

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HUMANANATOMIE UND EMBRYOLOGIE
PROF. DR. ERNST RUDOLF TAMM
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
UNIVERSITÄT REGENSBURG

UND
DEM LEHRSTUHL
FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD WEBER
FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIE ROLLE DES TGF-B-SIGNALWEGES BEI PATHOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN DER NETZHAUT

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin-
Universität Regensburg
und
Fakultät für Medizin
Universität Regensburg

vorgelegt von
Sarah Verena Etzel geb. Leimbeck
geb. 01.04.1987

2016

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HUMANANATOMIE UND EMBRYOLOGIE
PROF. DR. ERNST RUDOLF TAMM
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
UNIVERSITÄT REGENSBURG

UND
DEM LEHRSTUHL
FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD WEBER
FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIE ROLLE DES TGF-B-SIGNALWEGES BEI PATHOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN DER NETZHAUT

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin-
Universität Regensburg
und
Fakultät für Medizin
Universität Regensburg

vorgelegt von
Sarah Verena Etzel geb. Leimbeck
geb. 01.04.1987

2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ernst Rudolf Tamm

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2017

DIE ROLLE DES TGF-B-SIGNALWEGES BEI PATHOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN DER NETZHAUT

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung.....	1
I.1. Anatomie und Physiologie des Sehens.....	1
I.1.1. Anatomische Grundlagen.....	1
I.1.2. Physiologie des visuellen Systems.....	5
I.1.3. Gliazellen der Netzhaut.....	6
I.1.4. Vaskularisation der Mausretina.....	7
I.2 Der TGF- β -Signalweg.....	7
I.3. Einfluss von TGF- β auf GefäÙe.....	10
I.4. Erkrankungen des Augenhintergrundes mit GefäÙbeteiligung.....	12
I.4.1 Diabetische Retinopathie (DRP).....	12
I.4.2. Altersbedingte Makuladegeneration (AMD).....	13
I.4.3. Untersuchungsmethoden des erkrankten Augenhintergrundes.....	13
I.5. Cre/LoxP System CAG-Cre-Rekombinase.....	14
I.6. Cre;Rosa26R-LacZ Reportersystem.....	15
I.7. Zielsetzung.....	15
I.7.1. Etablierung der Tamoxifen-Augentropfen mittels pCAGGCre-ER TM ;Rosa26R-LacZ Reportersystem.....	15
I.7.2. Nachweis der konditionellen Deletion des TGF- β -Signalwegs bei pCAGGCre-ER TM ;Tgfbr2 ^(-/-) - Mäusen und dessen Auswirkung.....	15
II. Ergebnisse.....	17
II.1. Tgfbr2 Deletion mittels tamoxifenabhängiger Cre-Rekombinase pCAGGCre-ER TM	17
II.2. Tgfbr2 ^{Δeye} MäÙe zeigten strukturelle Veränderungen in der Retina.....	17
II.3. Retinale GefäÙveränderungen von Tgfbr2 ^{Δeye} -Mäusen.....	20
II.4. Charakterisierung der retinalen GefäÙe.....	22
II.5. Auswirkungen der Tgfbr2-Deletion auf retinale Signalmoleküle.....	23
II.6. Weitere Auswirkung der Tgfbr2-Deletion.....	24
III. Diskussion.....	49
III.1. Konditionelle Deletion von Tgfbr2 im Tgfbr2 ^{Δeye} -Mausauge.....	49
III.2. Persistierende A. hyaloidea weist auf Retinamangelversorgung hin.....	49
III.3. Tgfbr2 ^{Δeye} MäÙe zeigen Anzeichen einer diabetischen Retinopathie.....	50
III.4. Tgfbr2 ^{Δeye} MäÙe entwickeln Veränderungen wie bei AMD.....	51
III.5. Angiogene und immunologische Aktivierung durch Tgfbr2-Defizienz.....	53
IV. Zusammenfassung und Ausblick.....	58
V. Material und Methoden.....	59
V.1. Materialien.....	59

INHALTSVERZEICHNIS

V.1.1. Reagenzien	59
V.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	62
V.1.3. Geräte.....	63
V.1.4. Enzyme	64
V.1.5. Kits.....	65
V.1.6. Oligonukleotid-Primer.....	65
V.1.6.1. Oligonukleotid-Primer PCR	65
V.1.6.2. Oligonukleotid-Primer quantitative Realtime RT-PCR	66
V.1.7 Antikörper	67
V.1.8. Puffer und Lösungen	69
V.1.9. Gele	72
V.1.10. Versuchstiere	72
IV.1.10.1. Tierhaltung	72
V.1.10.2. Tiere	73
V.2. Methoden.....	74
V.2.1 Molekularbiologie	74
V.2.1.1. DNA-Isolation aus Mausschwänzen.....	74
V.2.1.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	74
V.2.1.3. DNA-Fällung aus Proteinase-K-Lyse-Puffer-Gemisch.....	74
V.2.1.4. Genotypisierung der Versuchstiere mittels PCR.....	74
V.2.1.5. Gelelektrophorese zum Nachweis eines PCR-Produktes.....	75
V.2.1.6. RNA-Isolierung	76
V.2.1.7. Proteinisolierung.....	77
V.2.1.8. Western Blot Analyse.....	78
V.2.1.9 Quantitative Realtime RT-PCR zur Bestimmung der relativen mRNA Expression	79
V.2.2 Einbettung von Präparaten und Herstellung von histologischen Schnitten	82
V.2.2.1. LacZ-Färbung (β -Galactosidase) und Paraffineinbettung	82
V.2.2.2. Herstellung von Eponschnitten.....	83
V.2.2.3. Dextranperfusion und Herstellung von Kryoschnitten	84
V.2.2.4. Immunhistochemische Färbungen.....	85
V.2.2.5. TUNEL-Reaktion	87
V.2.2.6. Sehnervenzählung und Dickenvermessung	87
V.3. Augennendruckmessung.....	88
V.4. Tamoxifen-Augentropfen.....	88
V.5. Funduskopie und Fluoreszenzangiographie.....	89

INHALTSVERZEICHNIS

V.6. Trypsinverdau der Retina und PAS-Färbung	90
V.7. Statistik.....	90
VI. Anhang	91
VI.1. Literaturverzeichnis.....	91
VI.2. Abbildungsverzeichnis.....	97
VI.3. Tabellenverzeichnis.....	98
VI.4. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis.....	99
VI.5. Dank	102
VI.6. Lebenslauf	103
VI.7. Erklärung	104

I. Einleitung

I.1. Anatomie und Physiologie des Sehens

Optische Reize werden mit Hilfe von komplexen Strukturen aufgenommen und verarbeitet. Sowohl die Anatomie als auch die physiologischen Funktionen spielen für die Reizweiterleitung und deren Verarbeitung eine große Rolle.

I.1.1. Anatomische Grundlagen

Die Anatomie des Auges lässt sich prinzipiell in zwei verschiedene Systeme einteilen: Zum einen in den optischen Apparat (1), der einen lichtbrechenden und einen informationsverarbeitenden Part beinhaltet, zum anderen in ein Hilffsystem, das zur Orientierung am betrachteten Objekt dient und Schutzfunktionen erfüllt. Dazu zählen zum Beispiel Augenmuskulatur, Tränensystem, Lider und Konjunktiven.

Der *Bulbus oculi* kann in drei Schichten aufgeteilt werden. Die *Tunica fibrosa bulbi* besteht aus *Sklera* und *Kornea*. Sie ist für die Stabilität des Auges verantwortlich. Aus der *Lamina episcleralis*, der *Lamina propria* und der *Lamina fusca* setzt sich die *Sklera* zusammen (2). Diese Schichten bestehen aus lockerem, straffem Bindegewebe und Melanozyten (2). Am hinteren Augenpol ermöglicht die *Lamina cribrosa* den Fasern des *Nervus opticus* aus dem Auge auszutreten. Am vorderen Augenpol geht die *Sklera* am *Limbus corneae* in die *Kornea* über. In der Tiefe ist die *Sklera* im Bereich des *Limbus* zum Trabekelwerk (2) aufgelockert und bildet den Schlemm-Kanal (*Sinus venosus sklerae*). Hierdurch wird ein Abfluss des Kammerwassers gewährleistet. Die durchsichtige *Kornea* ist Teil des lichtbrechenden Systems. Ihre Brechkraft liegt bei 43 Dioptrien. Um die Lichtdurchlässigkeit zu gewährleisten besitzt die *Kornea* keine eigenen Blutgefäße, sondern wird durch Diffusionsvorgänge aus Tränenfilm und Kammerwasser versorgt (2). Die *Lamina epithelialis* bildet sich aus fünf bis sechs Schichten unverhornten Plattenepithels (1). Ihre Basalmembran wird als *Lamina limitans anterior (Bowman-Membran)* bezeichnet. Sie hat eine besondere Barrierefunktion. Die mittlere Schicht der *Kornea* bildet die *Substantia propria*. Parallel zur Oberfläche ausgerichtete Kollagenfibrillen und Stromazellen sichern die Lichtdurchlässigkeit (2). Zur Innenseite des Auges schließt sich die zweischichtige *Lamina limitans posterior (Descemet-Membran)* an, die aus Kollagen und Glykoproteinen besteht. Die Grenze zur vorderen Augenkammer bildet das Endothel.

Choroidea, *Iris* und *Corpus ciliare* bilden zusammen die *Tunica vasculosa bulbi* oder mittlere Augenhaut (1). Die stark vaskularisierte *Choroidea* sorgt für ausreichend Nährstoffangebot und Sauerstoffversorgung der äußeren Retina (2). Durch eingelagerte Melanozyten ist die zwischen *Lamina fusca* und *Pars optica* der Retina gelegene Aderhaut pigmentiert (1). Sie besteht aus folgenden Schichten: *Lamina suprachoroidea*, *Lamina vasculosa* und *Lamina choroidecapillaris*. Die *Lamina suprachoroidea* enthält Äste der *Arteria ophthalmica*, welche

EINLEITUNG

in der *Lamina vasculosa* in weitlumige Arteriolen übergehen und in der *Lamina choriocapillaris* in Kapillarläppchen enden (2). Sie besitzen venöse Abflusswege in die *Vv. orbitales*. Das fenestrierte Endothel der Kapillaren der *Lamina choriocapillaris* grenzt direkt an die Bruch-Membran. Sie bildet zusammen mit der Basalmembran der *Lamina choriocapillaris* und der *Basallamina* des Pigmentepithels die Blut-Retina-Schranke (3). An ihrem Aufbau sind fünf Schichten beteiligt. Die Basalmembran des RPE und die Basalmembran der Choriokapillaris bilden die innere und äußere Grenze der Bruch-Membran. Den Kern bildet eine Schicht aus elastischen Fasern, die innen und außen von Kollagenfaser umgeben sind. Bei Mäusen sind diese Schichten ähnlich wie bei der menschlichen Retina strukturiert, jedoch weniger klar abgrenzbar (4). Die elastischen Fasern der Bruch-Membran tragen zur Desakkommodation bei. Hauptaufgaben des *Corpus ciliare* sind die Kammerwasserproduktion durch unpigmentiertes Ziliarepithel und die Akkomodation der Linse durch den *M. ciliaris* und die Zonulafasern. Das *Corpus ciliare* erstreckt sich von der Basis der Iris bis zur *Ora serrata* (1). Über Kontraktion und Entspannung des *M. ciliaris* kann die Linse in ihrer Krümmung beeinflusst werden. Kontraktion des Ziliarmuskels führt zu Erschlaffung der Zonulafasern, was eine stärkere Krümmung der Linse bewirkt. Durch diesen Vorgang wird scharfes Nahsehen, die Akkomodation begünstigt (2). Desakkommodation geschieht durch passive Entspannung des *M. ciliaris* und durch die elastischen Fasern der Bruch-Membran. Der vorderste Teil der *Uvea* ist die Iris. Ihre Aufgabe ist es, den Lichteinfall ins Auge und somit die Tiefenschärfe zu regeln (1). Die Öffnung der Iris (*Mydriasis*) geschieht durch den sympathisch innervierten *M. dilatator pupillae*. Sein Gegenspieler, der parasymphatisch versorgte *M. sphincter pupillae*, verengt die Öffnung der Iris (*Miosis*) (2). Die beiden Muskeln sind im *Stroma iridis* angelegt. Hier befinden sich auch zahlreiche Melanozyten. An der Vorderfläche der Iris bildet die *Lamina epithelialis iridis* die Grenze zur vorderen Augenkammer, die Rückseite der Iris wird durch das *Myoepithelium pigmentosum* gebildet.

Zu den lichtbrechenden Strukturen zählt die Linse, ihre Brechkraft kann durch die Aufhängung am Ziliarmuskel durch die Zonulafasern beliebig verändert werden. Die Brechkraft variiert dadurch zwischen 19 und 34 Dioptrien. Die Linsenkapsel besteht aus Kollagen, elastischen Fasern und Mikrofibrillen (3). Das einschichtige Linsenepithel der Vorderfläche steht in Verbindung mit der vorderen Augenkammer, während die hintere Zellschicht (Linsenfaser) in der *Fossa hyaloidea*, umgeben vom Berger-Raum im Glaskörper zu liegen kommt (1). Die Linsenfaser untereinander sind durch Nexus und Desmosomen verbunden, enthalten keinen Zellkern und nur wenige Organellen, dafür aber linsenspezifische Proteine wie Crystallin, Filensin und Phakinin. Um die Transparenz der Linse zu erhalten sorgen Aquaporine, Na^+K^+ -ATPase und $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$ Cotransporter für einen geregelten Wasserhaushalt (3). Da Linsenfaser ständig aus Linsenzellen der Äquatorialebene entstehen, bildet sich mit der Zeit eine Kernstruktur aus den älteren wasserarmen und kernlosen Fasern heraus.

EINLEITUNG

Zwischen *Kornea* und dem vorderen Linsenpol befindet sich die vordere Augenkammer, zwischen den seitlichen Rändern der Linse, dem hinterem Rand der Iris und dem Glaskörper liegt die hintere Augenkammer. Zwischen beiden Kammern findet ein Austausch von Kammerwasser statt, das von der hinteren Kammer über die Pupille in die vordere Kammer fließt und von dort über den Schlemm-Kanal im iridokornealen Winkel in die episkleralen Venen ablaufen kann. Hierdurch wird ein konstanter Augendruck von 12 bis 20 mmHg aufrechterhalten (2). Zwischen hinterem Linsenpol und Retina befindet sich der Glaskörper (*Corpus vitreum*). Er besteht aus einer geleeartigen (1), wasser- und hyaluronsäurehaltigen Masse und füllt zweidrittel (2) des Auginnenraums aus. Er ist völlig gefäß- und zellfrei und wird lediglich vom *Canalis hyaloideus* durchzogen, dem Überrest der *A. hyaloidea*.

Die innerste und letzte Schicht des Auges ist die Retina (vgl. Abb.1). Man kann sie in zwei verschiedene Regionen unterteilen. Die *Pars optica* enthält retinales Pigmentepithel, Fotorezeptoren und Neurone, während die *Pars caeca* lediglich aus zwei pigmentierten Epithelschichten besteht (3). An der *Ora serrata* endet die *Pars caeca*, die die Hinterwand der Iris und des *Corpus ciliare* auskleidet. Sie geht hier in die *Pars optica* über, die nur im Bereich der Ursprungsstelle des *N. opticus* und der *Ora serrata* eine feste Verwachsung mit dem Pigmentepithel aufweist (1). Im restlichen Bereich liegt die Retina dem Pigmentepithel nur lose an. Es kann hier durch die fehlende Verwachsung leicht zu Ablösungen des inneren Retinablattes kommen (*Ablatio retinae*) (3). Das Pigmentepithel entspricht dem äußeren Retinablatt, während das innere Retinablatt dem *Stratum nervosum* gleichzusetzen ist (1) (vgl. Abb.1). Die Aufgabe des Pigmentepithels ist es, die Retina mit der Choroidea zu verbinden um ein ausreichendes Nährstoff- und Sauerstoffangebot für die Fotorezeptoren zu sichern (1). Gleichzeitig soll das RPE verhindern, dass schädliche Substanzen aus dem Blut übertreten können. Dies geschieht durch die Blut-Retina-Schranke (siehe Seite 2). Das Pigmentepithel lagert sich mit feinen Zellausläufern um die Fotorezeptoren (3) und phagozytiert dort die Abfallprodukte der Lichtsinneszellen, die während der Membranerneuerung abgestoßen werden. Es regeneriert das Sehpigment 11-cis-Retinal und schützt die Außensegmente der Fotorezeptoren vor Fotooxidation. Die aus Neuroektoderm entstandene Retina kann in zehn Schichten unterschieden werden.

Die Fortsätze der Fotorezeptoren, der Stäbchen und Zapfen, bilden das *Stratum segmentorum* (vgl. Abb. 1). Die Außensegmente der Fotorezeptoren enthalten das Sehpigment und grenzen direkt an das Pigmentepithel. Sie sind durch Außenfaser mit dem Zellkörper verbunden, welcher sich in der vierten Schicht, dem *Stratum nucleare externum* (vgl. Abb. 1), befindet. Die menschliche Retina besteht etwa aus 120 Millionen Stäbchen und 6 Millionen Zapfen. Die Mausretina besteht zu zirca 97 Prozent aus Stäbchen (4). Die höchste Konzentration der farbwahnehmenden Zapfen ist beim Menschen in der *Fovea centralis* lokalisiert, welche in der Mausretina fehlt. Menschen besitzen drei verschiedene, Mäuse jedoch nur zwei Arten von Zapfen. Dies bedeutet, dass Mäuse - im Gegensatz zum Menschen - über eine dichromatische Farbwahrnehmung verfügen. Die hell-dunkel wahrnehmenden Stäbchen sind in der Retinaperipherie stärker vertreten und kommen nicht in der *Fovea*

centralis vor. Das *Stratum limitans externum* trennt die Segmente der Fotorezeptoren von deren Zellkörpern und besteht aus Fortsätzen der Müller-Stützzellen (retinale Gliazellen) (1) (vgl. Abb. 1). Zwischen den Zellen *des Stratum nucleare internum* und den Fotorezeptoren gibt es zahlreiche Verschaltungen. Diese Kontakte (Synapsen und gap junctions) entsprechen mikroskopisch dem *Stratum plexiforme externum* (vgl. Abb. 1). Im *Stratum nucleare internum* befinden sich mehrere Zelltypen. Bipolarzellen, Horizontalzellen und amakrine Zellen sowie die Zellkörper der Müller-Glia sind hier gelegen. Die Bipolarzellen sind das zweite Neuron der Sehbahn und stellen die Verbindung zwischen Ganglienzellen und Fotorezeptoren dar. In der Fovea centralis findet eine 1:1 Verschaltung von Zapfen über Bipolarzellen zur Ganglienzelle statt, während in der Peripherie mehrere Zapfen auf eine Bipolarzelle geleitet werden. Horizontalzellen und amakrine Zellen sind mit ihren unterschiedlichen Verknüpfungen zwischen Fotorezeptor, Ganglienzellen und Bipolarzellen an der Signalverarbeitung beteiligt. Das *Stratum plexiforme internum* enthält Synapsen und Zellausläufer der Zellen der inneren Körnerschicht und der Ganglienzellen. Die Zellkörper des dritten Neurons (Ganglienzelle) sind im *Stratum ganglionicum* gelegen, die Axone der Ganglienzellen bilden das *Stratum neurofibrarum* (vgl. Abb. 1). Diese unmyelinisierten Fasern verlaufen entlang der Schicht zur *Papilla n. optici* und bilden dort in myelinisierter Form den *N. opticus* (1). Die Grenzfläche zum Glaskörper bildet das *Stratum limitans internum* (vgl. Abb. 1). Es besteht aus einer Basalmembran und den Endfortsätzen der Müller-Gliazellen.

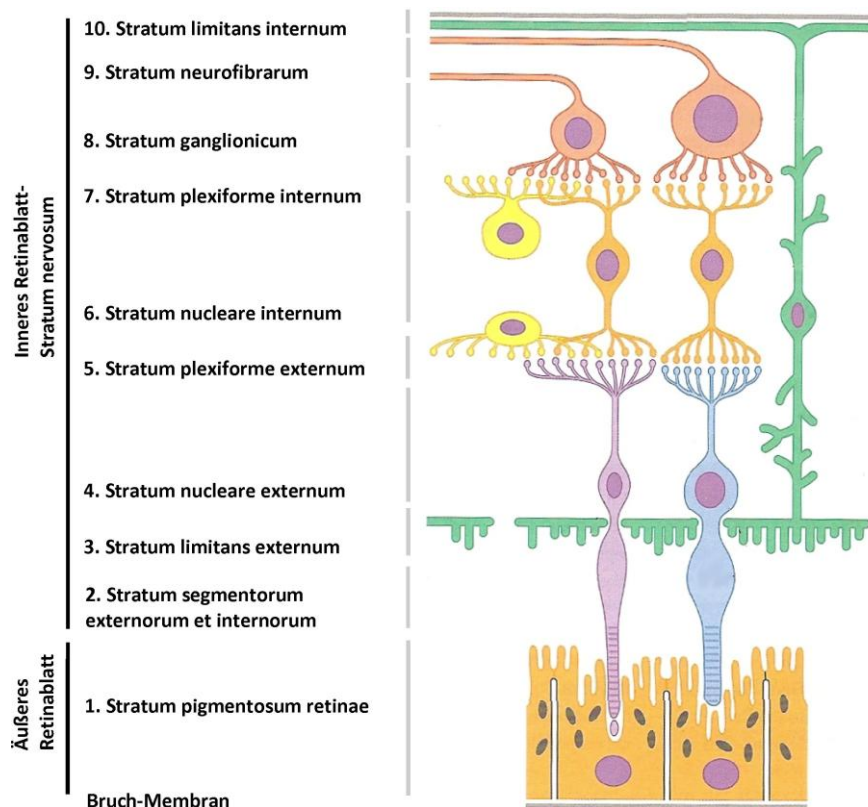


Abbildung 1: Schichten der Retina (2)

EINLEITUNG

Das innere Retinablatt entspricht dem *Stratum nervosum*. Es besteht aus zehn Schichten. Im *Stratum segmentorum externorum und internorum* befinden sich die Fotorezeptoraußen- und -innensegmente. Das aus Müllerendfüßen bestehende *Stratum limitans externum* trennt die Segmente der Fotorezeptoren von deren Zellkörpern die sich im *Stratum nucleare externum* befinden. Im *Stratum plexiforme externum* findet die Verschaltung mittels Synapsen und *gap junctions* statt. *Stratum nucleare internum* mit Zellkörpern von Bipolarzellen, Horizontalzellen, amakrine Zellen und der Müller-Gliazellen. Im *Stratum plexiforme internum* werden Zellen der inneren Körnerschicht mit Ganglienzellen verschaltet. Im *Stratum ganglionicum* finden sich Ganglienzellen deren Axone das *Stratum neurofibrarum* bilden. Die Grenzfläche zum Glaskörper bildet das *Stratum limitans internum* welches aus Basalmembran und den Endfortsätzen der Müller-Gliazellen besteht. Im äußeren Retinablatt liegen die RPE-Zellen der Bruch-Membran auf.

Die Fotorezeptoren der Retina sind das erste Neuron der Sehbahn. Es folgen die Bipolarzellen, die ihre Impulse wiederum auf die Ganglienzellen (3. Neuron) projizieren. Der zweite Hirnnerv, *Nervus opticus*, entsteht aus den zusammengefassten Axonen der Ganglienzellen in der *Papilla N. optici* (2). Retina und Sehnerv sind entwicklungsgeschichtlich aus dem Diencephalon entstanden. Der Sehnerv durchläuft die Orbita und tauscht am *Chiasma opticum* die jeweils im medialen Teil der Retina entsprungene Fasern mit der Gegenseite aus. Über den *Tractus opticus* erreichen die Axone der Ganglienzellen das *Corpus geniculatum laterale* des *Thalamus* und werden mit dem 4. Neuron der Sehbahn verschaltet. Von dort führt die Gratiolet-Sehstrahlung zur primären (Area 17) und sekundären Sehrinde (Area 18 und 19), die sich im Okzipitallappen befinden (2).

I.1.2. Physiologie des visuellen Systems

Sichtbares Licht besteht aus elektromagnetischen Schwingungen von circa 400 bis 760 nm Länge (5). Um diese Schwingungen wahrzunehmen, besitzt das Auge verschiedene Fotorezeptoren in der Retina. Diese lassen sich in Stäbchen und Zapfen unterscheiden. Ihre Außensegmente sind für die Umwandlung von sichtbarem Licht in elektrische Reize zuständig.

Stäbchen finden sich vor allem in der Peripherie der Retina, kommen nicht in der *Fovea centralis* vor und sind für das skotopische Sehen verantwortlich. Ihr Sehpigment ist das Rhodopsin. Bei der fotoelektrischen Transduktion (5) wird das Licht in elektrische Signale umgewandelt. Durch den Lichtreiz wird das Chromophor 11-cis-Retinal des Rhodopsins zu Metarhodopsin II, mit der all-trans Form, über mehrere Zwischenschritte umgewandelt (primäres Sensorpotential) (6). Hierdurch wird eine G-proteingekoppelte Signalkaskade ausgelöst, an deren Ende eine Hyperpolarisation der Zelle durch den Verschluss von Na^+ -Kanälen steht, welche dem sekundären Sensorpotential entspricht. In den Ganglienzellen wird dieses dann in ein Aktionspotential (AP) umgewandelt, wobei die AP-Frequenz mit der Negativität des Sensorpotentials ansteigt. Zapfen sind für das Tag- und Farbsehen, also das photopische Sehen verantwortlich. Sie sind am höchsten in der *Fovea centralis*, der Stelle des schärfsten Sehens, konzentriert. Dies wird durch eine 1:1 Übertragung (sonst circa 1:250) (6) auf Ganglienzellen ermöglicht. Bei den Zapfen ist das 11-cis-Retinal an drei

verschiedene Opsin-Arten gebunden, die ihre Erregbarkeit in verschiedenen Spektren des sichtbaren Lichts haben (Blau 440 nm, Rot 540 nm, Grün 570 nm) und das trichromatische Farbsehen ermöglichen (5). Mäuse sehen lediglich dichromatisch und besitzen keine *Fovea centralis*. Über Bipolarzellen und Ganglienzellen als zweites und drittes Neuron werden Erregungen weitergeleitet. Durch Horizontal- und amakrine Zellen entsteht eine Vernetzung zwischen einzelnen Bipolar- und Ganglienzellen (6). Inhibitorische Horizontalzellen tragen durch ihre Vernetzung der Bipolarzellen zur Ausbildung von rezeptiven Feldern bei, wobei jedes Feld einer Ganglienzelle entspricht. Dieses System trägt zur besseren Unterscheidung und Wahrnehmung von Hell-Dunkel-Kontrasten bei (6).

I.1.3. Gliazellen der Netzhaut

In der Netzhaut findet sich, neben den für die Fototransduktion und Reizleitung wichtigen Zellen, noch eine weitere Zellpopulation, die Gliazellen. Zu diesen gehören Astrozyten, Mikroglia und Müllerzellen.

Müllerzellen oder Müllerglia, sind die Stützzellen der Retina. Ihr Zellkörper ist im *Stratum nucleare internum* gelegen. Die Zellfortsätze der Müllerglia reichen vom *Stratum limitans internum* bis zum *Stratum limitans externum*, welches die Fotorezeptorsegmente von deren Zellkörpern trennt (2). Die Endfüßchen der Müllerzellen bilden die Grenzfläche zum Glaskörper, lagern sich um die großen Gefäße des inneren Plexus und bilden die Basalmembran, welche die Retina von Glaskörper trennt. Aufgaben der Müllerglia sind unter anderem Schutz der Nervenzellen vor zu hohen Transmitterkonzentrationen und deren Abbau, Phagozytose und Aufnahme von anderen Abbauprodukten. Aktivierte Müllerglia besitzen die für sie typische Glutaminsynthetase. Müllerendfüßchen enthalten *glial fibrillary acidic protein* (GFAP).

Mikroglia sind Teil des mononukleären phagozytären Systems. Sie wandern während der embryonalen Entwicklung in die Retina ein und phagozytieren apoptotische Zellen der inneren Körnerschicht und der Ganglienzellschicht (7). In der adulten Retina finden sich Mikrogliazellen hauptsächlich in der inneren und äußeren plexiformen Schicht. Ihre Aufgabe ist die zelluläre Immunabwehr im Bereich des zentralen Nervensystems (7). Wie Makrophagen in anderen Geweben präsentieren sie Antigene und phagozytieren apoptotisches Zellmaterial in der Retina. TGF- β vermindert die Expression antigenpräsentierender Proteine und reduziert die inflammatorischen Aktivitäten der Mikroglia. Mit diesem Wirkungsspektrum ist TGF- β 2 zusammen mit einer fehlenden Lymphdrainage und der Blut-Retina-Schranke für die Aufrechterhaltung des Immunprivilegs des Auges zuständig (8). Unter Immunprivileg versteht sich das Zusammenspiel verschiedener Faktoren und Zelltypen, welche die lokale Immunabwehr des Auges garantieren sollen, ohne die visuellen Funktionen des Auges zu stören (8). Da bereits kleine Entzündungsreaktionen den Sehprozess beeinflussen können, wäre eine normale Immunantwort im Auge mit Sehstörungen verbunden. Bei Traumen, Infektionen,

Neuronenschäden oder Ischämie im Bereich der Retina findet eine Aktivierung von Mikrogliazellen statt (7). Aktivierte Mikrogliazellen hypertrophieren, proliferieren und bilden vermehrt Zellfortsätze aus. Zudem produzieren sie eine Reihe von Zytokinen und Oberflächenmarker, wie zum Beispiel *cluster of differentiation 68* (CD68), *tumor necrosis factor* (TNF), *interleukin-6* (IL-6), *chemokin ligand 2* (CCL2), TGF- β und TGF- β -Rezeptoren (7).

I.1.4. Vaskularisation der Mausretina

Im Auge der Maus entwickeln sich die retinalen Gefäße innerhalb der ersten 14 Lebenstage (9). Die *A. hyaloidea* ist für die Versorgung der Retina vor Ausbildung der intraretinalen Gefäßversorgung zuständig. Da sich die drei Gefäßplexus der Retina wie im Folgenden beschrieben innerhalb der ersten 14 Lebenstage ausbilden und eine Versorgung durch die *A. hyaloidea* nicht mehr notwendig ist, atrophiert diese vollständig zum Canalis hyaloideus oder Cloquet-Kanal. Das Wachstum der bereits vorhandenen Gefäße innerhalb der obersten Nervenfaserschicht beginnt an der Sehnervenpapille mit Tag null und entwickelt sich bis zum zehnten postnatalen Tag bis zur *Ora serrata* (10). Beeinflusst wird dieses Gefäßwachstum von der Sauerstoffsättigung der Retina und verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF), das von Zellen der inneren Körnerschicht, wie zum Beispiel von Müllerzellen, aber auch von RPE-Zellen, Perizyten, Astrozyten und Endothelzellen, produziert wird (9). Der hauptsächliche Wachstumsschub erfolgt von Tag 2 bis 8. Die Peripherie bleibt zunächst bis Tag 10 gefäßlos (10). Die Gefäße dieses primären Plexus bilden ab dem siebten Postnataltag Kapillarstrukturen aus. Ab Tag 4 beginnen sich auch in den tieferen Schichten der Retina Gefäße zu bilden, sie wachsen aus dem oberflächlichen inneren Plexus aus und bilden ein paralleles Netzwerk zu den oberflächlichen Gefäßen (10). Diese können in den mittleren und den äußeren Plexus unterschieden werden. An der äußeren (äußerer Plexus) und inneren (mittlerer Plexus) Grenze des *Stratum nucleare internum* sowie dem *Stratum neurofibrarum* (innerer Plexus) befinden sich nun Gefäße, die miteinander in Verbindung stehen (9, 11). Ab dem zehnten Tag findet eine Ausreifung dieser Kapillarstrukturen statt (10). Die Ausbildung des mittleren Gefäßplexus ist stark abhängig von *hypoxia inducible factor* (HIF1- α) (9). Der Level von HIF1- α ist in der sich entwickelnden Retina junger Mäuse daher sehr hoch. Ist die Gefäßstruktur der Retina ausgereift, fallen die Spiegel von HIF1- α wieder ab.

I.2 Der TGF- β -Signalweg

Die TGF- β -Superfamilie beinhaltet viele verschiedene Signalproteine, die alle eine besondere Struktur, das für sie charakteristische Cystin-Knoten-Motiv, besitzen (vgl. Abb. 2). Es wird aus sechs Cystinresten und drei Disulfidbrücken gebildet. Zwei Disulfidbrücken stützen einen achteckigen Ring aus sechs Cystinresten der von einer dritten Brücke durchquert wird (12–14). Ein siebter Cysteinrest ermöglicht es, dass zwei monomere Strukturen zu einem Dimer

EINLEITUNG

über eine intermolekulare Disulfidbrücke verschmelzen. Zur Superfamilie der TGF- β gehören neben der TGF- β -Familie auch die *decapentaplegic and vegetal-1 related-* (DVR), Activin, *glial cell line-derived neurotrophoc factor-* (GDNF) Familie (12).

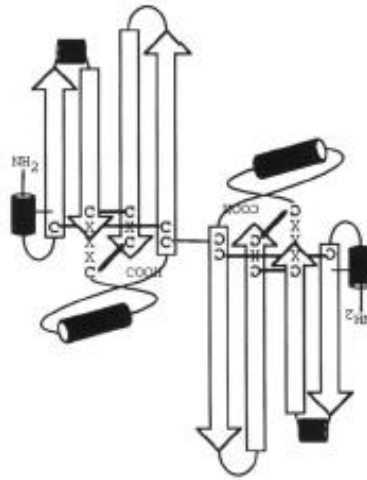


Abbildung 2: Kristallstruktur von TGF- β mit typischem Cystinknotenmotiv (13)

Das Cystin-Knoten-Motiv wird aus sechs Cystinresten und drei Disulfidbrücken gebildet. Zwei Disulfidbrücken stützen einen achteckigen Ring aus sechs Cystinresten, der von einer dritten Brücke durchquert wird (12–14). Ein siebter Cysteinrest ermöglicht es, dass zwei monomere Strukturen zu einem Dimer über eine intermolekulare Disulfidbrücke verschmelzen.

Von TGF- β selbst sind mehrere Unterformen bekannt. Es existieren drei Formen (TGF- β 1, 2 und 3) in Säugetieren sowie jeweils eine weitere Unterform bei Hühnern (TGF- β 4) und Amphibien (TGF- β 5) (12, 13, 15–17). Diese Zytokine haben vielfältige Funktionen im Organismus. TGF- β wird in Mesenchym, Thrombozyten, Knochen und Immunzellen exprimiert (12). Sowohl der Zellzyklus, die Differenzierung von Zellen, die Blutbildung, immunologische Vorgänge, Aufbauvorgänge der extrazellulären Matrix, Angiogenese und Chemotaxis unterliegen dem Einfluss von TGF- β (12). Im Auge hat TGF- β eine besondere Funktion. Hier hemmt es die zelluläre Immunantwort (18). Als Präprotein synthetisiert besitzt das Vorläufermolekül ein Signalpeptid, das es für die sekretorische Verarbeitung markiert. Nach Abspaltung einer Prodomäne, welche für die richtige Faltung zuständig ist, entsteht ein 110-140 Aminosäuren langes Produkt. Zum aktiven Signalmolekül wird TGF- β durch Homo- oder Heterodimerisation (12, 13, 16). Seine Wirkung erzielt TGF- β , indem es an verschiedene Zellstrukturen wie den TGF- β -Rezeptor (T β R) Typ 1, Typ 2 und Typ 3 bindet. T β RI und T β RII sind transmembranöse Serin-Threonin-Kinasen (13, 19). Der eigentliche Rezeptor besteht aus zwei Einheiten des T β RI sowie aus zwei Einheiten des T β RII und bildet so ein Tetramer (19–21). TGF- β bindet zuerst an den T β RII, welcher dann den T β RI rekrutiert (19, 21) (vgl. Abb. 3). Anschließend werden dessen Serin- und Threoninreste intrazellulär phosphoryliert, was wiederum eine Aktivierung der T β RI-Kinase bedingt und zur Signalweiterleitung durch Phosphorylierung von Smad-Proteinen führt (19) (vgl. Abb. 3).

Die intrazelluläre Weiterleitung eines durch TGF- β ausgelösten Signals geschieht über verschiedene Smad-Proteine. Smad-Proteine können in drei verschiedene funktionelle Gruppen eingeteilt werden (19, 22): R-Smads haben rezeptorregulatorische Funktion. Zu

ihnen gehören die Smad-Proteine Smad-1, -2, -3, -5 und -8. Smad-2 und -3 interagieren mit dem T β RI (12, 19, 22). Smad-4, ein Co-Smad bildet mit Smads der R-Gruppe Einheiten und stellt so das Bindeglied zwischen TGF- β -Rezeptor und der Transkription im Kern dar (22) (vgl. Abb. 3). Die dritte Gruppe der Smads sind die inhibitorischen Smad-Proteine Smad-6 und -7. Sie können an verschiedenen TGF- β -Rezeptoren binden und so die Phosphorylierung der R-Smads, also der rezeptorvermittelten Signalweiterleitung von TGF- β , verhindern (12, 19, 22). Die Smad-Proteine werden ubiquitiniert und im Proteasom degradiert.

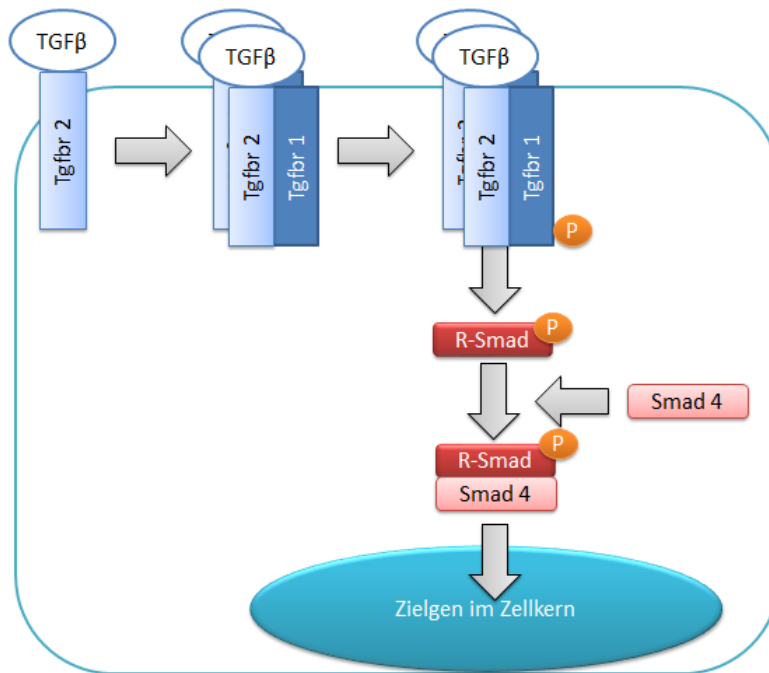


Abbildung 3: Signaltransduktion durch TGF- β (15, 19).

TGF- β bindet an den T β RII. Dieser rekrutiert dann den T β RI und ein Dimer wird gebildet. Zwei solche Dimere lagern sich zu einem Tetramer zusammen. Das Tetramer wird intrazellulär phosphoryliert. Der intrazelluläre Signalweg über Smad-Proteine wird durch Phosphorylierung aktiviert. Smad-4, ein Co-Smad bildet mit Smads der R-Gruppe Einheiten und vermittelt so die Transkription verschiedener Zielgene im Kern.

TGF- β 1 wird im Endothel der Choriokapillaris, in vitrealen Hyalozyten und der Plasmamembran der inneren bzw. äußeren Segmente der Fotorezeptorzellen in der menschlichen Retina produziert (23), ebenso wie im peripheren Nervensystem, im retinalen Gefäßendothel, in glatten Muskelzellen und in den Perizyten der Retina (23). TGF- β 2 wird dagegen in den großen choroidalen Gefäßen, im Stroma der Choroidea, den äußeren Segmenten der Fotorezeptorzellen und vitrealen Hyalozyten hergestellt. TGF- β 2 bildet sich auch im zentralen Nervensystem und retinalen glatten Gefäßmuskelzellen. TGF- β 3 in der Retina ist mit histiozytären Zellen assoziiert (23).

I.3. Einfluss von TGF- β auf Gefäße

Die Kapillaren der Retina bestehen im Wesentlichen aus folgenden drei Schichten: Endothelzelle, Basalmembran und Perizyt (24). Da diese Zellen Rezeptoren für TGF- β tragen, werden sie durch TGF- β beeinflusst.

Perizyten sind innerhalb der Basalmembran gelegen und stehen in der Retina jeweils mit einer Endothelzelle in Verbindung. Die Anzahl der Perizyten spricht für die Dichtigkeit der Blut-Retina-Schranke. Zwischen Endothelzelle und Perizyt bestehen zahlreiche Verbindungen wie *gap junctions* und *tight junctions* (25). Bei Störung dieser Verbindungen können Gefäße untergehen. Proliferation und Differenzierung der Endothelzelle werden von Perizyten beeinflusst. Stehen Mesenchymzellen in Kontakt mit Endothelzellen, wird latentes TGF- β 1 aktiviert und lässt diese zu Perizyten differenzieren (26, 27). Ein Verlust von Perizyten kann zum Beispiel bei der diabetischen Retinopathie beobachtet werden (28). Perizyten lassen sich in präkapilläre, kapilläre und postkapilläre Perizyten einteilen, wobei prä- und postkapilläre Perizyten Ähnlichkeiten mit glatten Muskelzellen haben, da sie kontraktile Elemente aus Aktin α besitzen (25). Neben Bestandteilen der Basalmembran bilden Perizyten auch verschiedene Botenstoffe wie Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ1 (PAI-1), Prostaglandin I₂, E₂ und F_{2 α} , sowie Tromboxan A₂ (25) und besitzen Rezeptoren für verschiedene Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel *platelet derived growth factor* (PDGF) und *epidermal growth factor* (EGF). Typische Perizytenmarker sind NG2, α -Aktin und Desmin.

Endothelzellen werden in gegenläufiger Art von TGF- β stimuliert. Niedrige Spiegel von TGF- β bewirken Proliferation und Migration (vgl. Abb. 4). Dies geschieht über die T β RI-activin receptor-like kinase 1 (ALK1) (26, 29, 30). ALK1 aktiviert Smad 1/5 und 8. Hohe Spiegel wirken über ALK5 und Smad 2/3 und haben wachstumshemmende Effekte (vgl. Abb 4) (26, 27). ALK1 wiederum kann ALK5 über die Hemmung von Smad 2/3 inhibieren (30). Endoglin ist ein akzessorischer Rezeptor für TGF- β (29). Es interagiert negativ mit ALK5 und wird in aktivierten Endothelzellen exprimiert (26). Erwachsene Mäuse mit einer systemischen TGF- β Inhibition durch lösliches Endoglin zeigen Veränderungen in der Retina. Neben Störungen der Blut-Retina-Schranke, Leckagen und minderperfundierten Gefäßen zeigen sie auch ultrastrukturelle Veränderungen in Zellkontakten, den *tight junctions*, zwischen Endothelzellen. Die Perizyten zeigen Kernkondensation als Zeichen der Apoptose (27).

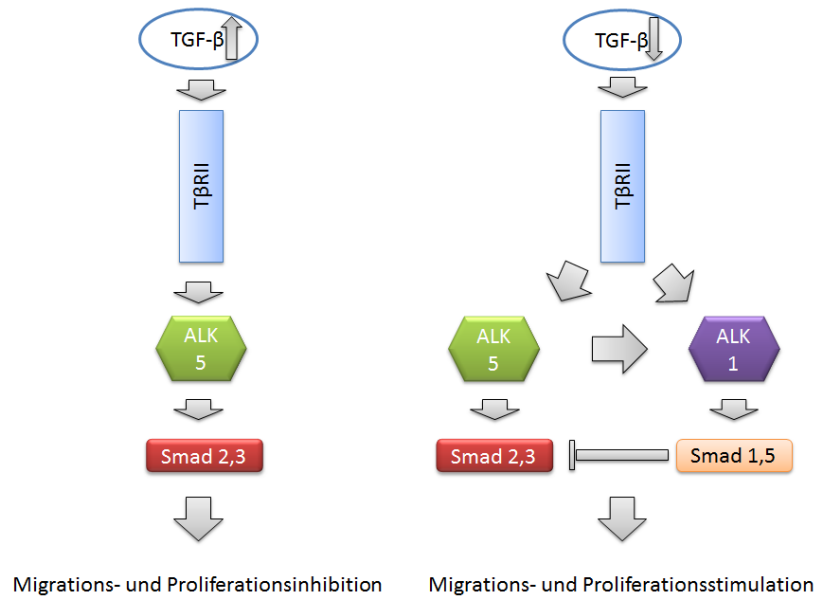


Abbildung 4: Einfluss von TGF-β auf die Endothelzelle via ALK1 und ALK5 (27).

TGF-β bindet an den TBR II, woraufhin entweder der Signalweg über ALK5 und Smad 2/3 zu Inhibierung von Zellmigration und Proliferation führt oder über ALK1 und Smad 1/5 zu Zellproliferation und Migration.

Werden Isoformen von TGF-β oder dessen Rezeptoren auf verschiedene Weise eliminiert, resultiert das in Defekten unterschiedlichster Art. Ein Mangel von TGF-β1 wirkt sich in gestörter embryonaler Mesodermdifferentierung, reduzierter Erythrozytenzahl und inadäquater Gefäßbildung aus (26). Tiere ohne TGF-β2 bilden kardiale Defekte aus. Die TBR I Defizienz, mit gestörtem Signalweg via ALK1, zeigt Defekte in der Angiogenese und eine gestörte Rekrutierung glatter Muskelzellen. Wird der TBR I Signalweg via ALK 5 beeinflusst, wirkt sich das auf Angiogenese, Endothelzellproliferation und Migration sowie Fibronectinproduktion aus (26). Wird TBR II in der Embryonalzeit ausgeschaltet, ist das aufgrund von gestörter Dottersackangiogenese und Hämatopoese letal (31). Wird der TBR III via Endoglin oder Betaglycan ausgeschaltet, zeigen sich Defekte in der Angiogenese, Rekrutierung glatter Muskelzellen sowie kardiale Defekte (26). Werden sinusoidale Endothelzellkulturen der Ratte *in vitro* mit TGF-β kultiviert, synthetisieren diese Zellen Proteine der Basalmembran wie Laminin und Kollagen IV sowie interstitielle Proteine wie Fibronectin (32). Bei Kontakten zwischen Endothelzellen und Mesenchymzellen wird TGF-β-abhängig VEGF ausgeschüttet (33). Auch Wachstumsfaktoren nehmen Einfluss auf Endothelzellen. In 3D *in vitro* Modellen bilden sich unter VEGF kapillarähnliche Strukturen aus, deren Wachstum durch Zugabe von TGF-β1 wieder stagniert (34). VEGF spielt für Angiogenese und Vasculogenese eine Rolle, genauso wie bei Permeabilitätseigenschaften von Gefäßen (35). Bei Sauerstoffmangel wird HIF1-α produziert und dadurch VEGF aus Müllerglia, RPE, Astrozyten, Perizyten und Endothelzellen freigesetzt (9, 36). Es akkumuliert in betroffenem Gewebe und ist richtungsweisend für die Einsprossung von Endothelzellen.

I.4. Erkrankungen des Augenhintergrundes mit Gefäßbeteiligung

I.4.1 Diabetische Retinopathie (DRP)

Die diabetische Retinopathie ist die häufigste Erblindungsursache im erwerbsfähigen Alter in Industrienationen. Nahezu alle Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 1 und zwei Drittel der Patienten mit einem Typ 2 Diabetes erkranken innerhalb von 20 Jahren daran. Die Blutzuckereinstellung spielt in beiden Fällen eine entscheidende Rolle. Risikofaktoren wie ein hoher HbA1c-Wert (HbA1c: an Hämoglobin A gebundene Glucose), begleitende diabetische Nephropathie, Hyperlipidämie oder Hypertonus verschlechtern die Prognose. Die DRP ist manifest, wenn folgende Befunde zu erkennen sind: Eine Mikroangiopathie mit Schwund der Perizyten, die erhöhte Permeabilität der Basalmembran, Endothelzelldekomensation und Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie VEGF (24, 37). Durch diese Defekte kommt es zu Mikroaneurysmen und Blutungen aus den retinalen Gefäßen in das Netzhautgewebe sowie zu Kapillarverschlüssen (37).

Klinisch lässt sich die DRP in zwei Bereiche gliedern. Betrifft die Störung die Stelle des schärfsten Sehens, spricht man von der Diabetischen Makulopathie (37). Ist die Peripherie der Retina befallen, kann die Erkrankung in eine proliferative sowie eine nicht-proliferative DRP eingeteilt werden. Eine nicht-proliferative diabetische Retinopathie (NPDRP) wird diagnostiziert, wenn bestimmte intraretinale Veränderungen vorliegen. Neben Mikroaneurysmen, intraretinalen Blutungen, Netzhautödemen, harten Lipidexsudaten und Kaliberschwankungen der Venen treten Cotton-Wool-Herde (Nervenfaserschichtinfarkte) auf (24, 37). Nach der 4-2-1-Regel kann das Risiko für die Entwicklung einer proliferativen DRP bestimmt werden, wenn entweder vier Quadranten Blutungen oder Mikroaneurysmen aufweisen, in zwei Quadranten venöse Kaliberschwankungen oder in einem Quadranten sogenannte IRMAs (intraretinale mikrovaskuläre Anomalien) gefunden werden können. Bei Vorliegen zweier Kriterien dieser Regel beträgt das Risiko, dass die nicht-proliferative in eine proliferative DRP übergeht, 45 Prozent. Cotton-Wool-Herde sprechen oft für ein gleichzeitiges Vorliegen einer hypertensiven Retinopathie. Sie können sich - wie Gefäßaneurysmen - zurückbilden. Hat sich aus der NPDRP erst eine PDRP gebildet, treten pathologische Gefäße über die *Membrana limitans interna* hinaus. Diese fibrovaskulären Neovaskularisationen können nach ihrer Lokalisation in Neovaskularisationen der Peripherie (NVE, engl.: *neovascularization elsewhere*) oder der Papille (NVD, engl.: *neovascularization of the disc*) eingeteilt werden. In diesem Stadium der DRP kann es leicht zu einem *Circulus Vitiosus* kommen: Aus den Neovaskularisationen können sich Glaskörperblutungen entwickeln, welche wiederum Proliferationsfaktoren induzieren, die zu neuen Neovaskularisationen führen (24). Bilden sich Neovaskularisationen im Kammerwinkel kann ein Neovaskularisationsglaukom entstehen. Betrifft die diabetische Retinopathie die Makula, spricht man von einer diabetische Makulopathie (37). Sie ist durch einen schweren Visusverlust gekennzeichnet. Durch ischämische Schwellung, intraretinale Ödeme und harte Exsudate verdickt sich die Retina an der Stelle des schärfsten Sehens.

I.4.2. Altersbedingte Makuladegeneration (AMD)

Im Alter über 65 Jahren löst die altersbedingte Makuladegeneration die diabetische Retinopathie als häufigste Erblindungsursache ab, im erwerbsfähigen Alter bleibt sie die Zweithäufigste (37). Von einer AMD spricht man, wenn Drusen, Veränderungen im retinalen Pigmentepithel oder eine Visusverschlechterung bis 0,6 auftreten. Als Risikofaktoren gelten Alter, weibliches Geschlecht, Rassenzugehörigkeit, Genetik und verschiedene Umwelteinflüsse wie z.B. Rauchen (37). Durch eine geringere Phagozytoseleistung des retinalen Pigmentepithels bleiben Abbauprodukte der Fotorezeptoren in den RPE-Zellen zurück und führen zum Zelltod. Schädigende freie Radikale bleiben erhalten. Es werden verschiedene angiogene Faktoren wie VEGF und FGF ausgeschüttet, gleichzeitig findet eine Choriokapillaratrophie statt.

Zu 90 Prozent tritt die nichtneovaskuläre oder trockene Form der AMD auf. Die Ablagerungen, die sich hier finden, können nach ihrer Lage in kollagenhaltige laminäre und phospholipidhaltige lineare Ablagerungen eingeteilt werden (37). Laminäre Ablagerungen auch „*basal laminar depotits*“ (BlamD) genannt finden sich zwischen der RPE-Basallamina und der RPE-Plasmamembran. Lineare Ablagerungen, sogenannte *basal linear deposits* (BlinDs) finden sich zwischen RPE-Basallamina und der inneren Kollagenschicht der Bruch-Membran. Drusen sind ebenfalls Ablagerungen am Augenhintergrund im Bereich der Makula. Sie finden sich zwischen RPE und Bruch-Membran und bestehen aus Lipiden und hyalinhaltigem Material. Harte Drusen sind scharf begrenzt und gelblichweiß, wohingegen weiche Drusen unscharf und flächigkonfluierend sind. Erreichen Drusen eine bestimmte Größe, können sie das RPE von der Bruch-Membran ablösen und zu dessen Atrophie führen. Bestehen fünf große oder verschmelzende Drusen, steigt das Risiko, dass aus der trockenen eine neovaskuläre, exsudative Form entsteht (37). Bei der exsudativen Form treten schnellwachsende choroidale Neovaskularisationen (CNV) aus der Choroidea durch die Bruch-Membran und wachsen durch RPE und die äußere Netzhaut. Begleitet wird dieses Wachstum von narbigen Veränderungen und Exsudationen von Blutlipiden in die Retina (harte Exsudate), auch subretinale Blutungen sind möglich (37). Auch hier kann es zu einer Abhebung des retinalen Pigmentepithels kommen. Besteht diese über einen längeren Zeitraum, atrophiert das RPE. Bei zunehmender CNV und Fibrosierung kann nach und nach die physiologische Schichtung der Netzhaut verloren gehen.

I.4.3. Untersuchungsmethoden des erkrankten Augenhintergrundes

Um Erkrankungen des Augenhintergrundes (*Fundus oculi*) darzustellen, gibt es verschiedene Untersuchungsmethoden, wie Fundoskopie (Spiegelung des Augenhintergrundes) oder Fluoreszenzangiographie (38). Bei der Fundoskopie wird mithilfe eines Ophthalmoskops Licht in den hinteren Augenabschnitt gelenkt. Von dort wird dieses Licht reflektiert und der Beobachter sieht den Augenhintergrund (6). Papille, Retina und Kapillarbett können dadurch beurteilt werden. Am Augenhintergrund befindet sich die einzige Stelle des Körpers, an der

nichtinvasiv Venen und Arterien direkt eingesehen und beurteilt werden können. So können Auswirkungen verschiedener Krankheiten wie, z. B. Diabetes mellitus oder Hypertonie auf die Gefäße beurteilt werden. Bei der Fluoreszenzangiographie wird zur besseren Darstellung der Gefäße ein fluoreszierender Farbstoff wie Fluoreszein oder Indocyaningrün intravenös verabreicht. Mithilfe eines speziellen Lichtfilters kann dieser Farbstoff zum Leuchten angeregt und damit die Gefäßsituation besser beurteilt werden.

I.5. Cre/LoxP System CAG-Cre-Rekombinase

Mit Hilfe des Cre/LoxP Systems ist es möglich, einen konditionellen knock-out des *Tgfbr2* zu erreichen (39). Das auf Chromosom 9 gelegene *Tgfbr2* wird hierfür an beiden Enden mit einer LoxP-Gensequenz versehen. Eine LoxP-Sequenz ist ein 34 bp langer Abschnitt mit folgender Nukleotidsequenz: 5'-ataacttcgtata-gcatacat-tatacgaagttat-3' (40). Ist ein Genabschnitt von solchen Sequenzen umschlossen, bezeichnet man ihn als gefloxt. Das Enzym Cre-Rekombinase gehört zur Familie der Integrasen. Es kann an geflochten Gensequenzen die DNA aufspalten und dann entweder ein Stück DNA einfügen oder dieses ausschneiden (40, 40). Wenn man eine Mauslinie, die diese geflochte Gensequenz enthält, mit einer Mauslinie, welche positiv für eine Cre-Rekombinase ist, kreuzt, kann eine *Tgfbr2* defizientes Tier entstehen (41). Das ursprüngliche System dieser spezifischen Rekombinationsmöglichkeit stammt aus dem Bacteriophagen P1 (42, 43). Homozygoten *Tgfbr2* defiziente Mäuse versterben bereits in der Embryonalperiode an verschiedenen Defekten (31). Um homozygoten *Tgfbr2* defiziente Mäuse in späteren Entwicklungsstufen zu erhalten, wurden Mäuse verwendet, in denen durch Tamoxifen eine spezielle Cre-Rekombinase aktiviert werden kann. Diese pCAGGCre-ERTM ist eine Cre-Rekombinase, die mit der Bindestelle eines mutierten Östrogenrezeptors (ERTM) verknüpft ist (44–46). In normalem Zustand befindet sich die mit dem mutierten Östrogenrezeptor verbundene pCAGGCre-ERTM an *heat shock protein 90* (Hsp 90) gebunden und somit inaktiv im Zytoplasma (44). Die Translokation und Rekombinationstätigkeit der pCAGGCre-ERTM im Zellkern wird somit verhindert. Erst durch die Abspaltung von *Hsp 90* mithilfe von Tamoxifen kann die pCAGGCre-ERTM in den Zellkern wandern und ihre Rekombinationstätigkeit, in diesem Fall das Ausschneiden einer Gensequenz des *Tgfbr2*, beginnen (44). Das bedeutet, dass die Rekombinationstätigkeit der pCAGGCre-ERTM durch die Anwesenheit von Tamoxifen aktiviert wird. Tamoxifen ist ein selektiver Inhibitor des Östrogenrezeptors. Die Expression von pCAGGCre-ERTM wird von einer chimären Promotor/Verstärker-Sequenz des Cytomegalovirus und einer β -globin Promotor/Verstärker-Sequenz aus dem Huhn gesteuert (44).

I.6. Cre;Rosa26R-LacZ Reportersystem

Um die Expression einer Cre-Rekombinase zu kontrollieren, kann das Cre;Rosa26R-LacZ Reportersystem verwendet werden. Mäuse mit dem Genotyp Rosa26R-LacZ tragen eine von Lox/P Seiten flankierte Stopp-Sequenz, das LacZ-Gen, das ursprünglich aus *Escherichia coli* stammt, und eine Polyadenylatsequenz an einer XbaI-Stelle auf Chromosom 6 (47, 48). Die Stopp-Sequenz beinhaltet eine Neoexpressions-Kassette sowie eine triple-Polyadenylatsequenz. Diese Stopp-Sequenz verhindert die Expression des LacZ-Gens während der normalen Transkription (48). Wenn eine Maus, die das Rosa26R-LacZ Gen trägt, mit einer Cre-Maus verpaart wird, tragen die Jungtiere beide Gene. Die vorhandene Cre-Rekombinase kann die gefloxt Stopp-Sequenz entfernen und die Transkription des LacZ-Gens ermöglichen. Genprodukt ist dann das Enzym β -Galactosidase. Mittels LacZ Färbung kann die Aktivität der β -Galactosidase nachgewiesen werden, indem man ihr das Substrat X-Gal anbietet (49, 50). Es wird in Galaktose und ein Indigo-Derivat gespalten. Zellen, in denen β -Galactosidase diese Reaktion katalysiert, sind nach dem LacZ-Staining blau (49, 50).

I.7. Zielsetzung

I.7.1. Etablierung der Tamoxifen-Augentropfen mittels pCAGGCre-ERTM;Rosa26R-LacZ Reportersystem

Mit Hilfe des pCAGGCre-ERTM;Rosa26R-LacZ Reportersystem soll gezeigt werden, dass durch eine Applikation von tamoxifenhaltigen Augentropfen auf das geschlossene Lid eines vier Tage alten Mausbabys eine Aktivierung der tamoxifenabhängigen Rekombinase möglich ist. Dies soll mit β -Galactosidase-Färbung an Paraffinschnitten nachgewiesen werden. Bei der *Tgfbr2* geflochten pCAGGCre-ERTM-Linie soll dann mit diesen Tamoxifenaugentropfen eine konditionelle Deletion im Bereich der Retina zu einem beliebigen Zeitpunkt erreicht werden.

I.7.2. Nachweis der konditionellen Deletion des TGF- β -Signalwegs bei pCAGGCre-ERTM;Tgfbr2^(-/-)-Mäusen und dessen Auswirkung

Tiere mit einem kompletten konventionellen Verlust von *Tgfbr2* und damit T β RII, sterben bereits während der Embryonalperiode, da sie auf Grund gestörter Dottersackangiogenese und Hämatopoese nicht lebensfähig sind (31). Eine Beurteilung der Bedeutung von TGF- β und dessen T β RII nach der Embryonalzeit beim heranwachsenden oder adulten Tier war bisher nicht möglich. Wäre es möglich, eine konditionelle Deletion des *Tgfbr2* mittels des pCAGGCre-ERTM;Tgfbr2^(-/-)-Systems zu erreichen, könnten die Auswirkungen des TGF- β -Signalwegverlustes auf die Retina und ihre postnatale Entwicklung untersucht werden. Die Deletion von *Tgfbr2* wäre dann zu jedem beliebigen Zeitpunkt möglich (44). Da TGF- β bei der Entwicklung von Gefäßen eine Rolle spielt, sich die Gefäße der Mausretina aber erst innerhalb der ersten 14 Lebenstage entwickeln und die Deletion von *Tgfbr2* in dieser Arbeit

EINLEITUNG

in die Zeit von Postnataltag 4 bis 8 fiel, sollte besonderes die Gefäßsituation der Versuchstiere betrachtet werden. Immunhistochemischen Färbungen, quantitativer Realtime RT-PCR und Western Blot Analyse sollen die Deletion des *Tgfbr2* und TβRII bestätigen. Phänotypanalysen und morphologische Veränderungen sollten mittels Semidünnschnitten und Transmissionselektronenmikroskopie beschrieben werden, gefäßspezifische Veränderungen mittels Fluoreszenzangiographie und Dextranperfusion, sowie Veränderungen von Wachstumsfaktoren, immunologischen und angiogenen Faktoren auf molekularer Ebene.

Tiere des Genotyps $pCAGGCre-ER^{TM};Tgfbr2^{(-/-)}$, also homozygote *Tgfbr2* defiziente Mäuse werden im Folgenden als *Tgfbr2*^{Δeye} bezeichnet.

II. Ergebnisse

II.1. *Tgfb2* Deletion mittels tamoxifenabhängiger Cre-Rekombinase pCAGGCre-ERTM

pCAGGCre-ERTM;Rosa26R-LacZ-Reportermäuse, die mit Tamoxifenaugentropfen behandelt wurden, zeigten nach β -Galactosidasefärbung eine intensive Blaufärbung in allen Schichten der Retina, besonders im Bereich der Fotorezeptorsegmente und der äußeren plexiformen Schicht. Ebenso waren die Choriokapillaris, die Sklera, die Kornea, das Trabekelwerk und der *N. opticus* an der Reaktion beteiligt. Bei gleichaltrigen Rosa26R-LacZ ohne pCAGGCre-ERTM ist keine Färbung der genannten Strukturen zu erkennen (vgl. Abb. 5 A) (113,114).

Mittels quantitativer Realtime RT-PCR konnte die *Tgfb2*-Deletion im Bereich der Retina von *Tgfb2* ^{Δ eye}-Mäusen nachgewiesen werden. Die relative Menge von *Tgfb2* mRNA war in den Augen von *Tgfb2* ^{Δ eye}-Mäusen im Alter von vier Wochen, verglichen mit den Kontrollen, hochsignifikant vermindert (vgl. Abb. 5 B) (114). Ebenso konnte die Deletion von T β RII im Western Blot nachgewiesen werden. Proteinisolierungen aus dem Bereich der Retina sowie des vorderen Augenabschnittes zeigten in der Western Blot Analyse die für T β RII spezifische Proteinbande bei 70 kDa. Diese Bande war bei gleicher Ladungskontrolle bei *Tgfb2* ^{Δ eye}-Proben wesentlich schwächer zu sehen. Auch in der densitometrischer Darstellung der Western Blots war die signifikante Verringerung von T β RII zu erkennen (vgl. Abb. 5 E, F) (114).

In immunhistochemischen Färbungen mittels spezifischer T β RII Antikörper konnte die Lokalisation des Rezeptors dargestellt werden. Bei den Kontrollen zeigte sich eine starke Fluoreszenz an Zellen der Ganglienzellschicht, im Bereich der äußeren plexiformen Schicht, der inneren Körnerschicht, sowie der Fotorezeptorinnensegmente und der *Choroidea*. *Tgfb2* ^{Δ eye}-Mäuse zeigten lediglich eine schwache Fluoreszenz im Bereich der Ganglienzellschicht (vgl. Abb. 5 C). Zur weiteren Kontrolle der *Tgfb2*-Deletion wurde ein downstream Mediator des TGF- β -Signalweges, das regulatorische Smad-Protein3 in seiner phosphorylierten Form (pSmad 3), immunhistochemisch dargestellt. In grüner Fluoreszenz der pSmad3 Färbung stellten sich in den Kontrollen Zellen der Ganglienschicht dar. An *Tgfb2* ^{Δ eye}-Schnitten waren die pSmad3-positiven Zellen der Ganglienzellschicht wesentlich geringer gefärbt (vgl. Abb. 5 D) (114).

II.2. *Tgfb2* ^{Δ eye} Mäuse zeigten strukturelle Veränderungen in der Retina

Um die Auswirkung der konditionellen *Tgfb2*-Deletion zu erfassen wurden zunächst Meridionalschnitte vier Wochen alter *Tgfb2* ^{Δ eye} Mäuse und von Kontrollen erstellt. Hierbei fiel bereits ein Gefäßnetz auf, welches sich vom *N. opticus* der *Tgfb2* ^{Δ eye}-Mäuse in Richtung Linse erstreckte und bei dem es sich um eine persistierende *A. hyaloidea* handelt. Diese Arterie bildet sich normalerweise im Alter von 2-3 Wochen zurück (51). Auch in der Retina waren Auffälligkeiten zu sehen. Drusenartigen Auflockerungen der Bruch-Membran und RPE Schichtungsstörungen sowie vaskuläre Veränderungen zeigten sich in zentralen und

peripheren Bereichen der Netzhaut. Die vaskulären Veränderungen fanden sich bevorzugt zwischen Ganglienzellschicht und inneren plexiformen Schicht (vgl. Abb. 6 B) (114). Im Gegensatz dazu waren die Kontrollen zu allen Zeitpunkten normal strukturiert (vgl. Abb. 6 A, C, E und 7A).

Um den weiteren Fortschritt der Veränderungen festzustellen, wurden anschließend Kontrollen und *Tgfbr2^{Δeye}* Mäuse im Alter von acht, zwölf und sechzehn Wochen histologisch untersucht. In allen Altersstufen zeigte sich die persistierende *A. hyaloidea*. Zusätzlich zu den Befunden der vier Wochen alten Tiere fand sich bei acht Wochen alten *Tgfbr2^{Δeye}* Tieren eine verdünnte äußere plexiforme Schicht. In der äußeren Körnerschicht war die Anzahl der Zellen vermindert und deren Architektur aufgelockert. Die äußeren Fotorezeptorsegmente waren degeneriert und es bildeten sich zystenartige Hohlräume und Ablagerungen zwischen dem retinalen Pigmentepithel und den wenigen verbliebenen Fotorezeptorinnensegmenten. Das RPE wirkte verdichtet und im Gegensatz zu den Kontrollen verbreitert (vgl. Abb. 6 D). In größerer Aufnahme zeigte sich das RPE teilweise hyper- und hypopigmentiert, zudem waren drusenartige Einlagerungen zu sehen (vgl. Abb. 6 I Mitte).

Im Alter von zwölf Wochen nahmen die strukturellen Veränderungen der Retina der *Tgfbr2^{Δeye}* Tiere zu. Oberhalb der Bruch-Membran entstanden weitflächige Areale, in denen sich zystische Hohlräume und Zelldetritus bildeten. Diese Veränderungen traten zwischen Bruch-Membran und RPE auf, und sind mit *basal laminar deposit* zu vereinbaren. Das RPE zeigte sich teilweise lückenhaft. Weiterhin fanden sich Einblutungen zwischen Bruch-Membran und äußerer Körnerschicht, sowie Glaskörperblutungen. Fotorezeptorsegmente wurden ebenso wie die äußere plexiforme Schicht abgebaut. Membranen erstreckten sich von zentral am Sehnervenkopf bis zur *Ora serrata* (vgl. Abb. 6 F, G) (114). Zudem konnten vaskuläre Strukturen, die aus der Ganglienzellschicht in den Glaskörperraum übertraten und mit proliferativen Neovaskularisationen vereinbar sind beobachtet werden (vgl. Abb. 6 H) (114). Zwischen Bruch-Membran und äußerer Körnerschicht fanden sich mit Kapillaren durchzogene Ablagerungen im Bereich des atrophisch zerstörten RPE. Innerhalb dieser Masse waren amorphe Gebiete, Pigmenteinschlüsse, RPE-Zellanteile und große mononukleäre Zellen vorhanden. Einige dieser Ablagerungen wiesen Ähnlichkeit mit *basal laminar deposits* (BlamD) auf (vgl. Abb. 6 I unten).

Sechzehn Wochen alte *Tgfbr2^{Δeye}* zeigten einen Phänotyp mit unterschiedlicher individueller Ausprägung. Die mildere Form der Veränderung beinhaltete, wie schon im Alter von acht und zwölf Wochen, eine Einschmelzung von Fotorezeptorsegmenten und zystische Gebilde zwischen dem RPE und den Fotorezeptorinnensegmenten. Das RPE zeigte sich stellenweise aufgeworfen und verdickt, die *A. hyaloidea* persistierte und erweiterte Gefäße waren im Bereich der Ganglienzellschicht zu erkennen. Die stärkere Ausprägung des Phänotyps zeigte eine komplette Zerstörung und Ablösung der Retina mit peripheren und zentralen Blutungen im Glaskörper und im Bereich der vorderen Augenkammer (vgl. Abb. 7 B, C) (114).

Um detailliertere Informationen über den Phänotyp zu erhalten, wurden Untersuchungen mittels Transmissionselektronenmikroskopie an vierzehn Wochen alten *Tgfbr2^{Δeye}* Mäusen und deren Kontrollen durchgeführt. Die Kontrollen zeigten einen normaler Aufbau der äußeren Netzhautschichten, der Basalmembran und der Choriokapillaris. Die Außensegmente der Fotorezeptorzellen waren dicht aneinander gereiht. Um die Zellfortsätze der Stäbchen legten sich die feingliedrigen apikalen Einfaltungen des retinalen Pigmentepithels. Die Zellen des RPE zeigten Pigmenteinlagerungen und Zellorganellen wie Mitochondrien. An der unteren Seite des RPE legte sich die Bruch-Membran an das basale Labyrinth an. Die Bruch-Membran selbst zeigte sich als schmales Band zwischen den basalen Einfaltungen und den Gefäßen der Choriokapillaris. Ihr fünfschichtiger Aufbau war regelrecht zu erkennen. Die Gefäße der Choriokapillaris hatten fenestriertes Endothel (vgl. Abb. 8 A). In den *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen waren nur noch vereinzelt Fotorezeptoraußensegmente zu sehen. An ihre Stelle trat eine wenig elektronendichte, amorphe Ablagerung mit granulierter Struktur. Diese Veränderungen fanden sich oberhalb des Pigmentepithels. Die Basalmembran zeigte sich verdickt. Das basale Labyrinth war zerstört und hatte Einlagerungen von wenig elektronendichtem Material und Erythrozyten. Die RPE-Zellen hoben sich von der Basalmembran ab (vgl. Abb. 8 A). Die Gefäße in der Retina der Kontrollen besaßen kontinuierliches Endothel. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Gefäßen, welche sich zwischen Bruch-Membran und RPE befanden, enthielten dagegen fenestriertes Endothel (vgl. Abb. 8 B). In beiden Versuchsgruppen waren ultrastrukturell Endothelzellen und Perizyten um die Gefäße zu erkennen (vgl. Abb. 8 B).

Die Bruch-Membran und ihre Umgebung wiesen bei *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen einige Veränderungen auf. Die einzelnen Schichten der Bruch-Membran waren schlechter voneinander abgrenzbar und weniger elektronendicht. Bei gleicher Vergrößerung stellte sie sich dicker als in den Kontrollen dar. Diese Veränderung zeigt sich vor allem in der äußeren kollagenen Schicht in der sich auch kleine vesikuläre Einschlüsse fanden (Abb. 8 D). Dabei könnte es sich entweder um Ausläufer der Zellen unterhalb der Bruch-Membran oder um vesikuläre Einschlüsse handeln. Beides wird bei der AMD des Menschen gefunden (52). Das basale Labyrinth der RPE-Zellen präsentierte sich weniger dicht oder sogar völlig abgebaut. Ihr Zytoplasma war unruhig und hatte kleine elektronendichte und granulierte Einschlüsse. Mitochondrien und raues endoplasmatisches Retikulum fanden sich nahe an der basalen Plasmamembran der RPE-Zellen (vgl. Abb. 8 D). Oberhalb der Bruch-Membran war amorphe Masse zu sehen, bei der es sich um *basal laminar deposits* (BlamD) handeln könnte (vgl. Abb. 8 C). Bei genauerer Betrachtung zeigte die Bruch-Membran blasige runde oder längliche Aufwerfungen, die sich an ihrer Innenseite in Richtung des basalen Labyrinths aufbauten. Diese Veränderungen sind mit *basal linear deposit* (BlinD) zu vereinbaren (53). BlinD ist aus bruchmembranähnlichem Material aufgebaut und findet sich zwischen der Basalmembran der RPE-Zellen und der inneren kollagenen Schicht der Bruch-Membran. Neben diesem amorphen, basalmembranähnlichen Material können in diesen Veränderungen auch Melaningranula und Zellorganellen durch Erosion der Zellmembranen enthalten sein (53). Zwischen der äußeren kollagenen Schicht der Bruch-Membran und der Basalmembran der

Choriokapillaris waren Zellen eingelagert. Diese Zellen besaßen teilweise lange Zellausläufer, die tief in die Bruch-Membran eindringen und viele vesikuläre Strukturen in ihrem Zytoplasma enthalten. Hierbei kann es sich um Endothelzellen der Choroidea oder um Makrophagen handeln. Die Basalmembran des RPE als innerste Schicht der Bruch-Membran wies Erosionen auf, durch die wenig elektronendichtes Material aus der Bruch-Membran fingerförmig in den intermembranösen Bereich des basalen Labyrinths übertrat. An diesen Stellen war die Kollagenstruktur der Bruch-Membran gestört. Oberhalb der blasig runden oder länglichen Aufwerfungen der Bruch-Membran war das basale Labyrinth des RPE degeneriert und die RPE-Zellen abgeflacht (vgl. Abb. 8 D, E).

II.3. Retinale Gefäßveränderungen von *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen

Eine genauere Situation der anatomischen Gefäßformationen und Augenhintergrundänderungen *in vivo* zeigten Fluoreszenzangiographie und native Aufnahmen. Bei vier Wochen alten Kontrollen stellten sich der Augenhintergrund und das mittels Fluoreszenzangiographie dargestellte Gefäßnetzwerk normal dar. Die Gefäße waren gut abgrenzbar, regelrecht verzweigt und kontinuierlich gefüllt (vgl. Abb. 9 A) (114). Die Beurteilung von *Tgfbr2^{Δeye}*-Tieren gestaltete sich schwieriger, da die Gefäßstrukturen bei Extravasation des Fluoreszeins wesentlich schlechter gegenüber dem Hintergrund abgrenzbar waren. Die dargestellten Gefäße waren nicht wie bei den Kontrollen geradlinig radiär angeordnet, sondern weisen zahlreiche Windungen (*Tortuositas vasorum*) und Kaliberschwankungen sowie Mikroaneurysmen auf. Zentral waren in der Fundusaufnahme Blutungen und Störungen des Pigmentepithels wie Hypopigmentierung zu erkennen.

Mit acht Wochen traten in der Funduskopie zusätzlich scharf begrenzte und weniger gut abgrenzbare Exsudate sowie hyper- und hypopigmentierte Areale auf (vgl. Abb. 9 B) (114). Diese Pigmentierungsstörungen sind gut mit dem Bild einer geographischen Atrophie zu vereinbaren, bei der eine zentrale Hypopigmentierung und Atrophie des RPEs auftritt, welche von einem hyperpigmentierten Rand umgeben ist. Die weniger gut abgrenzbaren Einlagerungen können alleine auf der Grundlage der Funduskopie nicht einer bestimmten Lage innerhalb der Retina zugeordnet werden.

Im Verlauf dominierten Exsudate den funduskopischen Befund bei *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen. Mit zwölf Wochen traten weiche, teils konfluierende und scharf begrenzte harte Drusen auf (vgl. Abb. 9 C und 9 Ea). Die Mikroaneurysmen waren weiterhin zu sehen. Im unteren Bereich der fluoreszenzangiographischen Aufnahme sind Gefäßleckagen zu erkennen. Auch hier sind hyper- und hypopigmentierte Areale vorhanden und im Bereich der depigmentierten Areale sind durchscheinende Choroideagefäße zu sehen (vgl. Abb. 9 C und 9 Ea). Die *A. hyaloidea* verzweigte sich bis zur Linse (vgl. Abb. 9 Eb und 9 Ec).

In den fluoreszenzangiographischen Untersuchungen von *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen nach sechzehn Wochen waren Augenhintergrund und Gefäßstatus nicht mehr beurteilbar, da sich die

Netzhaut abgelöst hatte. Blutungen waren im peripheren Bereich zu erkennen. In den Kontrollen zeigen sich auch nach sechzehn Wochen noch eine normale Funduskopie und Angiographie (vgl. Abb. 9 D).

An dextranperfundierten Retina-Flachpräparaten vier Wochen alter Kontrollen ließen sich sowohl die großen Ästen der *A. und V. centralis retinae* als auch die feinen Verzweigungen dieser Gefäße zeigen. Sie stellten sich als ein feines regelmäßiges Netzwerk dar (vgl. Abb. 10 A). Fokussierte man genauer durch die verschiedenen Schichten der Netzhaut, waren die drei unterschiedlich tief gelegenen Gefäßplexus zu erkennen. Auch sie lagen regelmäßig und kontinuierlich vor. Die Verteilung des intravasalen Dextrans war gleichmäßig (vgl. Abb. 10 A a, b, c). In Präparaten von *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen fielen wieder Mikroaneurysmen, wie in der angiographischen Darstellung beobachtet, auf. Neben diesem Befund stellten sich die Äste der *Vasa centralis retinae* deutlich dicker dar. Sie waren stärker mit fluoreszierendem Dextran gefüllt. Das Netzwerk der kleinen Blutgefäße und Kapillaren zwischen den zentralen Gefäßen war wesentlich lockerer. Auch die weiter oben beschriebene *Tortuositas vasorum* konnte in der Dextranperfusion dargestellt werden (vgl. Abb. 10 A). Bei Einstellung des oberen, mittleren und tiefen Plexus fiel auf, dass die dargestellten Gefäße dicker waren, aber weniger dicht zueinander lagen. In allen drei Schichten zeigten sich die typischen Mikroaneurysmen der Gefäße (vgl. Abb. 10 A a, b, c) (114).

Lokalisation und Aufbau der drei Gefäßplexus konnten in dextranperfundierten Kryomeridionalschnitten noch genauer gezeigt werden. Wie oben beschrieben bilden die retinalen Gefäße der Maus drei Gefäßplexus. Sie befinden sich im *Stratum neurofibrarum* (innerer Plexus), an der inneren (mittlerer Plexus) und äußeren (äußerer Plexus) Grenze des *Stratum nucleare internum*. Die Gefäßstrukturen in den Kontrollen folgten genau dieser beschriebenen Lokalisation. Die filigranen dextrangefüllten Gefäße liegen oberhalb der Ganglienzellschicht, sowie auf und unter der inneren Körnerschicht. Einzelne Gefäße zogen durch die innere plexiforme Schicht und die innere Körnerschicht und bildeten Verbindungen zwischen den drei Plexus (vgl. Abb. 10 B) (114). In den *Tgfbr2^{Δeye}*-Schnittbildern konnte man einige Unterschiede zu den Kontrollen erkennen. Alle abgebildeten Gefäße hatten ein deformiertes, größeres Lumen. Die Lokalisation der einzelnen Gefäße konnte teilweise keiner der drei üblichen Plexuslagen zuteilen werden. Lediglich der innere Plexus war an der richtigen Stelle ausgebildet. Oberhalb der inneren Körnerschicht fehlten zum Teil Gefäße oder waren nur spärlich ausgebildet. Unterhalb der inneren Körnerschicht fand sich nahezu kein dextranperfundiertes Gefäß. Dafür befanden sich Gefäßanteile in großem Ausmaß in der inneren Körnerschicht (vgl. Abb. 10 B). Nicht nur in der Anordnung der retinalen Gefäße waren diese Veränderungen zu erkennen. Normalerweise bildet die Bruch-Membran zusammen mit der Basalmembran der *Lamina choriokapillaris* und der Basallamina des Pigmentepithels die äußere Blut-Retina-Schranke, eine gefäßundurchlässige Schicht. Einzelne Gefäßstrukturen, die die Blut-Retina-Schranke durchbrachen waren in *Tgfbr2^{Δeye}*-Meridionalschnitten deutlich zu erkennen (vgl. Abb. 10 C).

II.4. Charakterisierung der retinalen Gefäße

Mithilfe der immunhistochemische Färbung für PLVAP konnte der Ursprung der veränderten Retinagefäße festgestellt werden. Das plasmalemma vesicle-associated protein (PLVAP) ist ein Marker für fenestriertes Endothel (54, 55). Die Gefäße der Retina bestehen normalerweise nicht aus fenestriertem Endothel, jedoch die der Choriokapillaris. In den vier Wochen alten Kontrollen färbte sich die Choriokapillaris an. Das Überlagerungsbild aus PLVAP-Färbung und DAPI-Zellkernfärbung zeigte, dass alle Zellkerne des retinalen Pigmentepithels in einer Linie auf der Choriokapillaris aufsaßen. In den vier Wochen alten *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen war die Anzahl der Zellkerne im RPE, verglichen mit den Kontrollen, erhöht. Es zeigten sich PLVAP-positive Strukturen oberhalb der RPE-Zellkernschicht. Gefäße, die sich normalerweise in der Retina befinden, sind nicht mit fenestriertem Endothel ausgekleidet und waren daher erwartungsgemäß PLVAP negativ (vgl. Abb. 11).

Kollagen Typ IV ist Bestandteil der Basallamina, welche Teil der Basalmembran ist. Die Endothelzellen größerer Gefäße sowie der Kapillaren werden von einer Basalmembran umgeben (113). Kollagen IV-positiv waren bei den vier Wochen alten Kontrollen die Gefäßwände der drei Retinaplexus in ihrer anatomisch korrekten Position. Sie waren schlank konfiguriert (vgl. Abb. 12 A) (114). Die choroidalen Gefäße stellten sich ebenfalls gut dar. Sie lagen gut abgrenzbar in einer Linie unterhalb der Zellkerne des RPE (vgl. Abb. 12 B). Auch die Basallamina der Ganglienzellschicht färbte sich positiv. Bei *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen mit vier Wochen fand sich erneut das oben beschriebene Bild. Es zeigten sich großlumige, deformierte Gefäße, die keinem der obengenannten Plexuslagen zugeordnet werden konnten. Lediglich die Gefäße der Nervenfaserschicht lagen anatomisch richtig (vgl. Abb. 12 A). Die Basallamina der Ganglienzellschicht als Grenze zum Glaskörper war nicht zu erkennen. Auch hier traten Gefäßstrukturen durch die Reihe der RPE-Zellkerne hindurch (vgl. Abb. 12 B).

Die immunhistochemische Fibronektin-Färbung wurde an vier Wochen alten Kontrollen und *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen durchgeführt. In den Kontrollen zeigte sich Fibronektin im Bereich der Bruch-Membran, der Choriokapillaris und der retinalen Gefäßstrukturen. Bei *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen waren dieselben Strukturen zu erkennen. Während bei den Kontrollen in den Lumina der Retinagefäße keine Färbung auftraten, zeigt sich bei *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen innerhalb der inneren Plexusgefäße eine starke Segmentierung und unruhige Färbung. Die in den Kontrollen durchgehend zu erkennende Bruch-Membran war in *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen lückenhaft angefärbt. Es traten große, fibronektinpositive Gefäße zwischen Bruch-Membran und äußerer Körnerschicht auf (vgl. Abb. 13). Fibronektin färbte sowohl die Bruch-Membran als auch das im BlinD enthaltene Fibronektin an (53). In der Färbung war deswegen sowohl die Bruch-Membran als auch eine weitere positive Linie zu erkennen.

Der Trypsinverdau der Retina sollte nun Aufschluss über Endothelzellen, Perizyten und Kapillarformationen geben, sowie über den Durchmesser der Retinagefäße (56). Im Retinatrypsinverdau der Kontrollen zeigten sich schlanke, viel verzweigte und gleichmäßig kaliberstarke Gefäße. Bei *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen stellten sich die Gefäße bei gleicher

Vergrößerung verdickt und ausgeweitet dar. In großer Zahl traten käulenartige Gefäßerweiterungen auf. In diesen Mikroaneurysmen, die sich zu meist an Gefäßendungen befanden, waren zahlreiche runde Zellkerne lokalisiert. (vgl. Abb. 14).

Desmin und α -smooth-muscle-Aktin (sm α -Aktin) sind unter anderem Marker für Perizyten. Die immunhistochemischen Färbungen für Desmin (vgl. Abb. 15 A) und sm α -Aktin (vgl. Abb. 15 B) zeigen sehr ähnliche Ergebnisse. In den Kontrollen waren bei beiden Färbungen im Bereich der drei Gefäßplexus Desmin- und sm α -Aktin-positive Strukturen lokalisiert. Vorherig intravasal appliziertes fluoreszierendes Dextran zeigt die Gefäße in der Retina. Sowohl für Desmin als auch für sm α -Aktin war eine Lokalisation der beiden Marker um Gefäße zu erkennen. Bei *Tgfb β 2* ^{Δ eye}-Mäusen sind alle mit Dextran dargestellten Gefäße von Desmin- bzw. sm α -Aktin-positiven Strukturen umgeben.

II.5. Auswirkungen der *Tgfb β 2*-Deletion auf retinale Signalmoleküle

Da die bisher vorgestellten morphologischen Ergebnisse einen ausgeprägten Gefäßphänotyp sowie RPE-Proliferationen zeigten, wurden auf Protein- und mRNA-Ebene verschiedene Wachstums-, angiogene und vaskulogene Faktoren bei vier Wochen alten *Tgfb β 2* ^{Δ eye} Mäusen und Kontrollen untersucht.

In der quantitativen Realtime RT-PCR war die mRNA für den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) mit den Splicevarianten VEGF-A-120 und VEGF-A-164 ebenso wie für den *insulin-like growth factor* (IGF) hochsignifikant erhöht. Signifikante Erhöhungen zeigten auch die mRNAs für die beiden Signalproteine Angiopoietin-2 und *platelet derived growth factor B* (PDGF-B). Mit einer mehr als zehnfachen Erhöhung konnte der mRNA Level für den *fibroblast growth factor* (FGF-2) detektiert werden (vgl. Abb. 16 A) (114). Auch auf Proteinebene wurde der hochsignifikante Anstieg von FGF-2 und dessen drei Isoformen bestätigt. Hierbei zeigte die 24 kDa Isoform neben den 18 und 21 kDa großen Isoformen den stärksten Anstieg (vgl. Abb. 16 B) (114). HIF1- α , ein Faktor, der bei Hypoxie regulatorische Funktionen innehat, war ebenfalls signifikant erhöht (vgl. Abb. 16 C) (114).

Weiterhin wurde die Expression verschiedener immunmodulatorischer Zytokine (IL6, CCL2, TNF- α , EGR-1), Mikroglia- und Makrophagenmarker (CD68, iNos) sowie Astrozyten- und Gliazellmarker (GFAP) überprüft. Unter anderem wurden die relativen mRNA-Spiegel von *early growth response protein 1* (Egr-1), *cytokine inducible nitric oxide synthetase* (iNos), *glial fibrillary acidic protein* (Gfap), *tumor necrosis factor α* (Tnf- α), *cluster of differentiation 68* (Cd68), *interleukin-6* (Il6) und *chemokine ligand 2* (CCL2) bestimmt. In der Gruppe der *Tgfb β 2* ^{Δ eye}-Mäuse zeigte sich, verglichen mit der Kontrollgruppe, bei allen getesteten Faktoren eine signifikante Erhöhung (vgl. Abb. 16 D). Der Anstieg von GFAP in den *Tgfb β 2* ^{Δ eye}-Mäusen konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden (vgl. Abb. 17 A). GFAP-positive Zellen fanden sich in der immunhistochemischen Färbung der Kontrollen vereinzelt in der Nervenfaserschicht und in der äußeren plexiformen Schicht. Die positive Färbung in der

Nervenfaserschicht der Kontrollen ist typisch für Astrozyten. Bei den *Tgfb2*^{Δeye}-Mäusen bildeten die GFAP-positiven Strukturen in der Nervenfaserschicht ein nahezu lückenloses Band. Auffällig war die Färbung von Zellen in der Choriokapillaris und in der Nähe der Bruch-Membran welche in den Kontrollen nicht zu finden war. Eine weitere Besonderheit waren die in den *Tgfb2*^{Δeye}-Mäusen aufgetretenen Streifen, welche sich von der Nervenfaserschicht bis hin zur *Lamina limitans interna* erstreckten (vgl. Abb. 17 B). Zur genaueren Charakterisierung wurde die Färbung als Doppelfärbung mit Glutaminsynthetase, einem Marker für Müllerglia, wiederholt. Im Überlagerungsbild aus GFAP und Glutaminsynthetase zeigte sich eine Kollokalisierung beider Marker (vgl. Abb. 17 C).

IBA-1 (*ionized calcium binding adapter molecule 1*) ist ein Protein, das spezifisch in Makrophagen und Mikrogliazellen exprimiert wird. Mithilfe einer immunhistochemischen Färbung dieses Proteins konnten Makrophagen und Mikrogliazellen detektiert werden. Die Kontrollen im Alter von elf Wochen zeigten IBA-1-positive Zellen im *Stratum neurofibrarum* und der inneren plexiformen Schicht. An der Grenze zwischen innerer plexiformen Schicht und innerer Körnerschicht sowie in der äußeren plexiformen Schicht waren ebenfalls positive Zellen zu erkennen. Vereinzelt fanden sich Zellfortsätze, die die innere Körnerschicht durchzogen. Auch in der Choriokapillaris waren IBA-1-positive Zellen zu finden. Im Allgemeinen waren die detektierten Zellen schlank konfiguriert. Die *Tgfb2*^{Δeye}-Mäuse zeigten eine auffällige Häufung der IBA-1-positiven Zellen um die Gefäße des inneren Plexus, sowie der abnorm lokalisierten Gefäße. Die Anzahl der detektierten Zellen in der Choriokapillaris, sowie der äußeren und inneren plexiformen Schicht war gegenüber den Kontrollen erhöht. Die angefärbten Zellen erschienen verplumpt. Mehr Zellfortsätze durchzogen die Körnerschichten (vgl. Abb. 18) (114). Um die Lokalisation der IBA-1-positiven Zellen zu den Gefäßen besser beschreiben zu können, wurde die IBA-1-Färbung an Dextran-perfundierten Kryoschnitten wiederholt. Bei acht Wochen alten *Tgfb2*^{Δeye}-Tieren waren die IBA-1-positiven Zellen in direkter Nachbarschaft zu den Gefäßen zu erkennen, sodass es im Überlagerungsbild zu einer Farbänderung der grünen und roten Fluoreszenz kam (vgl. Abb. 19). Hierbei addiert sich die rote Fluoreszenz der IBA-1-gefärbten Zellen mit der grünen Fluoreszenz des Dextrans, welches aus undichten Gefäßen austrat und sich somit in Überlagerung mit den Mikrogliazellen befand. Ähnliche Befunde waren bereits bei Präparaten drei Wochen alter Tiere zu erkennen.

II.6. Weitere Auswirkung der *Tgfb2*-Deletion

Da Verdichtungen im vorderen Augenabschnitt vier Wochen alter *Tgfb2*^{Δeye} auf eine Veränderung im Trabekelwerk hinwiesen, und zwischen Kornea und Iris Adhäsionen auftraten wurden Augendruckmessungen durchgeführt (vgl. Abb. 20 A). Ab einem Alter von zwölf Wochen trat eine signifikante Veränderung in der *Tgfb2*^{Δeye}-Gruppe auf. Der Augeninnendruck der Kontrollen lag im Durchschnitt etwa um 5 mmHg höher. Dieser Trend nahm bis zum Versuchsendpunkt mit sechzehn Wochen zu. Hier lag der durchschnittliche

Unterschied etwa bei 8 mmHg. Die Druckkurve der Wildtypen folgte dem natürlichen Altersverlauf. *Tgfbr2* ^{Δ eye}-Mäuse zeigten im Alter von zwölf und sechzehn Monaten einen signifikant niedrigeren Augeninnendruck (vgl. Abb. 20 B).

Ein weiterer morphologischer Unterschied stellt sich im Gewicht der Tiere dar. Während die Kontrollen stetig an Körpergewicht zunahmen, waren die *Tgfbr2* ^{Δ eye}-Mäuse im Alter von vier Wochen signifikant leichter. Die Gewichtszunahme glich sich im Verlauf dann an. Erst mit sechzehn Wochen stellte sich eine negative Gewichtsbilanz bei den *Tgfbr2* ^{Δ eye}-Mäusen ein, welche dann einen hochsignifikanten Gewichtsunterschied, verglichen mit der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 20 C), zeigten.

Morphologisch waren in den *N. optici* der Tiere des Genotyps *Tgfbr2* ^{Δ eye} mit acht Wochen zahlreiche stark angefärbte Strukturen zu sehen. Die Menge der bindegewebigen Anteile im Sehnerv war vermehrt (vgl. Abb. 21 A). Zählungen der Axone des *N. opticus* von je fünf Tieren der *Tgfbr2* ^{Δ eye}-Mäuse und Kontrollen zeigten eine signifikante Abnahme der Axonanzahl bei den *Tgfbr2* ^{Δ eye}-Mäusen (vgl. Abb. 21). Mithilfe der TUNEL-Reaktion konnten apoptotische Zellen in der Retina detektiert werden. Die Anzahl an TUNEL-positiven Zellen war in der Retina der *Tgfbr2* ^{Δ eye}-Mäuse signifikant erhöht und schon in Meridionalschnitten fiel die erhöhte Anzahl TUNEL-positiver Zellen auf. Diese befanden sich vor allem im Bereich der äußeren Körnerschicht (vgl. Abb. 21 C, D) (114). Dickenmessungen der verschiedenen Retinaschichten bei *Tgfbr2* ^{Δ eye}-Mäusen im Alter von acht Wochen zeigten eine signifikant dünnere äußere Körnerschicht (vgl. Abb. 21 F) (114). Auch die innere Körnerschicht war in den Kontrollen dicker als in den *Tgfbr2* ^{Δ eye}-Mäusen. Caspase 8, ein apoptotischer Faktor, war signifikant erhöht (vgl. Abb. 21 E).

ERGEBNISSE

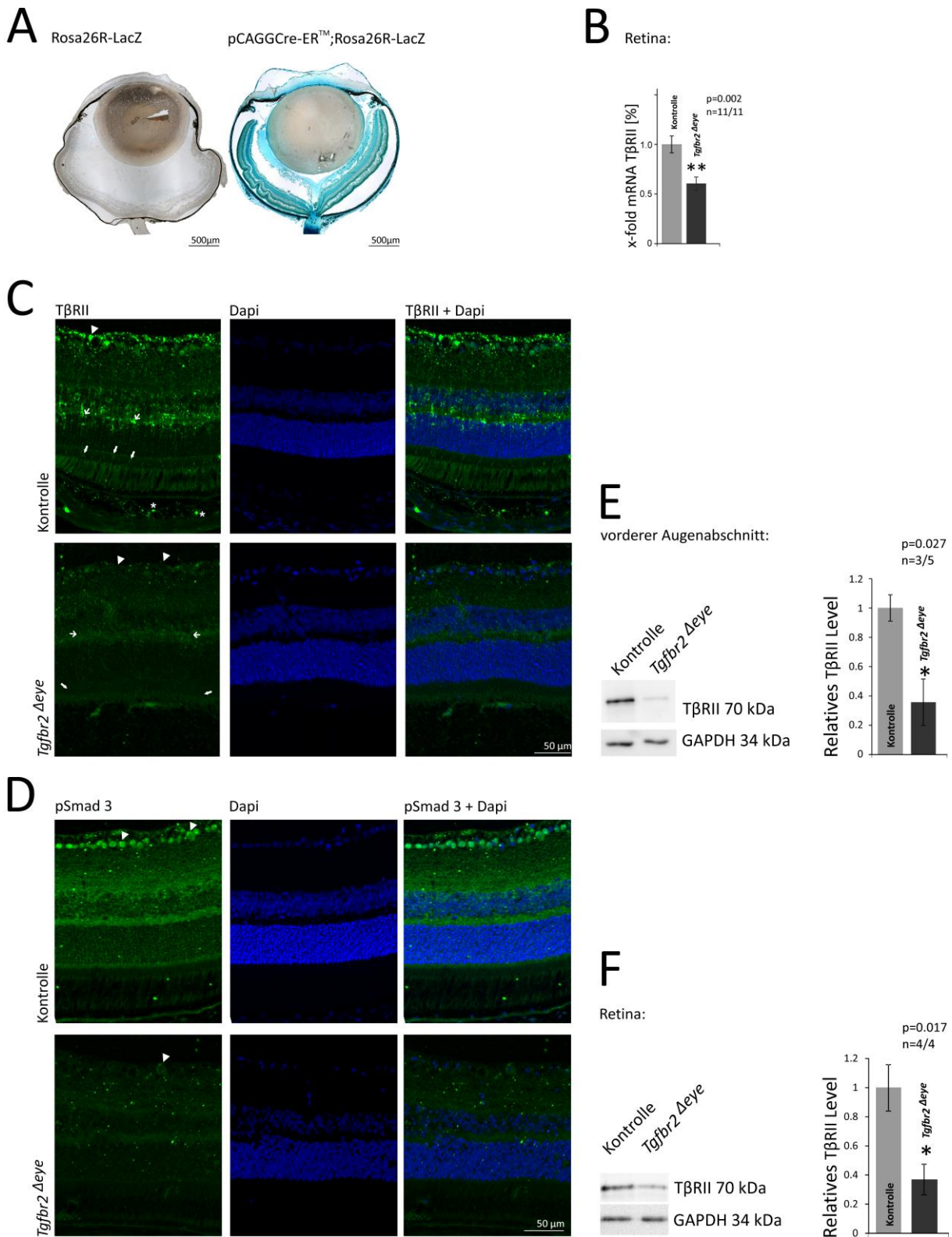


Abbildung 5: Deletionsnachweis von Tgfb2 und pSmad 3-Färbung

A: pCAGGCre-ERTM;Rosa26R-LacZ-Reportermäuse die mit Tamoxifenaugentropfen behandelt wurden zeigten nach β -Galactosidasefärbung an p 14 eine intensive Blaufärbung in allen Schichten der Retina, besonders im Bereich der Fotorezeptorsegmente und der äußeren plexiformen Schicht. Ebenso waren die Choriokapillaris, die Sklera, die Kornea, das Trabekelwerk und der N. opticus an der Reaktion beteiligt. Bei gleichaltrigen Rosa26R-LacZ ohne pCAGGCre-ERTM war keine Färbung der genannten Strukturen zu erkennen. Versuch

ERGEBNISSE

durchgeführt von S. Etzel (113, 114). B: quantitativer Realtime RT-PCR bei vier Wochen alten Tieren. Die *Tgfb2*-Deletion im Bereich der Retina von *Tgfb2^{Δeye}*-Mäusen konnte nachgewiesen werden. n=11. Versuch durchgeführt in Zusammenarbeit mit B. Braunger (114). C: Immunhistochemisch Färbung mittels TβRII spezifischen Antikörper bei 4 Wochen alten Mäusen. Hier kann die Lokalisation des Rezeptors dargestellt werden. Bei den Kontrollen zeigte sich eine starke Fluoreszenz an Zellen der Ganglienzellschicht (Pfeilspitze), im Bereich der äußeren plexiformen Schicht (Pfeil dünn), der inneren Körnerschicht, sowie der Fotorezeptorinnensegmente (Pfeil dick), und der *Choroidea* (Stern). *Tgfb2^{Δeye}*-Mäuse zeigten lediglich eine schwache Fluoreszenz im Bereich der Ganglienzellschicht (Pfeilspitze). Versuch durchgeführt von S. Etzel (114). D: Immunhistochemisch Darstellung von pSmad3 bei vier Wochen alten *Tgfb2^{Δeye}*-Tieren und Kontrollen. In grüner Fluoreszenz der pSmad3 Färbung stellten sich in den Kontrollen Zellen der Ganglienschicht (Pfeilspitze) dar. An *Tgfb2^{Δeye}*-Schnitten waren die pSmad3 positiven Zellen der Ganglienzellschicht (Pfeilspitze) wesentlich geringer gefärbt. Versuch durchgeführt von S. Etzel (114). E und F: Nachweis der TβRII-Deletion im Western Blot im Alter von vier Wochen. Proteinisolierungen aus dem Bereich des vorderen Augenabschnittes sowie der Retina zeigten in der Western Blot Analyse die für TβRII spezifische Proteinbande bei 70 kDA. Diese Bande war bei gleicher Ladungskontrolle bei *Tgfb2^{Δeye}*-Proben wesentlich schwächer zu sehen. Auch in der densitometrischer Darstellung der Western Blots war die signifikante Verringerung des TβRII zu erkennen. * p<0,05, **p<0,01. Versuch durchgeführt in Zusammenarbeit mit B. Braunger (114).

ERGEBNISSE

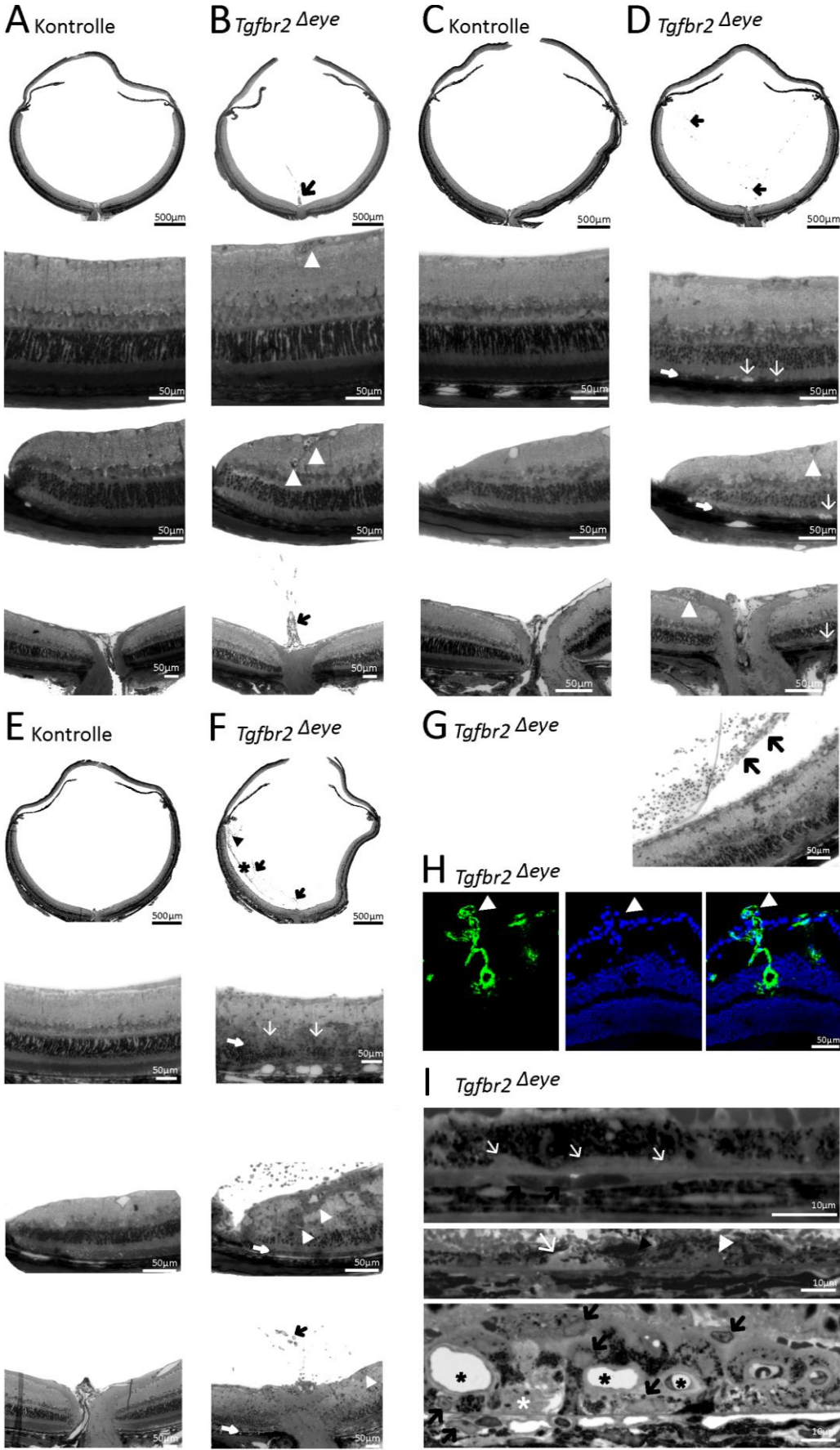


Abbildung 6: Semidünnschnitte im Alter von vier bis 12 Wochen, Dextranmeridionalschnitt

ERGEBNISSE

A: Meridionalschnitt von einem vier Wochen alten Kontrolltier durch das ganze Auge, zentrale (oben) und periphere Retina (Mitte) und Sehnervenkopf (unten) mit unauffälliger Morphologie. B: Meridionalschnitt von einem vier Wochen alten *Tgfb²^{Δeye}*-Tier durch das ganze Auge, zentraler (oben) und peripherer Retina (Mitte) und Sehnervenkopf (unten) mit persistierender *A. hyaloidea* (Pfeil schwarz), drusenartigen Auflockerungen der Bruch-Membran und RPE Schichtungsstörungen sowie vaskuläre Veränderungen in zentralen und peripheren Bereichen der Netzhaut zwischen Ganglienzellschicht und innere plexiforme Schicht (Pfeilspitze weiß). C: Kontrollmeridionalschnitt, acht Wochen, durch das ganze Auge, zentrale (oben) und periphere Retina (Mitte) und Sehnervenkopf (unten) mit unauffälliger Morphologie. D: Meridionalschnitt von einem acht Wochen alten *Tgfb²^{Δeye}*-Tier durch das ganze Auge, zentrale (oben) und periphere Retina (Mitte) und Sehnervenkopf (unten) mit *A. hyaloidea* (Pfeil schwarz), verdünnter äußerer plexiforme Schicht und verminderter Zellzahl in der äußeren Körnerschicht. Die äußeren Fotorezeptorsegmente waren degeneriert und es bildeten sich zystenartige Hohlräume und Ablagerungen (Pfeil weiß dünn) zwischen dem retinalen Pigmentepithel (Pfeil weiß dick) und den wenigen verbliebenen Fotorezeptorinnensegmenten. Es zeigten sich abnormale Retinagesäße (Pfeilspitze weiß). E: Kontrollmeridionalschnitt, zwölf Wochen, durch das ganze Auge, zentrale (oben) und periphere Retina (Mitte) und Sehnervenkopf (unten) mit unauffälliger Morphologie. F: Meridionalschnitt von einem zwölf Wochen alten *Tgfb²^{Δeye}*-Tier durch das ganze Auge, zentrale (oben) und periphere Retina (Mitte) und Sehnervenkopf (unten) mit Zunahme der Struktur- und Schichtungsstörung der Retina. Oberhalb der Bruch-Membran entstanden weitflächige Areale, in denen sich zystische Hohlräume und Zelldetritus bildeten (Pfeil weiß dünn). Diese Veränderungen traten zwischen Bruch-Membran und RPE (Pfeil weiß dick) auf und sind mit *basal laminar deposits* zu vereinbaren. Glaskörperblutungen (Pfeilspitze schwarz) traten auf. Membranen erstreckten sich von zentral am Sehnervenkopf bis zur Ora serrata (Stern schwarz). Weiterhin bestand die *A. hyaloidea* (Pfeil schwarz) sowie die verdünnter äußerer plexiforme Schicht und verminderter Zellzahl in der äußeren Körnerschicht. Es zeigten sich abnormale Retinagesäße (Pfeilspitze weiß). G: *Tgfb²^{Δeye}*-Semidünnschnitt, zwölf Wochen, zeigt die Detailaufnahme einer Membran (Pfeil schwarz) in der Peripherie der Retina (114). H: Dextranperfusion/Dapi/Überlagerungsbild *Tgfb²^{Δeye}*-Maus, zwölf Wochen, zeigte vaskuläre Strukturen, die aus der Ganglienzellschicht in den Glaskörperraum übertraten und mit proliferativen Neovaskularisationen zu vereinbar sind (114). I: Detailaufnahme 100fach von *Tgfb²^{Δeye}*-Retina mit vier (oben), acht (Mitte) und zwölf (unten) Wochen. Zwischen Bruch-Membran und äußerer Körnerschicht fanden sich von Kapillaren durchgezogene Ablagerungen (Stern schwarz) im Bereich des atrophisch zerstörten RPE. Innerhalb dieser Masse waren amorphe Gebiete (Stern weiß) evtl. Drusen oder BlamD, Pigmenteinschlüsse, RPE-Zellanteile und große mononukleäre Zellen (Pfeil schwarz) beinhaltet. Einige dieser Ablagerungen wiesen Ähnlichkeit mit *basal laminar deposits* (BlamD) (Pfeil weiß) auf. Es zeite sich hyper- (Pfeilspitze schwarz) und hypopigmentiertes (Pfeilspitze weiß) RPE. Versuche durchgeführt von S. Etzel.

ERGEBNISSE

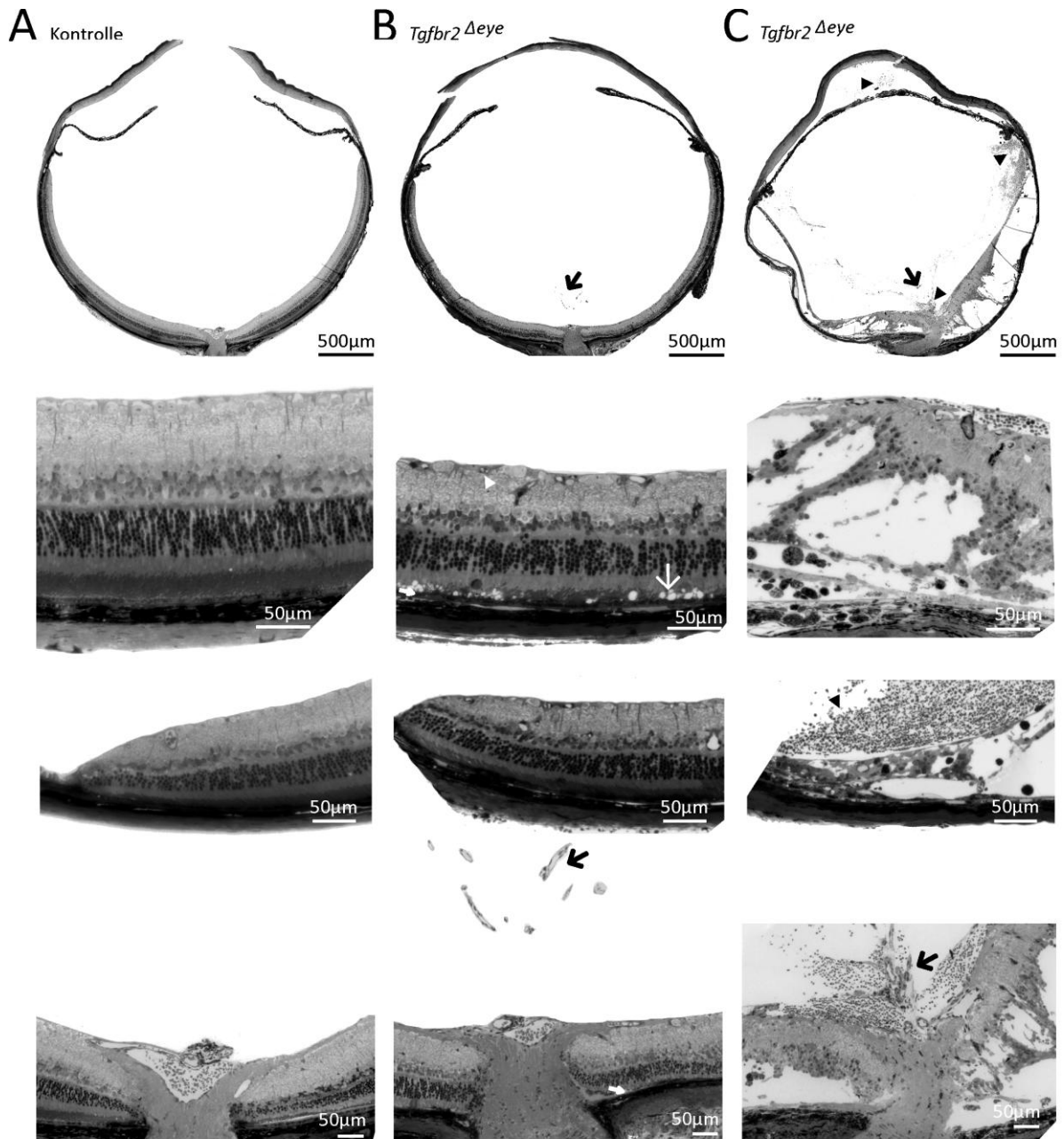


Abbildung 7: Semidünnschnitte im Alter von sechzehn Wochen

A: Kontrollmeridionalschnitt mit sechzehn Wochen durch das ganze Auge, zentrale (oben), periphere Retina (Mitte) und Sehnervenkopf (unten) mit unauffälliger Morphologie. B und C: Meridionalschnitt von sechzehn Wochen alten *Tgfbr2^{Δeye}* durch das ganze Auge, zentrale (oben), periphere Retina (Mitte) und Sehnervenkopf (unten). Sechzehn Wochen alte *Tgfbr2^{Δeye}* zeigten zwei Phänotypen. B: Die mildere Form der Veränderung beinhaltete, eine Einschmelzung von Fotorezeptorsegmenten (Pfeil weiß dünn) und zystische Gebilde zwischen RPE (Pfeil weiß dick) und Fotorezeptorinnensegmenten. Das RPE zeigte sich stellenweise aufgeworfen und verdickt. Es persistierte die *A. hyaloidea* (Pfeil schwarz), sowie erweiterte Gefäße im Bereich der Ganglienzellschicht (Pfeilspitze weiß) (114). C: Die stärkere Ausprägung des Phänotyps zeigte eine komplette Zerstörung und Ablösung der Retina mit peripheren und zentralen Blutungen im Glaskörper und im Bereich der vorderen Augenkammer (Pfeilspitze schwarz) (114). Versuche durchgeführt von S. Etzel.

ERGEBNISSE

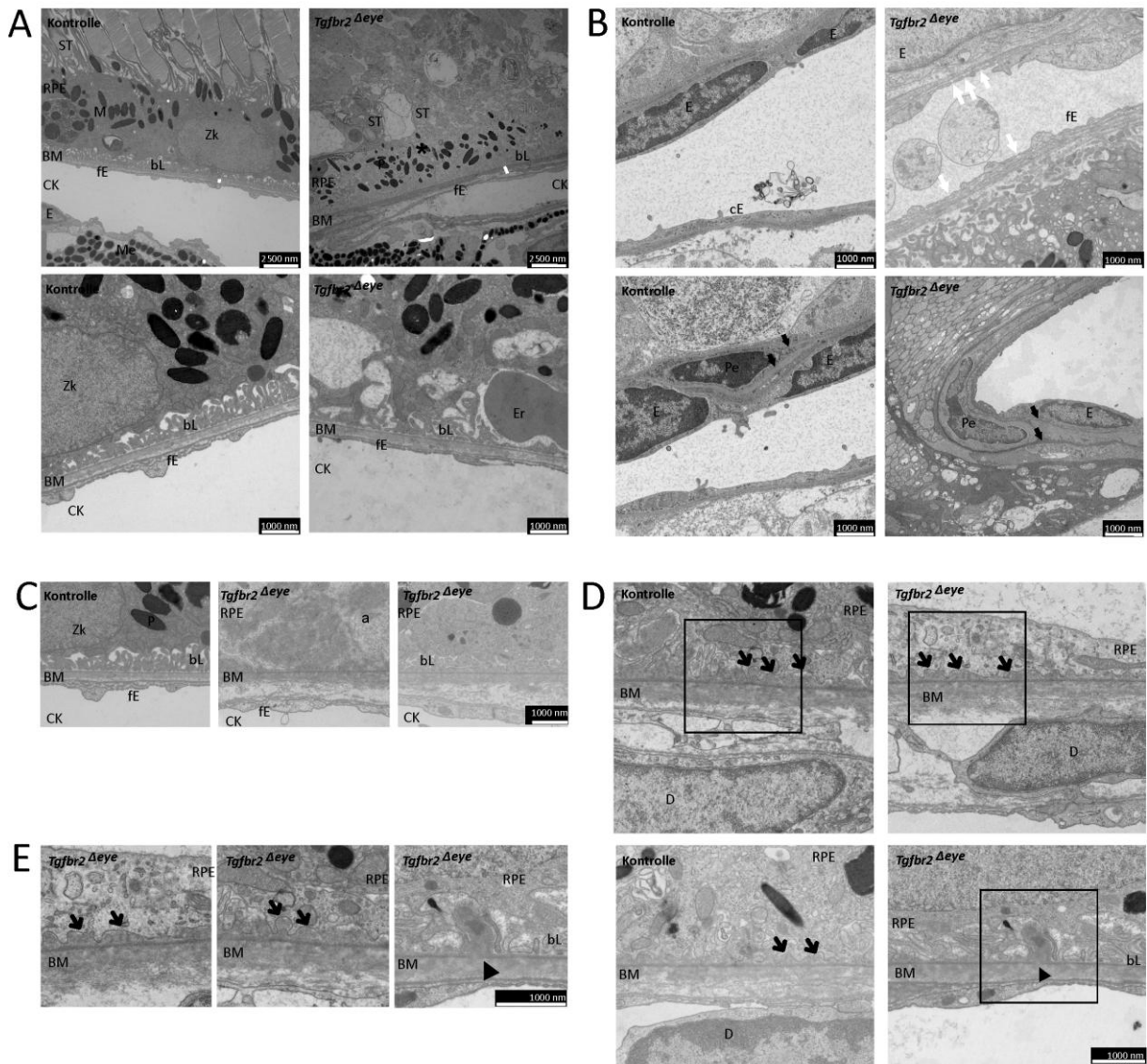


Abbildung 8: EM-Aufnahmen der äußeren Retina und der Retinagesäße

A: EM Aufnahmen von vierzehn Wochen alten *Tgfb2*^{Δeye} und deren Kontrollen. Die Kontrollen zeigten einen normalen Aufbau der äußeren Netzhautschichten, der Basalmembran und der Choriokapillaris. Die Außensegmente der Fotorezeptorzellen waren dicht aneinander gereiht. Um die Zellfortsätze der Stäbchen legten sich eng die feingliedrigen apikalen Einfaltungen des retinalen Pigmentepithels. Die Zellen des RPE zeigten Pigmenteinlagerungen und Zellorganellen wie Mitochondrien. An der unteren Seite des RPE lagte sich die Bruch-Membran an das basale Labyrinth an. Die Bruch-Membran zeigte sich als schmales Band zwischen den basalen Einfaltungen und den Gefäßen der Choriokapillaris. Ihr fünfschichtiger Aufbau war zu erkennen. Die Gefäße der Choriokapillaris hatten fenestriertes Endothel. In den *Tgfb2*^{Δeye}-Mäusen waren nur vereinzelt Fotorezeptoraußensegmente zu sehen. An ihre Stelle traten wenig elektronendichte, amorphe Ablagerungen mit granulierter Struktur. Diese Veränderungen fanden sich oberhalb des Pigmentepithels. Die Basalmembran zeigte sich verdickt. Das basale Labyrinth war zerstört und hatte Einlagerungen von wenig elektronendichtem Material und Erythrozyten. Die RPE-Zellen hoben sich von der Basalmembran ab. B: Die Gefäße in der Retina der Kontrollen besaßen kontinuierliches Endothel. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Gefäßen, welche sich zwischen Bruch-Membran und RPE befanden, enthielten dagegen fenestriertes Endothel. In beiden Versuchsgruppen waren ultrastrukturell Endothelzellen und Perizyten um die Gefäße zu erkennen.

ERGEBNISSE

C: elektronenmikroskopische Aufnahme von Kontrolle und *Tgfb²^{Δeye}*-Mäusen mit 14 Wochen. Die einzelnen Schichten der Bruch-Membran waren schlechter voneinander abgrenzbar und weniger elektronendicht. Bei gleicher Vergrößerung stellte sie sich dicker als in der Kontrolle dar. Diese Veränderung zeigt sich vor allem in der äußeren kollagenen Schicht in der sich auch kleine vesikuläre Einschlüsse fanden. Das basale Labyrinth der RPE-Zellen präsentierte sich weniger dicht oder sogar völlig abgebaut. Ihr Zytoplasma war unruhig mit kleinen elektronendichten und granulierten Einschlüssen. Mitochondrien und raues endoplasmatisches Retikulum fanden sich nahe an der basalen Plasmamembran der RPE-Zellen. Oberhalb der Bruch-Membran war amorphe Masse zu sehen, bei der es sich um *basal laminar deposits* (BlamD) handeln könnte. D und E: Bei genauerer Betrachtung zeigte die Bruch-Membran blasige runde oder längliche Aufwerfungen, die sich an ihrer Innenseite in Richtung des basalen Labyrinths aufbauten, evtl. *basal linear deposit* (BlinD). Zwischen der äußeren kollagenen Schicht der Bruch-Membran und der Basalmembran der Choriokapillaris waren dentritische Zellen eingelagert. Diese Zellen besaßen teilweise lange Zellausläufer, die tief in die Bruch-Membran eindringen und viele vesikuläre Strukturen in ihrem Zytoplasma enthalten. Die Basalmembran des RPE als innerste Schicht der Bruch-Membran wies Erosionen auf, durch die wenig elektronendichtes Material aus der Bruch-Membran fingerförmig in den intermembranösen Bereich des basalen Labyrinths übertrat. An diesen Stellen war die Kollagenstruktur der Bruch-Membran gestört. Oberhalb der blasig runden oder länglichen Aufwerfungen der Bruch-Membran war das basale Labyrinth des RPE degeneriert und die RPE-Zellen abgeflacht.

Zeichenerklärung: a: amorphe, teils elektronendichte Einlagerungen evtl. BlamD, bL: basales Labyrinth, BM: Bruch-Membran, cE: kontinuierliches Endothel, CK: Choriokapillaris D: dentritische Zelle, E: Endothelzelle, Er: Erythrozyt fE: fenestriertes Endothel, M: Mitochondrium, Me: Melanozyt, P: Pigment, Pe: Perizyt, RPE: retinales Pigmentepithel, ST: Stäbchen, Zk: Zellkern, l: dicke der Basalmembran, Stern: *Zonula occludens*, weißer Pfeil: Fenster, schwarzer Pfeil dick: Basalmembran von Endothelzelle und Perizyt, Pfeilspitze schwarz: Lücke in der Basalmembran des RPE mit Einlagerung von BlamD, schwarzer Pfeil dünn: Aufwerfung der Bruch-Membran, basal linear deposit. Versuche durchgeführt von S. Etzel.

ERGEBNISSE

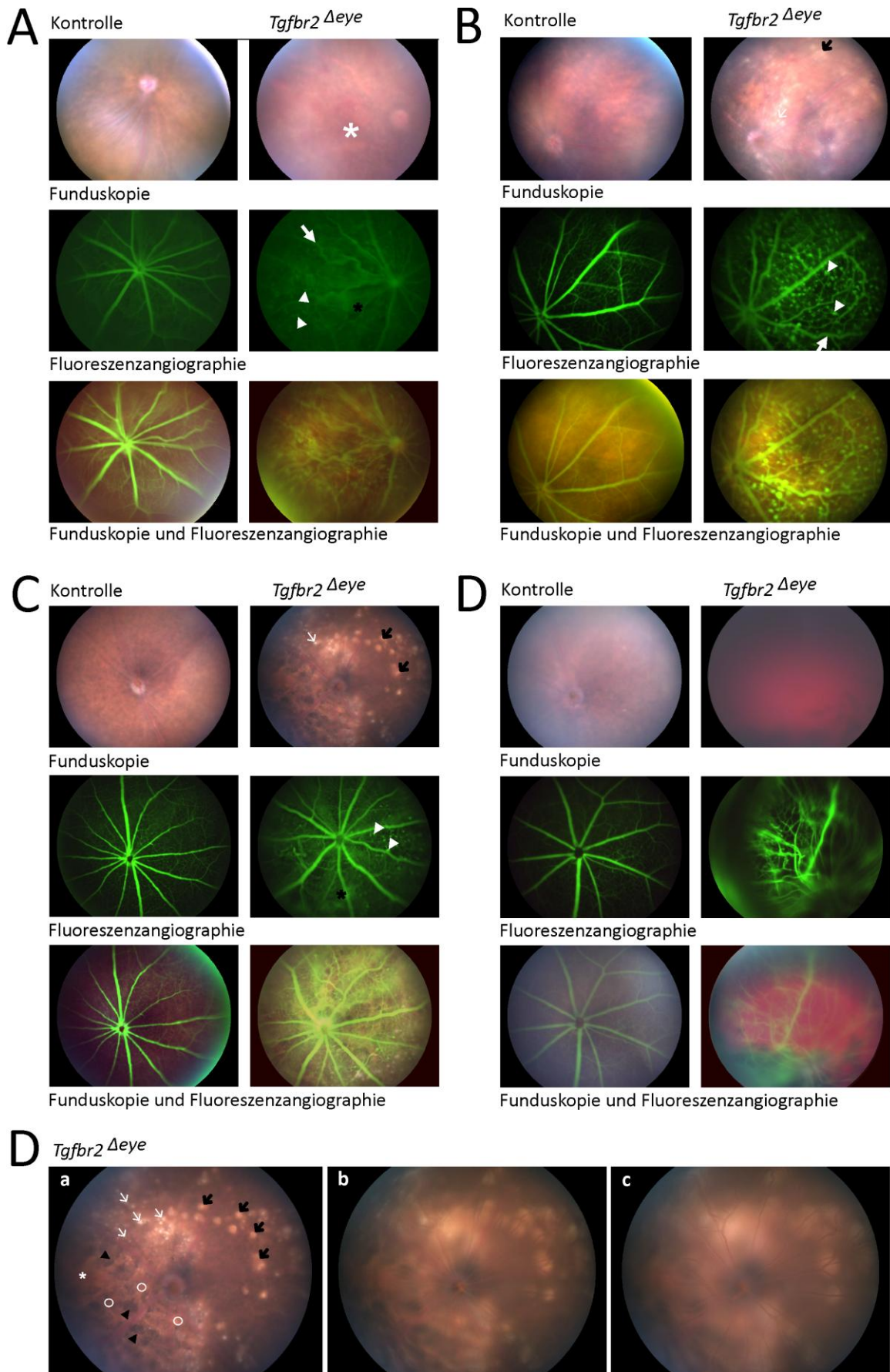


Abbildung 9: Funduskopie und Fluoreszenzangiographie

ERGEBNISSE

A: Funduskopie (oben), Fluoreszenzangiographie (Mitte) und Überlagerungsbild (unten) von Kontrolle und *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Maus mit vier Wochen. In vier Wochen alten Kontrollen stellte sich Augenhintergrund und Fluoreszenzangiographie normal dar. Die Gefäße waren gut abgrenzbar, regelrecht verzweigt und kontinuierlich gefüllt. Bei den *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Tieren schlechtere Abgrenzbarkeit der Gefäßstrukturen durch Extravasation des Fluoreszeins (Stern schwarz). Die dargestellten Gefäße waren nicht wie bei den Kontrollen geradlinig radiär angeordnet, sondern wiesen zahlreiche Windungen (weißer Pfeil dick) und Kaliberschwankungen sowie Mikroaneurysmen (Pfeilspitze weiß) auf. Zentral waren in der Fundusaufnahme Blutungen (Stern weiß) und Störungen des Pigmentepithels wie Hypopigmentierung zu erkennen (114). B: Funduskopie (oben), Fluoreszenzangiographie (Mitte) und Überlagerungsbild (unten) von Kontrolle und *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Tieren mit acht Wochen. Normaler Augenhintergrundbefund bei Kontrolltieren. Es traten in der Funduskopie von *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Mäusen zusätzlich scharf begrenzte (weißer Pfeil dünn) und weniger gut abgrenzbare Exsudate (schwarzer Pfeil), sowie hyper- und hypopigmentierte Areale auf. Tortuositas vasorum (weißer Pfeil dick) Mikroaneurysmen (Pfeilspitze) (114). C: Funduskopie (oben), Fluoreszenzangiographie (Mitte) und Überlagerungsbild (unten) von Kontrolle und *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Maus mit zwölf Wochen. In zwölf Wochen alten Kontrollen stellte sich Augenhintergrund und Fluoreszenzangiographie normal dar. Bei *Tgfb β 2 ^{Δ eye}* mit zwölf Wochen traten weiche, teils konfluierende (schwarzer Pfeil) und scharf begrenzte harte Drusen (weißer Pfeil dünn) auf. Die Mikroaneurysmen (Pfeilspitze weiß) waren weiterhin zu sehen. Im unteren Bereich der fluoreszenzangiographischen Aufnahme waren Gefäßleckagen (Stern schwarz) zu erkennen. Es waren hyper- und hypopigmentierte Areale vorhanden. Im Bereich der depigmentierten Areale waren durchscheinende Choroideagefäße zu sehen. D: Funduskopie (oben), Fluoreszenzangiographie (Mitte) und Überlagerungsbild (unten) von Kontrolle und *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Maus mit sechzehn Wochen. In Kontrollen stellte sich Augenhintergrund und Fluoreszenzangiographie normal dar. Bei *Tgfb β 2 ^{Δ eye}* waren Augenhintergrund und Gefäßstatus nicht mehr beurteilbar, da sich die Netzhaut abgelöst hatte. Blutungen waren im peripheren Bereich zu erkennen. E: Fundus einer *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Maus. Mit zwölf Wochen traten weiche (schwarzer Pfeil), teils konfluierende und scharf begrenzte harte Drusen (weißer Pfeil dünn) sowie retinale Blutungen (weißer Stern) auf (a). Hyper- (Pfeilspitze) und hypopigmentierte Areale (Kreis) im Sinne einer geographischen Atrophie waren vorhanden. Im Bereich der depigmentierten Areale zeigten sich durchscheinende Choroideagefäße. Die *A. hyaloidea* verzweigte sich von der Netzhaut (b) bis zur Linse (c). Versuche durchgeführt von S. Etzel in Kooperation mit Prof. Jägle.

ERGEBNISSE

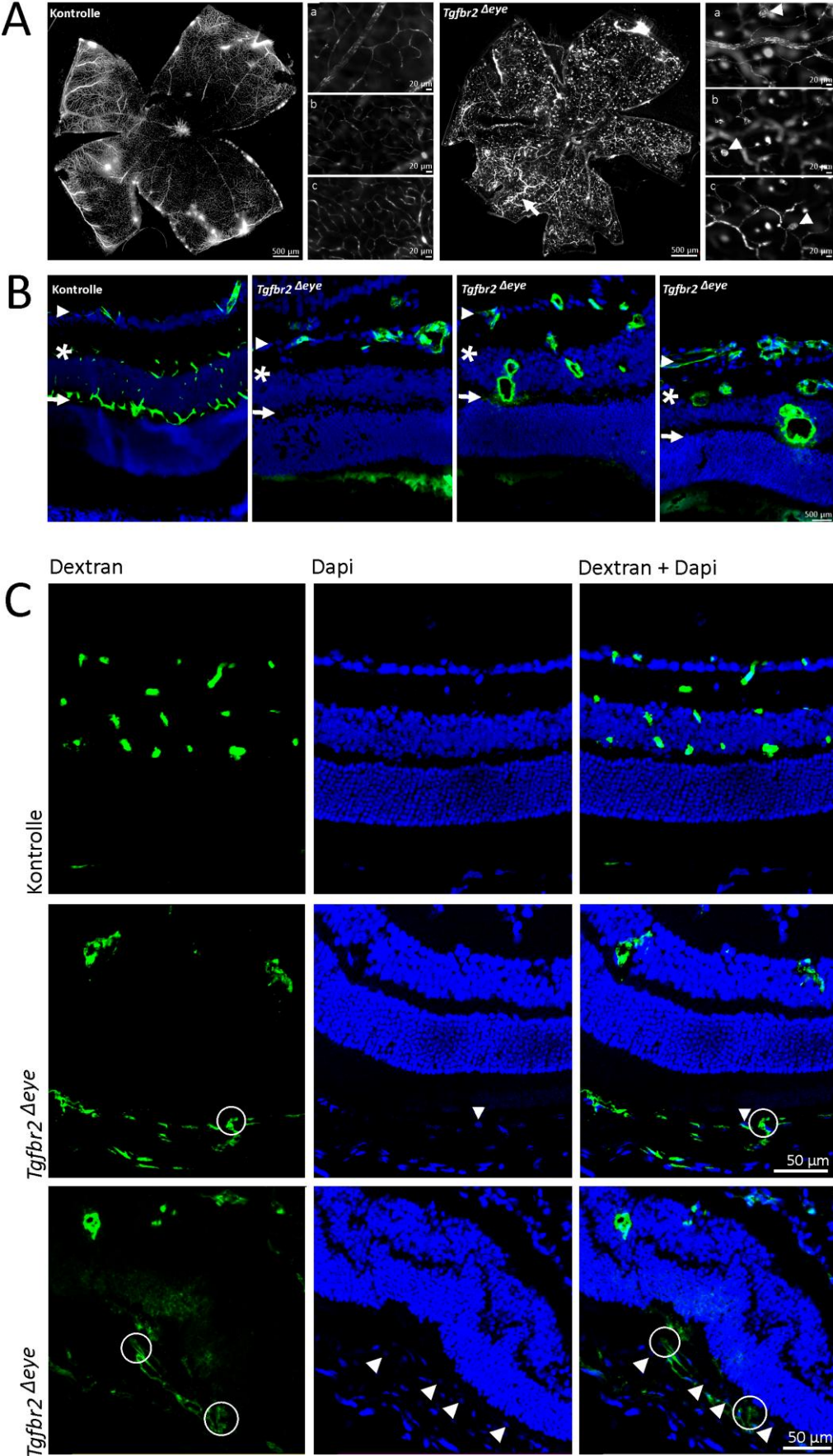


Abbildung 10: dextranperfundierter Retinaflachpräparate und Meridionalkryoschnitte

ERGEBNISSE

A: Retina-Flachpräparate von mit Dextran perfundierten, vier Wochen alten Kontrollen und *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Tier, fokussierter innerer (a), mittlerer (b), äußerer (c) Plexus. An dextranperfundierten Retina-Flachpräparaten vier Wochen alter Kontrollen ließen sich sowohl die großen Ästen der A. und V. centralis retinae als auch die feinen Verzweigungen dieser Gefäße zeigen. Sie stellten sich als ein feines regelmäßiges Netzwerk dar. Fokussiert man genauer durch die verschiedenen Schichten der Netzhaut waren die drei unterschiedlich tief gelegenen Gefäßplexus zu erkennen. Auch sie lagen regelmäßig und kontinuierlich vor. Die Verteilung des intravasalen Dextrans war gleichmäßig. In Präparaten von *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Mäusen fielen Mikroaneurysmen wie in der angiographischen Darstellung auf. Neben diesem Befund stellten sich die Äste der Vasa centralis retinae deutlich dicker dar. Sie sind stärker mit fluoreszierendem Dextran gefüllt. Das Netzwerk der kleinen Blutgefäße und Kapillaren zwischen den zentralen Gefäßen war lockerer. Auch die weiter oben beschriebene Tortuositas vasorum (Pfeil weiß) konnte in der Dextranperfusion dargestellt werden. Bei Einstellung des oberen, mittleren und tiefen Plexus fiel auf, dass die dargestellten Gefäße dicker waren, aber weniger dicht zueinander lagen. In allen drei Schichten zeigten sich typische Mikroaneurysmen der Gefäße (Pfeilspitze weiß) (114). B: Meridionalschnitt durch die Retina von drei Wochen alten Kontrollen und *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Maus. Die drei retinalen Gefäßplexus der Kontrollen befinden sich im Stratum neurofibrarum (innerer Plexus, Pfeil weiß), an der inneren (mittlerer Plexus, Stern weiß) und äußeren (äußerer Plexus, Pfeilspitze weiß) Grenze des Stratum nucleare internum. Die filigranen dextrangefüllten Gefäße lagen oberhalb der Ganglienzellschicht sowie auf und unter der inneren Körnerschicht. Einzelne Gefäße zogen durch die innere plexiforme Schicht und die innere Körnerschicht, um Verbindungen zwischen den drei Plexus zu bilden. Alle abgebildeten Gefäße in Schnitten der *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Maus hatten ein größeres Lumen und waren deformiert. Die Lokalisation der einzelnen Gefäße konnte teilweise keiner der drei üblichen Plexuslagen zugeteilt werden. Lediglich der innere Plexus war an der richtigen Stelle ausgebildet. Oberhalb der inneren Körnerschicht fehlten zum Teil Gefäße oder waren nur spärlich ausgebildet. Unterhalb der inneren Körnerschicht fand sich nahezu kein Gefäß, der äußere Plexus war nicht ausgebildet. Es befanden sich Gefäßanteile in großem Ausmaß in der inneren Körnerschicht. Normale Lokalisationslage der Plexus innerer Plexus (Pfeil weiß) mittlerer Plexus (Stern weiß) und äußerer Plexus (Pfeilspitze weiß) (114). C: Einzelne Gefäßstrukturen, die die Blut-Retina-Schranke durchbrechen waren in *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Meridionalschnitten einer zwölf Wochen alten *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Maus deutlich zu erkennen (Kreis). Pfeilspitze weiß: RPE-Zellkerne. Versuche durchgeführt von S. Etzel.

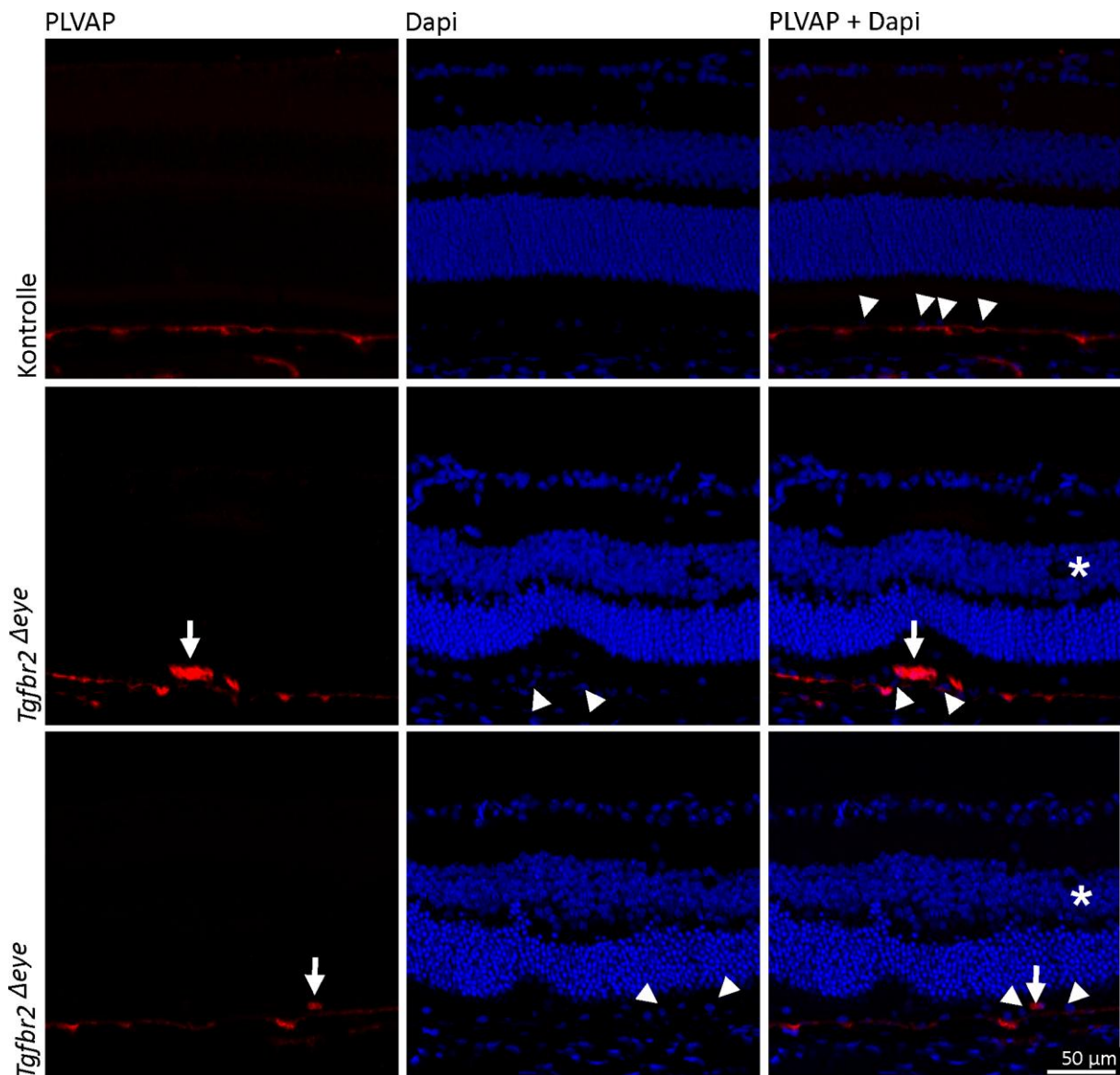


Abbildung 11: PLVAP-immunhistochemische Färbung

PLVAP-Färbung an Meridionalparaffinschnitten von vier Wochen alten Kontrollen und *Tgfbbr2^{Δeye}*-Mäusen. Mithilfe der PLVAP immunhistochemische Färbung konnte der Ursprung der veränderten Retinagefäße festgestellt werden. In den vier Wochen alten Kontrollen färbte sich die Choriokapillaris an. Das Überlagerungsbild aus PLVAP-Färbung und DAPI-Zellkernfärbung zeigte, dass alle Zellkerne des retinalen Pigmentepithels in einer Linie auf der Choriokapillaris aufsitzen. Bei *Tgfbbr2^{Δeye}*-Mäusen war die Anzahl der Zellkerne im RPE verglichen mit den Kontrollen erhöht. Es zeigten sich PLVAP positive Strukturen oberhalb der RPE-Zellkernschicht. Keine Färbung von Retinagefäßen. Pfeilspitze: RPE-Zellkerne, Stern: Retinagefäß, Pfeil: abnorme PLVAP positive Struktur. Versuche durchgeführt von S. Etzel.

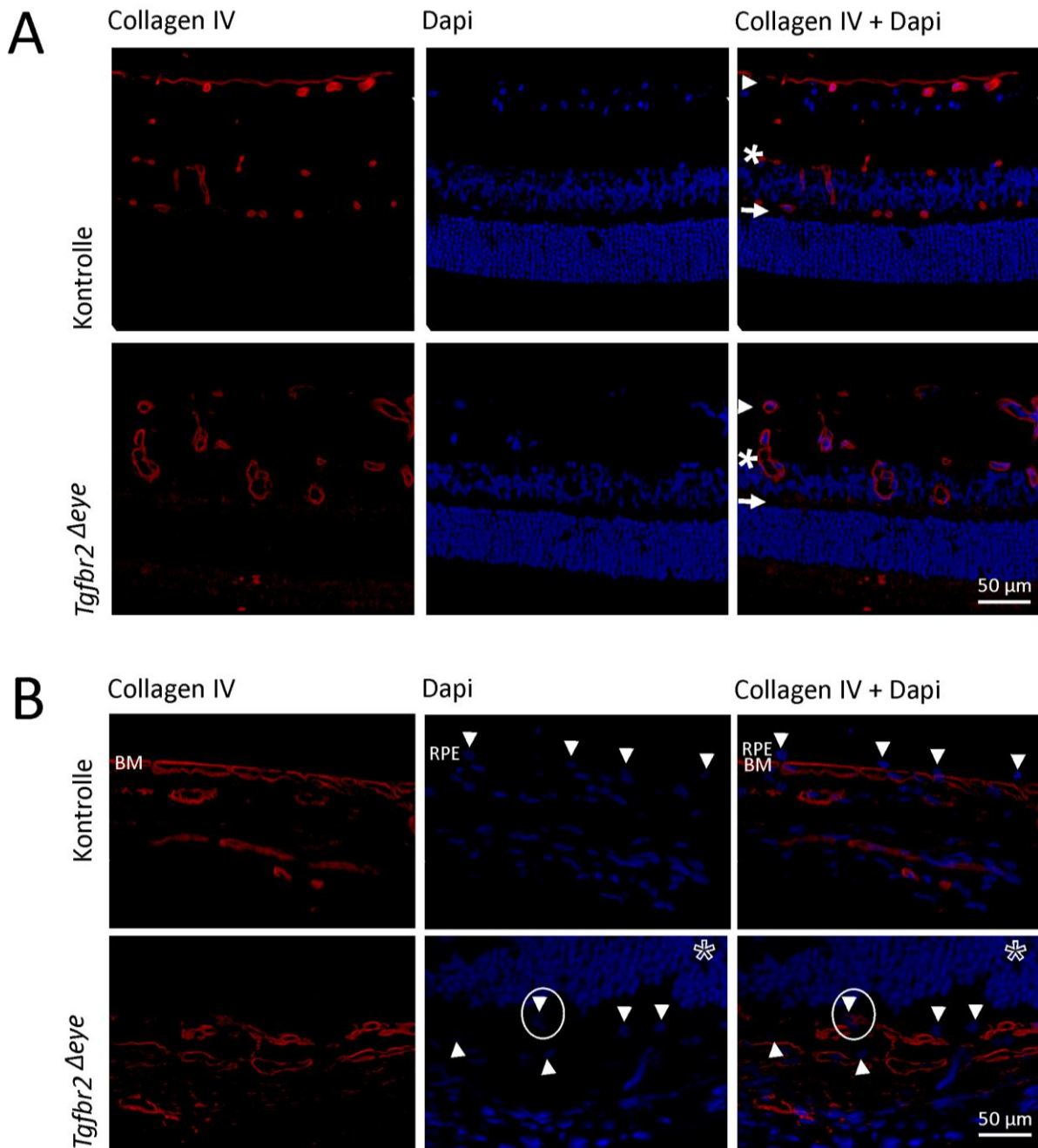


Abbildung 12: Collagen-IV-immunhistochemische Färbung

Collagen-IV-Färbung an Meridionalparaffinschnitten von vier Wochen alten Kontrollen und *Tgfb2* ^{Δ *eye*}-Mäusen. A: Collagen IV-positiv waren bei den vier Wochen alten Kontrollen die Gefäßwände der drei Retinaplexus in ihrer anatomisch korrekten Position. Sie waren schlank konfiguriert. Die choroidalen Gefäße stellten sich ebenfalls gut dar. Sie lagen gut abgrenzbar in einer Linie unterhalb der Zellkerne des RPE. Auch die Basallamina der Ganglienzellschicht färbte sich positiv. Bei *Tgfb2* ^{Δ *eye*}-Mäusen mit vier Wochen zeigten sich großlumige, deformierte Gefäße, die keinem der normalen Plexuslagen zugeordnet werden konnten. Lediglich die Gefäße der Nervenfaserschicht lagen anatomisch richtig. Normale Lokalisationslage der Plexus: innerer Plexus (Pfeil weiß) mittlerer Plexus (Stern weiß) und äußeren Plexus (Pfeilspitze weiß). Die Basallamina der Ganglienzellschicht als Grenze zum Glaskörper war nicht zu erkennen (114). B: In vier Wochen alten *Tgfb2* ^{Δ *eye*}-Mäusen traten Gefäßstrukturen durch die Reihe der RPE-Zellkerne hindurch (Kreis). RPE-Zellkernen (Pfeilspitze), BM: Bruch-Membran, RPE: retinales Pigmentepithel, Stern leer: äußere Körnerschicht. Versuche durchgeführt von S. Etzel.

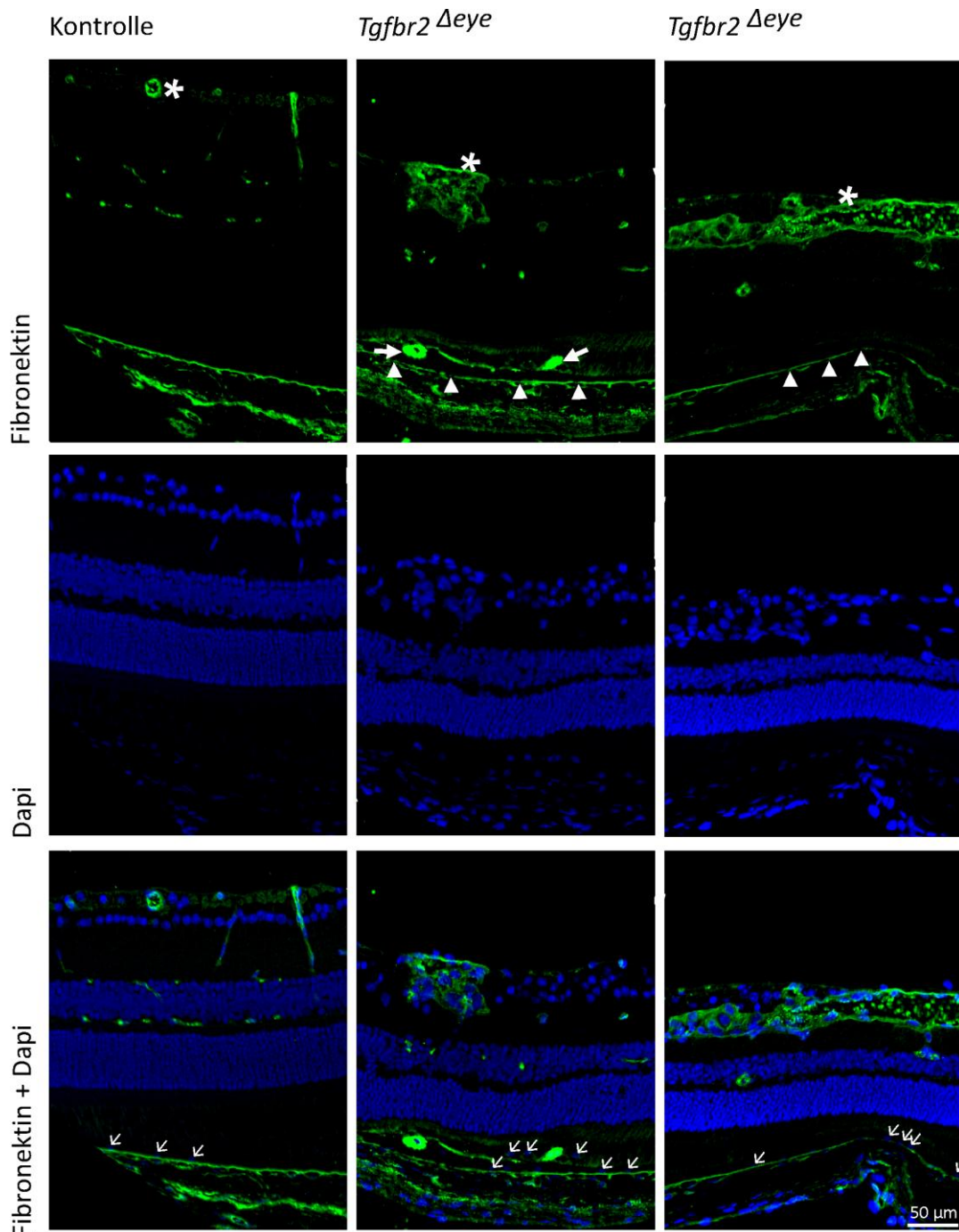
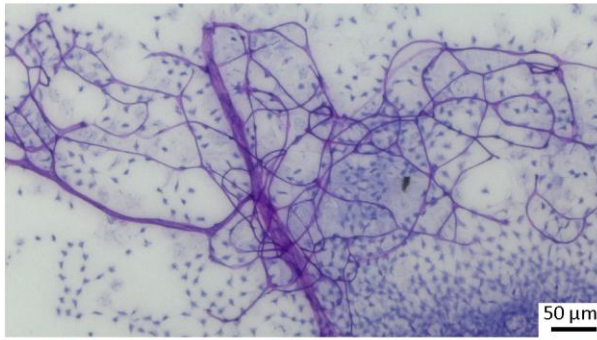


Abbildung 13: Fibronektin-immunhistochemische Färbung

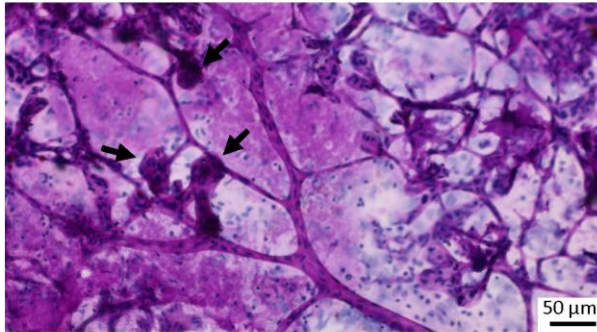
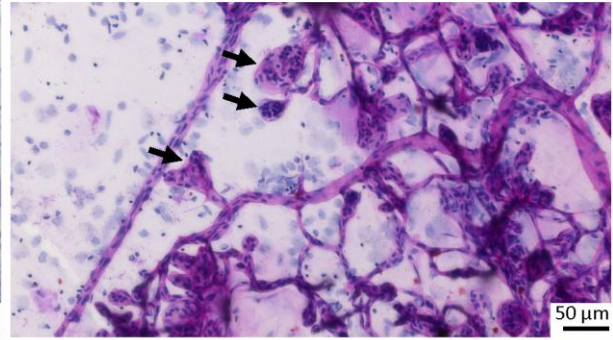
Die Fibronektin-Färbung wurde an vier Wochen alten Kontrollen und *Tgfbr2*^{Δeye}-Mäusen durchgeführt. In den Kontrollen zeigte sich die Expression von Fibronektin im Bereich der Bruch-Membran, der Choriokapillaris und der retinalen Gefäßstrukturen (weißer Stern). Bei *Tgfbr2*^{Δeye}-Mäusen waren dieselben Strukturen zu erkennen. Während bei den Kontrollen in den Lumina der Retinagefäße keine Färbung auftraten, zeigte sich bei *Tgfbr2*^{Δeye}-Mäusen innerhalb der inneren Plexusgefäße eine starke Segmentierung und unruhige Färbung. Die in den Kontrollen durchgehend zu erkennende Bruch-Membran war in *Tgfbr2*^{Δeye}-Mäusen lückenhaft angefärbt (weiße Pfeilspitze). Es traten große, fibronektinpositive Gefäße zwischen Bruch-Membran und äußerer Körnerschicht auf (weißer Pfeil dick). In der Färbung war sowohl die Bruch-Membran als auch eine weitere positive Linie, evtl. Blinds, zu erkennen. RPE-Zellkerne (weißer Pfeil dünn). Versuche durchgeführt von S. Etzel.

ERGEBNISSE

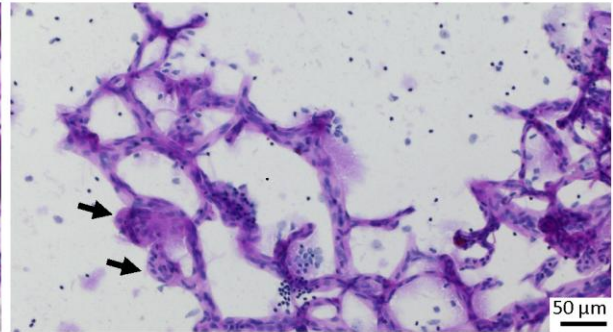
Kontrolle



Tgfbr2 ^{Δ eye}



Tgfbr2 ^{Δ eye}



Tgfbr2 ^{Δ eye}

Abbildung 14: Trypsinretinaverdau

Im Retinatrypsinerdau der Kontrollen mit acht Wochen zeigten sich schlanke, viel verzweigte und gleichmäßig kaliberstarke Gefäße. Bei *Tgfbr2* ^{Δ eye}-Mäusen mit fünf Wochen stellten sich die Gefäße bei gleicher Vergrößerung verdickt und ausgeweitet dar. In großer Zahl traten käulenartige Gefäßerweiterungen (Pfeil) auf. In diesen Mikroaneurysmen, die sich zu meist an Gefäßendungen befanden, waren zahlreiche runde Zellkerne lokalisiert. Versuche durchgeführt von S. Etzel.

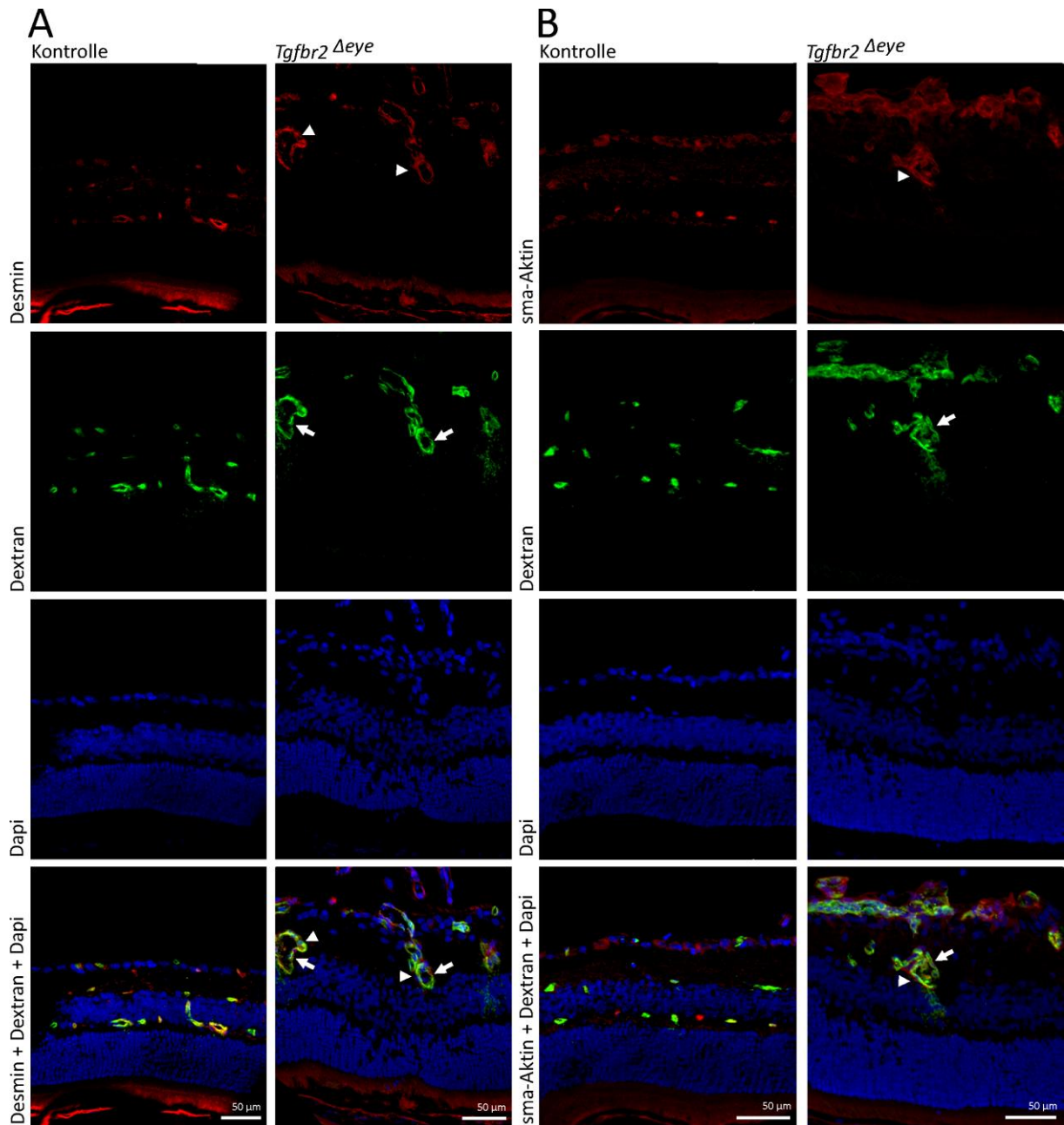


Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung von Perizytenmarkern

A: Die immunhistochemischen Färbungen für Desmin und B: sma -Aktin an dextranperfundierten Kryomeridionalschnitten. In den Kontrollen waren bei beiden Färbungen im Bereich der drei Gefäßplexus Desmin- und sma -Aktin-positive Strukturen lokalisiert. Vorherig intravasal appliziertes fluoreszierendes Dextran zeigt die Gefäße in der Retina (Pfeil). Sowohl für Desmin als auch für sma -Aktin war eine Lokalisation der beiden Marker um Gefäße zu erkennen. Bei *Tgfbr2* ^{Δ *eye*}-Mäusen sind alle mit Dextran dargestellten Gefäße von Desmin- bzw. sma -Aktin-positiven Strukturen umgeben (Pfeilspitze). Versuche durchgeführt von S. Etzel.

ERGEBNISSE

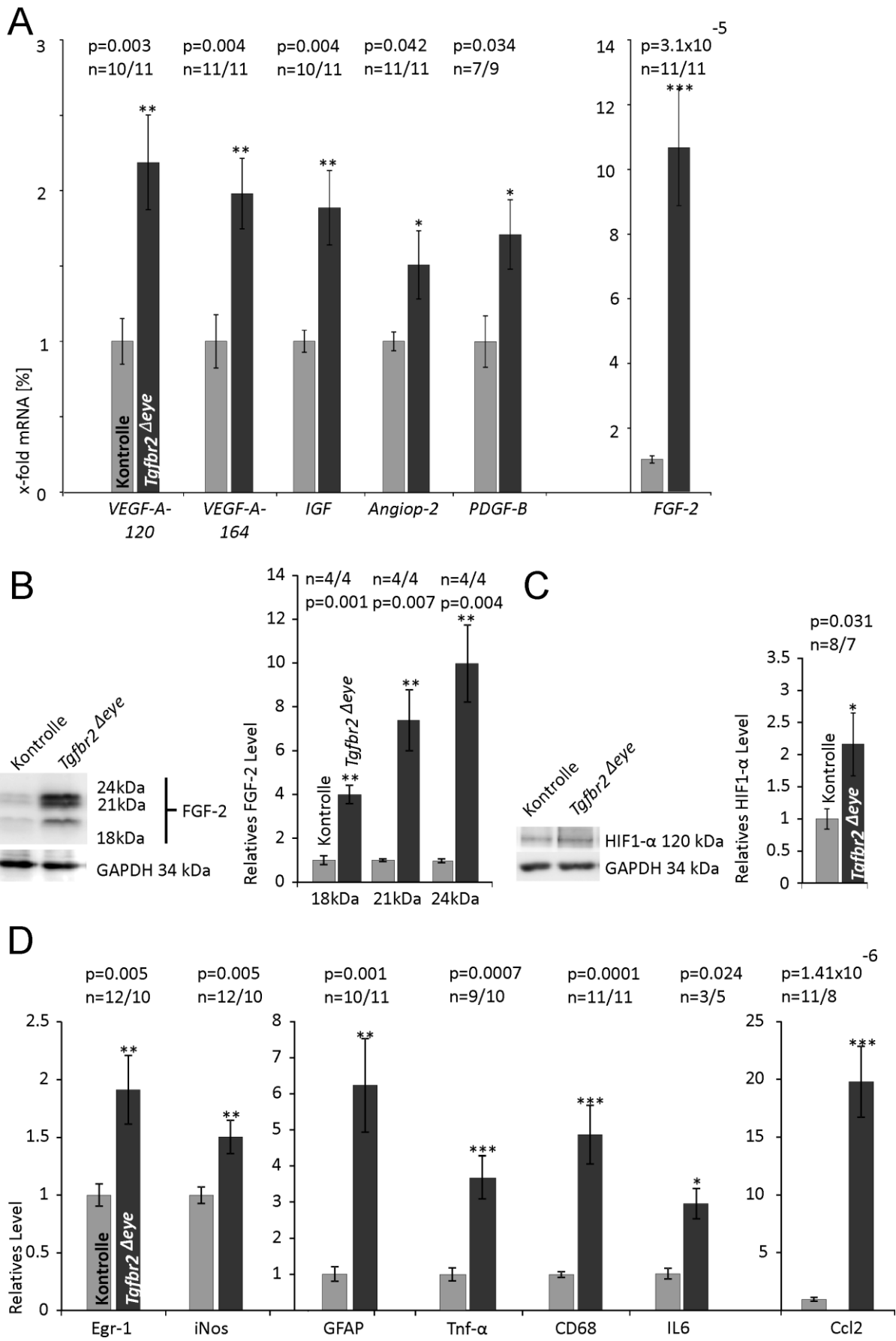
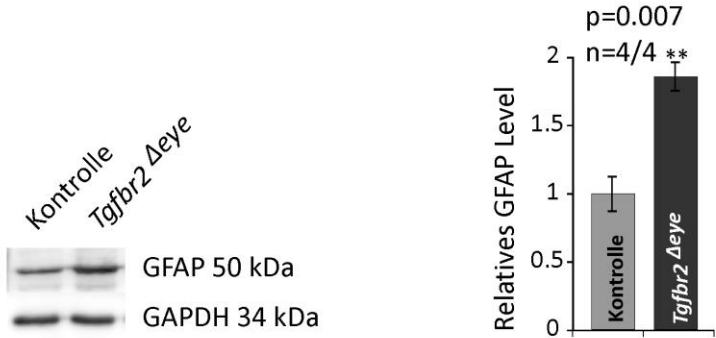


Abbildung 16: Molekularbiologische Ergebnisse

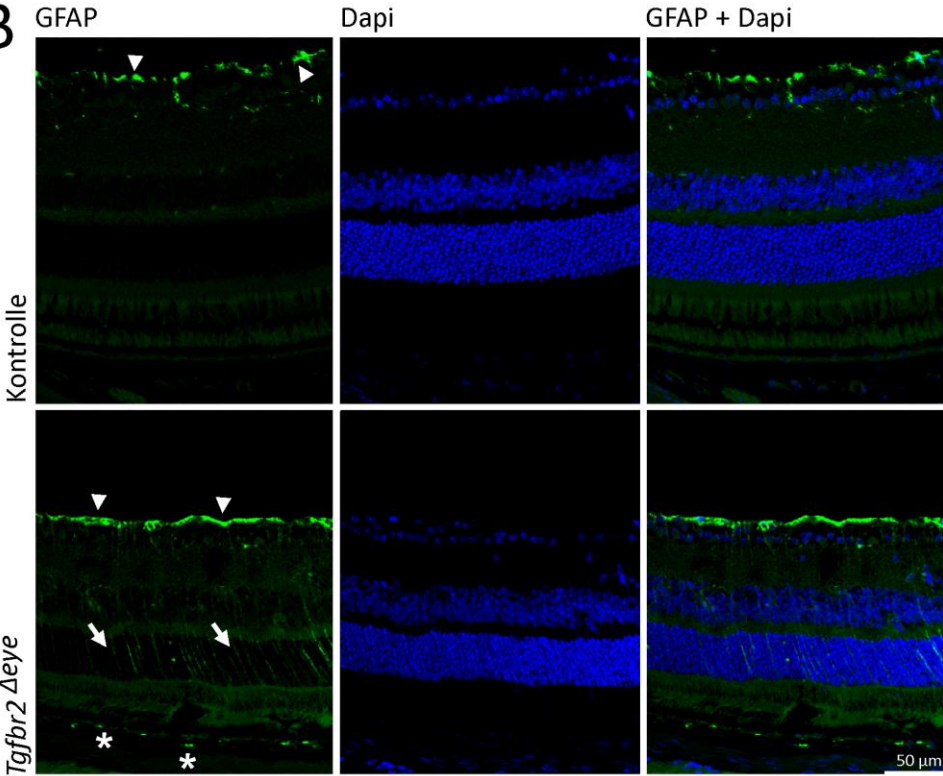
ERGEBNISSE

A: In der quantitativen Realtime RT-PCR war der *vascular endothelial growth factor* (Vegf) mit den Splicevarianten Vegf-a-120 und Vegf-a-164 ebenso wie der *insuline like growth factor* (Igf) hochsignifikant erhöht. Eine signifikante Erhöhung zeigten die beiden Signalproteine Angiopoietin-2 und der *platelet derived growth factor B* (Pdgfb). Mit einer mehr als zehnfachen Erhöhung konnte der mRNA Level für den *fibroblast growth factor* (Fgf-2) detektiert werden (114). B: Auch auf Proteinebene wurde der hochsignifikante Anstieg von FGF-2 und dessen drei Isoformen bei gleichstarker Ladungskontrolle GAPDH bestätigt. Hierbei zeigte die 24 kDa Isoform neben den 18 und 21 kDa großen Isoformen den stärksten Anstieg (114). C: HIF1- α , ein Faktor, der bei Hypoxie regulatorische Funktionen innehat, war auf Proteinebene ebenfalls signifikant erhöht (114). D: Verschiedene Gene immunmodulatorische Zytokine, Mikroglia- und Makrophagenmarker sowie Astrozyten- und Gliazellmarker wurden überprüft. Unter anderem wurden die relativen mRNA-Level von *early growth response protein 1* (Egr-1), *cytokine inducible Nitric oxide synthetase* (iNos), *glial fibrillary acidic protein* (Gfap), *tumor necrosis factor α* (Tnf- α), *cluster of differentiation 68* (Cd68), Interleukin-6 (Il6) und *chemokine ligand 2* (CCL2) bestimmt. In der Gruppe der *Tgfb β 2^{Δeye}*-Mäuse zeigten sich verglichen mit der Kontrollgruppe bei allen getesteten Faktoren signifikante Erhöhungen. Signifikant * $p < 0,05$, ** hochsignifikant $p < 0,01$, *** höchstsignifikant $p < 0,001$. Versuche durchgeführt von B. Braunger (114).

A



B



C

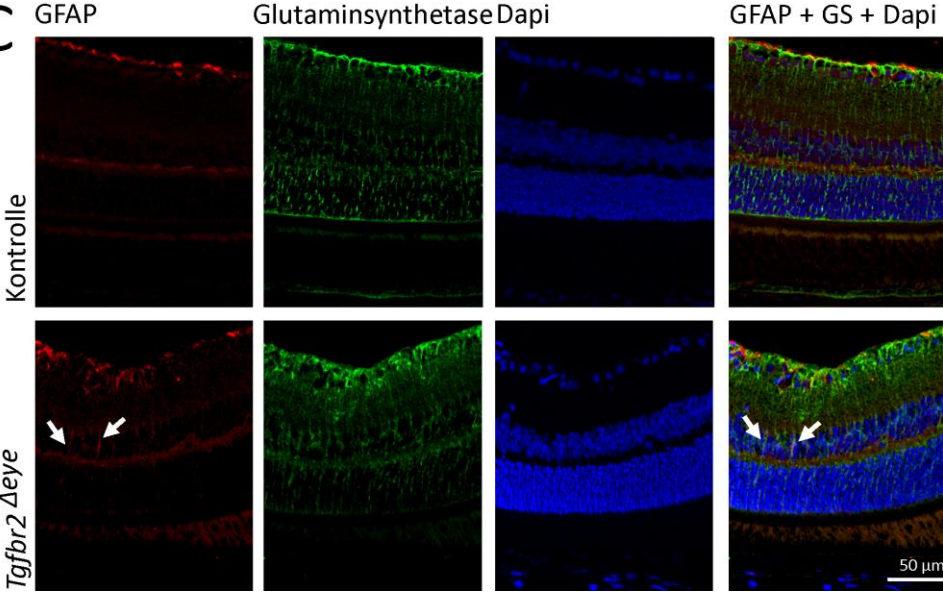


Abbildung 17: Nachweis von GFAP auf Proteinebene und immunhistochemisch

ERGEBNISSE

A: Der Anstieg von GFAP in *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Retinae konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden. Bei gleicher Ladungskontrolle von GAPDH war die Bande von GFAP in den *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Mäusen bei 50 kDa im Western Blot stärker. In der densitometrischen Vermessung des Western Blots war GFAP hochsignifikant erhöht. ** p<0,01. Versuche durchgeführt von B. Braunger. B: Immunhistochemische Färbung von GFAP. GFAP positive Zellen (Pfeilspitze) fanden sich in der immunhistochemischen Färbung der Kontrollen vereinzelt in der Nervenfaserschicht und in der äußeren plexiformen Schicht. Die positive Färbung in der Nervenfaserschicht der Kontrollen ist typisch für Astrozyten. Bei den *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Mäusen bildeten die GFAP-positiven Strukturen in der Nervenfaserschicht (Pfeilspitze) ein nahezu lückenloses Band. Auffällig war die Färbung von Zellen in der Choriokapillaris (Stern) und in der Nähe der Bruch-Membran welche in den Kontrollen nicht zu finden war. Eine weitere Besonderheit waren die in den *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Mäusen auftretenden Streifen, welche sich von der Nervenfaserschicht bis hin zur *Lamina limitans interna* (Pfeil) erstreckten. Versuch durchgeführt von S. Etzel. C: Doppelfärbung von GFAP und Glutaminsynthetase. Im Überlagerungsbild aus GFAP und Glutaminsynthetase zeigte sich eine Co-Lokalisation beider Marker (Pfeil). Versuch durchgeführt von S. Etzel.

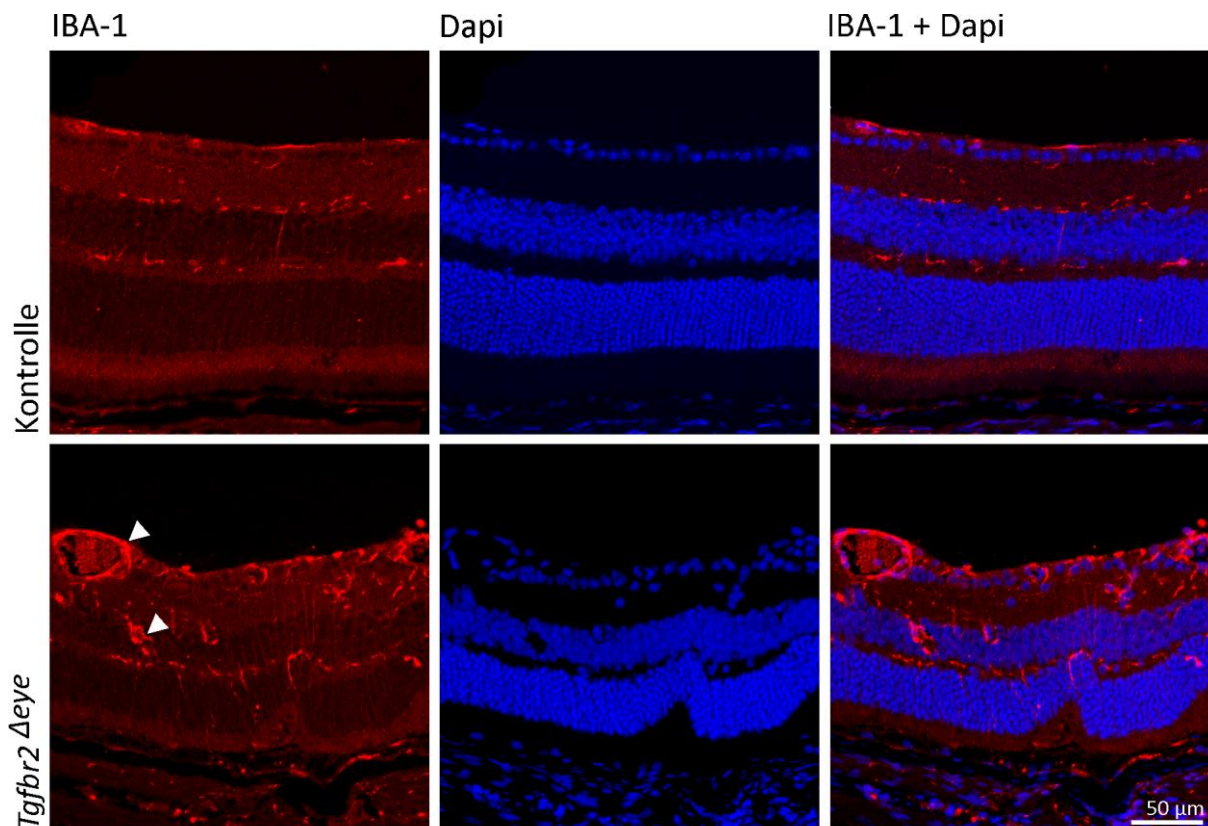


Abbildung 18: IBA-1-immunhistochemische Färbung

IBA-1 (*ionized calcium binding adapter molecule 1*) immunhistochemische Färbung von Kontrollen und *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Mäusen. Darstellung von Makrophagen und Mikrogliazellen in roter Fluoreszenz. Die Kontrollen im Alter von elf Wochen zeigten IBA-1 positive Zellen (Pfeilspitze) im Stratum neurofibrarum und der inneren plexiformen Schicht. An der Grenze zwischen innerer plexiformen Schicht und innerer Körnerschicht sowie in der äußeren plexiformen Schicht waren ebenfalls positive Zellen zu erkennen. Vereinzelt fanden sich Zellfortsätze, die die innere Körnerschicht durchzogen. Auch in der Choriokapillaris waren IBA-1 positive Zellen zu finden. Im Allgemeinen waren die detektierten Zellen schlank konfiguriert. Die *Tgfb β 2 ^{Δ eye}*-Mäuse zeigten eine auffällige Häufung der IBA-1 positiven Zellen um die Gefäße des inneren Plexus, sowie der abnorm lokalisierten Gefäße. Die Anzahl der detektierten Zellen in der Choriokapillaris, der äußeren und inneren plexiformen Schicht war gegenüber den Kontrollen erhöht. Die angefärbten Zellen erschienen verplumpt. Mehr Zellfortsätze durchzogen die Körnerschichten. Versuch durchgeführt von S. Etzel (114).

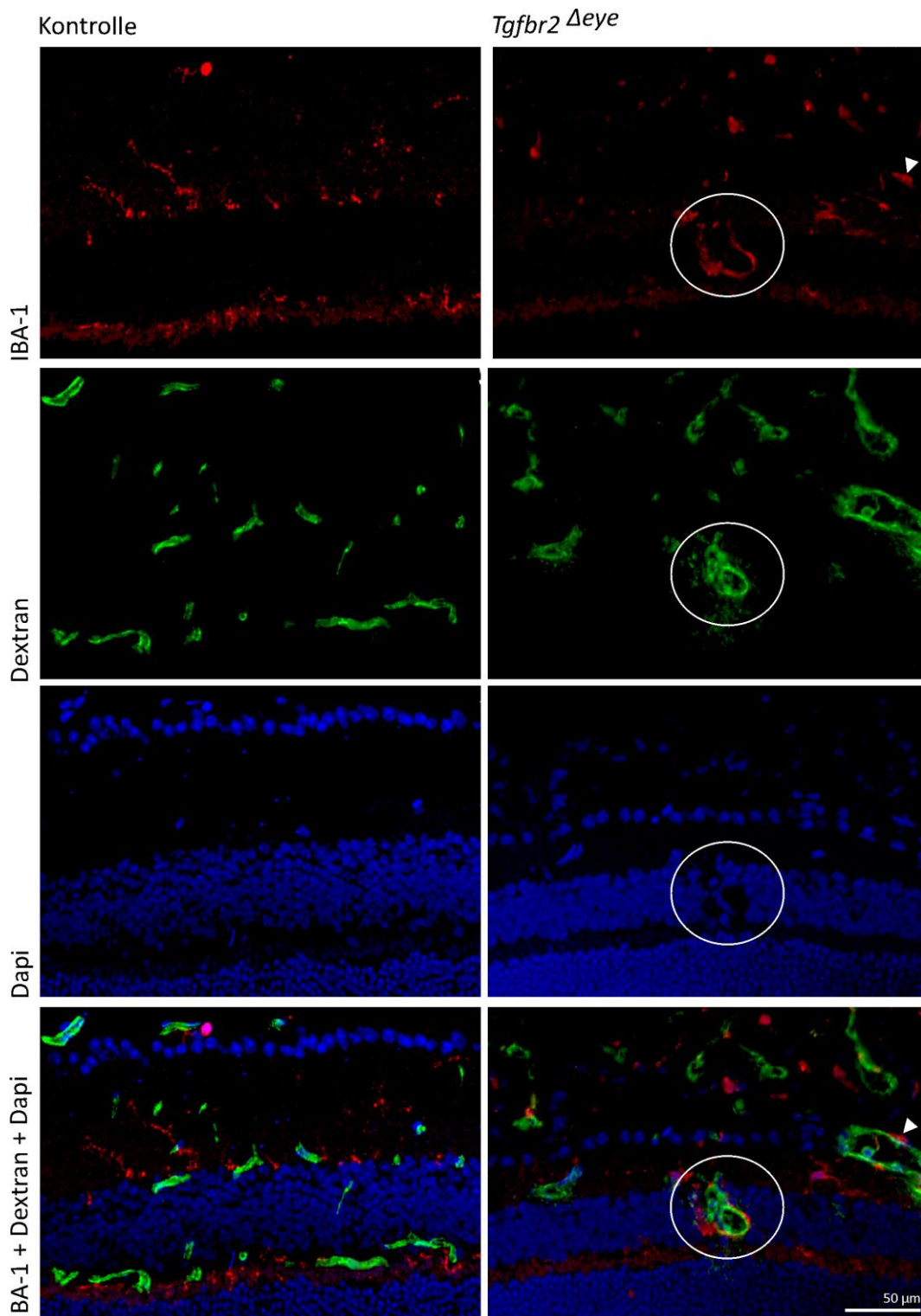


Abbildung 19: IBA-1-immunhistochemische Färbung an Dextrankryomeridionalschnitten

IBA-1 immunhistochemische Färbung an zuvor mit dextranperfundierten Kontrollen und *Tgfbr2*^{Δeye}-Mäusen mit zwölf Wochen. Bei *Tgfbr2*^{Δeye}-Tieren waren die IBA-1 positiven Zellen (Pfeilspitze) in direkter Nachbarschaft zu den Gefäßen zu erkennen (Kreis), sodass es im Überlagerungsbild zu einer Farbänderung der grünen und roten Fluoreszenz kam. Hierbei addiert sich die rote Fluoreszenz der IBA-1 gefärbten Zellen mit der grünen Fluoreszenz des Dextrans, welches aus undichten Gefäßen austrat und sich somit in Überlagerung mit den Mikrogliazellen befand. Versuch durchgeführt von S. Etzel.

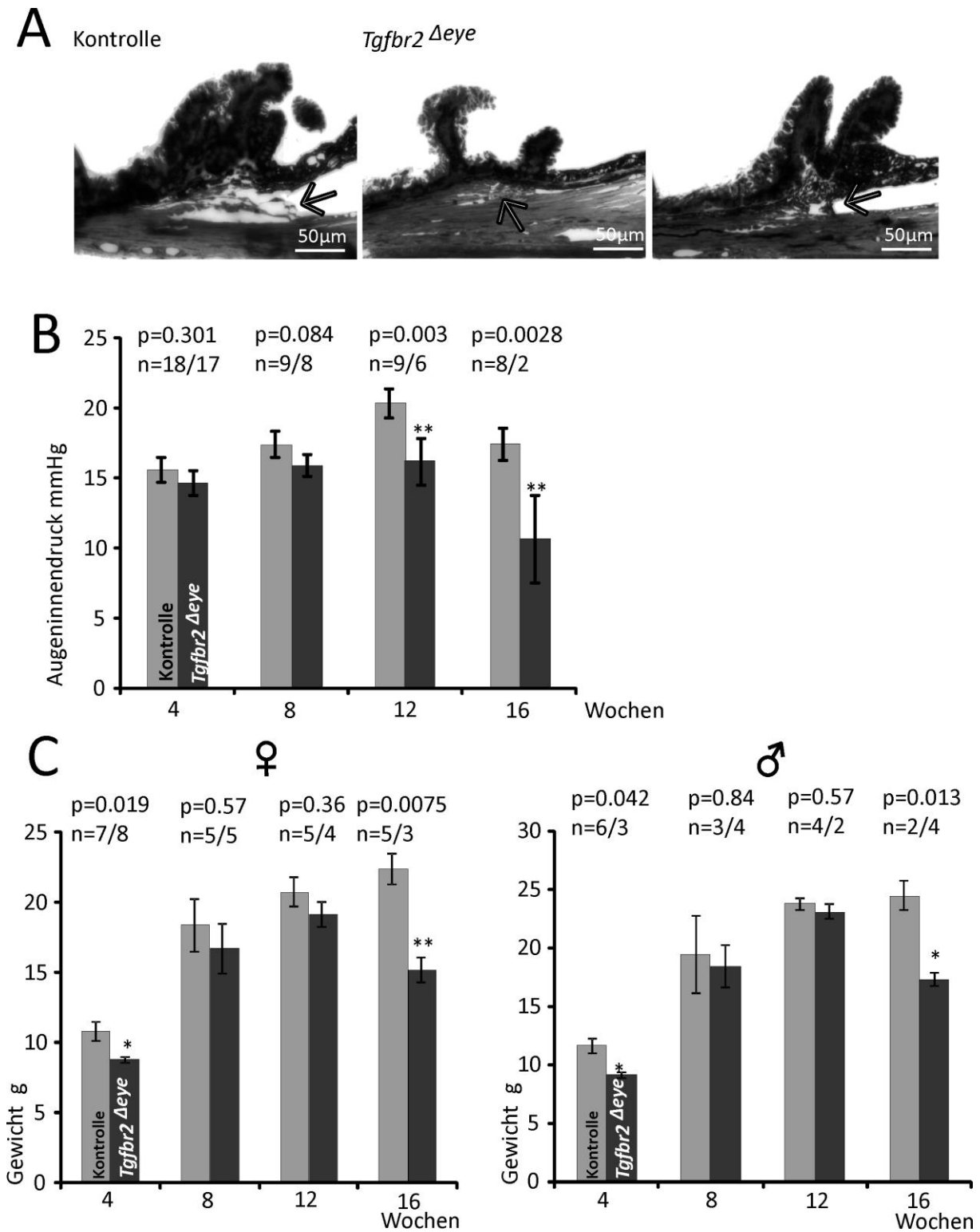


Abbildung 20: Semidünnschnitte des Kammerwinkels, Augendruck- und Gewichtsmessung

A: Detailaufnahmen des Kammerwinkels vier Wochen alter Kontrollen und *Tgfb^{r2} Δeye*-Tieren. *Tgfb^{r2} Δeye* zeigten Verdichtungen und Adhäsionen im vorderen Augenabschnitt und Kammerwinkel (Pfeil). B: Augeninnendruckmessung. Verglichen mit den Kontrollen zeigen die *Tgfb^{r2} Δeye*-Tiere bei drei und vier Monaten signifikant erniedrigte Werte. C: Gewicht der beiden Gruppen aufgeteilt in Männchen und Weibchen im Verlauf vom einem bis vier Monaten. Zu Beginn und zum Ende der Messreihe unterschieden sich die Werte signifikant. * p<0,05, **p<0,01. Versuche durchgeführt von S. Etzel.

ERGEBNISSE

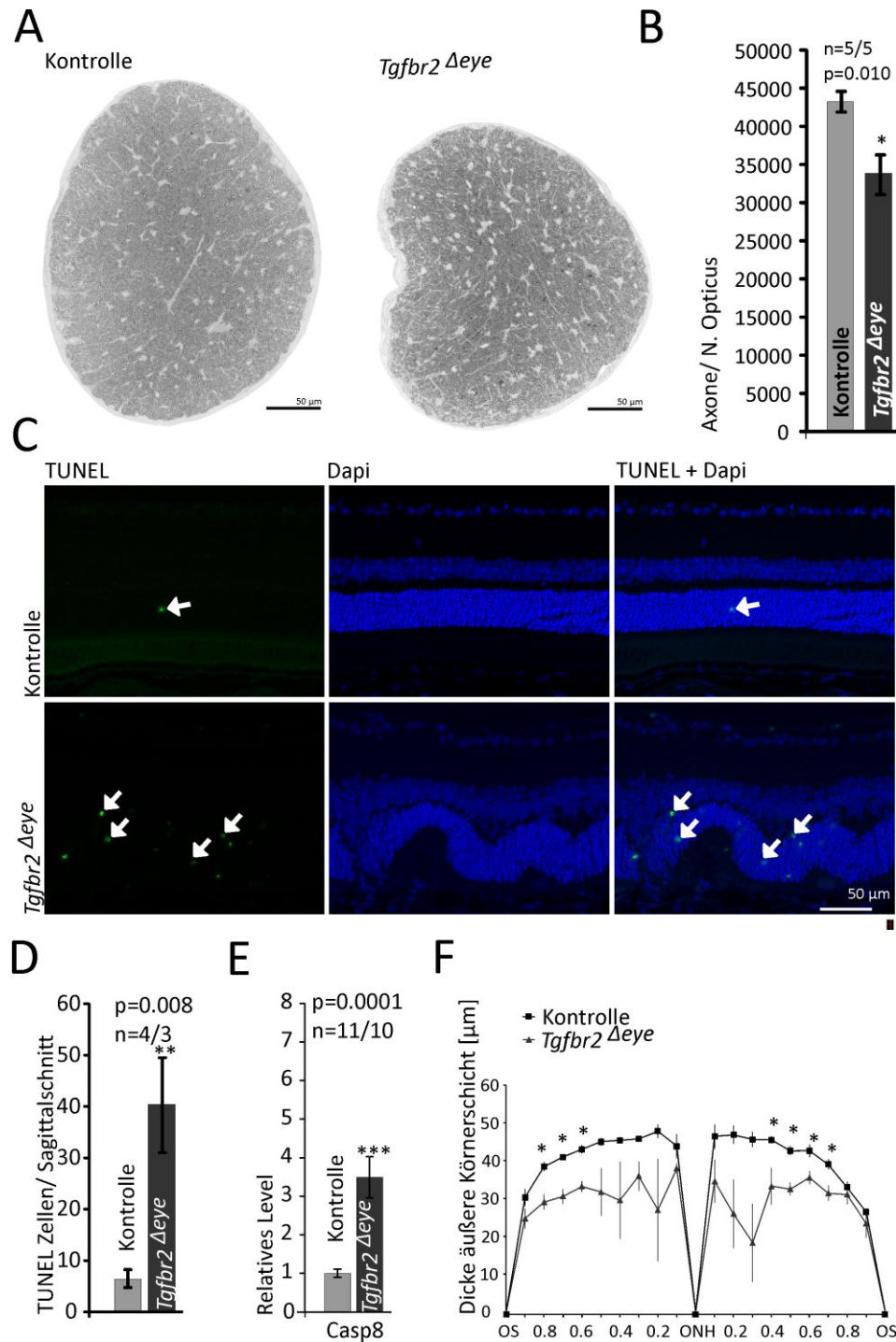


Abbildung 21: Darstellung von apoptotischen Vorgängen in Retina und in *Nn.optici*

A: Querschnitt durch den *N. opticus* von Kontrolle (li.) und *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen (re.); pyknotische Zellen und bindegewebige Vermehrung im *N. opticus* der *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäuse. B: Axonanzahl in den *N. optici*. *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäuse zeigten eine signifikante Erniedrigung der Axonanzahl, n=5. C: TUNEL-Reaktion. In grüner Fluoreszenz wurden apoptotische Zellen (Pfeil) dargestellt. Bei den *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen fanden sich diese vor allem in der äußeren Körnerschicht. D: TUNEL positive Zellen pro Meridionalschnitt. Sie waren in den *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen signifikant erhöht. E: Signifikante Erhöhung von Caspase 8 in der qRT-PCR bei *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen. F: Spiderdiagramm Schichtdicke der äußeren Körnerschicht, die Dicke der äußeren Körnerschicht war an mehreren Messpunkten signifikant dünner als bei den Kontrollen. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. A, B durchgeführt von S. Etzel. C-F durchgeführt von B. Braunger (114).

III. Diskussion

III.1. Konditionelle Deletion von *Tgfbr2* im *Tgfbr2^{Δeye}*-Mausauge

Aus den in der β -Galactosidasefärbung, quantitativer Realtime RT-PCR, Western Blot Analyse und immunhistochemischen Färbungen mittels T β RII- und pSmad3-spezifischen Antikörper erhobenen Daten lässt sich schließen, dass eine konditionelle *Tgfbr2*-Defizienz durch die lokale Applikation von Tamoxifenaugentropfen möglich ist (113). Die Auswirkungen eines kongenitalen systemischen Knockouts wie zum Beispiel gestörte Dottersackangiogenese, fehlerhafte Hämatopoese (31) oder kardiale Defekte aus denen eine embryonale Letalität resultiert, konnten durch die Etablierung dieses neuen Induktionsmodells umgangen werden. Dadurch konnten *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäuse im Versuch weit über die Embryonalperiode hinaus beobachtet werden. In anderen Arbeiten (57) wurde bereits die genaue Lokalisation von T β RII gezeigt werden. Die durchgeführte immunhistochemische Färbung mittels T β RII-spezifischem Antikörper konnte diese Rezeptorverteilung und ihre Verminderung in *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäuse im Bereich der Ganglienzellschicht, der inneren und äußeren Körnerschicht, der äußeren plexiformen Schicht, im Bereich der Fotorezeptorinnensegmente und der Choroidea bestätigen. Die im *Tgfbr2^{Δeye}*-Modell gezeigten morphologischen Veränderungen stimmten mit dieser Rezeptorlokalisierung überein. Es wurde bereits gezeigt, dass drei TGF- β -Isoformen vielfältig in der Maus sezerniert werden und viele Funktionen vermitteln. So beteiligen sie sich am Zellzyklus, der Differenzierung von Zellen, der Blutbildung, immunologischen Vorgängen, Aufbauvorgängen der extrazellulären Matrix, Angiogenese und Chemotaxis (12). Da die Tamoxifenaugentropfen nur lokal am Auge appliziert wurden, ist eine systemische Deletion des Rezeptors im ganzen Organismus verhindert worden oder zumindest nur vermindert erfolgt. Das signifikant niedrigere Körpergewicht sowie der Tod der Versuchstiere im Alter von ungefähr vier Monaten deuten jedoch auf eine zumindest teilweise systemische Deletion von T β RII hin. Da die pCAGGCre-ERTM-Rekombinase nicht spezifisch für das Auge ist und das Tamoxifen als Aktivator der Rekombinase mit dem Kammerwasser und über die retinalen Blutgefäße abtransportiert werden kann, kann es zu einer systemischen Reaktion kommen. Insgesamt wird eine geringere systemische Deletion vermutet, deren genaues Ausmaß Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe ist.

III.2. Persistierende *A. hyaloidea* weist auf Retinamangelversorgung hin

Die Glaskörperarterie (*A. hyaloidea*) ist unter anderem für die Nähr- und Sauerstoffversorgung der Retina innerhalb der ersten 14 Lebenstage notwendig. Nach Ausbildung der drei Gefäßplexus ist eine Versorgung durch die *A. hyaloidea* nicht mehr erforderlich und sie atrophiert zwischen Postnataltag 14 und 21 zum Canalis hyaloideus (9–11). Morphologisch fiel an den Semidünnschnitten von *Tgfbr2^{Δeye}* Mäusen eine Persistenz der Glaskörperarterie zu allen untersuchten Zeitpunkten auf. Die *A. hyaloidea* ist für die Versorgung der Retina vor Ausbildung der intraretinalen Gefäßversorgung zuständig. Ist eine ausreichende Versorgung

der Retina durch diese Gefäße nicht gewährleistet findet der Abbau der *A. hyaloidea* nicht statt und es kommt zu ihrem Fortbestehen (114). Folglich musste eine Störung des retinalen Gefäßwachstums vorliegen, die eine suffiziente Versorgung der Retina verhindert. Die konditionelle Deletion in den durchgeführten Versuchen fand zwischen dem postnatalen Tagen 4 und 8 statt. Bereits unmittelbar nach der Geburt findet ein Wachstum des oberflächlichen Plexus statt, er liegt also schon vor Beginn der konditionellen Deletion in seinen Grundzügen vor. Die Dextranperfusionen zeigten, dass genau dieser oberflächliche Plexus am normalsten aufgebaut und lokalisiert ist. Dagegen zeigten die anderen beiden Plexus ein weniger dichtes Kapillarnetz, was höchstwahrscheinlich Ursache einer mangelnden Versorgung der Retina war. Im *Tgfb β 2^{Δeye}*-Modell wird der *hypoxia inducible factor* HIF1- α in der Retina vermehrt freigesetzt, dessen Sekretion bei Sauerstoffmangelversorgung stattfindet (9). Für eine regelrechte Regression der *A. hyaloidea* wäre wiederum ein Absinken der retinalen HIF1- α Konzentration als molekulares Signal nötig (9, 58). Die Persistenz dieses embryonalen Gefäßbettes im *Tgfb β 2^{Δeye}*-Modell ist also zum einen durch die zu geringen Dichte der retinalen Gefäße, zum anderen aus der daraus resultierenden Mangelversorgung der Retina zu erklären. Eine bislang unbekannte direkte Funktion des TGF- β Signalwegs am Abbau der hyaloidealen Gefäße ist trotzdem nicht auszuschließen.

Aus dem erhöhten HIF1- α Spiegel resultiert die Produktion von VEGF (36). Die Akkumulation von angiogenen Faktoren im hypoxischen Gewebe ist richtungsweisend für die Einsprossung von Endothelzellen im Rahmen der Angiogenese. Perivaskuläre Zellen (Perizyten) und Endothelzellen exprimieren T β RII (26, 59). Sie sind in dem von uns gewählten System von der Deletion des *Tgfb β 2*-Gens betroffen. Es ist bereits beschrieben, dass niedrige Spiegel von TGF- β eine Proliferation und Migration von Endothelzellen bewirken (27). Passend hierzu sehen wir im Trypsinretinaverdau der defizienten Tiere eine große Zahl keulenartiger Gefäßerweiterungen, in denen sich zahlreich runde Zellkerne befinden. Diese Veränderungen sind Mikroaneurysmen, deren Aussackungen typischerweise sehr viele Zellkerne enthalten (60). Beim Menschen treten Mikroaneurysmen der retinalen Gefäße charakteristischerweise bei der diabetischen Retinopathie auf.

III.3. *Tgfb β 2^{Δeye}* Mäuse zeigen Anzeichen einer diabetischen Retinopathie

Im *Tgfb β 2^{Δeye}*-Mausmodell fanden sich einige Befunde, die auch bei der diabetischen Retinopathie auftreten. So konnten die für diese Erkrankung typischen bereits erwähnten zellkernreichen Mikroaneurysmen gezeigt werden. Auch die bei Fluoreszenzuntersuchungen der diabetischen Retinopathie vorliegende erhöhte Permeabilität der Gefäßbasalmembran mit Austritt von Flüssigkeit in das umliegende Netzhautgewebe und *Tortuositas vasorum* lag bei *Tgfb β 2^{Δeye}* Mäusen vor.

Da Mikroaneurysmen oft in der Nähe azellulärer Kapillaren gefunden werden, wird als pathogene Ursache ein Verlust von Perizyten diskutiert (24). Perizyten sind Teil der Blut-Retina Schranke und stehen in der Retina jeweils mit einer Endothelzelle in Verbindung. Die Gefäßleckagen, die wir bei TβR2-defizienten Tieren in der Fluoreszenzangiographie beobachten konnten, deuten zudem auf eine Störung der inneren Blut-Retina-Schranke hin.

Wie bei der diabetischen Retinopathie beschrieben, ist auch der angiogene Faktor VEGF im *Tgfbr2^{Δeye}*-Modell erhöht (61). Diese Erhöhung entsteht aus einem pro-angiogenen Milieu der Netzhaut. Die gezeigten vitrealen Neovaskularisationen, die die *Membrana limitans interna* durchbrechen resultieren wiederum daraus. Das Mausmodell zeigt also sowohl Befunde der nicht-proliferativen-diabetischen Retinopathie als auch der proliferativen Form. Andere typische Befunde der diabetischen Retinopathie sind azellulären Kapillaren mit Verlust von Perizyten oder Endothelzellen (24, 37). Die Auswirkung des *Tgfbr2^{Δeye}*-Modells auf perivaskuläre Zellen und retinaler Perfusion wird Gegenstand zukünftiger Projekte der Arbeitsgruppe sein.

III.4. *Tgfbr2^{Δeye}* Mäuse entwickeln Veränderungen wie bei AMD

Der Phänotyp der AMD äußert sich in Drusenentwicklung, Bildung von Neovaskularisationen, RPE-Degeneration und Atrophie, sowie Blutungen aus den Neovaskularisationen und, als stärkste Ausprägung des Phänotyps, in Netzhautablösung (37). Typischerweise werden beim Krankheitsbild der AMD im menschlichen Auge auch RPE-Pigmentstörungen in den Funduskopien, Hyper- oder Hypoplasie des RPE und dessen Atrophie beschrieben (37). Es finden sich auch Ablagerungen wie *basal linear deposits* (BlinD) als sehr frühes Zeichen der AMD (53) und Drusen, sowie funktionelle Veränderungen der Retina. Im *Tgfbr2^{Δeye}*-Mausmodell zeigten sich AMD-typische Veränderungen. Die zwischen der Bruch-Membran und dem RPE entstandenen, weitflächigen Areale von Ablagerungen mit zystischen Hohlräumen, Zelldetritus und die in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erkennenden Veränderungen der Bruch-Membran und des RPEs sind mit den bei der AMD auftretenden BlinDs und BlamDs zu vereinbaren. Die Degeneration der äußeren Fotorezeptorsegmente schreitet mit zunehmender Versuchsdauer von einer leichten Einschmelzung bis zur völligen Degeneration fort. Auch bei der atrophischen AMD gibt es Befunde, die zeigen, dass Fotorezeptoren, RPE und Choriokapillaris atrophieren. In den Schichtdickenvermessungen war die äußere Körnerschicht signifikant verdünnt und das RPE stellenweise verdichtet, andernorts nur noch degeneriert oder lückenhaft vorhanden. Im Bereich der BlinDs war das RPE von der Bruch-Membran abgehoben und atrophiert. Zelluläre, vesikuläre Einschlüsse, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum, das sich nahe an den BlinDs findet, wiesen auf einen Beitrag des RPEs zur Entstehung von BlinDs und Drusen hin (53). Durch die verminderte RPE-Leistung werden Ausscheidungsprodukte der Fotorezeptoren nicht mehr abgebaut und sind als amorphe Ablagerungen zu erkennen. Schlimmste Komplikation der AMD beim Menschen ist die Netzhautablösung. Auch der

Tgfb β 2 ^{Δ eye}-Phänotyp zeigte diese Verlaufsform. Eine weitere Gemeinsamkeit sind die in der Collagen-IV-Färbung dargestellten Neovaskularisationen aus der Choroidea, die die Bruch-Membran durchbrechen. Fibronektin ist ein Glykoprotein, welches in löslicher Form bei der Blutgerinnung als Koppler zwischen Fibrin und zellulären Bestandteilen eine Rolle spielt (62). In fibrillärer Form stellt es Verbindungen zwischen extrazellulärer Matrix und dem Zytoskelett der Zelle dar und ist am Aufbau der Basalmembran beteiligt. Es spielt eine Rolle bei der Ausbildung von Zellkontakten und der Migration von Zellen während der Entwicklung (62). In der Fibronektin-Färbung waren die für die AMD typischen großen Neovaskularisationen aus der Choroidea, zwischen Bruch-Membran und äußerer Körnerschicht und die lückenhafte Bruch-Membran zu erkennen. BlinDs enthalten ebenso Fibronektin und sind gefärbt (53). Die neu gebildeten Gefäße, die bei der AMD auftreten, sind weniger dicht und neigen zu Blutungen und Leckagen, wie bei den gezeigten Ergebnissen der *Tgfb β 2* ^{Δ eye}-Mäuse. Deutliche Anzeichen für das Krankheitsbild AMD in der menschlichen Funduskopie sind kleine, scharf begrenzte, runde, harte Drusen und weniger gut abgrenzbare, teils konfluierende weiche Drusen wie sie auch im *Tgfb β 2* ^{Δ eye}-Phänotyp zu sehen waren. Die Funduskopien der acht und zwölf Wochen alten Tiere zeigten die für AMD typische geographische Atrophie mit Hyper- und Hypopigmentierung des RPEs. Durch den Verlust der Blut-Retina-Schranke kam es zu Einlagerungen von Flüssigkeiten, die die Ablösung der Netzhaut, wie sie im sechzehn Wochen alten Tieren zu sehen war, begünstigen. Auch die Veränderungen in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten Analogien für das beim Menschen vorkommende Krankheitsbild der AMD. Bei der exsudativen Form der menschlichen AMD wachsen pathologische Gefäße aus der Choriokapillaris durch Lücken in der Bruch-Membran in die Netzhaut ein. Zwischen Bruch-Membran und RPE sind in diesem Mausmodell Gefäße und Blutungen zu sehen und neovaskuläre Choroideagefäße finden sich innerhalb der Retina. Der choroidale Ursprung wurde durch EM und der PLVAP-Färbung bestätigt. Wie bei der menschlichen AMD, bei der sich sowohl in der Bruch-Membran als auch zwischen Bruch-Membran und RPE Drusen und Ablagerungen wie BlinDs bilden, zeigten *Tgfb β 2* ^{Δ eye}-Tiere dort Veränderungen wie Bruch-Membran Verdickung, Unabgrenzbarkeit der Schichten und Einlagerung von Material. Innerhalb der Bruch-Membran fanden sich große Zellen. Ob es sich hierbei um Makrophagen oder um Endothelzellen handelt, die die Bruch-Membran arrodieren, ist unklar. Beide Zelltypen stehen bei der menschlichen AMD in Zusammenhang mit dem Abbau der Bruch-Membran (53). Oft zeigt die RD8 Mutation bei Mäusen einen AMD-ähnlichen Phänotyp. Um dies auszuschließen, wurden die Tiere des Genotyps *Tgfb β 2* ^{Δ eye} auf diese Mutation mittels PCR getestet. Sie trugen die RD8 Mutation nicht.

Basierend auf diesen Ergebnissen zeigten die *Tgfb β 2* ^{Δ eye} sowohl Aspekte der trockenen als auch der exsudativen Form der AMD. Wir gehen deshalb von einer ähnlichen Pathogenese der AMD beim Menschen wie im *Tgfb β 2* ^{Δ eye}-Modell aus.

III.5. Angiogene und immunologische Aktivierung durch *Tgfbr2*-Defizienz

Nicht nur die Morphologie wies typische Veränderungen einer diabetischen Retinopathie auf, auch die untersuchten Wachstumsfaktoren stehen in Zusammenhang mit diesem Erkrankungsbild. Die quantitative RT-PCR zeigte für alle untersuchten Faktoren eine signifikante Erhöhung der mRNA Spiegel. Dabei stieg FGF-2 am deutlichsten an, die beiden VEGF-Isoformen A-120 und A-164 sowie IGF um das Doppelte. Angiopoietin 2 und PDGF-B waren ebenfalls signifikant erhöht.

Im *Tgfbr2*^{Δeye}-Mausmodell war der TGF-β-Signalweg ausgeschaltet. Die Ursache für die Erhöhung dieser angiogenen Faktoren erklärt sich also teilweise durch die Blockade des Signalwegs selbst, andererseits aber auch durch die morphologischen Veränderungen, die durch die Defizienz des Rezeptors hervorgerufen wurden. Die Morphologie der Mäuse wurde von den Gefäßveränderungen im mittleren und äußeren Gefäßplexus dominiert. Dass eine suffiziente Versorgung der Netzhaut durch diese Gefäße nicht mehr möglich ist, zeigte sich in der Erhöhung von HIF1-α und der Persistenz der *A. hyaloidea*. Durch die Ausschüttung von HIF1-α von betroffenen Zellen wird die Produktion von VEGF stimuliert. Als richtungsweisender Faktor für die Einsprossung von Gefäßen ins Gewebe wiederum spielt VEGF für die Teilung von Endothelzellen und Bildung von Neovaskularisationen, sowie der Produktion von Metalloproteinasen eine Rolle (63). Nicht nur der VEGF-Spiegel wird durch Hypoxie erhöht, sondern auch der von PDGF (64, 65). VEGF wiederum wird durch die Anwesenheit von IGF erhöht und auch PDGF kann die VEGF Produktion anregen (65). Beide sind also für die Bildung von Neovaskularisationen zuständig. Die Isoform 164 des VEGF-A rekrutiert Leukozyten, welche für die Entstehung von Neovaskularisationen essentiell sind (66). IGF selbst hat wiederum Einfluss auf die Retinavaskularisation. Anwesenheit von wenig IGF zeigt eine geringe Vaskularisation. Es stellt sich die Frage, ob IGF ausgeschüttet wird, weil bei *Tgfbr2*^{Δeye}-Mäusen eine geringere oder fehlerhafte Vaskularisation vorliegt, oder ob der Phänotyp von der erhöhten Menge an IGF hervorgerufen wird (67–69). Die hohe Produktion von FGF-2 kann seinen Ursprung in der Ausschaltung des TGF-β Signalwegs haben. Bei *in vivo* Versuchen kann durch Stimulierung mit FGF-2 TGF-β1 erhöht werden (70). Da durch die Ausschaltung des TβRII auch die Signalweiterleitung von TGF-β1 unterbrochen wird, könnte dieser Effekt auf eine Rückkopplungsreaktion zurückzuführen sein (26). TGF-β besitzt in den frühen Stadien der diabetischen Retinopathie einen antiangiogenen Effekt. TGF-β2 verhindert bei mikrovaskulären Endothelzellen aus der Rindernetzhaut die Zellproliferation bei Hypoxie (71). Auch über den ALK 5 Signalweg wird die Proliferation und Migration von Endothelzellen und Perizyten verhindert (30). Die vorherrschende Isoform von TGF-β im Auge stellt die Unterform 2 dar (72). Trotzdem macht sich auch der Mangel von TGF-β1 mit einer gestörten Gefäßentwicklung bemerkbar. Die Zugabe von TGF-β1 zu kultivierten Perizyten zeigt einen Wachstumsstopp und eine Hochregulierung von smα-Aktin (73). TGF-β ist in der Lage, die Produktion verschiedener angiogener Faktoren wie VEGF, PDGF und tumor necrosis factor (TNF-α) selbst zu aktivieren. Auch FGF-2 und PDGF können direkt durch TGF-β1 induziert werden. Es ist zuständig für den Abbau der extrazellulären Matrix und kann Angiogenese stimulieren (74). Alle FGF-2 Isoformen sind auch auf Proteinebene

signifikant erhöht, am deutlichsten die 24kDa Form. Die 18kDa Isoform stimuliert Zellmigration, Proliferation und eine Herunterregulierung seines Rezeptors, wohingegen die beiden anderen Isoformen die Zellproliferation auf DNA-Ebene regulieren (75). Durch den hohen FGF-2 und PDGF Titer können auch die gesteigerte Angiogenese und die proliferativen Mikroaneurysmen erklärt werden (75, 76), da FGF-2 die Proliferationen von Endothelzellen und Perizyten fördert (73). Auch die Entstehung von choroidalen Neovaskularisationen wird durch FGF-2 gefördert (77). In anderen bereits etablierten Tiermodellen des Diabetes ist FGF-2 erhöht (78). Die Bildung von Neovaskularisationen ist auch abhängig vom Gefäßremodelling. Hierbei wird das vorhandene Gefäß destabilisiert und das Auswachsen von Neovaskularisationen möglich. Angiopoietin-2 hat genau diese Eigenschaften (79). Die Erhöhung von PDGF kann die Bildung von epiretinalen Membranen und Netzhautablösungen durch Einlagerung von fibrovaskulärem Gewebe erklären (80, 81).

Auch bei der AMD oder dem AMD-ähnlichen Phänotyp im *Tgfb β 2^{Δeye}*-Mausmodell ist eine Erhöhung verschiedener Wachstumsfaktoren plausibel und beschrieben (61). VEGF ist bei der menschlichen AMD erhöht (61). Es ist bekannt für seine angiogene Wirkung einerseits, andererseits aber auch für seinen Einfluss auf den Abbau von extrazellulärer Matrix. So ist erwiesen, dass VEGF die Produktion von Metalloproteinasen begünstigt, die benötigt werden um Basalmembranen für den Prozess der Gefäßinvasion vorzubereiten (63). Zudem wird diesem Wachstumsfaktor auch eine monozytenlockende Wirkung zugeschrieben, die ihren Beitrag zur pathologischen Angiogenese leistet (82). Wie bei der diabetischen Retinopathie besteht also ein Zusammenhang zwischen VEGF und der Bildung von Neovaskularisationen. Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass hierfür vor allem VEGF-A-164 verantwortlich ist (66). In Mäusen mit choroidalen Neovaskularisation wurde eine erhöhte Expression für VEGF-A-120 bestätigt (83). Es wird vermutet, dass die choroidalen Neovaskulationen durch folgende Pathogenese entstehen: Durch eine verdickte Bruch-Membran kann das basal produzierte VEGF der RPE-Zellen nicht mehr durch diese diffundieren. In der umgekehrten Richtung ist auch ein Nahrungs- und Sauerstoffaustausch weniger gut möglich. In der äußeren Retina entsteht dadurch Hypoxie, die wiederum über HIF1- α eine Hochregulierung des VEGF-Haushaltes induziert. Hierdurch kann es zu Neovaskularisationen kommen (61) und VEGF-Rezeptor tragende Immunzellen werden angezogen. Zudem wird eine VEGF Expression auch an infiltrierenden Makrophagen bei AMD beschrieben (84). Nicht nur VEGF, sondern auch FGF-2 und Angiopoietin-2 wird eine angiogene Wirkung zugeschrieben (61). FGF-2 und IGF-1 sind für die Produktion und Ablagerung von Matrixproteinen verantwortlich (61). Eine Erklärung für die Zunahme von FGF in *Tgfb β 2^{Δeye}*-Mäusen kann in der Schutzfunktion von FGF für Fotorezeptoren gefunden werden (84). FGF-2 wird auch mit der Entstehung choroidaler Neovaskularisationen in Verbindung gebracht (85). Auch die Erhöhung von PDGF in der äußeren Körnerschicht bei AMD ist bekannt (86). PDGF wird dabei eine RPE-lockende und RPE-wachstumsfördernde Eigenschaft zugeschrieben (87). Zudem erfolgt eine Induktion von PDGF durch Hypoxie (64, 65). Die hohen FGF-2 und PDGF Titer können die gesteigerte Angiogenese und Bildung von Neovaskularisationen im *Tgfb β 2^{Δeye}*-Tiermodell erklären (75, 76), da FGF-2 die Proliferationen von Endothelzellen und Perizytenproliferation fördert (73).

DISKUSSION

Wie oben beschrieben wird auch Angiopoietin-2 zu Bildung von Neovaskularisationen benötigt (79).

In vielen Publikationen wird eine Beteiligung des Immunsystems mit dendritischen Zellen, Zellen des mononukleären Phagozytosesystems und weiterer Zelltypen bei der Entstehung oder im Verlauf der Krankheiten AMD und DRP vermutet. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen der menschlichen AMD sind bereits früher Zellen, die sich der Bruch-Membran von Seiten der Choriokapillaris anlagern, als Makrophagen, Lymphozyten und Fibroblasten identifiziert worden. Die Makrophagen internalisieren Teile der Bruch-Membran und infiltrieren diese und den darüber liegenden subretinalen Raum (52, 53). In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der *Tgfbr2^{Δeye}*-Tiere sind deutlich große, dendritische, mononukleäre Zellen unterhalb und innerhalb der Bruch-Membran zu erkennen. Die Detektion des für Makrophagen und Mikroglia spezifischen Proteins IBA-1 zeigt, dass sowohl um die veränderten und dilatierten Gefäße des mittleren und äußeren, als auch um die relativ normalen Gefäße des inneren Plexus eine Ansammlung aktivierter Mikrogliazellen zu finden ist. In der Choroidea und den plexiformen Schichten ist die Anzahl der IBA-1-positiven Zellen erhöht. Diese Zellen sind verplumpt und mehr Zellfortsätze sind zu erkennen. Die in den EM-Aufnahmen dargestellten Zellen können also durchaus Makrophagen sein.

Die Messung des Augeninnendrucks ergab für die ersten Messzeitpunkte keinen signifikanten Unterschied. Erst die Augendruckmessung mit zwölf und sechzehn Wochen zeigte signifikant niedrigere intraokuläre Druckwerte bei *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen. Da sich der Kammerwinkel selbst relativ normal präsentiert und bei Verdichtungen in diesem Bereich eher mit einem Anstieg des Augendruckes zu rechnen ist, muss es einen anderen Grund für den gesenkten Druck geben. Diese Senkung des Augendruckes fällt genau mit dem Auftauchen der Neovaskularisationen, welche die Bruch-Membran durchbrechen, zusammen. Die Barrierefunktion der Bruch-Membran und des RPEs lässt durch die aufgetretene Degeneration, Neovaskularisation und die Arrosion durch Makrophagen nach. Somit werden alternative Abflusswege geschaffen.

Oft stellt sich die Frage, ob ein überschießendes Immunsystem Grund der Erkrankung ist oder aber eine andere Ursache zugrunde liegt. Im Alter von vier Wochen sind in der Retina einige Faktoren, die als Marker für Mikroglia und Makrophagen gewertet werden oder von Makrophagen und anderen Immunzellen exprimiert werden, auf mRNA-Ebene signifikant erhöht. So ist das für Makrophagen und Monozyten typische Oberflächenprotein *cluster of differentiation 68* (CD68) erhöht (88). Aktivierte Makrophagen und Astrozyten können über das Enzym *cytokine inducible nitricoxide synthetase* (iNOS) das freie Radikal Stickstoffmonoxyd herstellen (89). iNOS wird durch verschiedene proinflammatorische Zytokine aktiviert und kann durch das hochkonzentrierte zytotoxische Stickstoffmonoxyd zur Immunabwehr beitragen. Sowohl HIF1- α also auch TNF- α können iNOS und somit eine Steigerung der Phagozytose induzieren (90). iNOS gilt daher als Marker für Makrophagen und Mikroglia. Dieser spezifische Marker ist bei den *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen signifikant erhöht. In

der Literatur werden *early growth response protein 1* (EGR-1) vielseitige Aktivitäten im Zusammenhang mit hypoxischem Geschehen zugeschrieben. Auch *Tgfbr2^{Δeye}*-Tiere zeigen einen erhöhten Level von EGR-1. Über den Transkriptionsfaktor EGR-1 werden unter anderem hypoxiebedingte Entzündungsprozesse reguliert. Vermittelt durch HIF1- α steuert EGR-1 die hypoxieabhängige Transkription verschiedener proinflammatorischer und inflammatorischer Gene in Monozyten und Makrophagen (91). Die Abwanderung von Monozyten aus Gefäßen in hypoxischem Gewebe wird dadurch reguliert. Auch TNF- α , dessen Rezeptoren sowie Interleukin-6 werden über diesen Weg erhöht. HIF1- α ist auch für die Transaktivierung des iNOS-Gens zuständig (92). Über EGR-1 und HIF1- α wird in Makrophagen Plasminogen Activator Inhibitor-1 induziert. EGR-1 fördert die Monozytenreifung und -differenzierung und deren Entwicklung zu Makrophagen (93). Über TGF- β kann die FGF-Rezeptor-1-Expression moduliert werden und FGF-2 kann wiederum über diesen Rezeptor EGR-1 induzieren, das in Endothelzellen exprimiert wird (94). TGF- β selbst ist in der Lage, EGR-1 zu erhöhen, genauso wie PDGF (95). Apoptose und VEGF-Produktion unterliegen der EGR-1-Signalgebung (96). Auch die Astrozytenproliferation selbst steht unter dem Einfluss von EGR-1 (95). Über oxidativen Stress kann eine Induktion von EGR-1 stattfinden, was als Mediator zum Fortschreiten vieler Krankheiten wie Diabetes, Arteriosklerose aber auch der Induktion von Apoptose gewertet wird (95). Das macht EGR-1 zu einem Schlüsselfaktor bei Sauerstoffmangel und dem Verarbeiten hypoxischer Schäden. *Chemokin ligand 2* (CCL2) oder *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) kann Zellen des Immunsystems wie Monozyten und dendritische Zellen zu Orten inflammatorischen Geschehens locken. Es sorgt für eine Infiltration mit Neutrophilen und Makrophagen, für Angiogenese und den Aufbau von extrazellulärer Matrix (97). Für CCL2 ist bereits bekannt, dass es eine Rolle in verschiedenen AMD-ähnlichen Tiermodellen spielt (98). Mäuse, die entweder CCL2 oder dessen Rezeptor CCR2 nicht exprimieren, entwickeln einige Gemeinsamkeiten mit dem Phänotyp der AMD (98). In Mausmodellen wird CCL2 auch in Zusammenhang mit der Entwicklung von exsudativer AMD und choroidalen Neovaskularisationen gebracht (99). Menschen, die bestimmte *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) von CCL2 oder dessen Rezeptor aufweisen, besitzen auch ein höheres Risiko an AMD zu erkranken (98). Bei ihnen wurde ein signifikant höheres Level an Ccl2, jedoch ein geringeres für dessen Rezeptor gefunden (98). CCL2 wird ubiquitär exprimiert. Wenn es an den CCR2 Rezeptor bindet, führt es zu Aktinveränderungen und ermöglicht dadurch Zellbewegung (100). CCL2 wird von RPE-Zellen bei akuter Entzündung und oxidativem Stress in Richtung der Choroidea sezerniert (99). Es wird vermutet, dass RPE-Zellen dadurch Makrophagen aus der Choroidea rekrutieren können. Im RPE wird CCL2 wiederum durch Mikrogliazellen induziert (101). Das Zusammenspiel zwischen RPE und Mikrogliazellen spielt wohl eine außerordentlich wichtig Rolle in der AMD-Pathogenese und der Entstehung von Entzündung und Neovaskularisationen (101). Der hauptsächlich von Makrophagen sezernierte Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist ein wichtiges Signalmolekül des Immunsystems. Während bestehender Entzündungen kann TNF- α die phagozytären Leistungen von Makrophagen erhöhen und über Zytokinausschüttung gezielt Zellen des mononukleären phagozytären Systems anlocken (102). Es liegt als membrangebundenes

Protein vor und kann durch Metalloproteinasen in eine lösliche Form gebracht werden. Über Aktivierung des TNF-Rezeptor-1 kann die Apoptose mittels Caspase 8 in Gang gesetzt werden und die Transkription inflammatorischer Gene wird über diesen Rezeptor aktiviert (102). Die Sehnerven der *Tgfbr2^{Δeye}*-Tiere zeigen pyknotische Axone und eine Vermehrung an Bindegewebe. Dadurch ergibt sich die signifikant geringere Anzahl an Axonen in den *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäusen, und die Erhöhung apoptotischer Marker, wie Caspase 8. Über den Nf-κB Signalweg kann TNF-α aber auch die Apoptose inhibieren und Zelldifferenzierung, Zellaktivierung und Zytokinproduktion induzieren (102). Da TNF-α auch für die Entstehung der Kachexie mitverantwortlich ist, lässt sich das geringere Körpergewicht der *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäuse vielleicht unter anderem durch den höheren Level an TNF-α erklären. Über Genregulation durch Nf-κB, also über einen TNF-α-vermittelten Signalweg, wird Il-6 reguliert (103). Sowohl Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen, dendritische Zellen und B- und T-Zellen, als auch Endothelzellen, Fibroblasten, Astrozyten und Epithelzellen können Il-6 sezernieren (103). Es beeinflusst die Differenzierung von Makrophagen aus Monozyten, wirkt sich chemotaktisch auf diese aus und regt die IgG-Sekretion aus B-Zellen an. Il-6 induziert die VEGF-Produktion aus Fibroblasten und hat somit auch einen Einfluss auf Endothelzellen und die Permeabilität von Gefäßen (103). Über diese gesteigerte Permeabilität, die Induktion von Akut-Phase-Proteinen und die chemotaktischen Reize von Il-6 wird wiederum die Immunantwort in betroffenen Geweben verbessert (103).

Das intermediäre Zytoskelettprotein GFAP, ein Astrozyten- und Gliazellmarker, wird in Astrozyten und Müllergliaendfüßchen exprimiert (104). GFAP war auf Protein- und mRNA-Ebene erhöht. In der immunhistochemischen Färbung zeigten sich GFAP-positive Zellen in Nervenfaserschicht und Choriokapillaris. Mithilfe der Glutaminsynthetasefärbung konnten die Streifen, die sich von Nervenfaserschicht bis hin zur *Lamina limitans interna* erstrecken, als aktivierte Müllerglia identifiziert werden. Eine Hochregulierung von GFAP erfolgt, wenn die Retina Stress wie bei Verletzungen, Netzhautablösung (104), Diabetes oder Hypoxie ausgesetzt wird. Dieser Anstieg erfolgt dann hauptsächlich in retinalen Müllerzellen und geht mit ihrer Hypertrophie einher, die als Gliosereaktion bezeichnet wird. Eine künstliche Verschlechterung der choroidalen Durchblutung durch zerebrale Manipulationen zeigte im Tierexperiment eine Erhöhung von GFAP in Müllerzellen (105). Die *Tgfbr2^{Δeye}*-Mäuse zeigten genau diese Ausdehnung der GFAP-Expression von den Müllerzellendfüßchen auf die gesamte aktivierte Müllerzelle. Auch TβRII wird auf Müllerzellen exprimiert (7). Die Müllerglia sind dadurch direkt von der Deletion des *Tgfbr2* betroffen. Zusätzlich sind die Müllerglia der Hypoxie durch die fehlgebildeten Gefäße und damit einem unphysiologischem Retinamilieu und immunologischen Faktoren ausgesetzt. Eine Gliosaereaktion der Müllerglia auf diese Veränderungen hin, ist zu erwarten gewesen.

IV. Zusammenfassung und Ausblick

Zur Versorgung der Netzhaut werden zwei Kapillarnetzwerke ausgebildet. Die retinalen Kapillaren versorgen die innere Netzhaut, während die Ernährung der Photorezeptoren über Kapillaren der Choroidea erfolgt. Proliferationen der Kapillaren sind Komplikationen bei der diabetischen Retinopathie oder der altersabhängigen Makula-Degeneration (AMD), zwei der häufigsten zur Erblindung und Sehverschlechterung führenden Krankheiten. Bei der diabetischen Retinopathie proliferieren retinale Kapillaren, während bei der feuchten Form der AMD choroidale Kapillaren in die Netzhaut hineinwachsen. Der jeweils zu Grunde liegende Pathomechanismus ist weitgehend ungeklärt. Allerdings deuten vorwiegend *in vitro* erhobene Daten darauf hin, dass die anti-angiogenetische Wirkung des Signalmoleküls Transforming Growth Factor- β (TGF- β) gestört ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es ein *in vivo* Model zu entwickeln und zu charakterisieren, welches die Überprüfung der Hypothese erlaubt, dass das Fehlen eines TGF- β Signals ursächlich für retinale bzw. choroidale Neovaskularisationen ist. Dazu sollten *Tgfbr2* ^{Δ eye} Mäuse generiert werden, bei denen der essentielle Typ 2 Rezeptor des TGF- β -Signalwegs im Auge konditionell bei neugeborenen Tieren deletiert wird. Die Deletion erfolgt über das Cre-LoxP-System mit einer Induktion der Cre-Rekombinase über einen Tamoxifen-induzierbaren Promotor. Das System wurde über ein Reportersystem validiert. Der Phänotyp der Augen wurde funduskopisch, fluoreszenzangiographisch, histologisch, transmissions-elektronenmikroskopisch, sowie molekularbiologisch untersucht.

Wir konnten zeigen, dass unser System die weitgehende Deletion des TGF- β -Typ 2 Rezeptors und damit des TGF- β Signals bei neugeborenen Tieren ermöglicht. Die betroffenen Tiere weisen Proliferationen der Netzhautgefäße in den Glaskörper auf, ein Befund, der zu Glaskörperblutungen und schließlich zur Netzhautablösung führt. An der retinal-choroidalen Grenzfläche wurden proliferierende choroidale Gefäße beobachtet, die in die Netzhaut einwachsen. Diese Befunde waren assoziiert mit Ablagerungen von basal-lamina-ähnlichem Material zwischen den Zellen des retinalen Pigmentepithels, mit einem Zellverlust des Epithels und einer Degeneration von Photorezeptoren. Die Rückbildung der fetal angelegten hyaloidalen Gefäße unterblieb.

Insgesamt zeigt der Phänotyp der von uns generierten Tiere große Ähnlichkeiten mit den pathologischen Veränderungen auf, wie sie bei der diabetischen Retinopathie bzw. der feuchten Form der AMD beobachtet werden. Damit wird die Hypothese unterstützt, dass TGF- β -Signale essentiell sind für die Aufrechterhaltung regelrechter retinaler und choroidaler Kapillaren, während eine Störung dieser Signale zu pathologischen Neovaskularisationen führt. Darüber hinaus konnten wir prinzipiell ein gentechnisches System entwickeln und validieren, dass die konditionelle und induzierbare Deletion von Molekülen im Auge neugeborener Mäuse erlaubt.

V. Material und Methoden**V.1. Materialien****V.1.1. Reagenzien**

Reagenz	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
6x Ladungsfarbe orange	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
10x NH₄ Reaktionspuffer Boline	Boline GmbH, Luckenwalde
10x PCR-Puffer	Qiagen, Hilden
100 bp DNA Leiter GeneRuler™	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Ammoniumperoxidsulfat (APS), 10% (m/v)	Roth, Karlsruhe
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf
Boline-Puffer	Boline USA Inc, Taunton
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Conjucaïn®EDO® Augentropfen	Dr. Mann Pharma und Bausch&Lomb, Berlin
Corneregel	Dr. Mann Pharma und Bausch&Lomb, Berlin
Corn Oil	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAPI	Vectashield; Vector Laboratories, Burlington, CA, USA
Depex	Serva Electrophoresis, Heidelberg
dNTPs	Qiagen, Hilden
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Epon	Ted Pella, Redding, USA
Fluorescein ALCON® 10%	Alcon Pharm, Freiburg

Reagenz	Bezugsquelle
Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-Dextran	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation, Hamburg
Fluoromount W Mounting Medium	Serva Electrophoresis Heidelberg
Glutaraldehyd 25%	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Glycin	Merck, Darmstadt
Hämalaunlösung	Roth, Karlsruhe
HCl 37%	Merck, Darmstadt
HRP Substrat Luminol Reagenz	Millipore Corporation, Billerica, USA
HRP Peroxidase Lösung	Millipore Corporation, Billerica, USA
Immobilon™ Western HRP Substrat	Millipore Corporation, Billerica, USA
Isofluran	Baxter Deutschland, Unterschleißheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ketamin	WDT, Garbsen
K₂S₂O₅, Kaliumdisulfit	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (25 mM)	Qiagen, Hilden
Mydriaticum Stulln® UD 0,4ml	Pharma Stulln, Stulln
NaCl 0,9%	Roth, Karlsruhe
NaCl 0,85%	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
1 N HCl	Merck, Darmstadt

Reagenz	Bezugsquelle
Paraffin Paraplast Plus	R. Langenbrinck, Emmedingen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
PAP-Pen Liquid Blocker	SCI Science Services, München
Perjodsäure	Merck, Darmstadt
Propylenoxid	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Rotiphorese®Gel 30	Roth, Karlsruhe
Schiff-Reagenz	Roth, Karlsruhe
Stickstoff flüssig	Linde AG
Succrose	Merck, Darmstadt
SYBR-Green I	Qiagen, Hilden
Tamoxifen-Pulver	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tergitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tissue-Tek®	Sakura, Zoeterwoude, NL
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Tris Ultrapure, MB Grade	Usb Corporation, Cleveland, USA
TRIzol® -Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasser Rotisolv (Rnase-frei)	Roth, Karlsruhe
Xylazin	Serumwerk Bernburg, Bernburg
Xylol	Merck, Darmstadt

Tabelle 1: Reagenzien

V.1.2. Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser 18x18mm, 24x40mm, 24x50mm	Menzel – Gläser, Braunschweig
Einmalspritzen 1ml	Henry Schein, New York
„Falcon“ Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Glaswaren	Schott, Roth, VWR
Kanülen	Henry Schein, Gillingham
Microseal[®] „B“ Film,	BioRad, München
Multi-Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml	Sarstedt, Nümbrecht
Omnifix sterile Einmalspritzen	Braun, Wertheim
Pasteurpipetten	VWR International, Darmstadt
Personna Rasierklingen	American Safety Razor Company, USA
Pipettenspitzen 20µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Polyvinylfluorid-(PVDF)-Membran	Roche, Mannheim
Rotiprotect-Latex Handschuhe	Roth, Karlsruhe
Safety-Multifly[®]Set	Sarstedt, Nümbrecht
Sterican Einmal-Injektions-Kanüle	Braun, Wertheim
SuperFrost[®] Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Nitril Handschuhe	VWR-International, Leuven
"Whatman"-3 MM Blotting Papiere	Neolab, Heidelberg
24-Well Platten	Sarstedt, Nümbrecht
96 well iCycler IQ PCR Plates	Biorad, München

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

V.1.3. Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Elektrophorese Netzgerät E835	Consort, Turnhout, Belgien
Gewebe – Infiltrationsautomat HMP 110	Microm International, Walldorf
Gießsystem	peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen
IDA Gel Documentation System	raytest GmbH, Straubenhardt
iQ5 Multicolor Real-time-PCR Detection System und iCycler	BioRad, München
LAS 3000 Intelligent Dark Box	Fujifilm, Düsseldorf
Mastercycler gradient, personal	Eppendorf, Hamburg
Memmert Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Gießen
Microm HM 500 OM Kryostat	Microm International, Walldorf
Micron III	Phoenix Research Laboratories, Inc
Microtom Reichert Jung Supercut 2050	Cambridge Instruments, Nußloch
Mikropipetten “pipetman”	Gilson Inc., Middleton, USA
Mikroskop Axio Imager Z1	Zeiss, Göttingen
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA
Electrophoresis System Model 45-101-i Class II	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Paraffin Ausgießstation MPS/P2	SLEE Medical, Mainz
Pipetman Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Power Gen 125 Homogenisators	Fisher Scientific, Schwerte
Power Shot G5 Digitalkamera	Canon, Krefeld

Gerät	Hersteller
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Semi-Dry-Blotter	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen
System V75 Autoklav	Systeme GmbH, Wetzlar
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tonolab Tonometer	iCare, Finland
Transilluminator UV-Lampe	HeroldLab, Wiesloch
Transmissionselektronenmikroskop	Zeiss, Göttingen
Ultramikrotom Reichert Jung Ultracut E	Cambridge Instruments GmbH, Nussloch
UV-Vis Spectrofotometer NanoDrop 2000c	Thermo Fischer Scientific GmbH, Schwerte
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Wärmeschrank	Memmert GmbH, Schwabach
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 3: Geräte

V.1.4. Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
BioTaq™ DNA Polymerase	Bioline GmbH, Luckenwalde
„iScript™ Reverse Transcriptase	BioRad, München
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Taq Polymerase	Eigenproduktion

Tabelle 4: Enzyme

V.1.5. Kits

Kits	Bezugsquelle
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	Promega, Madison, Wisconsin, USA
iScript cDNA Synthese Kit	BioRad, München
M.O.M.™ Kit	Vector Laboratories, Inc. Burlingame

Tabelle 5: Kits

V.1.6. Oligonukleotid-Primer

V.1.6.1. Oligonukleotid-Primer PCR

Primer	Spezies	Sequenz	Produkt	Gefloxt
mCrb-1-F1	mm	5'-gtgaagacagctacagttctgatc-3'	220 bp	-
mCrb-1-F2	mm	5'-gccctgtttgcatggaggaaactt-ggaagacagctacagttcttg-3'	244 bp	-
mCrb-1-R	mm	5'-gccccattgcacactgatgac-3'	244 bp, 220 bp	-
CRE 1 fw	mm	5'-atgcttctgtccgtttgccg-3'	260 bp	-
CRE 1 rev	mm	5'-cctgtttgcacgttcaccg-3'	260 bp	-
LacZRosa26 fw	mm	5'-atcctctgatggtcaggtc-3'	315 bp	-
LacZRosa26 rev	mm	5'-cgtggcctgattcattcc-3'	315 bp	-
m Tgfbr2 GT fwd	mm	5'-gcaggcatcaggaccagttgatcc-3'	711 bp	556 bp
m Tgfbr2 GT rev	mm	5'-agagtgaagccgtgtaggtgagcttg-3'	711 bp	556 bp

Tabelle 6: PCR-Primer

Alle PCR-Primer wurden von Invitrogen, Karlsruhe bezogen. Die Wildtypform des *Tgfbr2* befindet sich auf der Lauflänge von 711 bp, die mit LoxP-Sequenzen umfasste Gensequenz des *Tgfbr2* bei 556 bp.

V.1.6.2. Oligonukleotid-Primer quantitative Realtime RT-PCR

Primer	Spezies	Sequenz	Quelle
<i>m Angiopoietin-2</i>	mm	5'-cactgaccttcccaact-3' 5'-cccacgtccatgtcacagta-3'	Invitrogen
<i>m Caspase8</i>	mm	5'-ttgaacaatgagatccccaaa-3' 5'-ccatttctacaaaaattcaagcag-3'	Invitrogen
<i>m Ccl2</i>	mm	5'-catccacgtgttggtca-3' 5'-gatcatcttgctggtgaatgagt-3'	Invitrogen
<i>m Cd68</i>	mm	5'-ctctctaaggctacaggctgct-3' 5'-ctctctaaggctacaggctgct-3'	Invitrogen
<i>m Egr-1</i>	mm	5'-cctatgagcacctgaccaca-3' 5'-tcgtttggctgggataactc-3'	Invitrogen
<i>m Fgf-2</i>	mm	5'-cggctctactgcaagaacg-3' 5'-tgcttgagttgtagtttgacg-3'	Invitrogen
<i>m GAPDH</i> <i>Housekeeper</i>	mm	5'-tgtccgtcgtgatctgac-3' 5'-cctgcttcaccaccttctg-3'	Invitrogen
<i>m Gfap</i>	mm	5'-tcgagatgccacctacag-3' 5'-gtctgtacaggaatggtgatgc-3'	Invitrogen
<i>m GNB2L</i> <i>Housekeeper</i>	mm	5'-tctgcaagtacacggtccag-3' 5'-gagacgatgatagggtgctg-3'	Invitrogen
<i>m Hif1-α</i>	mm	5'-catgatggctcccttttca-3' 5'-gtcacctggttgctgcaata-3'	Metabion
<i>m Igf-1</i>	mm	5'-caaaagcagcccgtcta-3' 5'-tcgataggacggggact-3'	Invitrogen
<i>m Il-6</i>	mm	5'-gctaccaaactggatataatcagga-3' 5'-ccaggtagctatggtactccagaa-3'	Invitrogen
<i>m iNOS</i>	mm	5'-gggctgtcacggagatca-3' 5'-ccatgatggtcacattctgc-3'	Invitrogen
<i>m Pdgfb</i>	mm	5'-tcgagttgaaagctcatctc-3' 5'-gtcttgactcggcgatta-3'	Invitrogen
<i>m RPL32</i> <i>Housekeeper</i>	mm	5'-gctgccatctgttttacgg-3' 5'-tgactggtgctgatgaact-3'	Invitrogen
<i>m Tgfbr2 Ex2</i>	mm	5'-agaagccgcatgaagtctg-3' 5'-ggcaaaccgtctccagagta-3'	Invitrogen
<i>m Tnf-α</i>	mm	5'-tcttctcattctgcttggtg-3' 5'-ggtctgggcatagaactga-3'	Invitrogen
<i>m Vegf 120</i>	mm	5'-ggagagatgagcttctacagca-3' 5'-ctgaacaaggctcacagtcattt-3'	Invitrogen

Primer	Spezies	Sequenz	Quelle
<i>m Vegf 164</i>	mm	5'-ggagagatgagcttcctacagca-3' 5'-ccttgcttgctcacattttct-3'	Invitrogen

Tabelle 7: quantitative Realtime RT-PCR-Primer

V.1.7 Antikörper

Antigen	Primärantikörper	Sekundärantikörper
FGF 2	FGF-2 sc79 rabbit, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	chicken anti-rabbit, HRP konjugiert
GAPDH	GAPDH, HRP-konjugiert 1:10000 Cell Signaling Technology, Germany	-
GFAP	GFAP, 1:200, Signet Laboratories	chicken anti-rabbit AP konjugiert
HIF1-α	HIF1- α rabbit, 1:200	chicken anti-rabbit, HRP konjugiert
TβRII	TGF- β RII (C16): sc-220 rabbit, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	chicken anti-rabbit, HRP konjugiert

Tabelle 8: Antikörper für Western Blot Analyse

Antigen	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Tertiärantikörper
Collagen IV	Anti-Collagen, rabbit, 1:100 Chemicon	IV, Biotinylated goat-anti-rabbit-IgG 1:500, Vector Laboratories, Inc. Burlingame	Streptavidin Alexa 546 1:1000 Molecular Probes
Desmin	Anti-Desmin, mouse, 1:100 Dianova	M.O.M-Kit	Streptavidin Alexa 546 1:1000 Molecular Probes
Fibronektin	Anti-Fibronektin, rabbit, 1:50 Dako	biotinylated goat anti rabbit-IgG 1:500 Vector Laboratories, Inc. Burlingame	Streptavidin Alexa 488 1:1000 Molecular Probes
GFAP	Anti-GFAP, rabbit 1:1000, Dako	Streptavidin 1:1000, Molec. Probes	Alexa 488 -

Antigen	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Tertiärantikörper
Glutamin-synthetase (GS)	Anti-Glutamin-synthetase, rabbit, 1:500 Sigma	biotinylated goat anti rabbit-IgG 1:500 Vector Laboratories, Inc. Burlingame	Streptavidin Alexa 488 1:1000 Molecular Probes
Iba-1	Anti-Iba-1, rabbit, 1:1000 Wako	Cy TM -3conjugated anti-rabbit 1:2000 Jackson Immuno Research Lab	-
PLVAP	Anti-PLVAP, rat 1:50 Santa Cruz	Cy TM -3 conjugated anti-rat 1:2000 Jackson Immuno Research Lab	-
pSmad3	Anti-pSmad3, rabbit 1:20 Cell Signaling	Biotinylated goat-anti-rabbit-IgG 1:500, Vector Laboratories, Inc. Burlingame	Streptavidin Alexa 488 1:1000 Molecular Probes
Smooth-muscle-alpha-Aktin (smα-Aktin)	Anti-SMA, mouse 1:50 Dianova	M.O.M-Kit	Streptavidin Alexa 555 1:1000 Molecular Probes
TβRII	TGF- β RII (L-21): sc-400 rabbit, 1:20 Santa Cruz Biotechnologie	biotinylated goat anti rabbit-IgG 1:500 Vector Laboratories, Inc. Burlingame	Streptavidin Alexa 488 1:1000 Molecular Probes

Tabelle 9: Antikörper für immunhistochemische Färbungen

V.1.8. Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Herstellung
0,1 M NaPO₄-Puffer	Für 500 ml: 11,5 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ 38,5 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ 450 ml Aqua dest.
0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4	100 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O mit 0,2 M NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O auf pH7,4 auf 0,1 M mit H ₂ O verdünnen
6x Orange Loading Dye	7,5 g Ficoll 400 Orange G dye mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen
Blotto, 5 %	Milchpulver 0,1 M Phosphatpuffer
Natriumcitratpuffer pH 6	0,2 M Citronensäure 1 Teil 0,2 M Natriumcitrat 4 Teile
Natriumcacodylatpuffer	0,1 M Natriumcacodylatpuffer 0,1 M HCl auf pH 7,4
EM-Fixans	10 ml Paraformaldehyd 25 % 50 ml 0,2 M Cacodylatpuffer pH 7,6 30 ml Aqua bidest.
Epon-Stammlösung	45 g Glycid Ether-alle von Serva, Heidelberg- 30 g DDSA Härter 20 g MNA Härter 1,5 g DMP-30 Beschleuniger
HU-Puffer	25 ml 10 % SDS 10 ml 1 M TRIS pH 6,8 100 µl 0,5 M EDTA pH 8 750 µl β-Mercaptoethanol 24 g Harnstoff
IRN-Puffer	5 ml 1 M TRIS 4 ml 0,5 M EDTA 16,6 ml 3 M NaCl
LacZ-Wasch-Puffer	Für 500 ml: 1 ml 1 M MgCl ₂ 5 ml 1 % NaDC 5 ml 2 % Tergitol 489 ml 0,1 M NaPO ₄ -Puffer

Puffer/Lösung	Herstellung
LacZ-Fix	Für 50 ml: 48,4 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3 100 µl 1 M MgCl ₂ 1,0 ml 0,250 M EGTA pH 7,3 0,4 ml 25 % Glutaraldehyd
LacZ-Stain	Für 75 ml: 72,0 ml Wasch-Puffer 3,0 ml X-Gal (25 mg/ml in DMSO) 0,159 g K ₄ Fe(CN) ₆ ·3H ₂ O 0,123 g K ₃ Fe(CN) ₆
Osmiumferrocyanid	1 % Osmiumtetroxid 0,8 % Kaliumhexacyanoferrat (II)
1x PBS	8 g NaCl 2 g KCl 1,805 g Na ₂ HPO ₄ · x H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ 900 ml Aqua dest.
PFA-Lösung (4 %)	Paraformaldehyd 4 % 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4
Proteinase-K-Lysis-Puffer	50 mM KCL 10 mM Tris HCL (pH 8,3) 2 mM MgCl ₂ 0,1 mg/ml Gelatine 0,45 % Nonidet P-40 0,45 % Tween 20
Richardson Färbelösung	1:5 g 1 % Azur in 500 ml Aqua dest. 2:5 g Methylenblau in 500 ml 1 % Natriumtetraboratlösung 3: 1 Teil 1, 1 Teil 2 und 2 Teile Aqua dest.
SDS-Lösung, 10 % (w/v)	10 g SDS auf 100 ml Aqua dest. lösen
SDS-Probenpuffer, 4x	0,25 M Tris/HCl, pH 6,8 30 % Glycerin 8 % (w/v) SDS 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 0,3 M DTT oder 10 % β-Mercaptoethanol
SDS-PAGE-Laufpuffer, 10x	250 mM Tris/HCl 400 mM Glycin 1 % (w/v) SDS, auf 1l Aqua dest. lösen

Puffer/Lösung	Herstellung
Sulfitwasser	6g $K_2S_2O_5$ 600 ml Aqua dest 60 ml 1 NHCl
TBE-Puffer, 1x	9 l Aqua bidest. 1 l 10x TBE-Puffer
1x TBS	Tris Base 12,114 g NaCl 43,83 g Aqua dest.
TBST, 1x	100 ml 10x TBS 0,05 % (v/v) Tween 20 auf 1 l Aqua dest. lösen
Transferpuffer, 10x	5,8 g Tris 2,9 g Glycin 200 ml Methanol 3,7 ml 10 % (w/v) SDS auf 1 l Aqua dest. lösen
Tris/HCl, 1,0 M, pH 6,8	121,14g Tris in Aqua dest. lösen pH einstellen auf 1 l
Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8	181,71 g Tris in Aqua dest. lösen pH einstellen auf 1 l

Tabelle 10: Puffer und Lösungen

V.1.9. Gele

Reagenz	Sammelgel	Trenngel 10 %
Aqua dest.	0,68	1,9
Rotiphorese®Gel 30	0,17	1,7
Tris/HCl 1M, pH 6,8	0,13	-
Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8	-	1,3
10 % SDS	0,01	0,05
10 % APS	0,01	0,05
TEMED	0,001	0,001

Tabelle 11: SDS-PAGE-Gele, Angaben in ml

Reagenz	Menge	Verarbeitung
Agarose	1 g	
1x TBE	100 ml	Agarose und 1x TBE-Puffer mischen, 5 min aufkochen und abkühlen
EtBr	3 µl	Zugeben und mischen, in Gelschlitten gießen, Gelkämme einstecken und 20 Minuten aushärten lassen

Tabelle 12: Agarosegel 1%

V.1.10. Versuchstiere**IV.1.10.1. Tierhaltung**

Die Tiere wurden im Tierstall der NWF III der Universität Regensburg unter Standardbedingungen gehalten. Die Temperatur betrug $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, die relative Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 5\%$. Den Tieren stand unbegrenzt Futter und Wasser zur Verfügung. Es wurde ein zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus simuliert.

V.1.10.2. Tiere

Folgende Tiere wurden für *in vivo* Versuche verwendet:

Linie	Genetischer Hintergrund	Veränderungen
CAG-Cre	C57BL/6J (106)	pCAGGCre-ER TM (44)
Tgfbr2 ^(fl/fl)	BL/6	Exon2 des Tgfbr2 Gens mit loxP Sites flankiert (39)
Rosa26R-LacZ	C57BL/6J (48)	Rosa26 Promoter mit loxP Sites flankiert (47)

Tabelle 13: Versuchstiere

V.2. Methoden

V.2.1 Molekularbiologie

V.2.1.1. DNA-Isolation aus Mausschwänzen

Um die Versuchstiere zu genotypisieren wurde ihnen ein 5mm langes Stück des Schwanzes abgetrennt. Dieses wurde über Nacht in einer Mischung aus 200 µl Proteinase-K-Lysis-Puffer pro Mausschwanz und 10 µl Proteinase K bei 55°C und 1200 rpm im Thermomixer inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K bei 95°C für 15 Minuten im Thermomixer. Der Ansatz wurde bei 13200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die DNA-Konzentration aus dem Überstand wurde anschließend fotometrisch bestimmt.

V.2.1.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Reinheit und DNA-Konzentration der lysierten Gewebe zu bestimmen, wurden diese mit dem UV-Vis Spectrofotometer NanoDrop fotometrisch vermessen. Das Verhältnis der Absorption bei 260nm für DNA und 280nm für Proteine zeigt die Reinheit der Proben. Ergab der Wert des Quotienten $A_{260}/280 \geq 1,8$, so wurden die Proben verwendet.

V.2.1.3. DNA-Fällung aus Proteinase-K-Lyse-Puffer-Gemisch

War die Reinheit nicht ausreichend, wurde die DNA gefällt. Dafür wurden 150 µl Lyse-DNA-Gemisch mit 150µl IRN-Puffer und 375µl 100 prozentigem Ethanol gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren bei 14000 rpm und 4°C konnte der Überstand verworfen und das Pellet mit 100 µl Wasser resuspendiert werden.

V.2.1.4. Genotypisierung der Versuchstiere mittels PCR

Die Genotypisierung der Versuchstiere erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion. Es wurden 0,5 µl der gewonnenen DNA zu 24,5 µl Mastermix gegeben. Der Mastermix bestand aus:

Substanz	Menge in µl
Wasser, Rnase-frei	18,5
10xPuffer	2,5
Primer forward, 1:10	0,5
Primer reverse, 1:10	0,5

Substanz	Menge in μl (Fortsetzung)
dNTPs 10mM	0,5
Taq-Polymerase	0,5
MgCl ₂	1,5

Tabelle 14: Mastermix PCR

Je nach Genotyp des Versuchstiers wurden die entsprechenden Primer verwendet. Die LacZ PCR wurde mit BioTaq™ DNA Polymerase durchgeführt. Das fertige Mastermix/DNA-Gemisch wurde gevortext und abzentrifugiert. Die Amplifikation im Thermocycler wurde je nach Genotyp bei folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	CAG-Cre	Rosa-LacZ	Tgfr2
1.	96°C - 2 Minuten	94°C - 3 Minuten	95°C - 3 Minuten
2. Denaturierung	94°C - 30 Sekunden	94°C - 30 Sekunden	95°C - 30 Sekunde
3. Annealing	57°C - 30 Sekunde	60°C - 30 Sekunde	61°C - 1 Minute
4. Elongation	72°C - 1 Minute	72°C - 35 Sekunde	72°C - 1 Minute
5. Wdh. 2. - 4.	35x	34x	35x
6.	72°C - 2 Minuten	72°C - 5 Minuten	72°C - 5 Minuten
7.	10°C - ∞	10°C - ∞	10°C - ∞

Tabelle 15: PCR-Programme

Es wurde für jede PCR je eine Negativ- und eine Positivkontrolle durchgeführt, um sicherzustellen, dass es sich bei den auftretenden Banden um spezifische Signale handelt.

V.2.1.5. Gelelektrophorese zum Nachweis eines PCR-Produktes

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Die PCR-Probe wurde mit 3,5 μl 6x Orange Loading Dye gemischt und kurz abzentrifugiert. Der Gelschlitten kam in die mit 1x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer und die Taschen des zuvor gegossenen 1 % Agarosegels wurden mit je 10 μl Proben-6x-Orange-Loading-Dye-Gemisch beladen. Zum Laufhöhenvergleich wurde eine Geltasche mit einer 100 bp Leiter beladen. Im Model 45-101-i Class II Electrophoresis System wurde die DNA bei 120 V, 500 mA, 150 W für 45 Minuten aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte mit IDA Gel Documentation Systems. Die

Genotypen wurden mittels Laufhöhe der Banden im Vergleich zur Standardbasenpaarleiter gezeigt. Für ein Tier mit pCAGGCre-ERTM-Mutation lag die Bande bei 526bp, bei einem geflochten *Tgfbr2* Gen bei 711bp, bei einem ungeflochten *Tgfbr2* Gen bei 556bp und bei einem Rosa26R-LacZ-Mutation tragenden Tier bei 315bp.

V.2.1.6. RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus Mausgewebe erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (107). Mithilfe von TRIzol[®] wurden die Zellen aufgeschlossen. Folgende Schritte wurden angewandt:

RNA Isolation mit TRIzol [®] -Reagenz
Gewebestück und 500 µl TRIzol [®] -Reagenz in ein Reaktionsgefäß geben
Lysieren der Strukturen mit dem Power Gen 125 Homogenisator
Zugabe von 200 µl Chlorophorm pro ml TRIzol [®] -Reagenz, vortexen
20 Minuten auf Eis inkubieren
20 Minuten bei 14000 rpm und 4 ° C zentrifugieren,
Wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen, Aufbewahrung der restlichen Phasen für Proteinisolation bei -20°C
1:1 Zugabe von Isopropanol, vortexen, über Nacht bei -20°C lagern, Ausfällung der RNA
20 Minuten bei 14000 rpm und 4 ° C zentrifugieren, Überstand verwerfen
Pellet in 500 µl 70 % Ethanol aufnehmen, vortexen
5 Minuten bei 14000 rpm und 4 ° C zentrifugieren, Überstand verwerfen
Lösen des Pellets in 10 - 20 µl RNase-freiem Wasser
Lagerung bei – 80°C

Tabelle 16: RNA-Isolierung

V.2.1.7. Proteinisolierung

Die Isolierung der Proteine erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi im Anschluss an das oben beschriebene Schema der RNA-Isolierung (107). Die isolierten Proteine wurden bei -20°C eingefroren und bei -80°C gelagert. Folgendes Schema wurde angewandt:

Proteinextraktion nach RNA-Isolation mit TRIzol® aus Inter- und Phenol-Chloroform-Phase
Zum Abtrennen der DNA 300 µl 100 % Ethanol pro ml TRIzol® zugeben, vortexen
3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
5 Minuten bei 2000g und 4 °C zentrifugieren
Pellet enthält DNA, verwerfen
Zugabe von 1,5 ml Isopropanol pro ml TRIzol® zum Überstand, vortexen
10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
10 Minuten bei 12000g und 4 °C zentrifugieren,
Überstand verwerfen
3x Pellet waschen:
20 Minuten bei Raumtemperatur in 2 ml Waschpuffer pro ml TRIzol® inkubieren,
5 Minuten bei 7600 g und 4°C zentrifugieren und Überstand verwerfen
Pellet in 2 ml 95 % Ethanol pro ml TRIzol® lösen und vortexen
20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
5 Minuten bei 7600g und 4 °C zentrifugieren
Pellet trocknen lassen
Pellet in 150 µl HU-Puffer aufnehmen
15 Minuten bei 65 °C abkochen und zentrifugieren

Tabelle 17: Proteinisolierung

V.2.1.8. Western Blot Analyse

Der Nachweis der *Tgfr2* Deletion auf Proteinebene erfolgte durch die Western Blot Analyse. Auch andere Proteine wie FGF-2, GAPDH, GFAP und HIF1- α wurden analysiert. Die nach der weiter oben beschriebenen Methode gewonnenen Proteine wurden mithilfe eines SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt. SDS hatte die Aufgabe, die Proteinproben zu denaturieren und sorgte für eine einheitliche negative Ladung. So werden die Proteine im elektrischen Feld spezifisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zur Herstellung dieses Gels wurde zunächst ein zehnprozentiges Trenngel in ein Gießsystem gefüllt und bis zur Aushärtung mit 200 μ l Isopropanol abgedeckt. Auf das polymerisierte Trenngel wurde dann das Sammelgel gegeben und darin ein Plastikkamm versenkt, um Taschen für die Proben herzustellen. Im Sammelgel dieses zweiphasigen Gels konnten nun aufgrund seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften Proteine angereichert werden. Die Auftrennung der Proteine sowie von 5 μ l Proteinmolekulargewichtsmarker fand im Trenngel nach der Größe statt. Nach Einsetzen des Gels in die Elektrophoresekammer und Auffüllen des Puffertanks mit 1x Laufpuffer konnten die Proteine in die Geltaschen eingefüllt werden: Geräteeinstellung 20 mA, 90 Minuten.

Zur Weiterverwendung wurden die Proteine mittels Semidry Elektroblothing im Semi-Dry-Blotter vom Trenngel auf eine PVDF-Membran überführt: Geräteeinstellung 25 V, 90 Minuten. Hierbei wanderten die Proteine die durch das SDS eine negative Ladung besaßen, Richtung Anode und somit auf die Membran. Vorbereitend wurde die PVDF-Membran zuerst in Methanol eingelegt und dann eine Minute in Aqua dest. geschüttelt. Whatman-Papiere und PVDF-Membran wurden mit Transferpuffer angefeuchtet. Die Apparatur wurde nach folgendem Schema aufgebaut:

Aufbau des Semy-Dry-Blotters
Kathode (-)
Whatman-Papier (3 Lagen)
Trenngel mit Proteinen
PVDF-Membran
Whatman-Papier (2 Lagen)
Anode (+)

Tabelle 18: Aufbau des Semy-Dry-Bloters

Der Nachweis der Proteine auf der PVDF-Membran erfolgte nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip. Ein Primärantikörper bindet spezifisch an das gesuchte Protein und bildet mit diesem Komplexe. Ein zweiter Antikörper, der mit einer Meerrettich-Peroxidase HRP (engl.:

horseradish-peroxidase) gekoppelt ist, bindet wiederum an den primären Antikörper. Die Meerrettich-Peroxidase kann die Chemilumineszenzreaktion des Luminols katalysieren und wandelt es dabei in seine oxidierte Form um. Die Substanzen wurden zusammen mit der PVDF-Membran in einen Falcon gegeben und unter Rotation inkubiert. Die nachfolgende Tabelle zeigt das Vorgehen für den Proteinnachweis nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip:

Substanz	Zeit
Blotto 5 % oder BSA 5 % Blockierung	1 Stunde bei Raumtemperatur
Primärantikörper	Inkubation bei 4°C über Nacht
TBST	3x 10 Minuten spülen
sekundärer Antikörper	1 Stunde bei Raumtemperatur
TBST	3x 10 Minuten spülen

Tabelle 19: Behandlung der PVDF-Membran für den Proteinnachweis

Nach diesen Schritten wurde 1 ml HRP Substrate Luminol Reagenz und HRP Peroxidase Lösung (1:1 gemischt) auf die Membran gegeben und zur Inkubation für 5 Minuten in eine Folie gelegt. Mit der LAS 3000 Intelligent Dark Box konnte das Chemilumineszenz-Signal detektiert und verarbeitet werden. Zur Quantifizierung der Signale wurden diese in Graustufen umgewandelt und mit der Software Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06 analysiert. Folgende Proteine wurden im Western Blot nachgewiesen: FGF-2, GAPDH, GFAP, HIF1- α und T β RII (s.o.). Als Blockierlösung wurde Blotto 5 % für den Nachweis von GAPDH, GFAP und T β RII verwendet. Für FGF-2 und HIF1- α Western Blot Analysen diente BSA 5 % als Blockierlösung.

V.2.1.9 Quantitative Realtime RT-PCR zur Bestimmung der relativen mRNA Expression

Um RNA quantifizieren zu können wurde die quantitative Realtime RT-Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Da RNA instabiler als DNA ist, wurde sie zuvor in cDNA umgewandelt. Dies geschah mithilfe der „iScript“ reversen Transkriptase. Die so gewonnene cDNA ließ sich mittels PCR ermitteln. Die Herstellung der cDNA wurde mit oligo-dT-Primern und dem „iScript cDNA Synthese Kit“ durchgeführt. Folgende Ansätze wurden verwendet:

Ansatz für RNA-Probe (+RT):	Ansatz zur Reinheitskontrolle (-RT):
1µg RNA in 15 µL Nuklease-freiem Wasser	1µg RNA in 20 µL Nuclease-freiem Wasser
4µL „5x iScript™ Reaction Mix“	
1µL „iScript™ Reverse Transcriptase	

Tabelle 20: cDNA Ansatz

Die cDNA Herstellung geschah bei folgendem Programm im Thermocycler:

Prorgamm zur Herstellung von cDNA	
1.	25°C - 5 Minuten
2.	42°C - 30 Minuten
3.	85°C - 5 Minuten
4.	4°C - ∞ Lagerung bei -20°

Tabelle 21: Programm zur cDNA Herstellung

Mithilfe der quantitativen Realtime RT-PCR war es möglich, die relative Genexpression über Quantifizierung von mRNA zu ermitteln. Die Amplifizierung der hierfür zuvor gewonnenen cDNA erfolgte im iQ5 Multicolor Realtime-PCR Detection System. Um die PCR Produkte im Nachhinein vergleichbar zu machen, wurde ein Housekeeper mitamplifiziert. Als Housekeeper wurden GAPDH, RPL32 und GNB2I getestet. Nach statistischer Auswertung wurde RPL32 als Housekeeper verwendet, auf den alle untersuchten Gene normiert wurden. Die cDNA-Proben wurden in dreifacher Ausführung mit reverser Transkriptase und als Minuskontrolle ohne reverse Transkriptase amplifiziert. Um Verunreinigungen auszuschließen wurde pro Gen eine Wasserkontrolle mit RNase-freiem Wasser mitanalysiert. 0,15 µl jeder Probe wurden mit einem speziellen Master-Mix auf 10 µl Volumen gebracht und anschließend in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit 5 µl Primer gemischt. Die spezifischen Primer wurden jeweils in den Master-Mix/Proben Ansatz mit, bzw. ohne reverse Transkriptase und dem Ansatz mit RNase-freiem Wasser gegeben. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green I detektiert. SYBR-Green I macht doppelsträngige DNA sichtbar, indem blaues Licht der Wellenlänge 494 nm absorbiert und grünes Licht der Wellenlänge 521 nm emittiert wird. Master-Mix und Primermix wurden folgendermaßen hergestellt:

Substanz	Menge in μl
Probe (+RT, -RT oder RNase-freies Wasser)	0,15
10 x PCR-Puffer	1,5
MgCl ₂ (25 mM)	0,6
dNTPs	0,12
Taq DNA Polymerase (5 U/ μL)	0,06
SYBR-Green I (7,4 % (v/v) in DMSO)	0,19
Fluorescein	0,015
RNase-freies Wasser	7,37

Tabelle 22: Mastermix quantitative Realtime RT-PCR

Substanz	Menge in μl
forward Primer (1 μM)	0,17
reverse Primer (1 μM)	0,17
RNase-freies Wasser	4,66

Tabelle 23: Primeransatz quantitative Realtime RT-PCR

Die 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden mit Microsealfolie verschlossen, abzentrifugiert und in das Gerät eingesetzt. Die PCR lief mit folgendem Programm:

Real-Time PCR-Programm		
1.		95°C - 15 Minuten
2.	40 x	95°C - 10 Sekunden; 60°C- 40 Sekunden
3.		95°C - 1 Minuten
4.		55°C - 1 Minuten
5.	81 x	55°C + 0,5°C je Zyklus (für Schmelzkurve) – 6 Sekunden

Tabelle 24: Real-Time qPCR Programm

Mit der iQ Optical System Software Version 2.0 wurden Daten erhoben und die relative Expression nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet (108).

V.2.2 Einbettung von Präparaten und Herstellung von histologischen Schnitten

V.2.2.1. LacZ-Färbung (β -Galactosidase) und Paraffineinbettung

Zur Herstellung von β -Galactosidase-Paraffinpräparaten wurden Tiere mit dem Genotyp pCAGGCre-ERTM;Rosa26R-LacZ verwendet. Um ideale Bedingungen für die Paraffinschnitte zu schaffen, wurden die Tiere mit LacZ-Fixans perfusionsfixiert. Hierfür wurden die Tiere mit 1,5 IE Ketamin/Xylazine (0,2 ml 2 % Xylazin, 0,6 ml 10 % Ketamin) narkotisiert. Wenn kein Schmerzreiz mehr auslösbar war, wurde die Bauchhöhle eröffnet, Diaphragma und Rippen durchtrennt und die linke Herzkammer mit einer Kanüle penetriert. Es wurden zuerst 5 ml Phosphatpuffer 0,1 M, dann 5 ml Lac-Z-Fixans injiziert. Über einen Entlastungsschnitt der Mesenterialgefäße konnte das Blut abfließen. Die Augen wurden anschließend aus der Augenhöhle entfernt.

Für die β -Galactosidasefärbung fixierten die Augen für 30 Minuten in LacZ-Fixans. Anschließend wurden sie dreimal 5 bis 10 Minuten lang in LacZ-Wasch-Puffer gewaschen und über Nacht bei 37°C in LacZ-Färbelösung aufbewahrt. Sie konnten nach erneut dreimaligem waschen für 5 bis 10 Minuten in LacZ-Wasch-Puffer in 0,1 molaren Phosphatpuffer überführt werden. In der LacZ-Färbelösung ist 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) enthalten. Es ist Substrat für die β -Galactosidase und wird von dieser in Galaktose und ein Indigo-Derivat gespalten. Zellen in denen die β -Galactosidase diese Reaktion katalysiert, sind nach der LacZ-Färbung blau (49, 50).

Zur Einbettung in Paraffin mussten die Augen je eine Stunde in 50 % Isopropanol, 1 Stunde in 70 % Isopropanol und über Nacht noch einmal in neuen 70 %igen Isopropanol gelagert werden. Die Einbettung im Gewebe-Infiltrationsautomat HMP 110 erfolgte nach folgenden Einstellungen:

Substanz	Konzentration	Zeit
Isopropanol	70 %	1 Stunde
Isopropanol	80 %	1 Stunde
Isopropanol I	96 %	1 Stunde
Isopropanol II	96 %	2 Stunden
Isopropanol I	100 %	1 Stunde
Isopropanol II	100 %	1 Stunde
Isopropanol III	100 %	2 Stunden
Xylol I		1 Stunde

Substanz	Konzentration	Zeit (Fortsetzung)
Xylol II		1.5 Stunden
Paraffin I		2 Stunden
Paraffin II		8 Stunden

Tabelle 25: Schema zur Einbettung von Präparaten in Paraffin

Mit der Paraffinausgießstation MPS/P2 sind die Augen eingebettet und in Haltevorrichtungen für das Microtom Reichert Jung Supercut 2050 gegeben worden. Sie wurden in 6 µm dicke Schnitte geschnitten. Der Transfer auf SuperFrostPlus Objektträger erfolgte über ein Wasserbad. Nachdem trocken der Schnitte wurden diese entparaffiniert und in Vectashield Mounting Medium eingebettet.

Zur Weiterverarbeitung von Paraffinschnitten für immunhistochemische Färbungen wurden die Schnitte nach folgendem Schema entparaffiniert:

Substanz	Konzentration	Zeit
Xylol I		10 Minuten
Xylol II		10 Minuten
Isopropanol I	100 %	10 Minuten
Isopropanol II	100 %	10 Minuten
Isopropanol	96 %	5 Minuten je 2x
Isopropanol	80 %	5 Minuten je 2x
Isopropanol	70 %	5 Minuten

Tabelle 26: Schema zu Entparaffinierung

V.2.2.2. Herstellung von Eponschnitten

Zur Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten wurden die Tiere wie oben beschrieben fixiert (siehe V.2.2.1). Allerdings wurden 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer und 5 ml einer Mischung aus 1 ml Glutaraldehyd und 9 ml EM-Fixans anstatt des LacZ-Fixans verwendet. Die Präparate wurden mit einer modifizierter Fixierung nach Ito und Karnovsky immersionsfixiert (2,5 % Paraformaldehyd, 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer) (109). Um eine bessere Fixierung zu erreichen, erfolgte nach einer Stunde eine Eröffnung der Cornea. Nach

mindestens zwölfstündiger Fixierung der Augen oder Sehnerven folgten vier Spülschritte à 20 Minuten mit 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) und die Nachfixierung in 1 % Osmiumferrocyanid. Dann wurde das Osmium mit Aqua bidest. ausgewaschen und die Entwässerung erfolgte anschließend in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70 %, 80 %, 90 %, 100 %). Im Einbettautomat wurde die Einbettung in Epon über Propylenoxid nach Standardmethoden durchgeführt:

Eponeinbettung	
Propylenoxid	2x 20 Minuten
Propylenoxid / Epon 2:1	120 Minuten
Propylenoxid / Epon 1:1	120 Minuten
Propylenoxid / Epon 1:2	120 Minuten
Epon	über Nacht

Tabelle 27: Schema zur Einbettung von Präparaten in Epon

Die Aushärtung erfolgte für 24 Stunden bei 60°C im Brutschrank. Schnitte wurden mit dem Reichert Jung Ultracut E Mikrotom hergestellt. Für Semidünnschnitte wurde eine Schichtdicke von 1 µm, für Ultradünnschnitte von 50nm gewählt und eine Färbung nach Richardson durchgeführt (110). Aufnahmen der Schnitte wurden mit dem Lichtmikroskop Axio Imager Z1 gemacht, elektronenmikroskopische Aufnahmen mit dem Transmissions-elektronenmikroskop.

V.2.2.3. Dextranperfusion und Herstellung von Kryoschnitten

Zur Herstellung von dextranperfundierten Retinaflachpräparaten und Kryomeridionalschnitten wurden Tiere mit dem Genotyp *Tgfb²^{Aeye}* verwendet. Die Tiere wurden mit 1,5 IE Ketamin/Xylazin (0,2 ml 2 % Xylazin, 0,6 ml 10 % Ketamin) narkotisiert. Konnte kein Schmerzreiz mehr auslöst werden, wurde die Bauchhöhle eröffnet, Diaphragma und Rippen durchtrennt und die linke Herzkammer mit Safety-Multifly®Set penetriert. Über einen Entlastungsschnitt der Mesenterialgefäße konnte das Blut abfließen. Es wurden je nach Größe der Tiere 0,8 IE bis 1 IE Fluorescein Isothiocyanate-Dextran infundiert. Die Augen wurden anschließend aus den *Orbitae* entfernt. Für Retinaflachpräparate wurden die Augen zwei Stunden lang in 4 % PFA fixiert und anschließend dreimal fünf Minuten lang in 0,1 M Phosphatpuffer gespült. Danach konnten die Präparate auf einen Objektträger aufgebracht, mit einem Tropfen Mounting Medium und einem Deckglas eingedeckelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

Zur Herstellung von Kryoschnitten wurden die Augen dextranperfundierter Tieren nach Eucleation für vier Stunden in 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Augen drei mal fünf Minuten lang in 0,1 M Phosphatpuffer gespült. Die Präparate, die für immunhistochemische Färbungen vorgesehen waren, wurden für vier Stunden lang in Methyl-Carnoy Lösung (10 % Eisessig, 60 % Methanol, 30 % Chloroform) fixiert, je 30 Minuten in 50 % und 25 % Methanol inkubiert und in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Zur Vorbereitung wurden die Präparate für die Kryoschnitte und immunhistochemischen Färbungen je vier Stunden in 10, 20 und 30 % Succrose- 0,1 M Phosphatpufferlösung fixiert, in eine Halteapperratur mit Tissue-Tek® überführt und mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Präparate wurden auf Metallblöcke gefroren, am Microm HM 500 OM Kryostat in 12 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträger überführt. Für immunhistochemische Färbungen wurde die Trägersubstanz Tissue-Tek® mit Phosphatpuffer ausgewaschen, die Präparate mit einem hydrophoben PAP-Stift abgegrenzt, danach wurde mit ihnen - je nach Färbung, wie unten beschrieben - weiter verfahren. Nach der Färbung konnten die Objekte mit 1:10 DAPI:Mounting Medium eingedeckelt werden. Zur Herstellung von Dextranskryomeridionalschnitten wurden die auf Objektträger aufgebrachten Schnitte für fünf Minuten lang in 0,1 m Phosphatpuffer gespült und anschließend mit Mounting Medium eingedeckelt.

V.2.2.4. Immunhistochemische Färbungen

Durch immunhistochemische Färbungen können verschiedene Zellbestandteile unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Um ein bestimmtes Protein zu markieren, wird ein spezifischer Primärantikörper eingesetzt, der an dieses Protein bindet. Der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte sekundäre Antikörper bindet an den primären Antikörper. Um eine Signalverstärkung zu erreichen, kann zwischen primärem Antikörper und fluoreszenzmarkiertem Antikörper ein weiterer biotinylierter Antikörper eingesetzt werden. Werden die Fluoreszenzfarbstoffe mit Licht passender Wellenlänge angeregt, emittiert der an den sekundären Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff Licht einer bestimmten Wellenlänge, die als Fluoreszenz detektiert werden kann. Rote Fluoreszenz kann durch die Verwendung von Streptavidin Alexa 555 gekoppelten oder CyTM-3 konjugierten Antikörpern bei Beleuchtung mit Licht der Wellenlänge 555 nm erhalten werden, grüne Fluoreszenz durch Beleuchtung von Streptavidin Alexa 488 bei 488 nm. Zellkerne können mittels DNA Markierung durch DAPI bei einer Wellenlänge von 381 nm zu blauem Licht angeregt werden. Dabei legt sich das 4',6-Diamidin-2-phenylindol an AT-haltige Sequenzen der DNA an (111). Betrachtung und Aufnahme erfolgten am Fluoreszenzmikroskop.

Immunhistochemische Färbungen wurden an Paraffin- und Kryomeridionalschnitten durchgeführt. Für Färbungen mittels TβRII-Antikörper wurden Paraffinmeridionalschnitte in Aqua dest. gewaschen und zwei mal sechs Minuten in kochendem Citratpuffer inkubiert. Für die pSmad3 immunhistochemische Färbung wurde die in gleicher Art und Weise durchgeführt, als Puffer diente hier aber 1x TBS statt Phosphatpuffer. Die Färbungen für

MATERIAL UND METHODEN

Desmin, $\text{sm}\alpha$ -Aktin, PLVAP und IBA-1 wurden an Kryoschnitten, die Färbungen für Collagen IV, Fibronectin, GFAP und Glutaminsynthetase an Paraffinschnitten durchgeführt. Zur Fibronectin- und Collagen-IV-Färbung wurden die Paraffinschnitte für je 5 Minuten mit Tris-HCL und Proteinase K und für 30 Minuten mit 0,1 M HCl vorbehandelt. Da die primären Antikörper gegen Desmin und $\text{sm}\alpha$ -Aktin aus der Maus stammen, wurden diese Färbungen über das M.O.M.-Kit durchgeführt.

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten nach diesem Schema:

Schritt	Reagenz	Zeit
1. Waschen	0,1 M Phosphatpuffer oder 1x TBS	5 Minuten
2. Blockierung	Siehe Tabelle unten	45-60 Minuten
3. 1° AK	Siehe Tabelle "Antikörper"	Über Nacht, 4°C
4. Waschen	0,1M Phosphatpuffer oder 1x TBS	3x 5 Minuten
5. 2° AK	Siehe Tabelle "Antikörper"	60 Minuten
6. Waschen	0,1M Phosphatpuffer oder 1x TBS	3x 5 Minuten
7. evtl. 3° AK	Siehe Tabelle "Antikörper"	60 Minuten
8. evtl. Waschen	0,1M Phosphatpuffer oder 1x TBS	3x 5 Minuten
7./ 9. Eindeckeln	1:10 DAPI: Vectashield Mounting Medium	

Tabelle 28: Schema für immunhistochemische Färbungen

Färbung	Blockierung
<i>Tgfbr2</i>	2 %BSA/ 0,2 % CWFG/ 0,1 M Phosphatpuffer
pSmad3	2 %BSA/ 0,2 % CWFG/ 0,1 M 1x TBS
PLVAP	1 %BSA/ 0,2 % CWFG/ 0,1 % Triton
IBA-1	2 % BSA/ 2 % DK/0,1 M Phosphatpuffer
Desmin, $\text{sm}\alpha$ -Aktin	M.O.M.-Kit
Collagen IV, Fibronectin	2 % BSA/0,1 M Phosphatpuffer
GFAP, Glutaminsynthetase	3 % BSA/0.1 % Triton/ 0,1 M Phosphatpuffer

Tabelle 29: Blockierlösungen für immunhistochemische Färbungen

V.2.2.5. TUNEL-Reaktion

Wird in einer Zelle Apoptose ausgelöst, wird DNA aus dem Zellkern freigesetzt. Diese kann mit Hilfe des DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System detektiert werden. Hierbei werden die DNA-Fragmente am 3'-OH Ende vom Enzym Terminal Deoxynucleotidyl Transferase mit einem fluoreszenzmarkierten Nukleotid versehen. Dieses Fluorescein-12-dUTP kann unter dem Fluoreszenzmikroskop im GFP-Kanal sichtbar gemacht werden. Da die TUNEL-Färbung an Paraffin-Schnitten durchgeführt wird, müssen diese entparaffiniert werden (siehe V.2.2.1). Nach dem letzten Schritt der Entparaffinierung folgt ein fünfminütiger Spülschritt in 50 % Isopropanol mit anschließendem, ebenfalls fünf Minuten dauerndem Waschschritt in Aqua bidest..

Schritt	Reagenz	Zeit
1.	0,85 % NaCl	5 Minuten
2., 3.	1x PBS	2 x 5 Minuten
4.	4 % PFA	15 Minuten
5., 6.	1x PBS	2 x 5 Minuten
7.	Proteinase K (1:500 in 1x PBS)	8 Minuten
8, 9.	1x PBS	2 x 5 Minuten
10.	4 % PFA	5 Minuten
11., 12.	1x PBS	2 x 5 Minuten
13.	Equilibration buffer	10 Minuten
14.	rTdT-Inkubation bei 37°C (22,5 µl Equilibration buffer + 2,5 µl Nukleotide Mix + 0,5 µl rTdT pro Schnitt)	60 Minuten
15.	2x SSC	15 Minuten
16., 17.	1x PBS	2 x 5 Minuten

Tabelle 30: TUNEL-Färbung

V.2.2.6. Sehnervenzählung und Dickenvermessung

Die Anzahl der Axone pro Querschnitt durch den *N. Opticus* wurde an mit Paraphenyldiamin gefärbten Semidünnschnitten gezählt. Hierfür wurden Aufnahmen der Sehnerven mit dem Programm Axiovision erstellt und mithilfe des ImageJ Cell Counter ausgezählt. Die Dicke der inneren und äußeren Körnerschicht wurde an Semidünnschnitten

in der nasal-temporalen Ebene, an mehreren Messpunkten gemessen. Hierfür wurde die Fläche zwischen *Ora serrata* und Sehnervenkopf in zehn Abschnitte geteilt und an den so entstandenen Messpunkten die Dicke bestimmt.

V.3. Augeninnendruckmessung

Um den Augeninnendruck zu messen, wurden die Mäuse mit 0,03 IE Ketamin/Xylazine i.p. (0,2 ml 2 % Xylazin, 0,6 ml 10 % Ketamin) narkotisiert und die Augen mit Conjucaïn-Augentropfen (Wirkstoff: Oxybuprocainhydrochlorid) lokal betäubt. Direkt vor der Augeninnendruckmessung wurde der Conjucaïnüberstand mit einem Wattestäbchen abgezogen. Mit einem Rebound-Tonometer wurden pro Auge je 6 Messungen durchgeführt. Hierbei wird durch das Messgerät eine Messnadel, die mit einem Kunststoffpolster bedeckt wird, gegen die Hornhaut geschleudert. Der Rückstoß, mit dem die Nadel von der Cornea zurückprallt, wird dann vom Gerät in einem Magnetfeld in mmHg gemessen (38). Das Tonometer wurde mit 1 cm Abstand senkrecht zum Auge gehalten. Anschließend wurde das Gewicht des Tieres gemessen.

V.4. Tamoxifen-Augentropfen

Für die Versuche wurden Tamoxifen-Augentropfen in einer Konzentration von 5mg Tamoxifen in 1 ml Corn-Oil hergestellt (112). Die Aufbewahrung des Tamoxifen-Pulver erfolgte in lichtundurchlässigen Eppendorf-Cups und erst am Tag der Behandlung wurde es mit Corn Oil gemischt. Gelagert wurden die fertigen Augentropfen ebenfalls bei 8°C im Kühlschrank.

Um den Mäusen die Augentropfen zu verabreichen, wurden sie von den Elterntieren getrennt und die Augentropfen konnten mit einer Pipette auf die Augenlider der noch geschlossenen Augen getropft werden. Nach 5 Minuten kamen die behandelten Tiere zurück in den Käfig. Bei Tieren, die älter waren als 10 Tage, wurde hierfür eine kurze Inhalationsnarkose mit Isofluran eingesetzt. Pro Mausauge wurden 10 µl fertige Augentropfen benötigt und lokal appliziert. Tieren des Genotyps pCCAGCre-ERTM;Rosa26R-LacZ wurden fünf Tage lang drei mal am Tag 10 µl pro Auge topisch verabreicht und Tieren des Genotyps pCCAGCre-ERTM;Tgfbr2^{fl/fl} von p 4 bis 8 drei mal am Tag 10 µl pro Auge. Zur Entnahme der Augen mithilfe einer gebogenen Pinzette wurden die Tiere, nach einer vorherigen Isofluran-Inhalationsnarkose durch zervikale Dislokation getötet. Die Augen wurden anschließend - je nach Weiterverarbeitung - wie oben beschrieben fixiert.

V.5. Funduskopie und Fluoreszenzangiographie

Mithilfe von Augenhintergrundspiegelung und Fluoreszenzangiographie konnten Änderungen im Phänotyp der tamoxifenbehandelten *Tgfb β 2^{Δeye}*-Mäuse im Bereich des Augenhintergrundes *in vivo* dargestellt werden. Hierfür wurden die Mäuse mit einem Ketamin/Xylazin/NaCl-Gemisch (0,2 ml 2 % Xylazin, 0,6 ml 10 % Ketamin, 0,8 ml 0,9 % NaCl, 0,06 ml pro 5g) betäubt. Vor den Untersuchungen wurde je ein Tropfen Mydriaticum Stulln®UD 0,4 ml (Wirkstoff: Tropicamid) in beide Augen der Mäuse gegeben, um die Pupille zu erweitern. Per Funduskamera wurde zunächst der Augenhintergrund im Nativbild dargestellt. Um die retinalen Blutgefäße darzustellen, wurde anschließend durch einen zuvor intraperitoneal gelegten Zugang 0,02 ml Fluorescein appliziert. Bei der Angiographie mit Fluorescein werden Natriumfluorescein Moleküle mit Licht bestimmter Wellenlänge angeregt und gelangen auf ein höheres Energieniveau. Bei Rückfall in den ursprünglichen Zustand wird elektromagnetische Strahlung emittiert (38). Durch einen blauen Excitationsfilter wird das Blitzlicht der Kamera auf eine Wellenlänge von 465 bis 490 nm reduziert. Das von der Retina zurückgeworfene Licht gelangt durch einen Sperrfilter, welcher nur grünes Licht der Wellenlänge 520 - 530 nm passieren lässt, zum Aufnahmegerät (vgl. Abb. 22) (38). Natriumfluorescein wird innerhalb der Blutstrombahn an Albumin gebunden. Es penetriert durch alle Gefäße, außer denen der Retina und des Gehirns. Gefäßwände von Neovaskularisationsgefäßen sind ebenso durchlässig (38). Um die Gefäßsituation der Retina beurteilen zu können, erfolgen Aufnahmen in verschiedenen Phasen. In der choroidalen Phase nach 8 bis 12 Sekunden sind die großen Gefäße der Aderhaut, des Sehnervenkopfes und die Choridokapillaris angefärbt (38). In der arteriellen Phase werden die *A. centralis retinae* und ihre Äste befüllt. Hypofluoreszierende Areale sprechen für einen Fülldefekt (Cotton-Wool-Spots, subretinale Blutung, Gefäßwandschaden), hyperfluoreszierende Areale für Leckagen, Neovaskularisationen oder Kapillarektasien. Zur Bearbeitung der Aufnahmen diente das Programm Stream Pix.

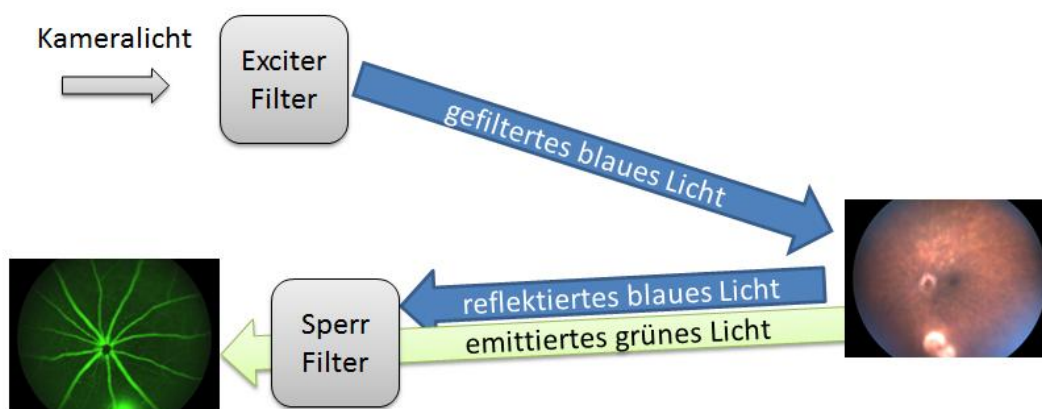


Abbildung 22: Prinzip der Fluoreszenzangiographie (38).

Weißes Kameralicht wird über einen Exciterfilter auf blaues Licht reduziert, welches wiederum von der Netzhaut reflektiert wird. Das in den retinalen Gefäßen enthaltene Fluorescein emittiert bei Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 465 bis 490 nm grünes Licht. Durch den Sperrfilter kann nur das emittierte grüne Licht zum Aufnahmegerät gelangen.

V.6. Trypsinverdau der Retina und PAS-Färbung

Die abpräparierten Augen wurden im Ganzen für 48 Stunden in 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die *Retinae* aus den Augen freigelegt und für 75 Minuten in Aqua dest. gespült. Die *Retinae* wurden auf einen chromgelatinierten Objektträger aufgebracht, mit einem hydrophoben PAP-Stift umrandet, an allen vier Seiten leicht eingeschnitten und für 90 Minuten in 3 % Trypsin 0,2 M Tris-HCL-Lösung bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden die *Retinae* mit einer Pasteurpipette eingesaugt, auf einen frischen Objektträger überführt und erneut für 120 Minuten in 3 % Trypsin 0,2 M Tris-HCL-Lösung bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Die Objektträger mit den *Retinae* wurden über Nacht getrocknet und *Perjodacid-Schiff* (PAS) gefärbt. In aufsteigender Alkoholreihe wurden die Präparate entwässert und mit Depex eingedeckelt.

Perjodsäure-Schiff-Färbung	
Aqua bidest.	5 Minuten
Perjodsäure	10 Minuten
Aqua bidest.	5 Minuten
Schiff-Reagenz	15 Minuten
Sulfitwasser	2 x 2 Minuten
warmes Wasser	10 Minuten
Hämalaun	2,5 Minuten
Fließend wässern	10 Minuten
Aqua bidest.	2 Minuten

Tabelle 31: PAS-Färbung

V.7. Statistik

Statistische Auswertungen und deren Darstellung in Graphen wurden mithilfe von Microsoft® Excel (Microsoft® Corporation, Redmond, USA) erstellt. Die Signifikanz wurde mit dem „Student's“ T-Test berechnet. Signifikante Unterschiede sind mit * für $p < 0,05$ gekennzeichnet, hochsignifikante Unterschiede mit ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$. Der Standardfehler (SEM) wurde zur Berechnung der Fehlerbalken verwendet.

VI. Anhang

VI.1. Literaturverzeichnis

1. Aumüller G. Anatomie: 208 Tabellen. Stuttgart: Thieme; 2007. (Duale Reihe).
2. Trepel M. Neuroanatomie: Struktur und Funktion ; [Online-Zugang + interaktive Extras]. 4., neu bearb. Aufl. München, Jena: Elsevier, Urban & Fischer; 2008. (StudentConsult).
3. Welsch U. Lehrbuch Histologie. 3. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2010.
4. Smith RS. Systematic evaluation of the mouse eye: Anatomy, pathology, and biometrics. Boca Raton: CRC Press; 2002. (Research methods for mutant mice series).
5. Lang F, Lang P. Basiswissen Physiologie. 2., vollständig neu bearbeitete und aktualisierte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2007. (Springer-Lehrbuch).
6. Hick C, Hartmann J. Intensivkurs Physiologie. 5., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer; 2006. (Vorklinik).
7. Langmann T. Microglia activation in retinal degeneration. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 81(6):1345–51.
8. Streilein JW. Immunoregulatory mechanisms of the eye. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18(3):357–70.
9. Caprara C, Thiersch M, Lange C, Joly S, Samardzija M, Grimm C. HIF1A is essential for the development of the intermediate plexus of the retinal vasculature. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011; 52(5):2109–17.
10. Connolly SE, Hores TA, Smith LE, D'Amore PA. Characterization of vascular development in the mouse retina. *Microvasc. Res.* 1988; 36(3):275–90.
11. Fruttiger M. Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002; 43(2):522–7.
12. Böttner M, Kriegstein K, Unsicker K. The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J. Neurochem.* 2000; 75(6):2227–40.
13. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* 1994; 8(2):133–46.
14. McDonald NQ, Hendrickson WA. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 1993; 73(3):421–4.
15. Kondaiah P, Sands MJ, Smith JM, Fields A, Roberts AB, Sporn MB et al. Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 1990; 265(2):1089–93.
16. Sporn MB, Roberts AB. TGF-beta: problems and prospects. *Cell Regul.* 1990; 1(12):875–82.
17. Derynck R, Lindquist PB, Lee A, Wen D, Tamm J, Graycar JL et al. A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J.* 1988; 7(12):3737–43.
18. Wahl SM, Wen J, Moutsopoulos N. TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. *Immunol. Rev.* 2006; 213:213–27.
19. Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 1998; 67:753–91.

20. Yamashita H, Dijke P ten, Franzén P, Miyazono K, Heldin CH. Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(31):20172–8.
21. Wrana JL, Attisano L, Cárcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M et al. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 1992; 71(6):1003–14.
22. Heldin CH, Miyazono K, Dijke P ten. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390(6659):465–71.
23. Luty GA, Merges C, Threlkeld AB, Crone S, McLeod DS. Heterogeneity in localization of isoforms of TGF-beta in human retina, vitreous, and choroid. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993; 34(3):477–87.
24. Hammes H. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Horm. Metab. Res.* 2005; 37 Suppl 1:39–43.
25. Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *FASEB J.* 1993; 7(11):1031–8.
26. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Dijke P ten. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc. Res.* 2005; 65(3):599–608.
27. Walshe TE, Saint-Geniez M, Maharaj, Arindel S R, Sekiyama E, Maldonado AE, D'Amore PA. TGF-beta is required for vascular barrier function, endothelial survival and homeostasis of the adult microvasculature. *PLoS ONE* 2009; 4(4):e5149.
28. Cogan DG, Touissant D, Kuwabara T. Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy. *Arch. Ophthalmol.* 1961; 66:366–78.
29. Lebrin F, Goumans M, Jonker L, Carvalho, Rita L C, Valdimarsdottir G, Thorikay M et al. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 2004; 23(20):4018–28.
30. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C et al. Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol. Cell* 2003; 12(4):817–28.
31. Oshima M, Oshima H, Taketo MM. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol.* 1996; 179(1):297–302.
32. Neubauer K, Krüger M, Quondamatteo F, Knittel T, Saile B, Ramadori G. Transforming growth factor-beta1 stimulates the synthesis of basement membrane proteins laminin, collagen type IV and entactin in rat liver sinusoidal endothelial cells. *J. Hepatol.* 1999; 31(4):692–702.
33. Darland DC, Massingham LJ, Smith SR, Piek E, Saint-Geniez M, D'Amore PA. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev. Biol.* 2003; 264(1):275–88.
34. Ramsauer M, D'Amore PA. Contextual role for angiopoietins and TGFbeta1 in blood vessel stabilization. *J. Cell. Sci.* 2007; 120(Pt 10):1810–7.
35. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407(6801):242–8.
36. *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. München: Elsevier, Urban & Fischer.
37. Augustin AJ. *Augenheilkunde*. 3., komplett überarbeitete und erw. Aufl. Berlin: Springer; 2007.

38. Grunz C, Straub W. Augenärztliche Untersuchungsmethoden: 106 Tabellen. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme; 2008.
39. Chytil A, Magnuson MA, Wright, Christopher V E, Moses HL. Conditional inactivation of the TGF-beta type II receptor using Cre:Lox. *Genesis* 2002; 32(2):73–5.
40. Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 2000; 26(2):99–109.
41. Kos CH. Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr. Rev.* 2004; 62(6 Pt 1):243–6.
42. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* 1981; 150(4):467–86.
43. Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988; 85(14):5166–70.
44. Hayashi S, McMahon AP. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev. Biol.* 2002; 244(2):305–18.
45. Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93(20):10887–90.
46. Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 237(3):752–7.
47. Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* 1999; 21(1):70–1.
48. JAX Mice Database. Gt(ROSA)26Sortm1Sor/Gt(ROSA)26Sortm1Sor: Jackson, Laboratory [cited 2014 Jun 5]. Available from: URL:<http://jaxmice.jax.org/strain/003474.html>.
49. Zhang Y, Ruest LB. Analysis of neural crest cell fate during cardiovascular development using Cre-activated lacZ/ β -galactosidase staining. *Methods Mol. Biol.* 2012; 843:125–38.
50. Sweeney ST, Hidalgo A, de Belle, J Steven, Keshishian H. X-gal staining of the central nervous system in adult *Drosophila*. *Cold Spring Harb Protoc* 2012; 2012(2):239–41.
51. Ohlmann AV, Adamek E, Ohlmann A, Lütjen-Drecoll E. Norrie gene product is necessary for regression of hyaloid vessels. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004; 45(7):2384–90.
52. Killingsworth MC, Sarks JP, Sarks SH. Macrophages related to Bruch's membrane in age-related macular degeneration. *Eye (Lond)* 1990; 4 (Pt 4):613–21.
53. Löffler KU, Lee WR. Basal linear deposit in the human macula. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1986; 224(6):493–501.
54. Herrnberger L, Ebner K, Junglas B, Tamm ER. The role of plasmalemma vesicle-associated protein (PLVAP) in endothelial cells of Schlemm's canal and ocular capillaries. *Exp. Eye Res.* 2012; 105:27–33.
55. Herrnberger L, Seitz R, Kuespert S, Bösl MR, Fuchshofer R, Tamm ER. Lack of endothelial diaphragms in fenestrae and caveolae of mutant Plvap-deficient mice. *Histochem. Cell Biol.* 2012; 138(5):709–24.

56. Dietrich N, Hammes H. Retinal digest preparation: a method to study diabetic retinopathy. *Methods Mol. Biol.* 2012; 933:291–302.
57. Yamada H, Obata H, Kaji Y, Yamashita H. Expression of transforming growth factor-beta superfamily receptors in developing rat eyes. *Jpn. J. Ophthalmol.* 1999; 43(4):290–4.
58. Huang T, Wang Y, Ebrahim Q, Chen Y, Cheng C, Doughman YQ et al. Deletion of HIF-1 α partially rescues the abnormal hyaloid vascular system in Cited2 conditional knockout mouse eyes. *Mol. Vis.* 2012; 18:1260–70.
59. Walshe TE. TGF-beta and microvessel homeostasis. *Microvasc. Res.* 2010; 80(1):166–73.
60. Kuwabara T, Cogan DG. Studies of retinal vascular patterns. I. Normal architecture. *Arch. Ophthalmol.* 1960; 64:904–11.
61. Schlingemann RO. Role of growth factors and the wound healing response in age-related macular degeneration. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2004; 242(1):91–101.
62. Rassow J. *Biochemie. 3., vollst. überarb. u. erw. Aufl.* Stuttgart: Thieme; 2012. (Duale Reihe).
63. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr. Rev.* 1992; 13(1):18–32.
64. Kourembanas S, Hannan RL, Faller DV. Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene in human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1990; 86(2):670–4.
65. Wilkinson-Berka JL, Babic S, Gooyer T de, Stitt AW, Jaworski K, Ong, Leslie G T et al. Inhibition of platelet-derived growth factor promotes pericyte loss and angiogenesis in ischemic retinopathy. *Am. J. Pathol.* 2004; 164(4):1263–73.
66. Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, Amano S, Ogura Y et al. VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *J. Exp. Med.* 2003; 198(3):483–9.
67. Poulaki V, Jousseaume AM, Mitsiades N, Mitsiades CS, Iliaki EF, Adamis AP. Insulin-like growth factor-I plays a pathogenetic role in diabetic retinopathy. *Am. J. Pathol.* 2004; 165(2):457–69.
68. Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, Ellis EA, Aboufrikha M, Guy J. Insulin-like growth factor I acts as an angiogenic agent in rabbit cornea and retina: comparative studies with basic fibroblast growth factor. *Diabetologia* 1993; 36(4):282–91.
69. Danis RP, Bingaman DP. Insulin-like growth factor-1 retinal microangiopathy in the pig eye. *Ophthalmology* 1997; 104(10):1661–9.
70. Flaumenhaft R, Abe M, Mignatti P, Rifkin DB. Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor beta in endothelial cells: regulation of plasminogen activator activity. *J. Cell Biol.* 1992; 118(4):901–9.
71. Baldysiak-Figiel A, Lang GK, Kampmeier J, Lang GE. Octreotide prevents growth factor-induced proliferation of bovine retinal endothelial cells under hypoxia. *J. Endocrinol.* 2004; 180(3):417–24.
72. Pfeffer BA, Flanders KC, Guérin CJ, Danielpour D, Anderson DH. Transforming growth factor beta 2 is the predominant isoform in the neural retina, retinal pigment epithelium-choroid and vitreous of the monkey eye. *Exp. Eye Res.* 1994; 59(3):323–33.

73. Papetti M, Shujath J, Riley KN, Herman IM. FGF-2 antagonizes the TGF-beta1-mediated induction of pericyte alpha-smooth muscle actin expression: a role for myf-5 and Smad-mediated signaling pathways. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003; 44(11):4994–5005.
74. Paine SK, Basu A, Mondal LK, Sen A, Choudhuri S, Chowdhury IH et al. Association of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor beta, and interferon gamma gene polymorphisms with proliferative diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Mol. Vis.* 2012; 18:2749–57.
75. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr. Rev.* 1997; 18(1):26–45.
76. Javerzat S, Auguste P, Bikfalvi A. The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol Med* 2002; 8(10):483–9.
77. Soubrane G, Cohen SY, Delayre T, Tassin J, Hartmann MP, Coscas GJ et al. Basic fibroblast growth factor experimentally induced choroidal angiogenesis in the minipig. *Curr. Eye Res.* 1994; 13(3):183–95.
78. Lowe WL, Florkiewicz RZ, Yorek MA, Spanheimer RG, Albrecht BN. Regulation of growth factor mRNA levels in the eyes of diabetic rats. *Metab. Clin. Exp.* 1995; 44(8):1038.
79. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277(5322):55–60.
80. Carrington L, McLeod D, Boulton M. IL-10 and antibodies to TGF-beta2 and PDGF inhibit RPE-mediated retinal contraction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; 41(5):1210–6.
81. Robbins SG, Mixon RN, Wilson DJ, Hart CE, Robertson JE, Westra I et al. Platelet-derived growth factor ligands and receptors immunolocalized in proliferative retinal diseases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994; 35(10):3649–63.
82. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J. Exp. Med.* 1990; 172(6):1535–45.
83. Rakic J, Lambert V, Devy L, Luttun A, Carmeliet P, Claes C et al. Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003; 44(7):3186–93.
84. Kliffen M, Sharma HS, Mooy CM, Kerkvliet S, de Jong, P T. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *Br J Ophthalmol* 1997; 81(2):154–62.
85. Amin R, Puklin JE, Frank RN. Growth factor localization in choroidal neovascular membranes of age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994; 35(8):3178–88.
86. Reddy VM, Zamora RL, Kaplan HJ. Distribution of growth factors in subfoveal neovascular membranes in age-related macular degeneration and presumed ocular histoplasmosis syndrome. *Am. J. Ophthalmol.* 1995; 120(3):291–301.
87. Yoshida M, Tanihara H, Yoshimura N. Platelet-derived growth factor gene expression in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 189(1):66–71.
88. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 1993; 81(6):1607–13.

89. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992; 6(12):3051–64.
90. Kaneko Y, Rao NA. Mitochondrial oxidative stress initiates visual loss in sympathetic ophthalmia. *Jpn. J. Ophthalmol.* 2012; 56(3):191–7.
91. Bosco MC, Puppo M, Blengio F, Fraone T, Cappello P, Giovarelli M et al. Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology* 2008; 213(9-10):733–49.
92. Mi Z, Rapisarda A, Taylor L, Brooks A, Creighton-Gutteridge M, Melillo G et al. Synergistic induction of HIF-1alpha transcriptional activity by hypoxia and lipopolysaccharide in macrophages. *Cell Cycle* 2008; 7(2):232–41.
93. Krishnaraju K, Nguyen HQ, Liebermann DA, Hoffman B. The zinc finger transcription factor Egr-1 potentiates macrophage differentiation of hematopoietic cells. *Mol. Cell. Biol.* 1995; 15(10):5499–507.
94. Thannickal VJ, Aldweib KD, Rajan T, Fanburg BL. Upregulated expression of fibroblast growth factor (FGF) receptors by transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) mediates enhanced mitogenic responses to FGFs in cultured human lung fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 251(2):437–41.
95. Pagel J, Deindl E. Disease progression mediated by egr-1 associated signaling in response to oxidative stress. *Int J Mol Sci* 2012; 13(10):13104–17.
96. Yan SF, Fujita T, Lu J, Okada K, Shan Zou Y, Mackman N et al. Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat. Med.* 2000; 6(12):1355–61.
97. Bhatwadekar AD, Guerin EP, Jarajapu, Yagna P R, Caballero S, Sheridan C, Kent D et al. Transient inhibition of transforming growth factor-beta1 in human diabetic CD34+ cells enhances vascular reparative functions. *Diabetes* 2010; 59(8):2010–9.
98. Anand A, Sharma NK, Gupta A, Prabhakar S, Sharma SK, Singh R et al. Single nucleotide polymorphisms in MCP-1 and its receptor are associated with the risk of age related macular degeneration. *PLoS ONE* 2012; 7(11):e49905.
99. Yamada K, Sakurai E, Itaya M, Yamasaki S, Ogura Y. Inhibition of laser-induced choroidal neovascularization by atorvastatin by downregulation of monocyte chemotactic protein-1 synthesis in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48(4):1839–43.
100. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ. Res.* 2004; 95(9):858–66.
101. Ma W, Zhao L, Fontainhas AM, Fariss RN, Wong WT. Microglia in the mouse retina alter the structure and function of retinal pigmented epithelial cells: a potential cellular interaction relevant to AMD. *PLoS ONE* 2009; 4(11):e7945.
102. Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005; 115(1):1–20.
103. Rincon M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol.* 2012; 33(11):571–7.
104. Erickson PA, Fisher SK, Guérin CJ, Anderson DH, Kaska DD. Glial fibrillary acidic protein increases in Müller cells after retinal detachment. *Exp. Eye Res.* 1987; 44(1):37–48.

105. Fitzgerald ME, Vana BA, Reiner A. Evidence for retinal pathology following interruption of neural regulation of choroidal blood flow: Müller cells express GFAP following lesions of the nucleus of Edinger-Westphal in pigeons. *Curr. Eye Res.* 1990; 9(6):583–98.
106. JAX Mice Database. B6.Cg-Tg(CAG-cre/Esr1*)5Amc/J: Jackson Laboratory [cited 2014 Jun 5]. Available from: URL:<http://jaxmice.jax.org/strain/004682.html>.
107. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 1993; 15(3):532-4, 536-7.
108. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4):402–8.
109. Ito S, Karnovsky M. Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing trinitrocompounds. *The Journal of Cell Biology (J Cell Bio)* 1968; (39):168–9.
110. Richardson KC, Jarett L, Finke EH. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol* 1960; 35:313–23.
111. Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 1992; 31(12):3103–12.
112. Liu P, Johnson RL. Lmx1b is required for murine trabecular meshwork formation and for maintenance of corneal transparency. *Dev. Dyn.* 2010; 239(8):2161–71.
113. Leimbeck SV, Schlecht A, Tamm ER, Braunger BM. Tamoxifen-Containing Eye Drops Successfully Trigger Cre-Mediated Recombination in the Entire Eye. *Adv Exp Med Biol.* 2016;854:495-500.
114. Braunger BM, Leimbeck SV, Schlecht A, Volz C, Jäggle H, Tamm ER. Deletion of ocular transforming growth factor β signaling mimics essential characteristics of diabetic retinopathy. *Am J Pathol.* 2015 Jun;185(6):1749-68.

VI.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schichten der Retina (2).....	4
Abbildung 2: Kristallstruktur von TGF- β mit typischem Cystinknotenmotiv (13)	8
Abbildung 3: Signaltransduktion durch TGF- β (15, 19).....	9
Abbildung 4: Einfluss von TGF- β auf die Endothelzelle via ALK1 und ALK5 (27).....	11
Abbildung 5: Deletionsnachweis von Tgfbr2 und pSmad 3-Färbung	26
Abbildung 6: Semidünnschnitte im Alter von vier bis 12 Wochen, Dextranmeridionalschnitt	28
Abbildung 7: Semidünnschnitte im Alter von sechzehn Wochen	30
Abbildung 8: EM-Aufnahmen der äußeren Retina und der Retinagefäße	31
Abbildung 9: Funduskopie und Fluoreszenzangiographie	33
Abbildung 10: dextranperfundierter Retinaflachpräparate und Meridionalkryoschnitte	35
Abbildung 11: PLVAP-immunhistochemische Färbung	37
Abbildung 12: Collagen-IV-immunhistochemische Färbung	38
Abbildung 13: Fibronektin-immunhistochemische Färbung.....	39
Abbildung 14: Trypsinretinaverdau.....	40
Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung von Perizytenmarkern.....	41
Abbildung 16: Molekularbiologische Ergebnisse	42

Abbildung 17: Nachweis von GFAP auf Proteinebene und immunhistochemisch.....	44
Abbildung 18: IBA-1-immunhistochemische Färbung.....	45
Abbildung 19: IBA-1-immunhistochemische Färbung an Dextrankryomeridionalschnitten	46
Abbildung 20: Semidünnschnitte des Kammerwinkels, Augendruck- und Gewichtsmessung	47
Abbildung 21: Darstellung von apoptotischen Vorgängen in Retina und in <i>Nn.optici</i>	48
Abbildung 22: Prinzip der Fluoreszenzangiographie (38).....	89

VI.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien.....	61
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial	62
Tabelle 3: Geräte	64
Tabelle 4: Enzyme.....	64
Tabelle 5: Kits	65
Tabelle 6: PCR-Primer.....	65
Tabelle 7: quantitative Realtime RT-PCR-Primer.....	67
Tabelle 8: Antikörper für Western Blot Analyse.....	67
Tabelle 9: Antikörper für immunhistochemische Färbungen	68
Tabelle 10: Puffer und Lösungen.....	71
Tabelle 11: SDS-PAGE-Gele, Angaben in ml	72
Tabelle 12: Agarosegel 1%.....	72
Tabelle 13: Versuchstiere	73
Tabelle 14: Mastermix PCR.....	75
Tabelle 15: PCR-Programme.....	75
Tabelle 16: RNA-Isolierung	76
Tabelle 17: Proteinisolierung.....	77
Tabelle 18: Aufbau des Semy-Dry-Bloters.....	78
Tabelle 19: Behandlung der PVDF-Membran für den Proteinnachweis	79
Tabelle 20: cDNA Ansatz.....	80
Tabelle 21: Programm zur cDNA Herstellung.....	80
Tabelle 22: Mastermix quantitative Realtime RT-PCR	81
Tabelle 23: Primeransatz quantitative Realtime RT-PCR	81
Tabelle 24: Real-Time qPCR Programm.....	81
Tabelle 25: Schema zur Einbettung von Präparaten in Paraffin	83
Tabelle 26: Schema zu Entparaffinierung.....	83
Tabelle 27: Schema zur Einbettung von Präparaten in Epon	84
Tabelle 28: Schema für immunhistochemische Färbungen	86
Tabelle 29: Blockierlösungen für immunhistochemische Färbungen	86
Tabelle 30: TUNEL-Färbung	87
Tabelle 31: PAS-Färbung.....	90

VI.4. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

A, A., α	Ampere, Arteria, Alpha/ Anti
Abb.	Abbildung
ad lib.	ad libitum
AK	Antikörper
ALK	activin receptor-like kinase 1
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
Angiop-2	Angiopoietin-2
AT	Augentropfen
β	beta
bidest.	bidestillatus
BlamD	basal laminar deposit
BlinD	basal linear deposit
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovin Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Casp 8	Caspase 8
CCL-2, Ccl-2	chemokin ligand 2 (Protein, Gen)
CD68, Cd68	cluster of differtiation 68 (Protein, Gen)
cDNA	komplementäre DNA
CNV	choroidale Neovaskularisation
Co-Smad	collaborating Smad
Cre	cyclization recombinase
d	Tag, destiliert
da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpt	Dioptrie
DRP	Diabetische Retinopathie
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
EGR-1, Egr-1	early growth response protein 1 (Protein, Gen)
ER TM	Östrogenrezeptors (unregistered Trademark)
FGF-2, Fgf-1	fibroblast growth factor 2 (Protein, Gen)
FITC	Fluorescein Isothiocyanate-Dextran
fl/fl	flox/flox
fwd	forward
g	Gram
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP, Gfap	glial fibrillary acidic protein (Protein, Gen)
GFP	green fluorescent protein
GNB2L	guanine nucleotide binding protein beta polypeptide 2-like
GS	Glutaminsynthetase

ANHANG

h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HIF1- α , Hif1- α	hypoxie inducible factor alpha (Protein, Gen)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
IBA-1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
IE	Internationale Einheit
IGF-1, Igf-1	insulinlike growth factor 1 (Protein, Gen)
IL-6, IL-6	Interleukin 6 (Protein, Gen)
iNOS	cytokine inducible nitric oxide synthetase
i.p., i.v.	intraperitoneal, intravenös
k	Kilo
l	Liter
loxP	locus of crossover (x) in P1 bacteriophage
M, M.	Molar, Muskel
m	Meter, milli (10 ⁻³)
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mm	Mus musculus
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger RNA
μ	mikro (10 ⁻⁶)
N.	Nerv
n	nano (10 ⁻⁹)
NaCl	Natriumchlorid
NPDRP	nicht-proliferative diabetische Retinopathie
NVD	neovascularization of the disc
NVE	neovascularization elsewhere
P	Postnatahtag
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF-B, Pdgfb	platlet derived growth factor B (Protein, Gen)
PDRP	proliferative diabetische Retinopathie
PFA	Paraformaldehyd
PLVAP	plasmalemma vesicle-associated protein
pSmad	phosphorylierte Smads
PVDF	Polyvinylfluorid
qRT PCR	quantitativer Real-Time PCR
R	Rezeptor
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	retinales Pigmentepithel
RPL32	ribosomal protein L32
rpm	revolutions per minute
R-Smad	receptor-regulated Smad
rTdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant

ANHANG

RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sm α -Aktin	Smooth-muscle-alpha-Aktin
Smad	Sma- and Mad-related Protein
s.o.	siehe oben
SSC	Standard Saline Citrate
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS buffered saline
TBST	TRIS buffered saline Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	transforming growth factor beta
<i>Tgfb2</i> , <i>Tgfb2</i> ^{fl/fl}	transforming growth factor beta receptor typ 2, gefloxt
<i>Tgfb2</i> ^{Δeye}	konditionelle doppelte Defizient des <i>Tgfb2</i>
TNF- α , Tnf- α	tumor necrosis factor α (Protein, Gen)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Salzsäure
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling
ü.N.	über Nacht
V, v./Vv.	Volt, Vena/e
VEGF, Vegf	vascular endothelial growth factor (Protein, Gen)
vgl.	vergleiche
W	Watt
Wdh.	Wiederholung
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent

VI.5. Dank

Im Rahmen dieser Arbeit möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. Ernst Tamm für die Vergabe des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor zur Durchführung der Arbeit. Vielen Dank für die Übernahme des Gutachtens zur Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Weber für die Begutachtung der Arbeit.

Der **Fakultät für Medizin** für die Vergabe meines Promotionsstipendiums.

PD Dr. Dr. Barbara Braunger möchte ich besonders danken für ihre stets liebenswürdige Hilfe und Betreuung. Und ebenso für die gemeinsamen Mittagessen und die erfolgreichen Tierstallmissionen.

Elke Stauber, Margit Schimmel, Angelika Pach und Silvia Babl auf deren goldwertes Wissen ich zurückgreifen konnte und deren tatkräftige Unterstützung mir kostbare Zeit gespart hat.

Den Mitarbeitern am Lehrstuhl Tamm.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern **Otilie Leimbeck-Rindle** und **Dr. Norbert Rindle** für jegliche Unterstützung im Umfeld dieser Arbeit bedanken. Sie ermöglichten mein Studium und das Verfassen dieser Arbeit. Gleiches gilt für meine Geschwistern und deren Familien.

Daniela Kawall möchte ich für die tägliche Abwechslung in und jenseits des Labors danken und für ihre Unterstützung, wenn hin und wieder scheinbar unlösbare Probleme auftraten. Auch **Katharina Kawall** bin ich zu Dank verpflichtet.

Für die unendliche Geduld und ein stets offenes Ohr für die Ergebnisse meiner Arbeit möchte ich meinem Mann **Michael Etzel** und seiner Familie danken.

VI.6. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Sarah Verena Etzel geb. Leimbeck
Geburtsdatum/-ort 01.04.1987 in Augsburg
Kontaktdaten sarah.etzelt@gmx.de

Schulischer Werdegang

1993-1998 Grundschule und Hauptschule Augsburg-Firnhaberau
1998-2007 Peutingen-Gymnasium Augsburg, Abitur 2007

Akademischer Werdegang

2007-2014 Humanmedizin Universität und Uniklinikum Regensburg
09.2009 Erster Abschnitt Ärztliche Prüfung
04.-06.2014 Zweiter Abschnitt Ärztliche Prüfung und Erlangung der Approbation

Beruflicher Werdegang

07.2014 Universitätsklinikum Tübingen, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

Promotion

03.2011-02.2013 Prof. Dr. Tamm, Institut für Anatomie Universität Regensburg
08.2012-02.2013 Promotionsstipendium der Fakultät für Medizin, Uniklinikum Regensburg, Forschungsmester
09.2012 Abstract zur Anatomischen Tagung in Würzburg: „Conditional knockout of the Type 2 TGF- β receptor in the mouse retina influences angiogenesis“-Posterpreis

Veröffentlichungen

Schlecht A*, **Leimbeck SV***, Tamm ER, Braunger BM. Tamoxifen-Containing Eye Drops Successfully Trigger Cre-Mediated Recombination in the Entire Eye. Adv Exp Med Biol. 2016;854:495-500.

* contributed equally to the study.

Braunger BM, **Leimbeck SV**, Schlecht A, Volz C, Jäggle H, Tamm ER. Deletion of ocular transforming growth factor β signaling mimics essential characteristics of diabetic retinopathy. Am J Pathol. 2015 Jun;185(6):1749-68.

VI.7. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

.....

Sarah Verena Etzel geb. Leimbeck