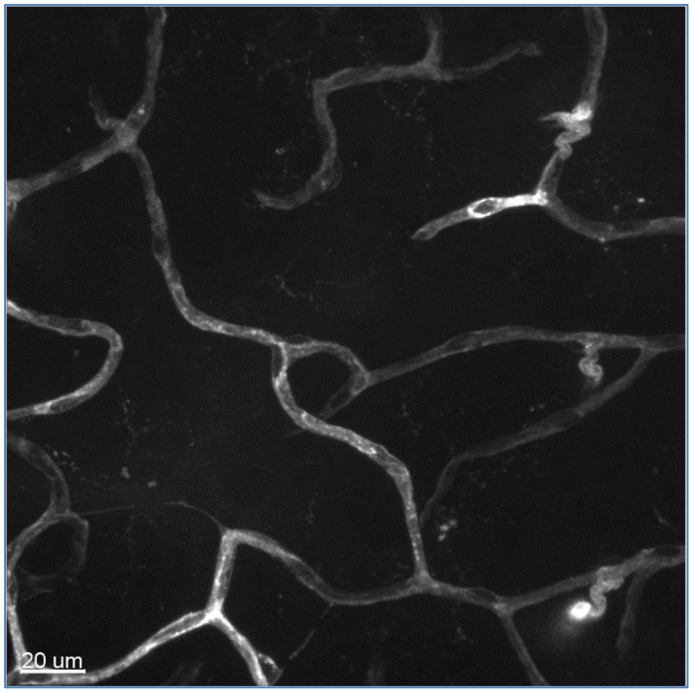
RAxYFP YFP

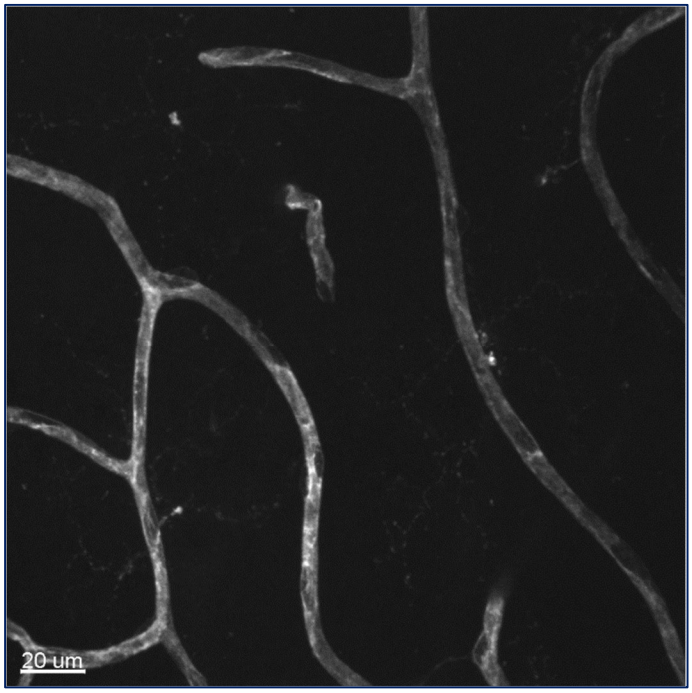
4





12





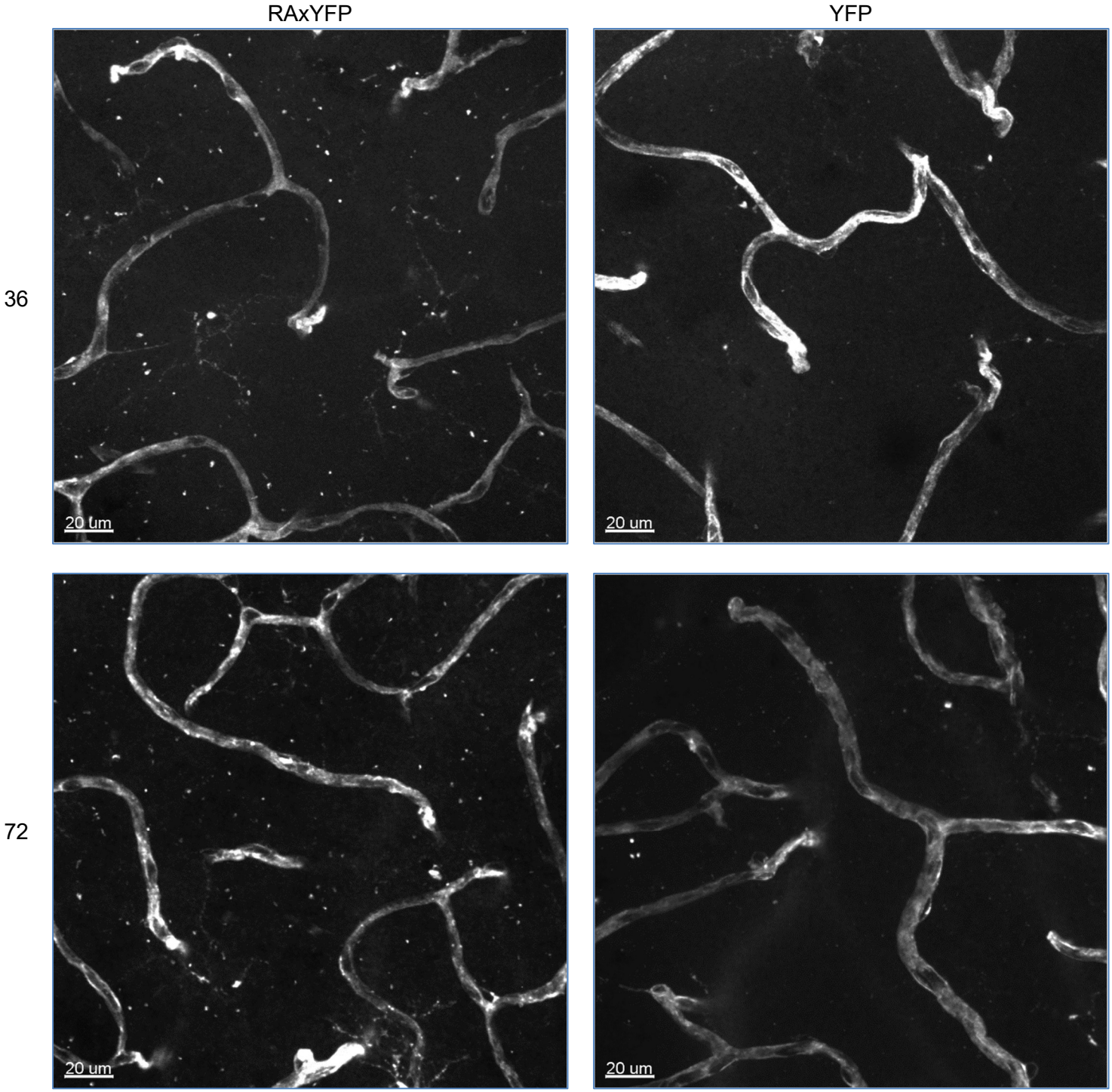


Abbildung 4-11: Exemplarische Darstellung des intermediären Gefäßplexus jeweils eines RAxYFP (linke Spalte) und YFP (rechte Spalte) Tiers im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen.

4.3.3 Tiefer Gefäßplexus

Im tiefen Gefäßplexus stieg das Volumen im RAxYFP Stamm von der Altersgruppe der 4 Wochen alten Tieren zu den 12 Wochen alten Tieren. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Im Vergleich der 12 Wochen alten RAxYFP Tieren zu den 36 Wochen alten Tieren des gleichen Stammes sank das Volumen signifikant ab. Mit der weiteren Alterung, von 36 Wochen auf 72 Wochen stieg das Volumen des tiefen Gefäßplexus wieder signifikant an. Beim YFP Stamm gab es dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Altersgruppen. Bei den 4, 12 und 72 Wochen alten Tieren war das Volumen des RAxYFP Stammes jeweils größer als das Volumen des YFP Stammes. Nur in der Altersgruppe der 36 Wochen alten Tiere war das Volumen im YFP Stamm größer als im RAxYFP Stamm. Diese Unterschiede waren nicht signifikant.

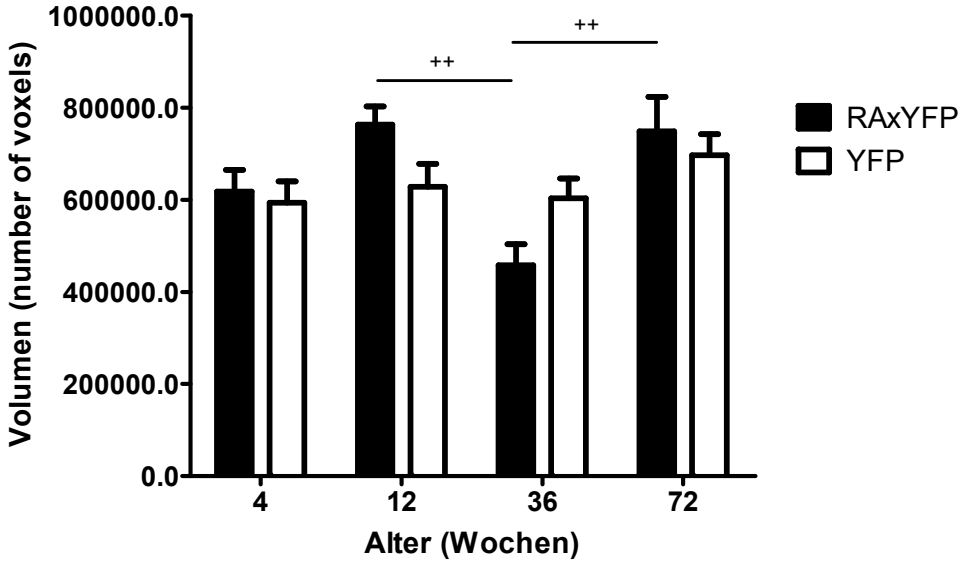
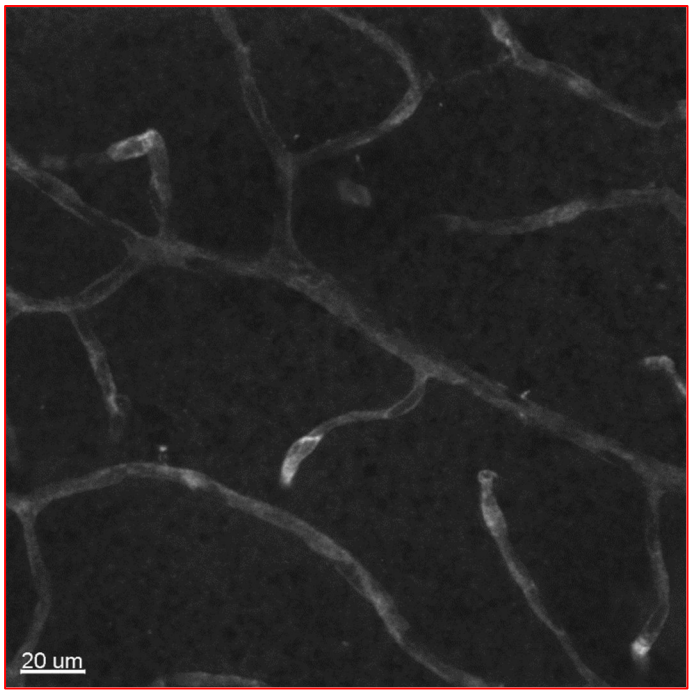


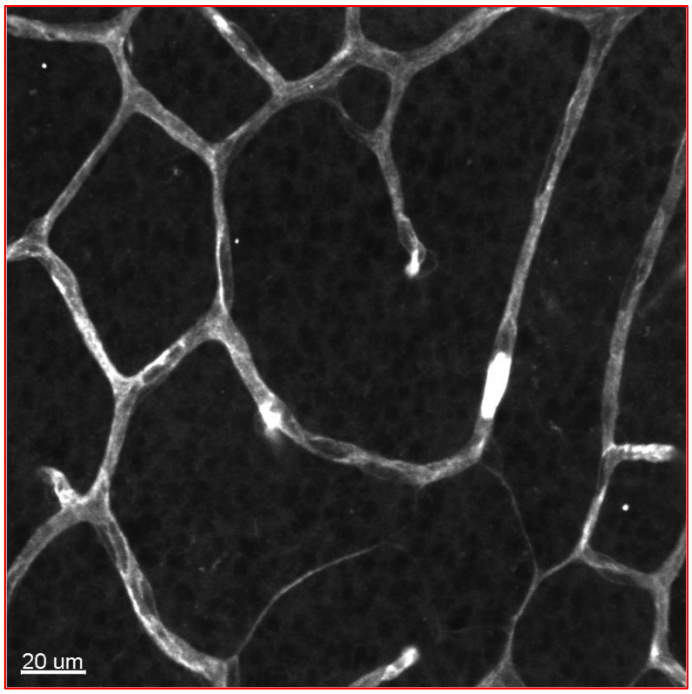
Abbildung 4-12: Das Volumen des tiefen Gefäßplexus von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen
4 Wochen (n= 32-34); 12 Wochen (n= 28-30), 36 Wochen (n= 30-35); 72 Wochen (n= 32); ++, p<0,01; 1way ANOVA/ Bonferroni Korrektur.

RAxYFP

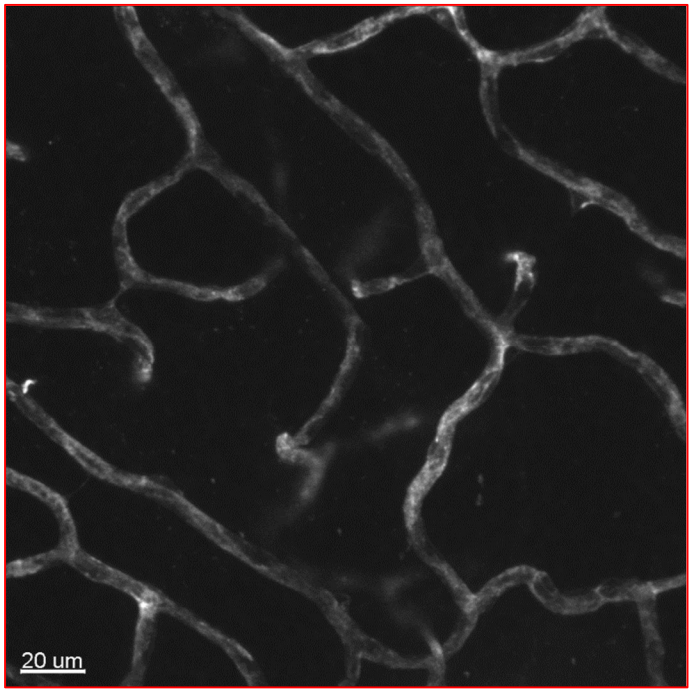
YFP

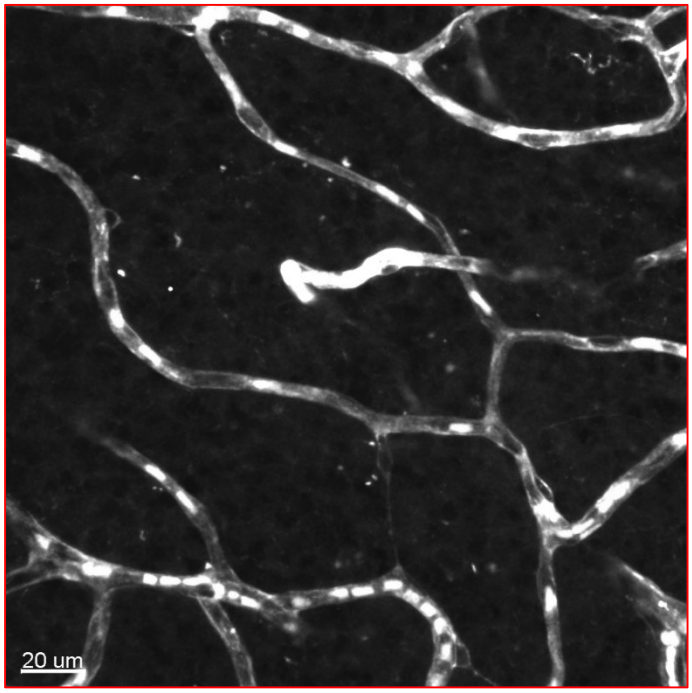
4





12





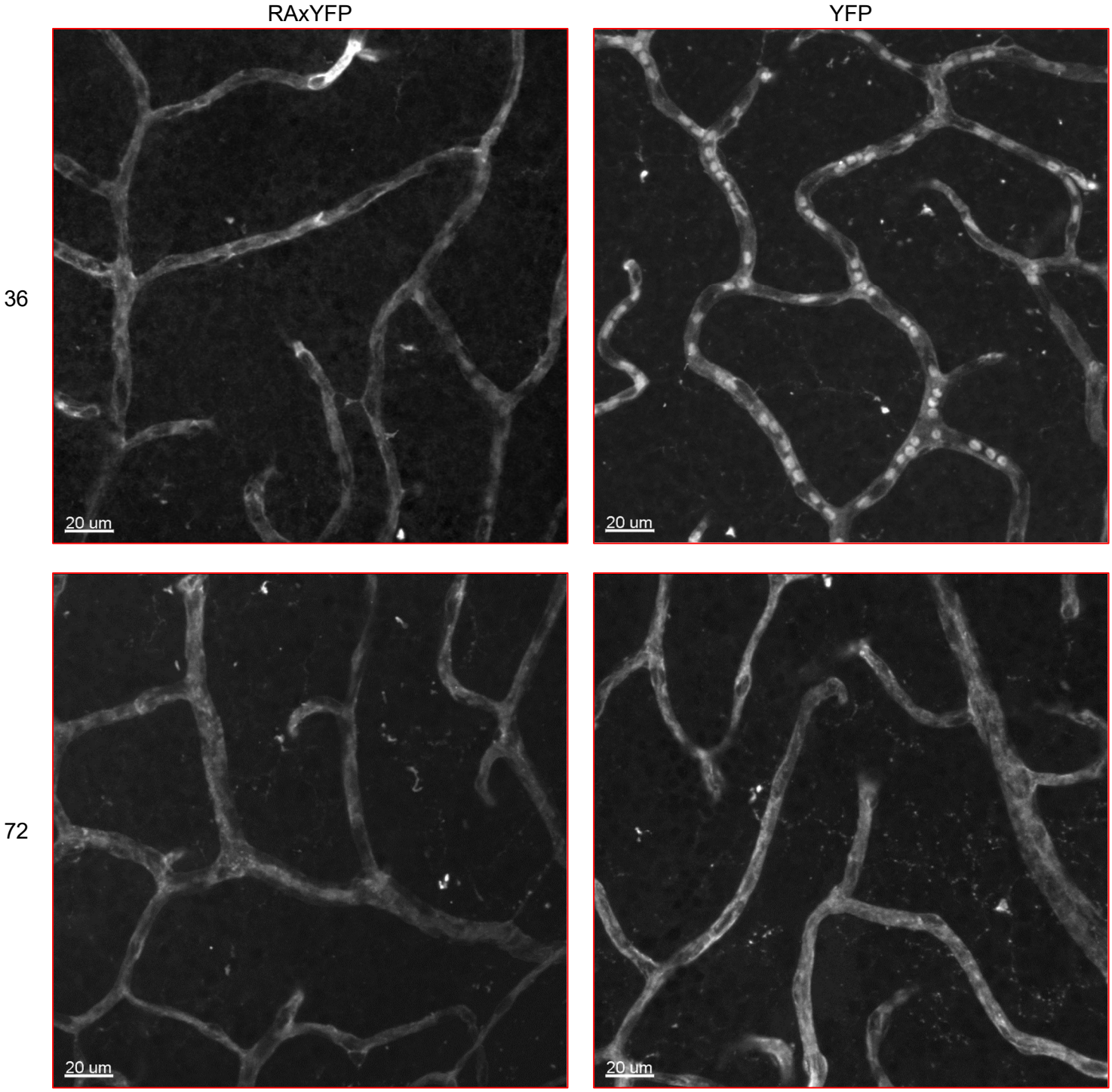


Abbildung 4-13: Exemplarische Darstellung des tiefen Gefäßplexus jeweils eines RAxYFP (linke Spalte) und YFP (rechte Spalte) Tiers im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen.

4.3.4 Vergleich der Schichten des Gefäßplexus über die Zeit in den Stämmen

In der Altersgruppe der 4 Wochen alten Mäusen gab es innerhalb des RAxYFP Stammes keinen signifikanten Unterschied im Volumen der unterschiedlichen Gefäßplexus. Bei den 12 Wochen alten Tieren war der tiefe Gefäßplexus mit 762997 number of voxels signifikant größer als der obere (537949 number of voxels). Mit der Alterung (36 Wochen) kam es zu einer Umkehr des Verhältnisses und der obere Gefäßplexus hatte signifikant mehr Volumen als der tiefe. Auch der Volumenunterschied der Gefäße zwischen dem oberflächlichen - und intermediären Gefäßplexus war signifikant. Im Alter von 72 Wochen hatte der tiefe Gefäßplexus dann wieder am meisten Volumen. Der Unterschied zum intermediären Gefäßplexus in dieser Altersgruppe war signifikant, der Unterschied zum oberflächlichen Gefäßplexus tendenziell.

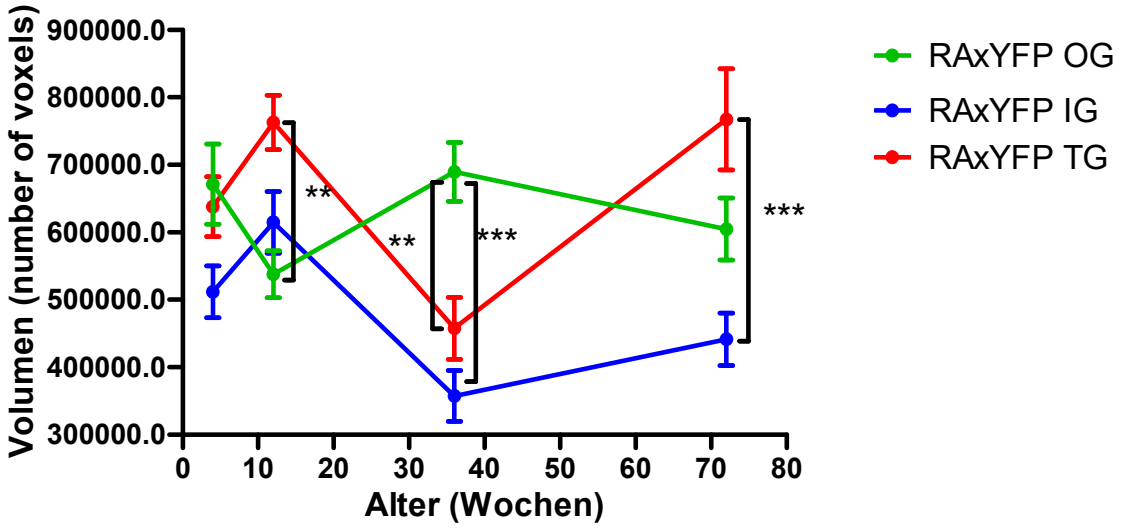


Abbildung 4-14: Das Volumen der einzelnen Schichten des retinalen Gefäßplexus im Alterungsprozess des RAxYFP Stammes
OG= Oberflächlicher Gefäßplexus (grün); IG= intermediärer Gefäßplexus (blau); TG= tiefer Gefäßplexus (rot); 4 Wochen (n= 33-34); 12 Wochen (n= 28); 36 Wochen (n= 30); 72 Wochen (n= 32); *, p<0,05; **, p<0,01, ***, p<0,001; 2way ANOVA/ Bonferroni Korrektur.

Im YFP Stamm zeigte sich in der Altersgruppe der 4 Wochen alten Tiere, dass der tiefe Gefäßplexus am meisten Volumen (593543 number of Voxels) hat. Der obere- (473959 number of voxels) sowie der intermediäre Gefäßplexus (463118 number of voxels) besaßen in dieser Altersgruppe untereinander nur eine kleine Differenz im Volumen. Der jeweilige Unterschied zum tiefen Gefäßplexus war allerdings nicht signifikant. Bei den YFP Tieren hatte der intermediäre Gefäßplexus in allen Altersgruppen am wenigsten Volumen. Bei den 12 Wochen alten Tieren hatte der obere Gefäßplexus deutlich an Volumen zugenommen, so dass nun ein signifikanter Unterschied zum intermediären Gefäßplexus detektiert werden konnte. Bei den 36 Wochen alten Tieren glichen sich die Volumina des oberflächlichen (613006 number of voxels) und des tiefen Gefäßplexus (602891 number of voxels) weiter an. Die Gefäße dieser beiden Schichten hatten signifikant mehr Volumen im Vergleich zum intermediären Gefäßplexus. Bei den 72 Wochen alten Tieren zeigt sich ein vergleichbares Bild zum RAxYFP Stamm. Das Volumen des tiefen Gefäßplexus war am größten und der Unterschied zum intermediären, aber nicht zum oberflächlichen Gefäßplexus, signifikant.

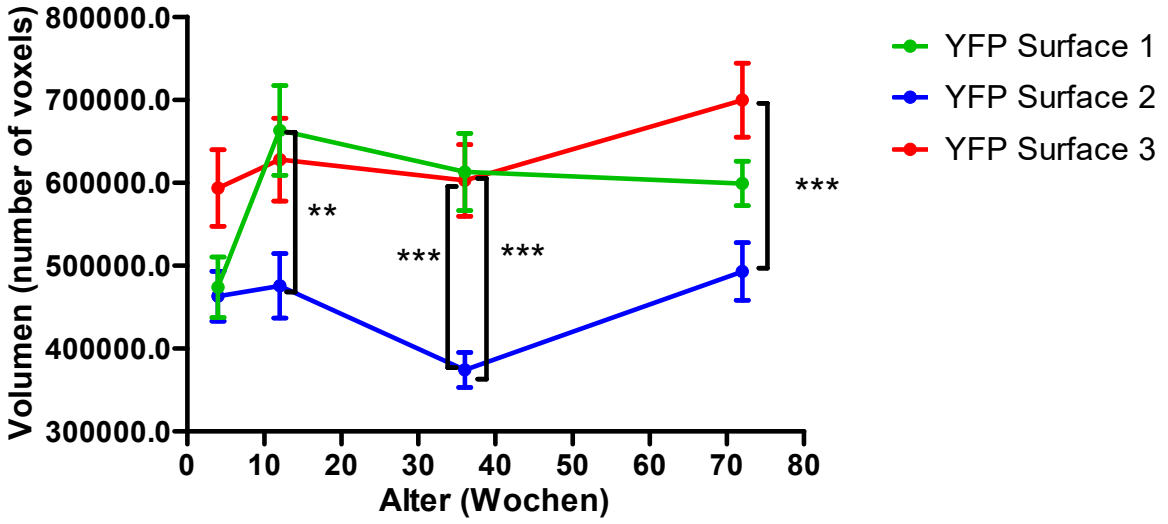


Abbildung 4-15: Das Volumen der einzelnen Schichten des retinalen Gefäßplexus im Alterungsprozess des YFP Stammes
OG= Oberflächlicher Gefäßplexus (grün); IG= intermediärer Gefäßplexus (blau); TG= tiefer Gefäßplexus (rot); 4 Wochen (n= 32); 12 Wochen (n= 30); 36 Wochen (n= 35); 72 Wochen (n= 31-33); *, p<0,05; **, p<0,01, ***, p<0,001; 2way ANOVA/ Bonferroni Korrektur.

4.3.5 Vergleich des gesamten Gefäßplexus zwischen den Stämmen

Um den gesamten retinalen Gefäßplexus des RAxYFP mit dem YFP Stamm vergleichen zu können, wurden die Volumina der einzelnen Gefäßschichten addiert.

Sowohl bei den 4 Wochen alten Tieren als auch bei den 12 Wochen alten Tieren war das Volumen des gesamten Gefäßplexus beim RAxYFP Stamm signifikant höher als beim YFP Stamm. Mit der Alterung sank das Volumen im RAxYFP signifikant ab (12 im Vergleich zu 36 Wochen) und war im Alter von 36 Wochen im YFP Stamm sogar etwas höher als im RAxYFP Stamm. Während der weiteren Alterung (bis 72 Wochen) kam es zu einer vergleichbaren Volumenzunahme in beiden Stämmen.

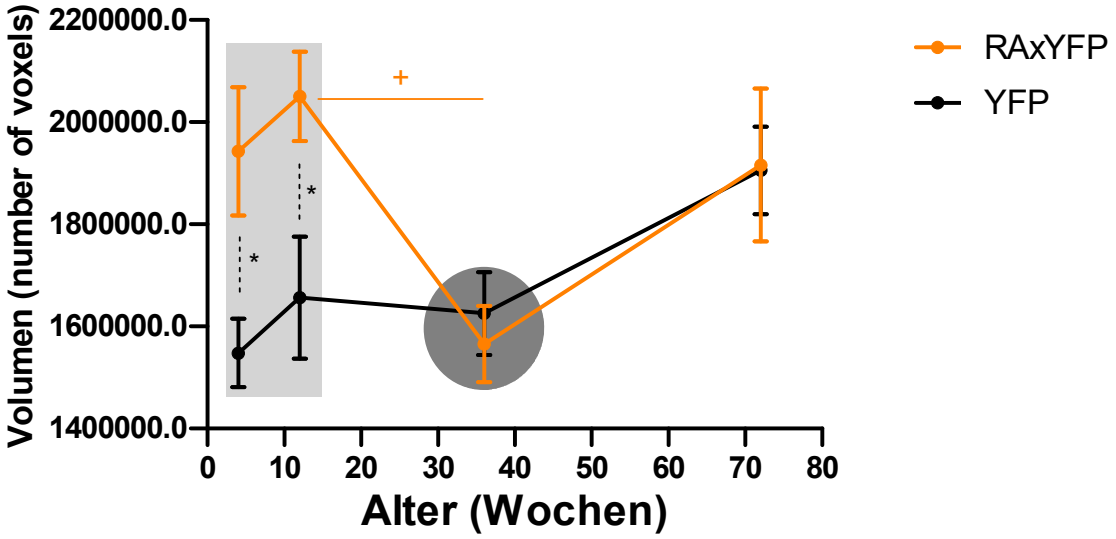


Abbildung 4-16: Das Volumen des gesamten retinalen Gefäßplexus im Alterungsprozess der RAxYFP (orange) und YFP (schwarz) Stammes
4 Wochen (n= 32-33); 12 Wochen (n= 28-30); 36 Wochen (n= 30-35); 72 Wochen (n= 32); *, p<0,05; **, 2way ANOVA/ Bonferroni Korrektur.

4.3.6 Pericyten

Die Auszählung der Pericyten erfolgte auf Basis der gleichen 3D Bilder, die für die Auswertung des Gefäßplexus verwendet wurden. Sie ergab, dass in den Altersgruppen von 4 und 36 Wochen die Mäuse des RAxYFP Stammes jeweils signifikant mehr Pericyten hatten als die Mäuse des YFP Stammes. Bei den 72 Wochen alten Tieren hatten dagegen die YFP Tiere mehr Pericyten, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Bei Betrachtung des Alterungsverlaufs innerhalb eines Stammes ließ sich erkennen, dass die 4 Wochen alten RAxYFP Tiere mit 19,5 Pericyten signifikant mehr Pericyten besaßen als die 12 (15,0 Pericyten) und 72 Wochen (13,1 Pericyten) alten Tiere. Des Weiteren wiesen die 36 Wochen alten RAxYFP Mäuse durchschnittlich 6,4 Pericyten mehr als die 72 Wochen alten Tiere des gleichen Stammes auf. Dieser Unterschied war signifikant.

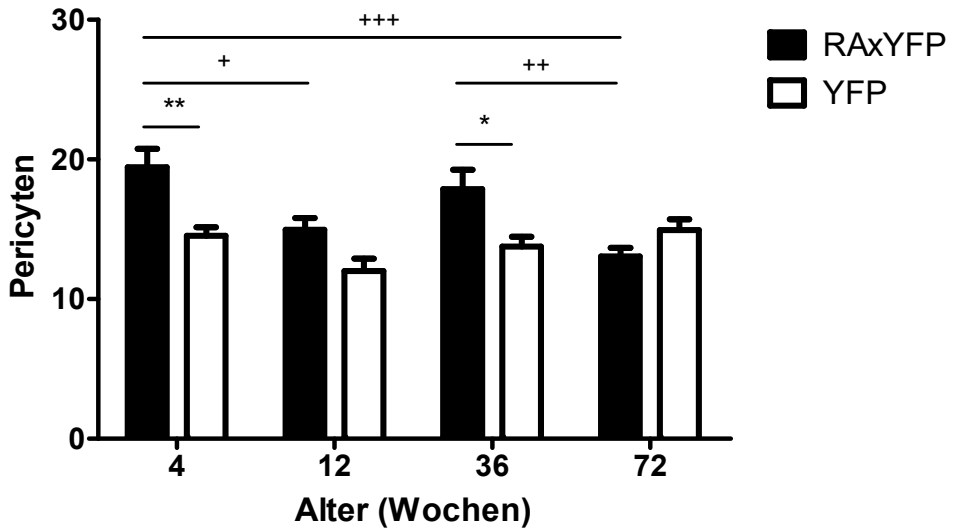


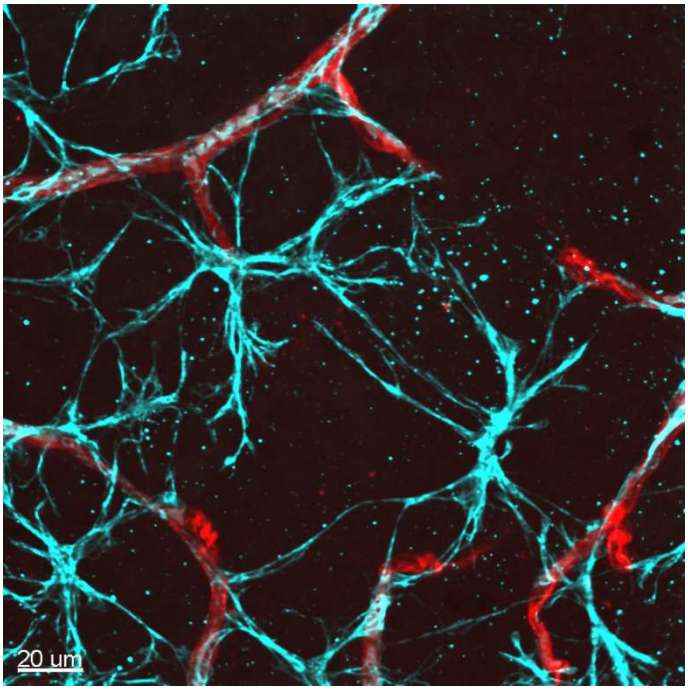
Abbildung 4-17: Die Anzahl der Pericyten von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tiere im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen
4 Wochen (n= 31-32); 12 Wochen (n= 28-30), 36 Wochen (n= 32-35); 72 Wochen (n= 32); +, p<0.05; ++, p<0,01; +++, p<0,001 1way ANOVA/ Bonferroni Korrektur.

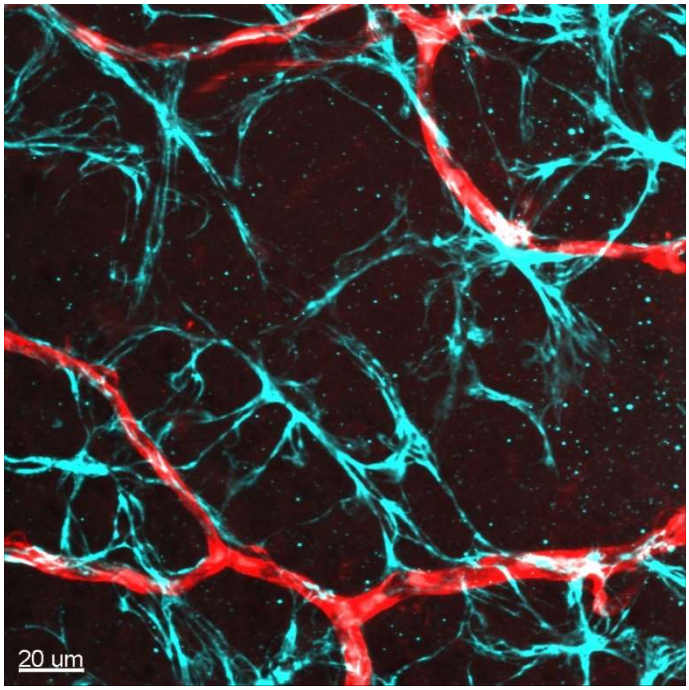
4.3.7 Fluoreszenzmikroskopische Bilder der Astrozyten

Die Astrozyten (Gliazellen) des oberflächlichen Gefäßplexus sind zentraler Bestandteil der neurovaskulären Einheit der Retina. Ihre Dichte wurde in den 12, 36 und 72 Wochen alten Tieren exemplarisch betrachtet. Da nicht in allen Tieren der Nachweis erfolgte und eine weitere methodische Entwicklung insbesondere für den Nachweis in den 4 Wochen alten Tieren notwendig ist, wurde keine quantitative Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen durchgeführt. Anhand dieser vorläufigen Ergebnisse ließ sich im Altersverlauf im RAxYFP Stamm keine Veränderung der Interaktion zwischen Astrozyten und Gefäßen detektieren. Beim YFP-Stamm erschien das Netzwerk der Astrozyten bei den 36 Monate alten Tieren stärker ausgeprägt, während es bei den 72 Monate alten Tieren reduziert wirkte.

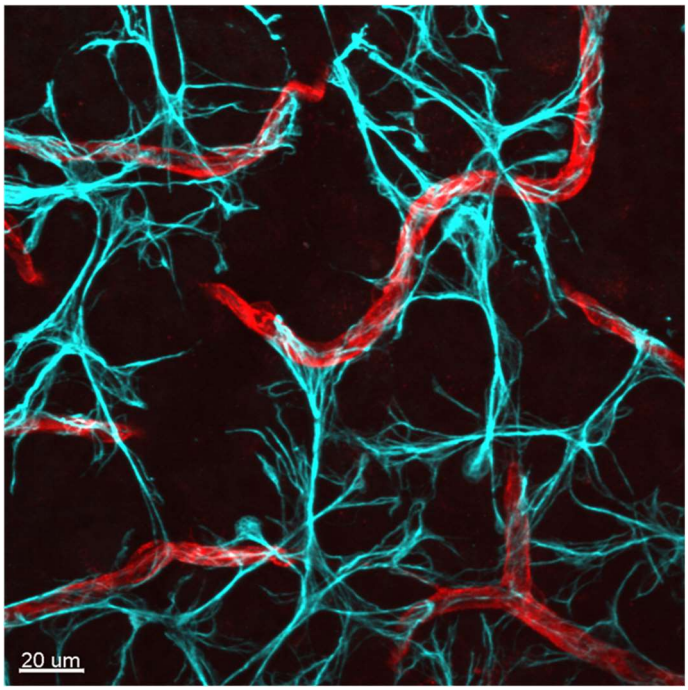
RAxYFP YFP

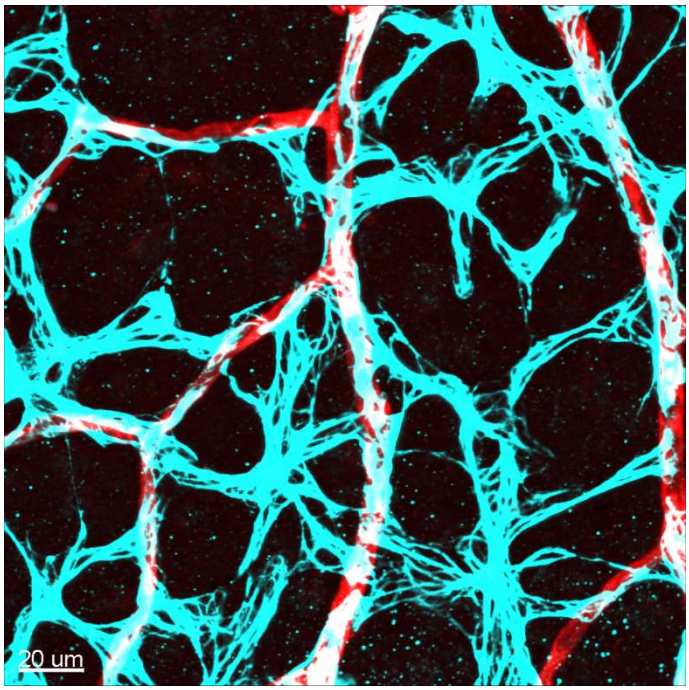
12





36





72

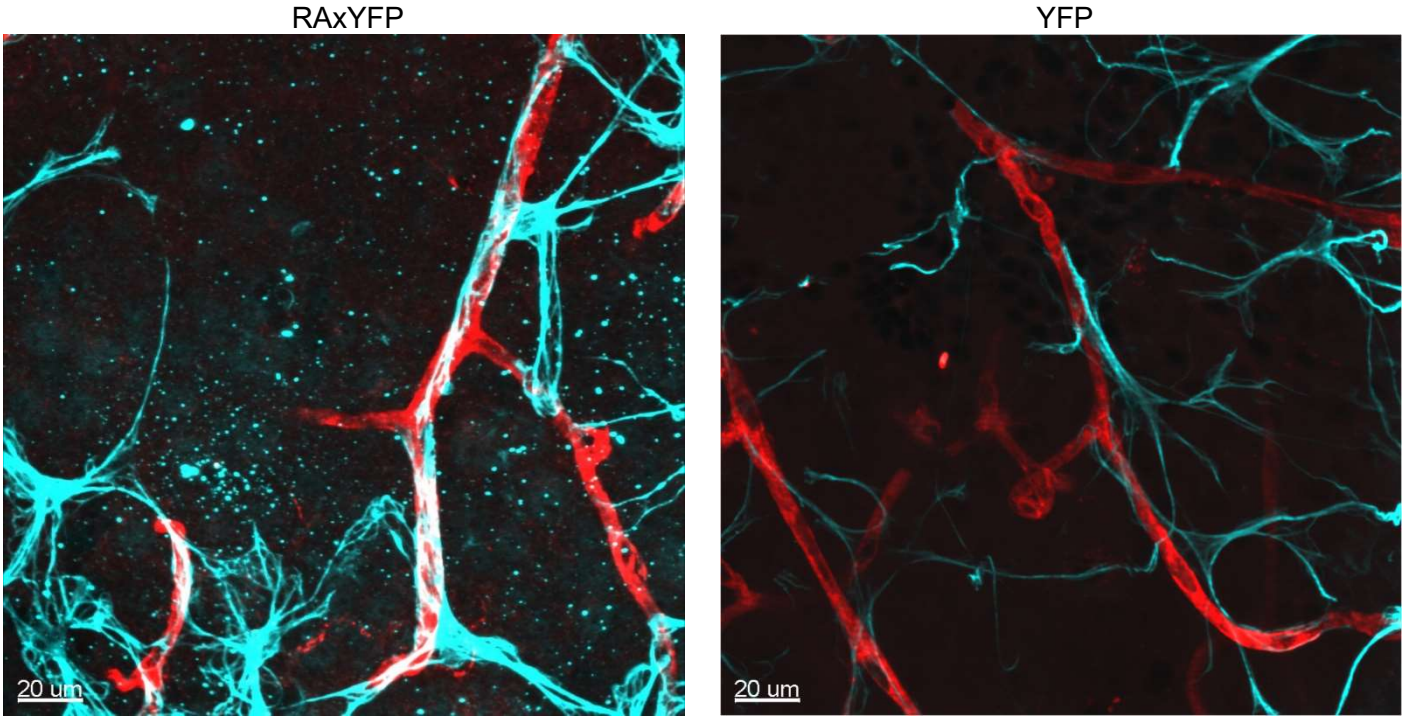


Abbildung 4-18: Exemplarische Darstellung der mittels GFAP angefärbten Astrozyten (blau) und deren Interaktion mit dem oberflächlichen Gefäßplexus (rot) jeweils eines RAxYFP (linke Spalte) und YFP (rechte Spalte) Tiers im Alter von 12, 36 und 72 Wochen.

4.4 Genexpression

4.4.1 Enzyme der antioxidativen Abwehr in der Retina

Die Genexpressionsanalyse von ausgewählten antioxidativen Enzymen und Proteinen der Retina sowie des membranären Anteil des RAGE wurden aus den asservierten Proben durch Herrn Justus Hosseini am IBIO durchgeführt. Die Rohdaten wurden zur Verfügung gestellt und in GraphPad Prism 5 analysiert.

Bei allen untersuchten Enzymen und Proteinen (SOD1, SOD2, GPX, Catalase, Crystallin AB, DJ1), die zur Reduktion des oxidativen Stresses in der Retina beitragen können, war die relative Expression bei den 4 Wochen alten Tieren im RAxYFP Stamm höher als im YFP Stamm. Bis auf die Expression von Crystallin AB waren alle Unterschiede signifikant.

Bei der SOD1 zeigte sich innerhalb des RAxYFP Stammes eine hohe relative Expression in den jungen Altersgruppen, die im Rahmen der Alterung kontinuierlich abnahm. Im Alter von 4 ($6{,}2 \times 10^6$ relative Expression/G6pdx) und 12 Wochen ($6{,}0 \times 10^6$ relative Expression/G6pdx) war die relative Expression der SOD1 jeweils signifikant höher als die relative Expression in der Altersgruppe von 72 Wochen ($3{,}6 \times 10^6$ relative Expression/G6pdx). Bei den YFP Tieren war die relative Expression dagegen bei den 4 Wochen alten Tieren signifikant geringer als bei den 12 Wochen alten Tieren. Nach diesem Anstieg nahm die relative Expression im Rahmen der weiteren Alterung wieder ab. Mit $5{,}4 \times 10^6$ relative Expression/G6pdx war der Wert bei den 12 Wochen alten YFP Mäusen signifikant höher als bei den 72 Wochen ($2{,}8 \times 10^6$ relative Expression/G6pdx) alten Mäusen desselben Stammes.

Mit $1{,}1 \times 10^7$ relative Expression/G6pdx war die SOD2 in der Altersgruppe von 4 Wochen innerhalb des RAxYFP Stammes am höchsten. Der Unterschied zu den Altersgruppen desselben Stammes war immer signifikant. Im YFP Stamm ließ sich tendenziell erkennen, dass die relative Expression der SOD2 bis zur Altersgruppe der 36 Wochen alten Tieren kontinuierlich zunahm, bevor die relative Expression im Alterungsprozess bei den 72 Wochen alten Tieren wieder abnahm.

Auch die relative Expression der GPX1 war innerhalb des RAxYFP Stammes bei den 4 Wochen alten Tieren signifikant am höchsten. Mit der Alterung nahm die relative Expression ab, bevor es wiederum zu einem signifikanten Anstieg in der Expression von den 36 Wochen alten Tieren zu den 72 Wochen alten Tieren kam. Innerhalb des YFP Stammes kam es im Rahmen der Alterung tendenziell zu einer kontinuierlichen Abnahme der Expression von GPX1.

Im RAxYFP Stamm war auch bei der Catalase die relative Expression/G6pdx mit $7{,}6 \times 10^6$ im Alter von 4 Wochen signifikant höher als in den anderen Altersgruppen. Bei den YFP Tieren war das Verhältnis der Expression zwischen den Altersgruppen ähnlich dem Verhältnis der Expression der SOD1 im YFP Stamm. Die 12 Wochen alten YFP Mäuse zeigten mit $4{,}2 \times 10^5$

relative Expression/G6pdx das Maximum. Der Unterschied zu den 36 und 72 Wochen alten YFP Tieren war signifikant.

Bei der Expression von Crystallin AB zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen im Alter von 12 Wochen. In dieser Altersgruppe exprimierten RAxYFP Tiere mit $4{,}0 \times 10^6$ signifikant mehr Crystallin AB als die YFP Tiere der gleichen Altersgruppe ($1{,}5 \times 10^6$ relative Expression/G6pdx). Im RAxYFP Stamm war die Expression bei den 4 Wochen alten Tieren ($5{,}3 \times 10^6$ relative Expression/G6pdx) am höchsten, nahm aber zu den 12 Wochen alten Tieren nur tendenziell ab. Die Expression bei den 4 und 12 Wochen alten Tieren war für Crystallin AB jeweils höher als die Expression bei den 36 und 72 Wochen alten RAxYFP Tieren.

Die Expression des DJ1 nahm innerhalb des RAxYFP Stammes im Rahmen der Alterung kontinuierlich ab. Die Expression bei den YFP Tieren nahm dagegen bis zu einem Alter von 36 Wochen ($4{,}4 \times 10^6$ relative Expression/G6pdx) zu, im Vergleich zu den 4 Wochen alten Tieren war dieser Unterschied signifikant. Mit $2{,}6 \times 10^6$ relative Expression/G6pdx DJ1 bei den 72 Wochen alten YFP Mäusen war die Expression dann signifikant geringer als bei den 36 Wochen alten YFP Mäusen. Im YFP Stamm ähnelte das Expressionsmuster dem der SOD2.

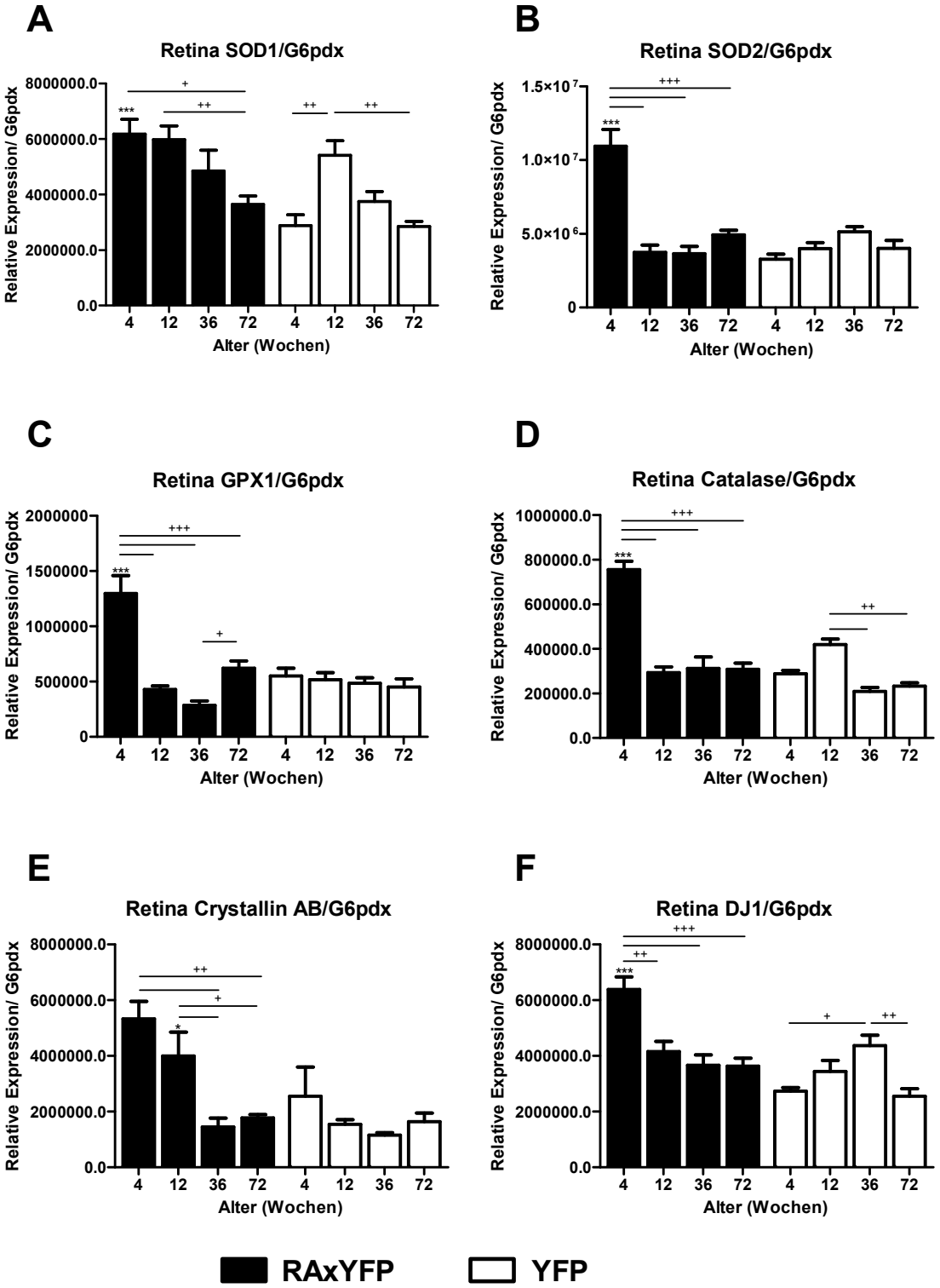


Abbildung 4-19: Genexpressionsanalyse der Retina von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen
A: SOD 1= Superoxiddismutase 1; B: SOD 2= Superoxiddismutase 2; C: GPX1= Glutathionperoxidase 1; D: Catalase; E: Crystallin AB; F: DJ1 4 Wochen (n= 8-12); 12 Wochen (n= 12), 36 Wochen (n= 12); 72 Wochen (n= 12); +, p<0.05; ++, p<0,01; +++,***, p<0,001 1way ANOVA/ Bonferroni Korrektur.

4.4.2 Expression des RAGE in der Retina

Im RAxYFP Stamm fehlt die extrazelluläre Domäne des RAGE (82). Im Folgenden ist die relative Expression/G6pdx vom verbleibenden membranären Anteil des RAGE dargestellt.

Innerhalb des RAxYFP Stamm zeigte die RAGE Expression im Alterungsprozess keine signifikante Veränderung. Tendenziell nahm die Expression zwischen den 4 und 12 Wochen alten Tieren zu. Im YFP Stamm zeigte sich dagegen ein Anstieg der Expression mit der Alterung. Die Expression des RAGE erreichte im YFP Stamm bei den 36 Wochen alten Tieren mit 16088 relative Expression/ G6pdx ihr Maximum. Bei den 72 Wochen alten Tieren präsentierte sich dagegen eine Abnahme in der Expression auf 59084,6 relative Expression/ G6pdx auf das Niveau der 4 Wochen alten Tiere. Die Unterschiede zwischen den 12 und 36 Wochen alten YFP Mäusen zu den anderen Altersgruppen (4 und 72 Wochen alten Mäusen) des gleichen Stammes waren jeweils signifikant.

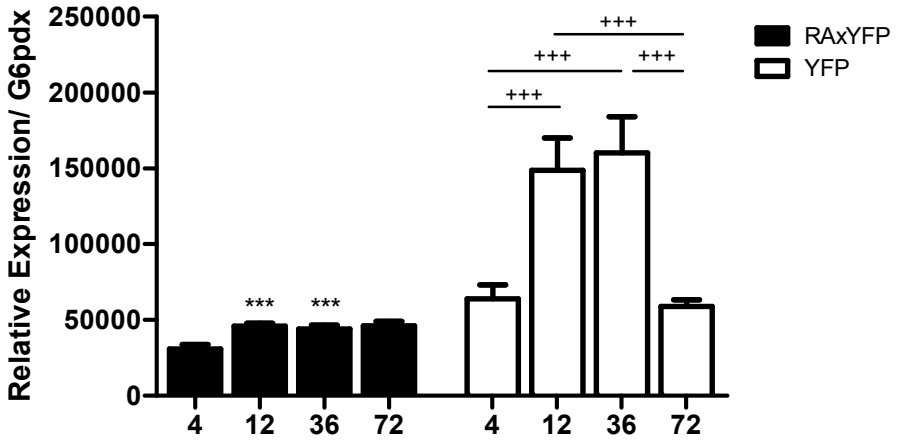


Abbildung 4-20: Genexpressionsanalyse des membranären Anteil des RAGE in der Retina von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen
4 Wochen (n= 8-12); 12 Wochen (n= 12), 36 Wochen (n= 12); 72 Wochen (n= 12); +++, ***, p<0,001 1way ANOVA/ Bonferroni Korrektur.

5 Diskussion

Der Einfluss des AGE-RAGE Systems auf eine Vielzahl von altersbedingten Erkrankungen wurde mehrfach beschrieben (10, 32, 36).

Der schädigende Einfluss des AGE-RAGE Systems auf Gefäße konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden. Wie in der Einleitung beschrieben zeigt sich die Pathophysiologie der diabetischen Retinopathie daher eng mit dem AGE-RAGE System verknüpft (83, 84). Durch die Blockade des AGE-RAGE-Systems erhofft man sich neue Therapieformen (55).

Perkins et al. untersuchten an gesunden übergewichtigen Menschen den Effekt einer kontrolliert induzierten Hyperglykämie und deren Einfluss auf das AGE-RAGE System und oxidativen Stress (85). Hier konnte gezeigt werden, dass sich die Konzentration von Markern des oxidativen Stresses als auch die AGEs (bis auf CML) verringern (85). Diese Ergebnisse sind widersprüchlich zu dem Anstieg von AGEs nach postprandialem Blutzuckeranstieg in Typ-1 Diabetikern (86) und Typ-2 Diabetikern (87). Dieser vermeintliche Widerspruch lässt das steigende Interesse an personalisierter Medizin gut nachvollziehen. Die personalisierte Medizin versucht das Individuum auf unterschiedlichen Ebenen (dem Genom und Proteom, als auch biochemischer Vorgänge und dem Verhalten) zu verstehen und eine zielgerichtete, individuelle Therapie zu verfolgen. Der Gedanke der personalisierten Medizin ist unter anderem aus der Beobachtung entstanden, dass die gleiche Therapie an zwei unterschiedlichen Patienten zu verschiedenen Effekten führt. Dadurch lassen sich trotz gleicher Klassifizierung interindividuell sehr unterschiedliche Krankheitsverläufe beobachten (88). Die Idee der personalisierten Medizin zeigt auf, wie wichtig es ist, zumindest die Prozesse und Veränderungen des physiologischen Alterns zu berücksichtigen, denn häufig liegt der interindividuelle Unterschied im Lebensalter begründet.

Um den Einfluss des AGE-RAGE Systems unter Berücksichtigung des Lebensalters zu untersuchen wurde in dieser Studie der B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J RAGE -/- (RAxYFP) mit dem B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J (YFP) im Alterungsprozess miteinander verglichen. Es wurden das Gewicht, Glukose und Triglyceride im Blut, das Blutbild, die Gefäße und die antioxidativen Enzyme in der Retina untersucht und in verschiedenen Altersgruppen miteinander verglichen. Der RAxYFP Stamm unterscheidet sich vom YFP Stamm durch das Fehlen der extrazellulären Domäne des RAGE (82).

Im Hinblick auf diese Studie stellt sich die Frage, inwieweit die Blockade des AGE-RAGE Systems von Vorteil ist und ob dieser Benefit dauerhaft oder auf eine bestimmte Phase des Lebens beschränkt ist. Des Weiteren gilt es zu diskutieren, inwieweit Effekte, die an RAxYFP Tieren gezeigt werden, sich mit Ergebnissen einer medikamentösen Blockade des AGE-RAGE Systems im Tiermodell vergleichen lassen. Generell gilt es zu hinterfragen, welche der in Tierstudien gezeigten Effekte auf den Menschen übertragbar sind. Häufig werden Experimente

an diabetischen Jungtieren durchgeführt, die nicht ohne Weiteres auf zumeist ältere Typ-2 Diabetiker übertragbar sind.

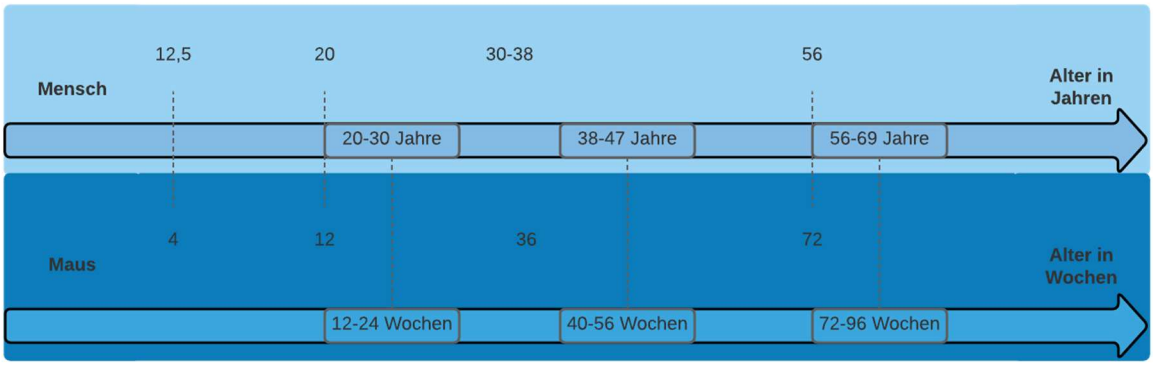


Abbildung 5-1 Altersvergleich zwischen Maus (in Wochen) und Mensch (in Jahren) [modifiziert nach (89)]

5.1 Blutanalytik

5.1.1 Blutzucker und HbA1c der RAxYFP Tiere im Vergleich mit den YFP Tieren

Die 4 Wochen alten RAxYFP Tiere zeigten höhere Blutglukosewerte als die YFP Tiere. Im Alter von 12 Wochen glichen sich dann beide Tierstämme an. Im Alter von 36 und 72 Wochen war dann die Blutglukose bei den YFP Tieren höher als bei den RAxYFP Tieren. Daraus lässt sich ableiten, dass der Effekt des RAGE Knockout altersabhängig ist. Es ist bereits beschrieben worden, dass das AGE-RAGE System durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel dem TNF-α, zu einer Insulinresistenz und in der Folge zu einer Störung der Glukosetoleranz führen kann (90). Passend zu diesen Befunden zeigten sich auch in Rahmen dieser Studie erhöhte Blutglukose- und HbA1c-Konzentrationen bei den YFP Tieren im höheren Alter. Alle ermittelten Werte befanden sich aber im Normbereich. Eine Hyperglykämie oder diabetische Stoffwechsellage konnte zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden. Bei den RAxYFP Tieren, können die AGEs nicht den RAGE binden und so die Entwicklung einer Insulinresistenz und gestörten Glukosetoleranz triggern. Um diese Hypothese weiter abzusichern, sollte man bei den 36 und 72 Wochen alten YFP Tieren einen Glukosetoleranztest und den HOMA-IR bestimmen.

5.1.2 Fettstoffwechsel und Gewicht der RAxYFP Tiere im Vergleich mit den YFP-Tieren

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die HDL Plasmakonzentration durch den RAGE erniedrigt wird (91). Ein Zusammenhang zwischen einer niedrigen HDL Konzentration und dem Risiko arteriosklerotischer, kardiovaskulären Erkrankungen wurde oftmals postuliert. Neuere Untersuchungen lassen einen antiarteriosklerotischen Effekt des HDL unabhängig von der Plasmakonzentration vermuten (92). Zudem gelang der Nachweis, dass CML-AGEs den zellulären Cholesterin Efflux reduzieren und dieser Effekt über den RAGE vermittelt wird (91).

In dieser Studie zeigte sich in jeder Altersgruppe das HDL im RAxYFP Stamm höher als im YFP Stamm. Der altersabhängige Verlauf, mit dem Höchstwert der Plasmakonzentration bei den 36 Wochen alten Tieren, ist bei beiden Stämmen gleich. Es ist zu vermuten, dass die Unterschiede zwischen den Stämmen mit einer größeren Kohorte signifikant sind.
Die Aufnahme von hohen Konzentrationen an AGEs, insbesondere durch hoch verarbeitete Nahrung, ist ein Prädikator für die Entwicklung einer früheren Insulinresistenz. Das konnte sowohl in gesunden Menschen als auch solchen, die an Diabetes mellitus erkrankt sind, nachgewiesen werden (93). Außerdem sind AGEs appetitanregend und fördern damit Überernährung und in der Konsequenz Übergewicht (93).
Über das AGE-RAGE System kommt es zu einer höheren Expression von proinflammatorischen Zytokinen. Neben TNFα, welches die Insulinresistenz und Lipolyse in Adipozyten fördert, kann Interleukin-6 zu einer Hypertriglyceridämie über eine erhöhte Lipolyse und einer vermehrten Sekretion von Triglyceriden aus der Leber führen (94). Demgegenüber konnte aber auch eine Interaktion der AGEs mit CD36 nachgewiesen werden. CD 36 vermittelt die Endozytose von AGEs in Adipozyten und beeinflusst damit die Entwicklung von Übergewicht und Insulinresistenz (95).
In dieser Studie bekamen die Tiere beider Stämme die gleiche Standarddiät ad libitum. Trotzdem war bei den RAxYFP Tieren beider Geschlechter das Gewicht höher als bei den YFP Tieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass der RAGE einen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung hat. Es lässt sich vermuten, dass der RAGE im Vergleich zu anderen AGE-Rezeptoren bei der Entwicklung von Übergewicht von untergeordneter Rolle ist. Dadurch, dass die AGEs im RAxYFP Stamm nicht an den RAGE binden können, lässt sich postulieren, dass anderen Signalwege, möglicherweise vermittelt über CD 36, vermehrt aktiv sind und es so zu einer erhöhten Gewichtszunahme der RAxYFP Tiere im Vergleich mit den YFP Tieren kommt.
Bei den Triglyceriden zeigte sich eine höhere Konzentration von Triglyceriden im Plasma bei den RAxYFP Tieren. Dieser Unterschied wurde ab der Altersgruppe der 12 Wochen alten Tieren signifikant. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit dem Zusammenhang zwischen Hypertriglyceridämie und Übergewicht in Einklang bringen. Demgegenüber steht die erhöhte Blutglukose bei den YFP Tieren im hohen Alter. In den aktuellen Empfehlungen zur Behandlung der Hypertriglyderidämie sind Lifestyle-Modifikation, Blutzuckermanagement und Gewichtsreduktion die ersten und vordergründigen Interventionen mit einem Potential die Triglyceride um bis zu 70 % zu senken (96). Ob eine Abnahme der AGEs hierbei eine Rolle spielt, gilt es weiterführend zu klären.

5.1.3 Das Blutbild der RAxYFP Tiere im Vergleich mit den YFP-Tieren

In dieser Studie erfolgte erstmalig die Auswertung von Blutbildern für Alterskohorten von 4 bis 72 Wochen im Mausmodell. Sowohl für die YFP-Tiere als auch für die RAxYFP Tiere konnten

in der bestehenden Literatur keine solchen Referenzwerte über einen vergleichbar großen Altersbereich gefunden werden. Auch für zukünftige Studien bieten die im Ergebnisteil dargestellten Werte einen Mehrwert, um Abweichungen vom Normalwert und somit Pathologien zu detektieren. Hierbei ist jedoch die Methodik der Blutuntersuchung und deren Vergleichbarkeit zu berücksichtigen.

Beim Hämoglobin zeigt sich bei beiden Stämmen der bekannte Anstieg in der Hämoglobinkonzentration zwischen den 4 und den 12 Wochen alten Tieren. Im Vergleich mit den anderen Alterskohorten zeigt der Hämoglobinwert keine signifikanten Unterschiede. Auch die beiden Stämme unterscheiden sich nicht in der Hämoglobinkonzentration. Dies zeigt, dass die Effekte im HbA1c nicht auf einer unterschiedlichen Hämoglobinkonzentration zwischen den beiden Stämmen beruhen können.

Es konnte gezeigt werden, dass der RAGE direkten Einfluss auf die Leukozyten Migration besitzt (97). In nekrotischen Geweben wird über den RAGE und HMGB1 die Migration von Neutrophilen vermittelt (98). RAGE beeinflusst die T-Zell Differenzierung in frühen Stadien (99) und die Expression von RAGE auf T-Zellen ist mit einer Aktivierung der Signalkaskade assoziiert (100). Durch diese Ergebnisse wird die Verbindung des RAGE auf die Immunantwort und insbesondere auf die Entzündung deutlich. Vor allem bei Diabetikern erhofft man sich durch Modulation des RAGE Komplikationen und Spätfolgen zu lindern beziehungsweise zu reduzieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen der Leukozyten im Blut bei den Altersgruppen der 4- und 12 Wochen alten RAxYFP Tieren signifikant höher sind. Im Verlauf der weiteren Alterung gleicht sich die Konzentration der Leukozyten bei beiden Stämmen an. Man kann postulieren, dass durch die fehlende extrazelluläre Domäne des RAGE, die Leukozyten schlechter ins Gewebe migrieren können. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, könnte man die Konzentration von Leukozyten in verschiedenen Geweben messen. Auch in Hinblick auf eine mögliche Adaptation im Rahmen der Alterung wären weitere Untersuchungen der Leukozytenmigration in unterschiedliche Gewebe sinnvoll. Des Weiteren könnte sich eine kompensatorische Hochregulierung der Leukozyten im jungen Alter erschöpfen, sodass es zu einer Angleichung der Leukozytenkonzentration im Alter kommt. Zudem konnten signifikant höhere Lymphozyten in den 4 Wochen alten RAxYFP Mäusen im Vergleich zu den YFP-Tieren ermittelt werden.

	4	12	36	72
Blutzucker	+		−	−
HbA1c	+	+		−
Triglyceride		+	+	+
Leukozyten	+	+		
Oberer Gefäßplexus	+			
Intermediärer Gefäßplexus				
Tiefer Gefäßplexus				
Gesamter Gefäßplexus	+	+		
Pericyten	+		+	
Antioxidative Enzyme der Retina	+			

Abbildung 5-2: Übersicht über die signifikanten Unterschiede des RAxYFP- im Vergleich mit YFP-Stamm in den Altersgruppen der 4,12, 36 und 72 Wochen alten Tieren.

5.2 Das retinale Gefäßsystem der RAxYFP Tiere im Vergleich mit den YFP-Tieren

Das Auftreten von AGEs in retinalen Blutgefäßen ist mit dem Schweregrad der diabetischen Retinopathie assoziiert (101). Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Behandlung mit dem sRAGE zu einer Suppression der Entwicklung von Atherosklerose führte (68) wird das AGE RAGE System als ein vielversprechender therapeutischer Ansatzpunkt in der

Behandlung von diabetischen makroangiopathischen, aber auch mikroangiopathischen Spätschäden, wie der diabetischen Retinopathie, angesehen.
Der Verlust von Pericyten ist die erste morphologische Veränderung in einer diabetischen Retina (102). Pericyten exprimieren den RAGE. Über die Bindung von AGEs und die in der Folge entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies kommt es zur Apoptose der Pericyten (103).
In dieser Studie zeigt sich, dass bei den jungen Tieren das Volumen des Gefäßplexus im RAxYFP Stamm höher ist. Das Volumen des gesamten Gefäßplexus nahm nach dem Erreichen des Lebensalters von 12 Wochen innerhalb des RAxYFP Stamm signifikant ab. Damit wäre die Ausschaltung der extrazellulären Domäne des RAGE bei der Entwicklung des Gefäßplexus, welcher bei der Maus mit der 4. Lebenswoche abgeschlossen ist (40), von Vorteil. Passend zu dieser Hypothese resultierte, dass der obere Gefäßplexus, der sich zuerst entwickelt, bei den 4 Wochen RAxYFP Mäusen ein signifikant größeres Volumen hat als der oberflächliche Gefäßplexus der 4 Wochen alten YFP Tiere. Auch bei den 12 Wochen alten Tieren lag das Volumen des Gefäßplexus bei den RAxYFP Tieren signifikant höher als bei den YFP Tieren. Im Rahmen der weiteren Alterung (36 Wochen) kam es dann aber innerhalb des RAxYFP Stamm zu einer signifikanten Reduktion des Volumens, während dies im YFP-Stamm unverändert blieb. Mit Alterung geht der Vorteil der Ausschaltung der extrazellulären Domäne des RAGE im Vergleich zum Kontrollstamm damit vollständig verloren.
In Studien wurde bereits nachgewiesen, dass die Gabe von sRAGE zu einer Reduktion von Atherosklerose führte. Jedoch wurden diese Effekte nur an 8 bis 11 Wochen alten Mäusen durchgeführt und nachgewiesen (104). Das Alter der Mäuse entspricht beim Menschen dem Alter eines Jugendlichen. In Kontrast hierzu zeigt sich eine altersabhängige Prävalenz insbesondere des Typ-2-Diabetes. Die Lebenszeitprävalenz an Diabetes mellitus zu erkranken in Deutschland beträgt bei den unter 50 jährigen 2-3%, wohingegen bei den über 70 Jährigen die Prävalenz auf bis zu 22% ansteigt (16). Auch das Vorkommen der diabetischen Retinopathie korreliert mit der Erkrankungsdauer (16). Es wird das Problem deutlich, dass ein großer Unterschied zwischen dem Alter der Tiere in Tierstudien und dem Alter der Menschen in möglichen klinischen Studien besteht. Diese Diskrepanz erfordert ein kritisches Hinterfragen von einigen in Tierstudien ermittelten Effekten.
Des Weiteren muss zwischen einer medikamentösen Blockade des AGE-RAGE Systems und einem Tiermodell mit einem RAGE Knockout unterschieden werden. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es zur oben dargelegten altersabhängigen Adaptation des Volumens des retinalen Gefäßplexus durch Ausschaltung der extrazellulären Domäne des RAGE kommt. Ob es bei einer medikamentösen Blockade des AGE-RAGE Systems bei Mäusen im Alter von 12 und 36 Wochen zu vergleichbaren Effekten kommt, kann hieraus nicht geschlossen werden. Da bei diesen Tieren die vorangegangene Entwicklung unter einem physiologischen

AGE-RAGE System erfolgte, wären auch andere Effekte denkbar. Solche Experimente sollten zukünftig durchgeführt werden.

Bei der Pericytenauszählung hat sich gezeigt, dass die Anzahl der Pericyten in der Altersgruppe der 4, 12 und 36 Wochen alten Tieren im RAxYFP Stamm grösser ist als im YFP Stamm. Dabei war der Unterschied in der Altersgruppe der 4 und 36 Wochen alten Mäuse signifikant. Bei den 72 Wochen alten Tieren besaß der YFP Stamm mehr Pericyten im Vergleich zu dem RAxYFP Stamm. Diese Ergebnisse korrelieren mit den bereits diskutierten Ergebnissen zum Volumen des Gefäßplexus. Beim Vergleich der Pericyten mit dem Gefäßvolumen präsentiert sich für die Pericyten ein vom Gefäßvolumen unabhängiger Effekt. Denn am Beispiel der 36 Wochen alten RAxYFP Tiere zeigt sich, dass weniger Gefäßvolumen nicht automatisch mit einer geringeren Anzahl an Pericyten einhergeht. Es ist allerdings anzumerken, dass die Pericyten Auszählung im Gegensatz zur Volumenbestimmung eine deutlich subjektive Komponente enthält. Es wurden etablierte Kriterien zur Auszählung festgelegt, aber keine separate Anfärbung der Pericyten durchgeführt. Für die weiterführende Interpretation der Ergebnisse wäre die Kalkulation der Anzahl der Pericyten bezogen auf das Volumen der Gefäße interessant, um den Einfluss des AGE-RAGE Systems auf die Pericyten unabhängig vom Volumen des Gefäßplexus zu untersuchen.

5.3 Die antioxidative Abwehr in der Retina der RAxYFP Tiere im Vergleich mit den YFP-Tieren

Sowohl AGEs als auch der oxidative Stress steigen mit der Alterung an (105). Eine hohe Konzentration von AGEs korreliert unabhängig vom Alter mit einem erhöhten oxidativen Stress (105). Oxidativer Stress ist definiert als die Imbalance zwischen der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies und der Elimination durch Antioxidantien (106). Durch eine hyperglykämische Stoffwechsellage wird oxidativer Stress verstärkt. Der gesteigerte oxidative Stress führt zu mitochondrialen Schäden, zelluläre Apoptose, Entzündung und funktionellen und strukturellen Änderungen in der Retina. Somit trägt der oxidative Stress entscheidend zu der Entwicklung einer diabetischen Retinopathie bei (101). Als Maß für den oxidativen Stress wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von Antioxidantien vom RAxYFP mit dem YFP-Stamm verglichen. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Justus Hosseini am IBIO erhoben. In der Retina sind die antioxidativen Enzyme bei den 4 Wochen alten RAxYFP Tieren höher exprimiert, im Vergleich zu den YFP Tieren. Mit der Alterung nimmt die Expression innerhalb des RAxYFP Stammes ab. Innerhalb des YFP Stammes zeigte sich kein einheitliches Muster in der Expression der antioxidativen Enzyme.

Die Retina ist aufgrund des hohen Sauerstoffbedarfes, dem hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren und dem direkten Lichteinfall besonders anfällig für oxidativen Stress (107) .Sie besteht aus funktionell sehr unterschiedlichen Schichten. Die Durchblutung in der Retina wird

unter anderem durch die neurovaskuläre Einheit, bestehend aus retinalen Neuronen, Gliazellen und Endothelzellen, reguliert (108). Sowohl für die Mitochondrien als auch die NAPDH Oxidase der Photorezeptoren konnte gezeigt werden, dass diese reaktive Sauerstoffspezies bilden und so entscheidend zu vaskulären Läsionen bei der diabetischen Retinopathie beitragen (109). Neben den Photorezeptoren konnten die Müllerzellen und Endothelzellen als Quelle für oxidativen Stress identifiziert werden (109). In Studien konnten die Catalase (110), die SOD (107), DJ-1 (111) und die GPX (112) die Retina vor oxidativen Stress schützen. αB-Crystallin wird vom Crystallin AB (CRYAB) Gen codiert und gehört zu der Familie der kleinen Hitzeschockproteine und dienen als Chaperon, unter anderem für VEGF-A (64), (65). Außerdem fungiert das αB-Crytsallin als Inhibitor der Apoptose, Zellprotektion und proteasomaler Interkation (65). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von VEGF-A in αB-Crystallin -/- Mäusen niedrig ist und es zu signifikant weniger Neovaskularisation kommt (65). Deswegen wird αB-Crystallin als wichtiger, potentieller therapeutischer Angriffspunkt für Erkrankungen wie die proliferative diabetische Retinopathie angesehen.

In der Arbeit zeigte sich eine Angleichung des Expressionsniveaus der antioxidativen Enzyme zwischen den unterschiedlichen Altersgruppen der Stämme. Bei den Jungtieren führt die Blockade des RAxYFP zu einer erhöhten Expression von antioxidativen Enzymen. Die Frage, ob die vermehrte Expression verminderten oxidativen Stress oder aber reaktiv, infolge erhöhter Produktion von ROS/RNS entsteht (113), lässt sich ohne weitere Untersuchungen vorerst nicht beantworten.

Es konnte nachgewiesen werden, dass in der frühen Phase der diabetischen Retinopathie, die Aktivierung von NF-κB zu einer Induktion der Apoptose in retinalen Endothelzellen und Pericyten führt. Antioxidantien besitzen einen protektiven Faktor (114). Das in dieser Arbeit ermittelte gesamte retinale Gefäßvolumen ist in den jungen Altersgruppen ebenfalls im RAxYFP Stamm signifikant höher als im YFP Stamm. Diese Korrelation der Daten des retinalen Gefäßvolumen und der Expression der Antioxidativen Enzyme legt einen protektiven Einfluss von antioxidativen Enzymen vor einer apoptotischen Zerstörung von retinalen Endothelzellen nahe, wobei der Effekt in diesem Modell auf das jüngere Lebensalter beschränkt bleibt.

Vergleichend zur Expression der antioxidativen Enzymen in der Retina wurden die Enzyme durch Herrn Justus Hosseini in der Cornea des Auges untersucht (siehe Anhang). Es konnte gezeigt werden, dass ein RAGE Knockout bei 8-12 Wochen alten diabetischen Mäusen einen schützenden Effekt auf den Nervenfaserverlust in der Cornea besitzt (115). Über RAGE wird die Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3k) aktiviert. PI3k führt unter anderem zu einer Anhäufung von oxidativem Stress, der Aktivität von Caspase-3 und nukleärer DNA-Degradation. Der Konsum des Antioxidans alpha-Liponsäure hat einen protektiven Einfluss (116). Durch die

Gabe von sRAGE konnten Nervenschäden, sowohl in vitro als auch in vivo, vorgebeugt werden (116). Im Gegensatz zur Retina ist die Cornea nicht vaskularisiert. Die altersabhängige Expression der antioxidativen Enzyme präsentierte sich nicht nur in der Retina, sondern auch in der Cornea zwischen den Stämmen unterschiedlich. Beim YFP-Stamm war die Expression bei den 4 Wochen alten Jungtieren hoch und nahm dann ab. Die Expression der antioxidativen Enzyme war bei den 4 Wochen alten Tieren des RAxYFP Stamms niedriger als im Kontrollstamm und stieg danach erst an. Für SOD1, DJ1, Crystallin AB und Catalase präsentiert sich das Maximum der Expression in der 12 Lebenswoche. Im Gegensatz dazu befand sich die höchste Expression des SOD 2 in der 36 Wochen. Die SOD 2 liegt im Gegensatz zur SOD 1 vor allem in den Mitochondrien (44), die möglicherweise erst verzögert oxidativen Stress ausgesetzt sind.

Wir konnten nachweisen, dass sich die Expression der antioxidativen Enzyme der RAxYFP von denen des YFP-Kontrollstammes unterscheidet. Während das Maximum der Expression der antioxidativen Enzyme in der gut vaskularisierten Retina schon bei den 4 Wochen alten Jungtieren liegt, präsentiert sich das Maximum der antioxidativen Enzyme in der Cornea erst bei den 12 Wochen alten Tieren. Beide Gewebe unterscheiden sich aber altersabhängig, und dabei aber insbesondere in jungem Lebensalter, in der Expression der antioxidativen Enzyme vom Kontrollstamm. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Blockade des AGE-RAGE-Systems in diesem Alter protektiv sein könnte. Eine Inhibition des AGE-RAGE Systems könnte so bei jungen Typ-I-Diabetikern das Auftreten einer diabetischen Neuropathie, beziehungsweise diabetischen Retinopathie verzögern. Mit einer solchen Intervention sollte möglicherweise bereits vor der Manifestation von Spätschäden begonnen werden. Die Blockade des AGE-RAGE Systems im hohen Alter (Typ-2-Diabetikern) lässt jedoch keinen schützenden Effekt über das antioxidative System vermuten, wobei die Möglichkeit einer reaktiven Steigerung der Expression nicht ausgeschlossen werden darf.

5.4 Die Expression des RAGE in der Retina der RAxYFP Tiere im Vergleich mit den YFP Tieren

Die Expression des RAGE präsentiert sich während der Alterung in der Retina innerhalb des RAxYFP Stammes auf einem konstant niedrigen Niveau. Durch Bindung von AGEs und in der Konsequenz Aktivierung von NF-κB kommt es zu einer Erhöhung der Expression von RAGE (117). Passend zu den steigenden AGEs im Alter (46) und der aktiven AGE-RAGE Achse im Vergleich zum Knockout zeigt sich bei den Kontrolltieren ein Anstieg des RAGE bis zu den 36 Wochen alten Tieren. Mit der weiteren Alterung nimmt die Expression des RAGE wieder ab. Soulis et. al konnten nachweisen, dass AGEs und RAGE in der inneren plexiformen Schicht und der inneren Grenzmembran der Retina nebeneinander bestehen (118). In glaukomerkranketen Augen konnte RAGEs auch auf Gliazellen nachgewiesen werden. Vor

allem auf Müller-Zellen konnte der RAGE nachgewiesen werden (119). Diese Verteilung des RAGE in der Retina unterstreicht den pathophysiologischen Zusammenhang des AGE-RAGE Systems in der Entwicklung der diabetischen Retinopathie (siehe AGE-RAGE-System in der diabetischen Retinopathie). Anschließende Studien wären notwendig, um beurteilen zu können, ob das AGE-RAGE Systems im Alter an Bedeutung verliert oder ob es zu einer gezielten Herunterregulation des RAGE im Sinne eines Adaptionsmechanismus an die steigenden AGEs im Alter kommt. Zur Beantwortung dieser Frage wäre beispielsweise eine Messung der NF-κB-Aktivität sinnvoll.

5.5 Ausblick

Die Blockade des AGE RAGE System wird als therapeutischer Ansatzpunkt in verschiedenen Erkrankungen untersucht.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des AGE-RAGE Systems durch die Verwendung eines RAGE Knockout Stammes zu einem höheren Volumen des retinalen Gefäßplexus in den jungen Altersgruppen führt. Inwieweit die signifikant erhöhten antioxidativen Enzyme hierzu beitragen gilt es weiterführend zu klären. Beispielsweise könnte die Retina auf Marker oxidativer Proteinschädigung (Carbonylgruppen) oder oxidativen Lipidschädigungen (Lipidhydroperoxide) untersucht werden um Hinweise zu finden, ob die Expression durch erhöhte ROS getriggert ansteigt oder über andere Mechanismen reguliert wird. Weiterhin ist die Expressionsanalyse des VEGF als Signalmolekül der Angiogenese von Interesse. Zudem gilt es zu klären, ob im Alter das AGE-RAGE System an Bedeutung verliert und andere Signalwege beispielsweise andere AGE Rezeptoren dominanter werden.

Die oben diskutierten Ergebnisse zeigen, dass die Blockade des AGE-RAGE Systems altersabhängig zu unterschiedlichen Effekten führt. Dies sollte auch in klinische Studien berücksichtigt werden. Es stellt sich die Frage zu welchem Zeitpunkt und für welchen Patienten die Blockade des RAGE von Vorteil ist. Vorab gilt es aber, den altersabhängigen Effekt einer Blockade mittels sRAGE mit dem in dieser Studie gezeigten altersabhängigen Verlauf der Blockade mittels RAGE Knockout zu überprüfen.

6 Zusammenfassung

Diabetes mellitus ist eine häufig vorkommende Stoffwechselerkrankung und die Prävalenz ist weltweit steigend. Eine unerkannte Diabeteserkrankung oder ein unzureichend behandelter Diabetes mellitus ist mit Spätfolgen wie der diabetischen Retinopathie vergesellschaftet. Im Rahmen der Alterung und verstärkt durch eine Diabeteserkrankung kommt es zu einer steigenden Konzentration von AGEs, die über Bindung an den RAGE die Pathogenese beschleunigen. Über Blockade des AGE-RAGE System, beispielsweise mittels sRAGE

Erhöhung, wird versucht, für den Diabetes mellitus aber auch eine Vielzahl weiterer Erkrankungen einen therapeutischen Ansatzpunkt zu entwickeln.
Mit dieser tierexperimentellen Studie sollte daher der Einfluss des AGE-RAGE Systems in der Alterung mit Fokus auf die Retina untersucht werden. Dazu wurde der RAxYFP Stamm, bei dem das AGE-RAGE System durch Fehlen der extrazellulären Domäne blockiert ist, mit dem YFP Stamm als Kontrollstamm verglichen. Die Analyse erfolgte zu den Alterszeitpunkten 4, 12, 36 und 72 Wochen. Neben den Gefäßen des retinalen Gefäßplexus wurden Blut und Gewicht analysiert. Außerdem wurde die Expression des RAGE sowie antioxidativer Enzyme und Proteine untersucht.
Blutzucker und korrelierend dazu der HbA1c waren bei den 4 Wochen alten RAxYFP Tieren signifikant höher als bei den YFP Tieren. Mit der Alterung stieg jedoch der Blutzucker und damit auch der HbA1c im YFP Stamm verglichen mit dem RAxYFP Stamm an. Eine diabetische Stoffwechsellage konnte jedoch in beiden Stämmen nicht nachgewiesen werden. Das Gewicht der RAxYFP Tiere war signifikant höher als das Gewicht der YFP Tiere. Bei den Blutfetten war die HDL-Konzentration der RAxYFP Mäuse tendenziell niedriger als die HDL-Konzentration der YFP-Tiere. Die Triglyceride waren ab einem Alter von 12 Wochen bei den RAxYFP Mäusen signifikant höher. Mittels Blutbilder wurden beide Stämme weiterführend charakterisiert. Höheren Leukozyten und Lymphozyten Konzentration im RAxYFP Stamm bei den jungen Altersgruppen (4 und 12 Wochen), standen tendenziell erniedrigte Monozyten Konzentrationen im Vergleich zum YFP-Stamm gegenüber.
Das Volumen des retinalen Gefäßplexus war in den jungen Alterskohorten (4 und 12 Wochen) bei den RAxYFP Tieren höher als bei den YFP Tieren. Mit 36 Wochen erfolgte eine Angleichung der Volumina und nachfolgend eine vergleichbare Zunahme zum Alter von 72 Wochen in beiden Stämmen. Bei der Betrachtung der einzelnen Gefäßschichten zeigte sich ein signifikant höheres Volumen in dem sich zuerst ausbildenden oberflächlichen Gefäßplexus im RAxYFP Stamm. Signifikante Veränderungen des retinalen Gefäßplexus im RAxYFP Stammes gingen mit einer erhöhten Pericyten Zahl im Vergleich zum YFP Stamm einher. Die antioxidativen Enzyme (SOD1, SOD2, GPX und Catalase) und die vor oxidativem Stress schützenden Chaperone DJ1 und Crystallin AB waren bei den 4 Wochen alten Tieren in der Retina des RAxYFP-Stamms signifikant höher exprimiert, bevor es mit der Alterung zu einer Angleichung der Expression an den YFP Stamm kam.
Zusammengenommen deuten alle Ergebnisse auf einen Entwicklungsvorsprung im jungen Lebensalter durch die Blockade AGE-RAGE System im RAxYFP Stamm hin. Durch die dauerhafte Ausschaltung des Systems, welches sich durch die niedrige unveränderte Expression des membranständigen Anteils des RAGE bestätigen ließ, scheint es allerdings zu einer Adaptation im Alter zu kommen, die im Vergleich zum Kontrollstamm keine dauerhafte Protektion erkennen lässt. Der RAGE scheint auch in der Retina in die Homöostase von

protektiven und aggressiven Faktoren integriert zu sein, worauf die erhöhte Expression vor allem im mittleren Lebensalter im Kontrollstamm hindeutet. Eine dauerhafte Blockade des AGE-RAGE Systems muss daher genauso hinterfragt werden, wie der Einsatz bei Typ-II-Diabetikern, bei denen sich die Erkrankung zumeist im fortgeschrittenen Lebensalter manifestiert. Aus diesen Ergebnissen lässt sich aber ein Benefit der Antagonisierung des AGE-RAGE Systems bei jungen Typ-I-Diabetikern vermuten, bei denen frühzeitig Komplikationen wie eine retinale Veränderung auftreten.

7 Thesen

1. Parallel zur Inzidenzsteigerung des Diabetes mellitus (DM) nimmt auch die diabetische Retinopathie als mikrovaskuläre Komplikation der Erkrankung zu, die schon jetzt die Hauptursache für eine Erblindung im erwerbsfähigen Alter ist.
2. Advanced Glycation End Products (AGE) sind im Alter und bei Diabetes mellitus erhöht und tragen durch Bindung an den Receptor for AGE (RAGE) zur Entwicklung mikrovaskulärer Komplikationen bei.
3. Da die altersabhängige Veränderung im AGE-RAGE System noch kaum untersucht ist, wurden in dieser Studie vier unterschiedliche Alterskohorten (4, 12, 36, und 72 Wochen) eines RAGE Knockout Stamms (RAxYFP) und eines Kontrollstamms (YFP) von B6/J Mäusen untersucht.
4. Die RAxYFP Tiere waren im gesamten Altersverlauf schwerer als die YFP Tiere.
5. Der Stoffwechsel der RAxYFP Tiere war im Vergleich zum YFP-Stamm verändert und zeigte in den jungen Alterskohorten einen signifikant höheren Blutzucker und HbA1c, im Alter dagegen signifikant erhöhte Triglyceride.
6. RAxYFP Jungtiere (4 Wochen) hatten eine signifikant höhere Leukozytenzahl als YFP Tiere.
7. In der Retina war zum selben Alterszeitpunkt die Expression von antioxidativen Enzymen (SOD1, SOD2, GPX und Catalase) und die vor oxidativem Stress schützenden Chaperone DJ1 und Crystallin AB signifikant erhöht.
8. Das Volumen des fluoreszenzmikroskopisch dargestellten retinalen Gefäßplexus wurde quantifiziert und war bei den 4 und 12 Wochen alten RAxYFP Tieren signifikant höher als bei den YFP Tieren.
9. Die Auswertung der einzelnen Gefäßschichten zeigte ein signifikant höheres Volumen in dem sich zuerst ausbildenden oberflächlichen Gefäßplexus in RAxYFP Jungtieren.
10. Die Veränderungen durch den RAGE Knockout lassen sich mit Fokus auf die Retina als Entwicklungsvorsprung im jungen Lebensalter interpretieren.
11. Da die RAGE Expression im Kontrollstamm altersabhängig signifikante Unterschiede zeigte und nicht wie im Knockout Stamm dauerhaft niedrig war, scheint der RAGE aber auch in der Retina in die Modulation der Homöostase von protektiven und aggressiven Faktoren integriert zu sein.
12. Bezogen auf die Pathogenese des DM scheint eine dauerhafte therapeutische Blockade daher ungeeignet, bei jungen Typ-I DM Patienten mit frühzeitigen Anzeichen einer diabetischen Retinopathie aber möglicherweise sinnvoll.

8 Anhang

8.1 Enzyme der antioxidativen Abwehr in der Cornea

Diese Daten wurden von Herrn Justus Hosseini am IBIO ermittelt. Da die Cornea sich in Expression der antioxidativen Enzyme und Proteine im Vergleich zur Retina (Kapitel 4.4.1) deutlich unterschieden hat und damit wichtige Ansatzpunkte für die Diskussion der Daten geliefert hat, werden die Daten nachfolgend dargestellt und kurz erläutert.

Bei der SOD 1 stieg die relative Expression innerhalb des RAxYFP Stammes von der Altersgruppe der vier Wochen alten Tieren zu den 12 Wochen alten Tieren. Mit der Alterung sank die relative Expression wieder. Im YFP Stamm präsentierte sich ein anderer Verlauf. Die relative Expression war bei den 4 Wochen alten Tieren höher als in den anderen Altersgruppen. Bis zum Alter der 36 Wochen alten Tieren sank die relative Expression, nahm dann bis zur Altersgruppe der 72 Wochen alten Tieren wieder zu. Die relative Expression der SOD 1 war bei den 12 und 36 Wochen alten RAxYFP Tieren signifikant höher als bei den YFP Tieren der gleichen Altersgruppe.

Bei der SOD 2 präsentierte sich ein vergleichbarer Verlauf der relativen Expression. Innerhalb des RAxYFP Stamm stieg die relative Expression bis zur Altersgruppe der 36 Wochen alten Tieren. Hier erreichte die SOD 2 ein Maximum bei $1{,}1 \times 10^8$ relative Expression/G6pdx. Danach sank die relative Expression wieder ab. Beim YFP Stamm war die Expression der SOD 2 bei den 4 Wochen alten Mäusen höher und sank mit der Alterung, ehe die Expression der SOD 2 von der Alterskohorte der 36 Wochen alten Tieren bis zu den 72 Wochen alten Tieren wieder stieg.

Die Expression der GPX1 stieg innerhalb des RAxYFP mit der Alterung kontinuierlich. Innerhalb des YFP Stammes zeigte sich konträr dazu eine kontinuierliche Abnahme der Expression. Mit $1{,}0 \times 10^6$ war die relative Expression/G6pdx bei den 4 Wochen alten YFP Mäusen am höchsten. Die Abnahme der Expression im Vergleich der 36 zu den 72 Wochen alten Tieren des gleichen Stammes war signifikant. Außerdem war der Unterschied der Expression bei den 4 und 12 Wochen alten Tieren zwischen den Stämmen signifikant.

Die Expression der Catalase in der Cornea zeigte innerhalb des RAxYFP Stammes keine signifikanten Unterschiede. Die Expression bei den 4 Wochen alten Mäusen war mit 58915,7 relative Expression/G6pdx innerhalb des RAxYFP Stammes am niedrigsten. Im Vergleich dazu war die Expression der Catalase bei den 12 Wochen alten RAxYFP Tieren am höchsten (87032,8 relative Expression/G6pdx). Beim YFP Stamm war die Expression mit 327314 relative Expression/G6pdx bei den 4 Wochen alten Tieren am höchsten. Mit der Alterung zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme in der Expression der Catalase. Diese Unterschiede zwischen den Alterskohorten des YFP Stammes waren signifikant.

Das Crystallin AB wurde im RAxYFP Stamm bei den 4 Wochen alten Tieren mit $2{,}2x10^7$ relative Expression/G6pdx exprimiert. Bis zu der Altersgruppe der 12 Wochen alten Tieren stieg die Expression auf $3{,}0x10^7$, ehe sie auf $7{,}5x10^6$ relative Expression/G6pdx bei den 72 Wochen alten Mäusen absank. Der YFP Stamm präsentierte eine hohe Expression des Crystallin AB bei den 4 Wochen alten Jungtieren. Mit der Alterung sank die Expression auf $4{,}2x10^6$ relative Expression/ G6pdx bei den 12 Wochen alten Tieren. Im weiteren Alterungsprozess stieg die Expression vom Crytallin AB wieder kontinuierlich an.
Beim RAxYFP erreichte die Expression des DJ1 mit $4{,}8x10^6$ relative Expression/G6pdx (12 Wochen alte Tiere) den Höchstwert innerhalb des RAxYFP Stammes. Im Vergleich zu den 4 und 72 Wochen alten Tieren des gleichen Stammes waren die Unterschiede signifikant. Im YFP Stamm präsentierte sich erst eine kontinuierliche Abnahme der Expression vom DJ1 bis zu den 36 Wochen alten Mäusen. Danach stieg die Expression wieder an.

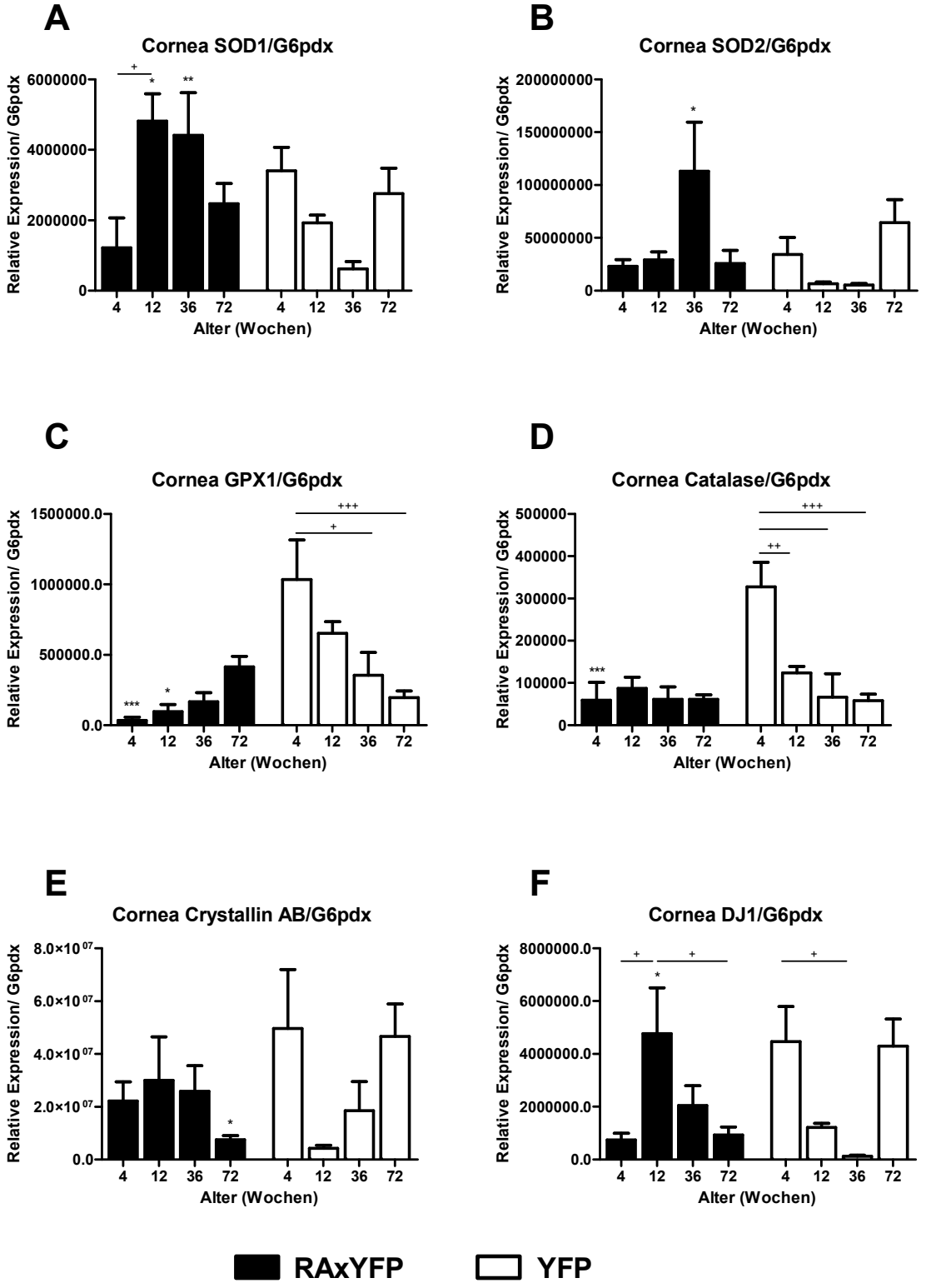


Abbildung 8-1: Genexpressionsanalyse der Cornea von RAxYFP (schwarz) und YFP (weiß) Tieren im Alter von 4,12, 36 und 72 Wochen
A: SOD 1= Superoxiddismutase 1; B: SOD 2= Superoxiddismutase 2; C: GPX1= Glutathionperoxidase 1; D: Catalase; E: Crystallin AB; F: DJ1 4 Wochen (n= 7-12); 12 Wochen (n= 12), 36 Wochen (n= 12); 72 Wochen (n= 12); +,*, p<0.05; ++,**, p<0,01; +++,***, p<0,001 1way ANOVA/ Bonferroni Korrektur

9 Literatur

1. Statistisches Bundesamt. Bevölkerung im Wandel: Ergebnisse der 14. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung 2019 Jun 27; 2019.
2. Sabine Sütterlin. Deutschland ist eines der kinderärmsten Länder der Welt. Berlin-Institut 2008.
3. Gemeinsam getragen von Robert Koch-Institut (RKI) und dem Statistischen Bundesamt. Gesundheit in Deutschland - Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2015.
4. RKI. Gesundheit und Krankheit im Alter 2009.
5. Riede U-N, Werner M. Allgemeine und Spezielle Pathologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017.
6. Ungvari Z, Tarantini S, Donato AJ, Galvan V, Csiszar A. Mechanisms of Vascular Aging. Circ Res 2018; 123(7):849–67. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.311378.
7. Statitisches Bundesamt. Gesundheit im Alter 2010.
8. Deuschl G, Maier W et al. S3-Leitlinie Demenzen. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Hrsg. Leitlinie für Diagnostik und Therapie in der Neurologie 2016; 2016.
9. Raz L, Knoefel J, Bhaskar K. The neuropathology and cerebrovascular mechanisms of dementia. J Cereb Blood Flow Metab 2016; 36(1):172–86. doi: 10.1038/jcbfm.2015.164.
10. Pugazhenthi S, Qin L, Reddy PH. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 2017; 1863(5):1037–45. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.04.017.
11. Kerner W, Brückel J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2014; 122(7):384–6. doi: 10.1055/s-0034-1366278.
12. Nauck M, Gerdes C, Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Freckmann G et al. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus: Update 2020. Diabetologie und Stoffwechsel 2020; 15(S 01):S9-S17. doi: 10.1055/a-1193-3185.
13. IDF Diabetes. IDF Diabetes Atlas: Ninth edition 2019; 2019.
14. IDF. Metabolic Syndrome 2006.
15. Pfizer. Prävalenz von Diabetes mellitus nach Alter und Geschlecht (in Prozent) 2006.
16. Herold G, Hrsg. Innere Medizin 2020: Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Gerd Herold; 2020.
17. Hien P, Böhm BO. Diabetes-Handbuch: Eine Anleitung für Praxis und Klinik. 6., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010. (Diabetes-Handbuch). Verfügbar unter: http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10446226.

18. Landgraf R, Aberle J, Birkenfeld AL, Gallwitz B, Kellerer M, Klein HH et al. Therapie des Typ-2-Diabetes. Diabetologie und Stoffwechsel 2020; 15(S 01):S65-S92. doi: 10.1055/a-1193-3793.
19. Yamagishi S-i. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. Exp Gerontol 2011; 46(4):217–24. Verfügbar unter: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531556510004122.
20. Lin Y-C, Chang Y-H, Yang S-Y, Wu K-D, Chu T-S. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. J Formos Med Assoc 2018; 117(8):662–75. doi: 10.1016/j.jfma.2018.02.007.
21. UK Prospective Diabetes Study Group. Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 39. UK Prospective Diabetes Study Group. BMJ 1998; 317(7160):713–20.
22. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB et al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. N Engl J Med 2001; 345(12):851–60. doi: 10.1056/NEJMoa011303.
23. Arzneimittelkommission Der Deutschen Ärzteschaft, Deutsche Diabetes-Gesellschaft, Deutsche Gesellschaft Für Allgemeinmedizin Und Familienmedizin, Deutsche Gesellschaft Für Gefäßchirurgie Und Gefäßmedizin, Deutsche Gesellschaft Für Innere Medizin (DGIM), Deutsche Gesellschaft Für Nephrologie et al. Nationale VersorgungsLeitlinie Nierenerkrankungen bei Diabetes im Erwachsenenalter – Kurzfassung, 1. Auflage: Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF); 2010.
24. Professor Dr. med. Jürgen Winkler, Professor Dr. med. Dr. h. c. Theodor H. Schiebler. Anatomie: Sinnesorgane; 2005.
25. Grehn F. Netzhaut. In: Grehn F, Hrsg. Augenheilkunde. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. S. 281–356.
26. Campbell JP, Zhang M, Hwang TS, Bailey ST, Wilson DJ, Jia Y et al. Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography. Sci Rep 2017; 7:42201. doi: 10.1038/srep42201.
27. Jeany Q. Li, Thomas Welchowski, Mathias Schmid, Julia Letow, A. Caroline Wolpers, Frank G. Holz et al. Retinal Diseases in Europe 2017; 2017.
28. Robert Koch-Institut. Gesundheitsberichterstattung des Bundes | GBE-Themenheft | Blindheit und Sehbehinderung 2017.
29. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng C-Y et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a

systematic review and meta-analysis. Lancet Glob Health 2014; 2(2):e106-16. doi: 10.1016/S2214-109X(13)70145-1.

30. García-Layana A, Cabrera-López F, García-Arumí J, Arias-Barquet L, Ruiz-Moreno JM. Early and intermediate age-related macular degeneration: update and clinical review. Clin Interv Aging 2017; 12:1579–87. doi: 10.2147/CIA.S142685.
31. Al-Zamil W, Yassin S. Recent developments in age-related macular degeneration: a review. CIA 2017; Volume 12:1313–30. doi: 10.2147/CIA.S143508.
32. Marcus Walckling und Simone Baltrusch. Diabetische Retinopathie: Aktuelle Möglichkeiten von Diagnostik und Therapie. Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten 2019; 42.(9).
33. Hammes H-P. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. Diabetologia 2018:29–38. doi: 10.1007/s00125-017-4435-8.
34. Duh EJ, Sun JK, Stitt AW. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. JCI Insight 2017; 2(14). doi: 10.1172/jci.insight.93751.
35. Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy. N Engl J Med 2012; 366(13):1227–39. doi: 10.1056/NEJMra1005073.
36. Sho-ichi Y, Kazuo N, Takanori M. Advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) system in diabetic retinopathy. 2006.
37. Jandeck C, Stahl A. Frühgeborenenretinopathie. Klin Monbl Augenheilkd 2012; 229(5):559-75; quiz 576-7. doi: 10.1055/s-0031-1298437.
38. Stahl A. Studienüberblick zur Frühgeborenenretinopathie : Aktueller Wissensstand und Ausblick. Ophthalmologe 2018; 115(6):456–63. doi: 10.1007/s00347-018-0720-2.
39. Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM et al. The mouse retina as an angiogenesis model. Invest Ophthalmol Vis Sci 2010; 51(6):2813–26. doi: 10.1167/iovs.10-5176.
40. Milde F, Lauw S, Koumoutsakos P, Iruela-Arispe ML. The mouse retina in 3D: quantification of vascular growth and remodeling. Integr Biol (Camb) 2013; 5(12):1426–38. doi: 10.1039/c3ib40085a.
41. Kim Y, Park JR, Hong HK, Han M, Lee J, Kim P et al. In vivo imaging of the hyaloid vascular regression and retinal and choroidal vascular development in rat eyes using optical coherence tomography angiography. Sci Rep 2020; 10(1):12901. doi: 10.1038/s41598-020-69765-7.
42. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. Ann N Y Acad Sci 2011; 1243:88–102. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06320.x.

43. Nawroth PP, Bierhaus A, Vogel GE, Hofmann MA, Zumbach M, Wahl P et al. Nichtenzymatische Glykierung und oxidativer Stress bei chronischen Erkrankungen und Diabetes mellitus. Med Klin (Munich) 1999; 94(1):29–38. doi: 10.1007/bf03044692.
44. Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
45. Rohlfing CL, Wiedmeyer H-M, Little RR, England JD, Tennill A, Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA(1c): analysis of glucose profiles and HbA(1c) in the Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes Care 2002; 25(2):275–8. doi: 10.2337/diacare.25.2.275.
46. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. J Biol Chem 1992; 267(21):14998–5004.
47. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. Circulation 2006; 114(6):597–605. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854.
48. Litwinoff E, Hurtado Del Pozo C, Ramasamy R, Schmidt AM. Emerging Targets for Therapeutic Development in Diabetes and Its Complications: The RAGE Signaling Pathway. Clin Pharmacol Ther 2015; 98(2):135–44. doi: 10.1002/cpt.148.
49. Shen C-Y, Lu C-H, Wu C-H, Li K-J, Kuo Y-M, Hsieh S-C et al. The Development of Maillard Reaction, and Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for AGE (RAGE) Signaling Inhibitors as Novel Therapeutic Strategies for Patients with AGE-Related Diseases. Molecules 2020; 25(23). doi: 10.3390/molecules25235591.
50. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. Circ Res 1999; 84(5):489–97. doi: 10.1161/01.res.84.5.489.
51. Bongarzone S, Savickas V, Luzi F, Gee AD. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. J Med Chem 2017; 60(17):7213–32. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00058.
52. Schlueter C, Hauke S, Flohr AM, Rogalla P, Bullerdiek J. Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms--a result of regulated alternative splicing? Biochim Biophys Acta 2003; 1630(1):1–6. doi: 10.1016/j.bbaexp.2003.08.008.
53. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. Circ Res 2010; 106(5):842–53. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.212217.
54. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands-cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. J Mol Med 2009; 87(3):235–47. doi: 10.1007/s00109-009-0439-2.

55. Bongarzone S, Savickas V, Luzi F, Gee AD. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. J Med Chem 2017; 60(17):7213–32. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00058.
56. Schmidt AM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. J Clin Invest 2001.
57. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. J Mol Med 2005; 83(11):876–86. doi: 10.1007/s00109-005-0688-7.
58. Shen C-Y, Lu C-H, Wu C-H, Li K-J, Kuo Y-M, Hsieh S-C et al. The Development of Maillard Reaction, and Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for AGE (RAGE) Signaling Inhibitors as Novel Therapeutic Strategies for Patients with AGE-Related Diseases. Molecules 2020; 25(23). doi: 10.3390/molecules25235591.
59. Hekimi S, Lapointe J, Wen Y. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. Trends Cell Biol 2011; 21(10):569–76. doi: 10.1016/j.tcb.2011.06.008.
60. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. Cell 2005; 120(4):483–95. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.001.
61. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. Cell Physiol Biochem 2017; 44(2):532–53. doi: 10.1159/000485089.
62. Nandi A, Yan L-J, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. Oxid Med Cell Longev 2019; 2019:9613090. doi: 10.1155/2019/9613090.
63. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal 2011; 15(7):1957–97. doi: 10.1089/ars.2010.3586.
64. Dong Y, Dong Z, Kase S, Ando R, Fukuhara J, Kinoshita S et al. Phosphorylation of alphaB-crystallin in epiretinal membrane of human proliferative diabetic retinopathy. Int J Ophthalmol 2016; 9(8):1100–5. doi: 10.18240/ijo.2016.08.03.
65. Kase S, He S, Sonoda S, Kitamura M, Spee C, Wawrousek E et al. alphaB-crystallin regulation of angiogenesis by modulation of VEGF. Blood 2010; 115(16):3398–406. doi: 10.1182/blood-2009-01-197095.
66. Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T, Abeliovich A. DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. PLoS Biol 2004; 2(11):e362. doi: 10.1371/journal.pbio.0020362.
67. Egaña-Gorroño L, López-Díez R, Yepuri G, Ramirez LS, Reverdatto S, Gugger PF et al. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Mechanisms and Therapeutic

Opportunities in Diabetes and Cardiovascular Disease: Insights From Human Subjects and Animal Models. Front Cardiovasc Med 2020; 7:37. doi: 10.3389/fcvm.2020.00037.

68. Lisa Park, Kathleen G. Raman, Kenneth J. Lee, Yan Lu, Luis J. Ferran, Jr., Wing Sun Chow, David Stern, Ann Marie Schmidt, Kathleen G. Raman, Wing Sun Chow. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts 1998.
69. Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2010; 65(9):963–75. doi: 10.1093/gerona/glq074.
70. Denham Harman, M.D., Ph.D. AGING: A THEORY BASED ON FREE RADICAL AND RADIATION CHEMISTRY 1956.
71. Dipl.-Oecotroph Dorothee Hahne. Hightech in schlichtem Gewand: Innenleben eines Blutzuckermesssystems: Bei einem Besuch des Unternehmens Bayer HealthCare blicken wir ins Herz der leistungsfähigen Minilabore. Deutsches Ärzteblatt 2014 Mai 16.
72. PHSA Laboratories CW Site. DCA Vantage HbA1C Quick Reference Guide 2016.
73. UCSF Medical Center. HEMOGLOBIN A1C BY THE DCA VANTAGE 2013.
74. Roche Diagnostics AG. Reflotron System 2010. Verfügbar unter: www.roche-diagnostics.ch.
75. Invitrogen. Isolectin IB4 Conjugates 2005.
76. Esther Osterwalder. Immunhistochemie kompakt: Eine Einführung in die wichtigsten Grundlagen zu Therorie und Praxis. Verfügbar unter: www.histologietechnik.ch.
77. Bradbury S. Dictionary of light microscopy. Oxford, New York, Oxford: Oxford University Press; Royal Microscopical Society; 1989. (Oxford science publications; Bd. 15).
78. Dr. Helge Schmidt, Professor Dr. Simone Baltrusch. Tackling Diabetes with Confocal Microscopy. Olympus 2015.
79. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. Dev Cell 2011; 21(2):193–215. doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.001.
80. Du Prel J-B, Röhrig B, Hommel G, Blettner M. Choosing statistical tests: part 12 of a series on evaluation of scientific publications. Dtsch Arztebl Int 2010; 107(19):343–8. doi: 10.3238/arztebl.2010.0343.
81. Victor A, Elsässer A, Hommel G, Blettner M. Judging a plethora of p-values: how to contend with the problem of multiple testing--part 10 of a series on evaluation of scientific publications. Dtsch Arztebl Int 2010; 107(4):50–6. doi: 10.3238/arztebl.2010.0050.
82. Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. J Clin Invest 2004; 113(11):1641–50. doi: 10.1172/JCI18704.

83. Angelika Bierhaus, Marion A. Hofmann, Reinhard Ziegler, Peter P. Nawroth. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept 1997.
84. Rhee SY, Kim YS. The Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Vascular Complications. Diabetes Metab J 2018; 42(3):188–95. doi: 10.4093/dmj.2017.0105.
85. Perkins RK, Miranda ER, Karstoft K, Beisswenger PJ, Solomon TPJ, Haus JM. Experimental Hyperglycemia Alters Circulating Concentrations and Renal Clearance of Oxidative and Advanced Glycation End Products in Healthy Obese Humans. Nutrients 2019; 11(3). doi: 10.3390/nu11030532.
86. Beisswenger PJ, Howell SK, O'Dell RM, Wood ME, Touchette AD, Szwergold BS. alpha-Dicarbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. Diabetes Care; 2001.
87. Maessen DE, Hanssen NM, Scheijen JL, van der Kallen CJ, van Greevenbroek MM, Stehouwer CD et al. Post-Glucose Load Plasma α-Dicarbonyl Concentrations Are Increased in Individuals With Impaired Glucose Metabolism and Type 2 Diabetes: The CODAM Study. Diabetes Care 2015; 38(5):913–20. doi: 10.2337/dc14-2605.
88. Goetz LH, Schork NJ. Personalized medicine: motivation, challenges, and progress. Fertil Steril 2018; 109(6):952–63. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.05.006.
89. Jackson Laboratory. LIFE SPAN AS A BIOMARKER: https://www.jax.org/research-and-faculty/research-labs/the-harrison-lab/gerontology/life-span-as-a-biomarker#. Verfügbar unter: Jackson Laboratory: LIFE SPAN AS A BIOMARKER.
90. Cai W, He JC, Zhu L, Chen X, Wallenstein S, Striker GE et al. Reduced oxidant stress and extended lifespan in mice exposed to a low glycotoxin diet: association with increased AGER1 expression. Am J Pathol 2007; 170(6):1893–902. doi: 10.2353/ajpath.2007.061281.
91. Daffu G, Shen X, Senatus L, Thiagarajan D, Abedini A, Hurtado Del Pozo C et al. RAGE Suppresses ABCG1-Mediated Macrophage Cholesterol Efflux in Diabetes. Diabetes 2015; 64(12):4046–60. doi: 10.2337/db15-0575.
92. Eckardstein A von, Kardassis D. High Density Lipoproteins. Cham: Springer International Publishing; 2015. (Bd. 224).
93. Vlassara H, Striker GE. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. Nat Rev Endocrinol 2011; 7(9):526–39. doi: 10.1038/nrendo.2011.74.
94. Bettiga A, Fiorio F, Di Marco F, Trevisani F, Romani A, Porrini E et al. The Modern Western Diet Rich in Advanced Glycation End-Products (AGEs): An Overview of Its Impact on Obesity and Early Progression of Renal Pathology. Nutrients 2019; 11(8). doi: 10.3390/nu11081748.

95. Kuniyasu A, Ohgami N, Hayashi S, Miyazaki A, Horiuchi S, Nakayama H. CD36-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products (AGE) in mouse 3T3-L1 and human subcutaneous adipocytes. FEBS Letters 2003; 537(1-3):85–90. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00096-6.
96. Parhofer KG, Laufs U. The Diagnosis and Treatment of Hypertriglyceridemia. Dtsch Arztebl Int 2019; 116(49):825–32. doi: 10.3238/arztebl.2019.0825.
97. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T et al. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. J Exp Med 2003; 198(10):1507–15. doi: 10.1084/jem.20030800.
98. Huebener P, Pradere J-P, Hernandez C, Gwak G-Y, Caviglia JM, Mu X et al. The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury amplification following necrosis. J Clin Invest 2015; 125(2):539–50. doi: 10.1172/JCI76887.
99. Chen Y, Akirav EM, Chen W, Henegariu O, Moser B, Desai D et al. RAGE ligation affects T cell activation and controls T cell differentiation. J Immunol 2008; 181(6):4272–8. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.4272.
100. Reed JC, Preston-Hurlburt P, Philbrick W, Betancur G, Korah M, Lucas C et al. The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) modulates T cell signaling. PLoS One 2020; 15(9):e0236921. doi: 10.1371/journal.pone.0236921.
101. Kang Q, Yang C. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. Redox Biol 2020; 37:101799. doi: 10.1016/j.redox.2020.101799.
102. Hammes H-P. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. Horm Metab Res 2005; 37 Suppl 1:39–43. doi: 10.1055/s-2005-861361.
103. Xu J, Chen L-J, Yu J, Wang H-J, Zhang F, Liu Q et al. Involvement of Advanced Glycation End Products in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. Cell Physiol Biochem 2018; 48(2):705–17. doi: 10.1159/000491897.
104. Wendt T, Harja E, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Rong LL et al. RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. Atherosclerosis 2006; 185(1):70–7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.06.013.
105. Jaime Uribarri, Weijing Cai, Melpomeni Peppa, Susan Goodman, Luigi Ferrucci, Gary Striker, and Helen Vlassara. Circulating Glycotoxins and Dietary Advanced Glycation Endproducts: Two Links to Inflammatory Response, Oxidative Stress, and Aging 2009.
106. Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? Trends Pharmacol Sci 2011; 32(3):125–30. doi: 10.1016/j.tips.2010.12.002.
107. Jain SK. Superoxide dismutase overexpression and cellular oxidative damage in diabetes. A commentary on "Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in

mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress". Free Radic Biol Med 2006; 41(8):1187–90. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.07.017.

108. Ruan Y, Jiang S, Musayeva A, Gericke A. Oxidative Stress and Vascular Dysfunction in the Retina: Therapeutic Strategies. Antioxidants (Basel) 2020; 9(8). doi: 10.3390/antiox9080761.

109. Du Y, Veenstra A, Palczewski K, Kern TS. Photoreceptor cells are major contributors to diabetes-induced oxidative stress and local inflammation in the retina. Proc Natl Acad Sci U S A 2013; 110(41):16586–91. doi: 10.1073/pnas.1314575110.

110. Giordano CR, Roberts R, Krentz KA, Bissig D, Talreja D, Kumar A et al. Catalase therapy corrects oxidative stress-induced pathophysiology in incipient diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2015; 56(5):3095–102. doi: 10.1167/iovs.14-16194.

111. Wang W, Zhao H, Chen B. DJ-1 protects retinal pericytes against high glucose-induced oxidative stress through the Nrf2 signaling pathway. Sci Rep 2020; 10(1):2477. doi: 10.1038/s41598-020-59408-2.

112. Lili Lu, Brain C. Oveson, Young–Joon Jo, Thomas W. Lauer, Shinichi Usui, Keiichi Komeima et al. Increased Expression of Glutathione Peroxidase 4 Strongly Protects Retina from Oxidative Damage 2009.

113. RKI. Oxidativer Stress und Möglichkeiten seiner Messung aus umweltmedizinischer Sicht: Mitteilung der Kommission "Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin". Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 2008; 51(12):1464–82. doi: 10.1007/s00103-008-0720-5.

114. Kowluru RA, Koppolu P, Chakrabarti S, Chen S. Diabetes-induced activation of nuclear transcriptional factor in the retina, and its inhibition by antioxidants. Free Radic Res 2003; 37(11):1169–80. doi: 10.1080/10715760310001604189.

115. Florian T. Der Einfluss des RAGE (receptor for advanced glycation end products) auf den subbasalen Nervenplexus der Cornea bei Mäusen mit einem Diabetes mellitus. Dissertation 2020.

116. Vincent AM, Perrone L, Sullivan KA, Backus C, Sastry AM, Lastoskie C et al. Receptor for advanced glycation end products activation injures primary sensory neurons via oxidative stress. Endocrinology 2007; 148(2):548–58. doi: 10.1210/en.2006-0073.

117. Angelika Bierhaus, Stephan Schiekofer, Markus Schwaninger. Diabetes-Associated Sustained Activation of the Transcription Factor Nuclear Factor-kappaB. Diabetes 2001; 2001.

118. T. Soulis, V. Thallas, S.Youssef, R.E. Gilbert, B.G.McWilliam, R.P.Murray-McIntosh, M.E.Cooper. Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury 1997.

119. Gülgün Tezel, Cheng Luo, and Xiangjun Yang. Accelerated Aging in Glaucoma: Immunohistochemical Assessment of Advanced Glycation End Products in the Human Retina and Optic Nerve Head 2007.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstütz haben.

An erster Stelle möchte ich mich beim Medizinischen Institut für Biochemie Rostock bedanken. Insbesondere bei meiner Doktormutter Frau Professor Baltrusch für das anspruchsvolle und interessante Promotionsthema. Ihr großes Engagement, die zeitnahen Antworten und die jederzeitige Hilfestellung auch während den Wochenenden und den Abenden waren ein wesentlicher Bestandteil zur Vollendung der Dissertation.
Des Weiteren möchte ich mich bei dem gesamten Team der Biochemie Rostock bedanken. Mein Dank gilt Frau Annett Kott, die mir in freundlicher Arbeitsatmosphäre eine Einführung in die Labore und dem Tierhaus gab. Auch im weiteren Verlauf durfte ich jederzeit Rückfragen stellen, die für den Erfolg der Experimente entscheiden waren.
Außerdem geht mein herzlicher Dank an Rica Waterstradt, die mit Ihrem Engagement einen wesentlichen Bestandteil zu dieser Dissertation beigetragen hat.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mich jederzeit, geduldig unterstützten.

Diese Gelegenheit möchte ich nutzen meinen Freunden zu danken. Der Austausch war für mich ein sehr wichtiger Bestandteil bei der Anfertigung der Arbeit.

13 Lebenslauf

Name, Vorname:	vom Brocke, Max Paul
Geburtsdatum, -ort:	26.05.1996, Lüdenscheid
Staatsangehörigkeit/Religion:	deutsch/ evangelisch
Familienstand:	ledig
Anschrift:	St. Galler-Ring 59, 4055 Basel (CH)
e-mail/ mobil:	maxpaul96@web.de/ +41 782509099

Bildungsweg:

Juni 2014	Abitur am Geschwister Scholl Gymnasium Lüdenscheid
WS 2014/15 - WS 2020/21	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
September 2016	Erster Abschnitt der Ärztl. Prüfung (Physikum) (Note: gut)
Oktober 2019	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: befriedigend)
November 2020	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut) Gesamtnote der ärztlichen Prüfung: gut
seit 2017	Anfertigung einer Doktorarbeit am Institut für Biochemie bei Prof. Baltrusch

Praktische Tätigkeiten:

18.11.19 - 08.03.20	PJ Tertial Neurologie an der Universitätsmedizin Rostock
09.03. - 28.06.2020	PJ Tertial Innere Medizin als Unterassistent am Gesundheitszentrum Fricktal (Schweiz), Klinik für Innere Medizin
29.06. - 18.10.2020	PJ Tertial Chirurgie am MEDICLIN Krankenhaus Plau am See
Ab 01.02.2021	Arzt in Weiterbildung, Fachbereich Innere Medizin, Gesundheitszentrum Fricktal (Schweiz)

Fortbildungen:

28.05. - 30.05.2021	Erfolgreiche Teilnahme am interdisziplinären Grundkurs Sonographie Abdomen an dem Klinikum Hochrhein
23.09. – 24.09.2021	ACLS Provider des Universitätsspital Basel

Laufenburg, den 15.08.2021 Unterschrift