

De invloed van acute inflammatie en *inflammaging* op het regeneratief potentieel van de zebravisretina

An BECKERS

Promotor: Prof. Dr. L. Moons

Begeleiders: Drs. I. Bollaerts
Drs. J. Van houcke

Proefschrift ingediend tot het
behalen van de graad van
Master of Science in Biochemie en
Biotechnologie

Academiejaar 2014-2015

© Copyright by KU Leuven

Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van zowel de promotor(en) als de auteur(s) is overnemen, kopiëren, gebruiken of realiseren van deze uitgave of gedeelten ervan verboden. Voor aanvragen tot of informatie i.v.m. het overnemen en/of gebruik en/of realisatie van gedeelten uit deze publicatie, wendt u tot de KU Leuven, Faculteit Wetenschappen, Geel Huis, Kasteelpark Arenberg 11 bus 2100, 3001 Leuven (Heverlee), Telefoon +32 16 32 14 01.

Voorafgaande schriftelijke toestemming van de promotor(en) is eveneens vereist voor het aanwenden van de in dit afstudeerwerk beschreven (originele) methoden, producten, schakelingen en programma's voor industrieel of commercieel nut en voor de inzending van deze publicatie ter deelname aan wetenschappelijke prijzen of wedstrijden.

DANKWOORD

‘Je mag nu een vijftal testvissen uit deze bak halen, hier is een netje’, met deze zin gaf Ilse 9 maanden geleden het startschot voor dit thesisavontuur. Zelfs dat bleek al een hele uitdaging, snelle beestjes zijn het! Eens gevangen, kwam het echte werk pas: moeilijke operatietechnieken aanleren met een trillende hand die het nog duidelijk niet gewoon was om minuscule vissenoogjes te opereren. Hoe moeilijk ook de start was, na de eerste dagen wist ik al dat ik dit graag zou doen! Dit zijn nu de laatste woorden die van deze thesis getypt worden, maar misschien wel net de belangrijkste. Dit werk is dan ook niet alleen gerealiseerd, vandaar dat op deze pagina de woordjes ‘dankjewel, merci en bedankt’ centraal zullen staan!

Allereerst zou ik mijn twee begeleidsters, Jessie en Ilse, graag in de bloemetjes willen zetten. De uitspraak ‘zonder jullie hulp zou het nooit gelukt zijn’ is er eentje die zeker van toepassing is! Dankjewel voor al de praktische technieken die jullie mij hebben aangeleerd, de wijze raad bij het schrijven en het nalezen van deze vele pagina’s. Ook wanneer het eventjes niet lukte, maakte jullie ‘het komt wel goed’ een wereld van verschil. De dikste merci verdienen jullie, Ilse en Jessie! Ook mijn promotor, professor Lieve Moons, wil ik heel hard bedanken voor de professionele begeleiding en de kans om in dit onderzoek mee te draaien. Bedankt voor het vertrouwen dat u in mij heeft gesteld.

Daarnaast wil ik ook de andere thesisstudenten Jurgen, Claudia, Julie, Lien, Valerie, Laetitia en Isabelle bedanken. We maakten allemaal dezelfde *ups* en *downs* mee, vonden bij elkaar steun en hebben bovenal samen ook veel plezier gehad! Onze Facebookpagina kreeg dan niet voor niets de toepasselijke naam ‘We zijn ALLEMAAL thesisstudentjes’. Bedankt allemaal! De vrienden van in Leuven, maar vooral de Peerse bende zijn ook heel belangrijk geweest tijdens dit thesisjaar. Uiteraard hebben ze altijd een luisterend oor aangeboden, maar ze hebben vooral voor de nodige ontspanning gezorgd! Ik vind jullie allemaal stuk voor stuk zalige personen en ik wil jullie langs deze weg bedanken om er altijd voor mij te zijn.

Dan Ralph, wat kan ik over jou beter zeggen dan ‘da’s Ralph!’. Bedankt voor de (onnozele) gesprekken de laatste weken, de afleiding en de ontelbare lachbuien! Merci om mijn laatste schrijfweken in te kleuren en met de nodige humor alles te helpen relativeren.

And last but definitely not least, mijn ouders, mijn broers en schoonzussen, en de kleine neefjes! Dankjewel mama en papa om mij de kans te geven om vijf jaar lang te studeren en voor de goede zorgen. Ik weet dat ik altijd bij jullie terecht kan en jullie zijn dan ook de grootste steun voor mij. Het was fijn om telkens na een drukke thesisweek thuis te komen, zeker als al de broers en schoonzussen er ook waren! Ik ben trots dat ik jullie kleine zusje mag zijn! Emiel, Bram en Arthur, jullie zijn nog zo klein, maar misschien zijn jullie net wel degenen die de grootste glimlach op mijn gezicht kunnen toveren. Bedankt voor alles, familie Beckers!

Merci allemaal, een hele dikke merci!

INHOUDSOPGAVE

DANKWOORD	I
INHOUDSOPGAVE	II
AFKORTINGSLIJST	V
SAMENVATTING	VII
SUMMARY	VIII
1 LITERATUURSTUDIE	1
1.1 Beperkte regeneratiecapaciteit in het CZS van adulte zoogdieren	1
1.2 Het visueel systeem als model.....	2
1.2.1 Anatomie van het oog bij zoogdieren	3
1.2.2 De retinofugale projectie.....	6
1.3 Regeneratieve strategieën in het visueel systeem van zoogdieren	7
1.3.1 Neuronale regeneratie in de adulte zoogdierretina.....	7
1.3.2 Neuroprotectie en axonale regeneratie ter hoogte van de adulte zoogdierretina	8
1.4 Vergelijkende studies in de zebravis	11
1.4.1 De zebravis als studiemodel.....	11
1.4.2 Opbouw van het visueel systeem bij de zebravis.....	12
1.4.3 Regeneratie in het visueel systeem van de zebravis	13
1.4.3.1 Neuronale regeneratie in de retina van de zebravis	13
1.4.3.2 Neuroprotectie en axonale regeneratie in de retina van de zebravis	13
1.5 De inflammatiebalans als bouwsteen voor regeneratieve strategieën	15
1.5.1 Inflammatie en regeneratie in zoogdieren.....	16
1.5.2 Inflammatie en regeneratie in zebravissen.....	18
1.6 De invloed van veroudering op het regeneratief potentieel.....	19
1.6.1 De zebravis als model: veroudering en regeneratie	20
1.7 <i>Inflammaging</i>	21
2 DOELSTELLINGEN	22
3 MATERIALEN EN METHODEN	23
3.1 De zebravis, <i>Danio rerio</i>	23
3.1.1 Onderhoud.....	23

3.1.2 Kweek	23
3.1.3 Gebruikte vislijnen	23
3.2 Optische zenuwbeschadiging (<i>optic nerve crush</i>)	24
3.3 Immunohistochemie	25
3.3.1 Transcardiale perfusie en fixatie van het weefsel voor IHC	26
3.3.2 Inbedden van het weefsel en het maken van cryocoupes voor IHC	27
3.3.3 Immunohistochemische kleuringen	27
3.3.4 Microscopie en data-analyse	28
3.4 Immunostimulatie en –suppressie aan de hand van intravitreale injecties	29
3.4.1 Intravitreale injectie	29
3.4.2 Gebruikte injectievloeistoffen voor intravitreale injectie	30
3.4.2.1 Immunostimulatie met zymosan	30
3.4.2.2 Immunosuppressie met dexamethasone	30
3.4.2.3 Immunosuppressie met clodronaat liposomen.....	30
3.4.3 Hematoxyline en eosine kleuring ter controle van de retinale morfologie en het tellen van RGC's	30
3.5 Dissectie van ogen en maken van <i>whole mount</i> retina's	31
3.5.1 Corol1a ⁺ celtellingen op <i>whole mount</i> retina's.....	32
3.6 Detectie van axonale regeneratie via retrograde labeling met biocytine	32
3.6.1 Aanbrengen van biocytine.....	32
3.6.2 Transcardiale perfusie en fixatie van de hersenen	33
3.6.3 Inbedden van het weefsel en maken van vibratoomcoupes	33
3.6.4 Visualisatie van de geregenereerde axonen	33
3.6.4.1 DAB-kleuring	33
3.6.4.2 Tegenkleuring met <i>neutral red</i>	34
3.6.5 Microscopie en data-analyse	34
4 RESULTATEN	36
4.1 Axonale regeneratie na ONC in jonge adulte vs. verouderde vissen	36
4.1.1 De aanwezigheid van GAP-43 in de retina van jonge adulte vs. verouderde vissen	36
4.1.2 De aanwezigheid van GAP-43 in de optische zenuw van jonge adulte vs. verouderde vissen	38
4.2 Karakterisatie van de inflammatoire respons na ONC in jonge adulte vs. verouderde vissen.....	39
4.2.1 <i>Inflammaging</i> in de verouderde zebravis	39
4.2.2 De inflammatoire respons na ONC in jonge adulte vs. verouderde vissen.....	39

4.2.3	Specifieke karakterisatie van de inflammatoire respons na ONC in jonge adulte vissen: gebruik van de transgene lijn Tg (<i>coro1a:eGFP</i>).....	40
4.2.4	Verschil in het aantal gelabelde cellen in de transgene lijn Tg(<i>coro1a:eGFP</i>) en na kleuring met het 4C4-antilichaam.....	41
4.3	Modulatie van de inflammatoire respons in jonge adulte vissen.....	42
4.3.1	Immunostimulatie aan de hand van een intravitreale injectie van zymosan.....	42
4.3.1.1	Effect van een intravitreale injectie van zymosan ter hoogte van de retina en het optisch tectum.....	42
4.3.1.2	Invloed van een intravitreale zymosaninjectie op axonale regeneratie na ONC.....	43
4.3.1.3	Invloed van een intravitreale zymosaninjectie op lange-termijn RGC-overleving	44
4.3.2	Immunosuppressie aan de hand van een intravitreale injectie van dexamethasone.....	45
4.3.2.1	Effect van een intravitreale injectie van dexamethasone ter hoogte van de retina	45
4.3.3	Immunosuppressie aan de hand van een intravitreale injectie van clodronaat liposomen.....	47
4.3.3.1	Effect van een intravitreale injectie van clodronaat liposomen ter hoogte van de retina	47
4.3.3.2	Invloed van een intravitreale injectie van clodronaat liposomen op axonale regeneratie na ONC.....	49
5	DISCUSSIE EN TOEKOMSTPERSPECTIEVEN	52
5.1	Axonale regeneratie vertraagt in de verouderde zebravis	52
5.2	Karakterisatie van het inflammatoir proces in jonge adulte en verouderde vissen	55
5.3	Immunomodulatie in jonge adulte vissen.....	57
5.3.1	Een intravitreale zymosaninjectie versnelt axonale regeneratie	57
5.3.2	Dexamethasone beïnvloedt het aantal en morfologie van <i>coro1a</i> ⁺ cellen.....	59
5.3.3	Clodronaat liposomen beïnvloeden de aanwezigheid en morfologie van <i>coro1a</i> ⁺ cellen	61
5.3.4	Het effect van immunosuppressie na ONC op axonale regeneratie.....	62
5.4	Algemeen besluit	64
6	BRONNEN.....	65
	ADDENDA.....	A1
1.	Risicoanalyse	A1
2.	Samenstelling van de gebruikte oplossingen	A3

AFKORTINGSLIJST

5M	5 maand
24M	24 maand
ABC	avidine/biotine complex
AD	<i>aqua destillata</i>
ADP	adenosinedifosfaat
ALS	amyotrofe laterale sclerose
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATP	adenosinetrifosfaat
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BMP	<i>bone morphogenetic proteins</i>
cAMP	cyclisch adenosine monofosfaat
Cas	CRISPR-associated
CE	ciliair epithelium
CMZ	ciliaire marginale zone
CNTF	ciliaire neurotrofe factor
Coro1a	coronin 1a
CRISPR	<i>clustered regulary interspaced short palindromic repeats</i>
CSPG	chondroitinesulfaat proteoglycanen
Cy3	cyanine-3
CZS	centraal zenuwstelsel
DAB	3,3-diaminobenzidine
DAPI	4'6-diamidino-2-fenylindool
DEX	dexamethasone
Dpi	<i>days post injury</i>
DpIVT	<i>days post intravitreal injection</i>
DsRed	<i>discoma red fluorescent protein</i>
FDA	<i>food and drug administration</i>
FGG-2	fibroblast groeifactor-2
GAP-43	groei-geassocieerd proteïne-43
GCL	ganglioncellaag
GDNF	<i>gliacell-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acid protein</i>
GFP	groen fluorescent proteïne
GR	glucocorticoïde receptor
GRE	glucocorticoïde responsieve elementen
H&E	hematoxyline en eosine
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP70	hitte-schok proteïne 70
IAP	inhibitor van apoptose
IFNγ	interferon- γ
IGF-1	insuline groeifactor-1
IHC	immunohistochemie
INL	<i>inner nuclear layer</i> , binnenste nucleaire laag
IL	interleukine
IPL	<i>inner plexiform layer</i> , binnenste plexiforme laag
JAK	janus kinase
LGN	laterale geniculate nucleus

LIF	leukemie inhiberende factor
LMD	leeftijdsgebonden maculadegeneratie
LTC4	leukotrieen C4
LPS	lipopolysacharide
Lyz	lyzosyme C
MAG	myeline-geassocieerd glycoproteïne
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MQ	milli-q water
NFL	<i>nerve fiber layer</i> , zenuwvezellaag
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NMDA	<i>N-methyl-d-aspartaat</i>
Nogo-A	<i>neurite outgrowth inhibitor-A</i>
OB	olfactorische bulbus
OMgp	oligodendrocyt-myeline glycoproteïne
ONC	<i>optic nerve crush</i>
ONL	<i>outer nuclear layer</i> , buitenste nucleaire laag
OPL	<i>outer plexiform layer</i> , buitenste plexiforme laag
OT	optisch tectum
PAX6	<i>paired box protein 6</i>
PBS	fosfaat gebufferde saline
PFA	paraformaldehyde
PI3K	fosfatidylinositol-4,5-bifosfaat-kinase
PRL	<i>photoreceptor layer</i> , fotoreceptorlaag
PZS	perifeer zenuwstelsel
RGC	retinale ganglioncel
RM	ruggenmerg
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
RPL	retinale pigmentlaag
ROCK	rho/rho kinase
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
Sfpq	<i>splicing factor proline/glutamine rijk</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Socs3	suppressor van cytokine signalering 3
TALEN	<i>transcription activator-like effector</i> nuclease
TBS	tris gebufferde saline
Tel	telencephalon
Tg	transgeen
TNB	Tris-NaCl buffer
TNFα	tumornecrosefactor- α
TRAF	TNF receptor-geassocieerde factor
TrkB	receptor tropomyosine receptor kinase B
Tuba1	α -tubuline 1
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
VEGF	vasculaire endotheliale groeifactor
Vim	vimentine
ZVN	<i>zinc-finger</i> nucleasen

SAMENVATTING

Neurodegeneratie in het centraal zenuwstelsel van volwassen zoogdieren is irreversibel vanwege het gelimiteerd regeneratievermogen. Ondanks intens onderzoek, blijft de inductie van neuronale en axonale regeneratie in volwassen zoogdieren een uitdaging. Regeneratie wordt daarenboven verder onderdrukt door verouderingsprocessen, zoals chronische inflammatie of ‘*inflammaging*’. De zebravis heeft daarentegen een groot regeneratievermogen en ondergaat bovendien dezelfde graduele veroudering, wat het een ideaal onderzoeksmodel maakt om de invloed van verouderingsprocessen, en specifiek *inflammaging*, op axonale regeneratie te bestuderen. In deze studies wordt vaak het retinotectaal systeem gebruikt omwille van de relatief makkelijke manipuleerbaarheid en grote morfologische en moleculaire conservatie binnen de vertebraten.

In deze thesis wordt vooreerst bevestigd dat axonale regeneratie van retinale ganglioncellen (RGC's) inderdaad vertraagt, na beschadiging door het pletten van de oogzenuw (*optic nerve crush*, ONC) in verouderde zebravissen. Verouderde vissen vertonen immers een vertraagd expressiepatroon van het groei-geassocieerd proteïne GAP-43 in de retina en de RGC-axonen blijken een kleinere afstand overbrugd te hebben vier dagen na ONC in vergelijking met jonge adulten. Daarnaast tonen de resultaten aan dat in naïeve verouderde vissen een hoger aantal microglia/macrofagen aanwezig is en dat na ONC meer van deze cellen infiltreren en/of prolifereren, in vergelijking met jonge adulte vissen. De wijziging in inflammatoire balans kan een belangrijke impact uitoefenen op het regeneratieproces. In toekomstige studies zal dit verder onderzocht worden.

Tenslotte wordt de invloed van acute inflammatie op axonale regeneratie in detail onderzocht in jonge adulte vissen. Immunostimulatie aan de hand van een intravitreale injectie van zymosan veroorzaakt een infiltratie van microglia/macrofagen en neutrofielen in de retina, en versnelt bovendien axonale regeneratie na ONC. Na immunosuppressie, bekomen via een intravitreale injectie van dexamethasone of clodronaat liposomen, wordt daarentegen duidelijk vastgesteld dat microglia/macrofagen naar de vitreus toe bewegen en een amoëboïde vorm aannemen. In dit werk kan tot nu toe echter geen invloed van immunosuppressie op axonale regeneratie aangetoond worden, waarschijnlijk doordat de infiltratie van microglia/macrofagen tijdens het regeneratieproces nog niet voldoende onderdrukt wordt. In de INL infiltreren immers nieuwe microglia/macrofagen na ONC en immunosuppressie, dewelke het axonaal regeneratieproces zouden kunnen stimuleren, gelijkaardig aan wat gebeurt in onbehandelde vissen na ONC. In toekomstige experimenten, waarbij de inductie van immunosuppressie relatief ten op zichte van de ONC gewijzigd zal worden, zal het effect van deze immunosuppressie op de regeneratieve capaciteit verder uitgeklaard worden.

SUMMARY

Due to a limited regenerative capacity, neurodegeneration is irreversible in the mammalian central nervous system. Despite intensive research efforts, induction of a regenerative response remains challenging in adult mammals. Moreover, regeneration is further inhibited by aging processes, e.g. by chronic inflammation or ‘inflammaging’. In contrast to mammals, zebrafish have a robust regenerative potential. It was recently shown that they are also subjected to gradual aging, which makes them an ideal model to study the influence of aging processes, such as inflammaging, on the regenerative potential. The retinotectal system is often used in regenerative studies because of its easy accessibility and the good morphological and molecular conservation between vertebrates.

Within this thesis, a delayed axonal regeneration in aged zebrafish retina is confirmed after injury induced by optic nerve crush (ONC). Aged zebrafish show a delayed expression pattern of the growth-associated protein GAP-43 within the retina and their RGC-axons have grown less far at four days after ONC, in comparison with young adult fish. Additional studies show that in aged, naive zebrafish the number of microglia/macrophages is higher and more of these cells seem to infiltrate and/or proliferate after ONC, in comparison with young adult fish. The altered inflammatory balance could have an important impact on regeneration. Future experiments will help to clarify this.

Furthermore, the influence of acute inflammation on axonal regeneration is examined in detail in young adults. Immunostimulation via intravitreal injection of zymosan induces an infiltration of microglia/macrophages in the retina, and accelerates axonal regeneration after ONC. After immunosuppression, via intravitreal injection of either dexamethasone or clodronate liposomes, microglia/macrophages migrate towards the vitreous and become amoeboid. However, no influence of immunosuppression on axonal regeneration is observed, probably because the infiltration of microglia/macrophages during the regeneration process could not yet be suppressed sufficiently. In fact, new microglia/macrophages seem to infiltrate the INL of the retina, which can stimulate the regeneration process, similar to what happens in untreated fish after ONC. By changing the timing between the moment of immunosuppression relative to ONC injury, the effect of immunosuppression on the regenerative capacity will be further clarified.

1 Literatuurstudie

1.1 Beperkte regeneratiecapaciteit in het CZS van adulte zoogdieren

Wereldwijd lijden ongeveer 37 miljoen mensen aan een neurodegeneratieve ziekte zoals de ziektes van Parkinson en Alzheimer, amyotrofe laterale sclerose (ALS) en glaucoom. Dergelijke chronische aandoeningen worden gekenmerkt door een progressief verlies van de structuur en functionaliteit van neuronen in specifieke gebieden van het perifeer (PZS) en/of centraal zenuwstelsel (CZS) (Zhou *et al.* (2013)). Enig functioneel herstel na een dergelijke neurodegeneratieve ziekte of schade aan het CZS, enerzijds via neuronale regeneratie, - de aanmaak van nieuwe neuronen door proliferatie en differentiatie van progenitor- of stamcellen -, en/of anderzijds via axonale regeneratie, - het specifiek terug elongeren van de zenuwuitlopers na schade aan de axonen -, wordt in het CZS door verschillende factoren verhinderd. In de eerste plaats verlaagt de intrinsieke regeneratiecapaciteit gedurende de ontwikkeling van zoogdieren en in de tweede plaats onderdrukken extrinsieke factoren neuroregeneratie sterk (Murray *et al.* (2009); Spencer en Filbin (2004)).

Inderdaad, in vergelijking met zoogdieren tijdens de ontwikkeling ontstaan in volwassen zoogdieren veranderingen in de aanwezigheid van neurogene progenitorcellen en de productie van bepaalde proteïnen, met een verlaging van het regeneratief potentieel als gevolg.

Zo verlaagt het vermogen om neuronen aan te maken via het proces van neurogenese. Radiale glia delen als neurogene progenitorcellen asymmetrisch tijdens de ontwikkeling tot verschillende types neuronen en gliacellen. Uiteindelijk migreren deze progenitorcellen echter van de ventriculaire zone van de ontwikkelende cortex naar de corticale plaat, waar ze transformeren tot astrocyten. Op deze manier verdwijnen veel van deze progenitorcellen, zodat adulte zoogdieren slechts een zeer laag potentieel tot *de novo* neurogenese bezitten. Slechts twee neurogene zones blijven bestaan in het adulte CZS, namelijk de subventriculaire zone in het telencephalon en de subgranulaire zone van de hippocampus. Beiden vertonen een beperkte proliferatierespons na letsel. De capaciteit tot differentiatie en vervolgens integratie van nieuwe neuronen in het functioneel netwerk is dus bijna volledig afwezig in het CZS van adulte zoogdieren (Engelhardt *et al.* (2005); Fleisch *et al.* (2011); Kriegstein en Alvarez-Buylla (2009)).

Naast intrinsieke neuronale regeneratie, verlaagt ook de mogelijkheid tot axonale regeneratie gedurende de ontwikkeling van zoogdieren. Het groei-geassocieerd proteïne-43 (GAP-43) wordt immers in een hoge concentratie geproduceerd in de groeiconus van axonen tijdens de ontwikkeling. GAP-43 productie verlaagt echter postnataal, wat een verminderd potentieel tot heruitgroei van axonen na schade met zich meebrengt (Kettenmann en Ransom (2005); Zhang *et al.* (2000)). Daarnaast kent ook de concentratie van neuronaal cyclisch adenosine monofosfaat (cAMP) een drastische daling gedurende de ontwikkeling van zoogdieren. In tegenstelling tot de attractieve eigenschappen van myeline-geassocieerde componenten in de

aanwezigheid van hoge cAMP-niveaus, zorgt een daling van cAMP voor de repulsie van de groeiconus en het onderdrukken van axonenelongatie na letsel (Cai *et al.* (2001); Murray *et al.* (2009); Spencer en Filbin (2004)).

Naast het laag intrinsiek regeneratiepotentieel onderdrukken ook extrinsieke factoren, zoals inhibitorische componenten, neuroregeneratie sterk. Deze inhibitorische componenten zijn enerzijds afkomstig van de beschadigde myelineselementen zoals myeline-geassocieerd glycoproteïne (MAG), *neurite outgrowth inhibitor-A* (Nogo-A) en oligodendrocyt-myeline glycoproteïne (OMgp), die ervoor zorgen dat de groeikegel van axonen instort. Anderzijds zijn ze afkomstig van het gliaal litteken gevormd na beschadiging van het CZS. Dit gliaal litteken bestaat uit reactieve astrocyten en microglia, die ter hoogte van de neuronale schade een fysieke barrière voor axonale regeneratie vormen. Het gliaal litteken bevat naast deze cellen ook moleculen van de extracellulaire matrix, zoals chondroïtinesulfaat proteoglycanen (CSPG's) gesecreteerd door astrocyten, die eveneens axonale regeneratie inhiberen (Huang *et al.* (2014); Riger *et al.* (2010)).

In tegenstelling tot axonen van het adulte CZS, kunnen de axonen van het perifeer zenuwstelsel wel spontaan regenereren. Dit is in belangrijke mate te wijten aan de aanwezigheid van Schwanncellen en een hoger aantal inflammatoire cellen zoals macrofagen. Na neuronale schade dedifferentiëren de Schwanncellen immers naar progenitorachtige cellen die axonale regeneratie bevorderen. Samen met macrofagen, verteren ze de myelineschede en vormen ze zuilvormige structuren waar axonen doorheen regenereren. Na succesvolle axonregeneratie vormen ze tenslotte terug een myelineschede rond de geregenereerde axonen (Gordon *et al.* (2003); Huebner en Strittmatter (2009); Napoli *et al.* (2011)).

Ondanks de gelimiteerde capaciteit voor axonale en neuronale regeneratie in het CZS, impliceert het hoog regeneratief potentieel in ontwikkelende zoogdieren, evenals in het adulte PZS, echter dat ook in het CZS van volwassen zoogdieren er potentieel is tot succesvolle neuroregeneratie, en dat dit mogelijk geïnduceerd kan worden met effectieve therapeutische behandelingen (Aharoni en Arnan (2009); Bjarkam (2001); 't Hart (2014)).

1.2 Het visueel systeem als model

Een veelgebruikt en krachtig model om neurodegeneratie en regeneratieve processen in het CZS te onderzoeken, is het visueel systeem. De retina kan immers gezien worden als een onderdeel van het CZS en vertoont vele gelijkenissen met de hersenen en het ruggenmerg met betrekking tot anatomie, functionaliteit en immunologische responsen. Bovendien degenereren bij oculaire neurodegeneratieve ziekten voornamelijk neuronen in het oog, zoals bij glaucoom en leeftijdsgebonden maculadegeneratie (LMD), volgens mechanismen en processen die ook bij neurodegeneratieve ziekten worden waargenomen. Daarnaast tasten neurodegeneratieve ziekten ook de zenuwen in het oog aan, waarbij deze gevolgen zich

regelmatig eerst ter hoogte van het oog manifesteren, alvorens de hersenen aan te tasten (Berisha *et al.* (2007); London *et al.* (2013)).

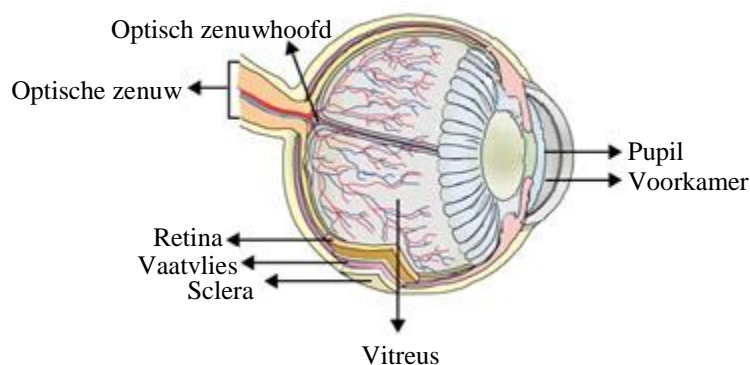
Ook praktisch gezien is het visueel systeem een goed onderzoeksmodel voor het bestuderen van neurodegeneratie en de inductie van regeneratie in het CZS. Het is immers relatief toegankelijk in vergelijking met de hersenen en toediening van componenten kan gemakkelijk gebeuren via intraoculaire injecties. Daarnaast maakt de unieke, gelaagde organisatie van het oog het mogelijk om de verschillende interacties tussen de neuronen en andere celtypes te onderscheiden. Een laatste voordeel is dat maar één neuronaal celtype vanuit het oog informatie projecteert naar de hersenen (London *et al.* (2013)).

Al deze eigenschappen maken dat veel van onze huidige kennis over neurodegeneratieve processen en axonale en neuronale regeneratie, afkomstig is uit experimenten uitgevoerd in het visueel systeem (London *et al.* (2013)).

1.2.1 Anatomie van het oog bij zoogdieren

Het zicht vormt bij vertebraten één van de belangrijkste zintuigen, waarmee ze mogelijke prooien, predatoren en partners kunnen waarnemen. Binnen het phylum van de vertebraten is de anatomie, histologie en biochemie van het visueel systeem goed geconserveerd (Fadool en Dowling (2008)).

Na breking van het licht door de cornea en de lens, valt het licht in op de enige lichtgevoelige laag van het oog, namelijk de retina of het netvlies (figuur 1). Vervolgens absorbeert deze binnenste laag van het oog de lichtstralen en volgt een chemische en elektrische cascade waarbij actiepotentialen uiteindelijk de hersenen bereiken en een beeld wordt gevormd. De retina staat dus rechtstreeks in verbinding met de hersenen. Doorheen de retina kunnen verschillende celtypes onderscheiden worden, die georganiseerd zijn in een duidelijk gelaagde structuur. Vooreerst wordt de retina van buiten naar binnen opgedeeld in de pigmentlaag en de neuronale laag. De neuronale laag bestaat op zijn beurt uit twee synaptische lagen en drie cellagen (figuur 2) (Bear *et al.* (2007); Purves *et al.* (2010)).



Figuur 1: De anatomie van het oog bij zoogdieren (aangepast overgenomen uit Goel *et al.* (2013)).

De **buitenste nucleaire laag** (*outer nuclear layer*; ONL) bevat de cellichamen van de staaf- en kegelvecellen, de enige lichtgevoelige cellen van het oog, waarvan de buitenste segmenten in de fotoreceptorlaag (*photoreceptor layer*, PRL) liggen (figuur 2). Licht dringt dus eerst door de andere lagen van de retina, alvorens geabsorbeerd te worden door middel van lichtgevoelige pigmenten zoals rodopsine in de fotoreceptoren (Purves *et al.* (2010)).

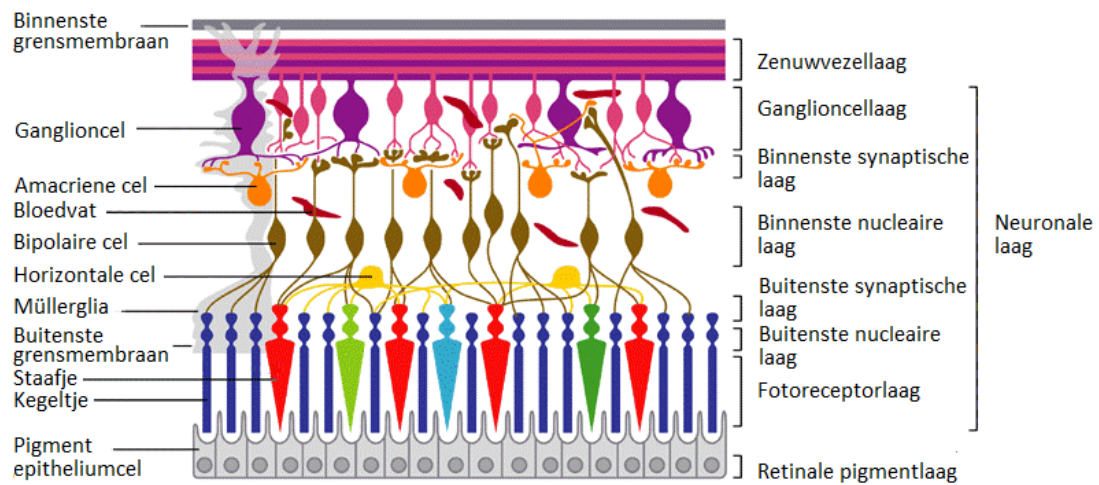
In de **buitenste synaptische laag** (*outer plexiform layer*; OPL) maken de fotoreceptoren contact met de bipolaire cellen (figuur 2), gelegen in de **binnenste nucleaire laag** (*inner nuclear layer*; INL). De bipolaire cellen vormen op hun beurt synapsen met de retinale ganglioncellen (RGC's) ter hoogte van de **binnenste synaptische laag** (*inner plexiform layer*; IPL) (figuur 2). De RGC's, gelegen in de **ganglioncellaag** (GCL), zijn de enige retinale cellen die informatie projecteren naar de hersenen. De axonen van deze cellen, gebundeld in de zenuwvezellaag (*nerve fiber layer*; NFL), verlaten samen het oog ter hoogte van het optisch zenuwhoofd en vormen dan de optische zenuw. Ter hoogte van het optisch zenuwhoofd liggen geen fotoreceptoren. Bijgevolg zal het licht dat hierop gefocust wordt niet omgezet worden naar elektrische impulsen. Dit punt wordt daarom ook de blinde vlek genoemd (Kamel en Barnette (2014); Purves *et al.* (2010)).

De directe communicatie tussen fotoreceptoren, bipolaire cellen en RGC's kan worden beïnvloed door twee types internneuronen, namelijk de horizontale en amacriene cellen (figuur 2). De uitlopers van de horizontale cellen, zelf gelegen in de binnenste nucleaire laag, bevinden zich in de buitenste synaptische laag en helpen de informatie van meerdere fotoreceptoren te integreren. Met behulp van hun lateraal gerichte neurieten beïnvloeden ze bipolaire cellen en fotoreceptoren, door negatieve *feedback* te bezorgen. Daarbij worden onbelichte fotoreceptoren, die onder invloed van naburige belichte fotoreceptoren toch geëxciteerd kunnen worden, geïnhibeerd zodat er een beter ruimtelijk contrast ontstaat (Fahrenholt *et al.* (2005); Jackman *et al.* (2011)).

In de binnenste synaptische laag bevinden zich de uitlopers van de amacriene cellen, die informatie ontvangen van de bipolaire cellen. Zelf beïnvloeden ze RGC's, bipolaire cellen en andere amacriene cellen. De precieze functie van de amacriene cellen is niet gekend, maar algemeen wordt aangenomen dat zij een inhiberende werking hebben op de RGC's. Ze zouden de excitatie van de RGC's door de bipolaire cellen teniet doen zodat RGC's enkel tijdelijk kunnen reageren (Abbot *et al.* (2012); Bear *et al.* (2007); Liu *et al.* (2013)).

De **retinale pigmentlaag** (RPL) heeft in tegenstelling tot de neuronale laag slechts een dikte van één cel en bestaat uit niet-neuronale, balkvormige, gepigmenteerde epitheelcellen (figuur 2). Deze multifunctionele pigmentlaag maakt deel uit van de bloed-retina barrière tussen het vaatvlies en de retina (Seagle *et al.* (2005); Simo *et al.* (2010)). Bovendien beschermt de pigmentlaag de retina tegen reactieve zuurstofverbindingen (*reactive oxygen species*, ROS) met behulp van enzymen zoals catalasen en superoxide dismutasen, en

antioxidanten zoals carotenoïden. Ze voorziet tevens de retina en vooral de fotoreceptoren van diverse groei- en overlevingsfactoren (Bear *et al.* (2007); Martinez *et al.* (2004); Simo *et al.* (2010)).



Figuur 2: De verschillende cellagen en celtypes in de retina van zoogdieren (aangepast overgenomen uit Wilkinson-Berka (2004)).

Naast neuronen bevat de retina ook nog drie types gliacellen die samen de retinale neuronen ondersteunen: Müllerglia en astrocyten, die samen de macroglia vormen, en microglia.

Müllerglia overspannen de neuronale retina. Hun cellichaam bevindt zich in de INL en lange vertakte uitlopers lopen in beide richtingen, tot aan de binnenste en buitenste grensmembranen. Het binnenste grensmembraan definieert de grens tussen de retina en het glasachtig lichaam. Het buitenste membraan is gelokaliseerd, daar waar de uitlopers van de Müllerglia aan elkaar en aan de binnenste segmenten van de fotoreceptoren zijn verbonden (figuur 2). Laterale vertakkingen vanuit deze uitlopers zorgen ervoor dat de Müllerglia in nauw contact staan met de synapsen in de plexiforme lagen en de cellichamen in de neuronale lagen. Bijgevolg hebben Müllerglia een ideale ruimtelijke oriëntatie om de viabiliteit en gezondheid van de retinale cellen te verzekeren. De Müllerglia zorgen onder andere voor het transporteren van nutriënten, afvalstoffen en water tussen de bloedvaten en de retinale neuronen, het recyclen van gebruikte neurotransmitters en het voorzien van neuronen van de precursoren voor deze signaalmoleculen (Lindqvist *et al.* (2010); Reichenbach en Bringmann (2013)).

Een tweede type gliacellen zijn **astrocyten**, die zich bevinden in de GCL en in de retinale zenuwvezellaag, waar de axonen van de RGC's samenkomen. Deze multifunctionele cellen voorzien neuronen van nutriënten, houden de bloed-retina barrière in stand en secreteren groeifactoren (Dharmarajan *et al.* (2014); Shin *et al.* (2014)).

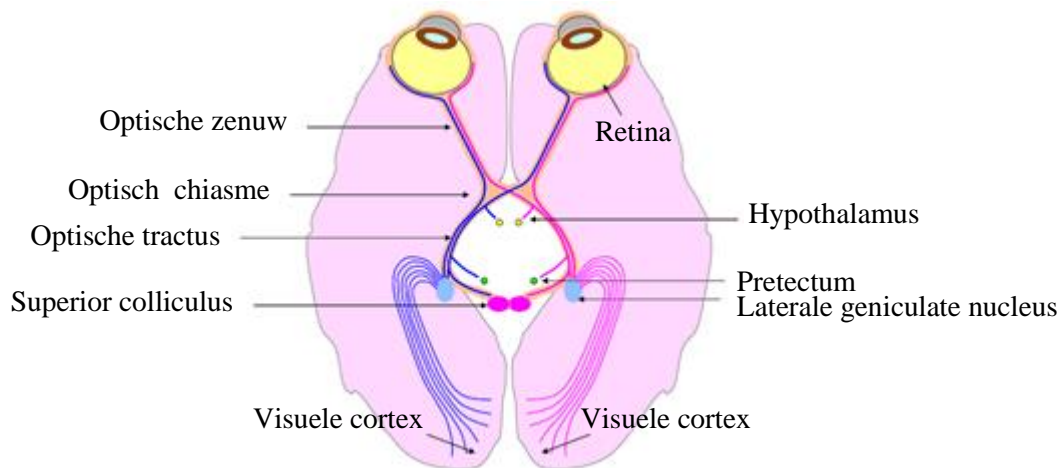
Tenslotte zijn in de retina ook **microglia** aanwezig, de residentie immuuncellen in het CZS. Naargelang de status van de retinale omgeving verschilt hun locatie en vorm. Bij afwezigheid van alarmerende signalen zijn deze cellen vertakt en scannen ze de omgeving met behulp van

zeer mobiele uitlopers waarop zich receptoren voor onder andere cytokines, antilichamen en adhesiemoleculen bevinden. Wanneer ze signalen van onder andere infectie en neuronale schade waarnemen, worden de microglia geactiveerd, waarna ze een vergrote amoëboïde vorm aannemen en zich verplaatsen naar de bedreigde locatie. Eenmaal daar aangekomen, regelen ze de immuunrespons door andere immuuncellen aan te trekken en ruimen ze via fagocytose de extracellulaire debris op, die afkomstig is van bijvoorbeeld stervende neuronen (Dartt, *et al.* (2011); Nakazawa *et al.* (2014); Ryan (2013)).

1.2.2 De retinofugale projectie

De retinofugale projectie, waarmee de projectie bedoeld wordt van de RGC-axonen vanuit het oog naar de hersenen, start ter hoogte van het optisch zenuwhoofd waar deze axonen de optische zenuw vormen. De optische zenuwen vanuit beide ogen combineren in het optisch chiasme, een x-vormige structuur die gelegen is aan de ventrale kant van de hypothalamus (figuur 3). De axonen van beide nasale retina's (de retinahelften aan de kant van de neus) zullen ter hoogte van het chiasme kruisen, terwijl de axonen van beide temporale retina's (de retinahelften aan de kant van de slaap) dit niet zullen doen. Zo komen zowel ipsilaterale (naar dezelfde kant) als contralaterale (naar de andere kant) projecties naar de hersenen tot stand (Bear *et al.* (2007); Prasad en Galetta (2011); Purves *et al.* (2010)).

Na het optisch chiasme worden de twee optische tracta gevormd, ter hoogte van de tussenhersenen of het diencephalon, vanwaar verschillende delen van de hersenen worden geïnnerveerd (figuur 3). Allereerst maken de RGC-axonen synaptische contacten ter hoogte van de **nucleus suprachiasmaticus** van de hypothalamus, belangrijk voor het regelen van het circadiaans ritme (Wolters en Groenewegen (2004)). Daarnaast projecteren de RGC-axonen ook naar het **pretectum**, gelegen tussen de thalamus en de middenhersenen. Hier worden onder andere de grootte van de pupil, snelle oogbewegingen en het knipperen van het oog bij fel licht geregeld (Gamlin (2006)). Verder ontstaat ook RGC-innervatie van de **superior colliculus**, een deel van de middenhersenen, essentieel voor snelle oog- en hoofdbewegingen als reactie op bewegende, nieuwe of onverwachte visuele stimuli (Bear *et al.* (2007)). Bij primaten innerveren de RGC-axonen echter voornamelijk de **laterale geniculate nucleus** (LGN), gelegen in de dorsale thalamus. Uiteindelijk zullen de axonen van deze LGN-neuronen synapsen vormen in de **visuele cortex**, een deel van de occipitaalkwab van de grote hersenen waar visuele signalen geïntegreerd worden tot een beeld van de werkelijkheid (Prasad en Galetta (2011); Purves *et al.* (2010)).



Figuur 3: Overzicht van de verschillende hersendelen die geïnnerveerd worden in zoogdieren door de axonen van de retinale ganglioncellen (aangepast overgenomen uit Liu *et al.* (2011)).

1.3 Regeneratieve strategieën in het visueel systeem van zoogdieren

Zoals reeds aangehaald, vormt het visueel systeem een relatief toegankelijk, goed gekarakteriseerd en dus waardevol model om neuroregeneratieve strategieën in uit te werken. Intensief onderzoek naar de onderliggende moleculaire mechanismen van neuroregeneratie focust zich dan ook ter hoogte van het oog en specifiek van de retina. Hierbij wordt visueel herstel na oogschade enerzijds beoogd via de inductie van neuronale regeneratie via endogeen of exogeen toegediende stamcellen, anderzijds wordt getracht neuroprotectie van RGC-cellen en verdere axonale regeneratie te stimuleren, na optreden van schade aan de optische zenuw (Enciu *et al.* (2011); Selzer (2003)).

1.3.1 Neuronale regeneratie in de adulte zoogdierretina

Verschillende celtypen aanwezig in de adulte zoogdierretina zijn in staat om, hetzij *in vivo*, hetzij *in vitro* culturen, karakteristieken van neuronale stam- of progenitorcellen te vertonen. Vaak treedt echter slechts een beperkte proliferatie- en/of differentiatierespons op zodat volwassen zoogdieren beschadigde neuronen, waarvan het cellichaam reeds afgestorven is, niet spontaan kunnen vervangen door nieuwe neuronen. Bijgevolg is stimulatie van *de novo* neurogenese via endogene of exogene stam- of progenitorcellen nodig om neuronale regeneratie te bewerkstelligen (Engelhardt *et al.* (2005); Fleisch *et al.* (2011)).

Zo kunnen **Müllerglia** in cultuur na neuronale schade de progenitormerker *paired box protein 6* (Pax6) tot expressie brengen. Na geïnduceerde fotoreceptordegeneratie bij ratten prolifereren deze cellen in cultuur en zijn ze in staat vier tot zes weken te overleven (Karl en Reh (2010); Taupin (2006)). Bovendien vertoont een subpopulatie van Müllerglia ook *in vivo* mitotische activiteit, na *N*-methyl-d-aspartaat (NMDA) intraoculaire injectie bij ratten. Sommige van de gevormde dochtercellen dragen daarenboven specifieke markkers voor bipolaire cellen of staafreceptoren. Markkers voor ganglion-, amacriene of horizontale cellen

worden tot op heden echter niet teruggevonden. Müllerglia vertonen dus zowel *in vitro* als *in vivo*, progenitoreigenschappen na retinale schade (Karl en Reh (2010); Ooto *et al.* (2004); Taupin (2006)).

Daarnaast kunnen ook cellen van de **retinale pigmentlaag** en de gepigmenteerde cellen van het **ciliair epithelium** (CE) *in vitro* prolifereren en differentiëren naar verschillende retinale neuronen en gliacellen, zoals aangetoond bij muizen (Engelhardt *et al.* (2005); (Macneil *et al.* (2007); Taupin (2006)). Beide celtypes brengen daarbij de merker nestine tot expressie, die aanwezig is op ongedifferentieerde progenitor- en stamcellen. Het *in vitro* proliferatie- en differentiatiepotentieel van de cellen van het CE is ook reeds bij andere zoogdieren geïdentificeerd, waaronder de mens (Tropepe *et al.* (2000)). In het ciliair lichaam is nog een tweede populatie cellen aanwezig, namelijk de **cellen van de pars plana**, die net zoals de **cellen van de iris** in aanwezigheid van fibroblast groeifactor-2 (FGF-2) mitotische activiteit vertonen *in vitro* en bovendien neuronale en gliale celtypes kunnen vormen (Engelhardt *et al.* (2005); Macneil *et al.* (2007); Taupin (2006); Tropepe *et al.* (2000)).

De aanwezigheid van diverse neuronale celpopulaties die *in vitro* kunnen prolifereren en differentiëren, suggereert de mogelijkheid tot de inductie van regeneratieve strategieën via de retinale stam- of progenitorcellen in adulte zoogdieren. De beperkte capaciteit tot proliferatie, differentiatie en integratie *in vivo*, mogelijk door het gebrek aan proliferatie-stimulerende factoren en/of de aanwezigheid van inhiberende componenten, duidt echter op de nood aan therapeutische additieven. Gedegenererde celpopulaties zouden bijvoorbeeld vervangen kunnen worden met behulp van een geschikte donor- of autologe celtransplantatie of bepaalde drugs zouden progenitor- of stamceldifferentiatie naar het gewenste celtype kunnen promoten (Macneil *et al.* (2007)).

1.3.2 Neuroprotectie en axonale regeneratie ter hoogte van de adulte zoogdierretina

De invloed van pathologische processen zoals excitotoxiciteit, oxidatieve stress, ischemie en de accumulatie van proteïneaggregaten is veelal eerst te bemerken ter hoogte van de axonen, die vaak primair worden aangetast en waarop later neuronale celdood volgt. Het reduceren van neuronaal verlies en het afremmen van neurodegeneratieve processen vereist daarom vooreerst de inductie van neuroprotectie, namelijk het relatief behouden van de structuur, functie en viabiliteit van neuronen na schade, vervolgens ook de heruitgroei van beschadigde axonen en tenslotte de reïnnervatie van hun doelstructuren. Verschillende innovatieve methoden worden momenteel onderzocht om neuronale protectie en axonale regeneratie te bewerkstelligen in de retina, zoals het toedienen van neurotrofe factoren, het tegengaan van de inhiberende omgeving en het induceren van inflammatie (Casson *et al.* (2012); Jain (2011); Ryan *et al.* (2013)).

Neurotrofe factoren

Vaak speelt een verminderde aanvoer van neurotrofe factoren een centrale rol in de pathologie van neurodegeneratieve ziekten waardoor toediening van deze polypeptiden zowel neuronale overleving als axonale heruitgroei stimuleert (Semkova en Krieglstein (1999); Tuszynski *et al.* 2004)). Neurotrofe factoren voorzien immers vele neuronpopulaties van de nodige trofische steun tijdens de ontwikkeling en de volledige levensduur (Semkova en Krieglstein (1999)).

De meeste neurotrofe factoren kunnen ondergebracht worden in drie families: de neurotrofines, de familie van de gliacel-afkomstige neurotrofe factoren en de neuropoietische cytokines. Ze worden onder andere gesecreteerd door immuuncellen, gliacellen, neuronale stamcellen en neuronen zelf (Semkova en Krieglstein (1999); Tuszynski *et al.* (2004)).

Onder hen zijn de ciliaire neurotrofe factor (CNTF) en *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) twee van de meest bestudeerde neurotrofe factoren in verschillende modellen van retinale degeneratie, waarbij kan aangetoond worden dat ze retinale neuroprotectie kunnen bieden door apoptotische celdood in de retina te inhiberen (Yorio *et al.* (2011)). Zo beschermt CNTF bijvoorbeeld specifiek tegen fotoreceptordegeneratie in de ziektegroep Retinitis pigmentosa, waardoor de ontwikkeling als drug is goedgekeurd door de U.S *Food and Drug Administration* (FDA). De CNTF-receptoren bevinden zich hierbij op gliacellen en retinale pigmentcellen, maar niet op fotoreceptoren zelf, wat suggereert dat CNTF zijn effect indirect uitoefent, mogelijk via het promoten van de vrijlating van neuroprotectieve cytokines zoals de leukemie inhiberende factor (LIF) door Müllerglia (Boyd en Gordon (2003); Rhee *et al.* (2013); Yorio *et al.* (2011)). CNTF is niettemin ook in staat, zowel *in vitro* als *in vivo* axonale regeneratie van RGC's na optische zenuwschade te stimuleren (Hu *et al.* (2005); Newbern *et al.* (2009)). Ook BDNF verbetert de overleving van RGC's in cultuur en *in vivo* modellen van RGC-schade. In het visueel systeem van onder andere ratten en katten verhoogt intraoculaire injectie van BDNF immers de overleving van RGC's na axotomie, het doorknippen van de optische zenuw, zeer sterk. Dit beschermende effect van exogeen BDNF is echter enkel tijdelijk en RGC-sterfte vertraagt, maar wordt niet verhinderd. Dit komt door de internalisatie van de BDNF receptor tropomyosine receptor kinase B (TrkB) en door de verlaging van de expressie van deze receptor na axotomie (Tombran *et al.* (2008); Yorio *et al.* (2011)).

Andere groeifactoren die RGC-overleving *in vitro* en *in vivo* stimuleren zijn *gliacell-derived neurotrophic factor* (GDNF), vasculaire endotheliale groeifactor (VEGF) en *bone morphogenetic proteins* (BMP's) (Tombran *et al.* (2008); Yorio *et al.* (2011)). De signaalwegen die deze groeifactoren beïnvloeden zijn complex en bestaan onder andere uit de *mitogen activated protein kinase* (MAPK), fosfatidylinositol-4,5-bifosfaat-kinase (PI3K) en de Janus kinase/*Signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT) signaalwegen, dewelke allemaal een rol spelen bij cellulaire overleving (Yorio *et al.* (2011)).

Tenslotte verbetert ook het toedienen van cAMP-analogen axonale regeneratie na optische zenuwbeschadiging in muizen en ratten. cAMP zou daarbij axonale regeneratie bevorderen door enerzijds receptoren voor groeifactoren naar het celoppervlakte te verplaatsen en anderzijds door de inhiberende werking van myeline-geassocieerde componenten teniet te doen (Benowitz en Yin (2010); Monsul *et al.* (2004)).

Tegengaan van de inhiberende omgeving

Naast het intrinsiek promoten van neuroprotectie en de heruitgroei van beschadigde axonen, kan ook de inhiberende werking van de extracellulaire omgeving worden tegengegaan door de hoeveelheid inhibitorische proteïnen te reduceren of de intracellulaire signaaltransductie die deze moleculen beïnvloeden, te inhiberen (Fischer *et al.* (2004); Kastin en Pan (2005)).

Zo kan de vorming of inhiberende werking van het gliaal litteken verhinderd worden via inhibitie van de Rho/Rho kinase (ROCK) signaalweg, normaal geactiveerd door de inhiberende CSPG's van het gliaal litteken. Dit zorgt in de rat voor een stijging van geregenereerde RGC-axonen na RGC-schade (Lingor *et al.* (2007)). Als bijkomende regeneratieve strategie kunnen ook de receptoren van inhiberende myeline-geassocieerde componenten tegengewerkt worden. In ratten zal het inhiberen van de Nogo-receptor, - de receptor voor Nogo-A, OMgp en MAG,- zorgen voor een groter percentage regenererende RGC's, na schade aan de RGC-axonen. Dit effect ontstaat echter enkel wanneer de RGC's eerst een axonale regeneratie-stimulerende behandeling ondergaan door het induceren van een gecontroleerde inflammatie (Fischer *et al.* (2004); Kastin en Pan (2005)).

Induceren van inflammatie

Steeds vaker wordt duidelijk dat inflammatie-inducerende behandelingen, al dan niet in combinatie met andere therapeutische strategieën, een verhoogde axonale regeneratie na RGC-schade kunnen bewerkstelligen. Zo veroorzaken de intraoculaire injectie van zymosan, een onoplosbare polysacharide celwandcomponent van *Saccharomyces cerevisiae*, of het toebrengen van schade aan de lens, in muizen en ratten een infiltratie van neutrofielen en macrofagen in het oog. Zowel zymosaninjectie als lensschade verhogen hierbij axonale regeneratie na RGC-axotomie (Leon *et al.* (2000); Nakazawa *et al.* (2014); Yin *et al.* (2003)). Oncomoduline, een Ca²⁺-bindend eiwit dat geproduceerd wordt door de geïnfiltreerde neutrofielen en macrofagen, is geïdentificeerd als een zeer belangrijke regeneratie-stimulerende component. Het bindt in aanwezigheid van cAMP aan receptoren op de RGC's waardoor de MAPK-signaalweg geactiveerd wordt met een verhoogde axonale regeneratie als gevolg (Benowitz en Yin (2010); Kurimoto *et al.* (2010); Yin *et al.* (2006)). Algemeen wordt dan ook aanvaard dat inflammatie een zeer belangrijke rol speelt in regeneratie, wat uitgebreid aan bod zal komen in paragraaf 1.5.

1.4 Vergelijkende studies in de zebravis

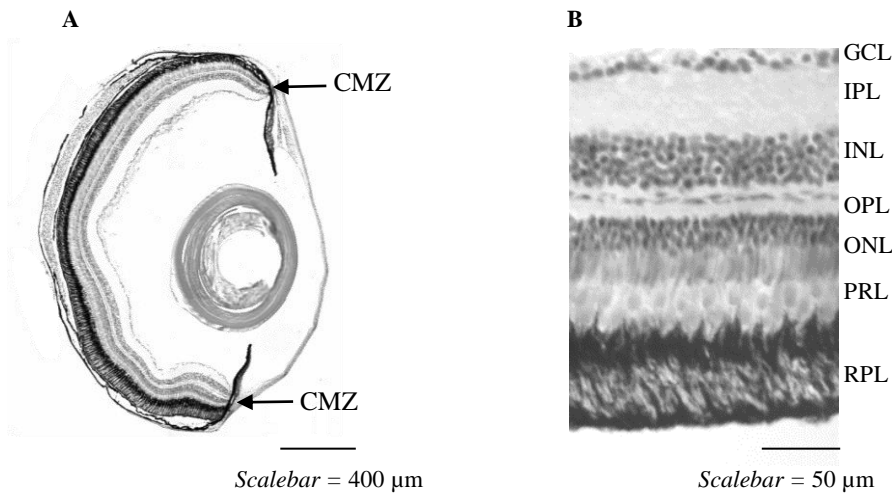
Spontane regeneratie treedt zo goed als niet op in het CZS van adulte zoogdieren. Daarentegen beschikken teleosten en amfibieën echter wel over een zeer grote capaciteit om beschadigde of afgestorven cellen en weefsels te regenereren. Zo kunnen ze succesvol het hart, extremiteiten en zenuwen regenereren, zowel wat betreft morfologie als functionaliteit. De onderliggende mechanismen van deze succesvolle spontane regeneratie zijn echter nog niet volledig opgehelderd, maar zouden tot belangrijke inzichten kunnen leiden in het onderzoek naar de inductie van neuroregeneratie in adulte zoogdieren (Becker en Becker (2014); Kyritsis *et al.* (2014)). Als kleine, gemakkelijk te huishouden en goed gekarakteriseerde teleost, wordt de zebravis dan ook veelvuldig gehanteerd in vergelijkende studies naar de onderliggende moleculaire processen van neuronale regeneratie, neuroprotectie en axonale regeneratie. Dergelijk onderzoek situeert zich vaak ter hoogte van het visueel systeem van de zebravis, dat wegens zijn grote conservatie binnen de vertebraten, een interessant modelsysteem vormt (Becker en Becker (2014)).

1.4.1 De zebravis als studiemodel

De zebravis (*Danio rerio*) is een kleine tropische zoetwatervis die behoort tot de orde van de Karperachtigen (*Cypriniformes*) en voorkomt in snelstromende rivieren van onder andere India, Pakistan en Nepal. Sinds de jaren '70 is de zebravis in opmars als veelzijdig modelorganisme dankzij zijn klein formaat, een korte generatietijd van drie à vier maanden en het gemakkelijk en goedkoop onderhoud. Verder is de volledige sequentie van het zebravisgenoom gekend, welke bovendien een hoge mate van conservatie met het humaan genoom vertoont. Daarnaast vindt de bevruchting en ontwikkeling van het transparante embryo extern plaats, wat observatie en manipulatie van beide processen relatief gemakkelijk maakt. De sterkte van de zebravis als modelorganisme wordt nog eens onderstreept door vele beschikbare genetische methoden om genmanipulaties uit te voeren, zoals *antisense* morfolino gemedieerde *knockdown* en het gebruik van *zinc-finger* nucleasen (ZNF's), *transcription activator-like effector* nucleasen (TALEN's) en *clustered regulary interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated* (CRISPR/Cas9). Daardoor is de beschikbaarheid aan gemanipuleerde zebravisvislijnen, die gebruik maken van fluorescente eiwitten als 'reporter' en/of waarbij specifieke genen zijn uitgeschakeld, dan ook groot (Brand en Poon (2013); Currie en Lieschke (2007)).

1.4.2 Opbouw van het visueel systeem bij de zebravis

De morfologie, fysiologie en functionaliteit van het visueel systeem van de zebravis vertonen zeer grote gelijkenissen met dat van zoogdieren, op slechts enkele verschillen na (figuur 4) (Gestri *et al.* (2012); Perry *et al.* (2010)).

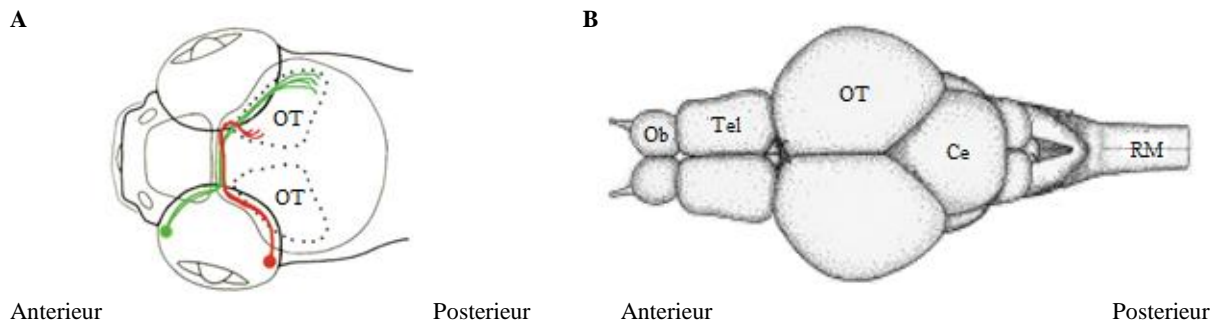


Figuur 4: Overzicht van het oog (A) en de retina (B) van een volwassen zebravis. GCL: ganglioncellaag; IPL: binnenste plexiforme laag; INL: binnenste nucleaire laag; OPL: buitenste plexiforme laag; ONL: buitenste nucleaire laag; PRL: fotoreceptorlaag; RPL: retinale pigmentlaag; CMZ: ciliaire marginale zone.

Net zoals zoogdieren bevat de retina van de zebravis verschillende types neuronen, georganiseerd in vijf lagen (figuur 4). Zoogdieren hebben echter één type staafjes en drie types kegeltjes, die gevoelig zijn voor korte, gemiddelde en lange golflengten. Zoogdieren zijn dus trichromaten. Zebravissen daarentegen zijn tetrachromaten aangezien ze een extra type kegeltjesreceptoren hebben waarmee ze ultraviolette stralen kunnen opvangen (Gestri *et al.* (2012); Perry *et al.* (2010)).

Een belangrijk verschil is ook dat de retina van de zebravis continu blijft groeien gedurende zijn hele levensloop, in tegenstelling tot de retina bij zoogdieren. Hiervoor treedt in de zebravisretina voortdurende neurogenese op door differentiatie van hoog proliferatieve retinale stamcellen aanwezig ter hoogte van de ciliaire marginale zone (CMZ), de grens tussen de neuronale retina en het niet-neuronaal CE (figuur 4). Deze cellen in de CMZ produceren multipotente progenitorcellen, die op hun beurt kunnen differentiëren tot alle retinale celtypes en Müllerglia, op staafreceptoren na. Deze Müllerglia zijn zelf in staat sporadisch te delen en genereren zo ook progenitorcellen voor staafreceptoren, die langs de uitlopers van de Müllerglia migreren en ter hoogte van de buitenste nucleaire laag differentiëren tot staafreceptoren. Neurogenese van alle retinale celtypes is dus een continu biologisch proces in de retina van de zebravis (Fleisch *et al.* (2011); Meyers *et al.* (2012); Thummel *et al.* (2008)).

Tenslotte komt bij de zebravis, in tegenstelling tot bij zoogdieren, geen gedeeltelijke maar een volledige kruising van de optische zenuwen ter hoogte van het chiasme tot stand. Dit impliceert dat alle RGC's contralateraal projecteren naar hun doelstructuren in de hersenen (Sengpiel (2008)). Bij de zebravis is dit projectiegebied bovendien niet de superior colliculus of de LGN (afwezig in teleosten), maar wordt visuele informatie verwerkt door het optisch tectum (figuur 5). Dit is het meest dorsale gedeelte van de middenhersenen, homologo aan de superior colliculus (Gori, *et al.* 2014); Perry *et al.* (2010)).



Figuur 5: Retinofugale projectie naar het optisch tectum bij de zebravis (A) en een dorsaal overzicht van de zebravis hersenstructuren (B). A Bij de zebravis komt er, in tegenstelling tot bij zoogdieren, een volledige kruising van de optische zenuwen ter hoogte van het optisch chiasme tot stand (aangepast overgenomen uit Karlstrom *et al.* (1997)). B Een schematisch overzicht van de hersenstructuren in de zebravis (aangepast overgenomen uit Friedrich *et al.* (2010)). OB: olfactorische bulbus; Tel: telencephalon; OT: optisch tectum; RM: ruggenmerg.

1.4.3 Regeneratie in het visueel systeem van de zebravis

Na schade in de retina van de zebravis treedt succesvolle regeneratie op. Deze regeneratieve processen kunnen worden opgedeeld in neuronale regeneratie via Müllerglia enerzijds, en succesvolle axonale regeneratie anderzijds (Becker en Becker (2008); Goldman (2014)).

1.4.3.1 Neuronale regeneratie in de retina van de zebravis

Na retinale schade in de adulte zebravis dedifferentiëren de Müllerglia in de onmiddellijke omgeving en ondergaan ze moleculaire veranderingen waarbij ze stamceleigenschappen verkrijgen. Hierna prolifereren de Müllerglia asymmetrisch en vormen ze multipotente neuronale progenitorcellen. Deze dochtercellen vormen compacte neurogene clusters in de binnenste nucleaire laag, waarin ze meervoudig prolifereren en differentiëren naar alle vereiste retinale celtypen (Goldman (2014); Lenowski en Raymond (2014)).

1.4.3.2 Neuroprotectie en axonale regeneratie in de retina van de zebravis

De zebravis kan in tegenstelling tot zoogdieren na axonale beschadiging succesvol langeafstandsprojecties naar de hersenen herstellen. Vooreerst treedt er, in tegenstelling tot bij zoogdieren, in de zebravis geen massieve neuronale celdood op na beschadiging van de RGC-axonen, wat op de aanwezigheid van neuroprotectieve moleculen wijst. Zo stijgt, na schade aan de optische zenuw, de concentratie van insuline groeifactor-1 (IGF-1), dat de PI3K/proteïne kinase B signaalweg inhibeert, en van hitte-schok proteïne 70 (HSP70). Beide

proteïnen zorgen na axonale beschadiging in de optische zenuw voor inhibitie van RGC-apoptose. Daarna wordt de abundantie van groei-geassocieerde proteïnen zoals GAP-43, moleculen die axon-gidsing ondersteunen zoals Ephrin-A2, en cytoskeletale proteïnen zoals α -tubuline 1 (*tuba1*), verhoogd. De RGC-axonen groeien vervolgens naar de distale zenuwstomp toe en reïnnerveren terug het optisch tectum. Hierbij zijn de RGC-axonen in staat de correcte synaptische einddoelen te reïnnerveren en de retinotopische map met hoge accuraatheid te herstellen. Na ongeveer twee maanden is retinotopie volledig hersteld en bijgevolg ook het zicht (Becker en Becker (2008); Becker en Becker (2014); Kyritsis *et al.* (2014); McCurley en Callard (2010)).

Verschillende redenen zouden aan de basis van succesvolle axonale regeneratie kunnen liggen in de zebravis. Vooreerst zijn bij de zebravis nog geen aanwijzingen gevonden voor de vorming van een gliaal littekenweefsel na beschadiging van de optische zenuw, zoals wel het geval is bij zoogdieren. Bovendien produceren oligodendrocyten na schade meer moleculen die axonenelongatie promoten, zoals contactines. Deze contactines zijn celadhesiemoleculen gelokaliseerd op het celoppervlakte, die belangrijk zijn voor de binding met de extracellulaire matrix of andere cellen. Daarnaast is in de zebravis aangetoond dat het inhibitorisch domein van Nogo-A ontbreekt. Algemeen suggereert dit dus dat de cellulaire en moleculaire omgeving van het adulte zebravis CZS meer permissief is voor axonale regeneratie in vergelijking met zoogdieren. Ook intrinsiek zouden de neuronen een hoger axonaal regeneratiepotentieel hebben; zo stijgt in zebravissen GAP-43 wel na beschadiging, in tegenstelling tot bij zoogdieren (Becker en Becker (2008); Becker en Becker (2014)).

Optic nerve crush als schademodel

Een veelgebruikte experimentele methode om schade toe te brengen aan axonen van de RGC's, is het *optic nerve crush* (ONC) model, waarbij de axonenbundels ter hoogte van de optische zenuw geplet worden. Bij de zebravis blijven na ONC de meeste RGC's in leven (ongeveer 90 tot 100%), waarna het regeneratieproces opgedeeld kan worden in vier verschillende fasen (tabel 1). Tijdens de schade-respons fase, minder dan 24 uur na verwonding, blijft de expressie van cytoskeletale en groei-geassocieerde genen zoals *tuba1* en *GAP-43* nog op het basale niveau. Vervolgens worden deze genen opgereguleerd tijdens de volgende zeven dagen, de voorbereidingsfase voor axonale heruitgroei. Axonale groei neemt 5 tot 18 dagen na schade plaats wanneer de expressieniveaus van beide genen terug afnemen (de axonextensie fase). De expressie van *tuba1* en *GAP-43* keert terug naar basale niveaus 14 tot 25 dagen na ONC, waarbij de reconstructie van de contacten met het optisch tectum terug tot stand komen en waarbij synaptische verfijning optreedt. Ongeveer twee maanden na ONC is het zicht functioneel hersteld (Becker en Becker (2008); Becker en Becker (2014); McCurley en Callard (2010); (Zou *et al.* (2013)).

Tabel 1: De verschillende fasen van het regeneratieproces na *optic nerve crush* (ONC), gebaseerd op het expressieniveau van de genen *α-tubuline 1* (*tuba1*) en het groei-geassocieerd proteïne-43 (*GAP-43*). Het tijdstip waarop elke fase optreedt, wordt aangeduid in dpi (*days post injury*, i. e. het aantal dagen na het ontstaan van het letsel) (McCurley en Callard (2010)).

Regeneratiefase	Tijdstip	Expressie van <i>tuba1</i> en <i>GAP-43</i>
Schade-respons	<1dpi	Basisniveau
Vorbereiding van axonale uitgroei	1-7dpi	Sterk verhoogd
Axonextensie fase	5-18dpi	Verhoogd
Synaptogenese en synaptische verfijning	14-25dpi	Basisniveau
Functioneel visueel herstel	~ 60dpi	Basisniveau

1.5 De inflammatiebalans als bouwsteen voor regeneratieve strategieën

Na beschadiging van het CZS treedt een acute inflammatoire respons op, een complexe opeenvolging van moleculaire en cellulaire processen. Vooreerst vindt er activatie van microglia plaats, waarbij het vertakte fenotype overgaat in het geactiveerde amoëboïde type (zie 1.2.1). Reactieve microglia secreteren vervolgens signaalmoleculen die de bloed-hersenbarrière meer doorlaatbaar maken en die perifere bloedcellen zoals leukocyten aantrekken. De voornaamste infiltrerende leukocyten zijn neutrofielen enerzijds, en monocyt/macrofagen anderzijds. Dit infiltratieproces verloopt in het beschadigde CZS van zoogdieren in twee fasen. De eerste fase duurt tot ongeveer tien dagen na ontstaan van het letsel. Het aantal neutrofielen piekt op de eerste dag, terwijl het aantal microglia/macrofagen een maximum bereikt op dag zeven. De tweede infiltratiefase van leukocyten en microglia/macrofagen begint ongeveer twee weken na verwonding, en rekrutering van deze cellen blijft zes maanden na letsel nog steeds detecteerbaar. Naast de activatie van microglia en rekrutering van immuuncellen zoals monocyt/macrofagen en neutrofielen, treedt na schade reactieve astroglie op, waarbij geactiveerde astrocyten een gliaal litteken vormen ter hoogte van de beschadiging. In tegenstelling tot de snelle infiltratie van de cellen van het aangeboren immuunsysteem, bereiken de cellen van het adaptieve immuunsysteem pas na een aantal dagen het CZS (Akhlaq *et al.* (2008); Benowitz en Popovich (2011); Kumar en Loane (2012); Kyritsis *et al.* (2014)). In dit werk zal voornamelijk gefocust worden op de bijdrage van het aangeboren immuunsysteem, en meer specifiek op de rol van de microglia/macrofagen in axonale regeneratie.

1.5.1 Inflammatie en regeneratie in zoogdieren

Hoewel de inflammatoire respons een beschermingsmechanisme is van het lichaam, werd dit in het verleden vooral als nadelig beschouwd voor regeneratie in het CZS. Een voorbeeld hiervan is de vorming van het gliaal littekenweefsel. Anti-inflammatoire therapieën die regeneratieve processen in het CZS van zoogdieren zouden stimuleren, zijn dan ook onderzocht en toegepast in experimentele diermodellen na bijvoorbeeld schade aan het ruggenmerg (Benowitz en Popovich (2011); Lenzlinger *et al.* (2001); Shechter en Schwartz (2012)). Sinds kort worden echter de positieve invloeden van inflammatie en microglia/macrofagen voor CZS-regeneratie meer benadrukt en uitvoeriger onderzocht.

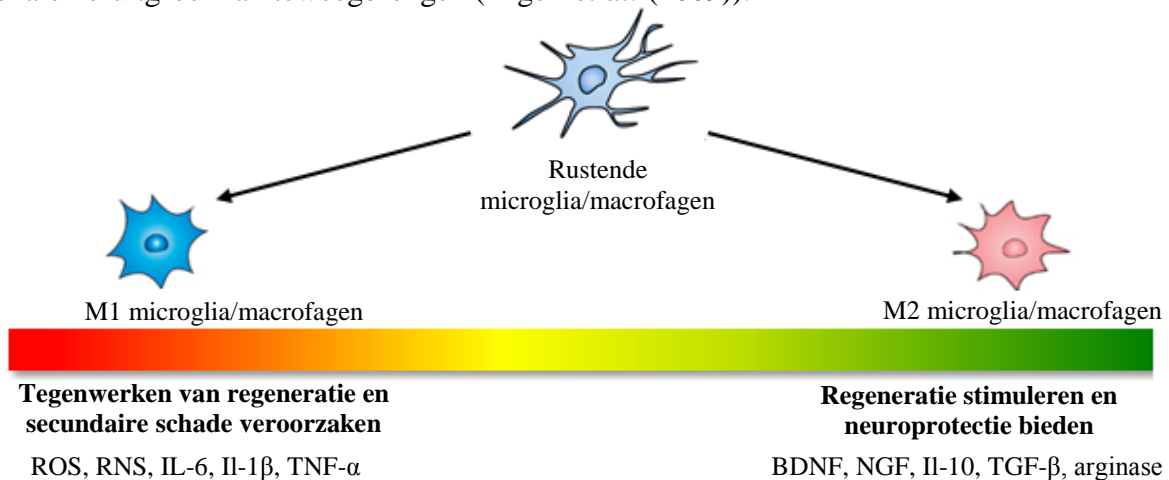
De precieze invloed van neuroinflammatie op regeneratie in het CZS is dus onduidelijk, en blijkt bovendien afhankelijk te zijn van talrijke factoren zoals stress- en schadesignalen, de duur en tijdstippen van impact, de micro-omgeving, de interactie met andere celtypen en ook de leeftijd van het organisme (Czeh *et al.* (2011)). Geactiveerde microglia/macrofagen vormen immers een heterogene groep die uiteenlopende celfenotypen bevat, ontstaan door verschillende activatiesignalen (figuur 6). Aan het ene uiterste bevinden zich de ‘klassiek geactiveerde’ M1 microglia/macrofagen, aan het andere de ‘alternatief geactiveerde’ M2 microglia/macrofagen, en daartussen ligt een continuüm van cellen met een tussenliggende polarisatietoestand. Activatie van microglia/macrofagen via het cytokine interferon- γ (IFN γ) of door bacteriële producten zoals lipopolysacharide (LPS) leidt tot het M1 type, dat algemeen genomen regeneratie tegenwerkt en secundaire schade veroorzaakt. Anderzijds hebben de M2 type microglia/macrofagen, geactiveerd door interleukine (IL)-4 en -13, neuroprotectieve en regeneratie-stimulerende eigenschappen (Czeh *et al.* (2011); Kigerl *et al.* (2009)).

Neurotoxiciteit door M1 microglia/macrofagen

De M1 microglia/macrofagen zijn essentieel in de bescherming tegen pathogenen en tumorcellen, maar kunnen ook gezonde cellen zoals neuronen en gliacellen beschadigen (figuur 6). Ze produceren immers grote hoeveelheden ROS en reactieve stikstofdeeltjes (*reactive nitrogen species*, RNS), die weliswaar belangrijk zijn voor het natuurlijke afweermechanisme, maar ook neuronale oxidatieve stress en celdood kunnen veroorzaken (Czeh *et al.* (2011)). Daarnaast produceren ze ook pro-inflammatoire cytokines zoals IL-6, IL-1 β en tumornecrosefactor- α (TNF α), die eveneens neuronale schade kunnen aanrichten (Kigerl *et al.* (2009)). Bovendien kunnen IL-1 β , TNF α en RNS celdood van oligodendrocyten veroorzaken, wat het remyelinisatieproces verstoort. Tenslotte is ook aangetoond dat M1 microglia/macrofagen de overleving van nieuw gevormde neuronen ter hoogte van de hippocampus verlagen en dus neurogenese verstoren (Czeh *et al.* (2011); Kigerl *et al.* (2009); Zhou *et al.* (2014)).

Neuroprotectie en regeneratie door M2 microglia/macrofagen

Vooreerst secreteren M2 microglia/macrofagen een breed spectrum van neurotrofe factoren, zoals BDNF en *nerve growth factor* (NGF), en anti-inflammatoire cytokines, zoals IL-10 en TGF- β (zie figuur 6). Deze kunnen overleving en herstel van de neuronen na neuronale schade promoten (Kyritsis *et al.* (2014); Yong (2010)). Daarnaast stimuleren M2 microglia/macrofagen differentiatie van oligodendrocyten, essentieel voor efficiënte remyelinisatie (Miron *et al.* (2013)). Bovendien inhiberen ze de productie van stikstofdioxide (NO) door M1 microglia/macrofagen, via de synthese van het enzyme arginase, dat de aanmaak van NO tegenwerkt (Briken en Mosser (2011)). M2 microglia/macrofagen stimuleren eveneens de heruitgroei van axonen over een lange afstand *in vitro*, zelfs in aanwezigheid van inhiberende CSPG's, terwijl het M1 subtype enkel korte, zeer vertakte axonale heruitgroei kan teweegbrengen (Kigerl *et al.* (2009)).



Figuur 6: Een overzicht van de twee uiterste types microglia/macrofagen. M1 microglia/macrofagen, geactiveerd door IFN- γ en LPS, werken regeneratie tegen en veroorzaken secundaire schade. M2 microglia/macrofagen, geactiveerd door IL-4 en IL-13 promoten daarentegen regeneratie en bieden neuroprotectie. Tussen deze twee extreme fenotypes, ligt een continuüm van cellen met een tussenliggende polarisatiegraad.

Een mogelijke verklaring voor de afwezigheid van spontane regeneratie in het CZS van zoogdieren is de dominerende invloed van het M1 microglia/macrofaag fenotype ten opzichte van het M2 type. Na een ruggenmergletsel in muizen vindt immers een langdurige respons van het M1 type plaats, die een maand na de beschadiging nog waarneembaar is en de beperktere aanwezigheid van het M2 type overheerst (Kigerl *et al.* (2009)). In het PZS daarentegen, bijvoorbeeld na een huidwond, vindt een verschuiving van M1 naar M2 type microglia/macrofagen plaats. Daarbij wordt de wonde dus eerst steriel gemaakt door fagocytose van extracellulaire debris, en vervolgens wordt wondheling ondersteund door M2 microglia/macrofagen (Deonarine *et al.* (2007); Nahrendorf *et al.* (2007)). Met andere woorden, de afwezigheid van een dergelijke verschuiving verklaart mogelijk mee dat spontane regeneratie niet kan optreden in het CZS (Kigerl *et al.* (2009)).

Een innovatieve invalshoek om nieuwe inzichten te verkrijgen in de rol van microglia/macrofagen wordt geboden door het gebruik van de zebravis. Hier treedt regeneratie in het CZS wel spontaan op, en dus is het interessant om na te gaan op welke manier de acute neuroinflammatoire respons gekoppeld wordt aan succesvolle regeneratie. Deze kennis zou vervolgens kunnen bijdragen tot het opwekken van een regeneratief potentieel in het CZS van zoogdieren (Huang *et al.* (2014); Yin *et al.* (2006); Yong (2010)).

1.5.2 Inflammatie en regeneratie in zebravissen

Het immuunsysteem van de zebravis vertoont zeer veel gelijkenissen met dat van zoogdieren. De zebravis beschikt immers ook over zowel een aangeboren als een adaptief immuunsysteem en over gelijkaardige inflammatoire proteïnen en processen, waaronder fagocytose van cellulaire debris en bacteriën (Kyritsis *et al.* (2014)).

De acute inflammatoire respons die optreedt na beschadiging is uitvoerig bestudeerd in het telencephalon van de zebravis. Dergelijke letsels leiden tot proliferatie van radiale gliacellen. Dit zijn progenitorcellen die gelokaliseerd zijn in de hersenventrikels, en zowel tijdens de ontwikkeling als doorheen de hele levensloop van de zebravis neuronen en gliacellen produceren. Na opname van de anti-inflammatoire drug dexamethasone (DEX), reduceert de reactieve proliferatierespons van deze progenitorcellen na hersenschade echter significant, terwijl injectie van zymosan in de hersenventrikels van intacte hersenen een infiltratie van microglia/macrofagen en leukocyten en een verhoogde proliferatieactiviteit van de progenitorcellen veroorzaakt. Dit impliceert dat de inflammatoire respons één van de moleculaire signalen is voor de activatie van de radiale glia in het telencephalon van zebravissen (Kyritsis *et al.* (2012)). In dit model is ook reeds een eerste stap gezet om de onderliggende mechanismen van dit proces te identificeren. Op de membranen van deze radiale gliacellen bevinden zich, na beschadiging van het telencephalon of na injectie van zymosan, meer cysteïnyl leukotrieën 1 receptoren, die belangrijk zijn bij de leukotrieën signalering in de inflammatoire respons. Sterker nog, neurogenese stijgt ook na injectie van leukotrieen C4 (LTC₄), een ligand van de cysteïnyl leukotrieen 1 receptoren. Met andere woorden, de inflammatoire respons, inclusief de leukotrieen-signalering, zou na hersenschade in de volwassen zebravis regeneratie kunnen initiëren (Kyritsis *et al.* (2012); Park *et al.* (2014)).

Ook in de retina van de zebravis wordt de rol van de acute inflammatoire respons tijdens het regeneratieproces van de optische zenuw bestudeerd. Intravitreale injectie van zymosan leidt tot een influx van macrofagen en neutrofielen ter hoogte van de retina en zorgt voor een verhoging van het aantal RGC's die het optisch tectum bereiken. Dit suggereert dat inflammatie axonale regeneratie stimuleert in de retina van de zebravis. Echter, in zebravissen met een intacte optische zenuw is het aantal RGC's op 14 dagen na de intravitreale injectie van zymosan significant gedaald. Dit suggereert dat inflammatie op korte termijn axonale

regeneratie kan stimuleren, maar op lange termijn een negatieve invloed heeft op celoverleving (Zou *et al.* (2013)). Bovendien geeft een studie van Kyritsis *et al.* (2012) weer dat in de zebravis na CZS-schade geen chronische inflammatie optreedt, in tegenstelling tot bij zoogdieren (zie 1.5), wat verder impliceert dat een gebalanceerde acute immuunrespons met snelle resolutie noodzakelijk is voor succesvolle regeneratie. Hoewel het dus duidelijk is dat de zebravis de acute inflammatoire respons kan koppelen aan succesvolle regeneratie van de optische zenuw, zijn de precieze mechanismen die dit proces onderliggen, nog niet opgehelderd.

1.6 De invloed van veroudering op het regeneratief potentieel

Veroudering wordt in het algemeen beschreven als de progressieve accumulatie van verschillende schadelijke veranderingen in cellen en weefsels naarmate organismen ouder worden, wat gepaard gaat met een grotere vatbaarheid voor ziekte of dood (Tosato *et al.* (2007)). Dergelijke wijzigingen, zoals een hogere mate van oxidatieve stress, een verstoorde energiehomeostase, de accumulatie van beschadigde proteïnen en schade aan het DNA, vinden ook plaats in neuronen van het CZS. Veroudering brengt bijgevolg de functie en overleving van neuronen in gevaar en is een belangrijke risicofactor voor neurodegeneratieve ziekten (Mattson en Magnus (2006)).

Zo zullen deze leeftijds-geassocieerde intra- en extracellulaire wijzigingen ook de capaciteit tot neuroregeneratie, evenals het therapeutisch applicatiepotentieel van regeneratieve strategieën, significant beïnvloeden. Verschillende studies tonen immers aan dat het reeds beperkte regeneratievermogen van adulte zoogdieren nog meer wordt onderdrukt naarmate de leeftijd stijgt (Galvan en Jin (2007); Verdú *et al.* (2000)). In het PZS van oudere muizen en ratten, regenereren bijvoorbeeld minder perifere neuronen na axotomie in vergelijking met jonge adulte dieren en bovendien duurt het reïnnervatieproces langer (Verdú *et al.* (2000); Vaughan (1992)). Inderdaad, ook de neurogene capaciteit van de weinige stamcellen in de subgranulaire zone van de hippocampus (één van de twee neurogene zones in de hersenen van zoogdieren), alsook het aantal stamcellen dat in deze hersenzone overleeft, daalt drastisch in oudere knaagdieren en niet-mensapen. Mogelijk treedt een intrinsieke daling op van de reactiviteit van de stamcellen en/of van stimulerende omgevingsfactoren, of accumuleren inhiberende factoren.

Leeftijdsgerelateerde extracellulaire wijzigingen kunnen dus een grote invloed uitoefenen op het neurogeen potentieel van stamcellen en hun reactivatie na schade, alsook op de uitgroaicapaciteiten van axonen. Aangezien het neuronaal en axonaal regeneratief potentieel echter reeds zeer gelimiteerd is in het CZS van adulte zoogdieren, is er een hoge nood aan een goed gekarakteriseerd verouderingsmodel, waarin een succesvolle axonale heruitgroei van beschadigde neuronen en *de novo* neurogene in een verouderde omgeving kan bestudeerd worden.

1.6.1 De zebra vis als model: veroudering en regeneratie

Ook de zebra vis vertoont, net als zoogdieren, een graduele veroudering, waardoor het een veelbelovend verouderingsmodel is. Hoewel vele verouderingsprocessen nog niet volledig gekarakteriseerd zijn in het CZS van de zebra vis, blijken ze wel een daling in cognitieve functie en leervermogen te vertonen. Daarnaast zijn ook het voorkomen van spinale kromming, wijzigingen in het circadiaans ritme (zoals een afname van het aantal uren slaap en een lager activiteitsniveau) en de accumulatie van geoxideerde proteïnen zoals β -galactosidase, reeds beschreven in de verouderde zebra vis (Hayes *et al.* (2013); Kishi *et al.* (2008); Yu *et al.* (2006); Zhdanova *et al.* (2008)).

Net zoals bij zoogdieren zou het regeneratief potentieel bij verouderde zebra vissen afnemen. Zo daalt de neurogene capaciteit bij verouderde zebra vissen in verschillende delen van de hersenen zoals de olfactorische bulbi en het telencephalon. Neurogenese treedt nog wel op na schade aan de hersenen, maar het aantal nieuw geboren neuronen ligt lager dan bij jonge adulte vissen (Edelmann *et al.* (2013)). Ook het potentieel om zenuwen van het CZS te remyeliniseren na letsel, daalt bij oudere zebra vissen. Vier weken na demyelinisatie is het aantal gemyeliniseerde axonen in verouderde vissen wel hersteld, maar de myelineschede is dunner dan voor het demyelinisatieproces, terwijl jonge adulte vissen de normale dikte kunnen regenereren (Münzel *et al.* (2014)). Tenslotte zou ook het axonale regeneratievermogen van het PZS dalen. Na beschadiging van de axonen van de posterieure laterale lijn, een gevoelsorgaan waarmee bewegingen in het water worden waargenomen, treedt de reïnnervatie van de doelstructuren later op in verouderde vissen, wat veroudering linkt aan een progressieve daling van axonale regeneratie (Graciarena *et al.* (2014)).

Deze eerste aanwijzingen die het onderdrukken van het regeneratievermogen door het optreden van verouderingsprocessen in verouderde zebra vissen illustreren, suggereren dat de zebra vis een uitstekend model is om leeftijds-geassocieerde cellulaire en moleculaire veranderingen in het CZS, en hun invloed op regeneratieve capaciteiten, te bestuderen. Het ontrafelen van de onderliggende moleculaire mechanismen van het dalende regeneratievermogen in verouderde zebra vissen zou meer inzicht kunnen brengen in het regeneratieproces en bijgevolg kunnen bijdragen aan nieuwe therapeutische behandelingen voor CZS-regeneratie. Het merendeel van de patiënten waarbij zenuwdegeneratie voorkomt behoort immers tot de oudere bevolking, wat van de verouderde zebra vis een interessant en mogelijk meer accuraat onderzoeksmodel maakt om de verschillende regeneratiestrategieën te bestuderen.

1.7 Inflammaging

Het verouderingsproces gaat, zoals vermeld in 1.6, gepaard met verscheidene cellulaire veranderingen die het beperkte regeneratievermogen van zoogdieren verder onderdrukken. Een bijkomende leeftijdsgeassocieerde verandering in het CZS van oudere zoogdieren is *inflammaging*; het optreden van een lichte vorm van chronische inflammatie, gekarakteriseerd door de opregulatie van de inflammatoire respons en een chronische cytokineproductie van onder andere IL-6 en TNF- α (Baylis *et al.* (2013); Franceschi en Campisi (2014)). Bovendien verandert het fenotype van gliacellen zoals astrocyten en microglia in oudere zoogdieren. Verouderde astrocyten vertonen een hogere proliferatieactiviteit en verhogen de productie van de intermediaire filament proteïnen *glial fibrillary acid protein* (GFAP) en vimentine (Vim), die stevigheid bieden aan de uitlopers van astrocyten. Daarenboven zijn er meer microglia in oudere zoogdieren, verhogen ze de productie van cytokines zoals IL-6 en bevinden zich meer van deze cellen in de reactieve, amoëboïde toestand (Lynch *et al.* (2010); Wong (2013)).

Hoewel de etiologie en de invloed van *inflammaging* op de gezondheidstoestand grotendeels onbekend blijft, zijn de hogere aanwezigheid van onder andere TNF- α , IL-6 en IL-1, risicofactoren voor mortaliteit in verouderde zoogdieren. Epidemiologische studies suggereren immers dat vele leeftijdsgebonden ziekten initiëren of escaleren door inflammatie (Baylis *et al.* (2013)). Bovendien zullen deze leeftijdsgerelateerde verstoringen in inflammatoire responsen zeker bijdragen tot een afname in het neuroregeneratief potentieel. Zo stijgt de productie van GFAP en Vim en lijkt dit neurogenese te onderdrukken. Verouderde muizen die deficiënt zijn voor deze proteïnen (GFAP^{-/-}Vim^{-/-}-muizen) vertonen immers meer neurogenese in de subgranulaire zone van de hippocampus en een hogere overleving van de stamcellen (Galvan en Jin (2007); Larsson *et al.* (2004)). In oudere ratten ligt het aantal infiltrerende macrofagen daarnaast significant lager na intravitreale zymosaninjectie en is het stimulerende effect van zymosan op de regeneratie van RGC-axonen na optische zenuwbeschadiging, minder groot vergeleken met jonge ratten (Luo *et al.* (2010)). Omgekeerd blijft in het PZS van verouderde ratten, de proliferatierespons van microglia langer hoog dan bij jonge ratten. Hoewel deze microglia initieel nodig zijn voor een succesvol herstel, resulteert de vertraagde resolutie van het aantal microglia naar de waarde van voor de beschadiging in een tragere regeneratie van craniale zenuwen. Een langdurige inflammatoirespons lijkt dus nadelig voor succesvolle regeneratie (Conde en Streit (2006)).

Hoewel deze onderzoeken duidelijk onderstrepen dat succesvolle neuroregeneratie een nauwe balans van inflammatoire processen vereist, en dat deze duidelijk verstoord is in oudere zoogdieren, blijft *inflammaging* en de specifieke relatie met regeneratieve capaciteiten relatief onbestudeerd.

2 Doelstellingen

Verschillende studies tonen aan dat veroudering gepaard gaat met een daling in het regeneratievermogen. De centrale hypothese van deze thesis is dan ook dat axonale regeneratie na ONC in verouderde vissen vertraagd/vermindert. In de eerste plaats zal deze hypothese bijgevolg getoetst worden. Hiervoor zal gekeken worden naar de lokalisatie en abundantie van het groei-geassocieerd proteïne GAP-43, een merker voor uitgroeïende axonen, op verschillende tijdstippen na ONC ter hoogte van de retina en de optische zenuw.

De onderliggende oorzaken van een mogelijk vertraagd/verminderd regeneratieproces dat gepaard gaat met veroudering zullen vervolgens onderzocht worden. Aangezien inflammatie als een belangrijke speler bij axonale regeneratie wordt beschouwd, zal voornamelijk toegespitst worden op het concept van *inflammaging* en meer specifiek op de rol van microglia/macrofagen. Vooreerst zal hierbij het aantal microglia/macrofagen die zich bevinden in de retina van jonge adulte en verouderde vissen gekwantificeerd worden met behulp van een microglia/macrofaag specifiek antilichaam 4C4, en dit zowel in naïeve vissen, als in vissen onderworpen aan ONC. De waargenomen trend zal daarnaast geverifieerd worden in jonge adulte vissen aan de hand van een transgene vislijn waarin microglia/macrofagen en neutrofielen fluorescente proteïnen tot expressie brengen.

Tenslotte zal het inflammatoir proces gemoduleerd worden om zo de precieze rol ervan in axonale regeneratie te achterhalen. In het verleden werd inflammatie immers vooral als een negatieve effector in het regeneratieproces beschouwd, maar recent worden ook, zeker op korte termijn, positieve effecten beschreven. Vooreerst zal het immuunproces gestimuleerd worden, aan de hand van een intravitreale injectie van zymosan, wat een infiltratie van macrofagen en neutrofielen veroorzaakt. Daarna zal immunosuppressie geïnduceerd worden door intravitreale injectie van enerzijds DEX en anderzijds clodronaat liposomen. DEX is een algemene immunosuppressieve drug, terwijl clodronaat liposomen specifiek apoptose veroorzaken in microglia/macrofagen. In de eerste plaats zal het effect van zowel deze immunostimulatie als -suppressie op het aantal en het fenotype van de microglia/macrofagen bepaald worden, waarna ook gekeken wordt naar de invloed van beide op axonale regeneratie na ONC.

Deze studie zal mogelijk nieuwe inzichten opleveren in de rol van veroudering op het regeneratieproces, alsook de eerste stappen zetten voor het ophelderen van de potentiële oorzaken hiervan. Daarnaast zal de inflammatoire respons na ONC in detail bekeken worden om zo mogelijk meer duidelijkheid te creëren omtrent de functie ervan tijdens axonale regeneratie.

3 Materialen en methoden

3.1 De zebravis, *Danio rerio*

3.1.1 Onderhoud

In deze masterproef wordt gebruik gemaakt van jonge adulte (5 maand) en verouderde zebravissen (24 maand). De zebravissen worden gehuisvest onder standaard laboratoriumcondities, met een constante watertemperatuur van 27°C en een licht/donker cyclus van respectievelijk 14 en 10 uur. Tweemaal per week wordt de helft van het tankwater verversd door toevoeging van nieuw systeemwater met een samenstelling van 294 mg CaCl₂·2H₂O (Chem-Lab); 123,25 mg MgSO₄·7H₂O (Merck); 64,75 mg NaHCO₃ (Chem-Lab) en 5,75 mg KCl (Chem-Lab) per liter gedeïoniseerd water. De vissen worden zowel 's middags als 's avonds gevoed, respectievelijk met droogvoer (Dr. Bassleer Biofish Food) en levende Artemia (pekelkreeftjes). De Artemia wordt ter plaatse gekweekt door de gevriesdroogde eitjes op te groeien onder optimale condities, namelijk in een hoge zoutconcentratie en onder constante zuurstoftoevoer. Na 48 uur wordt de Artemia geoogst en worden de pekelkreeftjes, na wegfilteren van het zout, toegediend aan de vissen.

3.1.2 Kweek

De voortplanting van de zebravissen in het labo wordt kunstmatig gestimuleerd. Zebravissen paren 's morgens, juist voor het licht zal worden, dus op dat moment worden schalen met groene knikkers en artificiële algen in de tanks geplaatst. Onder deze knikkers zit een roostertje waar de eitjes doorvallen zodat ze worden opgevangen in het onderste deel van de schaal en bijgevolg niet opgegeten kunnen worden door de adulte vissen. Enkele uren na de fertilisatie worden de embryo's verzameld en overgebracht naar 0,3x Danieau's, een medium gebruikt om embryo's en jonge larven in op te groeien. De onbevuchte eitjes worden uit het medium verwijderd om de verspreiding van ziekten te voorkomen. Vervolgens worden de bevruchte eitjes opgegroeid in een incubator bij 27°C, tot de larven vijf dagen oud zijn. Hierna worden de larven overgeplaatst naar een grotere tank met een klein volume 0,3x Danieau's. Deze tanken worden tweemaal per week schoongemaakt. Jonge vissen die nog geen twee weken oud zijn, krijgen 's middags en 's avonds aangepast droogvoer (Sera Micron), dat de ideale nutriënten voor een optimale ontwikkeling bevat. Wanneer ze een maand oud zijn, kunnen de vissen worden overgeplaatst naar reguliere aquaria.

3.1.3 Gebruikte vislijnen

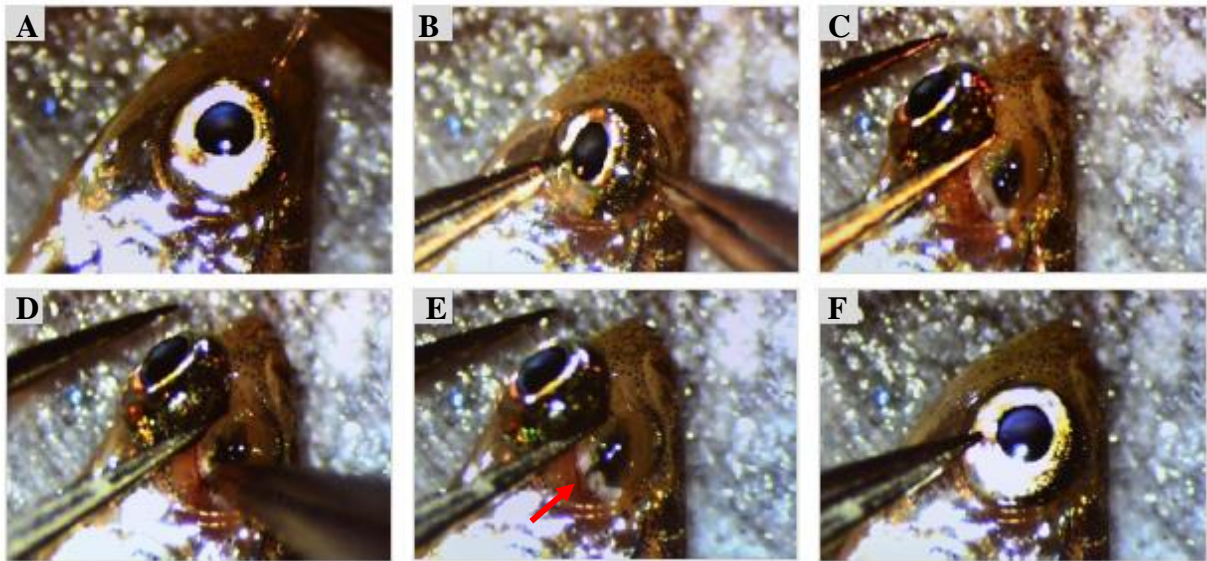
In dit werk worden vooreerst wild type vissen gebruikt, AB vissen. Daarnaast wordt ook gebruik gemaakt van de transgene (Tg) lijnen Tg(*coro1a:eGFP*) en Tg(*coro1a:eGFP; lyz:DsRed*). Bij beide transgene lijnen is de promotorregio van coronin 1a (*coro1a*), een actinebindend eiwit geproduceerd door leukocyten, gekoppeld aan het gen voor het groen fluorescente proteïne GFP. Hierdoor krijgen microglia/macrofagen en neutrofielen een groene

fluorescente kleur. In de transgene lijn Tg(*coro1a:eGFP*; *lyz:DsRed*) is bovendien de promotoregio van lyzosome C (*lyz*), een antibacterieel enzym dat specifieke bindingen in de bacteriële celwand kan hydrolyseren en voornamelijk geproduceerd wordt door neutrofielen, gekoppeld aan het rood fluorescente proteïne Discoma rood fluorescente proteïne (DsRed). Hierdoor kunnen microglia/macrofagen in deze laatstgenoemde lijn onderscheiden worden van neutrofielen, omdat zij enkel een groene fluorescente kleur zullen hebben, terwijl neutrofielen geel/oranje fluorescente zullen zijn door de expressie van zowel GFP als DsRed (Li *et al.* (2012); Zou *et al.* (2013)).

3.2 Optische zenuwbeschadiging (*optic nerve crush*)

Optic nerve crush (ONC) is een veelgebruikt schade paradigma aan de oogzenuw, waarna axonale regeneratie in het retinotectaal systeem van volwassen vertebraten bestudeerd kan worden. Voor het toepassen van dit relatief mild schade model, wordt de vis eerst verdoofd in een oplossing van 0,03% tricaine (ethyl 3-aminobenzoaat methaansulfonaat, Sigma Aldrich) in systeemwater. Verlies van evenwicht en vertraging van de beweging van de kieuwkleppen, zijn hierbij indicatoren om na te gaan of de verdoving voldoende is. De verdoofde vis wordt hierna met een doekje op ijs gelegd om de verdoving te ondersteunen. Hierna wordt met behulp van twee fijne steriele pincetten (Dumont nr. 5) het bindweefsel (buitenste cornea) verwijderd (figuur 7A en B), waardoor het oog vervolgens uit de oogholte gelift kan worden en de optische zenuw zichtbaar wordt (figuur 7C). De pincet wordt nu voorzichtig rond de oogzenuw geplaatst op een afstand van 500 µm van het optisch zenuw hoofd, waarna de zenuw gedurende tien seconden geplet wordt (figuur 7D). Belangrijk hierbij is dat de oogslagader naast de optische zenuw intact blijft. Indien de oogslagader geraakt wordt en dus een bloeding ontstaat, wordt de vis uit het experiment verwijderd. De ONC is correct uitgevoerd wanneer een duidelijke transparante lijn zichtbaar is op de plaats van beschadiging (figuur 7E). Tenslotte wordt het oog terug in de oogholte geplaatst (figuur 7F) en kunnen de vissen wakker gemaakt worden door ze voorzichtig door het water in de tank te bewegen, wat voor waterstuwning door de kieuwen zorgt.

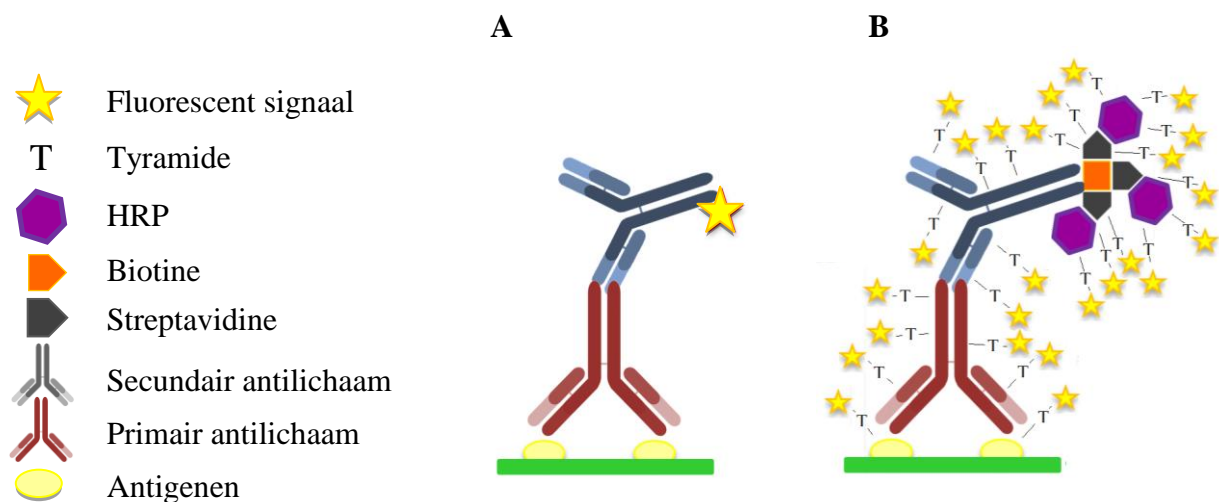
De beschadiging wordt steeds unilateraal toegepast op het linkeroog. Op verschillende dagen na ONC, *days post injury* (dpi), worden de vissen vervolgens opgeofferd.



Figuur 7: De verschillende stappen tijdens *optic nerve crush* (ONC). Vooreerst wordt het bindweefsel verwijderd (A-B), opdat het oog uit de oogholte gelift kan worden (C). Hierna wordt de optische zenuw geplet met een pincet (D), waardoor een donkere lijn op deze plaats ontstaat (E, aangeduid met een rode pijl). Tenslotte wordt het oog terug in de oogholte geplaatst (F).

3.3 Immunohistochemie

Immunohistochemie (IHC) verwijst naar de techniek waarbij specifieke antilichamen worden gebruikt voor de visualisatie en lokalisatie van antigenen in cellen of weefsels. Dit kan gebeuren volgens de directe methode, waarbij het primair antilichaam gemerkt is met een fluorofoor of geconjugeerd met een enzyme, waarmee visualisatie mogelijk wordt. Deze directe methode is echter minder gevoelig en wordt in dit werk niet gebruikt. Bij de indirecte methode draagt niet het primair, maar het secundair antilichaam, dat met het primair antilichaam interageert, een label. De indirecte methode wordt in dit werk op twee manieren uitgevoerd (figuur 8). Vooreerst kan het label een fluorofoor zijn, dat direct gekoppeld is aan het secundair antilichaam (geen amplificatie, figuur 8A). Daarnaast kan het secundair antilichaam gekoppeld worden aan biotine, waaraan vervolgens het enzyme *horseradish peroxidase* (HRP) geconjugeerd met streptavidine aan toegevoegd wordt. Streptavidine kan aan meerdere biotine-eenheden binden met een hoge affiniteit, wat voor amplificatie van het signaal zorgt. In de volgende stap wordt tyramide toegevoegd, gelinkt aan een fluorofoor. Tyramide is een substraat voor HRP en zal door dit enzyme omgezet worden naar een kortlevend, reactief intermediair. Dit reactief intermediair reageert vervolgens covalent met elektronenrijke regio's van zeer nabijgelegen proteïnen, voornamelijk tyrosineresidues, zodat op deze plaats het fluorescent signaal ontstaat (lange amplificatie, figuur 8B). Amplificatie van het fluorescent signaal ontstaat bij de lange amplificatie bijgevolg doordat meerdere streptavidinemoleculen binden aan biotine en doordat HRP verschillende tyramidemoleculen kan omvormen naar een reactief intermediair.



Figuur 8: Schematische voorstelling van de indirecte immunohistochemische methoden, toegepast in dit werk. A Een fluorescent gemerkt label is direct gekoppeld aan het secundair antilichaam (geen amplificatie). **B** Biotine gekoppeld aan het secundair antilichaam reageert met streptavidine en vervolgens met HRP, wat het fluorescent gemerkte tyramide activeert zodat dit kan binden aan elektronenrijke regio's van nabijgelegen proteïnen (lange amplificatie).

3.3.1 Transcardiale perfusie en fixatie van het weefsel voor IHC

Voorafgaand aan de immunohistochemische kleuringen, moet het weefsel gefixeerd worden en worden hiervan coupes gemaakt. De vissen worden echter eerst transcardiaal geperfuseerd om endogene peroxidase-activiteit van rode bloedcellen te voorkomen in de latere immunohistochemische kleuringen. Daartoe wordt de vis sterk verdoofd in een 0,1% tricaineoplossing en vervolgens op een sylgard plaat gelegd. De buikholte wordt opengesneden vanaf de anale vin tot aan de kieuwen, zodat het hart zichtbaar wordt. Na het openknippen van het atrium, wordt voorzichtig een dun glazen capillair, gekoppeld aan een 25 ml spuit, in het ventrikel geplaatst. Hierlangs wordt eerst ongeveer één ml 1x fosfaat gebufferde saline (PBS) in de bloedsomloop geïnjecteerd, ter verwijdering van het bloed, en vervolgens ongeveer één ml 2% paraformaldehyde (PFA), ter fixatie van het weefsel, en dit met een snelheid zodat het bloed rustig uit het atrium loopt. Fixatie met PFA zorgt ervoor dat crosslinks ontstaan tussen proteïnen, voornamelijk tussen lysines. Het is een cruciale stap bij het maken van histologische coupes opdat het weefsel niet beschadigd zou worden of zou degraderen, bijvoorbeeld door autolyse of door de aanwezigheid van proteolytische enzymen (Srinivasan *et al.* (2002). Vervolgens worden de ogen of het visueel systeem gedissecteerd. Om het visueel systeem (ogen, optische zenuwen, chiasme, tracti en hersenen) te dissecteren, wordt eerst het schedeldak opengemaakt en het visueel systeem volledig blootgelegd. Daarna worden de verbindingen van de hersenen met het ruggenmerg doorgeknipt en wordt zeer voorzichtig het volledige visueel systeem uit het lichaam verwijderd. Tenslotte wordt het oog of het visueel systeem overnacht gefixeerd in 4% PFA op 4°C.

3.3.2 *Inbedden van het weefsel en het maken van cryocoupes voor IHC*

Na fixatie van het visueel systeem en de ogen, worden ze eerst driemaal 15 minuten gespoeld in 1x PBS en vervolgens stapsgewijs overnacht geïncubeerd in een stijgende concentratie sucrose in 1x PBS (10%, 20% en 30% sucrose in 1x PBS). Sucrose voorkomt de vorming van ijskristallen tijdens het invriezen. Bij de start van het snijden van de coupes, wordt het weefsel ingebed in een 30% sucrose, 1,5% agarose (Invitrogen) in 1x PBS-oplossing. Met behulp van een cryostaat (Microm HM 560, Thermo Scientific) wordt dit sucrose-agarose blokje met hierin de ogen of het visueel systeem vervolgens in horizontale coupes gesneden met een dikte van 10 μm . Hierbij is de temperatuur van het mes van de cryostaat en het weefsel respectievelijk -23°C en -25°C . De coupes worden serieel opgevangen op superfrost draaglaastjes (Thermo Scientific).

3.3.3 *Immunohistochemische kleuringen*

De draaglaasjes met hierop de cryocoupes worden eerst vijf minuten in *aqua destillata* (AD) gelegd en vervolgens driemaal vijf minuten in 1x tris gebufferde saline (TBS). Tris maakt celmembranen meer permeabel, wat de resultaten van de kleuring kan verbeteren. Hierna worden de coupes ondergedompeld in 1x citraatbuffer en ofwel drie keer vijf minuten in de microgolf opgewarmd (de eerste twee keren op 700W en de laatste keer op 500W) ofwel 20 minuten in een oven op 95°C gezet, waarbij de 1x citraatbuffer eerst drie minuten voorverwarmd is in de microgolf (700W). De hittebehandeling van de coupes zorgt voor het verbreken van crosslinks, die ontstaan tijdens het fixeren met PFA. Deze crosslinks kunnen de epitopen maskeren waarop de antilichamen binden waardoor de kleuring mogelijk niet werkt (Hayat (2007)). Nadat de coupes 20 minuten hebben afgekoeld, worden ze driemaal gespoeld in 1x TBS. Vervolgens worden in de kleuringen waarbij lange amplificatie wordt toegepast, endogene peroxidase geblokkeerd. Daartoe worden de coupes 20 minuten ondergedompeld in een oplossing van 0,3% H_2O_2 in methanol (Acros Organics) en erna drie keer gespoeld in 1x TBS. Nadien worden de coupes één uur geïncubeerd met geit pre-immuunserum in Tris-NaCl buffer (TNB). Op deze manier wordt voorkomen dat het primair antilichaam specifieke bindingen zal aangaan aangezien de proteïnen in het serum alle bindingsplaatsen in het weefsel bezetten. Geit pre-immuunserum is geschikt als blokkeringsagentia wanneer het secundaire antilichaam uit geit komt. Vervolgens wordt het primair antilichaam in de juiste verdunning in TNB op de coupes gebracht en overnacht op kamertemperatuur geïncubeerd (tabel 2). Nadien worden de coupes opnieuw drie keer vijf minuten in 1x TBS gespoeld, om overtollige, ongebonden primaire antilichamen te verwijderen. Bij de kleuring waar geen amplificatie wordt toegepast, zal vervolgens het GAM-Alexa-488 toegevoegd worden, 1/200 opgelost in TNB. Wanneer de lange amplificatie toegepast wordt, wordt het correcte secundaire antilichaam gekoppeld aan biotine (Dako) toegevoegd voor 45 minuten, 1/300 verdund in TNB. Na de volgende spoelstap (driemaal vijf minuten in TBS), wordt streptavidine gekoppeld aan HRP (Dako) aangebracht op de coupes, 1/100 verdund in TNB.

Daaropvolgend wordt opnieuw driemaal gespoeld met TBS, waarna acht minuten geïncubeerd wordt met cyanine-3 (Cy3) gekoppeld aan tyramide, dat 1/50 verdund is in het bijbehorende amplificatie oplosmiddel (PerkinElmer). Zoals eerder beschreven zal het geïmmobiliseerde HRP met H₂O₂ het fluorescent-gelabelde tyramide omzetten naar een kortlevend intermediair, dat zal binden aan elektronenrijke tyrisineresidues. Na een laatste spoelstap met TBS, wordt 4'6-diamidino-2-fenylindool (DAPI) aangebracht op de coupes voor 30 minuten, 1/1000 verdund in 1xPBS. Deze blauw fluorescerende stof is membraanpermeabel en bindt aan chromatine zodat al de kernen gevisualiseerd worden. Tenslotte wordt nog mowiol aangebracht op de coupes voor het bewaren van de fluorescentie (Longin *et al.* (1993) en worden ze toegedekt met een dekglasje.

Tabel 2: Primaire antilichamen gebruikt in de immunohistochemische kleuringen en hun specificaties.

Primair antilichaam	Species	Bedrijf	Verdunning	Verdunning secundair antilichaam
4C4	Muis	Verkregen van P. Raymond (Universiteit van Michigan)	1/500	1/25000 (GAM-HRP)
Anti-GAP-43	Muis	Santa Cruz	1/300	1/5000 (GAM-HRP)
Anti-GPP	Muis	Abcam	1/250	1/200 (GAM-Alexa-488)

3.3.4 Microscopie en data-analyse

Van de gekleurde coupes worden representatieve foto's gemaakt met een Zeiss Imager Z1 microscoop met een AxioCam MR3 zwart-wit camera (20x of 40x lens) en Zen Pro Software, of een Olympus FV1000 confocale microscoop (40x lens) met Olympus Fluoview 4.1 Software. Met behulp van geschikte filters worden specifieke golflengten bekomen die de fluoroforen sterk absorberen of een laser wordt gebruikt. De golflengten die het beste geabsorbeerd worden zijn 358 nm voor DAPI, 488 nm voor Alexa-488 en 550 nm voor Cy3. Het fluorofoor zal door absorptie van lichtenergie naar een aangeslagen toestand gaan, en vervolgens licht met een langere golflengte uitzenden om terug te keren naar de grondtoestand. De uitgezonden golflengten zijn 461 nm voor DAPI, 519 nm voor Alexa-488 en 570 nm voor Cy3. Deze golflengten komen overeen met respectievelijk een blauwe, groene en rode kleur.

Bepalen van de groei afstand van axonen in de optische zenuw aan de hand van GAP-43

Axonale regeneratie wordt in dit werk nagegaan met behulp van de aanwezigheid van GAP-43 in de optische zenuw. Na IHC met anti-GAP-43 op cryosecties, wordt de groei afstand van de GAP-43⁺ RGC-axonen voorbij de *crush site* (in µm) bepaald met behulp van het programma ImageJ 1.48. Hierbij wordt de groei afstand bepaald dewelke het overgrote deel van de axonen heeft afgelegd. Statistische significantie wordt hierbij nagegaan met

behulp van een *two-way analysis of variance* (two-way ANOVA). Waarden worden als significant beschouwd wanneer de p-waarde kleiner is dan 0,05.

Bepalen van het aantal microglia/macrofagen aan de hand van 4C4⁺ celtellingen

Wanneer het aantal microglia/macrofagen wordt bepaald met het antilichaam 4C4, worden al de 4C4⁺ cellen geteld over de verschillende lagen. Hierna wordt dit aantal gecorrigeerd door te normaliseren met de lengte van de retina. Per vis worden vier representatieve retinale coupes genomen waarop de tellingen worden uitgevoerd; de coupe dat het optisch zenuwhoofd bevat en de tweede, vierde en zesde coupe ventraal gelegen van deze coupe. Statistische significantie wordt hierbij nagegaan met behulp van een ongepaarde t-test (vergelijking naïeve jonge adulte en verouderde vissen) of een *two-way* ANOVA (vergelijking jonge adulte en verouderde vissen op verschillende tijdstippen na ONC). Waarden worden als significant beschouwd wanneer de p-waarde kleiner is dan 0,05.

3.4 Immunostimulatie en –suppressie aan de hand van intravitreale injecties

De invloed van inflammatie wordt in dit werk nagegaan door intravitreale injecties van enerzijds zymosan, om een immunostimulatie op te wekken, en anderzijds van DEX of clodronaat liposomen, om een immunosuppressie te bekomen.

3.4.1 Intravitreale injectie

Voor een injectie wordt de vis verdoofd in 0,02% tricaine en vervolgens op een petrischaaltje gelegd. De kieuwen worden bedekt met een nat papiertje zodat de vis nog kan ademen tijdens de operatie. Vervolgens wordt de buitenste cornea verwijderd met twee steriele pincetten. Hierna wordt de dorsale kant van het oog omhoog geduwd door met een pincet aan de ventrale kant zacht te drukken. Een volume van 300 nL wordt vervolgens aan de dorsale kant van het oog geïnjecteerd met een micro-injector (Micro4TM, World Precision Instruments) en een capillair (diameter 40 tot 50 µm) aan een snelheid van 500 nl per seconde. Vervolgens wordt twee minuten gewacht voor het capillair uit het oog wordt verwijderd om reflux te vermijden. De vis wordt hierna terug wakker gemaakt door water over zijn kieuwen te laten gaan. De intravitreale injectie wordt steeds unilateraal uitgevoerd, aan de dorsale kant van het linkeroog. Op verschillende dagen na injectie, *days post intravitreal injection* (dpIVT) worden de vissen opgeofferd.

3.4.2 Gebruikte injectievloeistoffen voor intravitreale injectie

3.4.2.1 Immunostimulatie met zymosan

Zymosan (Sigma) is een celwandcomponent van *Saccharomyces cerevisiae* en veroorzaakt een infiltratie van macrofagen en neutrofielen (zie discussie) (Du *et al.* (2006)).

Wanneer zymosan wordt geïnjecteerd wordt dit poeder eerst opgelost in 0,69% NaCl in AD (saline), in een concentratie van 25 mg/mL. Ter controle worden vissen geïnjecteerd met 0,69% saline (vehikel) en vissen zonder injectiebehandeling gebruikt (ongeïnjecteerde controle).

3.4.2.2 Immunosuppressie met dexamethasone

DEX (Sigma) daarentegen is een synthetisch glucocorticoïde, wat een algemene immunosuppressie zal veroorzaken door enerzijds anti-inflammatoire genen te activeren, en anderzijds pro-inflammatoire genen te inhiberen (zie discussie) (Newton en Holden (2007)). DEX is niet wateroplosbaar en wordt daarom opgelost in 100% DMSO in een concentratie van 40 mg/mL. Controlevissen zijn enerzijds geïnjecteerd met 100% DMSO (vehikel) en anderzijds worden vissen zonder injectiebehandeling gebruikt (ongeïnjecteerde controle).

3.4.2.3 Immunosuppressie met clodronaat liposomen

Naast DEX wordt in dit werk gebruik gemaakt van clodronaat liposomen (verkregen van prof. Van Rooijen) om immunosuppressie te veroorzaken. Clodronaat liposomen zijn vetvesikels met daarin een apoptose-veroorzakende vloeistof, die specifiek apoptose in microglia/macrofagen veroorzaken (zie discussie) (Lehenkari *et al.* (2002)).

Clodronaat liposomen worden gebruikt in een concentratie van 5 mg clodronaat liposomen/mL in 1xPBS. Vooreerst worden controlevissen gebruikt die geïnjecteerd worden met 1x PBS, ter controle van het effect van een intravitreale injectie. Daarnaast wordt ook gecontroleerd voor de opname van liposomen zelf via injectie van 5 mg/mL PBS liposomen in 1xPBS, waarin PBS verpakt is in de vesikels in plaats van clodronaat. De functionaliteit van microglia/macrofagen zou immers beïnvloed kunnen worden door opname van de liposomen aangezien de fagocyterende capaciteit gesatureerd kan worden (Van Rooijen en Sanders (1994)). Ook vissen zonder injectiebehandeling worden meegenomen in deze experimenten (ongeïnjecteerde controle).

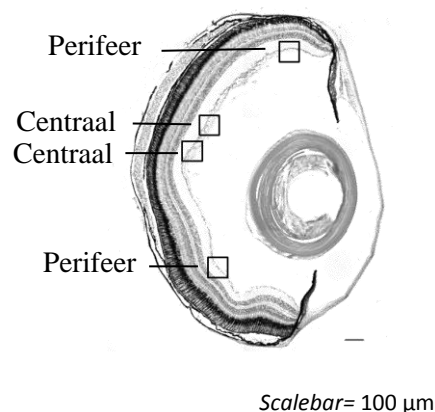
3.4.3 Hematoxyline en eosine kleuring ter controle van de retinale morfologie en het tellen van RGC's

Om te bepalen of de intravitreale injectie van 100% DMSO, wat als vehikel gebruikt wordt bij DEX injecties, geen effect heeft op de algemene retinale morfologie, wordt een hematoxyline en eosine (H&E) kleuring uitgevoerd op cryocoupees van deze ogen, evenals op ongeïnjecteerde controles. Dit is belangrijk om na te gaan aangezien DMSO een toxisch solvent is en neuronale schade kan aanrichten (Galvao *et al.* (2014)). Enerzijds worden bij deze kleuring de celkernen blauwpaars gekleurd door het basische hematoxyline, anderzijds

wordt het cytoplasma in het roos aangekleurd door het zure eosine.

Eerst worden de glaasjes met de coupes erop vijf minuten in AD geplaatst om het overtollige agarose weg te spoelen. Daarna worden de coupes gedurende drie minuten in hematoxyline (Prosan) gebracht, en dan grondig gespoeld in AD. De coupes worden vervolgens tien seconden in eosine gebracht (Prosan). Hierna worden ze ondergedompeld in een dehydratatiereeks (50%, 70%, 96% ethanol). Nadien worden de coupes in tweemaal drie minuten in 100% ethanol, en erna tweemaal vijf minuten in xyleen geplaatst. Tenslotte worden ze toegedekt met dekglasjes, met behulp van DePeX. Deze kleuring wordt gevisualiseerd met de Zeiss Imager Z1 microscoop (20x lens).

Ook om het aantal RGC's te bepalen na zymosaninjectie, wordt een H&E-kleuring uitgevoerd. Hierbij worden per vis op de coupe waarop het optisch zenuwhoofd ligt en op de tweede, vierde en zesde coupe zowel dorsaal en ventraal hiervan, viermaal het aantal RGC's op een retinale lengte van 100 μm geteld. Per retina wordt namelijk tweemaal centraal en tweemaal perifeer geteld (figuur 9). Van al deze tellingen wordt het gemiddelde per vis genomen. Statistische significantie wordt nagegaan met behulp van een *one-way* ANOVA. Waarden worden als significant beschouwd wanneer de p-waarde kleiner is dan 0,05.



Figuur 9: Kwantificatie van het aantal retinale ganglioncellen na zymosaninjectie. Per retinale coupe wordt viermaal (2x perifeer, 2x centraal) het aantal RGC's op een afstand van 100 μm (aangegeven door een vierkantje) geteld.

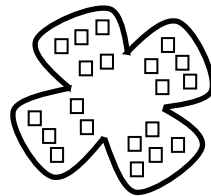
3.5 Dissectie van ogen en maken van *whole mount* retina's

Vooreerst worden de vissen sterk verdoofd in een 0,1% tricaineoplossing, waarna de ogen met fijne steriele pipetten uit de oogholte verwijderd kunnen worden. De ogen worden één uur gefixeerd in 4% PFA en vervolgens kort gespoeld in 1x PBS. Voor het maken van de retinale *whole mounts*, worden allereerst de oogspieren en de -zenuw verwijderd met een klein schaarje (Dumont, 15000-08), waarna de lens verwijderd wordt door de cornea weg te knippen. Met een scalpel (Swann-Morton, nr. 24) worden vier even grote insnedden gemaakt zodat een vlakke klavervorm ontstaat. Tenslotte wordt de sclera voorzichtig verwijderd om de *whole mount* retina te bekomen. Deze wordt opnieuw één uur gefixeerd in 4% PFA in vlakke vorm en daarna zorgvuldig gespoeld in 1x PBS, waarin de retinale *whole mounts* eveneens

kort bewaard kunnen worden. De retinale *whole mounts* worden gevisualiseerd met een Olympus FV1000 confocale microscoop met Olympus Fluoview 4.1 Software (20x lens).

3.5.1 *Coro1a*⁺ celtellingen op *whole mount retina*'s

Op verschillende tijdstippen na ONC wordt het aantal *coro1a*⁺ cellen in de transgene lijn Tg(*coro1a:eGFP*) bepaald in de retina. Hiervoor worden per kwadrant van de retinale *whole mount* vijf vierkanten met een zijde van 200 μm aangebracht, waarin het aantal *coro1a*⁺ cellen wordt geteld met behulp van ImageJ 1.48 (figuur 10). Van deze 20 tellingen per retina wordt vervolgens het gemiddelde genomen om één waarde per vis te bekomen. Statistische significantie wordt aangetoond aan de hand van een *one-way* ANOVA (p-waarde kleiner dan 0,05).



Figuur 10: Kwantificatie van het aantal *coro1a*⁺ cellen, geteld op retinale *whole mounts*. Per kwadrant van de retinale *whole mount* wordt vijfmaal het aantal *coro1a*⁺ cellen geteld in een vierkant met een zijde van 200 μm .

3.6 Detectie van axonale regeneratie via retrograde labeling met biocytine

In dit werk wordt de invloed van een intravitreale injectie van zymosan en clodronaat liposomen op axonale regeneratie na ONC, nagegaan. Hierbij wordt zymosan drie dagen voor ONC geïnjecteerd en clodronaat liposomen vier uur voor ONC. Na injectie van zymosan wordt op zowel 4 als 7dpi de reïnnervatie van de RGC-axonen in het optisch tectum gevisualiseerd met behulp van biocytine *tracing*, terwijl na injectie van clodronaat liposomen enkel op 7dpi wordt gekeken. Vier dagen na ONC zijn in een onbehandelde vis nog geen geregenereerde axonen waar te nemen in het optisch tectum; zeven dagen na ONC komen de axonen daarentegen volop in het optisch tectum toe (Bernhardt *et al.* (1996)). Biocytine is een conjugaat van biotine en L-lysine en wordt gebruikt als neuronale *tracer* die zowel efficiënt wordt getransporteerd in de anterograde, als in de retrograde richting. De visualisatie van geregenereerde neuronen komt tot stand doordat biocytine een grote affiniteit voor avidine vertoont, zodat het via het avidine/biotine complex (ABC) gekleurd kan worden met 3,3-diaminobenzidine (DAB) (King *et al.* (1989)).

3.6.1 Aanbrengen van biocytine

Biocytine (Sigma-Aldrich®) is een wit amorf poeder, dat eerst opgelost wordt in milli-q (MQ) water. Vervolgens wordt gelfoam® (Pfizer, Inc.) in deze oplossing gedipt, waarna het gedroogd wordt op kamertemperatuur en in het donker. Nadien wordt de biocytine-gelfoam bewaard bij -20°C. Voor het aanbrengen van biocytine op de optische zenuw, wordt de vis

verdoofd in een 0,03% tricaineoplossing en vervolgens op een ijsplaat met doekje gelegd. Na het verwijderen van de buitenste cornea wordt het oog uit de oogholte getild en de oogzenuw wordt doorgeknipt tussen het optisch zenuwhoofd en de plaats van ONC. Vervolgens wordt een stukje biocytine-gelfoam met minstens een diameter van de zenuw op het zenuweinde geplaatst. Tenslotte wordt de vis terug bij bewustzijn gebracht door hem zachtjes door het water in de tank te bewegen.

3.6.2 *Transcardiale perfusie en fixatie van de hersenen*

Drie uur nadat biocytine is aangebracht ter hoogte van de optische zenuw, worden de vissen transcardiaal geperfuseerd, zoals beschreven in 3.3.1. Hierna worden de hersenen gedissecteed. Daartoe wordt voorzichtig het schedeldak verwijderd en de optische zenuwen, het ruggenmerg en andere verbindingen met de hersenen doorgeknipt zodat de hersenen volledig intact uit het lichaam verwijderd kunnen worden. De hersenen worden vervolgens overnacht gefixeerd in 4% PFA in 1x PBS op 4°C.

3.6.3 *Inbedden van het weefsel en maken van vibratoomcoupes*

Voor de hersenen ingebed worden, worden ze eerst tweemaal gespoeld in 1x PBS om restanten van PFA te verwijderen. De hersenen worden vervolgens ingebed in een 4% agaroseoplossing in 1x PBS. Eens de agaroseoplossing is uitgehard, worden met behulp van een vibratoom (Microm HM 650V, Thermo Scientific) dwarse coupes gemaakt van 50 µm dikte doorheen het optisch tectum. Deze coupes worden opgevangen in *net wells* gevuld met 1x PBS en bewaard bij 4°C.

3.6.4 *Visualisatie van de geregenereerde axonen*

3.6.4.1 DAB-kleuring

De DAB-kleuring wordt gebruikt om de biocytine, die getransporteerd is door geregenereerde axonen, te visualiseren. Vooreerst worden de *net wells* met de coupes gedurende 20 minuten in een oplossing gezet die 2% H₂O₂ in PBST (1x PBS met 0,1% Triton X-100 (Applichem)) bevat, om de resterende endogene peroxidaseactiviteit te blokkeren. Vervolgens worden ze 20 minuten in een oplossing met 0,1% glycine in PBST gedompeld om mogelijk resterend fixatief te verwijderen. Ondertussen wordt de ABC-oplossing gemaakt (Vectastain ABC kit, Vector laboratories) door aan 15 ml PBST één druppel van oplossing A (avidine DH) en één druppel van oplossing B (gebiotinyleerd HRP) toe te voegen, waarbij tussen de verschillende stappen goed wordt gemengd. Dit mengsel wordt vervolgens 30 minuten in het donker geïncubeerd. Daarna worden de *net wells* voor 90 minuten overgeplaatst naar de ABC-oplossing, eveneens in het donker. Nadien volgen twee spoelstappen waarin de coupes telkens 15 minuten in 1x PBS worden geplaatst, waarna de coupes voor één tot vijf minuten in een oplossing worden gedompeld die 0,05% DAB, 0,2% NiCl₂, 0,2% CoSO₄, en 0,1% H₂O₂ bevat in 1x PBS. Vanuit deze enzymatische reactie ontstaan vrije zuurstofradicalen die het

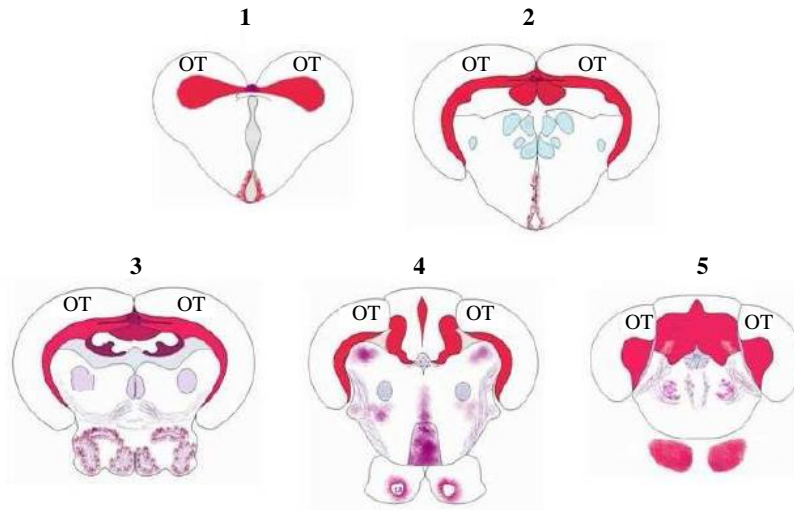
aanwezige DAB oxideren, waardoor het neerslaat en een bruine kleuring veroorzaakt. Deze reactie moet rechtstreeks gevolgd worden onder een lichtmicroscop. Wanneer de kleuring immers voldoende sterk is, wordt de reactie gestopt door de *net wells* over te brengen naar AD. Belangrijk bij deze kleurreactie is dat alle coupes even lang incuberen met H₂O₂ zodat achteraf de kwantificatie correct kan verlopen. Hierna worden de coupes voorzichtig op gelatinegecoate glaasjes gelegd en gedroogd.

3.6.4.2 Tegenkleuring met *neutral red*

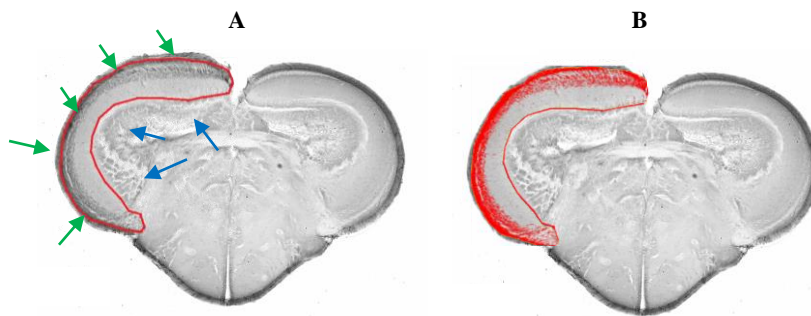
Om celkernen op de hersencoupes te kleuren, wordt nog een tegenkleuring uitgevoerd met *neutral red*. Hiervoor worden de glaasjes met de coupes eerst één tot twee minuten in AD gelegd om te rehydrateren, en daarna gedurende vijf minuten in de *neutral red* oplossing (4 ml acetaatbuffer + 100 ml 1% *neutral red* in AD). Na twee spoelstappen in AD, wordt een dehydratatiereeks doorlopen in 50%, 70% en 95% ethanol, telkens voor drie minuten. Daarna worden de glaasjes tweemaal 15 seconden in 100% aceton geplaatst, gevolgd door eenmaal één minuut en tweemaal vijf minuten in xyleen om te ontvetten. Tot slot worden de coupes toegedekt met dekglasjes door gebruik te maken van DePeX.

3.6.5 Microscopie en data-analyse

Voorafgaand aan de data-analyse, worden eerst lichtmicroscopische foto's gemaakt van de gekleurde coupes met een Zeiss Imager Z1 microscoop met een AxioCam MR3 zwart-wit camera (10x lens) en ZEN software. De foto's worden vervolgens geanalyseerd met behulp van een script geschreven in ImageJ 1.48, dat specifiek gemaakt is voor de kwantitatieve detectie van RGC-axonen in het optisch tectum. Bij deze analyse wordt een onderscheid gemaakt tussen vijf verschillende regio's in het optisch tectum, gaande van rostraal naar caudaal (figuur 10). Voor elke sectie wordt eerst de oppervlakte van het optisch tectum, zonder periventriculaire zone en pia mater, in de rechterhersen helft bepaald (figuur 11A). Dit is de contralaterale hersen helft ten op zichte van de linker optische zenuw, waarnaar de RGC-axonen na ONC bij regeneratie projecteren. Vervolgens wordt gekeken naar de zwartwaarde van elke pixel. Er wordt een grenswaarde voor deze zwartwaarde ingesteld, zodanig dat binnen het optisch tectum enkel de aangekleurde axonen boven de grens liggen (de biocytine⁺ oppervlakte) (figuur 11B). Door de DAB-kleuring hebben de geregenereerde axonen immers een hogere zwartwaarde dan het omliggende gebied. Tenslotte kan de verhouding berekend worden van de biocytine⁺ oppervlakte ten opzichte van de totale oppervlakte van het rechter optisch tectum. Deze verhouding wordt vervolgens relatief ten op zichte van de ongeïnjecteerde controle bekeken en significantie wordt getest met een *one-way* ANOVA, waarbij waarden als significant worden beschouwd wanneer de p-waarde kleiner is dan 0,05.



Figuur 11: De verschillende regio's doorheen het optisch tectum (OT), van rostraal naar caudaal. De verschillende regio's zijn genummerd van 1 tot 5, waarbij 1 het meest rostraal is, en 5 het meest caudaal.



Figuur 12: Methode om de axonale regeneratie te kwantificeren in ImageJ. **A** Eerst wordt de oppervlakte van het optisch tectum bepaald, door dit gebied af te lijnen. De pia mater (groene pijlen) en de periventriculaire zone (blauwe pijlen) worden niet meegenomen. **B** Vervolgens wordt een grenswaarde voor de zwartwaarde ingesteld, zodanig dat enkel de geregenereerde axonen in het optisch tectum boven deze grens liggen. De pixels boven de grenswaarde zijn rood gekleurd.

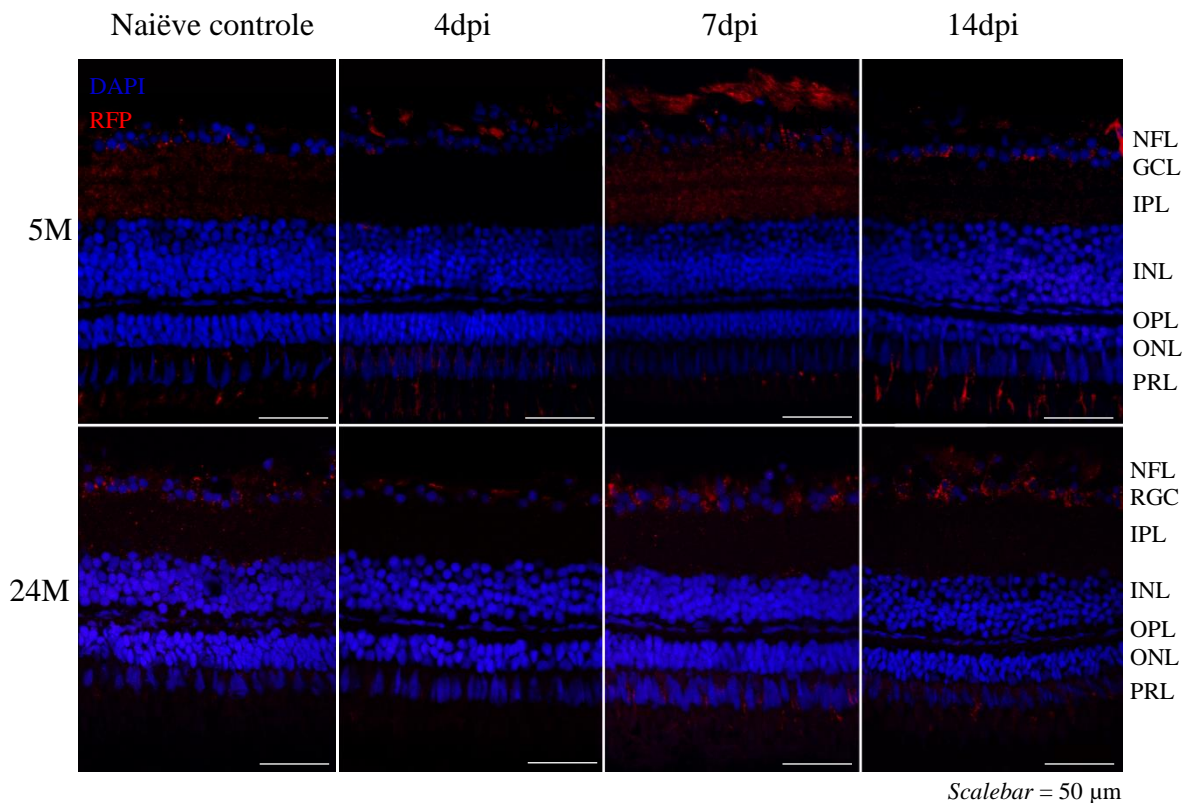
4 Resultaten

4.1 Axonale regeneratie na ONC in jonge adulte vs. verouderde vissen

Verschillende studies tonen aan dat veroudering een daling in het regeneratievermogen met zich meebrengt (Edelmann *et al.* (2013); Galvan en Jin (2007); Graciarena *et al.* (2014); Verdú *et al.* (2000)). Een belangrijke hypothese van deze thesis omvat dan ook dat het axonaal regeneratievermogen van de zebravis daalt met stijgende leeftijd. Om dit te toetsen wordt de aanwezigheid van het groei-geassocieerd proteïne GAP-43, een belangrijke indicator voor axonale (her)uitgroei, onderzocht na ONC in jonge adulte (5 maand oude) en verouderde (24 maand oude) vissen. Met behulp van IHC op cryocoupees van visuele systemen, wordt vooreerst de locatie en abundantie van GAP-43 ter hoogte van de retina bestudeerd, waarna ook ter hoogte van de optische zenuw wordt gekeken.

4.1.1 De aanwezigheid van GAP-43 in de retina van jonge adulte vs. verouderde vissen

Wanneer de aanwezigheid van GAP-43 op verschillende tijdstippen na ONC wordt bestudeerd in de retina van jonge adulte en verouderde vissen, komen duidelijke verschillen in het expressiepatroon naar voor (figuur 13). In de naïeve conditie is zowel bij jonge adulte als bij verouderde vissen een lichte expressie terug te vinden in het cytoplasma van de RGC-somata en in de IPL. Deze situatie blijkt op 1dpi nog niet gewijzigd (niet weergegeven in de figuur). In jonge adulte vissen neemt vanaf drie dagen na ONC (niet weergegeven) en zeker op 4dpi, de abundantie van GAP-43 toe in de RGC-somata en komt GAP-43 bovendien ook sterk voor in de axonen, gelegen in de NFL. Op zeven dagen na ONC blijft GAP-43 sterk aanwezig in zowel de RGC-somata en -axonen, alsook weer in de IPL. De GAP-43 abundantie daalt na 14 dagen en deze lijkt terug te keren naar het basale controleniveau. Verouderde vissen echter, kennen pas vanaf zeven dagen na ONC een toename in GAP-43 abundantie ter hoogte van de RGC-somata en -axonen. Deze sterke expressie is bovendien hier op 14dpi nog steeds aanwezig.

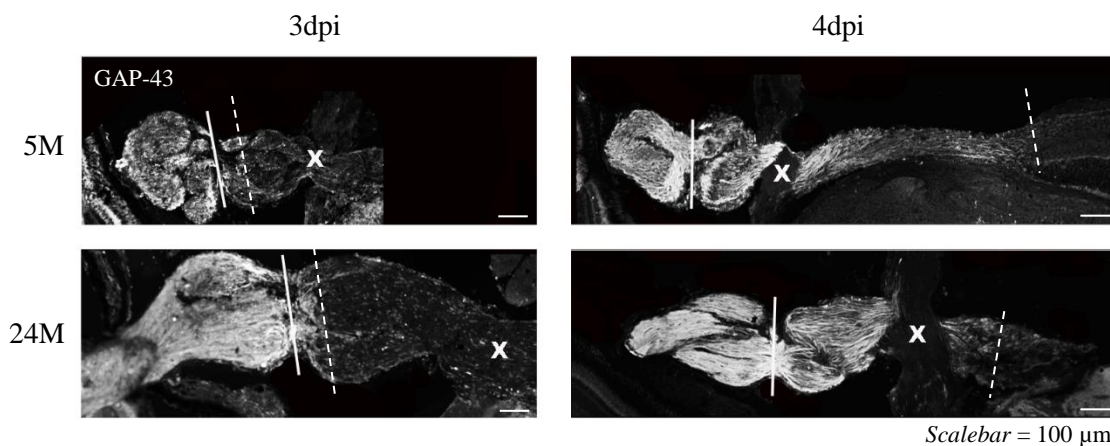


Figuur 13: Expressie en locatie van het groei-geassocieerd proteïne GAP-43 in de retina, na *optic nerve crush* (ONC) in jonge adulte en verouderde vissen. Immunohistochemie voor anti-GAP-43 op representatieve retinale secties van jonge adulte (5maand, 5M) en verouderde vissen (24 maand, 24M) geeft een vertraagd locatiepatroon weer in verouderde vissen, ten opzichte van jonge adulten. In de naïeve conditie is slechts een minimale expressie in de IPL en GCL aanwezig. Op 4dpi (*days post injury*) is GAP-43 daarentegen sterk aanwezig in de RGC-somata en in de RGC-axonen in de NFL in jonge adulte vissen. Op 7dpi bij deze vissen is GAP-43 ook sterk aanwezig in de IPL en lijkt de situatie terug te keren naar de controleconditie op 14 dpi. In verouderde vissen blijft GAP-43 verhoogd aanwezig in de RGC axonen op 7 en 14dpi. NFL: zenuwvezellaag; GCL: ganglioncellaag; IPL: binnenste plexiforme laag; INL: binnenste nucleaire laag; OPL: buitenste plexiforme laag; ONL: buitenste nucleaire laag; PRL: fotoreceptorlaag. n=4.

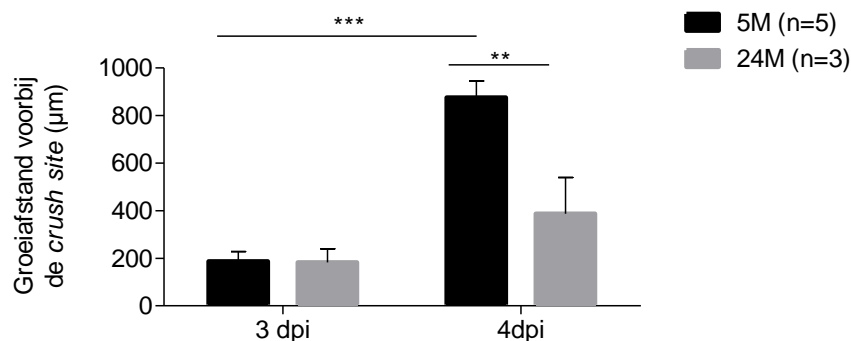
Aangezien ONC een verschillend GAP-43 expressiepatroon uitlokt in jonge adulte en verouderde zebrafissen, wordt beroep gedaan op Western blotting als semi-kwantitatieve methode om de abundantie van GAP-43 op deze twee leeftijden en op verschillende tijdstippen na ONC, na te gaan in de retina. Hiervan kunnen echter nog geen resultaten getoond worden in deze thesis, aangezien de optimalisatie-fase nog niet is afgerond.

4.1.2 De aanwezigheid van GAP-43 in de optische zenuw van jonge adulte vs. verouderde vissen

Na visualisatie van GAP-43 ter hoogte van de zenuw, lijken de GAP-43⁺ axonen zowel in jonge adulte als in verouderde vissen tot net voorbij de *crush site* te groeien, drie dagen na ONC. Op 4dpi bereiken de RGC-axonen reeds het optisch tectum in jonge adulten, terwijl bij de verouderde vissen ze nog niet ver voorbij het optisch chiasme reiken (figuur 14). Wanneer een eerste kwantificatie wordt uitgevoerd van de afgelegde groei afstand van het overgrote deel axonen, gemeten vanaf de *crush site*, blijken de axonen bij zowel jonge adulte als verouderde vissen een afstand afgelegd te hebben van $\pm 185 \mu\text{m}$ ($187 \pm 41 \mu\text{m}$ en $182 \pm 57 \mu\text{m}$, respectievelijk), op 3 dpi. Een dag later reiken de GAP-43⁺ axonen echter reeds tot $875 \pm 70 \mu\text{m}$ voorbij de *crush site* in jonge adulte vissen, terwijl de axonen in verouderde vissen een significant minder grote afstand hebben afgelegd ($387 \pm 152 \mu\text{m}$ vanaf de *crush site*, $p < 0.001$, grafiek 1).



Figuur 14: Expressie en locatie van het groei-geassocieerd proteïne GAP-43 in de optische zenuw na *optic nerve crush* (ONC) in jonge adulte en verouderde vissen. Op 3dpi wordt GAP-43 ongeveer even ver voorbij de *crush site* tot expressie gebracht in jonge adulte (5 maand, 5M) en verouderde vissen (24 maand, 24M). De GAP-43⁺ axonen reiken een dag later in jonge adulte vissen tot in het optisch tectum, terwijl in verouderde vissen deze op 4dpi slechts aanwezig zijn tot net voorbij het chiasme. Het optisch chiasme is weergegeven met een x, de *crush site* met een volle lijn en de plaats waar het overgrote deel van de GAP-43⁺ axonen eindigt met een onderbroken lijn. $n \geq 3$.

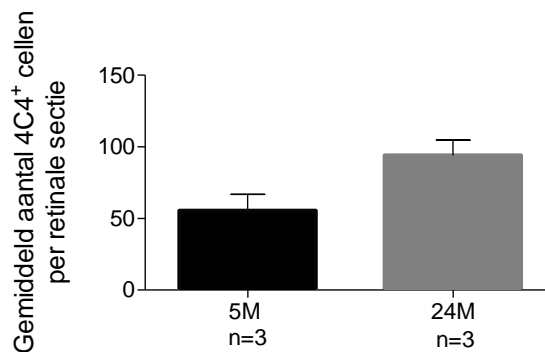


Grafiek 1: Metingen van de groei afstand voorbij de *crush site* (μm) in jonge adulte en verouderde vissen op cryosecties gekleurd met anti-GAP-43. Op 3dpi hebben de axonen in jonge adulte (5 maand, 5M) en verouderde vissen (24 maand, 24M) een even grote afstand afgelegd voorbij de *crush site*, terwijl op 4dpi in de jonge adulte vissen de axonen reeds een significant grotere afstand hebben overbrugd in vergelijking met de verouderde vissen ($p < 0,01$). Foutbalken vertegenwoordigen de standaardfout.

4.2 Karakterisatie van de inflammatoire respons na ONC in jonge adulte vs. verouderde vissen

4.2.1 Inflammaging in de verouderde zebravis

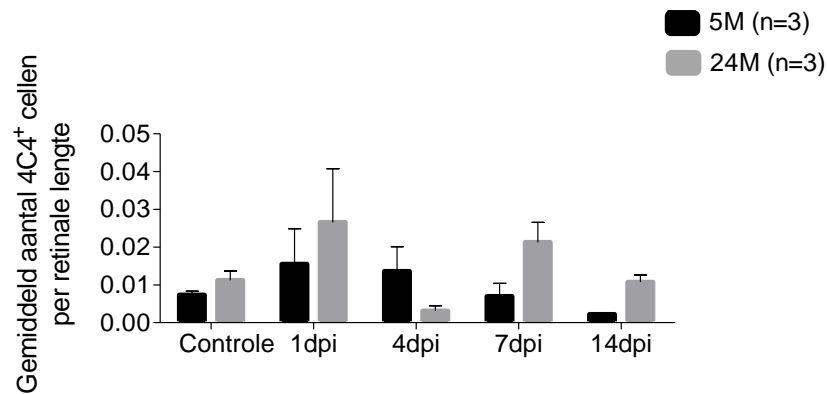
Om de onderliggende oorzaken van een vertraagde axonale regeneratie in verouderde zebravissen na ONC na te gaan, wordt in dit werk specifiek het verschil in inflammatoire respons bestudeerd. In de literatuur wordt immers beschreven dat in oudere zoogdieren *inflammaging* optreedt, een vorm van chronische inflammatie, wat het regeneratief potentieel zou kunnen beïnvloeden (Baylis *et al.* (2013); Franceschi en Campisi (2014)). *Inflammaging* wordt gekarakteriseerd door een verhoogde aanwezigheid van microglia/macrofagen (Lynch *et al.* (2010); Wong (2013)). Wanneer dit wordt nagegaan in de verouderde zebravis aan de hand van de microglia/macrofaag specifieke merker 4C4, wordt vastgesteld dat het aantal 4C4⁺ cellen per retinale sectie in jonge adulte vissen gemiddeld 55±12 is, terwijl in verouderde vissen bijna dubbel zoveel 4C4⁺ cellen aanwezig zijn (gemiddeld 94±11 4C4⁺ cellen per retinale sectie, grafiek 2).



Grafiek 2: Het gemiddelde aantal microglia/macrofagen (gevisualiseerd met het 4C4-antilichaam op cryocoupees) per retinale sectie. In naïeve verouderde zebravissen (24 maand, 24M) is het aantal microglia/macrofagen duidelijk verhoogd ten opzichte van jonge adulten (5 maand, 5M). Foutbalken vertegenwoordigen de standaardfout.

4.2.2 De inflammatoire respons na ONC in jonge adulte vs. verouderde vissen

Om de vorige vaststelling, namelijk het optreden van *inflammaging*, verder te ondersteunen, wordt vervolgens het aantal microglia/macrofagen na ONC in jonge adulte en verouderde vissen bestudeerd. Wederom ligt het aantal microglia/macrofagen in de naïeve controle bij verouderde vissen hoger dan bij jonge adulte vissen (grafiek 3), zoals eerder aangetoond (grafiek 2). Een verschillend inflammatiepatroon na ONC wordt echter vastgesteld in de twee leeftijdscategorieën. In jonge adulte vissen piekt het aantal 4C4⁺ cellen per retinale lengte op 1 en 3dpi, waarna het terug daalt en op 7dpi een waarde aanneemt zoals in de controleconditie. Het aantal microglia/macrofagen bij verouderde vissen piekt echter op 1dpi en deze waarde ligt hoger dan bij jonge vissen. Op een sterke daling op 4dpi na, lijkt het aantal microglia/macrofagen geleidelijk af te nemen ten opzichte van de initiële stijging op 1 dpi, om de waarde uit de controleconditie terug te bereiken op 14dpi. Significante verschillen kunnen voorlopig niet worden aangetoond (grafiek 3).

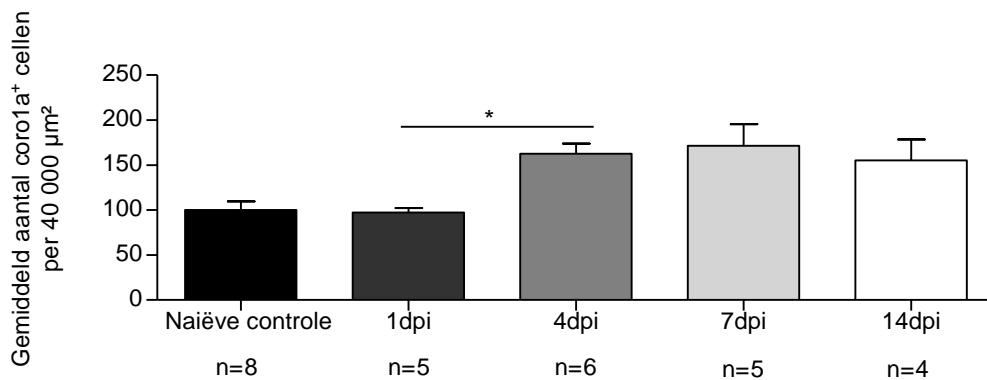


Grafiek 3: Het gemiddeld aantal 4C4⁺ cellen per retinale lengte na *optic nerve crush* (ONC), gevisualiseerd met het 4C4-antilichaam. In verouderde vissen (24 maand, 24M) is het gemiddeld aantal 4C4⁺ cellen per retinale lengte groter dan in jonge adulte vissen (5 maand, 5M). In jonge adulten stijgt het aantal microglia/macrofagen op 1 en 4dpi, waarna het daalt en op 7dpi een waarde aanneemt gelijkaardig als in de controleconditie. Op 1dpi piekt het aantal microglia/macrofagen in verouderde vissen (waarde groter dan in jonge adulten), waarna het vanaf 7dpi geleidelijk lijkt te dalen, ten opzichte van de sterke stijging op 1dpi. De controlewaarde wordt in verouderde vissen 14 dagen na ONC bereikt. Foutbalken vertegenwoordigen de standaardfout.

Het inflammatiepatroon in jonge adulte en verouderde zebrafissen wordt momenteel verder nagegaan met Western blotting aan de hand van het 4C4-antilichaam. Hiervan worden nog geen resultaten getoond in deze thesis, aangezien de optimalisatie-fase nog niet is afgerond.

4.2.3 Specifieke karakterisatie van de inflammatoire respons na ONC in jonge adulte vissen: gebruik van de transgene lijn Tg(*coro1a:eGFP*)

De waargenomen trend van het aantal microglia/macrofagen na ONC in jonge adulte vissen, wordt verder geverifieerd door gebruik te maken van de transgene lijn Tg(*coro1a:eGFP*), waarin microglia/macrofagen en neutrofielen groen fluorescent worden weergegeven. Verouderde vissen worden niet meegenomen in dit experiment aangezien nog geen verouderde vissen (24 maand) beschikbaar zijn van deze transgene lijn. In jonge adulte transgene vissen wordt echter een ander inflammatiepatroon vastgesteld dan waargenomen na 4C4⁺ celtellingen. Het aantal *coro1a*⁺ cellen, geteld op retinale *whole mounts*, blijft immers op 1dpi stabiel, waarna op 4 en 7dpi een grote stijging waar te nemen is. Op 14dpi begint het aantal inflammatoire cellen te dalen. Het aantal *coro1a*⁺ cellen is op 4dpi significant verhoogd ten opzichte van 1dpi ($p < 0,05$, grafiek 4).

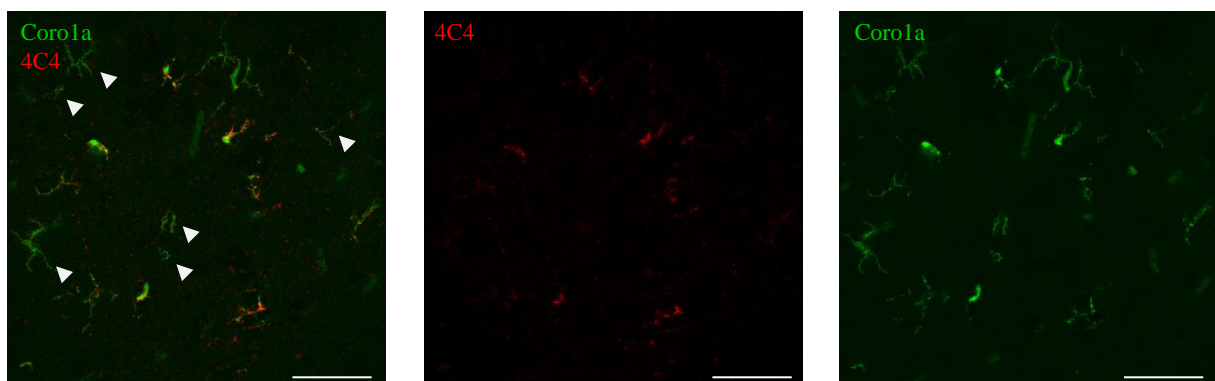


Grafiek 4: Het gemiddeld aantal coro1a⁺ cellen per 40 000 μm² in jonge adulte vissen van de lijn Tg(*coro1a:eGFP*) na optic nerve crush (ONC), geteld op retinale whole mounts. Het gemiddeld aantal coro1a⁺ cellen blijft gelijk op 1dpi (*days post injury*) in jonge adulte vissen (5 maand). Op 4 en 7dpi stijgt dit aantal, waarna het op 14dpi reeds minimaal is gedaald. Het aantal positieve cellen is op 4dpi significant verhoogd ten opzichte van 1dpi ($p < 0,05$). Foutbalken vertegenwoordigen de standaardfout.

Western blotting met het antilichaam anti-coro1a wordt hier momenteel toegepast om deze trend te verifiëren. Hiervan worden nog geen resultaten weergegeven (optimalisatie-fase).

4.2.4 Verschil in het aantal gelabelde cellen in de transgene lijn Tg(*coro1a:eGFP*) en na kleuring met het 4C4-antilichaam

Omdat duidelijk twee verschillende trends worden vastgesteld in het aantal microglia/macrofagen na ONC in jonge adulte vissen, met behulp van deze twee methoden (IHC met het 4C4-antilichaam en Tg(*coro1a:eGFP*) (grafiek 3 en 4, respectievelijk), wordt het verschil in aantal gelabelde cellen nagegaan in de transgene lijn Tg(*coro1a:eGFP*), aangekleurd met het 4C4-antilichaam. Inderdaad, het aantal gelabelde cellen na gebruik van het 4C4-antilichaam ligt duidelijk lager dan het aantal coro1a⁺ cellen (figuur 15).



Scalebar = 50 μm

Figuur 15: Een representatief detail van een 4C4-kleuring op hersencoupees van vissen uit de lijn Tg(*coro1a:eGFP*). Het aantal gelabelde cellen ligt lager wanneer met het 4C4-antilichaam wordt aangekleurd dan in de transgene lijn fluorescent wordt weergegeven. Met witte pijlpunten zijn duidelijke voorbeelden aangetoond waarbij microglia/macrofagen gelabeld zijn in de transgene lijn, maar niet met de 4C4-kleuring. n=2.

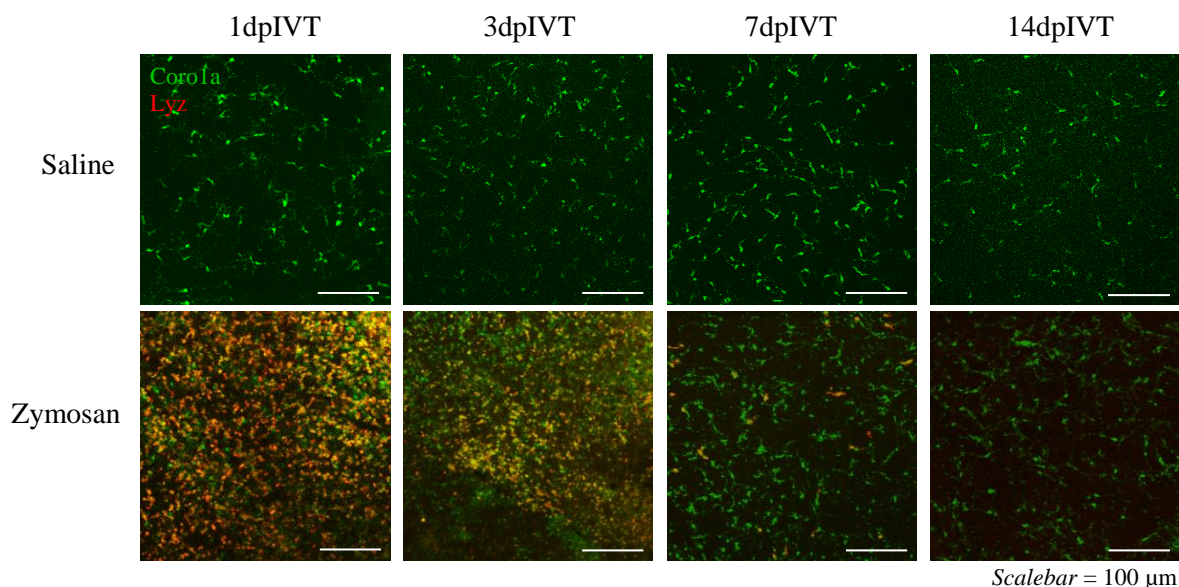
4.3 Modulatie van de inflammatoire respons in jonge adulte vissen

Om de invloed van inflammatie op axonale regeneratie verder te bestuderen, wordt in volgende experimenten getracht het inflammatieproces te moduleren in jonge adulte vissen. Verouderde vissen worden in deze experimenten nog niet meegenomen omwille van de kostbaarheid van deze vissen en omdat, zelfs zonder veroudering in rekening te brengen, het inflammatieproces een complex proces is. Bovendien worden hier ook vissen gebruikt van de transgene lijnen *Tg(corola:eGFP)* en *Tg(corola:eGFP; lyz:DsRed)*, waarvan nog geen verouderde vissen beschikbaar zijn. Enerzijds wordt zymosan gebruikt om een immunostimulatie op te wekken, anderzijds worden DEX en clodronaat liposomen gebruikt om de immuunrespons te onderdrukken. Vooreerst wordt nagegaan wat het effect van de verschillende componenten is op het aantal en het fenotype van microglia/macrofagen, waarna ook de invloed op axonale regeneratie na ONC wordt onderzocht.

4.3.1 Immunostimulatie aan de hand van een intravitreale injectie van zymosan

4.3.1.1 Effect van een intravitreale injectie van zymosan ter hoogte van de retina en het optisch tectum

In dit werk wordt vooreerst bevestigd dat een intravitreale injectie van zymosan een infiltratie van macrofagen en neutrofielen induceert, zoals in de literatuur beschreven wordt (Yin *et al.* (2003); Zou *et al.* (2013). Inderdaad, een duidelijk infiltratiepatroon van immuuncellen komt naar voor na injectie van zymosan, terwijl in controlevissen geïnjecteerd met saline het aantal fluorescente cellen stabiel blijft na injectie. Het aantal neutrofielen (geel fluorescent) en microglia/macrofagen (groen fluorescent) stijgt op 1 en 3dpIVT zeer sterk, terwijl op 7dpIVT slechts enkele neutrofielen en ook al minder microglia/macrofagen aanwezig zijn. Op 14dpIVT zijn al de neutrofielen verdwenen en is het aantal microglia/macrofagen slechts minimaal verhoogd ten opzichte van de controleconditie (figuur 16).

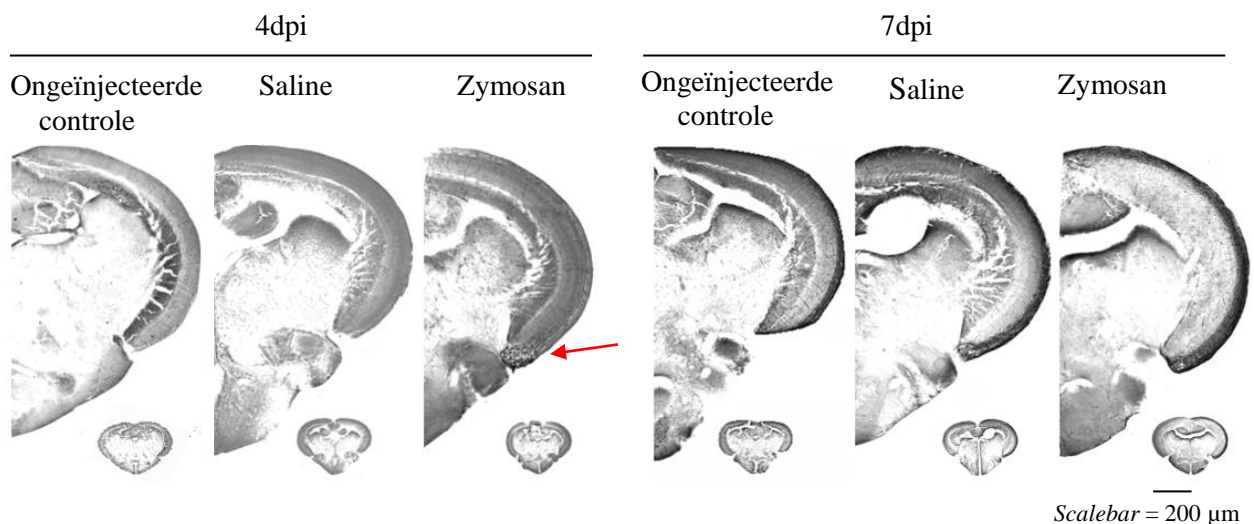


Figuur 16: Representatief detail van de *whole mount* retina's op 1, 3, 7 en 14dpIVT (*days post intravitreal injection*), geïnjecteerd met saline of zymosan. In de controleconditie blijft het aantal immuuncellen stabiel na injectie. In de zymosanconditie is echter een stijging waar te nemen van het aantal microglia/macrofagen en neutrofielen op 1 en 3dpIVT. Op 7 en 14dpIVT is dit aantal opnieuw sterk gedaald. n=3.

Om te bepalen of een intravitreale injectie van zymosan een inflammatoire respons opwekt in het optisch tectum, zijn ook de hersenen van dezelfde vissen bekeken. Echter, zowel na behandeling met saline als met zymosan, blijft het aantal corola⁺ cellen op een basaal niveau en kan dus geen verschil tussen beide condities worden waargenomen (figuren niet weergegeven).

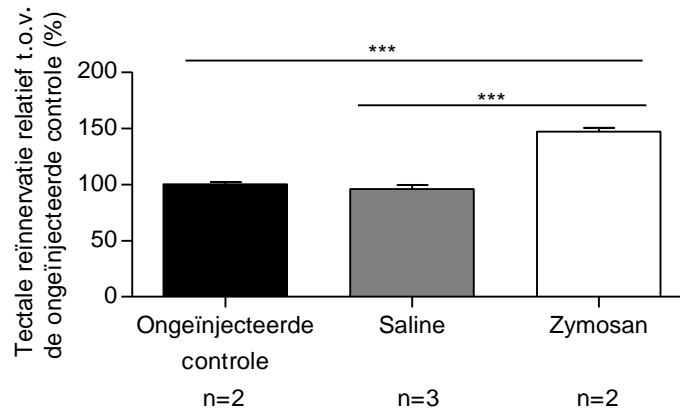
4.3.1.2 Invloed van een intravitreale zymosaninjectie op axonale regeneratie na ONC

In de literatuur wordt beschreven dat een intravitreale injectie van zymosan axonale regeneratie versnelt in de zebravis na ONC (Zou *et al.* (2013)). Om dit effect te bevestigen wordt het percentage van reïnnervatie in het optisch tectum bepaald, waarbij zymosan drie dagen voor ONC intravitreaal geïnjecteerd wordt. In de ongeïnjecteerde controle en de salineconditie zijn op 4dpi nog geen geregenereerde axonen waar te nemen in het optisch tectum, terwijl in de zymosanconditie op 4dpi hier de eerste axonen al toekomen. Daarnaast is op 7dpi de tectale innervatie groter na behandeling met zymosan dan met saline en dan in de ongeïnjecteerde vissen (figuur 17).



Figuur 17: Regeneratie van axonen in het optisch tectum op 4 en 7dpi (days post injury), na intravitreale injectie van saline of zymosan (drie dagen voor ONC, optic nerve crush), of zonder injectie. Op 4dpi komen de eerste axonen reeds aan in het optisch tectum in de conditie met zymosaninjectie (rode pijl), terwijl in de saline en ongeïnjecteerde conditie nog geen axonen waarneembaar zijn. Op 7dpi is het aantal geregenereerde axonen groter in de zymosanconditie dan in de salineconditie en dan in de ongeïnjecteerde controle. $n \geq 2$.

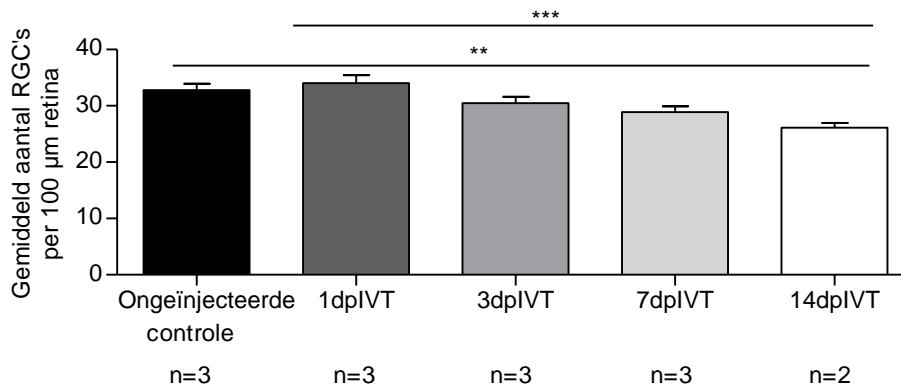
Na kwantificatie wordt een groter percentage tectale reïnnervatie gevonden in de zymosanconditie ($147 \pm 3\%$) dan in de ongeïnjecteerde ($100 \pm 2\%$) en de saline geïnjecteerde vissen ($96 \pm 4\%$) (grafiek 5). De stijging waargenomen in de vissen geïnjecteerd met zymosan is significant verschillend in vergelijking met de twee controlecondities ($p < 0,001$).



Grafiek 5: Kwantificatie van tectale reïnnervatie op 7dpi (*days post injection*), na intravitreale injectie van saline of zymosan (drie dagen voor *ONC, optic nerve crush*), of zonder injectie. Tectale reïnnervatie, is significant verhoogd in de zymosanconditie ten opzichte van de ongeïnjecteerde controle en de salineconditie ($p < 0,001$). Foutbalken vertegenwoordigen de standaardfout.

4.3.1.3 Invloed van een intravitreale zymosaninjectie op lange-termijn RGC-overleving

Zou *et al.* (2013) hebben ook aangetoond dat een intravitreale zymosaninjectie een negatief effect heeft op de lange-termijn overleving van de RGC's in de retina van de zebravis, zonder het uitvoeren van een *ONC* (Zou *et al.* (2013)). Ook in dit werk wordt een significante daling van het aantal RGC's per 100 μ m waargenomen, van gemiddeld 33 \pm 1 RGC's in de ongeïnjecteerde controle en 34 \pm 1 RGC's op één dag na zymosaninjectie naar gemiddelde 26 \pm 1 RGC's op 14 dagen na zymosaninjectie ($p < 0,01$ en $p < 0,001$, respectievelijk) (grafiek 6).



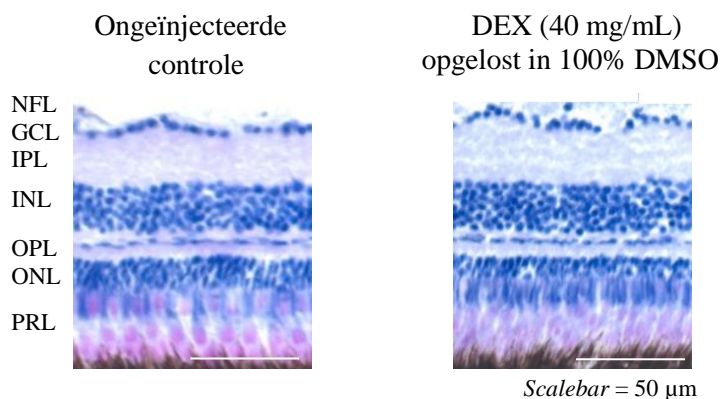
Grafiek 6: Kwantificatie van het aantal RGC's per 100 μ m retina, al dan niet na injectie van zymosan. Het aantal RGC's per 100 μ m daalt significant in de ongeïnjecteerde controle en één dag na zymosaninjectie ten opzichte van 14 dagen na zymosaninjectie ($p < 0,01$ en $p < 0,001$, respectievelijk). *DpIVT: days post intravitreal injection*. Foutbalken vertegenwoordigen de standaardfout.

4.3.2 Immunosuppressie aan de hand van een intravitreale injectie van dexamethasone

4.3.2.1 Effect van een intravitreale injectie van dexamethasone ter hoogte van de retina

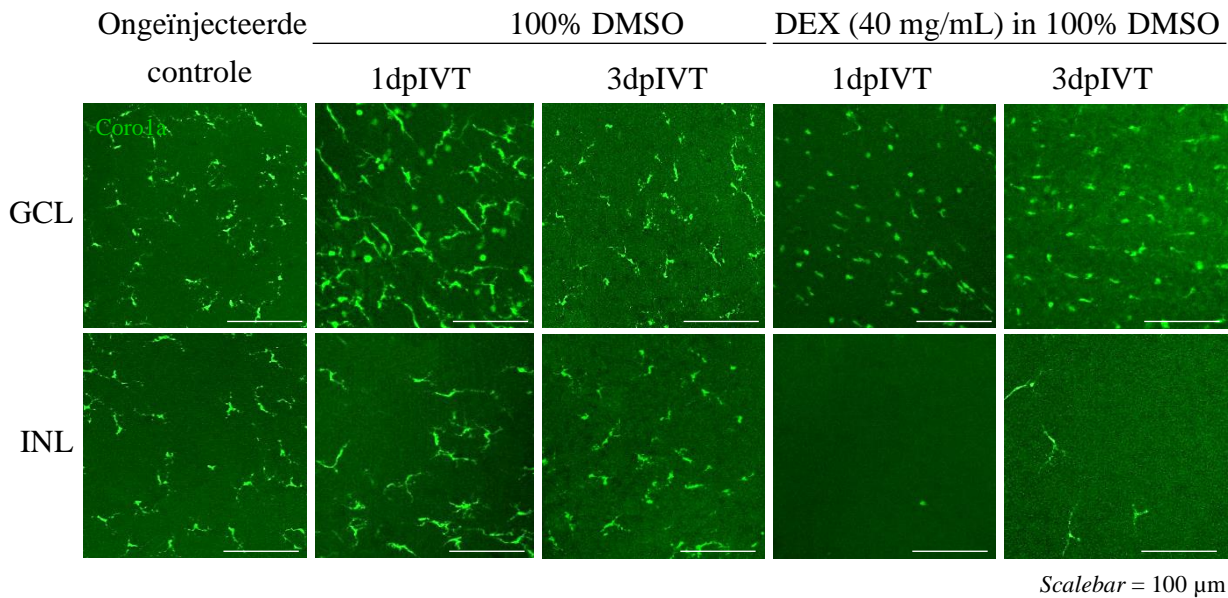
Naast immunostimulatie, kan de immuunrespons ook gemoduleerd worden via immunosuppressie. Een eerste manier om dit uit te voeren, is door intravitreale injectie van de anti-inflammatoire drug DEX. Het effect van DEX wordt nagegaan door vissen van de transgene lijn *Tg(corola:eGFP)*, waarin microglia/macrofagen en neutrofielen GFP tot expressie brengen, te injecteren met 40 mg/mL DEX, opgelost in 100% DMSO.

Vooreerst wordt de invloed nagegaan van een intravitreale injectie met 100% DMSO, dat gebruikt wordt als vehikel, op de retinale morfologie via een H&E-kleuring. Er wordt echter op 3dpi geen verschil waargenomen tussen beide condities. Alle retinale lagen behouden hun dikte en er is geen duidelijk verschil in het aantal neuronen waar te nemen (figuur 18).



Figuur 18: H&E-kleuring uitgevoerd op retinale secties, drie dagen na injectie van dexamethasone (DEX) opgelost in 100% DMSO, of zonder injectie. De retinale morfologie in de condities met DEX opgelost in 100% DMSO verschilt niet van deze in de ongeïnjecteerde controle. NFL: zenuwvezellaag; GCL: ganglioncellaag; IPL: binnenste plexiforme laag; INL: binnenste nucleaire laag; OPL: buitenste plexiforme laag; ONL: buitenste nucleaire laag; PRL: fotoreceptorlaag; n=2.

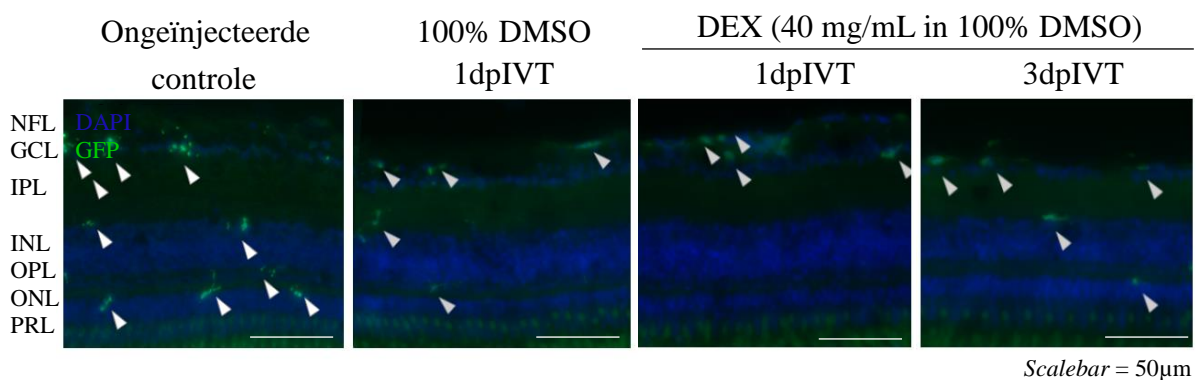
Om verder het aantal en de morfologie van de *coro1a*⁺ cellen, gevisualiseerd in *whole mount* retina's, duidelijk weer te geven, worden in de volgende figuren de GCL enerzijds, en de INL anderzijds, apart getoond. Dit zijn tevens de retinale lagen waar veruit de meeste *coro1a*⁺ cellen zich bevinden. De vehikelconditie (100% DMSO) verschilt slechts in kleine mate met de conditie zonder injectiebehandeling. De meeste *coro1a*⁺ cellen hebben namelijk een vertakt fenotype met uitlopers, net zoals in de ongeïnjecteerde controleretina's, op een paar amoëboïde cellen in de GCL op 1dpiVT na. In de *whole mount* retina's van de vissen na behandeling van DEX hebben de *coro1a*⁺ cellen op 1 en 3dpiVT in de GCL een amoëboïd fenotype, zonder uitlopers. Het aantal *coro1a*⁺ cellen in de INL is duidelijk gedaald; slechts enkele cellen zijn hier waar te nemen op 3dpiVT, allemaal met het vertakte fenotype (figuur 19).



Figuur 19: Representatief detail van de ongeïnjecteerde *whole mount* retina, en op 1 en 3dpIVT (*days post intravitreal injection*), geïnjecteerd met dexamethasone (DEX, 40 mg/mL, opgelost in 100% DMSO) of 100% DMSO. De behandeling met 100% DMSO heeft slechts een minimaal effect op het aantal en morfologie van de *coro1a*⁺ cellen; enkel op 1dpIVT in de GCL zijn een aantal amoëboïde cellen zichtbaar. Na behandeling met DEX zijn in de GCL enkel amoëboïde cellen te zien en in de INL is het aantal cellen drastisch verlaagd. De cellen aanwezig in de INL na behandeling van DEX op 3dpIVT hebben allemaal een vertakt fenotype.

GCL: ganglioncellaag; INL: buitenste nucleaire laag. n=3.

De cryocoupees gemaakt van deze *whole mount* retina's, gekleurd met een anti-GFP antilichaam, tonen vergelijkbare patronen. In de vehikelconditie hebben de meeste fluorescente cellen, net zoals in de ongeïnjecteerde retina, een vertakt fenotype en bevinden ze zich voornamelijk in de GCL en in de INL. Na behandeling met DEX, hebben de immuuncellen een rond fenotype en bevinden ze zich in de GCL, terwijl nauwelijks cellen aanwezig zijn in de INL (figuur 20).



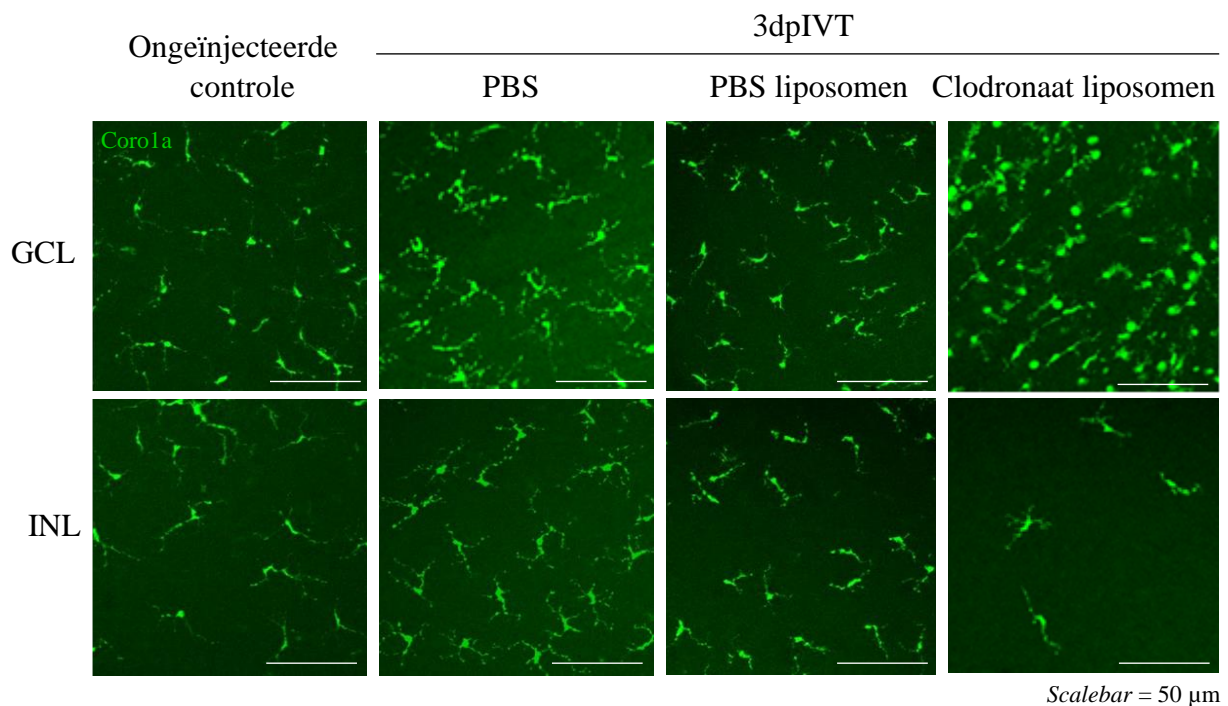
Figuur 20: Representatief detail van de retinale secties gekleurd met anti-GFP, gemaakt van de *whole mount* retina's uit figuur 19. In de ongeïnjecteerde en vehikelconditie bevinden de *coro1a*⁺ cellen zich verspreid over de retina. Na behandeling met dexamethasone (DEX) bevinden op 1 en 3dpIVT veel cellen zich in de GCL, en nemen ze een amoëboïde vorm aan. In de INL zijn na behandeling met DEX nauwelijks cellen aanwezig. *Coro1a*⁺ cellen zijn weergegeven met een witte pijlpunt. NFL: zenuwvezellaag; GCL: ganglioncellaag; IPL: binnenste plexiforme laag; INL: binnenste nucleaire laag; OPL: buitenste plexiforme laag; ONL: buitenste nucleaire laag; PRL: fotoreceptorlaag. n=3.

Om celdood via apoptose na te gaan, worden tenslotte de cryocoupees gekleurd voor geactiveerd caspase-3. Hierbij wordt geen enkele aangekleurde cel waargenomen, die ook *coro1a*⁺ is (figuren niet weergegeven). Coupes van het cerebellum van muispups (P8) werden gebruikt als positieve controle en vertonen wel het gekende aantal apoptotische cellen (Van Hove *et al.* (2012)).

4.3.3 Immunosuppressie aan de hand van een intravitreale injectie van clodronaat liposomen

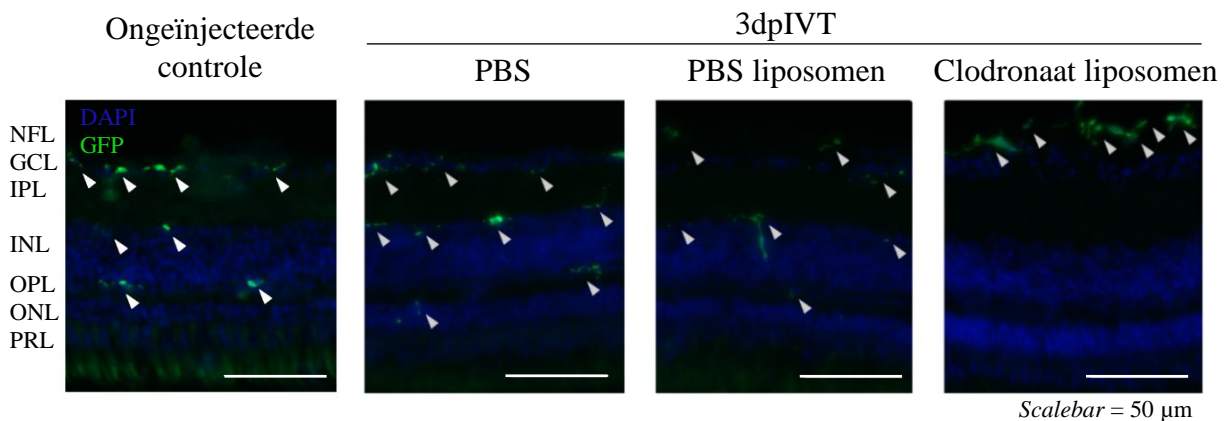
4.3.3.1 Effect van een intravitreale injectie van clodronaat liposomen ter hoogte van de retina

Een tweede manier om immunosuppressie te bekomen, is door gebruik te maken van een intravitreale injectie van clodronaat liposomen. De retina's van controlevissen geïnjecteerd met 1xPBS en PBS liposomen vertonen een gelijkaardig beeld als de ongeïnjecteerde controles, waarbij zowel in de GCL als in de INL *coro1a*⁺ cellen met een vertakt fenotype waar te nemen zijn. Na injectie van clodronaat liposomen hebben de meeste aangekleurde cellen in de GCL een amoëboïde vorm, zonder uitlopers. Het aantal *coro1a*⁺ cellen is in de INL bovendien duidelijk gedaald en hier zijn slechts enkele *coro1a*⁺ cellen te zien, allemaal met een vertakt fenotype (figuur 21).



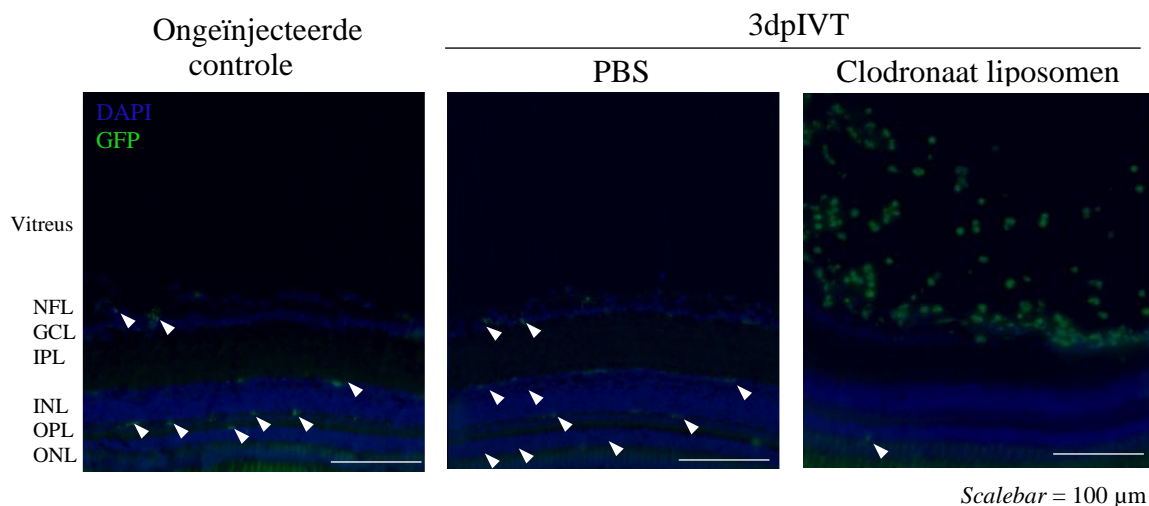
Figuur 21: Representatief detail van de ongeïnjecteerde whole mount retina's of op 3dpIVT (days post intravitreal injection), na injectie met 1x PBS, PBS liposomen of clodronaat liposomen. De injectie met 1xPBS en PBS liposomen heeft geen effect op de behandeling en morfologie van de *coro1a*⁺ cellen. Na behandeling met clodronaat liposomen, zijn in de GCL voornamelijk amoëboïde cellen te zien en in de INL is het aantal cellen drastisch verlaagd. De cellen aanwezig in de INL na behandeling met clodronaat liposomen op 3dpIVT hebben allemaal een vertakt fenotype. GCL: ganglioncellaag; INL: binnenste nucleaire laag. n=3.

Wederom worden op de cryocoupees gemaakt van deze *whole mount* retina's, gekleurd met een anti-GFP antilichaam, gelijkaardige resultaten vastgesteld. In de ongeïnjecteerde retina's en deze geïnjecteerd met 1x PBS en PBS liposomen worden vertakte cellen met uitlopers gevisualiseerd. Na behandeling met clodronaat liposomen bevinden de eerder amoëboïde $coro1a^+$ cellen zich voornamelijk in de NFL en in de GCL (figuur 22). Ook hier worden met een antilichaam tegen geactiveerd caspase-3 geen $coro1a^+$ cellen aangekleurd (figuren niet weergegeven).



Figuur 22: Representatief detail van de retinale secties gekleurd met anti-GFP, gemaakt van de *whole mount* retina's uit figuur 21. In de naïeve conditie, PBS (3dpIVT) en PBS liposomen (3dpIVT), hebben de cellen een vertakt fenotype en liggen ze verspreid over de retina. In de conditie waarbij de vissen behandeld zijn met clodronaat liposomen bevinden veel amoëboïde cellen zich in de NFL en GCL. $Coro1a^+$ cellen zijn weergegeven met een witte pijlpunt. NFL: zenuwvezellaag; GCL: ganglioncellaag; IPL: binnenste plexiforme laag; INL: binnenste nucleaire laag; OPL: buitenste plexiforme laag; ONL: buitenste nucleaire laag; PRL: fotoreceptorlaag. n=3.

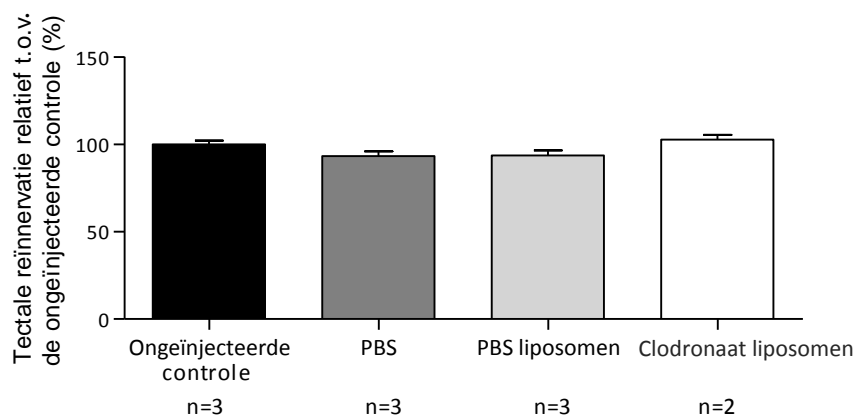
Figuur 22 doet vermoeden dat de $coro1a^+$ cellen zich na behandeling met clodronaat liposomen naar de vitreus verplaatsen. Ook na behandeling van DEX lijkt het alsof de $coro1a^+$ cellen naar de vitreus gaan. Op cryocoupees gemaakt van *whole mount* retina's is de vitreus echter niet meer aanwezig. Daarom worden cryocoupees gemaakt van ogen, na intravitreale injectie van clodronaat liposomen (3dpIVT), gekleurd met anti-GFP. Op deze coupes, waarop de vitreus nog wel aanwezig is, is weergegeven dat de $coro1a^+$ cellen zich inderdaad verplaatsen naar de vitreus na behandeling met clodronaat liposomen (figuur 23).



Figuur 23: Representatief detail van de retinale secties gekleurd met anti-GFP, na injectie van PBS of clodronaat liposomen 3dpIVT (days post intravitreal injection), of zonder injectie. In de naïeve retina en na injectie van PBS, bevinden de $Coro1a^+$ cellen zich verspreid over de retina. In de retina's van de vissen behandeld met clodronaat liposomen daarentegen zijn deze cellen voornamelijk in de vitreus aanwezig. $Coro1a^+$ cellen in de retina zijn weergegeven met een witte pijlpunt. NFL: zenuwvezellaag; GCL: ganglioncellaag; IPL: binnenste plexiforme laag; INL: binnenste nucleaire laag; OPL: buitenste plexiforme laag; ONL: buitenste nucleaire laag. n=2.

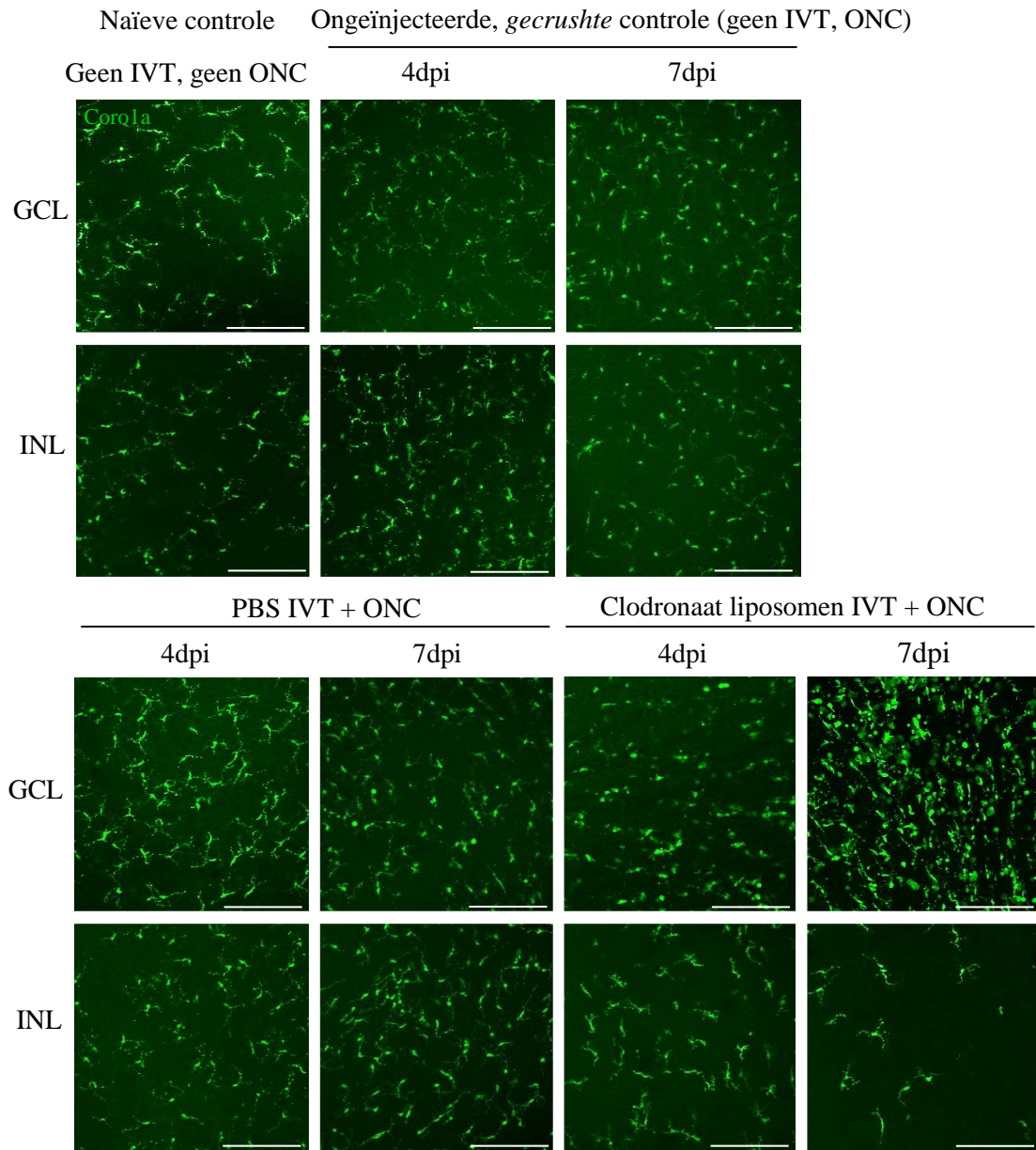
4.3.3.2 Invloed van een intravitreale injectie van clodronaat liposomen op axonale regeneratie na ONC

Na het bepalen van het effect van een intravitreale injectie van clodronaat liposomen op het aantal en het fenotype van de $Coro1a^+$ cellen, wordt de invloed hiervan op axonale regeneratie na ONC nagegaan. De kwantificatie van het percentage van het tectum dat gereïnnerveerd is, toont echter geen verschillen aan tussen de verschillende condities, namelijk zonder injectie of na injectie van PBS, PBS liposomen of clodronaat liposomen (grafiek 7).



Grafiek 7: Kwantificatie van tectale reïnnervatie op 7dpi (days post injury), na intravitreale injectie van PBS, PBS liposomen of clodronaat liposomen, of zonder injectie. Tectale reïnnervatie is overall ongeveer gelijk, geen significant verschil kan worden aangetoond. Foutbalken vertegenwoordigen de standaardfout.

Om de processen die in de retina afspelen tijdens het regeneratieproces na injectie van clodronaat liposomen te achterhalen, worden *whole mount* retina's van vissen van de transgene lijn Tg(*coro1a:eGFP; lyz:DsRed*) geïnjecteerd met clodronaat liposomen en na ONC bestudeerd. Het aantal gevisualiseerde cellen in de ongeïnjecteerde, *gecrushte* controle (geen IVT, wel ONC) ligt op 4 en 7dpi hoger dan in de naïeve controle (geen IVT, geen ONC), zowel in de GCL als in de INL. Op 7dpi in de ongeïnjecteerde, *gecrushte* controle worden reeds geactiveerde cellen waargenomen. Ook op 4 en 7dpi na injectie van 1x PBS stijgt het aantal vertakte cellen in de INL en GCL na ONC en verschijnen geactiveerde cellen. Na behandeling met clodronaat liposomen zijn in de GCL amoëboïde cellen terug te vinden op 4dpi en dit aantal stijgt nog op 7dpi. In de INL zijn in deze conditie vertakte cellen gevisualiseerd op 4dpi na behandeling van clodronaat liposomen, maar minder dan in de controlecondities. Dit aantal is lager op 7dpi (figuur 24).



Scalebar = 100 μ m

Figuur 24: Detailfoto's van de ongeïnjecteerde *whole mount* retina's (zonder *optic nerve crush* (ONC) of op 4 en 7dpi (*days post injury*)), en na ONC en injectie van 1x PBS of clodronaat liposomen (4 en 7dpi). In de ongeïnjecteerde + *gecrushte* controle en de PBS-controle zijn veel microglia/macrofagen aanwezig op 4 en 7dpi (meer dan in de naïeve controle), zowel in de GCL als in de INL. Op 7dpi zijn ook geactiveerde microglia/macrofagen aanwezig. In de conditie na injectie van clodronaat liposomen, zijn in de GCL amoëboïde cellen terug te vinden, meer op 7dpi dan op 4dpi. In de INL tenslotte zijn op 4dpi vertakte microglia/macrofagen aanwezig. Dit aantal ligt lager dan in de ongeïnjecteerde controle. GCL: ganglioncellaag; INL: binnenste nucleaire laag. $n \geq 2$.

5 Discussie en toekomstperspectieven

5.1 Axonale regeneratie vertraagt in de verouderde zebravis

Veroudering gaat gepaard met de accumulatie van verschillende schadelijke veranderingen in cellen en weefsels, wat de capaciteit voor neuroregeneratie verlaagt. Zo is geweten dat de beperkte neurogene capaciteit van de weinige stamcellen in de subgranulaire zone van de hippocampus drastisch daalt in verouderde knaagdieren en niet-mensapen (Galvan en Jin (2007)). Ook bij zebravissen vermindert neurogenese naarmate de leeftijd stijgt in verschillende delen van de hersenen zoals de olfactorische bulbi en het telencephalon (Edelmann *et al.* (2013)). De invloed van veroudering op het axonaal regeneratiepotentieel in het CZS daarentegen, is weinig bestudeerd. Wel wordt beschreven dat in het PZS van verouderde ratten en muizen, minder neuronen na axotomie regenereren, in vergelijking met jonge adulte dieren (Verdú *et al.* (2000); Vaughan (1992)). Bovendien treedt axonale regeneratie na beschadiging van de posterieure laterale lijn later op in verouderde zebravissen (Graciarena *et al.* (2014)). Gebaseerd op de literatuur is de centrale hypothese van deze thesis dan ook dat axonale regeneratie na ONC vermindert/vertraagt in zebravissen naarmate de leeftijd stijgt.

Om deze hypothese te toetsen kan gekeken worden naar de abundantie en locatie van het groei-geassocieerde proteïne GAP-43 in de retina en de optische zenuw, na uitvoeren van ONC. Inderdaad, het expressiepatroon van GAP-43 na ONC, wordt reeds in meerdere studies in de zebravis naar voor geschoven als een essentieel kenmerk van axonale (her)uitgroei en een relatief makkelijke manier om axonale regeneratie op te volgen (Kaneda *et al.* (2008); Diekmann *et al.* (2015)).

Zo schetst Kaneda *et al.* (2008) via Western blotting na transsectie een stijging van het GAP-43 proteïne in de retina van zebravissen tussen 1 en 3dpi en een piekwaarde tussen 5 en 20dpi. Hierna daalt de hoeveelheid GAP-43 gestaag naar controleniveaus, die worden bereikt op 80 dagen na transsectie. Aan de hand van IHC wordt bij het onderzoek van Kaneda *et al.* (2008) een sterk verhoogde GAP-43 expressie in de RGC-somata en -axonen gelokaliseerd na ONC, die nog steeds versterkt waargenomen wordt op 50dpi. Dit is in contrast met deze thesis; in het hier uitgevoerde experiment lijkt de abundantie van GAP-43 reeds te normaliseren na twee weken in jonge adulte vissen (figuur 13).

De snelheid van axonale regeneratie hangt echter sterk af van het soort en de plaats van de schade (Fisher en Leibinger (2012); Villegas-Pérez *et al.* (1993); You *et al.* (2000)). Na transsectie van de optische zenuw, die bovendien verder van het optisch zenuwhoofd wordt uitgevoerd (1 mm van het optisch zenuwhoofd), zal regeneratie en dus ook het GAP-43 tijds patroon natuurlijkerwijze trager verlopen, in vergelijking met wat in deze thesis geobserveerd wordt na het uitvoeren van een ONC op 0,5 mm van het optisch zenuwhoofd (figuur 13).

Inderdaad, in een recente paper van Diekmann *et al.* (2015) wordt eveneens het expressiepatroon van GAP-43 na ONC bestudeerd, aan de hand van een Tg(*GAP-43;GFP*) lijn, en hier wordt ook een sneller regeneratiepatroon vastgesteld. Diekmann *et al.* (2015) beschrijven evenzeer GFP-expressie in naïeve adulte vissen (8 maand), die zich situeert in de somata van de RGC's en in mindere mate ter hoogte van de IPL. Na *crush* wordt GFP reeds op 3dpi en zeker op 4dpi sterk in de RGC-axonen, gelegen in de NFL, waargenomen en verhoogt ook de GAP-43 expressie in de RGC-somata. Aansluitend bij de resultaten bekomen in dit werk (figuur 13), tonen Diekmann *et al.* (2015) aan dat deze verhoogde GFP-expressie in de NFL aanhoudt tot 6dpi, waarna het GFP signaal daalt in de axonen. GAP-43 blijft tot 14dpi nog steeds in mindere mate aanwezig in de RGC-somata en –axonen in adulte vissen. In deze thesis lijkt echter de abundantie van GAP-43 reeds naar controleniveaus te zakken op 14dpi. Het GAP-43 expressiepatroon na ONC in deze Tg(*GAP-43;GFP*) vissen, komt dus in grote lijnen overeen met het patroon beschreven in dit werk (figuur 13).

Hoewel de expressie van GAP-43 tot nu toe voornamelijk wordt gebruikt om axonale (her)uitgroei te bestuderen, maakt recent onderzoek duidelijk dat de aanwezigheid van GAP-43 in de IPL onder naïeve condities, mogelijk wijst op continue synaptische *shifting* en dendrietengroei (Diekmann *et al.* (2015); Kapfhammer *et al.* (1997)). Na ONC zou GAP-43 verder ook belangrijk kunnen zijn bij het proces van dendriethermodellering, waarbij de synaptische contacten tussen de RGC's en de bipolaire en amacriene cellen terug tot stand komen. Zo is in muizen en katten aangetoond dat dendrietinkrimping optreedt na ONC, alsook dat het aantal vertakkingen van de dendrietenbomen daalt (Kalesnykas *et al.* (2012); Leung *et al.* (2011); Weber en Harman (2008)). Eén van de hypothesen stelt dat dendrietinkrimping mogelijk noodzakelijk zou zijn om de nodige energie naar de axonen te verplaatsen zodat axonale heruitgroei gestimuleerd kan worden. Na een succesvolle regeneratie en targetinnervatie zouden de verloren gaande contacten in de retina vervolgens terug hersteld worden.

Inderdaad, GAP-43 lijkt na ONC te migreren vanuit de IPL naar de RGC-somata en –axonen toe (figuur 13). Op 4dpi is immers een hoge expressie aanwezig in de axonen, wat nodig is nodig voor axonale heruitgroei. Echter, op 7dpi stijgt het fluorescent signaal terug ter hoogte van de IPL en begint GAP-43 weer uit de RGC-axonen te verdwijnen, wat mogelijk op het proces van dendriethermodellering wijst. Op 14dpi is het GAP-43 signaal al terug gezakt naar controleniveaus in jonge adulte vissen. Dit doet inderdaad vermoeden dat in de jonge zebravis axonale regeneratie reeds min of meer is afgerond op 14dpi, wat ook overeenkomt met het einde van de axonextensiefase, die zoals eerder beschreven plaatsvindt in zebravissen 5-18 dagen na ONC (McCurley en Callard (2010)).

Verouderde vissen vertonen echter duidelijk een ander GAP-43 lokalisatie- en expressiepatroon in de tijd, waarbij de proteïneniveaus pas echt verhoogd voorkomen in de RGC-axonen tegen 7dpi en bovendien nog sterk aanwezig blijven in de NFL en in de GCL tot 14dpi (figuur 13). Dit eerder ‘vertraagd’ patroon in verouderde vissen suggereert dat hier de axonextensiefase nog bezig is op 14dpi en wijst erop dat axonale regeneratie in verouderde vissen dus trager verloopt ten opzichte van jonge adulte vissen. Bovendien daalt tijdens de ontwikkeling van zoogdieren de hoeveelheid GAP-43 in de groeiconus van de axonen pas wanneer zij hun doelwit hebben geïnnerveerd (Karimi-Abdolrezaee *et al.* (2002)). In verouderde vissen zou GAP-43 mogelijk dus nog aanwezig zijn op 14dpi omdat nog geen synapsen zijn gevormd ter hoogte van het optisch tectum vanwege het vertraagd regeneratieproces.

Wanneer gekeken wordt naar de afgelegde groei afstand van de RGC-axonen in de zenuw, blijkt deze inderdaad significant kleiner te zijn op 4dpi in verouderde zebravissen in vergelijking met jonge adulten (figuur 14, grafiek 1). Op 3 dagen na ONC kennen beide leeftijden echter nog gelijke groei afstanden, wat eerder onwaarschijnlijk lijkt op basis van de GAP-43 expressiedata. Een herhaling van dit experiment met een toename in het aantal vissen en meerdere metingen per individu, zal worden uitgevoerd om een duidelijker beeld te verkrijgen van de preliminaire data en de gevoeligheid van de meetmethode te verhogen. Naast de metingen op 3 en 4dpi na ONC, zal ook gekeken worden op andere tijdstippen om het GAP-43 tijdpatroon in de zenuw van de jonge adulte vis te kunnen verifiëren (Diekmann *et al.* (2015)) en een vertraagde axonale regeneratie in de verouderde vis te bevestigen. In het expressiepatroon van GAP-43 beschreven door Diekmann *et al.* (2015) in adulte vissen wordt GAP-43 reeds waargenomen vanaf 2dpi in de optische zenuw, waarna op 3dpi het aantal en de lengte van de gevisualiseerde axonen stijgt en het fluorescente signaal over de gehele breedte van de optische zenuw wordt waargenomen. Het fluorescent signaal is op 6dpi zeer sterk en overal aanwezig in de zenuw, waarna het afneemt op 14dpi. Ook in dit werk wordt een gelijkaardig expressiepatroon in jonge adulte vissen verwacht (Diekmann *et al.* (2015)).

Naast IHC, zal in volgende experimenten ook gebruik gemaakt worden van Western blotting om de hoeveelheid GAP-43 na ONC in jonge adulte vs. verouderde vissen na te gaan, dit zowel in stalen van de retina, de optische zenuw, als het optisch tectum. De stalen hiervoor zijn reeds verzameld (drie *pools* per conditie (naïeve controle, 6hpi (*hours post injury*), 1dpi, 4dpi, 7dpi, 10dpi, 14dpi en 21dpi), en het optimalisatie-proces wordt weldra afgerond. Via deze methode zal ook getracht worden op een semi-kwantitatieve manier een verminderde/vertraagde axonale regeneratiecapaciteit aan te tonen in verouderde vissen.

5.2 Karakterisatie van het inflammatoir proces in jonge adulte en verouderde vissen

Hoewel algemeen wordt aangenomen dat het neurogeen en axonaal regeneratief potentieel afneemt met toenemende leeftijd, zoals dus ook voor de zebravis kan worden aangetoond, is nog niet duidelijk welke onderliggende processen hiervoor verantwoordelijk zijn. Veroudering brengt zowel intra- als extracellulaire veranderingen teweeg zoals wijzigingen in de omgevende extracellulaire matrix, senescentie van neuronen en macrogliale cellen, alsook veranderingen in de inflammatierespons (Mattson en Magnus (2006)). Inderdaad, steeds vaker wordt in de literatuur de inflammatierespons als een bepalende factor naar voor geschoven in het axonaal regeneratieproces (Boivin *et al.* (2007); Cui *et al.* (2009); Zou *et al.* (2013)). Zo ook is de specifieke rol van *inflammaging*, het optreden van een lichte vorm van chronische inflammatie bij veroudering, - gekarakteriseerd door de opregulatie van de inflammatoire respons en een chronische cytokineproductie-, in tal van ouderdomsziekten beschreven, en wordt ook een verband gezien met een verminderde letselrespons (Baylis *et al.* (2013); Conde en Streit (2006); Luo *et al.* (2010)).

Daarom wordt vooreerst nagegaan of een karakteristiek van *inflammaging* in zoogdieren, - namelijk een groter aantal microglia/macrofagen-, ook optreedt in verouderde zebravissen (Lynch *et al.* (2010); Wong (2013)). Inderdaad, in de retina van verouderde vissen worden bijna dubbel zoveel microglia/macrofagen (gevisualiseerd met 4C4) waargenomen in vergelijking met jonge adulte vissen (grafiek 2 en 3). Op dit moment is de exacte reden voor het stijgend aantal microglia/macrofagen gepaard gaande met veroudering nog onduidelijk. Mogelijk is de functionaliteit van een senescente microglia/macrofaag verminderd, waardoor een toename in aantal een compensatiestrategie kan zijn om de algemene homeostase in de weefsels te behouden (Conde en Streit (2006)). Daarnaast kan het verhoogd aantal inflammatoire cellen met veroudering een gevolg zijn van een cumulatieve accumulatie onder invloed van omgevingsfactoren doorheen de tijd, zoals infecties en verwondingen (Wong *et al.* (2013)).

Om te visualiseren of de inflammatoire respons na letsel ook beïnvloed wordt door verouderingsprocessen en mogelijk aan de basis van een verminderd axonaal regeneratief potentieel ligt, wordt daarnaast (opnieuw aan de hand van 4C4 IHC) het aantal microglia/macrofagen op verschillende tijdstippen na ONC in jonge adulte en verouderde zebravissen bestudeerd (grafiek 3). Jonge adulte en verouderde vissen kennen een gelijkaardig infiltratiepatroon, waarbij op 1dpi een sterke stijging van het aantal microglia/macrofagen wordt waargenomen en deze geleidelijk afneemt. De sterke daling op 4dpi waargenomen in de verouderde vissen is zeer afwijkend en lijkt eerder onwaarschijnlijk. Deze daling zal getracht weerlegd te worden in een herhaling van het experiment. Het aantal microglia/macrofagen ligt bij verouderde vissen op elk tijdstip wel hoger. Bovendien lijkt het alsof in verouderde vissen pas op 14dpi het controleniveau terug bereikt wordt, terwijl in

jonge adulte vissen het aantal microglia/macrofagen al gedaald is op 7dpi. Algemeen suggereren de huidige tellingen dat in verouderde vissen meer microglia/macrofagen toestromen na ONC in vergelijking met jonge adulte vissen en bestaat de kans dat de resolutie van deze microglia/macrofagen trager verloopt.

Bovenvermeld compensatiemechanisme kan een mogelijke verklaring bieden voor de verhoogde instroom van inflammatoire cellen na axonaal letsel in verouderde vissen, in vergelijking met jonge adulte vissen. Indien deze microglia/macrofagen inderdaad minder functionaliteit bezitten vanwege cellulaire senescentie, biedt dit eveneens een potentiële verklaring voor de geobserveerde vertraagde regeneratie in verouderde zebrafissen (figuur 13 en 14, grafiek 1). Bovendien kan door de hogere toestroom van microglia/macrofagen een teveel aan negatieve mediators voor axonale regeneratie worden gesecreteerd, wat axonale regeneratie negatief kan beïnvloeden. De specifieke rol van inflammatie en de functies van microglia/macrofagen na axonale schade zijn immers nog niet opgehelderd. Zowel positieve als negatieve effecten op regeneratie kunnen worden toegedragen aan deze inflammatoire cellen (Czeh *et al.* (2011); Kordower en Tuszynski (2008); Zou *et al.* (2013)).

Recent wordt echter gesuggereerd dat niet alleen de snelle instroom en activatie van inflammatoire cellen, maar vooral de snelle resolutie van deze inflammatoire respons een succesvol regeneratieproces in de zebrafis onderliggen (Kyritsis *et al.* (2012); Zou *et al.* (2013)). Dit idee wordt verder ondersteund door een artikel van Bhumika *et al.* (2015), waarin na verlaging van de schildklierhormoonsignalering, niet alleen een versnelde axonale regeneratie na ONC kan worden waargenomen, maar bovendien een snellere resolutie van het aantal microglia/macrofagen plaatsvindt in de optische zenuw en het optisch tectum van de zebrafis. Hoewel axonale regeneratie in de zebrafis een spontaan proces is, kan het dus mogelijk versneld worden door de resolutie van het aantal microglia/macrofagen te bespoedigen (Bhumika *et al.* (2015)). Omgekeerd kan een vertraagde resolutie van aantal microglia/macrofagen in verouderde vissen dus mogelijk het vertraagd regeneratief potentieel onderliggen. Dit is interessant om verder na te gaan door meer tellingen uit te voeren en de trend verder te verifiëren.

Hoewel de data uit deze thesis bevestigen dat de inflammatierespons na letsel en mogelijk een snelle resolutie ervan cruciaal is voor axonale regeneratie, dient opgemerkt te worden dat het aantal inflammatoire cellen bij jonge adulte vissen uitzonderlijk snel terug naar basale niveaus terugkeert (grafiek 3). Door Zou *et al.* (2013) wordt immers beschreven dat het aantal microglia/macrofagen op 21 dagen na ONC nog steeds verhoogd is (Zou *et al.* (2013)). Daarbij moet verduidelijkt worden dat in de proefopzet in deze thesis gebruik wordt gemaakt van het 4C4-antilichaam om microglia/macrofagen aan te kleuren, terwijl in het voorgaande artikel gewerkt wordt met het anti-isolectine IB4, dat ook microglia/macrofagen labelt (Zou *et al.* (2013)). Hoewel het 4C4-antilichaam algemeen aanvaard wordt als specifieke

microglia/macrofaag merker, is nog steeds niet gekend aan welk antigeen dit bindt. Daarom wordt in dit werk de inflammatoire respons ook aan de hand van een tweede microglia/macrofaag-merker bestudeerd, het actinebindend eiwit *coro1a*. Met behulp van de transgene lijn *Tg(coro1a:eGFP)* kunnen microglia/macrofagen duidelijk gevisualiseerd en geteld worden op retinale *whole mounts*. Omdat verouderde vissen van deze lijn nog niet beschikbaar zijn, wordt vooreerst getracht de gevonden inflammatoire trend na ONC te verifiëren in jonge adulte vissen. Verrassend tonen tellingen van *coro1a*⁺ cellen echter een ander patroon in vergelijking met de 4C4⁺ celtellingen (grafiek 4 en 3, respectievelijk). Initieel (1dpi) stijgt het aantal microglia/macrofagen nog niet, waarna een sterke toename op 4 en 7dpi waar te nemen is. Op 14dpi lijkt het aantal microglia/macrofagen terug te dalen. De gevonden trend aan de hand van *coro1a*⁺ celtellingen sluit meer aan bij de bevindingen beschreven door Zou *et al.* (2013)). Wanneer een 4C4-kleuring wordt uitgevoerd op *Tg(coro1a:eGFP)* retinale secties, wordt bovendien duidelijk gevisualiseerd dat het 4C4-antilichaam maar een subset van de *coro1a*⁺ microglia/macrofagen aankleurt (figuur 15).

In afwachting van het opgroeien van de *Tg(coro1a:eGFP)* tot verouderde individuen, zal in de nabije toekomst reeds via Western blotting het aantal microglia/macrofagen bepaald worden na ONC in jonge adulte en verouderde vissen; dit zowel via het 4C4- als het *coro1a*-antilichaam. Zo wordt getracht een mogelijk verschil in respons van deze subsets aan inflammatoire cellen bloot te leggen.

5.3 Immunomodulatie in jonge adulte vissen

Om de verdere invloed van inflammatie tijdens axonale regeneratie te onderzoeken, wordt vervolgens getracht het inflammatieproces in jonge adulte vissen te moduleren. Enkel jonge adulten worden hiervoor gebruikt omwille van diverse redenen. De verouderde vissen zijn vooreerst zeer kostbaar en de gebruikte transgene lijnen zijn bovendien nog niet opgegroeid tot de gewenste leeftijd (24 maanden). Daarnaast is de rol van het inflammatoir proces tijdens axonale regeneratie zeer complex, zelfs zonder veroudering in rekening te brengen.

5.3.1 Een intravitreale zymosaninjectie versnelt axonale regeneratie

Een eerste manier om het inflammatoir proces te moduleren is door immunostimulatie te induceren via een intravitreale injectie van zymosan, een celwandcomponent van *Saccharomyces cerevisiae*, hoofdzakelijk bestaande uit 1,3- β -glucanen. Zymosan wordt gebruikt voor de inductie van experimentele steriele inflammatie, zonder aanwezigheid van micro-organismen en veroorzaakt zowel in zebrafissen als in zoogdieren een infiltratie van neutrofielen en microglia/macrofagen (Yin *et al.* (2003); Zou *et al.* (2013)). Dit wordt bevestigd in deze thesis (figuur 16). Initieel (1 en 3dpi) stijgt het aantal microglia/macrofagen en neutrofielen in de retina na intravitreale zymosaninjectie. Dit inflammatieproces blijft lokaal in de retina aangezien geen effect ter hoogte van de hersenen wordt waargenomen. De

initiële neutrofiel-dominantie na schade, is in de zebravis al eerder door Li *et al.* (2012) aangetoond in een schademodel waarbij de staartvin geamputeerd wordt. Acute inflammatie wordt hierbij initieel immers gedomineerd door neutrofielen tot zes uur na amputatie. Hierna verdwijnen de neutrofielen en worden de microglia/macrofagen het meest talrijk. Ook in zoogdieren is dit infiltratiepatroon bevestigd (Kolaczowska en Kubes (2013)). De neutrofielen kunnen enerzijds verdwijnen tijdens de acute inflammatierespons doordat ze apoptose ondergaan en gefagocytiseerd worden door de instromende microglia/macrofagen, anderzijds kunnen neutrofielen de plaats van beschadiging verlaten via het proces van omgekeerde migratie doorheen de vasculatuur in de retina. (Crane en Liversidge (2008); Li *et al.* (2012); Starnes en Hutttenlocher (2012)).

Zou *et al.* (2013) hebben aangetoond dat deze instroom van neutrofielen en microglia/macrofagen na zymosaninjectie een versnelde axonale regeneratie na ONC veroorzaakt, wat in dit werk ook vastgesteld wordt (figuur 17, grafiek 5). Een positief effect van een intravitreale zymosaninjectie op axonale regeneratie wordt niet alleen in de zebravis aangetoond, maar ook in bijvoorbeeld ratten, waarbij een stijging van het aantal geregenereerde axonen distaal van de *crush site* wordt waargenomen (Yin *et al.* (2003)). De precieze oorzaak van de verbeterde axonale regeneratie na het induceren van een immunostimulatie is nog onbekend, maar oncomoduline, geproduceerd door neutrofielen en macrofagen is geïdentificeerd als een belangrijke regeneratie-stimulerende component (Kurimoto *et al.* (2010)).

Ook studies vanuit een andere invalshoek, hebben aangetoond dat het spontane proces van axonale regeneratie in de zebravis versneld kan worden. Naast het blokkeren van de schildklierhormoon-signalering (Bhumika *et al.* (2015)) en intravitreale zymosaninjecties (Kurimoto *et al.* (2010)), blijkt ook *knockdown* van de suppressor van cytokine signaling 3 (socs3) en de *splicing* factor proline/glutamine rijk (sfpq), via het gebruik van morfolino's, axonale regeneratie te versnellen (Elsaeidi *et al.* (2014)). Socs3 en sfpq zijn inhibitoren van de JAK/STAT-sigtaalweg, belangrijk voor axonale regeneratie (Elsaeidi *et al.* (2014)).

De vaststelling dat axonale regeneratie zelfs in zebravissen positief gestimuleerd kan worden, is hoopgevend dat verdere verbeteringen mogelijk zijn bij dit proces in zoogdieren aan de hand van accurate therapieën. Ondanks vele studies hieromtrent, zijn slechts minimale verbeteringen in dierproeven met volwassen zoogdieren aangetoond en blijft het onderzoek naar regeneratie in het CZS een grote noodzaak (Huebner en Strittmatter (2009)).

Tenslotte wordt aangetoond dat, althans in zebravissen, zymosan een negatief effect heeft op lange termijn RGC-overleving, zonder schade aan de optische zenuw toe te brengen, zoals eerder beschreven door Zou *et al.* (2013). Deze vaststelling sluit aan bij het idee dat acute inflammatie axonale regeneratie stimuleert, maar een langdurig inflammatoir proces eerder negatieve effecten heeft (Kyritsis *et al.* (2014)).

5.3.2 Dexamethasone beïnvloedt het aantal en morfologie van *coro1a*⁺ cellen

Naast immunostimulatie wordt in dit werk ook getracht het inflammatoir proces te onderdrukken door enerzijds het gebruik van de anti-inflammatoire drug DEX en anderzijds clodronaat liposomen. DEX bindt aan de glucocorticoïde receptor (GR) in het cytosol van immuuncellen, waarna dit complex verplaatst naar de kern en bindt op de glucocorticoïde responsieve elementen (GRE) in de promotorregio's van doelwitgenen om zo gentranscriptie te beïnvloeden. Enerzijds zorgt deze binding voor de activatie van anti-inflammatoire genen, zoals IL-10, en de inhibitie van pro-inflammatoire genen, zoals het gen voor de transcriptiefactor NF- κ B, een belangrijke mediator van inflammatoire processen (Newton en Holden (2007)).

DEX is slecht oplosbaar in water en wordt daarom opgelost in 100% DMSO. DMSO heeft echter toxische effecten op verschillende celtypes. Zo hebben Galvao *et al.* (2014) aangetoond dat intravitreale injecties van 1-8% DMSO in ratten bij elke concentratie apoptose veroorzaakt van de RGC's. Een H&E-kleuring heeft echter aangetoond dat het gebruik van 100% DMSO geen invloed heeft op de algemene morfologie van de zebrawisretina (figuur 18). De verschillende lagen blijven immers volledig intact en het aantal cellen per laag en de laagdikte vertonen ook geen abnormaliteiten. Bij een kleuring met anti-geactiveerd caspase-3 zijn bovendien geen positieve cellen gevonden. Hoewel hiermee niet kan uitgesloten worden dat geen apoptose optreedt, - geactiveerd caspase-3 is slechts tijdelijk aanwezig bij apoptose en caspase-onafhankelijke apoptose kan ook optreden -, kan besloten worden dat in de zebrawis het effect van 100% DMSO op de algemene morfologie zeer beperkt is.

De intravitreale injectie van 100% DMSO heeft wel een kleine invloed op de morfologie en aanwezigheid van de microglia/macrofagen in de GCL. In de naïeve retina zijn de groen fluorescente *coro1a*⁺ cellen immers vertakt met uitlopers. Hoewel in de gebruikte transgene vislijn Tg(*coro1a:eGFP*) zowel microglia/macrofagen als neutrofielen *coro1a*⁺ zijn, kunnen op basis van celmorfologie de microglia/macrofagen onderscheiden worden (vertakt fenotype met uitlopers). Na intravitreale injectie van 100% DMSO verschijnen echter een aantal moeilijker te identificeren amoëboïde cellen, die een teken kunnen zijn van gliale reactiviteit, inflammatoire respons of celdood. Om deze reden werd na dit experiment beslist om het gebruik van 100% DMSO te vermijden en verder te werken met clodronaat liposomen. In de toekomst kan wateroplosbaar DEX in dezelfde concentratie gebruikt worden om hiervan het effect op axonale regeneratie na ONC te bestuderen. Een tweede mogelijkheid om intravitreale injectie van 100% DMSO te vermijden is het toevoegen van DEX aan het water in de aquaria (Kyritsis *et al.* (2012)).

Na behandeling met DEX wordt een daling in het aantal corol1a⁺ cellen in de INL vastgesteld, terwijl enkel amoëboïde corol1a⁺ cellen in de GCL aanwezig zijn (figuur 19 en 20). Deze amoëboïde cellen zouden vooreerst microglia/macrofagen kunnen zijn in een geactiveerde toestand, of tijdens apoptose. Enerzijds zouden deze microglia/macrofagen immers de aanwezigheid van DEX hebben kunnen detecteren, waarna ze het geactiveerde, amoëboïde fenotype aannemen. Een initiële activatie van de microglia/macrofagen zou dus wel kunnen optreden, waarschijnlijk zonder verdere gevolgen echter, aangezien DEX onder andere NF- κ B inhibeert, een belangrijke mediator voor de inflammatoire respons. NF- κ B stimuleert bij microglia/macrofagen immers de productie van pro-inflammatoire cytokines zoals IL-1 β en de inhibitie van de productie van anti-inflammatoire cytokines zoals IL-10 (Sternberg (2006)). Anderzijds is het mogelijk dat de microglia/macrofagen apoptose ondergaan. Dit is zeer plausibel aangezien DEX NF- κ B inhibeert, wat normaal verschillende inhibitoren van apoptose, zoals inhibitoren van apoptose (IAP's) en TNF receptor-geassocieerde factoren (TRAF's), activeert. Een kleuring met anti-geactiveerd caspase-3 kon wel geen enkele apoptotische cel aantonen. In de literatuur wordt echter ook beschreven dat DEX *in vitro* caspase-3 onafhankelijke apoptose kan veroorzaken in humane eosinofielen (Zhang *et al.* (2000)). Om verder te achterhalen of de amoëboïde cellen apoptotische microglia/macrofagen zijn, kan een *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) assay uitgevoerd worden, waarmee DNA-fragmentatie bij apoptotische cellen gevisualiseerd wordt, of een Annexin V kleuring, dat getransloceerd fosfatidylserine detecteert bij apoptotische cellen (Kyrylkova *et al.* (2012); Van Engeland *et al.* (1998)). Het is belangrijk op te merken dat het niet noodzakelijk is voor dit werk dat in de microglia/macrofagen apoptose optreedt, maar wel dat ze door behandeling van DEX hun regeneratie-stimulerende effecten niet kunnen uitoefenen.

Tenslotte bestaat ook, naast de mogelijkheid dat de amoëboïde cellen microglia/macrofagen zijn, de kans dat het neutrofielen zijn. DEX werkt echter de productie van adhesiemoleculen die neutrofielrekrutering promoten tegen, wat sterk doet vermoeden dat de amoëboïde cellen geen neutrofielen zijn (Perretti en Flower (1993); Yamamoto en Gaymor (2001); Yarwoot *et al.* (1993)). Bovendien zijn enkel microglia resident aanwezig als immuuncel in het CZS en infiltreren neutrofielen de retina enkel na schade (Dartt *et al.* (2011)). Een kleuring met het microglia-specifieke 4C4-antilichaam zal in de toekomst uitgevoerd worden om te bevestigen dat de amoëboïde cellen inderdaad microglia/macrofagen zijn.

5.3.3 Clodronaat liposomen beïnvloeden de aanwezigheid en morfologie van *coro1a*⁺ cellen

Een tweede manier waarop in deze thesis immunosuppressie wordt geïnduceerd, is door een intravitreale injectie van clodronaat liposomen, die specifiek apoptose zouden veroorzaken in microglia/macrofagen. Clodronaat wordt door een cel herkend als het structureel gelijkende pyrofosfaat en bijgevolg door bepaalde aminoacyl-tRNA synthetases omgezet naar een niet-hydrolyzeerbare ATP-analoog (adenosinetrifosfaat). Deze ATP-analoog inhibeert ATP/ADP (adenosinedifosfaat) translocasen gevonden op de binnenste membranen van mitochondriën, die belangrijk zijn in de elektronentransportketen. Dit zorgt uiteindelijk voor het openen van een porie in hetzelfde membraan en de vrijlating van proapoptotische factoren, zoals cytochroom C, met apoptose van de cel als gevolg. Clodronaat wordt artificieel verpakt in liposomen, vetvesikels bestaande uit concentrische fosfolipide bilagen, die enkel door fagocyterende microglia/macrofagen opgenomen worden en zo specifiek apoptose veroorzaken in deze cellen (Lehenkari, P. *et al.* (2002)).

Na injectie van 1x PBS en PBS liposomen, ter controle, worden geen veranderingen aangetoond qua morfologie en aanwezigheid van microglia/macrofagen (figuur 21 en 22). PBS (het vehikel) wordt gebruikt om het effect van een intravitreale injectie na te gaan, de standaardcontrole toegepast in een injectie-experiment. Bij het gebruik van clodronaat liposomen is het daarenboven ook nodig om te controleren voor de opname van de liposomen zelf. De fagocyterende functie van microglia/macrofagen zou immers tijdelijk gesatureerd kunnen zijn door de opname hiervan en op deze manier een effect kunnen uitoefenen. Met het gebruik van PBS liposomen als controle kan dit uitgesloten worden (Van Rooijen en Sanders (1994)).

Na injectie van clodronaat liposomen treedt, net zoals bij het gebruik van DEX, een daling van het aantal *coro1a*⁺ cellen op in de INL en verschijnen amoëboïde cellen in de GCL (figuur 21 en 22). Bovendien is na gebruik van clodronaat liposomen aangetoond dat de amoëboïde cellen zich verplaatsen naar de vitreus (figuur 23). Een kleuring met anti-geactiveerd caspase-3 kon wederom geen positieve cellen aanwijzen, hoewel beschreven is dat clodronaat liposomen apoptose zouden veroorzaken (Espenes *et al.* (1997); Proskocil *et al.* (2013); Yang *et al.* (2009)). Echter, zoals eerder vermeld duidt de aanwezigheid van geactiveerd caspase-3 slechts op een momentopname tijdens het apoptoseproces; het optreden hiervan kan dus niet uitgesloten worden. In de toekomst zullen daarom alternatieve methoden gebruikt worden om dit aan te tonen, zoals het gebruik van een TUNEL *assay* of een Annexin V kleuring. Tenslotte is het ook hier weinig waarschijnlijk dat de waargenomen *coro1a*⁺ amoëboïde cellen na het gebruik van clodronaat liposomen neutrofielen zijn, aangezien verschillende studies aantonen dat het gebruik van clodronaat liposomen neutrofielinfiltratie reduceert (Campbell *et al.* (2008); Kreisel *et al.* (2010)). Wederom zal hier in de toekomst een 4C4-kleuring uitgevoerd worden om te bevestigen dat de amoëboïde cellen microglia/macrofagen zijn.

5.3.4 Het effect van immunosuppressie na ONC op axonale regeneratie

Om de rol van microglia/macrofagen verder te onderzoeken bij axonale regeneratie na ONC, worden clodronaat liposomen geïnjecteerd, voor het uitvoeren van een ONC. In dit werk wordt gekozen om verder te werken met clodronaat liposomen en niet met DEX als immunosuppressieve drug omdat de preliminaire experimenten gelijkaardige resultaten aantonen en om het gebruik van 100% DMSO te vermijden. In het experiment in deze thesis uitgevoerd, heeft een injectie van clodronaat liposomen geen invloed op axonale regeneratie na ONC (grafiek 7), ondanks de waargenomen wijzigingen in aanwezigheid en morfologie van cor1a⁺ cellen na injectie van clodronaat liposomen en het uitvoeren van een ONC (figuur 24). Na ONC stijgt in de ongeïnjecteerde conditie en na injectie van PBS het aantal microglia/macrofagen, zoals ook werd waargenomen tijdens karakterisatie van de inflammatoire respons (grafiek 3 en 4). Hierbij werd immers gezien dat zowel het aantal cor1a⁺ cellen als het aantal 4C4⁺ cellen stijgt na ONC. Na injectie van clodronaat liposomen echter, is een daling van het aantal vertakte cellen in de INL waargenomen, al dan niet na het uitvoeren van de ONC (figuur 19 en 20). Na behandeling met clodronaat liposomen in combinatie met een ONC zijn echter meer cellen in de INL aanwezig dan enkel na behandeling van clodronaat liposomen, wat erop zou kunnen wijzen dat de ONC ook in deze conditie de instroom van microglia/macrofagen stimuleert. In de GCL tenslotte verschijnen veel amoëboïde cellen na injectie van clodronaat liposomen, wat ook zonder ONC wordt waargenomen (figuur 24 en 21, respectievelijk).

Hoewel clodronaat liposomen in combinatie met een ONC dus duidelijk een effect hebben op de morfologie en aanwezigheid van de celtypes, wordt axonale regeneratie na ONC hier niet beïnvloed (grafiek 7). De afwezigheid van een effect zou verklaard kunnen worden doordat in de INL een instroom is van microglia/macrofagen, dewelke regeneratie verder zouden kunnen stimuleren, net zoals in een onbehandelde vis.

In de literatuur zijn tegenstrijdige resultaten terug te vinden in verband met het gebruik van clodronaat liposomen en zenuwuitgroei/herstel in zoogdieren. Zo hebben Salegio *et al.* (2011) aangetoond dat na conditionering van spinale ganglia door het beschadigen van de sciatische zenuw, en depletie van macrofagen via een intraveneuze injectie van clodronaat liposomen, axonale regeneratie in ratten vermindert. Verscheidene studies beschrijven echter ook dat na depletie van macrofagen in ratten axonale regeneratie en functioneel herstel van het zenuwstelsel na schade onveranderd blijft of zelfs verbeterd wordt (Cui *et al.* (2009); Hauk *et al.* (2008); Lannotti *et al.* (2011); Popovich *et al.* (1999)).

Een reden voor de tegenstrijdige resultaten kan het verschil in *timing* zijn van het toedienen van de clodronaat liposomen en het aanbrengen van het schademodel. Een mogelijkheid bestaat immers dat, voordat apoptose optreedt bij de microglia/macrofagen door het toedienen van clodronaat liposomen, deze cellen geactiveerd worden en al veel positieve mediators voor axonale regeneratie zoals oncomoduline hebben gesecreteerd (Yin *et al.* (2003)).

Daarnaast zou het ook kunnen dat andere celtypes niet beïnvloed worden, zoals neutrofielen, en dat deze cellen ook axonale regeneratie promoten. Neutrofielen produceren immers ook oncomoduline, en, hoewel het ook fagocyterende cellen zijn, worden ze niet beïnvloed door toediening van clodronaat liposomen (de reden hiervoor is onbekend) (Jordan *et al.* (2003); Yin *et al.* (2008)). Bovendien kan het gebruik van clodronaat liposomen de infiltratie van microglia/macrofagen eventueel niet voldoende inhiberen, waardoor de instromende immuuncellen axonale regeneratie toch stimuleren. Dit laatste zou ook in deze masterproef van toepassing kunnen zijn aangezien duidelijk nog steeds microglia/macrofagen instromen, na behandeling van clodronaat liposomen en ONC. Tenslotte is de rol van inflammatie op regeneratie in het CZS, zoals eerder vermeld, onduidelijk en worden zowel positieve als negatieve effecten hiervan beschreven op axonale regeneratie. De uitkomst van inflammatie hangt bijvoorbeeld af van de duur en tijdstippen van impact, de micro-omgeving, de interactie met andere celtypes en ook de leeftijd van het organisme (Czeh *et al.* (2011); Kordower en Tuszynski (2008)).

Samenvattend suggereren al deze studies dus dat de *timing* van de injectie met clodronaat liposomen en schadetoebrengring van belang is. In toekomstige experimenten zal daarom het effect van verschillende *timing* in ons model worden nagegaan. Het is immers niet onwaarschijnlijk dat het exacte tijdstip waarop de injectie van clodronaat liposomen gebeurt, ten opzichte van het moment van ONC, een invloed zal hebben op de regeneratiecapaciteit. In plaats van bijna gelijktijdig de ONC en de injectie van clodronaat liposomen uit te voeren, kunnen clodronaat liposomen enkele dagen voor het aanbrengen van de ONC geïnjecteerd worden. Alternatief kan deze volgorde ook worden omgekeerd: eerst de zenuwbeschadiging en na enkele dagen de injectie van clodronaat liposomen.

Naast de invloed van clodronaat liposomen, zal ook de invloed van DEX op axonale regeneratie na ONC bepaald worden. Een studie van Boivin *et al.* (2007) toont aan dat na een lesie van de sciatische zenuw in ratten en een intraperitoneale injectie van DEX, nog geen volledig functioneel herstel op 49 dagen na schadetoediening optreedt, terwijl in controledieren na 28 dagen een volledig functioneel herstel is bereikt. Verschillende andere studies beschrijven echter het omgekeerde effect van DEX in ratten, namelijk een sneller functioneel herstel, na lesie van perifere zenuwen en de behandeling van DEX (Mohammadi *et al.* (2013); Sun *et al.* (2012)). Het is dus interessant om na te gaan welk effect de intravitale injectie van DEX op retinotectale regeneratie in de zebravis heeft.

5.4 Algemeen besluit

Diverse studies maken duidelijk dat veroudering in vertebraten gepaard gaat met een vermindering van neuroregeneratie. In deze thesis wordt aangetoond dat axonale regeneratie na ONC ook vertraagt in verouderde zebrafissen, aan de hand van de expressieniveaus van GAP-43 in de retina en in de optische zenuw. Deze immunokleuring in de retina toont aan dat in jonge adulte vissen GAP-43 op 4dpi sterk aanwezig is in de RGC-somata en -axonen, wat wijst op het proces van axonale regeneratie. Zeven dagen na het uitvoeren van de ONC, wordt mogelijk dendriethermodellering gevisualiseerd door het verplaatst GAP-43 signaal naar de IPL. Dit sluit aan bij het idee dat, net zoals tijdens de ontwikkeling van het neuronaal circuit, RGC's eerst zorgen voor axonale uitgroei en doelwitinnervatie, waarna de contacten tussen de RGC's en de bipolaire/amacriene cellen hersteld zullen worden. De vertraagde stijging in GAP-43 abundantie in verouderde vissen en de vaststelling dat dit groei-stimulerend proteïne nog op 14dpi sterk aanwezig is in de RGC-somata en -axonen, toont aan dat axonale regeneratie hier vertraagd optreedt. Bovendien hebben de axonen op 4dpi in de zenuw van verouderde vissen een kleinere afstand overbrugd, in vergelijking met jonge adulten. Uit de combinatie van deze resultaten kan wel degelijk geconcludeerd worden dat het axonaal regeneratieproces vertraagt in verouderde vissen.

De verdere resultaten tonen aan dat een karakteristiek van *inflammaging*, namelijk een verhoogd aantal microglia/macrofagen, ook optreedt in zebrafissen. Na 4C4 IHC worden immers zowel in naïeve vissen, als op elk tijdstip na ONC, een verhoogd aantal microglia/macrofagen gevisualiseerd in verouderde vissen, in vergelijking met jonge adulten. De wijziging in inflammatoire balans kan belangrijke gevolgen hebben voor het regeneratieproces en zal verder onderzocht worden.

Daarnaast wordt het inflammatieproces en de rol ervan op axonale regeneratie verder in detail bestudeerd door in jonge adulte vissen dit proces experimenteel te stimuleren of te onderdrukken. Immunostimulatie, aan de hand van een intravitreale injectie van zymosan, veroorzaakt een tijdelijke activatie van neutrofielen en microglia/macrofagen en versnelt axonale regeneratie.

Na een intravitreale injectie van dexamethasone of clodronaat liposomen, waarmee het inflammatoir proces wordt onderdrukt, bewegen amoëboïde microglia/macrofagen naar de GCL en de vitreus toe. In combinatie met een ONC, infiltreren microglia/macrofagen in de INL, net zoals na ONC in ongeïnjecteerde vissen. Dit kan verklaren waarom geen effect van clodronaat liposomen op axonale regeneratie wordt vastgesteld in het uitgevoerde experiment. In een andere experimentele opzet, waarbij de injectie en ONC niet gelijktijdig uitgevoerd worden, zou dit vermeden kunnen worden.

6 Bronnen

- Abbot, C. *et al.* (2012) – Amacrine and bipolar inputs to midget and parasol ganglion cells in marmoset retina. *Vis. Neurosci.* 29: 157-168
- Aharoni, R. en Arnan, R. (2009) – Linkage between immunomodulation, neuroprotection and neurogenesis. *Drugs News Perspect.* 22: 301-312
- Akhlaq, A. *et al.* (2008) – Metabolism and functions of bioactive ether lipids in the brain. Springer. Eerste editie, US, 280 pagina's
- Baylis, D. *et al.* (2013) – Understanding how we age: insights into inflammaging. *Long. And Lifesp.* 2: 8
- Bear, M. *et al.* (2007) – Neuroscience, exploring the brain. Derde editie, Lippincott Williams & Wilkins, US, 857 pagina's
- Becker, C. en Becker, T. (2008) – Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration. *Rest. Neurol. And Neurosci.* 26: 71-80
- Becker, T. en Becker G. (2014) – Axonal regeneration in zebrafish. *Curr. Op. In Neurobiol.* 27: 186-191
- Benowitz, L. en Popovich, P. (2011) – Inflammation and axon regeneration. *Curr. Op. In Neurol.* 24: 577-583
- Benowitz, L. en Yin, Y. (2010) – Optic nerve regeneration. *Arch. Of Ophth.* 128: 1059-1064
- Berisha, F. *et al.* (2007) – Retinal abnormalities in early Alzheimer's disease. *Invest. Ophth. And Vis. Sci.* 48: 2285-2289
- Bernhardt, R. *et al.* (1996) – Increased expression of specific recognition molecules by retinal ganglion cells and by the optic pathway glia accompanies the successful regeneration of retinal axons in adult zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 376: 253-264
- Bhumika, S. *et al.* (2015) – Decreased thyroid hormone signaling accelerates the reinnervation of the optic tectum following optic nerve crush in adult zebrafish. *Mol. And Cell. Neurosci.* 68: 92-102
- Bjarkam, C. *et al.* (2001) – New strategies for the treatment of Parkinson's disease hold considerable promise for the future management of neurodegenerative disorders. *Biogeront.* 2: 193-207
- Brand, T. en Poon, K. (2013) – The zebrafish model system in cardiovascular research: A tiny fish with mighty prospects. *Glob. Card. Sci. And Pract.* 2013: 9-28
- Briken, V. en Mosser, D. (2011) – Editorial: Switching on arginase in M2 macrophages. *J. Leuk. Biol.* 90: 839-841
- Boivin, A. *et al.* (2007) – Toll-like receptor signaling is critical for Wallerian degeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *J. Neurosci.* 27: 12565-12576
- Boyd, J. en Gordon, T. (2003) – Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol. Neurobiol.* 27: 277-324
- Cai, D. *et al.* (2001) – Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J. Neurosci.* 21: 4731-4739

- Campbel, S. *et al.* (2008) – Liver Kupffer cells control the magnitude of the inflammatory response in the injured brain and spinal cord. *Neuropharm.* 55: 780-787
- Casson, R. *et al.* (2012) – Translational neuroprotection research in glaucoma: a review of definitions and principles. *Clin. And Exp. Opth.* 40: 350-357
- Crane, J. en Liversidge, J. (2008) – Mechanisms of leukocyte migration across the blood-retina barrier. *Sem. Immunopath.* 30: 165-177
- Conde, J. en Streit, W. (2006) – Effect of aging on the microglial response to peripheral nerve injury. *Neurobiol. Ag.* 27: 1451-1461
- Cui, Q. *et al.* (2009) – The role of macrophages in optic nerve regeneration. *Neurosci.* 158: 1039-1048
- Currie, P. en Lieschke, G. (2007) – Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev.* 8: 353-367
- Czeh, M. *et al.* (2011) – The yin and yang of microglia. *Dev. Neurosci.* 33: 199-209
- Dartt, D. *et al.* (2011) – Immunology, inflammation and diseases of the eye. Eerste editie, Elsevier, US, 448 pagina's
- Deonarine, K. *et al.* (2007) – Gene expression profiling of cutaneous wound healing. *J. Transl. Med.* 5: 11
- Dharmarajan, S. *et al.* (2014) – Bone morphogenetic protein 7 regulates reactive gliosis in retinal astrocytes and Müller glia. *Mol. Vis.* 20: 1085-1108
- Diekmann, H. *et al.* (2015) – Characterization of optic nerve regeneration using transgenic zebrafish. *Front. Cell. Neurosci.* 9: 118
- Du, Z. *et al.* (2006) – Selective regulation of IL-10 signaling and function by zymosan. *J. Immunol.* 176: 4785-4792
- Edelmann, K. *et al.* (2013) – Increased radial glia quiescence, decreased reactivation upon injury and unaltered neuroblast behavior underlie decreased neurogenesis in the aging zebrafish telencephalon. *J. Comp. Neurol.* 521: 3099-3115
- Elsaedi, F. *et al.* (2014) – Jak/Stat signaling stimulates zebrafish optic nerve regeneration and overcomes the inhibitory actions of Socs3 and Sfpq. *J. Neurosci.* 34: 2632-2644
- Enciu, A. *et al.* (2011) – Neuroregeneration in neurodegenerative disorders. *BMC Neurol.* 11: 75-82
- Engelhardt, M. *et al.* (2005) – Adult retinal pigment epithelium cells express neural progenitor properties and the neuronal precursor protein doublecortin. *Brain Res.* 1040: 98-111
- Espenes, A. *et al.* (1997) – Apoptosis in phagocytotic cells of lymphoid tissues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following administration of clodronate liposomes. *Cell Tiss. Res.* 289: 323-331
- Fadool, J. en Dowling, J. (2008) – Zebrafish: a model system for the study of eye genetics. *Progr. In Ret. And Eye Res.* 27: 89-110
- Fahrenfort, I. *et al.* (2005) – The involvement of glutamate-gated channels in negative feedback from horizontal cells to cones. *Prog. Brain. Res.* 147: 219-229
- Fischer, D. *et al.* (2004) – Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state. *J. Neurosci.* 24: 1646-1651

- Fleisch, V. *et al.* (2005) – Investigating regeneration and functional integration of CNS neurons: Lessons from zebrafish genetics and other fish species. *BBA – Mol. Bas. Of Dis.* 1812: 364-380
- Franceschi, C. en Campisi, J. (2014) – Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J. Geront.* 69: S4-S9
- Friedrich, R. *et al.* (2010) – Circuit neuroscience in zebrafish. *Curr. Biol.* 20: R371-R381
- Galvan, V. en Jin, K. (2007) – Neurogenesis in the aging brain. *Clin. Interv. In Ag.* 2: 605-610
- Galvao, J. *et al.* (2014) – Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J.* 28: 1317-1330
- Gamling, P. (2006) – The pretectum: connections and oculomotor-related roles. *Progr. In Brain Res.* 151: 379-405
- Gestri, G. *et al.* (2012) – The visual system of zebrafish and its use to model human ocular diseases. *Dev. Neurobiol.* 72: 302-327
- Goel, R. *et al.* (2013) – Characterizing the normal proteome of human ciliary body. *Clin. Prot.* 10: 1-12
- Goldman, D. (2014) – Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 15: 431-442
- Gordon, T. *et al.* (2003) – Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J. Per. Nerv. Syst.* 8: 236-250
- Gori, S. *et al.* (2014) – Do fish perceive illusory motion? *Sci. Rep.* 4: 6443
- Graciarena, M. *et al.* (2014) – Dynamics of axonal regeneration in adult and aging zebrafish reveal the promoting effect of a first lesion. *PNAS* 111: 1610-1615
- 't Hart, B. (2014) – Apocynin, a low molecular oral treatment for neurodegenerative disease. *Biomed. Res. Intern.* 2014: 1-6
- Hauk, T. *et al.* (2008) – Neuro-protective and axon growth promoting effects of intraocular inflammation do not depend on oncomodulin or the presence of large numbers of activated macrophages. *Exp Neurol.* 209:469–482
- Hayat, M. (2007) – Microscopy, immunohistochemistry, and antigen retrieval methods. Eerste editie, Springer Science & Business media, US, 355 pagina's.
- Hayes, A. *et al.* (2013) – Spinal deformity in aged zebrafish is accompanied by degenerative changes to their vertebrae that resemble osteoarthritis. *PLoS ONE* 9: e75787
- Hu, Y. *et al.* (2005) – Lentiviral-mediated transfer of CNTF to schwann cells within reconstructed peripheral nerve grafts enhances adult retinal ganglion cell survival and axonal regeneration. *Mol. Ther.* 11: 906–915
- Huang, L. *et al.* (2014) – Glial scar formation occurs in the human brain after ischemic stroke. *Int. J. Med. Sci.* 11: 344-348
- Huebner, E. en Srittmatter, S. (2009) – Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems. *Results Probl. Cell Diff.* 48: 339-351
- Jackman, S. *et al.* (2011) – A positive feedback synapse from retinal horizontal cells to cone photoreceptors. *PLoS Biol.* 9: e1001057

- Jain, K. (2011) – The handbook of neuroprotection. Eerste editie, Humana Press, US, 547 pagina's
- Jordan, M. *et al.* (2003) – Liposomal clodronate as a novel agent for treating autoimmune hemolytic anemia in a mouse model. *Blood* 101: 594-601
- Kamel, I. en Barnette, R. (2014) – Positioning patients for spine surgery: Avoiding uncommon position-related complications. *W. J. Orthop.* 5: 425-443
- Kalesnykas, G. *et al.* (2012) – Retinal ganglion cell morphology after optic nerve crush and experimental glaucoma. *Invest. Opth. Vis. Sci.* 53: 3847-3857
- Kaneda, M. *et al.* (2008) – Changes of phospho-growth-associated protein 43 (phospho-GAP43) in the zebrafish retina after optic nerve injury: A long-term observation. *Neurosci. Res.* 61: 281-288
- Karimi-Abdolrezaee, S. *et al.* (2002) – Developmental down-Regulation of GAP-43 expression and timing of target contact in rat corticospinal neurons. *Exp. Neurol.* 176: 390-401
- Karl, M. en Reh, T. (2010) – Regenerative medicine for retinal diseases: activating the endogenous repair mechanisms. *Trends Mol. Med.* 16: 193-202
- Karlstrom, R. *et al.* (1997) – Genetic analysis of axon guidance and mapping in the zebrafish. *Trends In Neurosci.* 20: 3-8
- Kastin, A. en Pan, W. (2005) – Targeting neurite growth inhibitors to induce CNS regeneration. *Curr. Pharm. Des.* 11: 1247-1253
- Kapfhammer, J. *et al.* (1997) – The growth-associated protein GAP-43 is specifically expressed in tyrosine hydroxylase-positive cells of the rat retina. *Developm. Brain. Res.* 101: 257-264
- Kettenmann, H. en Ransom, B. (2005) – Neuroglia. Tweede editie, Oxford University Press, US, 601 pagina's.
- Kigerl, K. *et al.* (2009) – Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J. Neurosci.* 29: 13435-13444
- King, M. *et al.* (1989) – Biotin: a versatile anterograde neuroanatomical tract-tracing alternative. *Brain Res.* 497: 361-367
- Kishi, S. *et al.* (2008) – The identification of zebrafish mutants showing alterations in senescence-associated biomarkers. *PLoS* 4: e100152
- Kolaczowska, E. en Kubes, P. (2013) – Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 159-175
- Kordower, J. en Tuszynski, M. (2008) – CNS regeneration. Tweede editie, Academic Press, US, 526 pagina's
- Kreisel, D. *et al.* (2010) – *In vivo* two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *PNAS* 107: 18073-18078
- Kriegstein, A. en Alvarez-Buylla, A. (2009) – The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Ann. Rev. Of Neurosci.* 32: 149-184
- Kumar, A. en Loane, D. (2012) – Neuroinflammation after traumatic brain injury: Opportunities for therapeutic intervention. *Brain, Behav. And Immun.* 26: 1191-1201

- Kurimoto, T. *et al.* (2010) – Long–distance axon regeneration in the mature optic nerve: Contributions of Oncomodulin, cAMP, and pten gene deletion. *J. Neurosci.* 30: 15654–15663
- Kyrylkova, K. *et al.* (2012) – Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Of Mol. Biol.* 887: 41-47
- Kyritsis, N. *et al.* (2012) – Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain. *Sci.* 338: 1353-1356
- Kyritsis, N. *et al.* (2014) – Neuroinflammation and central nervous system regeneration in vertebrates. *Trends In Cell Biol.* 24: 128-135
- Lannotti, C. *et al.* (2011) – A combination immunomodulatory treatment promotes neuroprotection and locomotor recovery after contusion SCI. *Exp. Biol.* 230: 3-15
- Larsson, A. *et al.* (2004) – Increased cell proliferation and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of old GFAP(-/-)Vim(-/-) mice. *Neurochem. Res.* 29: 2069-2073
- Lehenkari, P. *et al.* (2002) – Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol. Pharm.* 61: 1255-1262
- Lenowski, J. en Raymond, P. (2014) – Müller glia: Stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. *Prog. Ret. Eye Res.* 40: 94-123
- Lenzlinger, P. *et al.* (2001) – The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Mol. Neurobiol.* 24: 169-181
- Leon, S. *et al.* (2000) – Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J. Neurosci.* 20: 4615–4626
- Leung, C. *et al.* (2011) – Long-term *in vivo* imaging and measurement of dendritic shrinkage of retinal ganglion cells. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* 52: 1539-1547
- Li, L. *et al.* (2012) – Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration. *J. Biol. Chem.* 287: 25353-25360
- Lindqvist, N. *et al.* (2010) – Retinal glial (Müller) gells: Sensing and responding to tissue stretch. *Invest. Ophth. And Vis. Sci.* 51: 1683-1690
- Lingor, P. *et al.* (2007) – Inhibition of Rho kinase (ROCK) increases neurite outgrowth on chondroitin sulphate proteoglycan *in vitro* and axonal regeneration in the adult optic nerve *in vivo*. *J. Neurochem.* 103: 181-189
- Liu, H. *et al.* (2011) – Dendritic changes in visual pathways in glaucoma and other neurodegenerative conditions. *Exp. Eye Res.* 92: 244-250
- London, A. *et al.* (2013) – The retina as a window to the brain – from eye research to CNS disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 9: 44–53
- Longin, A. *et al.* (1993) – Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy: image analysis and laser confocal microscopy study. *J. Histochem. Cytochem.* 41: 1833-1840
- Luo, J. *et al.* (2010) – Increased intrinsic neuronal vulnerability and decreased beneficial reaction of macrophages on axonal regeneration in aged rats. *Neurobiol. Of Ag.* 31: 1003-1009

- Lynch, A. *et al.* (2010) – The impact of glial activation in the aging brain. *Ag. And Dis.* 1: 262-278
- MacNeil, A. *et al.* (2007) – Comparative analysis of progenitor cells isolated from the iris, pars plana, and ciliary body of the adult porcine eye. *Stem Cells* 25:2430–2438
- Martinez, J. *et al.* (2004) – Eye development: a view from the retina pigmented epithelium. *Bioess.* 26: 766-777
- Mattson, M. en Magnus, T. (2006) – Aging and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 278-294
- McCurley, A. en Callard, G. (2010) – Time course analysis of gene expression patterns in zebrafish eye during optic nerve regeneration. *J. Exp. Neurosci.* 2010: 17-33
- Meyers, J. *et al.* (2012) – β -catenin/Wnt signaling controls progenitor fate in the developing and regenerating zebrafish retina. *Neur. Devel.* 7: 1-17
- Miron, V. *et al.* (2013) – M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat. Neurosci.* 16: 1211-1218
- Mohammadi, M. *et al.* (2013) – Dexamethasone topically accelerates peripheral nerve repair and target organ reinnervation: a transected sciatic nerve model in rat. *Inj.* 40: 565-569
- Monsul, N. *et al.* (2004) – Intraocular injection of dibutyl cyclic AMP promotes axon regeneration in rat optic nerve. *Exp. Neurol.* 186: 124–133
- Münzel, E. *et al.* (2014) – Zebrafish regenerate full thickness optic nerve myelin after demyelination, but this fails with increasing age. *Acta Neuro. Comm.* 2: 77
- Murray, A. *et al.* (2009) – cAMP-dependent axon guidance is distinctly regulated by Epac and protein kinase A. *J. Neurosci.* 29: 15434–15444
- Nahrendorf, M. *et al.* (2007) – The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *Exp. Med.* 204: 3037-3047
- Nakazawa, T. *et al.* (2014) – Neuroprotection and neuroregeneration for retinal diseases. Eerste editie, Springer, US, 356 pagina's
- Napoli, I. *et al.* (2011) – A Central role for the ERK-signaling pathway in controlling schwann cell plasticity and peripheral nerve regeneration *in vivo*. *Neuron* 73: 729-742
- Newbern, J. *et al.* (2009) – Taking off the SOCS: cytokine signaling spurs regeneration. *Neuron* 64: 591–59
- Newton, R. en Holdon, S. (2007) – Seperating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor. *Mol. Pharm.* 72: 799:809
- Ooto, S. *et al.* (2004) – Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *PNAS* 101: 13654-13659
- Park, J. *et al.* (2014) – Role of cysteinyl leukotriene signaling in a mouse model of noise-induced cochlear injury. *PNAS* 111: 9911-9916
- Perretti, M. en Flower, R. (1993) – Modulation of IL-1 induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. *J. Immunol.* 150: 992-999
- Perry, S. *et al.* (2010) – Fish fysiologie – zebrafish. Eerste editie, Academic Press, US, 468 pagina's

- Popovich, P. *et al.* (1999) – Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp. Biol.* 158: 351-365
- Prasad, S. en Galetta, S. (2011) – Handbook of clinical neurology. Eerste editie, Elsevier, US. 736 pagina's
- Proskocil, B. *et al.* (2013) – Macrophage TNF- α mediates parathion-induced airway hyperreactivity in guinea pigs. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 304: L519-L529
- Purves, D. *et al.* (2010) – Neuroscience. Tweede editie, Sinauer Associates, US, 759 pagina's
- Reichenbach, A. en Bringmann, A. (2013) – New functions of Müller cells. *Glia* 61: 651-678
- Rhee, K. *et al.* (2013) – CNTF-mediated protection of photoreceptors requires initial activation of the cytokine receptor gp130 in Müller glial cells. *PNAS* 19: E4520-E4529
- Riger, R. *et al.* (2010) – *Cold Spring Harb. Persp. Biol.* 2: a001867
- Ryan, S. *et al.* (2013) – Retina. Vijfde editie, Elsevier, US, 2564 pagina's
- Salegio, E. *et al.* (2011) – Macrophage presence is essential for the regeneration of ascending afferent fibres following a conditioning sciatic nerve lesion in adult rats. *BMC Neurosci.* 12: 11
- Seagle, B. *et al.* (2005) – Melanin photoprotection in the human retinal pigment epithelium and its correlation with light-induced cell apoptosis. *PNAS* 102: 8978-8983
- Selzer, M. (2003) – Promotion of axonal regeneration in the injured CNS. *The Lanc. Neurol.* 2: 157-166
- Semkova, I. en Krieglstein, J. (1999) – Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors. *Brain Res. Rev.* 30: 176-188
- Sengpiel, F. (2008) – Binocular vision: Only half a brain needed. *Curr. Biol.* 18: r1054-r1056
- Shechter, R. en Schwartz, M. (2012) – Harnessing monocyte-derived macrophages to control central nervous system pathologies: no longer 'if' but 'how'. *J. Pathol.* 229: 332-346
- Shin, E. *et al.* (2014) – High glucose alters retinal astrocytes phenotype through increased production of inflammatory cytokines and oxidative stress. *PLoS One* 9: e103148
- Simo, R. *et al.* (2010) – The retinal pigment epithelium: Something more than a constituent of the blood-retinal barrier - Implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J. Biom. And Biot.* 2010: 1-15
- Spencer, T. en Filbin, M. (2004) – A role for cAMP in regeneration of the adult mammalian CNS. *J. Anat.* 204: 49-55
- Srinivasan, M. *et al.* (2002) – Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am. J. Pathol.* 161: 1961-1971
- Starnes, W. en Huttenlocher, A. (2012) – Neutrophil reverse migration becomes transparent with zebrafish. *Adv. In Hema.* 2012: 398650
- Sternberg, M. (2006) – Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 318-328

- Sun, H. *et al.* (2012) – Dexamethasone and vitamin B12 synergistically promote peripheral nerve regeneration in rats by upregulating the expression of brain-derived neurotrophic factor. *Arch. Of Med. Sci.* 8: 924-930
- Taupin, P. (2006) – Adult neurogenesis and neural stem cells in mammals. Eerste editie, Nova Publishers, US, 208 pagina's
- Thummel, R. *et al.* (2008) – Characterization of Müller glia and neuronal progenitors during adult zebrafish retinal regeneration. *Exp. Eye Res.* 87: 433-444
- Tombran, J. *et al.* (2008) – Mechanisms of the glaucomas: disease processes and therapeutic modalities. Eerste editie, Springer Science & Business Media, US, 781 pagina's
- Tosato, M. *et al.* (2007) – The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clin. Interv. In Ag.* 2: 401-412
- Tropepe, V. *et al.* (2000) – Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Sci.* 287: 2032-2036
- Tuszynski, M. *et al.* (2004) – Neurotrophic factors and diseases of the nervous system. *Ann. Of Neurol.* 35: S9-S12
- Van Engeland, M. *et al.* (1998) – Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometr.* 31: 1-9
- Van Hove, I. *et al.* (2012) – An aberrant cerebellar development in mice lacking matrix metalloproteinase-3. *Mol. Neurobiol.* 45: 17-29
- Van Rooijen, N. en Sanders, A. (1994) – Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *Immunol. Meth* 174: 83-93
- Vaughan, D. (1992) – Effects of advancing age on peripheral nerve regeneration. *J. Comp. Neurol.* 323:219-237
- Verdú, E. *et al.* (2000) – Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J. Per. Nerv. Syst.* 5: 191-208
- Villegas-Pérez, M. *et al.* (1993) – Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J. Neurobiol.* 24: 23-36
- Weber, A. en Harman, C. (2008) – BDNF preserves the dendritic morphology of alpha and beta ganglion cells in the cat retina after optic nerve injury. *Invest. Ophthal. Vis. Sci.* 49: 2456-2463
- Wilkinson-Berka, J. (2004) – Diabetes and retinal vascular disorders: role of renin-angiotensin system. *Exp. Rev. In Mol. Med.* 6: 1-18
- Wolters, E. en Groenewegen, H. (2004) – Neurologie. Derde editie, Bohn Stafleu Van Loghum, Nederland, 669 pagina's.
- Wong, W. (2013) – Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation. *Front. In Cell Neurosci.* 7:22
- Yamamoto, Y. en Gaynor, R. (2001) – Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* 170: 135-142
- Yang, D. *et al.* (2009) – Clodronate-induced cell apoptosis in human thyroid carcinoma is mediated via the P2 receptor signaling pathway. *J. Pharm. And Exp. Ther.* 330: 613-623

- Yarwood, H. *et al.* (1993) – Effect of dexamethasone on neutrophil accumulation and oedema formation in rabbit skin: an investigation of site of action. *J. Pharmacol.* 180: 959-966
- Yin, Y. *et al.* (2003) – Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J. Neurosci.* 23: 2284–2293
- Yin, Y. *et al.* (2008) – Oncomodulin links inflammation to optic nerve regeneration. *PNAS* 106: 19587-19592
- Yin, Y. *et al.* (2006) – Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells. *Nat. Neurosci.* 9: 843–852
- Yong, W. (2010) – Inflammation in neurological disorders: a help or a hindrance? *Neurosci.* 16: 408-420
- Yorio, T. *et al.* (2011) – Ocular therapeutics: Eye on new discoveries. Eerste editie, Academic Press, US, 536 pagina's
- You, S. *et al.* (2000) – Axonal regeneration of retinal ganglion cells depending on the distance of axotomy in adult hamsters. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 41: 3165-3170
- Yu, L. *et al.* (2006) – Cognitive aging in zebrafish. *PLoS ONE* 1: e14
- Zhang, F. *et al.* (2000) – GAP-43 mediates retinal axon interaction with lateral diencephalon cells during optic tract formation. *Developm.* 127: 969–980
- Zhdanova, I. *et al.* (2008) – Aging of the circadian system in zebrafish and the effects of melatonin on sleep and cognitive performances. *Brain Res. Bull.* 75: 433-441
- Zhou, L. *et al.* (2013) – Viruses and neurodegeneration. *Virology* 10: 172-201
- Zou, S. *et al.* (2013) – Neurogenesis of retinal ganglion cells is not essential to visual functional recovery after optic nerve injury in adult zebrafish. *PLoS ONE* 8: e57280

ADDENDA

1. Risicoanalyse

De experimenten die in dit werk beschreven worden, zijn uitgevoerd in een laboratorium met inperkingsniveau L1. Er wordt dus niet met pathogene micro-organismen gewerkt, en het risico voor de omgeving is zeer laag. Het dragen van beschermende kledij, meer bepaald een labojas en handschoenen, is steeds verplicht.

Correct afvoeren van afval is belangrijk om de veiligheid te kunnen garanderen en om de impact op de omgeving te minimaliseren. Niet-risicohoudend afval en risicohoudend biologisch afval moeten steeds van elkaar gescheiden worden. Voor het inzamelen van het risicohoudend afval, moet het correcte recipiënt worden gebruikt (bv. Cordi-dozen voor vast afval zoals handschoenen en petriplaten). Chemisch afval dient steeds te worden ingezameld in de correcte afvalcategorie.

Bij bepaalde experimenten worden naalden of zeer dunne capillairen gebruikt. Uiteraard is het belangrijk hiermee voorzichtig om te gaan zodat verwondingen voorkomen worden. Scherpe voorwerpen dienen na gebruik te worden verzameld in de daartoe bestemde gele naaldcontainer.

Bij de experimenten die in dit werk beschreven zijn, worden een aantal gevaarlijke chemische stoffen gebruikt. Voor de meest relevante producten wordt hier dieper op de risico's ingegaan die ze inhouden en op de voorzorgsmaatregelen die genomen moeten worden om deze risico's te minimaliseren.

Voor het fixeren van weefsel, worden 4% PFA-oplossingen (bijzonder afvalvloeistoffen, categorie 5) gebruikt. PFA is een giftig product, en er zijn bovendien aanwijzingen dat het kankerverwekkend is. Daarnaast is het zeer irriterend bij inademing en bij contact met de ogen en de huid. Bij het maken van deze oplossing dient men steeds onder een trekkast te werken en is het dragen van persoonlijke bescherming zoals een mondmasker en veiligheidsbril nodig.

Bij het uitvoeren van de transcarteriale perfusies voor de DAB-kleuring wordt een mengsel van PFA (2%) en glutaaraldehyde (2,5%) (bijzondere afvalvloeistoffen, categorie 5) gebruikt. Glutaaraldehyde is acuut toxisch bij inademing en bij inslikken, en kan ernstige brandwonden en oogletsels veroorzaken. Het dragen van handschoenen en beschermende kledij is bijgevolg noodzakelijk, en er moet steeds onder een trekkast worden gewerkt.

De oplossingen met DAB (bijzondere afvalvloeistoffen, categorie 5) worden gebruikt in het kleuringsprotocol om de geregenereerde axonen zichtbaar te maken. Bij het werken met deze stof in poedervorm, dienen beschermende kledij, handschoenen en een mondmasker gedragen te worden aangezien het kanker kan veroorzaken. Er moet bovendien steeds onder een trekkast worden gewerkt, en voorzichtigheid is geboden. De DAB-oplossing bevat bovendien NiCl_2 en CoSO_4 (beiden bijzondere afvalvloeistoffen, categorie 5). Deze kunnen kanker

veroorzaken bij inademing en zijn schadelijk wanneer ze ingeslikt en ingeademd worden. Bij het DAB-kleuringsprotocol en bij IHC-kleuringen wordt ook H₂O₂ gebruikt (bijzondere afvalvloeistoffen, categorie 5). Deze sterk oxiderende stof kan ernstige brandwonden veroorzaken en moet uit de buurt gehouden worden van warmte en brandbare stoffen.

Bij de daarop volgende tegenkleuring met *neutral red* en bij H&E-kleuringen, wordt in de dehydratatiereeks xyleen (niet-gehalogeneerde organische afvalvloeistoffen, categorie 3) gebruikt. Deze stof is licht ontvlambaar, en bovendien schadelijk bij inademing en bij contact met de huid. Er moet daarom steeds onder een trekkast worden gewerkt. Methanol (niet-gehalogeneerde organische afvalvloeistoffen, categorie 3) wordt eveneens bij bepaalde IHC-kleuringen gebruikt, en is giftig bij inademing, bij contact met de huid en bij inslikken. Methanol is bovendien licht ontvlambaar, en er moet steeds onder een trekkast worden gewerkt.

Omdat Dex slecht oplost in water, wordt DMSO (bijzondere afvalvloeistoffen, categorie 5) gebruikt. DMSO is irriterend voor de huid en de ogen en er moet bijgevolg voorzichtig mee omgegaan worden.

In dit werk werden geen biologische agentia zoals micro-organismen, virussen of vectoren gebruikt. De risico's die hiermee gepaard gaan zijn dus niet van toepassing. Er worden wel dierproeven uitgevoerd, meer bepaald met zebrafissen (*Danio rerio*). Het gaat echter om wildtype lijnen en de Tg(*coro1a:eGFP*) en Tg(*coro1a:eGFP; lyz:DsRed*) transgene lijn, en het gebruik van deze dieren houdt geen extra veiligheidsrisico's in.

2. Samenstelling van de gebruikte oplossingen

Acetaatbuffer	1,021 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,286 mL CH_3COOH 125 mL AD
Citraatbuffer, 1x (pH 6)	10 mM citroenzuur 0,05% Tween-20 NaOH
Danieau's, 30x (pH 7,6)	1,74 M NaCl 21 mM KCl 12 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 18 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 150 mM HEPES buffer
DEX, 40 mg/mL	40 g DEX 100 mL 100% DMSO
DAPI	0,002% 4',6-diamidino-2-fenylindool (DAPI) 1x PBS
Hematoxiline	100 mL Harris hematoxiline (kwikvrij) 100 mL AD 2 mL watervrij azijnzuur
Mowiol	6 g glycerol 2,4 g mowiol 12 mL 0,2 M tris (pH 8,5) 6 mL Milli-Q
<i>Neutral red</i> oplossing	4 mL acetaatbuffer 1 g <i>neutral red</i> 100 mL AD
PBS, 10x (pH 7,4)	80 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20 mM KH_2PO_4 1,5 M NaCl 30 mM KCl
PFA, 4% (pH 7,4)	0,1 M PFA 1x PBS
Saline, 0,69%	0,69 g NaCl 100 mL AD
Sucrose, 10%, 20%, 30%	10%, 20%, 30% sucrose 1x PBS

TBS, 10x (pH 7,6)	0,1 M Tris 15 M NaCl 0,015 M Triton X-100
TNB	0,5% blokkerend reagens (PerkinElmer) 1x TBS
Tricaïneoplossing 0,03%, 0,02%, 0,1%	0,03 g, 0,02 g of 0,1 g ethyl 3-aminobenzoaat methaansulfonaat 100 mL systeemwater
Tris, 10x (pH 7,4)	0.5 M tris(hydroxymethyl)aminomethaan HCl
Zymosanoplossing 25 mg/mL	0,69 g NaCl 2,5 g zymosan 100 mL AD

AFDELING DIERENFYSIOLOGIE EN NEUROBIOLOGIE

Naamsestraat 61 – bus 2464

3000 LEUVEN, BELGIË

tel. + 32 16 32 39 91

fax + 32 16 32 42 62

www.kuleuven.be

