

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

Der Einfluss des VEGF Signalwegs auf die Gefäßentwicklung und Homöostase im Mausauge



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin (Dr. med.)
der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Anita Maria Grundl, geb. Fraunhofer

aus

Landshut

im Jahr

2022

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

Der Einfluss des VEGF Signalwegs auf die Gefäßentwicklung und Homöostase im Mausauge



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin (Dr. med.)
der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Anita Maria Grundl, geb. Fraunhofer

aus

Landshut

im Jahr

2022

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 17.10.2022

Diese Arbeit wurde angeleitet und betreut von:

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Barbara M. Braunger.

Prüfungsausschuss:

Erstgutachterin: Prof. Dr. Dr. Barbara Braunger

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Charlotte Wagner

Anita M. Grundl

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Anatomische Grundlagen und Funktionen des Auges.....	1
1.1.1 Äußere Augenhaut.....	2
1.1.2 Mittlere Augenhaut / Uvea.....	2
1.1.3 Innere Augenhaut.....	3
1.2 Der VEGF-Signalweg.....	6
1.2.1 Die VEGF-Familie und ihre zugehörigen Rezeptoren.....	6
1.2.2 Physiologische Funktionen sowie pathologische Konsequenzen von VEGF am Auge	10
1.3 Die Gefäßentwicklung im Mausauge.....	11
1.3.1 Molekulare Mechanismen retinaler Angiogenese.....	16
1.4 Ziel dieser Arbeit	17
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Materialliste.....	19
2.1.1 Reagenzienliste.....	19
2.1.2 Enzyme, Taq Polymerasen und handelsübliche Kits	21
2.1.3 Molekulargewichtsstandards	21
2.1.4 Oligonukleotidprimer zur Genotypisierung.....	21
2.1.5 Oligonukleotidprimer zum Einsatz bei quantitativer Echtzeit-PCR.....	21
2.1.6 Antikörper für Western Blot und immunhistochemische Färbungen.....	22
2.1.6.1 Primäre Antikörper.....	22
2.1.6.2 Sekundäre Antikörper	23
2.1.7 Chemische Zusammensetzung von Puffern und Lösungen.....	23
2.1.8 Laborausstattung	25
2.1.9 Verbrauchsmaterialien	26
2.2 Methoden	27

Inhaltsverzeichnis

2.2.1	Tiermodelle und Cre/loxP-System	27
2.2.2	Tierexperimente und Tierhaltung	28
2.2.2.1	Präparation des okularen Gewebes	29
2.2.2.2	Transkardiale Perfusion	29
2.2.2.3	Präparation von Netzhautflächpräparaten	30
2.2.2.4	Präparation von vorderen Augensegmenten und Irisflächpräparaten	30
2.2.2.5	Gewichtsbestimmung post mortem	31
2.2.3	DNA Analyse	31
2.2.3.1	DNA Isolation aus Mausschwanzbiopsien	31
2.2.3.2	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	31
2.2.3.3	Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.2.3.4	Agarosegelelektrophorese	35
2.2.4	RNA Analyse	36
2.2.4.1	RNA Isolation	36
2.2.4.2	RNA Quantifizierung	36
2.2.4.3	Komplementäre DNA Synthese (cDNA Synthese)	37
2.2.4.4	Quantitative Echtzeit PCR (RT-PCR)	37
2.2.5	Protein Analyse	39
2.2.5.1	Protein Isolation	39
2.2.5.2	BCA-Untersuchung	39
2.2.5.3	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.2.5.4	Halbtrockenes Übertragen der Proteine auf Polyvinylidenfluorid-Membranen (Semidry-Blotting)	41
2.2.5.5	Detektion von spezifischen Proteinen	41
2.2.5.6	Coomassie-Färbung	43
2.2.6	Histologische Methoden	43
2.2.6.1	Kryo Einbettung der Augen und Herstellung von Gefrierschnitten	43
2.2.6.2	Paraffin Einbettung der Augen und Herstellung von Paraffinschnitten	43
2.2.6.3	Epon Einbettung und Herstellung von Semi- sowie Ultradünnschnitten	44

Inhaltsverzeichnis

2.2.6.4	Morphometrische Analyse und Quantifikation anhand von Semidünnschnittpräparaten	46
2.2.6.5	Immunhistochemische Färbungen	47
2.2.6.5.1	Immunhistochemische Färbungen von Gefrierschnitten (Kryoschnitten)	47
2.2.6.5.2	Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten.....	48
2.2.6.5.3	Immunhistochemische Färbungen von Netzhautflachpräparaten	50
2.2.6.6	Quantitative Analyse immunhistochemisch gefärbter Präparate anhand von Paraffinschnitten.....	50
2.2.6.7	Apoptotischer Zelltod: Terminale Desoxynukleotidyltransferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL-Analysen)	51
2.2.6.8	Enzymhistochemische Färbetechniken.....	52
2.2.6.8.1	β -Galactosidase Aktivitätsfärbung	52
2.2.6.8.2	ADPase-Nachweis	53
2.2.7	Bildanalysen.....	53
2.2.8	Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie	54
2.2.9	Statistische Auswertung	54
Ergebnisse	55
2.3	Vegfr2-Knockdown im Mausauge.....	55
2.3.1	Genotypisierung der Versuchstiere mittels PCR.....	55
2.3.2	Verifikation der homogenen Rekombination durch Rosa-LacZ-Reportermäuse (R26R) mittels Tamoxifen Augentropfen.....	56
2.3.3	Nachweis des konditionellen <i>Vegfr2</i> -Knockdowns in der Retina.....	58
2.3.4	Nachweis des konditionellen <i>Vegfr2</i> -Knockdowns im Bereich des vorderen Augenabschnitts.....	60
2.4	Phänotyp-Analyse von <i>Vegfr2</i> ^{Δeye} -Mäusen: <i>Vegfr2</i> ^{Δeye} -Mäuse zeigen eine Gewichtsreduktion sowie dünnere retinale Zellschichten	61
2.4.1	Makroskopisch-morphologische Unterschiede: Größen- und Gewichtsreduktion der <i>Vegfr2</i> ^{Δeye} -Mäuse	61
2.4.2	Mikroskopisch-morphologische Unterschiede: Dünnere retinale Zellschichten der <i>Vegfr2</i> ^{Δeye} -Mäuse und erhöhte Apoptoserate in der Retina der <i>Vegfr2</i> ^{Δeye} -Mäuse ...	62
2.4.2.1	Dünnere retinale Zellschichten der <i>Vegfr2</i> ^{Δeye} -Mäuse	62

Inhaltsverzeichnis

2.4.2.2	Erhöhte Apoptoserate in der Retina der Vegfr2 ^{Δeye} -Mäuse: TUNEL-Analysen	64
2.5	Detaillierte Analyse der Retina von Vegfr2 ^{Δeye} -Mäusen	65
2.5.1	Gestörte retinale Angiogenese	65
2.5.1.1	Analyse von FITC-Dextran perfundierten Retinaflachpräparaten	65
2.5.1.2	Nachweis der retinalen Gefäßveränderungen mittels FITC-Dextran perfundierten Gefrierschnitten	66
2.5.1.3	Molekulare Veränderungen in der Retina in Zusammenhang mit der gestörten Angiogenese	68
2.5.2	Akkumulation von Astrozyten in der Nervenfaserschicht (NFL) der Retina	73
2.5.2.1	Identifikation und Quantifizierung der Zellakkumulation in der Nervenfaserschicht von Vegfr2 ^{Δeye} -Mäusen	73
2.5.2.2	Veränderungen des retinalen astrozytären Netzwerks	75
2.6	Gefäßproliferation im vorderen Augenabschnitt der Vegfr2 ^{Δeye} -Mäuse	77
2.6.1	Morphologische Unterschiede der Iris im Semidünnschnitt	77
2.6.2	Detektion und Differenzierung molekularer Veränderungen mittels Immunhistochemie	78
2.6.3	Veränderte Vaskularisierung der Iris	80
2.7	Pathologische Vaskularisation der Iris durch fenestriertes Irisendothel der Vegfr2 ^{Δeye} -Mäuse	81
2.7.1	Makroskopisch-morphologische Veränderungen der Vorderkammer	81
2.7.2	Mikroskopisch-morphologische Veränderungen der Irisgefäße	82
2.7.3	Molekularer Nachweis der pathologischen Vaskularisation	84
2.7.4	Kompensatorische molekulare Veränderungen im Bereich des vorderen Augenabschnitts	85
3	Diskussion	88
3.1	Der VEGF-Signalweg während der retinalen Angiogenese	89
3.2	Der Einfluss des VEGF-Signalwegs auf die retinalen Neurone	90
3.3	Der VEGF-Signalweg und Astrozyten	93
3.4	Der VEGF-Signalweg und die Veränderungen im vorderen Augenabschnitt	95
4	Zusammenfassung	100

Inhaltsverzeichnis

5	Anhang.....	102
5.1	Abbildungsverzeichnis.....	102
5.2	Tabellenverzeichnis.....	104
5.3	Abkürzungsverzeichnis	106
6	Literaturverzeichnis	109
7	Danksagung	121
8	Erteilung von Bildrechten.....	123
9	Erklärung.....	126

1 EINLEITUNG

1.1 ANATOMISCHE GRUNDLAGEN UND FUNKTIONEN DES AUGES

Das in der knöchernen Augenhöhle (Orbita) liegende Auge stellt eines der wichtigsten Sinnesorgane des Menschen dar, welches paarig ausgebildet ist, für die visuelle Verarbeitung von Sinneseindrücken zuständig ist und so das Sehen ermöglicht. Einerseits besteht das Auge aus dem annähernd kugeligen Augapfel (Bulbus oculi), andererseits aus den umgebenden Hilfs- und Schutzorganen wie den Augenlidern, der Bindehaut und der Tränendrüse (1,2). Außerdem sorgen verschiedene äußere Augenmuskeln für die Beweglichkeit des Bulbus (2). Der Nervus opticus (N. opticus) verbindet den Bulbus oculi mit dem Gehirn und sorgt so für die Weiterleitung der optischen Information (2). Die Wand des Augapfels ist aus drei Schichten aufgebaut, welche unterschiedliche Funktionen besitzen und eine unterschiedliche embryologische Herkunft besitzen: die kräftige Außenhülle (Tunica fibrosa bulbi), die Gefäßhaut (Tunica vasculosa bulbi oder Uvea) und die innere Augenhaut (Tunica interna bulbi) (2). Im Inneren des Bulbus befinden sich außerdem die Linse (Lens) und der Glaskörper (Corpus vitreum), welcher den Bulbus in seiner Form stabilisiert (2).

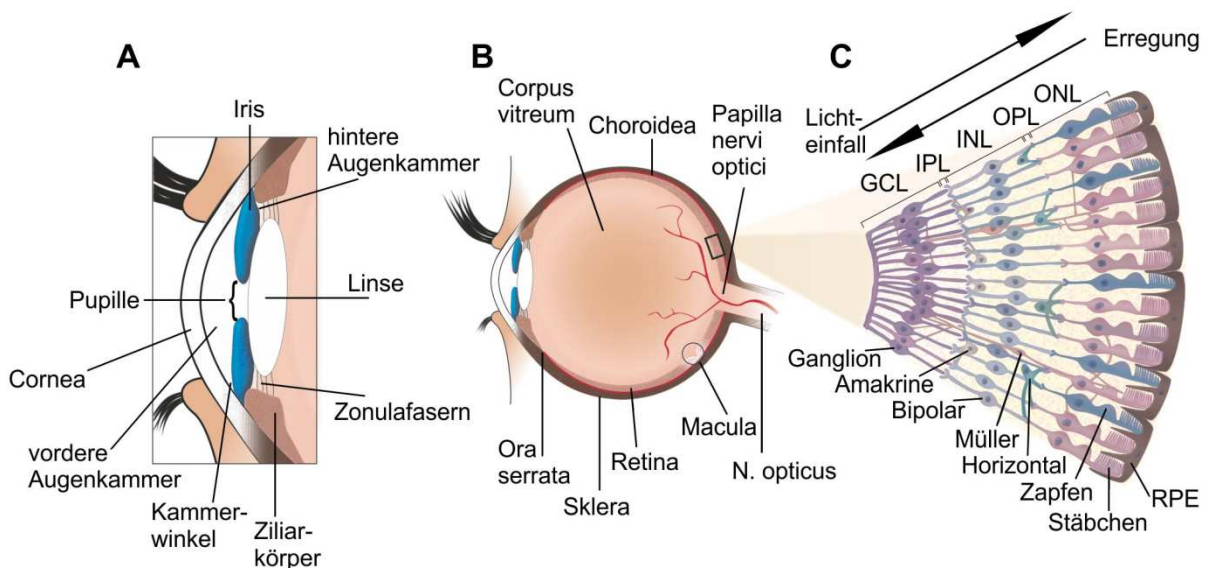


Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung des Auges

(A) Vergrößerung des vorderen Augenabschnittes **(B)** Übersichtsdarstellung des Bulbus oculi **(C)** Darstellung der ersten drei Projektionsneurone der Sehbahn mit ihrer zugehörigen Verschaltung sowie Darstellung der retinalen Schichtung

Einleitung

GCL = Ganglienzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere Körnerschicht, RPE = retinales Pigmentepithel

Abbildung mit Genehmigung übernommen von: Dr. med. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg und anschließend modifiziert (Genehmigung angefügt: 9. Erteilung von Bildrechten)

1.1.1 Äußere Augenhaut

Die äußere Augenhaut besteht aus der weißlichen Lederhaut (Sklera) sowie der transparenten Hornhaut (Cornea) (1,2). Die Sklera besteht aus straffem Bindegewebe und leistet so dem Augennendruck Widerstand (1). Des Weiteren dient sie als Ansatzpunkt für die äußeren Augenmuskeln, welche der Bewegung des Bulbus dienen (1). Im vorderen Teil des Augapfels wird diese Außenhülle durch die Cornea repräsentiert. Diese beiden Schichten gehen am Limbus corneae ineinander über (2). Die Cornea stellt ein wichtiges lichtbrechendes Medium dar, deren Brechkraft konstant ist und den größten Anteil der Gesamtbrechkraft des Auges ausmacht (3).

1.1.2 Mittlere Augenhaut / Uvea

Die blutgefäßreiche Uvea stellt die mittlere Augenschicht dar und besteht aus Aderhaut (Choroidea), Ziliarkörper und Irisstroma (1). Die Choroidea stellt die am stärksten durchblutete Region des menschlichen Körpers dar und dient der Ernährung der äußeren Schichten der Netzhaut (Retina) sowie der Temperaturregulation des Bulbus (2). An einem gezackten Rand im vorderen Drittel des Bulbus, der Ora serrata (OS), geht die Choroidea in den Ziliarkörper über, welcher sich wiederum bis zur Iriswurzel ringförmig im Bulbus darstellt und letztlich in die Iris übergeht (1,2). Die Choroidea gliedert sich histologisch in drei Schichten: die nerven- und gefäßführende Suprachoroidea (außen), das Stratum vasculare (Mitte) und die Kapillarschicht (Choriokapillaris) (innen) (1). An die Choriokapillaris schließt sich die, der inneren Augenhaut zugehörige, Netzhaut mit ihrer äußersten Schicht, dem retinalen Pigmentepithel (RPE), an (2). Dazwischen befindet sich die Bruch-Membran, die das RPE mit seiner Basalmembran fest aufsitzt (2) und den Nährstoffaustausch zwischen Choriokapillaris und den äußeren Sinneszellen der Retina in der Funktion als äußere Blut-Retinaschranke reguliert (4). Der Ziliarkörper besteht aus dem für die Akkommodation wichtigen Ziliarmuskel (M. ciliaris) sowie den für die Kammerwasserproduktion wichtigen Ziliarzotten, an welchen die Linse über die Zonulafasern verbunden ist (1). Der M. ciliaris hat seinen Ursprung im Sklerasporn und der Basalmembran des Cornealendothels (Descemet-Membran) und seinen Ansatz in den elastischen Fasern der Grenzschicht zwischen Ader- und Netzhaut (Bruch-Membran), wodurch diese die Antagonisten des M. ciliaris darstellen (1). Die ebenfalls dem

Einleitung

Ziliarkörper zugehörigen Ziliarzotten (Procc. ciliares) fungieren mit ihren feinen Zonulafasern (Fibrae zonulares) als Aufhängeapparat der Linse und sorgen bei Kontraktion bzw. Erschlaffung des M. ciliaris für den Akkomodationsvorgang (2). Andererseits wird den Procc. ciliares eine weitere wichtige Funktion zuteil: die Produktion des Kammerwassers (1). Dieses wird vom nicht pigmentierten Ziliarepithel der Procc. ciliares im Bereich der Augenhinterkammer gebildet und über die Pupille in die Augenvorderkammer transportiert, wo es letztlich hauptsächlich über Spalten des Trabekelwerks im Bereich des Kammerwinkels in den Schlemmkanal wieder abdrainiert wird (2). Dieses Ziliarepithel stellt neben dem pigmentierten Endothel der Iris und den Endothelzellen der Kapillaren (5) einen wesentlichen Anteil der Blut-Kammerwasser-Schranke dar. Diese sorgt für die Aufrechterhaltung der spezifischen Kammerwasserzusammensetzung (1). Des Weiteren werden die Linse und die Cornea durch das Kammerwasser mit Nährstoffen versorgt, da diese beiden Strukturen selbst nicht vaskularisiert sind (2). Physiologisch halten sich die Produktion und der Abfluss des Kammerwassers die Waage, sodass der auf der Innenwand des Augapfels lastende Druck (Augeninnendruck) relativ konstant zwischen 10 - 20 mmHg liegt und somit gleich bleibende Abstände des lichtbrechenden Systems im Auge vorherrschen (3). Den letzten Teil der Uvea stellt die Iris dar (2). Diese liegt vor der Linse und weist im Zentrum ein Loch, die Pupille, auf (1). Die Pupillenweite wird mit Hilfe der beiden inneren Augenmuskeln, M. dilatator pupillae und M. sphincter pupillae, wie auch durch den aktuellen Lichteinfall reguliert (2). Somit bildet die Iris eine Art Lochblende vor der Linse (2). Sie trennt den Bereich zwischen der Linse und der Cornea in eine hintere und eine vordere Augenkammer (2). Im Stroma der Iris liegen individuell unterschiedlich viele lichtabsorbierende, melaninhaltige Zellen (Melanozyten) vor, welche für die Augenfarbe eines Menschen verantwortlich sind (1). Außerdem befindet sich hier ein reich ausgebildetes Blutgefäßsystem, welches unter anderem der Temperierung des Kammerwassers dient (1).

1.1.3 Innere Augenhaut

Die innere Augenhaut gliedert sich im hinteren Teil des Bulbus in die lichtempfindliche Pars optica retinae und im vorderen Teil in die lichtunempfindliche Pars caeca retinae, welche an der OS ineinander übergehen (2). Die Pars caeca retinae wiederum besteht aus der Pars iridica und der Pars ciliaris retinae (1). Die Pars iridica retinae wird durch das zweischichtige Epithel der Irisrückseite gebildet und die Pars ciliaris retinae wird durch das zweischichtige Epithel der Rückseite des Ziliarkörpers gebildet, welche an die hintere Augenkammer grenzen und beide überwiegend Pigmente enthalten (1,2). Die insgesamt zehnschichtige Pars optica retinae kleidet von innen den Bulbus aus und wird in Anlehnung an die embryonale Augenentwicklung in zwei Retinablätter unterteilt, das äußere Retinablatt (Stratum pigmenti,

Einleitung

RPE) und das neuschichtige innere Retinablatt (Stratum nervosum), welches dem Glaskörper anliegt (1).

Die erste und äußerste Schicht, das RPE, besteht histologisch aus einem einschichtigen pigmentierten Epithel, an welches sich nach außen die Bruch-Membran anschließt (1). Die Zellen des Pigmentepithels sind lateral durch dichte Zellkontakte, sogenannte Zonulae occludentes, verbunden (1). Wesentliche Funktionen des RPEs stellen die Nährstoffversorgung der Photorezeptoren, der Abbau der Spitzen der Lichtsinneszellen als auch die Ausformung der äußeren Blut-Retina-Schranke dar, wodurch die Pars optica retinae vor Bestandteilen des Blutes der Choroidea geschützt wird (1). Dem RPE schließt sich nach innen das innere Retinablatt der Pars optica an, welches sich durch einen charakteristischen Schichtaufbau auszeichnet, sich als eine Ausstülpung des Zwischenhirns entwickelte und somit als ein in die Peripherie verlagerter Teil des zentralen Nervensystems zu verstehen ist (3). Die lichtempfindlichen Sinneszellen (Photorezeptoren) befinden sich außen und schließen somit an das RPE an (1,2). Daher muss das Licht zunächst alle weiter innen liegenden Schichten der Retina durchdringen, um letztlich das Umsetzen des Lichtimpulses in ein elektrochemisches Signal zu ermöglichen (2). Diese, durch das Licht ausgelösten, Aktionspotentiale werden dann dem Lichteinfall entgegen von außen nach innen zur Papilla nervi optici ("blinder Fleck") und letztlich dem N. opticus geleitet, welcher die Retina verlässt und in Richtung des Zwischenhirns verläuft (2). Die Photorezeptorzellen bestehen aus einem lichtrezeptiven Fortsatz, dem Perikaryon und dem Axon und werden in ihrer Gesamtheit als 1. Neuron bezeichnet (1). Es werden zwei Typen dieser Lichtsinneszellen unterschieden, Stäbchen (für das Hell-Dunkel-Sehen) und Zapfen (für das Farbsehen), wobei sich hierbei vor allem der nach außen gerichtete lichtrezeptive Fortsatz unterscheidet und für die Einteilung wesentlich ist (1). Diese Fortsätze gliedern sich in ein Innen- und ein Außensegment, bilden die äußerste Schicht des Stratum nervosums und liegen direkt dem RPE an (1). Die Rezeptorzellen sind an ihrem Übergang vom Innensegment zu ihrem Perikaryon mit den Spitzen der Müller-Gliazellen über Zonulae adhaerentes verbunden, was sich im histologischen Schnittbild als eine feine Linie, die äußere Gliagrenzmembran, darstellt (1). Die Zellkerne der Sinneszellen bilden die äußere Körnerschicht (ONL), deren kurze Axone in einer Synapsenregion, der äußeren plexiformen Schicht (OPL), enden (1). Dort findet die synaptische Übertragung auf das 2. Neuron, welches typischerweise eine bipolare Nervenzelle darstellt, statt (1). Es schließt sich die innere Körnerschicht (INL) an, in welcher die Perikaryen der bipolaren Nervenzellen, sowie die Zellkerne der Müller-Gliazellen, der amakrinen Zellen und der Horizontalzellen liegen (1). Die Müller-Gliazellen durchspannen die Retina von der äußeren bis zur inneren Gliagrenzmembran und fungieren unter anderem als retinale Stütz-

Einleitung

zellen (1). Insgesamt übernehmen die Müller-Gliazellen sehr vielfältige Aufgaben, so überwachen sie zum Beispiel die retinale Homöostase und tragen zur Struktur und Funktion der Netzhaut bei, indem sie unter anderem die äußeren Segmente der Zapfen phagozytieren (6). Die synaptische Verschaltung des 2. Neurons auf das 3. Neuron, welches eine Ganglienzelle darstellt, findet in der inneren plexiformen Schicht (IPL) der Retina statt (1). Daran schließt sich die Ganglienzellschicht (GCL) an, welche die Perikaryen der Ganglienzellen (1) und aberrante Amakrinzellen (7) beinhaltet. Es folgt die Nervenfaserschicht (NFL), welche die Axone der Ganglienzellen repräsentiert, die zur Papilla nervi optici ziehen, wo sie den Bulbus als N. opticus verlassen (2). Die innerste Schicht der Retina stellt die innere Gliagrenzmembran dar, welche aus den Zellfortsätzen der Müller-Gliazellen sowie Astrozyten besteht und die Retina vom Glaskörper abgrenzt (8) (graphische Darstellung der retinalen Schichten: Abbildung 1). Die Blutgefäßversorgung der Retina ist zweigeteilt: Die inneren Anteile der Retina werden durch die Zentralarterie, welche im Sehnerv verläuft und unter Abgabe kleiner Äste mit ihm zur Retina zieht, gewährleistet, wohingegen die äußeren Anteile durch die Choriokapillaris (Kapitel 1.1.2) sichergestellt werden (2,4,9,10). Um die Retina vor Bestandteilen des Blutes zu schützen und so die streng regulierte retinale Mikroumgebung zu erhalten, bilden sich Blut-Retina-Schranken aus, welche anatomisch aufgrund der zweigeteilten retinalen Blutversorgung in eine innere und eine äußere Blut-Retina-Schranke eingeteilt werden (4,11). Die äußere Blut-Retina-Schranke wird durch die RPE-Zellen, welche durch Tight-Junctions miteinander verbunden sind, gebildet (11). So wird eine Barriere zwischen den gefensterten Kapillaren der Choriokapillaris und den äußeren Anteilen der Retina gebildet (4). Die dazwischen liegende Bruch Membran ermöglicht eine gröÙenselektive passive Diffusion von Molekülen (12). Die innere Blut-Retina-Schranke besteht aus Tight-Junctions der Endothelzellen, die die Kapillaren der inneren Netzhaut auskleiden und als molekulare Schlüsselstrukturen für die Aufrechterhaltung der inneren Blut-Retina-Schranke sorgen (4,11). Diese werden von der Zentralarterie (A. centralis retinae) aus gespeist (4). Dieses sich immer weiter verzweigende Gefäßsystem bildet drei Gefäßplexus, den oberflächlichen, mittleren und tiefen Plexus. Der oberflächliche Gefäßplexus findet sich in der NFL, das mittlere Geflechtssystem in der inneren plexiformen Schicht und der tiefe Plexus in der äußeren plexiformen Schicht (4).

Als ein besonderer Bereich der Retina gilt die Macula lutea mit der Fovea centralis, auf welche das einfallende Licht fokussiert wird (1). Diese Stelle des schärfsten Sehens befindet sich etwas lateral der Papilla nervi optici und hier befinden sich ausnahmslos Zapfenzellen, welche vielfach 1:1:1 mit den bipolaren Nervenzellen und den Ganglienzellen verschaltet sind, wohingegen im restlichen Bereich der Retina eine höhere Konvergenz besteht (1,2).

1.2 DER VEGF-SIGNALWEG

Bis zum heutigen Tag wurden eine Vielzahl von angiogenen Molekülen mit ihren entsprechenden Signalwegen, welche die komplexen Prozesse der Angiogenese gewährleisten, identifiziert (13). Um ein physiologisches Gefäßwachstum zu gewährleisten, ist ein enges Zusammenwirken dieser wesentlich (13). Hierbei spielt auch der in dieser Arbeit untersuchte vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) eine bedeutende Rolle (14,15). Im Folgenden werden die sezernierten Liganden von VEGF und ihre entsprechenden Rezeptoren sowie Co-Rezeptoren differenzierter dargestellt, die eine zentrale Rolle für alle Aspekte der Gefäßentwicklung - von der anfänglichen Spezifizierung der Endothelzelllinie bis zur Gefäßbildung, der Angiogenese und dem Überleben der Endothelzellen - spielen (13).

1.2.1 Die VEGF-Familie und ihre zugehörigen Rezeptoren

Die Mitglieder der VEGF-Familie spielen eine wesentliche Rolle in der Entwicklung der Blut- und Lymphgefäße (16). Zu der VEGF-Proteinfamilie gehören bei Säugetieren VEGFa, VEGFb, VEGFc, VEGFd und der plazentare Wachstumsfaktor (PlGF) (16–18). Ferner sind die weiteren beiden Mitglieder, VEGFe (virales VEGF) und VEGFf (Schlangengift-VEGF) sowie das erst später entdeckte, aus endokrinen Drüsen stammende, Mitglied EG-VEGF der Vollständigkeit halber zu nennen (15,19). Jeder dieser Liganden weist ein charakteristisches Rezeptorbindungsprofil auf (14). Die VEGFs werden aus Polypeptiden gebildet, die wiederum ein Cystin-Knoten-Homodimer bilden, welches durch zwei intermolekulare Disulfidbindungen kovalent verbunden ist (14). Durch Bindung an eine ihrer endothelialen Rezeptortyrosinkinasen VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR1), VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2) oder VEGF-Rezeptor 3 (VEGFR3) stimulieren sie Angio- und Lymphangiogenese (14,20). Die VEGF-Rezeptoren bestehen aus sieben Immunglobulindomänen (14). Diese enthalten den ligandenbindenden Teil und eine gespaltene Tyrosinkinasedomäne, die wiederum die Wachstumsfaktorsignale weiterleitet (14). Hierbei bindet VEGF an die extrazelluläre Rezeptordomäne und fördert die Aktivierung des Tyrosinkinaseenzym in der intrazellulären Rezeptordomäne, welche die Tyrosinresiduen phosphoryliert und damit verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert (21). Verschiedene Mitglieder der VEGF-Familie können jedoch nicht nur mit den VEGF-Rezeptoren interagieren, sondern ebenfalls mit anderen Proteinen wie z. B. Neuropilinen, Integrinen, Cadherinen oder Heparansulfat-Proteoglycanen (15).

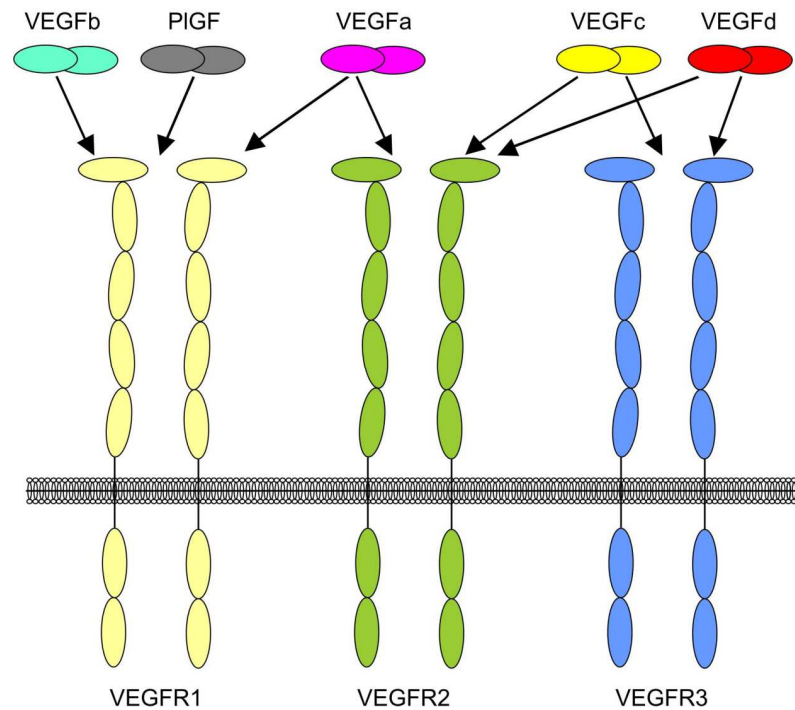


Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung der VEGF-Familie

Schematische und deutlich vereinfachte Darstellung der Hauptakteure des VEGF-Signalwegs mit zugehörigen Liganden und Rezeptoren. Jeder Ligand der VEGF-Familie weist ein charakteristisches Rezeptorbindungsmuster auf. Hierbei ist VEGFa der bedeutendste Ligand von VEGFR2. Die Aktivierung von VEGFR2 in Blutgefäßen stimuliert die Angiogenese und die Gefäßpermeabilität, während VEGFc und VEGFd über die Aktivierung von VEGFR3 die Lymphangiogenese stimulieren. VEGFR1 fungiert als negativer Regulator der Angiogenese, welcher unter anderem die VEGFa-Signalisierung durch VEGFR2 reguliert (14). Abbildung erstellt durch A. Grundl

Es werden mehrere Arten von VEGF-Liganden unterschieden, welche unterschiedliche Affinitäten zu den drei VEGF-Rezeptoren (VEGFR1, VEGFR2 und VEGFR3), verschiedenen Co-Rezeptoren und Heparansulfat-Proteoglykanen haben (14). Diese entstehen entweder, wie dies bei VEGFa der Fall ist, durch alternatives Spleißen der Ribonukleinsäure (RNA) oder, wie dies bei VEGFc und VEGFd der Fall ist, durch proteolytische Prozessierung (14). Der Ligand PIGF bindet nur an VEGFR1, wird vor allem in der Plazenta exprimiert und hat nur minimale angiogene Aktivität, ist jedoch in der Lage mit VEGF zu heterodimerisieren und dessen Wirkung zu modulieren (18,22). Obwohl verschiedene Liganden der VEGF-Familie angehören, richtet sich das hauptsächliche Augenmerk der Forschung auf VEGFa, da dieser Ligand eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Angiogenese in der Homöostase und bei verschiedenen Krankheiten innehat (23) und in der Literatur häufig unter dem Oberbegriff VEGF subsumiert wird. So ist VEGFa sowohl für die physiologische Homöostase der Gefäße in verschiedenen Geweben von entscheidender Bedeutung, als auch im Bereich von Tu-

Einleitung

morwachstum und Metastasierung sowie im Zusammenhang mit verschiedenen Augenerkrankungen wie zum Beispiel der altersbedingten Maculadegeneration (AMD) oder der diabetischen und hypertensiven Retinopathie (24). Der VEGFa-Ligand kann sowohl an den VEGFR1 als auch an den VEGFR2 binden und wird weitergehend in verschiedene Isoformen unterteilt, welche durch alternatives Exon-Spleißen entstehen (14). Hierbei unterscheidet man bei der Maus die bekannten drei Isoformen: einerseits VEGFa120 (human: VEGFa121 (14)), welches frei löslich vorliegt, weitergehend die Isoform VEGFa188 (human: VEGFa189 (14)), welches vollständig an die Matrix gebunden ist und letztlich VEGFa164 (human: VEGFa165 (14)), welches intermediäre Eigenschaften aufweist (25,26). Außerdem unterscheiden sich die Isoformen auch hinsichtlich ihrer Rezeptorbindungseigenschaften: so bindet VEGFa164 an den Co-Rezeptor Neuropilin-1, wohingegen VEGFa120 dies unterlässt (25). VEGFb bindet nur an VEGFR1 und stellt einen starken Überlebensfaktor für verschiedene Zelltypen dar, indem er die Apoptose durch Unterdrückung einiger zelltodbezogener Gene hemmt (14). Für das Wachstum der Blutgefäße in den meisten Organen spielt VEGFb eine vernachlässigbare Rolle, jedoch ist er für das Überleben der Blutgefäße von entscheidender Bedeutung (14). Insgesamt betrachtet gilt VEGFb als das Mitglied der VEGF-Proteinfamilie, das eine starke antiapoptotische Wirkung hat, wohingegen ihm die allgemeine angiogene Aktivität fehlt (27). Mechanistisch gesehen ist das wichtigere Merkmal von PlGF und VEGFb jedoch, dass ihre Bindung an VEGFR1 die Verfügbarkeit von VEGFa für die VEGFR2-Bindung und -Aktivierung erhöht (18,28). VEGFc und VEGFd sind in erster Linie an der Regulation der Lymphangiogenese beteiligt, indem sie den VEGFR3 aktivieren (29). Sie gelten als die primären Wachstumsfaktoren, die die Entwicklung der Lymphgefäße steuern und über VEGFR3 signalisieren (16). VEGFc und VEGFd können jedoch nach proteolytischer Spaltung ebenfalls an VEGFR2 binden (17,30).

Einleitung

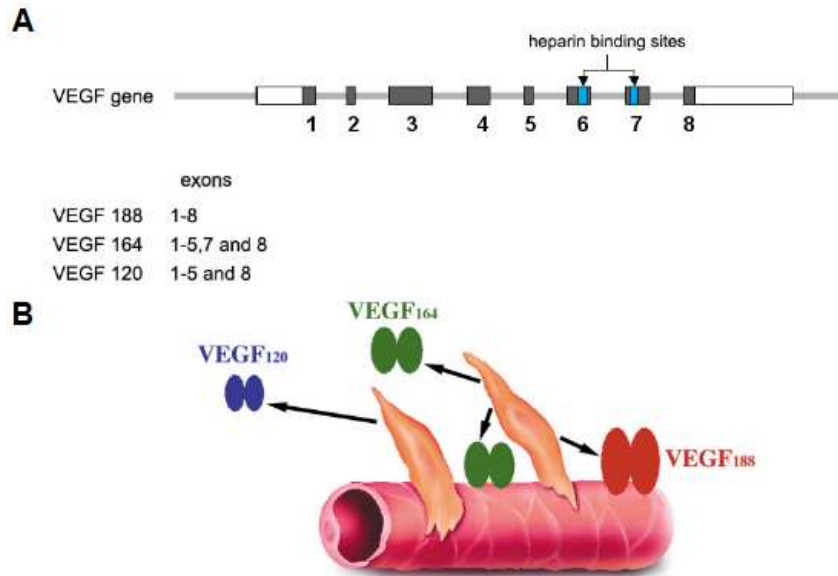


Abbildung 3: Struktur und extrazelluläre Lokalisation der drei hauptsächlichsten Isoformen von VEGFa

(A) Sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen werden die verschiedenen VEGFa-Isoformen mittels alternativem Splicing eines Gens gebildet (B) Die Fähigkeit der Isoformen, in den Extrazellularraum zu diffundieren, ist abhängig von der Anwesenheit von Heparinbindungsstellen. Während VEGFa₁₂₀ keine heparinbindenden Domänen enthält und frei diffundierbar ist, ist VEGFa₁₈₈ an die extrazelluläre Matrix der VEGF-produzierenden Zelle gebunden.

Abbildung mit Genehmigung übernommen aus: Saint-Geniez et al, 2004 (9), (Genehmigung angefügt: 9. Erteilung von Bildrechten)

VEGFR1 und VEGFR2 sind hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert (23), wohingegen VEGFR3 ab Beginn der Entwicklung des lymphatischen Systems überwiegend auf lymphatischen Endothelzellen exprimiert wird (31). Obwohl VEGFa zwar mit hoher Affinität an VEGFR1 bindet, signalisiert jedoch VEGFa in erster Linie über VEGFR2 (16), sodass dieser als der wichtigste Signalrezeptor für VEGFa gilt (32), dessen Aktivierung die Mitogenese und Permeabilität vaskulärer Endothelzellen fördert (23). Hierbei erscheint ganz wesentlich, dass der VEGFR1 aufgrund seiner relativ schwachen Kinaseaktivität als negativer Regulator der VEGFa-Signalübertragung gilt, indem er die Menge an freiem VEGFa begrenzt, die für die Bindung an VEGFR2-Homodimere zur Verfügung steht (14,17,18,28). Auch scheint der VEGFR1 eine wichtige Rolle bei pathologischer Angiogenese (z. B. Tumoren, Entzündungen etc.) im Adulten zu spielen (15,19). Obwohl eine gewisse Präferenz der Liganden für einen bestimmten Rezeptor vorliegt, so besteht dennoch zu einem gewissen Ausmaß auch ein wechselseitiger Austausch, sodass insgesamt keine ausschließliche Bindung eines der zur VEGF-Familie gehörigen Liganden mit einem bestimmten Rezeptor vorliegt (16). Außerdem modulieren einige VEGF-Co-Rezeptoren die Dauer und Qualität der VEGF-Signalkaskade

Einleitung

durch die Bildung eines VEGF-Gradienten sowie durch die Stabilisierung des Signalkomplexes (26). So können auch Heparin-bindendes VEGFa oder PlGF an den Co-Rezeptor Neuropilin 1 binden, was wiederum ihre Bindungsaffinität zum VEGFR2 erhöhen kann (15,23). Der Co-Rezeptor Neuropilin 2 spielt eine ähnliche Rolle bei der Regulierung der Lymphangiogenese durch seine Wechselwirkungen mit VEGFR3 (23,26). Die allgemeine VEGF-Expression seinerseits wird koordiniert durch Hypoxie-regulierte Gene und Faktoren (z. B. Hypoxie-induzierter Faktor (HIF), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) oder platelet-derived growth factor (PDGF) sowie onkogene Mutationen (23).

1.2.2 Physiologische Funktionen sowie pathologische Konsequenzen von VEGF am Auge

Die Entwicklung von Blutgefäßen sowie die Bildung von Gefäßmustern werden durch verschiedene Signalmoleküle gesteuert. Hierbei spielen unter anderem der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β), Angiopoetin-1 und -2 (Ang-1 und -2) sowie auch VEGF eine wichtige Rolle (33). Die Entdeckung von VEGF und der anschließende Nachweis, dass die VEGF-Produktion räumlich und zeitlich in den Bereichen der Gefäßentwicklung lokalisiert ist, lieferte starke Beweise dafür, dass VEGF die treibende Kraft bei der Angiogenese und bei der ischämischen/hypoxischen Regulierung der retinalen Gefäße ist (23). So produzieren und synthetisieren verschiedene Zellen der Retina VEGF, darunter Müller-Gliazellen, Astrozyten, Endothelzellen, Perizyten, Zellen des RPEs und retinale Ganglienzellen (RGC) (5,34). Ebenfalls wird in der Literatur postuliert, dass hypoxische Astrozyten während der Entwicklung der Netzhaut VEGF sezernieren, welches wiederum wachsende Endothelzellen anzieht, wenn diese radial aus dem Sehnervenkopf (ONH) wandern (35) und so die Bildung des oberflächlichen Plexus, einen Teil des von der A. centralis retinae gespeisten retinalen Gefäßsystems (4), antreiben (9). Auch zur Ausbildung der beiden tieferen Plexus der Retina ist die VEGF-Expression wesentlich; hierbei erfolgt diese durch Zellen in der INL, höchstwahrscheinlich Müller-Gliazellen (36). Die Transkription des VEGF-Gens wird durch HIFs gesteuert, die durch eine Gewebhypoxie stabilisiert werden und so als eine Art interzellulärer Sauerstoffsensoren fungieren (37). Das sezernierte VEGF bewirkt die Bildung der Netzhautgefäße, deren ausreichende Funktion letztlich den hypoxischen Reiz für die Gefäßbildung verringert und so das Sauerstoffangebot an den Bedarf anpasst (36). Durch die Kontrolle der Sezernierung von VEGF durch die HIFs wird sichergestellt, dass das Gewebewachstum bzw. Gefäßwachstum genau dort stattfindet, wo und wann dieses benötigt wird (35). So kann je nach Ausmaß der Aktivierung dieses HIF/VEGF-Systems im Kontext des Entwicklungsstadiums das Ergebnis ein Gefäßwachstum, eine Stabilisierung oder eine Rückbildung sein (35). Auch das choroidale Gefäßsystem,

Einleitung

das die äußere Netzhaut mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt, mit seiner Choriokapillaris wird durch das RPE mit VEGF versorgt (9,38). Dies ist entscheidend sowohl für die Entwicklung der Aderhautgefäße als auch im Adulten für die Aufrechterhaltung der Fenestrierung der Choriokapillaris (38). Jedoch ist VEGF nicht nur für die regelrechte Angiogenese und Aufrechterhaltung der retinalen Gefäße von essentieller Bedeutung (38), sondern scheint auch neuroprotektive Eigenschaften am Auge innezuhaben (39). So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von VEGFa an VEGFR2 und die folgende Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalwegs notwendig ist, um das Überleben der RGC zu fördern (39). Diese Wirkung ist als neuroprotektiv einzuordnen und stellt eine wirksame Glaukomprävention dar (39).

Die VEGF-Signalübertragung ist jedoch nicht nur für physiologische Vorgänge wesentlich, sondern ist ebenfalls mit der Pathogenese verschiedener Krankheiten in Verbindung zu bringen. So fördert z. B. VEGFa die Angiogenese, Entzündungen, eine Schädigung der Blut-Retina-Schranke und letztlich einen Visusverlust bei Menschen mit Erkrankungen wie z. B. der Frühgeborenenretinopathie, der diabetischen Retinopathie und der feuchten Spätform der AMD (40). Hierbei liegen okuläre Neovaskularisationen vor, wovon zwei Haupttypen voneinander unterschieden werden können: einerseits retinale Neovaskularisationen (NV) und andererseits subretinale bzw. choroidale NV (41). Bei ischämischen Retinopathien, die als Folge von Erkrankungen wie z. B. der diabetischen Retinopathie und retinalen Venenverschlüssen auftreten, kommt es aufgrund einer Ischämie der Netzhaut zu retinalen NV (41). Subretinale bzw. choroidale NVs treten bei Erkrankungen der äußeren Netzhaut und der Bruchschenn Membran auf (41). Hierbei gilt die AMD als der häufigste Vertreter dieser Gruppe (41). Um die molekulare Pathogenese dieser Erkrankungen differenzierter zu untersuchen, kamen insbesondere Mausmodelle zum Einsatz. Hierbei konnten beträchtliche Überschneidungen ausgemacht werden, da in allen Fällen ursächlich eine Stabilisierung von HIF-1 vorlag, was wiederum zu einer Hochregulation von verschiedenen hypoxieregulierten Genprodukten führte, worunter VEGF als ein sehr wesentlicher angiogener Faktor zu nennen ist (41).

1.3 DIE GEFÄßENTWICKLUNG IM MAUSAUGE

Bei der Entwicklung der Blutgefäße lassen sich grundsätzlich zwei Prozesse unterscheiden, die Vaskulogenese und die Angiogenese (9). Die Vaskulogenese stellt die Bildung von Blut-

Einleitung

gefäßen während der Embryogenese dar, wohingegen bei der Angiogenese neue Gefäße durch Sprossung aus bereits bestehenden Gefäßen entstehen (9,42–44). Während der initialen Entwicklung des Auges wird die Oxygenierung der Retina durch choroidale Gefäße und das hyaloide Gefäßsystem sichergestellt (9). Das hyaloide Gefäßsystem ist ein dichtes, aber vorübergehendes embryonales intraokuläres Gefäßsystem, welches bei Säugetieren zum Zeitpunkt der Geburt vollständig ausgebildet ist und sich zeitgleich mit der Bildung des finalen retinalen Gefäßsystems zurückbildet (9). Zu Beginn des intraokulären Vaskularisierungsprozesses zweigen zunächst die primitiven dorsalen und ventralen Arterien des Auges von der A. carotis interna ab (9). Die Hyaloidarterie entspringt aus der primitiven dorsalen Augenarterie und führt durch die Embryonalspalte in den ONH (9). Hierbei erstreckt sich die Hyaloidarterie binnen kurzer Zeit durch den primitiven Glaskörper und erreicht den hinteren Pol der sich bildenden Linse (9). Es entwickelt sich ein dichtes Kapillarnetzwerk, die Tunica vasculosa lentis, welches sich immer weiter ausdehnt, den vorderen Teil der Linse erreicht, die Pupillarmembran bildet und letztlich eine Anastomose mit dem choroidalen Gefäßsystem am vorderen Rand des Augenbechers herstellt (9,10). Alle hyaloiden Gefäße stellen Arterien dar, der venöse Abfluss erfolgt über choroidale Venen (9). Das Blut verlässt hierbei das Augeninnere im vorderen Augenabschnitt, wo es über venöse choroidale Gefäße drainiert wird (9,10).

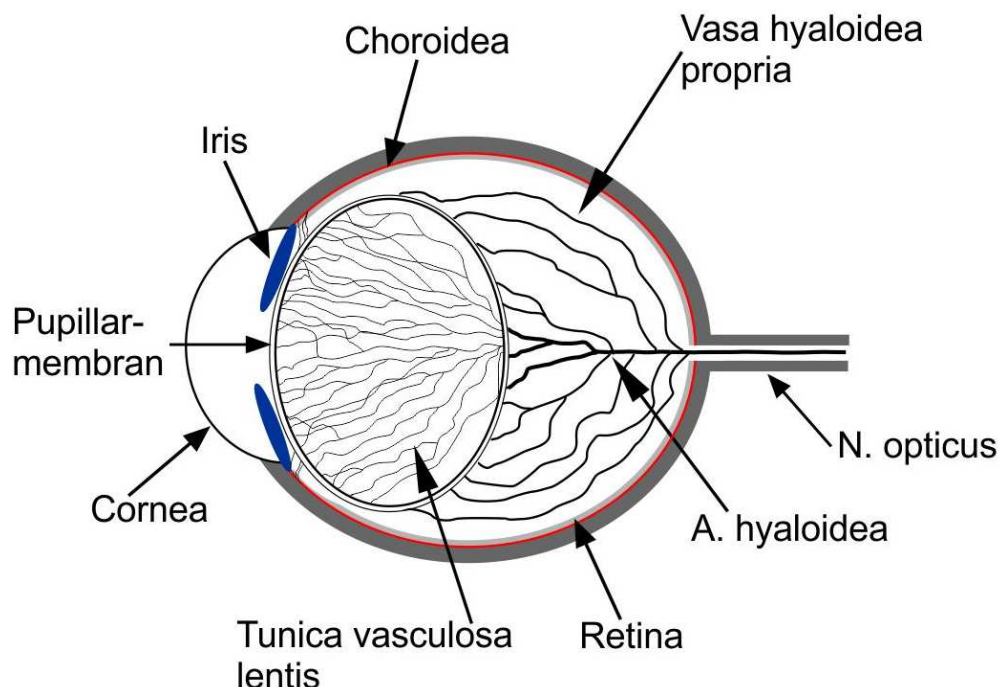


Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung der embryonalen intraokulären Gefäße

Das embryonale intraokuläre Kreislaufsystem, das die noch unreife Linse, die Netzhaut und den Glaskörper ernährt, besteht aus der Hyaloidarterie, der Tunica vasculosa lentis, der Vasa hyaloidea propria und der

Einleitung

Pupillarmembran. Der venöse Abfluss erfolgt über das choroidale Gefäßsystem. Abbildung erstellt durch A. Grundl

In der weitergehenden Entwicklung wird die hyaloide Gefäßstruktur allmählich durch die sich bildende retinale Gefäßstruktur ersetzt, welche sowohl Arterien als auch Venen enthält (10). Dieses neue Gefäßgeflecht entspringt aus der A. centralis retinae im ONH, breitet sich von zentral nach peripher in der retinalen NFL über die innere Oberfläche der Netzhaut aus und stellt den primären retinalen Gefäßplexus dar (10). Bei Mäusen erreicht dieser primäre Gefäßplexus ca. am postnatalen Tag 8 (P8) die Netzhautperipherie (10). Dieser primäre Gefäßplexus entwickelt sich anschließend weiter und bildet letztlich drei parallele, jedoch zahlreich untereinander verbundene Plexus, welche auch die tieferen retinalen Strukturen versorgen können (10). Schlussendlich finden sich diese bei adulten Tieren in der NFL (primärer Plexus, oberflächlicher Plexus), in der IPL (innerer tiefer Plexus, Intermediärplexus) und in der OPL (äußerer tiefer Plexus, tiefer Plexus) sodass nach Abschluss der Gefäßentwicklung die inneren Teile der adulten Neuroretina durch diese drei Gefäßgeflechte versorgt werden (10). Den äußeren Retinabereich versorgen die Aderhautgefäße, die sich in ihrer Funktion von den intraretinalen Gefäßplexus unterscheiden, wobei die Barrierefunktion der retinalen Gefäße im Kontrast zu den fenestrierten Gefäßen der choroidalen Gefäße den größten Funktionsunterschied darstellt (9). Das Gefäßsystem der Aderhaut entwickelt sich bereits bei der Einstülpung der Sehnervenblase, wobei sich ein großes Gefäßgeflecht aus primitiven Gefäßen bildet, die wiederum aus dem Neuralrohr stammen, sich um die äußere Schicht des ONHs herum anlagern und sich vom hinteren Pol bis nach vorne in Richtung des vorderen Augenabschnittes hin ausbreiten (9). Am vorderen Rand des Augenbechers bildet der Plexus choroidalis eine Anastomose und formiert ein ringförmiges Gefäß, das Ringgefäß, welches in der weitergehenden Entwicklung weiter differenziert ausgebildet wird (9). Die Aderhautgefäße verbinden sich mit den hinteren Ziliararterien, die Vortexvenen, die den Plexus drainieren, entwickeln sich und die endgültige Choriokapillarisschicht erscheint (9).

Einleitung

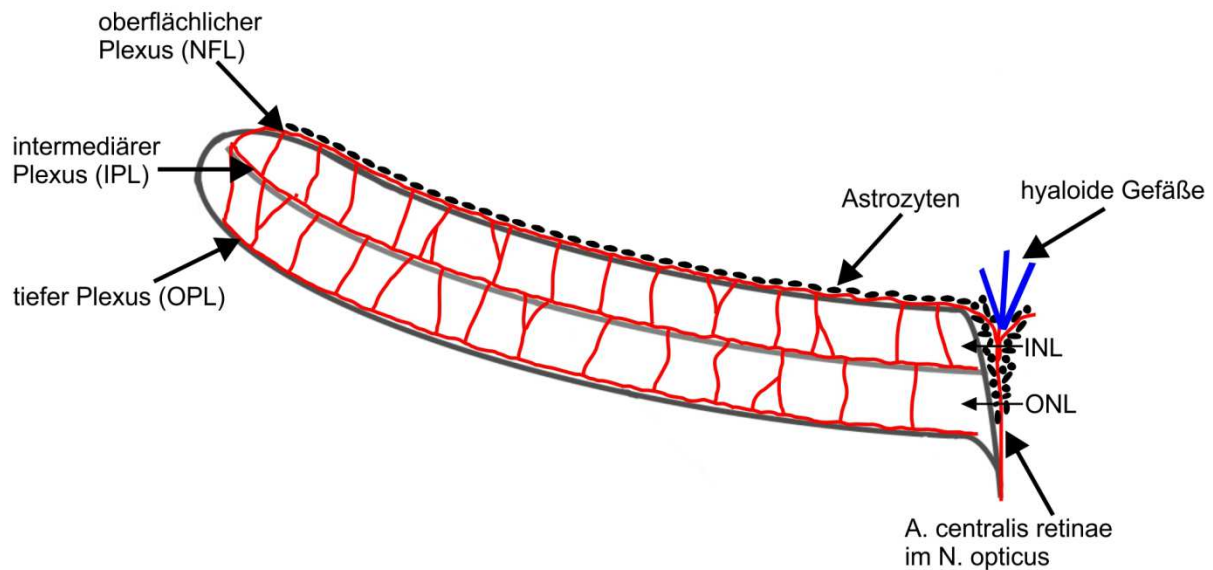


Abbildung 5: Vereinfachte schematische Darstellung der intraretinalen Gefäße

Die retinalen Gefäße zur Versorgung der inneren Anteile der Retina werden durch die A. centralis retinae aus dem N. opticus gespeist und gliedern sich in einen oberflächlichen, einen intermediären und einen tiefen Plexus. Abbildung erstellt durch A. Grundl

NFL = Nervenfaserschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere Körnerschicht

Während der Netzhautentwicklung führt die Reifung der neuronalen Netzhaut zu einer "physiologischen Hypoxie" (9,45), was wiederum den Anstoß der finalen retinalen Vaskularisation mit dem Beginn der Entwicklung des primären Plexus zur Folge hat (9). Hierbei spielen Astrozyten, welche aus dem ONH austreten, eine maßgebliche Rolle (10). Sie reagieren auf die Hypoxie, indem sie den angiogenen Faktor VEGF exprimieren, was wiederum die Bildung des oberflächlichen Plexus fördert (9), da die Endothelzellen das VEGF Signal mit ihrem VEGFR2 detektieren und so dem, von den Astrozyten gebildeten, VEGF-Gradienten folgen (35). Hierbei verbreiten sich die Astrozyten im weiteren Verlauf zentrifugal über die innere Oberfläche der Netzhaut und bilden so ein Netzwerk, welches dann als eine Vorlage für die Blutgefäße fungiert (10,46). Anschließend induziert eine zweite Welle der neuronalen Aktivierung unter anderem eine erneute VEGF-Sekretion in der inneren Körnerschicht, was ein Aussprossen und darauffolgendes Eindringen der Gefäße des oberflächlichen Plexus in die Tiefe der Retina auslöst und so die Bildung der tiefen Gefäßgeflechte initiiert (9,10). Dieser Prozess der Aussprossung aus dem primären Plexus beginnt etwa eine Woche nach der Geburt in der Mitte der Netzhaut und dehnt sich zur Peripherie hin aus (10). Die aussprossenden Endothelzellen wachsen zunächst entlang der Müllerzellfortsätze senkrecht in die Tiefe der Netzhaut und wachsen anschließend parallel zum primären Plexus einerseits in der

Einleitung

IPL und andererseits in der OPL in die Peripherie, um zwei weitere Gefäßgeflechte parallel zum primären Plexus zu formieren (10). Im Gegensatz zum primären Plexus entwickelt sich der tiefe Plexus unabhängig von den retinalen Astrozyten (10). Hierbei bildet sich zunächst das Gefäßgeflecht in der OPL in der zweiten postnatalen Woche und das intermediäre Gefäßgeflecht in der IPL in der dritten postnatalen Woche (46). In diesem Fall findet die VEGF-Sekretion durch Somatas in der INL, höchstwahrscheinlich von Müller-Gliazellen statt (36). Sobald das retinale Gewebe ausreichend vaskularisiert ist, reduziert sich die VEGF-Expression über einen lokalen Rückkopplungsmechanismus, die neu gebildeten Gefäße werden stabilisiert und das weitere Gefäßwachstum reduziert (36).

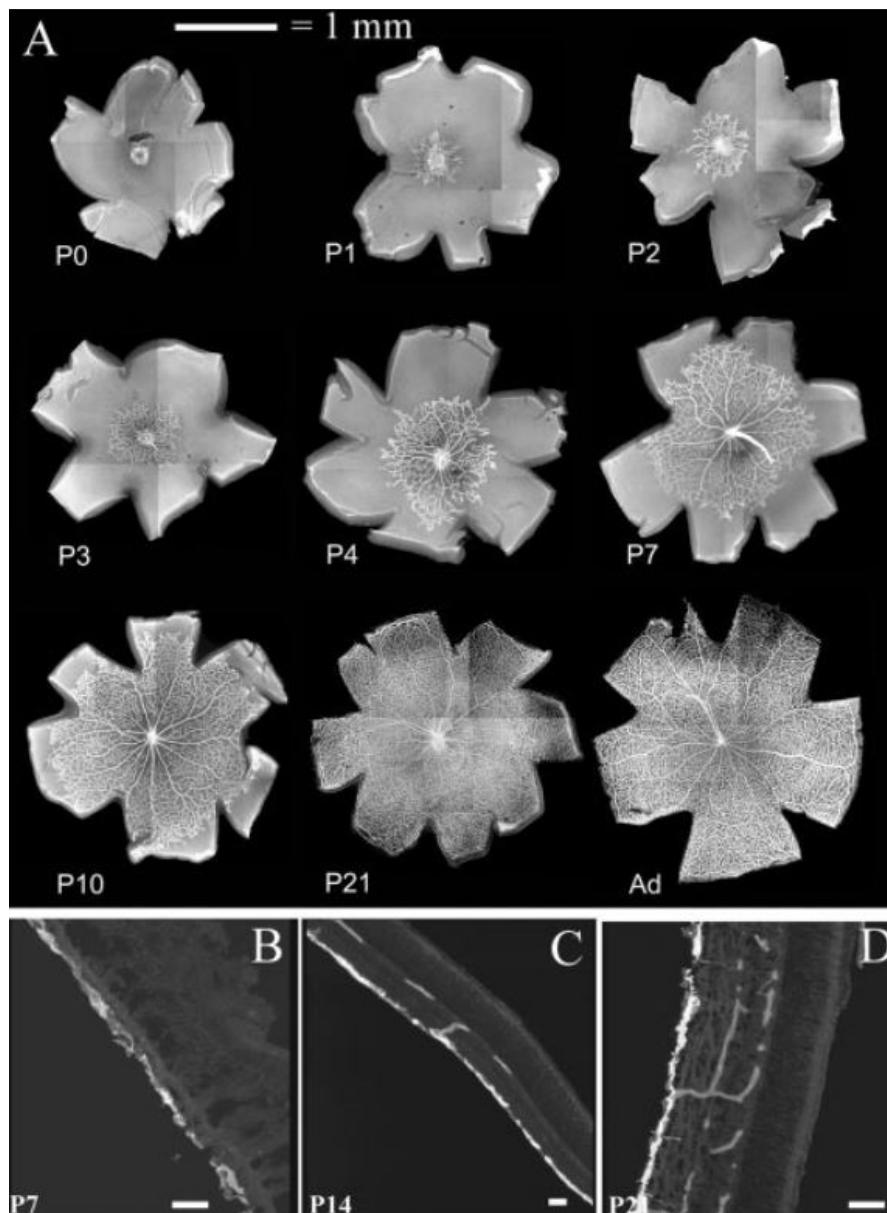


Abbildung 6: Entwicklung der Netzhautgefäße der Maus

(A) Visualisierung des retinalen Gefäßsystems durch immunhistochemische Färbung von Collagen IV. Bei Geburt (P0) ist das intraretinale Gefäßsystem der Maus noch nicht vorhanden, erst in den ersten Lebenswochen bildet

Einleitung

sich das endgültige intraretinale Gefäßsystem aus. Hierbei wandern die Endothelzellen von der zentralen Retina in die Peripherie. **(B-D)** Collagen IV-Färbung der Blutgefäße von Netzhautquerschnitten zur Visualisierung der tiefen Gefäßgeflechte. **(C)** Verzweigung der Gefäße und Auswanderung aus der primären oberflächlichen Gefäßschicht, um das sekundäre tiefe Gefäßgeflecht am äußeren Rand der inneren Körnerschicht zwischen P7 und P10 zu bilden. **(D)** Bildung des tertiären intermediären Gefäßplexus zwischen dem oberflächlichen und dem tiefen retinalen Plexus am inneren Rand der inneren Körnerschicht in der dritten postnatalen Woche. Abbildung mit Genehmigung übernommen aus Dorrell et al., 2002 (46) (Genehmigung angefügt: 9. Erteilung von Bildrechten)

1.3.1 Molekulare Mechanismen retinaler Angiogenese

Um die Entwicklung des primären Plexus differenzierter auf molekularer Ebene zu beleuchten, ist die Interaktion zwischen Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen maßgeblich. So veranlasst ein durch HIF-1 α in der Retina wahrgenommener Sauerstoffmangel die RGCs zur Expression des Thrombozyten-Wachstumsfaktors A (PDGFA) (47). Dies wiederum fördert, via Signalisierung über den Thrombozyten-Wachstumsfaktorrezeptor- α (PDGFR- α) auf Astrozyten (48), die Astrozytenproliferation und -migration vom ONH in Richtung der Netzhautperipherie in der NFL (47). Diese wandernden Astrozyten wiederum sezernieren VEGF und locken dadurch Endothelzellen durch die Signalisierung via VEGFR2 an (9,47). Die migrierenden Endothelzellen entlasten die Hypoxiesituation in der Retina einerseits und sezernieren zum anderen den leukemia inhibitory factor (LIF) (47). LIF seinerseits stimuliert die Astrozytendifferenzierung in der Retina, da zu Beginn der retinalen Angiogenese zunächst astrozytäre Vorläuferzellen und unreife Astrozyten vom ONH in die retinale Peripherie auswandern und sich diese erst im Laufe ihrer Einwanderung weiter zu adulten Astrozyten differenzieren (47).

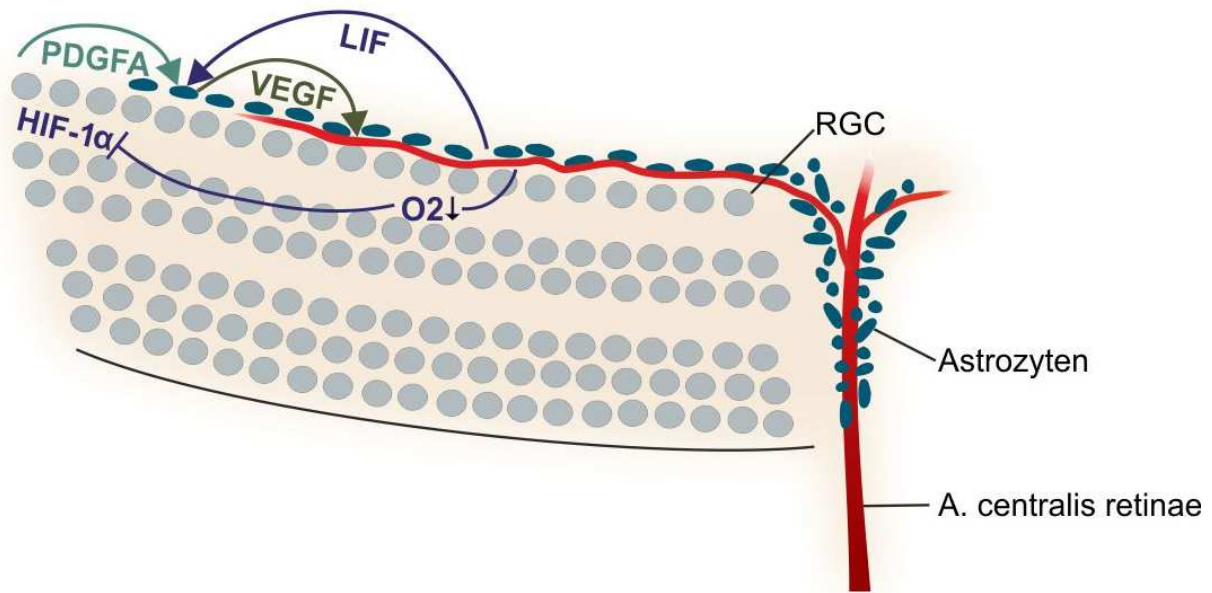


Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung der molekularen Mechanismen retinaler Angiogenese

Zusammenspiel von Astrozyten, Endothelzellen und Neuronen. Der durch HIF-1 α in der Neuroretina wahrgenommene Sauerstoffmangel veranlasst die RGCs zur Expression von PDGF-

A, was die Proliferation und Migration von Astrozyten zur Besiedlung der Netzhaut fördert. Astrozyten sezernieren unter anderem VEGF und locken dadurch Endothelzellen während der Angiogenese an. Die eingewanderten Endothelzellen formieren sich zu ersten unreifen Gefäßen und entlasten die Hypoxiesituation. Außerdem exprimieren sie LIF, was wiederum die Reifung der Astrozyten fördert. Abbildung erstellt durch A. Grundl

RGC = retinale Ganglienzellen, LIF = Leukämie-inhibitorischer Faktor, PDGFA = Thrombozyten-Wachstumsfaktor-A, HIF-1 α = Hypoxie-induzierter Faktor 1, subunit alpha, VEGF = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, O₂ = Sauerstoff

1.4 ZIEL DIESER ARBEIT

Die Zielsetzung dieser Arbeit war den Einfluss des VEGF-Signalwegs auf die postnatale Gefäßentwicklung und Homöostase im Auge der Maus zu untersuchen. Viele ophthalmologische Erkrankungen wie z. B. die proliferative diabetische Retinopathie (PDR), die feuchte Spätform der AMD oder die Frühgeborenenretinopathie (ROP) gehen mit Gefäßproliferationen am Auge einher (40). Es ist ferner bekannt, dass erhöhte VEGFa-Spiegel maßgeblich die, bei diesen Erkrankungen zu beobachtenden, pathologischen Gefäßproliferationen verursachen (49–52). In dieser Arbeit wurde mit konditionellen Knockout-Mäusen für den VEGFR2, welcher essentiell für den VEGF-Signalweg ist (14,15), gearbeitet, mit dem Ziel dessen Einfluss auf die retinale Gefäßentwicklung und Homöostase zu untersuchen. Hierzu wurden eine homozygot gefloخته VEGFR2-Maus, bei der Teile des Zielgens (Exon 3) mit

Einleitung

loxP sites flankiert wurden, mit einer durch Tamoxifen induzierbaren Cre Maus (Jackson Labs) verpaart. Nach der lokalen Applikation von Tamoxifen-Augentropfen ab dem ersten postnatalen Tag (P1) wurde die Cre-Rekombinase aktiviert, was letztlich nach dem Schneiden zur Deletion des Zielproteins (VEGFR2) führte.

Durch die daraus resultierende Inhibition des VEGF-Signalwegs während der retinalen Angiogenese gelang es somit die Gefäßentwicklung bei defizientem VEGFR2 im Mausauge zu untersuchen. Hierbei wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst generell die Aktivität der Cre-Rekombinase anhand von Cre-Reportermausen (Rosa-LacZ Reportermause; R26R) im gesamten Auge nachgewiesen. Ferner wurde sowohl auf Protein- als auch auf messengerRNA (mRNA)-Ebene der erfolgreiche Knockdown des VEGFR2 in den Versuchstieren nachgewiesen. Anschließend wurde eine Phänotyp-Analyse der Versuchstiere sowohl auf makroskopischer Ebene als auch auf mikroskopischer Ebene durchgeführt und dabei auf morphologische Veränderungen am Auge fokussiert. So wurden im Bereich der Retina morphometrische Untersuchungen der verschiedenen retinalen Schichten durchgeführt, diese durch TUNEL-Analysen ergänzt und die Gefäßentwicklung mittels transkardialen Perfusionen von hochmolekularem FITC-Dextran analysiert. Des Weiteren wurden differenziertere Untersuchungen der retinalen Astrozyten durchgeführt, welche im Rahmen der funktionellen, physiologischen Gefäßentwicklung eine entscheidende Rolle spielen. Auch im Bereich des vorderen Augenabschnitts wurden mikroskopische Untersuchungen der Gefäße durchgeführt, um die pathologischen Auswirkungen des VEGFR2-Knockdowns aufzuarbeiten. Außerdem wurden die gewonnenen Daten durch molekularbiologische Methoden auf mRNA- und Proteinebene differenzierter analysiert und gestützt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIALLISTE

2.1.1 Reagenzienliste

Bezeichnung	Bezugsquelle
2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (DMP-30)	Serva, Heidelberg, Deutschland
2-Dodecenyln-Bernsteinsäureanhydrid (DDSA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
10x Polymerase-Kettenreaktion (PCR)Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Azur II	Merck, Darmstadt, Deutschland
BCA Assay Reagenz A+ B	Interchim, Wörgl, Österreich
BCA Assay Reagenz 1+2	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bleicitrat	Science Services, München, Deutschland
Bleinitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie ® Brillant Blue R-250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Epon	Serva, Heidelberg, Deutschland
Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran)	TdB Labs AB, Uppsala, Schweden
Fluorescein	Qiagen, Hilden, Deutschland
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutaraldehyd, 25% in H ₂ O	Serva, Heidelberg, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glyzerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glyzidether	Serva, Heidelberg, Deutschland
Guanidinhydrochlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Material und Methoden

Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumferrocyanid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketamin	Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte (WDT), Garbsen, Deutschland
Kresolrot	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Luminata™ Forte, Western Blot HRP	Millipore Corporation, Billerica, USA
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) 50mM	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Maisöl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methylenblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methylnadinsäureanhydrid (MNA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Osmiumtetroxid	Science Services, München, Deutschland
Paraffin	Engelbrecht, München, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
peqGold TriFast™ (Trizol)	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Phosphatase-Inhibitor Mix	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Protease-Inhibitor Mix	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rotiphorese®Gel 30	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Spersacarpin 2% Augentropfen	OmniVision GmbH, Puchheim, Deutschland
SYBR-Green I	Qiagen, Hilden, Deutschland
Tamoxifen	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Tergitol NP-40	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tissue-Tek®	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Tris Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween-® 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Uranylacetat	Serva, Heidelberg, Deutschland
Urea	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasser ROTISOLV® (RNase-frei)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
X-Gal	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylazin	Serumwerk Bernburg, Bernburg, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 1: Reagenzien

2.1.2 Enzyme, Taq Polymerasen und handelsübliche Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	Promega, Madison, Wisconsin, USA
iScript™ cDNA Synthese Kit	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Mango Taq DNA-Polymerase	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Proteinase K	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taq DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland

Tabelle 2: Enzyme, Taq Polymerasen und handelsübliche Kits

2.1.3 Molekulargewichtsstandards

Bezeichnung	Bezugsquelle
EZ-Run vorgefärbte Rec Protein Leiter	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
GeneRuler 100 bp Plus DNA Leiter	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

Tabelle 3: Molekulargewichtsstandards

2.1.4 Oligonukleotidprimer zur Genotypisierung

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz (5' - 3')
CAG-Cre	Mus musculus	vorwärts (fwd)	ATGCTTCTGTCCGTTTGCCG
CAG-Cre	Mus musculus	rückwärts (rev)	CCTGTTTTGCACGTTACCG
Vegfr2	Mus musculus	fwd	CCACAGAACAACCTCAGGGCTA
Vegfr2	Mus musculus	rev	GGGAGCAAAGTCTCTGGAAA
Rosa26-LacZ	Mus musculus	fwd	ATCCTCTGCATGGTCAGGTC
Rosa26-LacZ	Mus musculus	rev	CGTGGCCTGATTCATTCC

Tabelle 4: Oligonukleotidprimer zur Genotypisierung

2.1.5 Oligonukleotidprimer zum Einsatz bei quantitativer Echtzeit-PCR

Primer	Spezies	Orientierung	Position	Sequenz (5' - 3')
Ang2	Mus musculus	fwd	1178-1197	CACACTGACCTTCCCCAACT
Ang2	Mus musculus	rev	1237-1218	CCCACGTCCATGTCACAGTA
Gapdh	Mus musculus	fwd	763-781	TGTCCGTCGTGGATCTGAC
Gapdh	Mus musculus	rev	818-837	CCTGCTTCACCACCTTCTTG
Gnb2l1	Mus musculus	fwd	514-533	TCTGCAAGTACACGGTCCAG
Gnb2l1	Mus musculus	rev	582-601	ACGATGATAGGGTTGCTGCT
GFAP	Mus musculus	fwd	1156-1174	TCGAGATCGCCACCTACAG

GFAP	Mus musculus	rev	1201-1222	GTCTGTACAGGAATGGTGATGC
PLVAP	Mus musculus	fwd	499 - 517	TCAACAAGACCTGCGAAGC
PLVAP	Mus musculus	rev	545 - 566	CACCTCCATCTCCAGTGTCTTA
Rpl32	Mus musculus	fwd	29-47	GCTGCCATCTGTTTTACGG
Rpl32	Mus musculus	rev	107-126	TGACTGGTGCCTGATGAACT
VEGFa120	Mus musculus	fwd	743-765	GGAGAGATGAGCTTCTTACAGCA
VEGFa120	Mus musculus	rev	888-905	CTGAACAAGGCTCACAGTCATTTT
VEGFa164	Mus musculus	fwd	743-765	GGAGAGATGAGCTTCTTACAGCA
VEGFa164	Mus musculus	rev	808-829	CCTTGGCTTGTACATTTTTTCT
Vegfr2	Mus musculus	fwd	1635-1656	CAGTGGTACTGGCAGCTAGAAG
Vegfr2	Mus musculus	rev	1681-1700	ACAAGCATACGGGCTTGTTT

Tabelle 5: Oligonukleotidprimer zum Einsatz bei quantitativer Echtzeit-PCR

Alle Primer wurden über Invitrogen bezogen.

2.1.6 Antikörper für Western Blot und immunhistochemische Färbungen

2.1.6.1 Primäre Antikörper

Die Verdünnungen der primären Antikörper werden in den Abschnitten der immunhistochemischen Färbung von Gefrierschnitten (Kapitel 2.2.6.5.1), Paraffinschnitten (Kapitel 2.2.6.5.2) und Netzhautflächpräparaten (Kapitel 2.2.6.5.3) genannt. Die Verdünnungen für Western Blots werden gesondert genannt (Kapitel 2.2.5.5)

Protein	Primärer Antikörper	Bezugsquelle
α -tubulin	rabbit anti- α -tubulin	Rockland Immunochemicals, Limerick, USA
CD31	goat anti-CD31	R&D Systems, Minneapolis, USA
Collagen IV	rabbit anti-Collagen IV	Rockland Immunochemicals, Limerick, USA
GFAP	rabbit anti-GFAP	Agilent Dako, Santa Clara, USA
HIF-1 α	Rabbit anti HIF-1 α	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
IBA-1	rabbit anti-IBA-1	Wako, Ōsaka, Japan
PLVAP	rat anti-PLVAP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
VEGFa ₁₆₄	goat anti VEGFa ₁₆₄	R&D Systems, Minneapolis, USA
VEGFR2	rabbit anti VEGFR2	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Tabelle 6: Primäre Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Die Verdünnungen der sekundären Antikörper werden in den Abschnitten der immunhistochemischen Färbung von Gefrierschnitten (Kapitel 2.2.6.5.1), Paraffinschnitten (Kapitel 2.2.6.5.2) und Netzhautflächpräparaten (Kapitel 2.2.6.5.3) genannt. Die Verdünnungen für Western Blots werden gesondert genannt (Kapitel 2.2.5.5).

Sekundärer Antikörper	Bezugsquelle
anti-rabbit Cy TM 3 IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
anti-goat Cy TM 3 IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
anti-rabbit IgG, HRP-linked	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
anti-goat IgG, HRP-linked	Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, USA
biotinylierter anti-rabbit IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
biotinylierter anti-goat IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
biotinylierter anti-rat IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Streptavidin Alexa Fluor ® 555	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Streptavidin Alexa Fluor ® 546	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie

2.1.7 Chemische Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Bezeichnung	Bezugsquelle
0,1 M Cacodylat-Puffer	10,7 g Cacodylsäure in 500 ml dH ₂ O
0.1 M Phosphatpuffer (Php) pH 7.4	100 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O mit 0,2 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O to pH 7.4 gelöst auf 0,1 M mit dH ₂ O
0,2 M Tris-Maleatpuffer, pH 7,2	24,2 g TRIS 23,2 g Maleinsäure gelöst in dH ₂ O auf 1l, pH Adjustierung mittels 10 N NaOH
5x DNA Puffer	60 % Glycerin 0,3 g Kresolrot
10x Elektrodenpuffer	250 mM Tris/HCl 400 mM Glycine 1 % (w/v) SDS in dH ₂ O, auf 1 l
Coomassie-Entfärbelösung	500 ml Methanol 10 ml Essigsäure aufgefüllt mit dH ₂ O auf 1 l
Coomassie-Färbelösung	40 ml Methanol 2 ml Essigsäure 0,2 g Coomassie-Brilliant Blue R-250 gelöst in dH ₂ O auf 100 ml
EM Fixiermittel	2,5 % Paraformaldehyd 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer
Eponstamm A	62 ml Glydether 100 mit 100 ml DDSA
Eponstamm B	100 ml Glydether 100 mit 89 ml NMA
LacZ Färbelösung (LacZ stain)	72 ml LacZ Waschpuffer 3ml X-Gal (25mg/ml in DMSO)

Material und Methoden

	0,159 g $K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$ 0,123 g $K_3Fe(CN)_6$
LacZ Waschpuffer	1 ml $MgCl_2$ 5 ml 1 % NaDC 5 ml 2 % Tergitol 489 ml 0,1 M Php pH 7,3
Methyl-Carnoy	60 % Methanol 30 % Chloroform 10 % Essigsäure
Mausschwanz-Lysepuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 5 mM EDTA 0,2 % SDS 200 mM NaCl aufgefüllt mit dH_2O auf 400ml
Mowiol mit DAPI	6,0 g Glycerin 2,4 g Mowiol 4-88 (1h, RT) 6,0 ml dH_2O (steril) (1h, RT) 12 ml 0,2 M Tris HCl, pH 8.5 (2h, 50°C) 25 mg/ml DABCO pro 1 ml DAPI (1:10)
Osmium-Ferrocyanid	2 % OsO_4 1,6 % Kaliumferrocyanid (96mg/6ml) gelöst in 0,2 M Cacodylat-Puffer
PBS, 10x, pH 7,4	80 g NaCl 2 g KCl 4,4 g Na_2HPO_4 2,4 g KH_2PO_4 gelöst in dH_2O auf 1 l, autoklaviert
PFA 4%	4 g Formaldehyd (4%) gelöst in 100 ml 0,1 M Php, pH 7,4
Richardson Färbung	Stammlösung 1: 5 g 1 % Azur II in 500 ml dH_2O Stammlösung 2: 5 g Methylenblau in 500 ml 1 % Natriumtetraborat (Borax) - Stammlösung 1 : Stammlösung 2 : dH_2O in einem Verhältnis von 1 : 1 : 2
SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer, 10x	250 mM Tris/HCl, pH 6,8 400 mM Glycin 1 % (w/v) SDS gelöst in dH_2O auf 1 l
SDS-Lösung, 10% (w/v)	10 g SDS gelöst in dH_2O auf 100 ml
SDS-Probenpuffer 4x (Laemmli Puffer)	0,25 M Tris/HCl, pH 6,8 30 % Glycerin 8% (w/v) SDS 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 0,3 M DTT 10 % β -Mercaptoethanol
TBE, 10x	108 g Tris Base 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 gelöst in dH_2O auf 1 l, pH 7,0
TBS, 10x, pH 7,4	30 g Tris 80 g NaCl

Material und Methoden

	2 g KCl gelöst in dH ₂ O auf 1 l, autoklaviert
TBS-T, 1x	100 ml 10 x TBS 0.05 % (v/v) Tween 20 gelöst in dH ₂ O auf 1 l
Transferpuffer, 10x	5,8 g Tris 2.9 g Glycin 200 ml Methanol 3,7 ml 10% (w/v) SDS gelöst in dH ₂ O auf 1 l
Tris/HCl, 1,0 M, pH 6,8	121,14 g Tris gelöst in dH ₂ O auf 1 l, pH-Adjustierung mittels HCl
Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8	181.71 g Tris/HCl gelöst in dH ₂ O auf 1l, pH-Adjustierung mittels HCl
Ureapuffer	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 Urea
Waschpuffer für Proteinisolation	0,3 M Guanidin HCl gelöst in 95% Ethanol

Tabelle 8: Chemische Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

2.1.8 Laborausstattung

Bezeichnung	Bezugsquelle
Aida Advanced Image Data Analyzer v.406	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Consort E835 Elektrophorese Power Supply	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Elektrophoresesystem mit Gelkammer EM 10A, Elektronenmikroskop	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland Zeiss, Göttingen, Deutschland
Excel	Microsoft, Redmond, WA, USA
Forschungspipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gewebeprozessorautomat Leica EM TP	Leica microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
HeatSealer RS 232	4titude, Berlin, Deutschland
IDA Gel Dokumentationssystem	Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland
ImageJ	ImageJ2x, Wayne Rasband, ehemals NIH, Bethesda, MD, USA
iQ5 Multicolor Real-time PCR Detektionssystem und iCycler mit Standard Edition Software	BioRad, München, Deutschland
Inolab pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Julabo SW20 Wasserbad	JulaboLabortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Kern 510-33 universelle Laboranalytwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
LAS 3000 Intelligent Dark Box	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland

Material und Methoden

Memmert Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Mettler AE 163 Hochpräzisionswaage	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Microm HM 500 OM Kryostat	Microm International, Walldorf, Deutschland
Mikroskop Axio Imager Z1	Zeiss, Göttingen, Deutschland
MilliQ Plus PF Wasseraufbereitungssystem	Millipore Corporation, Billerica, USA
Model 45-101-I Class II Electrophorese System	PeqLab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland
NanoDrop-2000c UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Paraffin Gewebeprozessor HMP 110	Microm International, Walldorf, Deutschland
Paraffin Wachs Einbettungsautomat MPS/P2	SLEE Medical, Mainz, Deutschland
Pipetman Pipetten	Gilson, Middleton, USA
PerfectBlue Gelsystem Mini L	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Polymax 1040 Plattformschüttler	Heidolph, Kelheim, Deutschland
Reinwasseranlage Veolia Water	Reiss Laborbedarf e.K., Mainz-Mombach, Deutschland
Semi-Dry electrophoretic transfer cell (halbtrockenes Elektrolotsystem)	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Sonorex RK 102	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Sunrise-Basic ELISA Reader	Tecan GmbH, Männedorf, Schweiz
SuperCut 2050 Reichert-Jung Microtom	Cambridge Instruments, Nußloch, Deutschland
Systec V75 Autoclav	Systec GmbH, Wettenburg, Deutschland
T100™ Thermal Cycler	BioRad, München, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV Durchlichtschirm	Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland
Ultracut E-Reichert-Jung Microtom	Reichert-Jung, Kirchseeon, Deutschland
Ultra Thurax	Biolabprodukte, Bebensee, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserdestillierapparat GFL Bi-Destillierapparat 2104	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 9: Laborausstattung

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
3 MM Blotting ("Whatman")-Blottingpaper	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Biosphere Filterpipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser, 24 x 60 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
ECOFLO®-safety Perfusionsbesteck	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland
Einmalspritzen (Feindosierungsspritzen)	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsröhrchen (Protein LoBind™ Tubes), 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Fettstift (PAP-Pen)	SCI Science Services, München, Deutschland
Glaspipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Grüne Nitrilhandschuhe	Kimtech Science, Koblenz, Deutschland
iQ™ 96-well PCR Platten	BioRad, München, Deutschland
Laborglaswaren	Schott, Roth, VWR, Deutschland

Microseal® adhesive, hitzeversiegelt	BioRad, München, Deutschland
Nunclon®Δ Multidishes 6-fachplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark
Ohrmarken	Hauptner & Herberholz, Solingen, Deutschland
Omnifix Einmalspritzen, steril	Braun, Wertheim, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten (Einmalpipetten)	Brand, Wertheim, Deutschland
PCRSoft Tubes, 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Personna Rasierklingen	American Safety Razor Company, Verona, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Präparierbesteck	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pro free blaue Handschuhe	Ulma, Neu-Ulm, Deutschland
Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF)- Western Blot Membran (Roti®-PVDF), 0,45µm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsröhrchen, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schraubröhren (Falcons), 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterican Injektionskanüle, Einmalkanüle	Braun, Wertheim, Deutschland
SuperFrost® Plus Glasobjektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien

2.2 METHODEN

2.2.1 Tiermodelle und Cre/loxP-System

Mauslinie	Genetischer Hintergrund
Vegfr2 ^{flox/flox}	C57BL/6J oder CD1
CAGGCre-ER TM	C57BL/6J
CAGGCre-ER TM ; Vegfr2 ^{flox/flox}	C57BL/6J oder C57BL/6J; CD1
R26R	129SV
CAGGCre-ER TM ; R26R	129SV; C57BL/6J

Tabelle 11: Verwendete Mauslinien

Für die *in vivo* Experimente dieser Arbeit wurden unterschiedliche Mauslinien verwendet (Tabelle 11). Da bei Mäusen mit ubiquitärer Deletion des VEGFR2 eine embryonale Sterblichkeit beschrieben ist (15,21,53) wurde ein Tamoxifen-abhängiges Cre-loxP-basiertes Tiermodell verwendet, welches eine gezielte Deletion des Zielgens VEGFR2 zu einem beliebigen Zeitpunkt der Lebensspanne des Tieres ermöglicht (54,55). Diese Mäuse tragen charakteristische Desoxyribonukleinsäure-Sequenzen (DNA-Sequenzen), sogenannte loxP- oder flox-Sites (flanked by loxP/flox), welche Teile des Exons 3 des *Vegfr2* flankieren (*Vegfr2*^{flox/flox}, abgekürzt *Vegfr2*^{fl/fl}). Die *Vegfr2*^{fl/fl} Mäuse wurden mit CAGGCre-ERTM Mäusen, welche eine Tamoxifen-abhängige Cre-Rekombinase tragen, verpaart. Die Cre-Rekombinase ist in der Lage, die DNA an den flox-Sites zu erkennen und zu schneiden. Die durch die Verpaarung entstandenen CAGGCre-ERTM; *Vegfr2*^{fl/fl} Mäuse tragen nun die Cre-

Rekombinase und die gefloxtete *Vegfr2*-Sequenz. In diesen Mäusen kann die Cre-Rekombinase durch die Applikation von Tamoxifen induziert werden, was zur Folge hat, dass die DNA an den flox-Sites gespalten und Teile der *Vegfr2*-Sequenz entfernt werden, was zu einer Defizienz des *Vegfr2* Gens führt. In der CAGGCre-ERTM-Mauslinie wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des ubiquitären chicken- β -actin-hybridpromotors exprimiert. Durch die Fusion der Cre-Rekombinase mit einer mutierten Form der Estrogen Rezeptor Bindedomäne (ERTM) ist die Cre-Rekombinase durch Tamoxifen aktivierbar. Weiterhin verhindert die Bindung an Hsp90 eine Translokalisierung in den Zellkern. Durch die Applikation von Tamoxifen kann dieser Komplex gespalten werden, die Cre-Rekombinase in den Zellkern translozieren und dort die Rekombination herbeiführen. In dieser Arbeit wurde die Induktion der Cre-Rekombinase durch topische Zugabe von Tamoxifen in Form von Augentropfen (5 mg/ml, 10 μ l/Tropfen, appliziert auf die geschlossenen Augenlider, dreimal täglich) von P1 bis P3 herbeigeführt. Es wurden die mit Tamoxifen-Augentropfen behandelten *Vegfr2*^{fl/fl}; CAGGCre-ERTM Mäuse der Experimentalgruppe zugeordnet (im Folgenden als *Vegfr2* ^{Δ eye}-Mäuse bezeichnet). *Vegfr2*^{fl/fl} positive, CAGGCre-ERTM negative Wurfgeschwister wurden der Kontrollgruppe zugeordnet und wurden ebenfalls mit Tamoxifen-Augentropfen behandelt (im Folgenden als Kontrollmäuse bezeichnet).

Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit heterozygote CAGGCre-ERTM Mäuse mit homozygoten Rosa-LacZ-Reporter-mäusen (R26R) verpaart, um CAGGCre-ERTM; R26R-Mäuse zu erzeugen. Aus dieser Verpaarung entstandene Tiere tragen alle heterozygot das LacZ-Gen. Ein Teil der Mäuse ist CAGGCre-ERTM positiv, der andere Teil CAGGCre-ERTM negativ. Auch hier erfolgte die Induktion der Cre-Rekombinase durch die äquivalente Methodik mittels Tamoxifen Augentropfen. Im Falle der Anwesenheit der Cre-Rekombinase konnte das Enzym ein Stop-Codon im LacZ-Gen entfernen, was zur Produktion von β -Galactosidase führte. Dieses Produkt wiederum konnte durch eine anschließende enzymhistochemische Färbung sichtbar gemacht werden (Kapitel 2.2.6.8). Hierdurch konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand des Cre-Reporter-Mausstammes (R26R) lichtmikroskopisch eine Cre-vermittelte Rekombination im gesamten Auge visualisiert werden und damit die Effektivität des eingesetzten Tiermodells bestätigt werden.

2.2.2 Tierexperimente und Tierhaltung

Alle in dieser Arbeit angewendeten Verfahren entsprachen den einheitlichen Anforderungen für Manuskripte, die bei biomedizinischen Fachzeitschriften eingereicht werden, den Richtlinien der National Institute of Health über die Pflege und Verwendung von Tieren in der Forschung und der EU-Richtlinie 2010/63/E. Kernpunkt dieser Richtlinien ist, dass Versuchstiere

als fühlende Wesen behandelt werden sollen und demnach nur geringstmöglichen Schmerzen, Angst und Leiden auszusetzen sind. Die Versuche wurden von der Regierung von Unterfranken, Würzburg, Deutschland, AZ: 55.2-2532-2-262 genehmigt. Alle für diese Arbeit verwendeten Tiere wurden unter optimierten Bedingungen bei einer Temperatur von $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ und einer Luftfeuchtigkeit von $55\% \pm 5\%$ gehalten und hatten permanent freien Zugang zu Futter und Wasser. Alle Mäuse wurden in einem Hell-Dunkel-Zyklus von jeweils 12 Stunden pro Tag mit einer Lichtintensität von etwa 400 Lux gehalten. Alle angewendeten Verfahren wurden an Mäusen beider Geschlechter durchgeführt.

2.2.2.1 Präparation des okularen Gewebes

Vor der Eukleation der Augen wurden die Mäuse durch atlanto-okzipitale Dislokation getötet. Die zur weiteren histologischen Aufbereitung ausgewählten Augen wurden im Ganzen enukleiert und mit dem entsprechenden Fixans (Paraformaldehyd (PFA), Methyl-Carnoy oder EM-Fixiermittel; Kapitel 2.2.6) inkubiert. Für molekularbiologische Analysen wurden die Augen mittels einer Rasierklinge entlang der OS aufgetrennt, die Linse entfernt und das Gewebe entsprechend aufbereitet. Hierzu wurde das gesamte vordere Augensegment abgetrennt, welches Cornea, Iris, Ziliarkörper und Trabekelwerk enthielt, und in ein 2 ml Eppendorf-Röhrchen auf Eis, welches peqGold TriFast™ Trizol beinhaltete, überführt. Der verbleibende hintere Teil des Auges, welcher Sklera, Choroidea und Retina beinhaltete, wurde so präpariert, dass die Retina durch ein sanftes Ausstreichen, ausgehend vom ONH, von den restlichen Strukturen abgelöst wurde. Diese wurde anschließend ebenfalls in ein 2 ml Eppendorf-Röhrchen auf Eis mit peqGOLD TriFast™ Trizol überführt.

2.2.2.2 Transkardiale Perfusion

Durch intraperitoneale Injektionen eines Anästhetikums (Ketamin (75 mg/ml) und Xylazin (5mg/ml)) wurden die Versuchstiere narkotisiert. Nach vollständiger Betäubung der Mäuse wurde die Bauch- und Brusthöhle eröffnet und das Herz sowie die Aorta abdominalis freigelegt. Die Injektionskanülenspitze wurde in der linken Herzkammer positioniert und ein Entlastungsschnitt in der Aorta abdominalis vorgenommen. Die Mäuse wurden zunächst mit 0,89 % NaCl und schließlich zur Fixierung mit 4 % PFA perfundiert. Bei Versuchstieren, welche für die Netzhautflächpräparation bzw. Präparation der vorderen Augensegmente bestimmt waren, wurden die Mäuse mit Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) perfundiert. FITC-Dextran ist eine mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte hochmolekulare Polysaccharidlösung, die aufgrund ihrer molekularen Masse von 2000 kDa im Gefäßsystem verweilt. Nach Anregung (Absorption bei 493 nm) unter dem Fluoreszenzmikroskop emittiert

FITC-Dextran grünes Licht mit einer Wellenlänge von 520 nm und macht somit die Gefäßstruktur fluoreszenzmikroskopisch sichtbar. Anschließend erfolgte die Eukleation der Augen sowie eine zusätzliche Fixierung für 1,5 Stunden (Irisflachpräparate), 2 Stunden (Netzhautflachpräparate) bzw. 4 Stunden zur weitergehenden Aufbereitung für Paraffin- bzw. Gefrierschnitte in 4 % PFA.

2.2.2.3 Präparation von Netzhautflachpräparaten

Nach Eukleation der Augen wurden diese für 2 Stunden in 4 % PFA bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurde das Auge mit einer Rasierklinge entlang der OS in ein vorderes und ein hinteres Augensegment aufgetrennt und das gesamte vordere Augensegment sowie die Linse entfernt. Die Retina wurde vorsichtig aus dem hinteren Augensegment ausgestrichen und auf einen Objektträger übertragen, welcher bereits mit 0,1 M Phosphatpuffer (Php) leicht befeuchtet war. Um die gewölbte Netzhaut auf dem Objektträger flach positionieren zu können, wurden vier Schnitte auf 3, 6, 9 und 12 Uhr gesetzt. Bei mit FITC-Dextran perfundierten Netzhautflachpräparaten (Kapitel 2.2.2.2) wurde das Präparat anschließend mit dem Einbettungsmedium Mowiol und einem Deckgläschen fixiert. Bei Präparaten, welche für eine immunhistochemische Färbung vorgesehen waren, wurde dieser Färbevorgang unmittelbar im Anschluss an die Präparation durchgeführt (Kapitel 2.2.6.5.3.).

2.2.2.4 Präparation von vorderen Augensegmenten und Irisflachpräparaten

Nach Eukleation der Augen wurden diese für 1,5 Stunden in 4 % PFA bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurde das Auge mit einer Rasierklinge entlang der OS in ein vorderes und ein hinteres Augensegment aufgetrennt und das gesamte hintere Augensegment sowie die Linse entfernt. Das vordere Augensegment wurde für die mikroskopischen Analysen der vorderen Augenabschnitte der mit FITC-Dextran perfundierten Tiere in der Gänze auf einen Objektträger übertragen, mit H₂O₂ in aufsteigender Konzentration von zunächst 10 % über 20 % und letztlich 30 % gebleicht und anschließend mit Mowiol auf dem Objektträger fixiert. Für die Herstellung der Irisflachpräparate wurde das abgetrennte vordere Augensegment vorsichtig weiter präpariert, sodass letztlich die Iris bestmöglich von der Cornea und dem Ziliarkörper getrennt wurde. Die leicht gewölbte Iris wurde auf einen Objektträger übertragen, welcher bereits leicht mit 0,1 M Php befeuchtet war und durch einen Einschnitt flach auf dem Objektträger positioniert.

2.2.2.5 Gewichtsbestimmung post mortem

Mithilfe einer Präzisionswaage (Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland) erfolgte eine Gewichtsbestimmung der an P13 getöteten Versuchstiere unmittelbar nach Eintritt ihres Todes. Eine statistische Auswertung der Mittelwerte, der Standardabweichungen sowie der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) erfolgte mithilfe der Excel-Software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) um die Ergebnisse zwischen der Kontroll- und Experimentalgruppe zu vergleichen.

2.2.3 DNA Analyse

2.2.3.1 DNA Isolation aus Mausschwanzbiopsien

Zur Extraktion genomischer DNA wurden die Versuchsmäuse mittels Isofluran anästhesiert und eine 3 mm lange Gewebeprobe des Mäuseschwanzes abgeschnitten. Diese ungefähr einminütige Narkose wurde auch zur Kennzeichnung der Tiere mittels Ohrmarke genutzt. Diese Mausschwanzbiopsie wurde in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Lysepuffer sowie 5 µl Proteinase K über Nacht bei 55 °C und 550 rpm lysiert. Am darauffolgenden Morgen wurden 500 µl 100 %-Isopropanol hinzugegeben, dies gut miteinander vermischt (gevortext) und für 5 Minuten bei -20 °C inkubiert, um die DNA-Fällung zu induzieren. Anschließend wurde die Suspension für 10 Minuten bei 4 °C und 13.200 rpm zentrifugiert. Nach Abschluss der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt, das verbliebene DNA Pellet wurde in 500 µl 70% Ethanol gelöst und mittels eines Vibrationsmischers (Vortexgerät) durchmischt. Die Suspension wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 4 °C und 13.200 rpm zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand entfernt. Nach erneuter einminütiger Zentrifugation wurden Flüssigkeitsreste entfernt. Das entstandene DNA-Pellet wurde kurz luftgetrocknet und anschließend mit 100 µl TrisPuffer (5 mM, pH 8.0) unter kräftigem Vortexen und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur gelöst. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

2.2.3.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration der extrahierten DNA aus Mausschwanzbiopsien wurde mit Hilfe eines Spectrophotometers (Thermo Scientific *NanoDrop One* Microvolume UV-Vis Spectrophotometer Nano Drop 2000c, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) gemessen. Hierbei wurde der Absorptionsgrad bei einer Wellenlänge von 260 nm sowie bei 280 nm untersucht. Auf Grundlage dieser Messergebnisse wurde jede DNA-Probe

auf eine Konzentration von 50 ng/µl verdünnt, um Anwendung in der Polymerase-Kettenreaktion (Kapitel 2.2.3.3) zu finden.

2.2.3.3 Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um die Genotypen der verwendeten Versuchsmäuse zu bestimmen wurde eine PCR durchgeführt. Dies ist eine etablierte Methode zur selektiven Amplifikation von spezifischen Nukleotidsequenzen (56). Hierbei dient die DNA als Template und die individuell designten Primer als Start- und Endpunkt des zu amplifizierenden Bereichs der DNA. Ferner werden Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs), die Bausteine des neu zu synthetisierenden DNA-Strangs, MgCl₂ (um die Reaktion ablaufen zu lassen) und das hitzestabile Enzym, die DNA-Polymerase benötigt. Durch Flankierung der zu amplifizierenden Zielsequenz mittels oligonukleotiden Primern und sich mehrfach wiederholende Zyklen wird die Zielsequenz letztlich vervielfältigt.

Eine PCR-Reaktion kann in drei Phasen unterteilt werden: die Denaturierung des bestehenden DNA-Doppelstrangs, die Annealing-Phase, in der die Primer spezifisch an die DNA binden, und die anschließende DNA-Synthesephase, in welcher der neue DNA-Strang synthetisiert wird (57). Diese Zyklen werden abhängig von den Primersequenzen und der Template-Menge unterschiedlich oft wiederholt. Auch die Temperatur der einzelnen Schritte ist abhängig von der verwendeten Primersequenz.

Als DNA-Template diente die extrahierte DNA, welche durch Mausschwanzbiopsien (Kapitel 2.2.3.1) gewonnen wurde. Bei jeder PCR wurde zeitgleich eine Negativkontrolle (DNA Template wurde durch Zugabe einer äquivalenten Menge an H₂O ersetzt) sowie eine Positivkontrolle (bereits vorhergehend erfolgreich verifizierter Genotyp) durchgeführt um falsch-positive Ergebnisse zu detektieren bzw. um die erfolgreiche Amplifikation nachzuweisen. Jeder PCR-Reaktionsansatz wurde mittels Vortexgerät kräftig durchmischt und anschließend kurz zentrifugiert, um den gesamten Lösungsansatz auf den Boden des PCR-Cups zu bringen. Anschließend erfolgte die Amplifikation der Proben mittels eines Thermocyclers (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). In dieser Arbeit wurden die Versuchstiere mittels PCR auf das Vorhandensein der Cre-Rekombinase (CAGGCre), der Flankierung der Zielsequenz Vegfr2 mittels loxP-sites und der LacZ-Expression in Cre-Reportermäusen untersucht.

Um die Vegfr2-Mäuse hinsichtlich des Vorhandenseins der Cre-Rekombinase zu charakterisieren, wurde der Reaktionsansatz gemäß Tabelle 12 zusammengesetzt und anschließend in einer Thermocyclerreaktion (Tabelle 13) amplifiziert. Das Vorhandensein eines 270 Basenpaar (bp)-großen PCR-Produktes belegte dabei den transgenen Zustand

Material und Methoden

(CAGGCre+/-), das Fehlen eines PCR-Produktes auf dieser Höhe belegte den wildtypischen Zustand (WT).

Komponente	Volumen (µl)
5x DNA Puffer	3
dNTPs (10 mM)	0,3
MgCl ₂ (50 mM)	0,5
Cre Primer fwd (10 µM)	0,3
Cre Primer rev (10 µM)	0,3
Taq DNA Polymerase	0,15
H ₂ O (Millipore)	9,45
Mastermix	= 14
+ genomische DNA (50 ng/µl)	1

Tabelle 12: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes zur Amplifikation eines Cre-Rekombinasefragments aus genomischer DNA (CAGGCre)

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer
Initiale Denaturierung	95	3 Minuten
Denaturierung	95	30 Sekunden
Annealing	61	30 Sekunden
Elongation	72	35 Sekunden
Finale Elongation	72	5 Minuten
Pause	10	∞

Tabelle 13: CAGGCre-PCR Cycler Programm

Um die Vegfr2-Mäuse hinsichtlich des Vorhandenseins der beidseitigen Flankierung der Zielsequenz mittels loxP-sites (flox; fl) zu untersuchen, wurde eine PCR mit folgenden Änderungen angesetzt. Der Reaktionsansatz wurde gemäß Tabelle 14 zusammengesetzt und anschließend in einer Thermocyclerreaktion (Tabelle 15) amplifiziert. Je nach Vorhandensein der flox-Sequenz ergaben sich unterschiedlich große PCR-Produkte: homozygote Mäuse zeigten ein 230 bp großes PCR-Produkt (fl/fl), heterozygote Mäuse zeigten ein 230 bp und ein 179 bp großes PCR-Produkt (fl/+) und wildtypische Mäuse zeigten ein 179 bp großes PCR-Produkt (+/+). Als Versuchstiere wurden ausnahmslos Tiere verwendet, die das homozygot mit loxP-sites flankierte *Vegfr2*-Gen trugen.

Komponente	Volumen (µl)
5x DNA Puffer	5
dNTPs (10 mM)	0,5
MgCl ₂ (50 mM)	0,75
Vegfr2 Primer fwd (10 µM)	0,5
Vegfr2 Primer rev (10 µM)	0,5

Material und Methoden

Taq DNA Polymerase	0,5
H ₂ O (Millipore)	16,25
Mastermix	= 24
+ genomische DNA (50 ng/μl)	1

Tabelle 14: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes zur Genotypisierung von Vegfr2^{fl/fl} Mäusen

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer
Initiale Denaturierung	95	3 Minuten
Denaturierung	95	30 Sekunden
Annealing	57	1 Minute
Elongation	72	1 Minute
Finale Elongation	72	5 Minuten
Pause	10	∞

Tabelle 15: Vegfr2^{fl/fl}-PCR Cycler Programm

Um die Vegfr2-Mäuse hinsichtlich des Vorhandenseins der Cre-Rekombinase und der Vegfr2-flox Sequenz zeitgleich zu untersuchen, wurde eine PCR mit folgenden Änderungen angesetzt. Der Reaktionsansatz wurde gemäß Tabelle 16 zusammengesetzt und anschließend in einer Thermocyclerreaktion (Tabelle 17) amplifiziert. Die Bedeutung der Größe bzw. das Vorhandensein der PCR-Produkte änderte sich dabei zu den einzeln durchgeführten PCR-Produkten nicht.

Komponente	Volumen (μl)
5x DNA Puffer	5
dNTPs (10 mM)	0,5
MgCl ₂ (50 mM)	0,75
Vegfr2 Primer fwd (10 μM)	0,5
Vegfr2 Primer rev (10 μM)	0,5
Cre Primer fwd (10 μM)	0,6
Cre Primer rev (10 μM)	0,6
Taq DNA Polymerase	0,6
H ₂ O (Millipore)	14,75
Mastermix	= 24
+ genomische DNA (50 ng/μl)	1

Tabelle 16: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes zur Genotypisierung von Vegfr2^{fl/fl} Mäusen sowie zur Differenzierung des Vorhandenseins der Cre-Rekombinase (CAGGCre)

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer
Initiale Denaturierung	95	3 Minuten
Denaturierung	95	30 Sekunden
Annealing	58	40 Sekunden
Elongation	72	50 Sekunden
Finale Elongation	72	5 Minuten
Pause	10	∞

Tabelle 17: Vegfr2^{fl/fl} - und CAGGCre -PCR Cycler Programm

Um die Cre-Reportermäuse hinsichtlich des Vorhandenseins der LacZ-Expression zu untersuchen, wurde eine PCR mit folgenden Änderungen angesetzt. Der Reaktionsansatz wurde gemäß Tabelle 18 zusammengesetzt und anschließend in einer Thermocyclerreaktion (Tabelle 19) amplifiziert. Das Vorhandensein eines 315 bp-großen PCR-Produktes belegte dabei den transgenen Zustand (LacZ^{+/-}) und zeigte die heterozygote Ausprägung an.

Komponente	Volumen (µl)
5x DNA Puffer	2,5
dNTPs (10 mM)	0,5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5
ROSA26-LacZ Primer fwd (10 µM)	0,5
ROSA26-LacZ Primer rev (10 µM)	0,5
Mango Taq	0,5
H ₂ O (Millipore)	18
Mastermix	= 24
+ genomische DNA (50 ng/µl)	1

Tabelle 18: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes zur Genotypisierung der LacZ-Expression in Cre-Reportermäusen (ROSA26-LacZ)

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer
Initiale Denaturierung	94	3 Minuten
Denaturierung	94	30 Sekunden
Annealing	60	30 Sekunden
Elongation	72	1 Minute
Finale Elongation	72	5 Minuten
Pause	10	∞

Tabelle 19: Lac-Z-PCR Cycler Programm

2.2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Nach erfolgter Amplifikation der DNA-Fragmente wurden die PCR Produkte mittels einer Agarosegelelektrophorese hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt und visualisiert. Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert dabei mit der doppelsträngigen DNA. Dadurch kann diese nach erfolgter Größenauftrennung mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden. Je nach Größe des zu erwartenden PCR-Produkts wurde ein 1 %-iges (CAGGCre und RosaLacZ) oder 2 %-iges Agarosegel verwendet, (Vegfr2^{fl/fl}-PCR bzw. Kombinations-PCR Vegfr2^{fl/fl} + CAGGCre-PCR), wobei 1 g oder 2 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer gelöst wurde. Anschließend wurden 3 µl Ethidiumbromid in die leicht abgekühlte Lösung gegeben, vorsichtig geschwenkt und in eine quadratische Standardform gegossen. Nach Auskühlen der Gelösung wurden jeweils 10 µl des PCR-Produkts und 3 µl des Standard-DNA-Markers (Gene

Ruler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) aufgetragen. Die DNA-Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer konstanten 120 V Spannung über 45 Minuten bei 500 mA, der TBE-Puffer diente dabei als Laufpuffer in der Elektrophoresekammer. Im Anschluss wurden unter Zuhilfenahme eines UV-Durchlichtschirmes die DNA-Fragmente bei 302 nm visualisiert und unter Zuhilfenahme der aufgetragenen DNA-Leiter analysiert. Eine Überprüfung dessen erfolgte durch den Vergleich mit der ebenfalls aufgetragenen Positivkontrolle. Zu Dokumentationszwecken wurden jeweils Abbilder der Gele mithilfe des IDA Gel Dokumentationssystem (raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland) erstellt.

2.2.4 RNA Analyse

2.2.4.1 RNA Isolation

Für die RNA Analysen wurden in dieser Arbeit sowohl murine Retinae als auch murine vordere Augenabschnitte verwendet. Das entsprechend frisch präparierte Gewebe (Kapitel 2.2.2.1) wurde in vorbereitete Reaktionsgefäße auf Eis übertragen. Zum Aufschluss der RNA wurde peqGOLD TriFast™ Trizol verwendet, welches die RNA stabilisiert und RNAsen inaktiviert. Hierbei wurden 500 µl dieser gebrauchsfertigen Lösung, welche Phenol und Guanidinisothiocyanat enthält, auf die Gewebeprobe gegeben und die Proben mit einem Ultra Thurax (Biolabproducts, Bebensee, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurde zur Initiierung der Phasentrennung 100 µl Chloroform hinzugegeben, gevortext, 10 Minuten auf Eis inkubiert und bei 13.200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, wurde entnommen und nach Hinzufügen von 500 µl 100 %-Isopropanol bei -20 °C über Nacht gelagert. Die organische Phase wurde für die spätere Proteinisolation gesondert bei -20 °C gelagert (Kapitel 2.2.5.1). Zur Fortführung der RNA-Isolierung wurden die Proben am darauffolgenden Morgen auf einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge für 20 Minuten bei 13.200 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 70 %-Ethanol gewaschen. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben für 5 Minuten bei 13.200 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde, wie zuvor beschrieben, erneut weitere zwei Mal mit 70 %-Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde sehr sorgfältig entfernt und das RNA-Pellet wurde in 15 µl RNase-freies H₂O gelöst und durch kurzes Vortexen eluiert. Die Proben wurden längerfristig bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2 RNA Quantifizierung

Mithilfe des Spectrophotometers (Thermo Scientific *NanoDrop One* Microvolume UV-Vis Spectrophotometer Nano Drop 2000c, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutsch-

land) wurde die RNA Konzentration und Qualität bestimmt. Hierfür misst das Gerät die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm (OD₂₆₀), welche dem Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren entspricht. Außerdem wird bei einer Wellenlänge von 280nm (OD₂₈₀) das Absorptionsmaximum für Proteine bestimmt, um eine etwaige Verunreinigung zu detektieren. Das Verhältnis von OD₂₆₀/OD₂₈₀ liefert letztlich eine verlässliche Information hinsichtlich des Reinheitsgrades der vorliegenden RNA. Das Optimum der isolierten RNA mittels peqGOLD TriFast™ sollte > 1,7 liegen.

2.2.4.3 Komplementäre DNA Synthese (cDNA Synthese)

Um cDNA zu synthetisieren muss mRNA mittels eines Enzyms, der reversen Transkriptase (RT), umgeschrieben werden. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase erstellt anhand einer Einzelstrang-mRNA-Vorlage die komplementäre DNA. Die cDNA-Synthese in dieser Arbeit wurde aus 1 µg RNA mittels eines Synthese Kits (iScript cDNA Synthese Kit, Bio-Rad) getreu den Herstellervorgaben (Tabelle 20) und (Tabelle 21) synthetisiert (RT+). Als Negativkontrolle diente RNA, welche nicht revers transkribiert wurde (RT-). Bei diesen Proben wurde die RT durch die äquivalente Menge H₂O ersetzt.

	RT+	RT-
iScript reverse Transkriptase	1 µl	-
5x iScript Reaktionsgemisch	4 µl	4 µl
1 µg RNA, gelöst in H ₂ O	15 µl	16 µl

Tabelle 20: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

Temperatur (°C)	Dauer (min)
25	5
42	30
85	5
4	∞

Tabelle 21: Cycler-Programm für die cDNA-Synthese

Die synthetisierte cDNA wurde entweder direkt für die quantitative Echtzeit-PCR eingesetzt oder bei -20 °C tiefgefroren.

2.2.4.4 Quantitative Echtzeit PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR ist bekannt als eine gängige Methode zur quantitativen Messung der Vervielfältigung von Nukleinsäuren mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs. Hierbei wurde ein Thermocycler (Bio-Rad iQ5 Real-Time PCR Detektionssystem) verwendet, welcher die Proben mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt und die emittierte Fluoreszenz misst. Dies ermöglicht den Nachweis der mRNA-Expression eines Zielgens in Echtzeit. Die entstandenen

Material und Methoden

PCR-Produkte werden mittels SYBR-Green I, welches mit doppelsträngiger cDNA interkaliert, nachgewiesen. Durch Zunahme eines bestimmten DNA-Produkts während der PCR kommt es zu einer Intensitätssteigerung der Fluoreszenz, wodurch eine Quantifizierung der Nukleinsäuremenge gelingt. Die RT-PCR wurde für jede Probe in Triplikaten durchgeführt. Zur relativen Quantifizierung wurden die folgenden stabil exprimierte Referenzgene (Housekeeper) verwendet: ribosomales Protein L32 (RPL32), Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Gapdh) oder Guanin-Nukleotid-bindende Proteinuntereinheit beta-2-like1 (Gnb2l1). Als Negativkontrollen fungierten RT-Proben sowie Nuklease-freies H₂O. Die RT-PCR-Reaktionen wurden wie in Tabelle 22 dargestellt angefertigt und erfolgten mit dem in Tabelle 23 dargestellten Cycloer-Programm.

Reagenz	Volumen (µl)
Probe (+RT, -RT, H ₂ O)	0,15
10x PCR Puffer	1,5
MgCl ₂ (25 mM)	0,6
dNTPs (25 mM)	0,12
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,06
SYBR-Green I (7,4 % (v/v) in DMSO)	0,19
Fluorescein	0,015
Primer fwd (1 µM)	0,17
Primer rev (1 µM)	0,17
Nuklease-freies H ₂ O	13,03

Tabelle 22: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die RT-PCR

Temperatur (°C)	Dauer	
95	15 Minuten	
95	10 Sekunden	} 40x
60	40 Sekunden	
72	10 Sekunden	
95	60 Sekunden	
55	60 Sekunden	
55 + 0,5 pro Zyklus (Schmelzkurve)	6 Sekunden	81x

Tabelle 23: Cycloer-Programm für die RT-PCR

Ferner wurde eine Schmelzkurve erstellt, um vorliegende DNA-Kontaminationen zu erkennen, da SYBR-Green I jegliche Doppelstrang-DNA erkennt bzw. mit dieser interkaliert (z. B. Primer-Dimere, sonstige DNA-Kontaminationen etc.). Durch die Erstellung einer Schmelzkurve konnte somit verifiziert werden, dass nur die gewünschte, amplifizierte Nukleinsäure nachgewiesen wurde.

Die sich nach erfolgter RT-PCR anschließende Quantifizierung wurde mit Hilfe der Bio-Rad iQ5 Standard Edition Software (Version 2.0.148.60623) (BioRad Laboratories GmbH, Mün-

chen, Deutschland) und der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode mittels der Excel Software (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) fertiggestellt.

2.2.5 Protein Analyse

2.2.5.1 Protein Isolation

Für die Protein Analysen wurden in dieser Arbeit sowohl murine Retinae als auch murine vordere Augenabschnitte verwendet. Auch die Proteinisolation wurde mittels der peqGOLD TriFast™ Methode durchgeführt. Hierzu wurde nach Initiierung der Phasentrennung mittels Chloroform (Kapitel 2.2.4.1) die untere organische Phase verwendet, um die darin enthaltenen Proteine zu isolieren. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut, mit 750 µl Isopropanol versetzt und mithilfe des Vortexgerätes durchmischt. Nach einer Inkubationsphase von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben für 10 Minuten bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das verbleibende Pellet wurde insgesamt dreimal gewaschen. Dazu wurde dem Pellet jeweils 500 µl Trizol-Waschpuffer hinzugefügt, für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 5 Minuten bei 4 °C und 7.600 rpm zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 500 µl 95 %-Ethanol kräftig resuspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 4 °C und 7600 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde komplett entfernt. Die getrockneten Pellets wurden bei den Retinaprobe mit 200 µl Ureapuffer (mit 0,1 % Proteasehemmer und 0,1 % Phosphatasehemmer) resuspendiert, für 5 Minuten bei 95 °C in einem Thermomixer erhitzt und für 5 Minuten bei 4 °C und 13.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und längerfristig bei -80 °C gelagert. Bei den Proben des vorderen Augenabschnitts wurden die getrockneten Pellets mit 200 µl 1 %-igem SDS (mit 0,1 % Proteasehemmer und 0,1 % Phosphatasehemmer) resuspendiert. Die in SDS gelösten Proben wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und am darauffolgenden Morgen für 10 Minuten bei 7.600 rpm zentrifugiert. Auch hier wurde der Überstand entnommen und längerfristig bei -80 °C gelagert.

2.2.5.2 BCA-Untersuchung

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde in dieser Arbeit bei den in 1 %-igem SDS gelösten Proteinproben des vorderen Augenabschnitts Bicinchoninsäure (BCA) verwendet. Diese photometrische Methode basiert auf einer Kupferreduktion. Die Peptidbindungen der in der Probe enthaltenen Proteine reduzieren durch Zugabe von 100 µl BCA-Reagenz pro Probe Cu^{2+} zu Cu^+ , wobei das reduzierte Cu^+ zu einem lilafarbenen Komplex chelatiert, wel-

cher bei einer Wellenlänge von 562 nm sein Absorptionsmaximum bietet und mithilfe dem Sunrise-Basis ELISA Leser (Tecan Austria GmbH, Groding, Österreich) gemessen wurde. Zusätzlich wurde bei dieser Messung eine Standardreihe verwendet, mithilfe derer die Proteinkonzentration in der Gewebeprobe bestimmt werden konnte, da der Farbverlauf proportional zur Gesamtproteinmenge ist.

2.2.5.3 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Diese molekularbiologische Methode dient dem Nachweis von bestimmten, zu untersuchenden, Zielproteinen. Dabei bedient sie sich einer elektrophoretischen Übertragung der Proteine aus Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelen, in welcher diese zunächst entlang ihres Molekulargewichtes fraktioniert und dann in einem zweiten Schritt auf Polyvinylidenfluorid-Membranen übertragen werden. Diese Membranen wurden dann mit verschiedenen spezifischen Antikörpern angefärbt, um das Zielprotein zu detektieren (58,59). In dieser Arbeit wurde das Elektrophorese-System der PeqLab Biotechnologie GmbH verwendet. In Abhängigkeit des Molekulargewichts der zu detektierenden Proteine wurden Auftrennungsgel mit einer Konzentration von 6 %, 8 % wie auch 12 % verwendet (Tabelle 24). Das noch flüssige Gel in der jeweiligen Konzentration wurde in einen Gießrahmen, welcher durch zwei Glasplatten mit dazwischenliegenden Kunststoffabstandshaltern versehen war, gegossen und vorübergehend mit Isopropanol benetzt, um eine präzise Trennlinie zum Sammelgel zu erhalten. Nach Aushärtung wurde das Isopropanol vollständig entfernt und das Sammelgel (Tabelle 24) hinzugefügt, in welches ein Kamm mit 10 Kammern zum Füllen der Proteinproben eingesetzt wurde. Dieses Gel war nötig, um die Proteinproben zu konzentrieren. Nach Aushärtung des Sammelgels wurde dieses in eine Elektrophoresekammer gemäß den Herstellerangaben gegeben, die Kämme entfernt und diese mit 1x Elektrodenpuffer aufgefüllt.

Reagenz	Sammelgel (ml)	Auftrennungsgel (ml)		
		6 %	8 %	12 %
dH ₂ O	0,68	2,6	2,3	1,6
Rotiphorese®Gel	0,17	1,0	1,3	2,0
Tris-HCl, 1 M, pH 6,8	0,13	-	-	-
Tris-HCl, 1,5 M, pH 8,8	-	1,3	1,3	1,3
10 % SDS	0,01	0,05	0,05	0,05
10 % APS	0,01	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,001	0,004	0,003	0,002

Tabelle 24: Bestandteile des SDS-Gels für Western Blot-Analysen

Die in 1 %-igem SDS gelösten Proben des vorderen Augenabschnitts wurden mit 5x Laemmlipuffer versetzt und anschließend zur Proteindenaturierung für 5 Minuten bei 100 °C erhitzt. Es wurden 20 µg der in SDS gelösten Proteinproben des vorderen Augenabschnitts bzw. 15 µl der in Ureapuffer gelösten Proteinproben der Retina in die jeweilige Gelkammer geladen. Zusätzlich wurde zur Bestimmung des molekularen Proteingewichts in eine Gelkammer 5 µl eines entsprechenden Molekulargewichtsstandards für Proteine zugesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 20 mA pro Gel für ca. 60 - 90 Minuten durchgeführt, bis eine vollständige Separierung der Proteine ersichtlich war.

2.2.5.4 Halbtrockenes Übertragen der Proteine auf Polyvinylidenfluorid-Membranen (Semidry-Blotting)

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die separierten Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran; Millipore, Temecula, USA) mit einer Porengröße von 0,45 µm mittels eines halbtrockenen Elektroblotsystems übertragen. Hierzu wurde die PVDF-Membran durch kurzes Schwenken in Methanol für ca. 30 Sekunden aktiviert und anschließend in 1x Transferpuffer stabilisiert. Auch die verwendeten Whatman-Papiere wurden kurz in 1x Transferpuffer inkubiert. Die Anordnung der verwendeten Bestandteile findet sich in Tabelle 25. Nach Arrangement der einzelnen Bestandteile wurde der Übertragungsvorgang pro Gel für 45 Minuten bei 14 V, 300 W und 190 mA durchgeführt.

Kathode (-)	}	Ausstreichen etwaiger Luftblasen zwischen Gel und PVDF-Membran
3 Whatman Papiere		
Gel		
PVDF Membran		
2 Whatman Papiere		
Anode (+)		

Tabelle 25: Schematische Anordnung des Semidry-Blots

2.2.5.5 Detektion von spezifischen Proteinen

Mithilfe von spezifischen Antikörpern wurden Proteinbanden des Zielproteins mittels der in dieser Arbeit angewendeten Western Blot Methode sichtbar gemacht. Der entsprechend verwendete primäre Antikörper bindet hierbei spezifisch das Zielproteinantigen. Dieser Antigen-Antikörperkomplex wiederum wurde durch den eingesetzten sekundären Antikörper erkannt und gebunden. Da der eingesetzte sekundäre Antikörper mit HRP (Horseradish Peroxidase) konjugiert ist, kann dieser gebundene Komplex durch Zugabe von HRP-Substrat und dabei entstehender Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

Material und Methoden

Nach Abschluss des Proteinübertragungsvorgangs wurde die PVDF-Membran bei Raumtemperatur unter ständigem leichtem Schwenken für 60 Minuten in der entsprechenden Blockierlösung (Tabelle 26) inkubiert. Dieser Schritt diente der Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen. Nach erfolgtem Blockiervorgang wurde die Membran für 5 Minuten in TBS-T gewaschen und im Anschluss mit dem primären Antikörper (Tabelle 26) zunächst für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur und abschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Morgen wurde die Membran zunächst dreimal für jeweils 10 Minuten in TBS-T gewaschen und daraufhin mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (Tabelle 26) für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem leichtem Schwenken inkubiert.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Blockierlösungen sowie Antikörper werden in Tabelle 26 dargestellt.

Protein	Blockierlösung	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
VEGFR2	3% BSA in TBS-T	rabbit anti-VEGFR2, 1:1000 in 0,3% BSA in TBS-T	anti-rabbit IgG HRP, 1:2000 in 0,3% BSA in TBS-T
VEGF ₁₆₄	5% BSA in TBS-T	goat anti-VEGF ₁₆₄ , 1µg/ml in 0,5% BSA in TBS-T	anti-goat IgG HRP, 1:2000 in 0,5% BSA in TBS-T
HIF-1 α	5% Magermilchpulver in TBS-T	rabbit anti-HIF-1 α , 1:1000 in 0,5% Ma- germilchpulver in TBS-T	anti-rabbit IgG HRP, 1:2000 in 0,5% Mager- milchpulver in TBS-T
α -tubulin	5% BSA in TBS-T	rabbit anti- α -tubulin, 1:5000 in 0,5% BSA in TBS-T	anti-rabbit IgG HRP, 1:2000 in 0,5% BSA in TBS-T

Tabelle 26: Verwendete Substanzen bei Western Blot-Analysen

Nach vollständiger Inkubation mit dem sekundären Antikörper schloss sich erneut ein dreimal wiederholter Waschvorgang mit TBS-T für jeweils 10 Minuten an. Daraufhin wurde die Membran mit 1 ml Luminata Forte Western HRP Substrat (Millipore Corporation, Billerica, USA) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mithilfe des LAS-3000 Lumineszenz Bildanalyse-Systems (LAS-3000 Intelligent Dark Box, Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) visualisiert. Als Normierung wurden die Proteinproben ebenfalls mit einem Antikörper eines Housekeepers inkubiert, sodass die abschließende Auswertung der Zielproteine in Referenz zu diesem Housekeeper-Protein mit Hilfe der Software Aida Image Analyzer (v.406, Raytest) und der Excel-Software (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) durchgeführt wurde.

2.2.5.6 Coomassie-Färbung

Mithilfe der Coomassie-Färbung (60) ist es möglich, sämtliche Proteinbanden auf der PVDF-Membran nachzuweisen. Hierzu wurde die Membran in der Coomassie-Lösung unter permanentem leichtem Schwenken für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an diese Inkubationsphase wurde die Membran mit Coomassie-Entfärbelösung mehrmals gewaschen bis die Proteinbanden klar sichtbar waren. Schließlich wurde die getrocknete Membran mithilfe des Bildanalyse-Systems LAS 3000 (Intelligent Dark Box, Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) aufgenommen.

2.2.6 Histologische Methoden

2.2.6.1 Kryo Einbettung der Augen und Herstellung von Gefrierschnitten

Die entnommenen Augen wurden mit 4 % PFA für 4 Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde das PFA durch 0,1 M Php ersetzt, welcher dreimal, im Abstand von jeweils 10 Minuten, gewechselt wurde und daraufhin durch 10 % Saccharose ersetzt und über Nacht inkubiert wurde. Am nächsten Morgen wurde die 10 % Saccharose durch 20 % Saccharose und nach ca. 10 Stunden durch 30 % Saccharose ersetzt. Um Gefrierschnitte herstellen zu können wurden die Augen in Tissue-Tek® Befestigungsmedium eingebettet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und am Microm HM500 OM Kryostat (Microm International, Walldorf, Deutschland) 12 µm dünne Schnitte hergestellt, welche auf einem Objektträger fixiert wurden. Die so hergestellten Schnitte wurden entweder sofort gefärbt oder bei -20 ° C aufbewahrt.

2.2.6.2 Paraffin Einbettung der Augen und Herstellung von Paraffinschnitten

Die präparierten Augen wurden entweder ebenfalls mit 4 % PFA oder mit Methyl-Carnoy (10 % Eisessig, 60 % Methanol, 30 % Chloroform) jeweils für 4 Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Nach Beendigung des Fixierungsprozesses wurden die PFA-fixierten Augen in 0,1 M Php überführt, welcher dreimal, im Abstand von jeweils 10 Minuten, gewechselt wurde. Die Methyl-Carnoy-fixierten Augen wurden nach Abschluss des Fixierungsvorgangs für jeweils 10 Minuten zunächst in 50 %-iges und dann in 25 %-iges Methanol übertragen. Anschließend wurden die Augen in Aqua dest. für 10 Minuten überführt, daraufhin in 0,1 M Php übertragen und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Letztlich wurden alle Augen in Einbettförmchen überführt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (Tabelle 27) und nach einem standardisierten Protokoll in Paraffin eingebettet.

Reagenz	Dauer	Wiederholungen
50 % Isopropanol	1 Stunde	1
70 % Isopropanol	1 Stunde	1
70 % Isopropanol	über Nacht	1
70 % Isopropanol	1 Stunde	1
80 % Isopropanol	1 Stunde	1
96 % Isopropanol	1 Stunde	2
100 % Isopropanol	1 Stunde	2
100 % Isopropanol	2 Stunden	1
100 % Xylol	1 Stunde	1
100 % Xylol	1,5 Stunden	1
100 % Paraffin	4 Stunden	2
100 % Paraffin	8 Stunden	1

Tabelle 27: Protokoll der Dehydration für Paraffineinbettung

Nach erfolgreichem Durchlauf der Paraffin-Einbettreihe wurden die Augen aus den Einbettförmchen in Ausbettförmchen übertragen und mit flüssigem Paraffin übergossen. Die Ausbettung der Augen erfolgte streng sagittal, als Orientierungspunkte dafür dienten die Cornea und der N. opticus. Schließlich wurden die Ausbettförmchen zum Auskühlen auf eine Kälteplatte gelegt.

Mit Hilfe des Reichert-Jung Supercut 2050-Mikrotoms (Cambridge Instruments GmbH, Nussloch) wurden 6 µm dünne Sagittalschnitte hergestellt, welche auf Objektträger (SuperFrost/Plus, Menzel) überführt wurden und bei 37 °C über Nacht getrocknet wurden. Nach erfolgreichem Trocknungsprozess wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für die weitere Verwendung gelagert.

2.2.6.3 Epon Einbettung und Herstellung von Semi- sowie Ultradünnschnitten

Die entnommenen Augen wurden für 24 Stunden in EM-Fixiermittel fixiert. Hierbei erfolgte 60 Minuten nach Beginn des Fixierprozesses ein kleiner Corneaschnitt, um dem Fixiermittel das Eindringen in den Bulbus zu erleichtern. Am darauffolgenden Tag wurden die Präparate dreimal für jeweils 20 Minuten mit 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte ein Osmierungsschritt mit 1 % Osmiumtetroxid für 3 Stunden und 30 Minuten, worauf ein viermaliger, jeweils 30-minütiger Waschschrift mit Aqua bidest. folgte, um etwaige Ablagerungen zu verhindern. Im darauffolgenden Schritt wurden die entnommenen Augen in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (Tabelle 28).

Reagenz	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
25 % Ethanol	4 °C	15 Minuten	2
35 % Ethanol	4 °C	15 Minuten	2
50 % Ethanol	4 °C	15 Minuten	2
60 % Ethanol	4 °C	15 Minuten	2
70 % Ethanol	4 °C	15 Minuten	2
70 % Ethanol	4 °C	2 Tage	1
80 % Ethanol	4 °C	40 Minuten	2
90 % Ethanol	Raumtemperatur	40 Minuten	3
100 % Ethanol	Raumtemperatur	45 Minuten	3

Tabelle 28: Protokoll der Dehydration für Eponeinbettung

Die weitergehende Eponeinbettung der in 100 %igem Ethanol asservierten Augen wurde nach einem standardisierten Protokoll (Tabelle 29) durchgeführt:

Reagenz	Mischungsverhältnis
Ethanol/Aceton	1:1
Aceton	100 %
Epon/Aceton	1:2
Epon/Aceton	2:1
Epon	100 %

Tabelle 29: Protokoll für Eponeinbettung

Sowohl die Dehydrationsreihe als auch die Eponeinbettungsschritte wurden mit Hilfe des Gewebearbeitungsautomaten Leica EM TP (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Dieses Gerät ist in der Lage, eine konstante Verarbeitungstemperatur des Harzes zu halten. Die Augen wurden 72 Stunden lang bei 60 °C gehärtet. Für die Einbettung mit 2 % DMP-30 wurden Epon-Stamm A und Epon-Stamm B 1:1 gemischt. Schließlich wurden einerseits Semidünnschnitte (1 µm dünn) mit Hilfe des Ultracut E Reichert-Jung Microtome (Cambridge Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) erstellt und diese mit Richardson's Färbung (61) angefärbt. Die weitergehende Analyse erfolgte mittels Semidünnschnittlichtmikroskopie. Andererseits wurden Ultradünnschnitte (60 nm dünn) für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erstellt. Hierzu wurde ein kleiner Bereich des bereits semidünngeschnittenen Präparats für die ultradünnen Schnitte herausgetrimmt und anschließend mit Hilfe des Ultracut E Reichert-Jung Microtome (Cambridge Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) geschnitten. Zur Kontrastierung des ultradünnen Schnitts wurde 3 %-iges Uranylacetat für 30 Minuten hinzugegeben, welches anschließend gründlich mit Aqua bidest. gespült und kurz getrocknet wurde. Anschließend wurde für 60 Sekunden Bleicitrat hinzugefügt, welches ebenfalls im Anschluss gründlich mit Aqua bidest. gespült wurde. Nach einem ausreichend langen (mind. 24 Std.) Trocknungsprozess wurden die

Schnitte mit dem Elektronenmikroskop (EM 10A Elektronenmikroskop, Zeiss, Göttingen, Deutschland) untersucht.

2.2.6.4 Morphometrische Analyse und Quantifikation anhand von Semidünnschnittpräparaten

Um die retinale Morphologie zu untersuchen, wurden Semidünnschnittpräparate hergestellt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Für morphometrische Untersuchungen der Retina wurde in dieser Arbeit die Dicke der INL und ONL mithilfe der Software ImageJ (ImageJ2x, Wayne Rasband, ehemals NIH, Bethesda, MD, USA) vermessen. Hierzu wurde zunächst der Abstand zwischen der OS und dem ONH am RPE jeder Hemisphäre gemessen. Diese aufgezeichnete Strecke wurde in Zehntel geteilt, sodass reproduktive Messpunkte jeder Hemisphäre generiert wurden, an welchen die Dicke der Körnerschichten vermessen wurde. Für die Messung wurden jeweils die Mittelwerte der jeweiligen Messpunkte (jeweils separat pro Abbildung angegeben) graphisch in einem Spiderdiagramm aufgetragen. Es erfolgte eine statistische Auswertung der Mittelwerte sowie der Standardabweichungen und SEMs für jeden Messpunkt mithilfe der Excel-Software (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA).

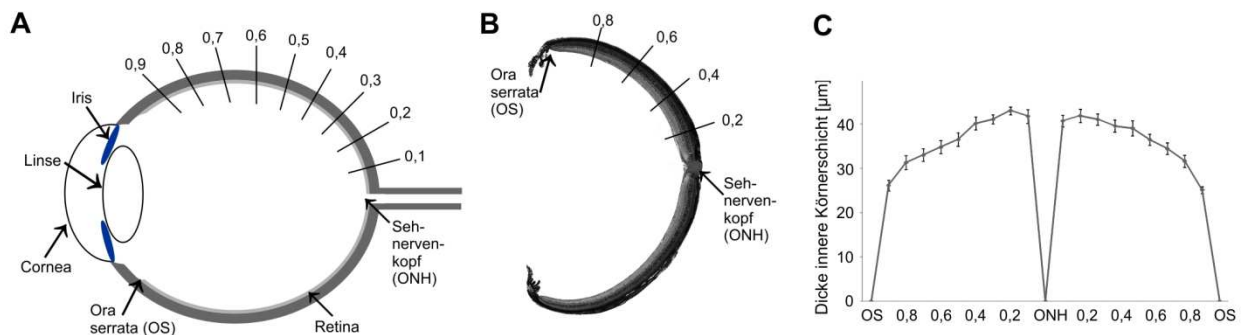


Abbildung 8: Morphometrische Analyse der Retina anhand von Semidünnschnittpräparaten

(A) Schematische Darstellung eines Bulbus mit Positionierung der retinalen Messpositionen auf einer Hemisphäre für die Dickenmessung der beiden Körnerschichten der Retina. Die darauffolgenden Messungen wurden jeweils an den zugewiesenen Messpunkten durchgeführt. (B) Eine lichtmikroskopische Panoramaaufnahme der Retina mit exemplarischer Kennzeichnung von ausgewählten Messpunkten auf einer Hemisphäre. (C) Ein exemplarisches Spiderdiagramm der Retina zeigt hier die Dicke der inneren Körnerschicht, vermessen an 21 definierten Messpunkten. Abbildung erstellt durch A. Grundl

Zur weitergehenden Untersuchung der retinalen Morphologie wurde in dieser Arbeit ebenfalls die GCL untersucht. Hierbei wurde jedoch im Gegensatz zur INL und ONL keine Vermessung der Schichtdicke, sondern eine Quantifizierung der einzelnen Zellen in der

Ganglienzellschicht (GCL) durchgeführt. Zur Normierung wurde der Abstand zwischen der OS und dem ONH am RPE jeder Hemisphäre gemessen und die quantifizierten Zellen der GCL dazu in Relation gesetzt. Diese Quantifizierung erfolgte mithilfe dem Cell Counter Plugin der Software ImageJ (ImageJ2x, Wayne Rasband, ehemals NIH, Bethesda, MD, USA). Auch hierbei wurden Mittelwerte der einzelnen Quantifikationsergebnisse gebildet. Eine statistische Auswertung der Mittelwerte, der Standardabweichungen sowie der SEMs erfolgte ebenfalls mithilfe der Excel-Software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), um die Ergebnisse zwischen der Kontroll- und Experimentalgruppe zu vergleichen.

2.2.6.5 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Färbungen wurden in dieser Arbeit sowohl an Gefrierschnitten als auch an Paraffinschnitten durchgeführt. Hierbei wurde die Technik der Immunhistochemie angewendet, welche die gezielte Visualisierung von molekularen Strukturen in Geweben ermöglicht, sodass Aussagen über deren Lokalisation und Verteilung möglich sind. Hierbei wird die chemische Bindung zwischen Antigenen der Zielproteine und ihren hinzugefügten komplementären Antikörpern genutzt, an welche in einem zweiten Schritt sekundäre, mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierte, Antikörper binden. Die Bildauswertung erfolgte nach Abschluss des Färbeprozesses durch Fluoreszenzmikroskopie (Axio Imager Z1 (Zeiss, Göttingen, Deutschland)).

2.2.6.5.1 Immunhistochemische Färbungen von Gefrierschnitten (Kryoschnitten)

Sämtliche verwendete Präparate für die immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten wurden nach Präparation mit 4 % PFA fixiert. Die auf einem Objektträger fixierten 12 µm dünnen Kryoschnitte wurden bei Raumtemperatur für 5 Minuten getrocknet und anschließend in 0,1 M Php für 5 Minuten gewaschen, um das restliche Einbettungsmedium zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Fettstift (PapPen) eingerahmt und für 60 Minuten mit der für die Färbung entsprechenden Blockierlösung (Tabelle 30) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die primäre Antikörperlösung (Tabelle 30) hinzugegeben und für eine Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Morgen wurden die Schnitte dreimal mit 0,1 M Php für jeweils 5 Minuten gewaschen und anschließend mit der sekundären Antikörperlösung (Tabelle 30) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationsphase schloss sich erneut ein dreimaliger Waschschriff mit 0,1 M Php an und eine Überführung in Aqua dest. für 5 Minuten. Zur Gegenfärbung der Kern-DNA wurde 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet, welches im Verhältnis 1:10 in einem fluoreszierenden Einbettungsmedium

Material und Methoden

(Mowiol + DAPI) verdünnt wurde, um einen Kontrast und eine bessere Orientierung zu ermöglichen. Schließlich wurden die Proben durch Einsetzen eines Deckglases versiegelt, um den gefärbten Schnitt zu stabilisieren. Ab Zugabe des sekundären Antikörpers wurde der Färbeprozess unter lichtgeschützten Bedingungen durchgeführt. Auch wurden für die jeweilige immunhistochemische Färbung Negativkontrollen, welche eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers ausschließen, durchgeführt. Eine Vorbehandlung erfolgte lediglich bei der Färbung auf das ionisierte Kalzium-bindende Adapterprotein 1 (IBA-1 Färbung) für 30 Minuten mit 0,05 M NH₄Cl mit anschließendem dreimaligen Waschvorgang mit 0,1 M Php, an welchen sich die Applikation der Blockierlösung anschloss.

Protein	Blockierlösung	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
VEGFR2	2 % BSA/ 0,2 % CWFG/ 0,1 M Php	rabbit anti-VEGFR2 1:200 in 0,2 % BSA/ 0,02 % CWFG/ 0,1 M Php	1.) biotinylierter anti-rabbit IgG 1:500 in 0,2 % BSA/ 0,02 % CWFG/ 0,1 M Php 2.) Streptavidin Alexa Fluor 555 1:1000 in 0,2 % BSA/ 0,02 % CWFG / 0,1 M Php
VEGFa₁₆₄ (vorderer Au- genabschnitt)	1 % BSA/ 0,3 % TRITON/ 0,1 M Php	goat anti-VEGFa ₁₆₄ 1:20 in 0,1 % BSA/ 0,03 % TRITON/ 0,1 M Php	1.) biotinylierter anti-goat IgG 1:500 in 0,1 % BSA/ 0,03 % TRITON/ 0,1 M Php 2.) Streptavidin Alexa Fluor 555 1:1000 in 0,1 % BSA/ 0,03 % TRITON/ 0,1 M Php
GFAP	3 % BSA/ 0,1 % TRITON/ 0,1 M Php	rabbit anti-GFAP 1:500 in 0,3 % BSA/ 0,01 % TRITON/ 0,1 M Php	anti-rabbit Cy TM 3 IgG 1:2000 in 0,3 % BSA/ 0,01 % TRI- TON/ 0,1 M Php
CD 31	5% Magermilch- pulver/ 0,1 M Php	goat anti-CD31 1:50 in 0,5 % Magermilch- pulver/ 0,1 M Php	anti-goat Cy TM 3 IgG 1:2000 in 0,5 % Magermilchpulver/ 0,1 M Php
Collagen IV	2 % BSA/ 0,1 M Php	rabbit anti-Collagen IV 1:100 in 0,2 % BSA / 0,1 M Php	anti-rabbit Cy TM 3 IgG 1:2000 in 0,2 % BSA/ 0,1M Php
IBA-1	2 % BSA / 0,1 % TRITON/ 0,1 M Php	rabbit anti-IBA-1 1:500 in 0,2 % BSA / 0,01 % TRITON/ 0,1 M Php	anti-rabbit Cy TM 3 IgG 1:2000 in 0,2 % BSA/ 0,01 % TRI- TON/ 0,1 M Php

Tabelle 30: Immunhistochemische Färbeprotokolle für Gefrierschnitte

2.2.6.5.2 Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten

Um immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten durchführen zu können, wurden die auf einem Objektträger fixierten 6 µm dünnen Schnitte entparaffiniert (Tabelle 31).

Reagenz	Dauer	Wiederholungen
100 % Xylol	10 Minuten	2
100 % Isopropanol	10 Minuten	2
96 % Isopropanol	5 Minuten	2
80 % Isopropanol	5 Minuten	2
70 % Isopropanol	5 Minuten	1
Aqua bidest.	5 Minuten	1

Tabelle 31: Protokoll zur Entparaffinierung

Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst vorbehandelt und anschließend mit einer Blockierlösung und den entsprechenden Antikörpern versehen (spezifisches Vorgehen analog Kapitel 2.2.6.5.1). Die Gegenfärbung mit DAPI erfolgte ebenfalls analog zu den Gefrierschnitten (Kapitel 2.2.6.5.1). Auch hier wurden für die jeweilige Färbung Negativkontrollen angefertigt. Tabelle 32 zeigt die für die Paraffinschnitte in dieser Arbeit verwendeten Vorbehandlungen, Blockierungen und Antikörper.

Protein	Vorbehandlung	Blockierlösung	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
PLVAP Fixierung: Methyl- Carnoy	1.) 5 Minuten 0,05 M TRIS HCl 2.) 5 Minuten Proteinase K in TRIS HCl 3.) 30 Minuten 2 N HCl	2 % BSA/ 0,2 % CWFG/ 0,1 % TRITON/ 0,1 M Php	rat anti-PLVAP 1:50 in 0,2 % BSA/ 0,02 % CWFG/ 0,01 % TRITON/ 0,1 M Php	1.) biotinylierter anti- rat IgG 1:500 in 0,2 % BSA/ 0,02 % CWFG/ 0,01 % TRITON/ 0,1 M Php 2.) Streptavidin Alexa Fluor 546 1:1000 in 0,2 % BSA/ 0,02 % CWFG / 0,1 M Php
VEGFa₁₆₄ <i>(Retina)</i> Fixierung: PFA	1.) 5 Minuten 0,05 M TRIS HCl 2.) 5 Minuten Proteinase K in TRIS HCl 3.) 30 Minuten 2 N HCl	1 % BSA/ 0,3 % TRITON/ 0,1 M Php	goat anti- VEGFa ₁₆₄ 1:50 in 0,1 % BSA/ 0,03 % TRITON/ 0,1 M Php	1.) biotinylierter anti- goat IgG 1:500 in 0,1 % BSA/ 0,03 % TRI- TON/ 0,1 M Php 2.) Streptavidin Alexa Fluor 546 1:1000 in 0,1 % BSA/ 0,03 % TRITON/ 0,1 M Php
GFAP Fixierung: PFA	-	3 % BSA/ 0,1 % TRITON/ 0,1 M Php	rabbit anti- GFAP 1:500 in 0,3 % BSA/ 0,01 % TRITON/ 0,1 M Php	anti-rabbit Cy TM 3 IgG 1:2000 in 0,3 % BSA/ 0,01 % TRITON/ 0,1 M Php

Tabelle 32: Immunhistochemische Färbeprotokolle für Paraffinschnitte

2.2.6.5.3 Immunhistochemische Färbungen von Netzhautflächpräparaten

In dieser Arbeit wurden Netzhautflächpräparate (detaillierte Präparation, Kapitel 2.2.2.3) hergestellt und je nach Fragestellung immunhistochemisch angefärbt. Der Ablauf der immunhistochemischen Färbung ist mit dem unter Kapitel 2.2.6.5.1 beschriebenen Vorgehen vergleichbar; alle Änderungen sind in Tabelle 33 aufgeführt. Die Netzhautflächpräparate wurden nicht mit DAPI gegengefärbt. Das Präparat wurde mit Mowiol und einem Deckglas fixiert. Auch wurden als Kontrolle zum Ausschluss unspezifischer Bindungen des sekundären Antikörpers Negativkontrollen durchgeführt.

Protein	Vorbehandlung	Blockierlösung	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
GFAP	1.) 60 Minuten 50 mM NH ₄ Cl	2 % BSA/0,2 % CWFG/ 0,1 % TRITON/0,1 M Php	rabbit anti-GFAP 1:1000 in 0,2 % BSA/ 0,02 % CWFG/ 0,01 % TRITON/ 0,1 M Php	anti-rabbit Cy TM 3 IgG 1:2000 in 0,2 % BSA/ 0,02 % CWFG/ 0,01 % TRITON/ 0,1 M Php
FITC-Dextran-perfundiert, 2 Stunden in 4 % PFA fixiert	2.) 30 Minuten 0,5 % TRITON			

Tabelle 33: Immunhistochemisches Färbeprotokoll für Netzhautflächpräparate

2.2.6.6 Quantitative Analyse immunhistochemisch gefärbter Präparate anhand von Paraffinschnitten

In dieser Arbeit wurden quantitative Untersuchungen von immunhistochemisch angefärbten Präparaten durchgeführt. Hierzu wurden ausschließlich Paraffinschnitte verwendet, welche mit Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (Tabelle 32) angefärbt und anschließend quantifiziert wurden. Die Quantifizierung der einzelnen GFAP-positiven Zellen wurde auf die jeweils gemessene Länge des Abstandes zwischen der OS und dem ONH am RPE jeder Hemisphäre normiert und erfolgte mithilfe der Software ImageJ, cell counter (ImageJ2x, Wayne Rasband, ehemals NIH, Bethesda, MD, USA). Hierbei wurden Mittelwerte der einzelnen Quantifikationsergebnisse gebildet. Eine statistische Auswertung der Mittelwerte, der Standardabweichungen sowie der SEMs erfolgte mithilfe der Excel-Software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), um die Ergebnisse zwischen der Kontroll- und Experimentalgruppe zu vergleichen.

2.2.6.7 Apoptotischer Zelltod: Terminale Desoxynukleotidyltransferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL-Analysen)

Apoptose ist ein programmierter Zelltod, betrifft typischerweise einzelne Zellen und äußert sich histologisch durch die Bildung kleiner Zytoplasma-Fragmente, von denen einige pyknotische Kernreste enthalten (62). Die TUNEL-Untersuchung ist eine Methode zum Nachweis dieser DNA-Fragmentierung, da durch den DNA-Strangbruch an den jeweiligen Bruchenden freiliegende 3'-OH-Gruppen durch das Enzym terminale Desoxynukleotidyltransferase mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden versehen werden, welche sekundär durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden können (63). In dieser Arbeit wurde das Apoptose-Detektionssystem (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, Promega) verwendet. Hierbei wurden mit 4 % PFA-fixierte Augen in Paraffin eingebettet und 6 µm dünn geschnitten (Kapitel 2.2.6.2). Nach Entparaffinierung (Tabelle 31) wurde das folgende Protokoll, welches Tabelle 34 zeigt, durchgeführt.

Reagenz	Dauer (Min)	Wiederholungen
50 % Isopropanol	5	1
Aqua bidest.	5	1
0,89 % NaCl	5	1
1x phosphatgepufferte Kochsalzlösung (1x PBS)	5	2
4 % PFA	15	1
1x PBS	5	2
Proteinase K (1:500 in 1xPBS)	8	1
1x PBS	5	2
4 % PFA	5	1
1x PBS	5	2
100 µl Äquilibriumspuffer	10	1
50 µl rTDT Inkubationspuffer (37 °C)	60	1
2x SSC	15	1
1x PBS	5	1
Aqua bidest.	5	1

Tabelle 34: Protokoll TUNEL-Analyse

Für die letzten drei beschriebenen Schritte (Tabelle 34) wurde die Behandlung unter reduzierten Lichtverhältnissen durchgeführt. Nach Beendigung der TUNEL-Färbung erfolgte die Gegenfärbung mit DAPI analog zu den Gefrierschnitten (Kapitel 2.2.6.5.1).

Es erfolgte nach Aufnahme der Bilddateien mithilfe des Axio Imager Z1-Mikroskops (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) die Quantifizierung der einzelnen TUNEL-positiven Kerne unter Einsatz des Cell Counter Plugin in ImageJ (ImageJ2x, Wayne Rasband, ehemals NIH, Bethesda, MD, USA).

Zur Normierung wurde der Abstand zwischen der OS und dem ONH am RPE jeder Hemisphäre gemessen und die TUNEL-positiven Kerne dazu in Relation gesetzt. Hierbei wurden

Mittelwerte der einzelnen Quantifikationsergebnisse gebildet. Eine statistische Auswertung der Mittelwerte, der Standardabweichungen sowie der SEMs erfolgte mithilfe der Excel-Software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) um die Ergebnisse zwischen der Kontroll- und Experimentalgruppe zu vergleichen.

2.2.6.8 Enzymhistochemische Färbetechniken

In dieser Arbeit wurden zwei enzymhistochemische Färbetechniken verwendet: Die β -Galactosidase Aktivitätsfärbung und der Adenosindiphosphatase-Nachweis (ADPase-Nachweis). In beiden Verfahren wurden die zu analysierenden Gewebebereiche mit einem Substrat unter vordefinierten Bedingungen inkubiert, welches für das betreffende Enzym spezifisch ist. Das durch die enzymatische Reaktion entstandene Produkt wurde in einen unlöslichen Farbstoff überführt, sodass die enzymatische Aktivität durch die resultierende Farbveränderung nachgewiesen werden konnte.

2.2.6.8.1 β -Galactosidase Aktivitätsfärbung

Bei Rosa-LacZ-Reporter- und CAGGCre- verpaarten Mäusen wurde die Cre-Rekombinase durch Tamoxifen-Augentropfen induziert. Dies hatte bei Anwesenheit der Cre-Rekombinase zur Folge, dass ein Stop-Codon im LacZ-Gen entfernt wurde, was zur Produktion von β -Galactosidase führte. Die Aktivität der β -Galactosidase konnte enzymhistochemisch nachgewiesen werden, indem das farblose X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) hinzugesetzt wurde. Die β -Galactosidase katalysierte hierbei die Hydrolyse von X-Gal zu Galaktose und einem Indigo-Farbstoff, welcher lichtmikroskopisch nachgewiesen werden konnte. Im Falle der Abwesenheit der Cre-Rekombinase kann dieser Vorgang nicht stattfinden, sodass die Blaufärbung ausbleibt (64).

In dieser Arbeit wurde die β -Galactosidase-Aktivitätsfärbung an Netzhautflächpräparaten sowie an Gefrierschnitten durchgeführt. Dafür wurden, nach Entnahme der Augen an P8, diese, angelehnt an bereits früher publizierte Protokolle (65,66), fixiert und anschließend dreimal mit LacZ-Waschpuffer (1 M $MgCl_2$, 1 % NaDC, 2 % Tergitol NP-40 in 0,1 M Php) für jeweils 10 Minuten gewaschen. Es schloss sich die Behandlung mit LacZ-stain (bestehend aus LacZ-Waschpuffer, 5 mM Kaliumferrocyanid, 5mM Kaliumhexacyanoferrat (III) und 1 mg/ml X-Gal in 0,1 M Php) an, womit entweder das Netzhautflächpräparat oder das enukleierte, vollständige Auge benetzt wurde. Die Inkubation fand in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 24 Stunden im Dunkeln statt, damit die β -Galactosidasereaktion stattfinden konnte. Am nächsten Tag wurde das Präparat dreimal mit LacZ-Waschpuffer vorsichtig ge-

waschen und die Netzhautflächpräparate mit Mowiol und einem Deckglas fixiert. Die für die Gefrierschnitte bestimmten Augen wurden nach Abschluss der Färbung analog zu Kapitel 2.2.6.1 behandelt. Nachdem die Präparate 24 Stunden lang getrocknet waren, wurden lichtmikroskopische Aufnahmen (Axio Imager Z1 (Zeiss, Göttingen, Deutschland)) angefertigt.

2.2.6.8.2 ADPase-Nachweis

ADPase ist bekannt als ein Ektoenzym, welches auf Endothelzellen vorhanden ist und der Gruppe der Phosphatase-Enzyme zugehörig ist. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte ADPase katalysiert die Hydrolyse von Adenosindiphosphat (ADP) in Adenosinmonophosphat und einem anorganischen Phosphat (67). In der im Anschluss beschriebenen Methode wird die ADPase-Aktivität auf den Endothelzellen nachgewiesen, indem Ammoniumsulfat hinzugegeben wird, welches die Entstehung eines braunen Bleisulfidreaktionsproduktes verursacht (68). In dieser Arbeit wurde die ADPase in Irisflächpräparaten nachgewiesen, um somit die Blutgefäße darzustellen. Die Präparate wurden an P13 entnommen, anschließend erfolgte eine Präparation der Iris (Kapitel 2.2.2.4). Das so entstandene Flachpräparat wurde auf einen Objektträger übertragen und für 10 Minuten in klares Leitungswasser überführt. Anschließend wurde für 15 Minuten 5 mM TRIS-Maleatpuffer zugesetzt, dieser Vorgang wurde weitere drei Mal wiederholt. Darauffolgend wurde das Präparat mit dem vorbereiteten Reaktionsmedium (0,2 M TRIS-Maleatpuffer, pH 7,2, 3 mM Bleinitrat, 6 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml ADP) für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Abschluss des Reaktionsprozesses wurde fünfmal für jeweils 5 Minuten mit 5 mM TRIS-Maleatpuffer gewaschen und das Präparat für weitere 5 Minuten in Aqua dest. überführt. Anschließend wurde für 1 Minute 2 % Ammoniumsulfid zugesetzt. Nach Abschluss dessen wurde dreimal für jeweils 5 Minuten mit Aqua dest. gewaschen und das Präparat mit Glycerin und einem Deckglas fixiert. Nach einer 24-stündigen Trocknungsperiode wurden lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht (Axio Imager Z1 (Zeiss, Göttingen, Deutschland)).

2.2.7 Bildanalysen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bilddateien wurden mithilfe der Software ImageJ (ImageJ2x, Wayne Rasband, ehemals NIH, Bethesda, MD, USA) und der darin enthaltenen Messfunktionen via Plugins (Zellenzähler, Längenvermessung) analysiert.

2.2.8 Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie

Die durch immunhistochemische bzw. histochemische Färbungen produzierten mikroskopischen Daten dieser Arbeit wurden mithilfe des Axio Imager Z1-Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) aufgenommen.

2.2.9 Statistische Auswertung

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten histochemischen und immunhistochemischen Färbungen wurden an mindestens drei verschiedenen Tieren durchgeführt. Die RT-PCR wurde für jede Probe in Triplikaten durchgeführt. Die gewonnenen Daten wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Ferner wurde ein zweiseitiger Student's t-test für die statistischen Analysen der molekularbiologischen Methoden unter Verwendung der Excel-Software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) verwendet. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

ERGEBNISSE

2.3 VEGFR2-KNOCKDOWN IM MAUSAUGE

2.3.1 Genotypisierung der Versuchstiere mittels PCR

Im Vorfeld der Experimente wurde jedes Tier mittels PCR genotypisiert, um die homozygote Ausprägung der loxP-sites im *Vegfr2-Gen* ($Vegfr2^{fl/fl}$) zu verifizieren und um ferner eine Zuordnung zur Kontrollgruppe ($Vegfr2^{fl/fl}$ - positiv, CAGGCre - negativ) bzw. zur Experimentalgruppe ($Vegfr2^{fl/fl}$ - positiv, CAGGCre - positiv; abgekürzt als $Vegfr2^{\Delta eye}$) zu ermöglichen. Die Verifikation des Vorhandenseins der beiden loxP-sites wurde durch das Vorliegen einer 230 bp DNA-Bande und die gleichzeitige Abwesenheit einer 179 bp DNA-Bande sichergestellt. Das Vorhandensein einer DNA-Bande bei 270 bp zeigte das Vorhandensein der CAGGCre an, sodass die betreffenden Tiere der Experimentalgruppe zugeordnet wurden. Bei Abwesenheit dieser Bande wurde das Tier der Kontrollgruppe zugeordnet (Abbildung 9).

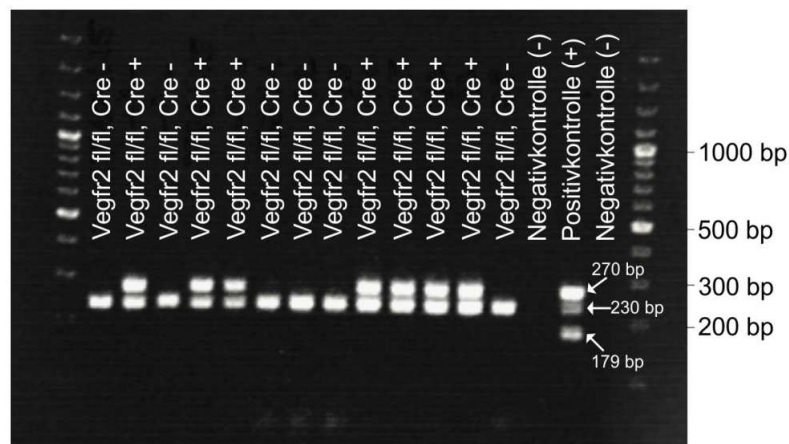


Abbildung 9: Genotypisierung von $Vegfr2^{fl/fl}$ Mäusen inklusive Differenzierung des Vorhandenseins der Cre-Rekombinase (CAGGCre)

Eine repräsentative $Vegfr2^{fl/fl};CAGGCre$ -PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese visualisiert. Diese zeigte bei allen Proben 230 bp DNA-Banden, welche für das homozygote Vorliegen der beiden loxP-sites sprechen ($Vegfr2^{fl/fl}$). Außerdem lag in keiner der Proben eine Bande bei 179 bp vor, sodass ein heterozygotes Vorliegen der loxP-sites ausgeschlossen werden konnte. Eine etwaige vorhandene DNA-Bande bei 270 bp zeigte das Vorhandensein der CAGGCre an ($Vegfr2^{fl/fl}$, Cre +: $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse). Bei Abwesenheit dieser Bande lag keine CAGGCre-Rekombinase vor ($Vegfr2^{fl/fl}$, Cre -: Kontrolltiere). Bei jeder PCR wurde zeitgleich eine Negativkontrolle (DNA Template wurde durch Zugabe einer äquivalenten Menge an H_2O ersetzt) sowie eine Positivkontrolle (bereits vorhergehend erfolgreich verifizierter Genotyp, hier gezeigt ein heterozygotes $Vegfr2^{fl^{WT}}$, Cre-positives (Cre +)-Tier) durchgeführt.

bp = Basenpaar

2.3.2 Verifikation der homogenen Rekombination durch Rosa-LacZ-Reportermäuse (R26R) mittels Tamoxifen Augentropfen

Mithilfe einer Cre-Reportermaus (Rosa-LacZ, R26R-Maus (69)) wurde an P8 die erfolgreiche Rekombination der Cre-Rekombinase nach Tamoxifen-Augentropfengabe im Auge nachgewiesen. Hierbei wurde detailliert insbesondere die Retina, der ONH und der Ziliarkörper mit angrenzender Iris untersucht. Es wurden homozygote Rosa-LacZ-Reportermäuse mit CAGGCre-tragenden Mäusen gekreuzt und deren Abkömmlinge einer β -Galactosidasereaktion ausgesetzt. Die enzymatische Reaktion wurde sowohl an Netzhautflächpräparaten als auch an Gefrierschnitten durchgeführt. Da LacZ nur in jenem Gewebe exprimiert wird, in welchem auch die Cre exprimiert wird und aktiv ist (69), reagierten die doppelt transgenen CAGGCre-ERTM; R26R-Mäuse mit einer enzymatischen Reaktion, welche durch die Entstehung eines blauen Farbstoffes visualisiert werden konnte, wohingegen die Kontrolltiere keinerlei blaues Signal aufwiesen (Abbildung 10 A, B). Somit konnte die erfolgreiche Induktion der Cre-Expression durch die Applikation von Tamoxifen-Augentropfen bestätigt werden. An den retinalen Flachpräparaten der CAGGCre-ERTM; R26R-Mäusen war ein deutliches und homogen verteiltes Signal in der gesamten Netzhaut zu erkennen (Abbildung 10 A). Eine detaillierte Betrachtung sagittaler Gefrierschnitte zeigte ein starkes Signal in der gesamten Netzhaut, des ONHs und des unpigmentierten sowie des pigmentierten Ziliarkörperepithels sowie in der Iris (Abbildung 10 B).

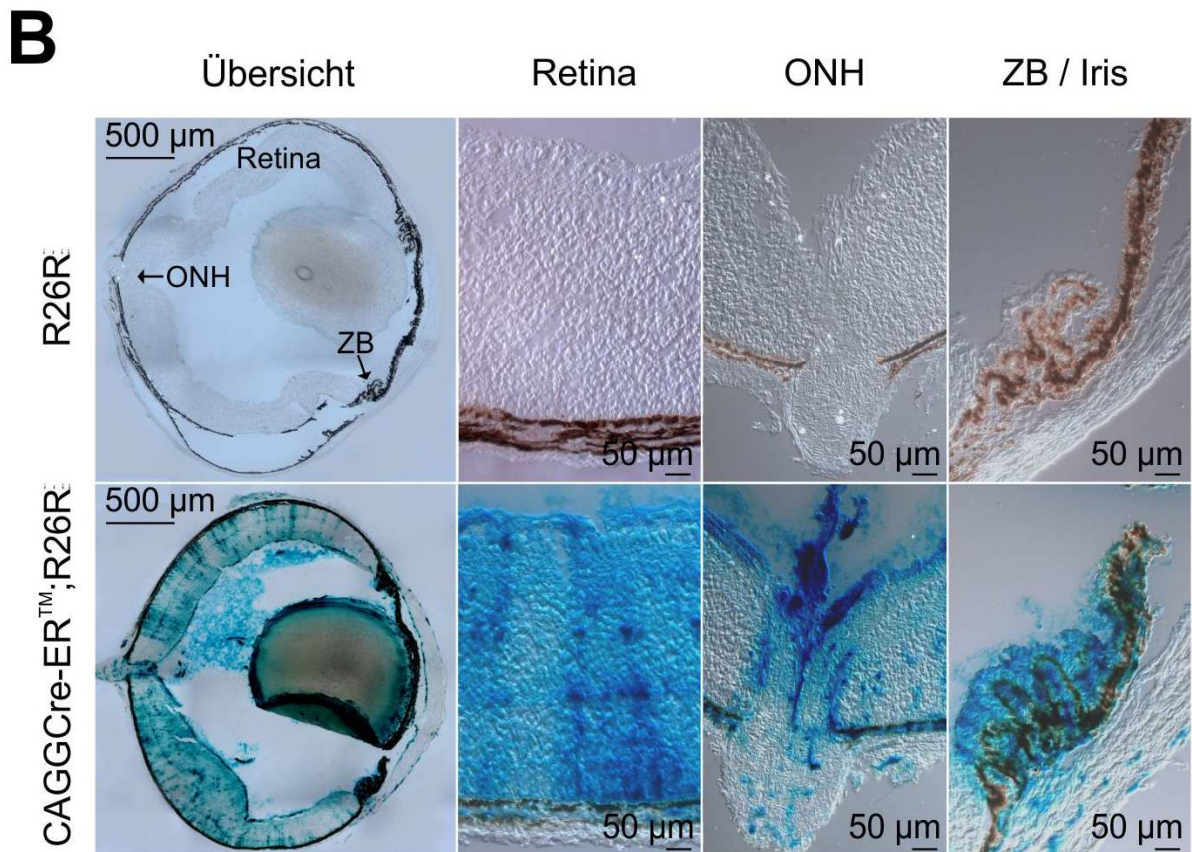
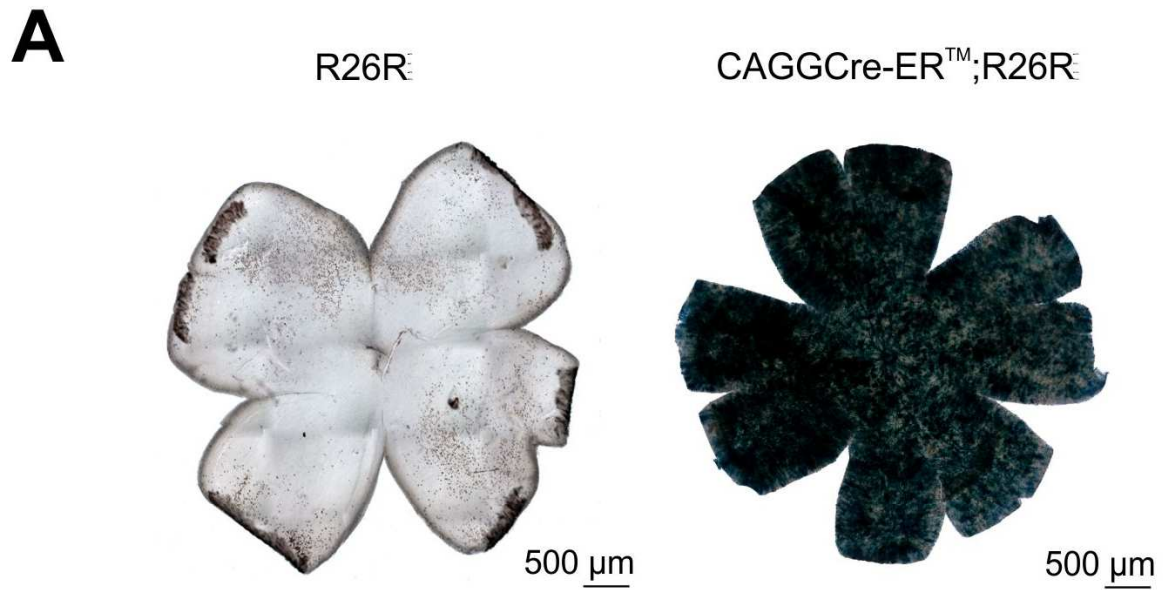


Abbildung 10: Rosa-LacZ Reporter-mäuse (R26R): Mikroskopische Aufnahmen der β -Galaktosidaseaktivitätsfärbung an P8

(A) Repräsentative β -Galaktosidaseaktivitätsfärbung an Netzhautflächpräparaten von CAGGCre-ERTM;R26R-Mäusen an P8 zeigte eine homogene Verteilung des durch die enzymatische Aktivität der β -Galaktosidase gebildeten Indigo-farbenen Signals in der gesamten Netzhaut der doppelt transgenen R26R;CAGGCre-ERTM-Maus, während die Netzhaut des Kontrolltieres keine blaue Färbung zeigte. **(B)** β -Galaktosidaseaktivitätsfärbung an Gefrierschnitten von CAGGCre-ERTM;R26R-Mäusen an P8 zeigte ein Indigo-farbiges Signal in der Netzhaut, dem

Ergebnisse

ONH, dem Ziliarkörper und der Iris der doppelt transgenen R26R;CAGGCre-ERTM-Maus, während die äquivalenten Gewebe des Kontrolltieres keine blaue Färbung zeigten.

ONH = Sehnervenkopf, ZB = Ziliarkörper

2.3.3 Nachweis des konditionellen *Vegfr2*-Knockdowns in der Retina

Um den retinalen Knockdown der *Vegfr2*-Expression in den *Vegfr2*^{Δeye}-Mäusen zu verifizieren wurden mRNA- und Proteinanalysen an retinalem Gewebe von *Vegfr2*^{Δeye}-Mäusen und deren Kontrollgeschwistertieren an P13 durchgeführt.

Mithilfe der RT-PCR wurde das signifikant reduzierte mRNA Expressionslevel von *Vegfr2* in der Retina der *Vegfr2*^{Δeye}-Mäuse (n=6; 0,26 ± 0,09; **p=0,003) im Vergleich zu den Kontrollgeschwistertieren (n=6; 1 ± 0,19) nachgewiesen (Abbildung 11 A). Ergänzend konnte der Knockdown von *Vegfr2* durch Western Blot Analysen von Gewebe der sensorischen Netzhaut auf Proteinebene bestätigt werden (Abbildung 11 B). Hierbei zeigte sich das *Vegfr2*-Proteinlevel der *Vegfr2*^{Δeye}-Mäuse (n=3; 0,29 ± 0,12; *p=0,02) ebenfalls signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Kontrollgeschwistertieren (n=4; 1 ± 0,16). Außerdem gelang es durch immunhistochemische Darstellung von *Vegfr2* den Knockdown in der Retina zu visualisieren (Abbildung 11 C). Hierbei zeigten die Kontrolltiere intensive Signale in der GCL sowie ein streifenförmiges Muster durch die Netzhaut, welches auf eine Expression in Müller-Gliazellen der Netzhaut schließen lässt. Diese Signale waren bei den *Vegfr2*^{Δeye}-Mäusen deutlich reduziert. Die Gegenfärbung der DNA wurde mit DAPI (blau) durchgeführt, sodass letztlich im Fusionsbild eine bessere räumliche Orientierung in der Retina ermöglicht wurde. Die Negativkontrolle wurde ohne primären Antikörper durchgeführt und zeigte keinerlei unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers.

Ergebnisse

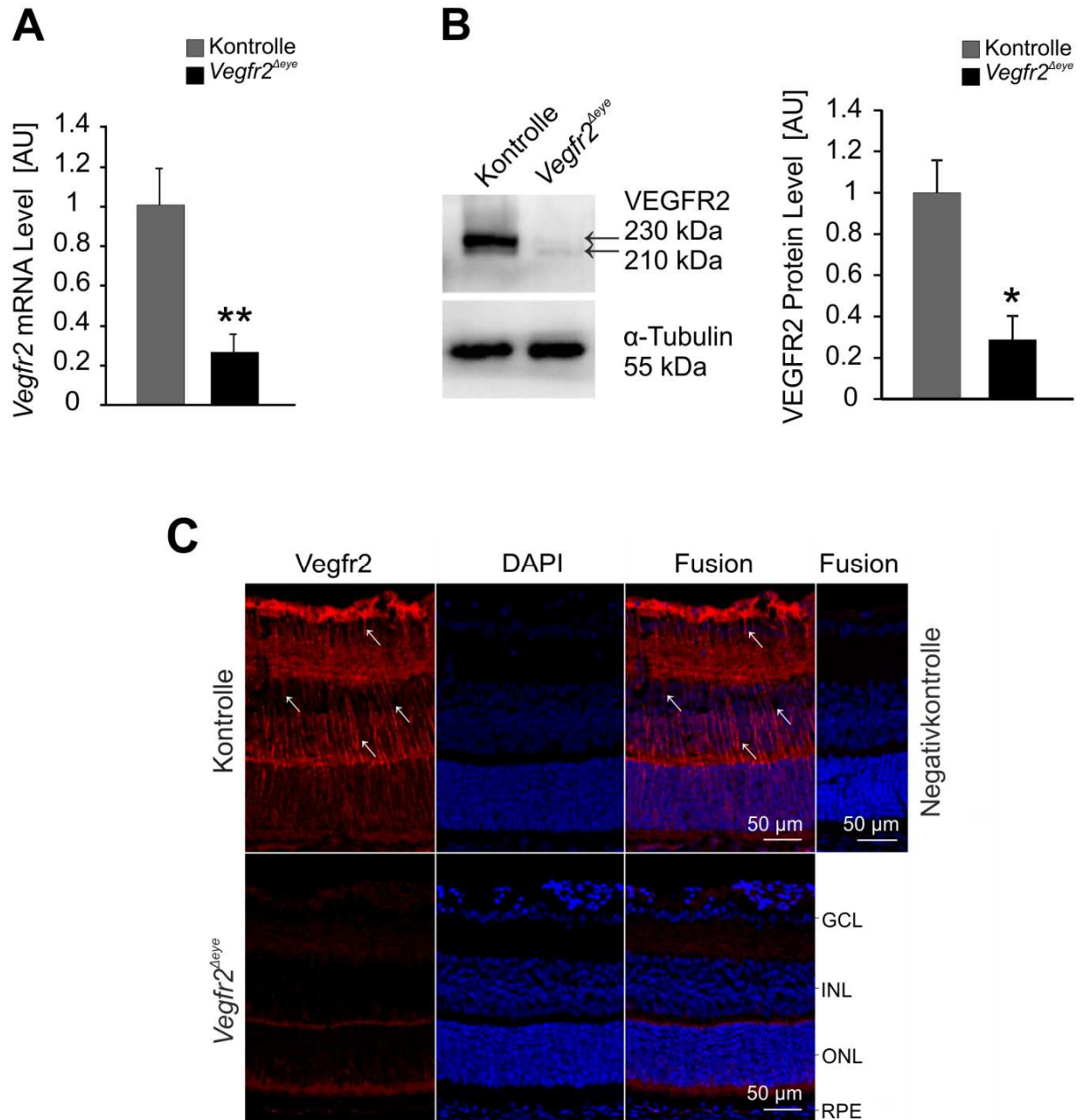


Abbildung 11: Nachweis des konditionellen Knockdowns von Vegfr2 bei Vegfr2^{Δeye}-Mäusen in der Retina an P13

(A) mRNA-Expression von *Vegfr2* in der Retina der *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse (n=6; $0,26 \pm 0,09$; $**p=0,003$) zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern signifikant erniedrigt (n=6; $1 \pm 0,19$). Der Mittelwert der Kontrolltiere wurde auf 1 gesetzt. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM. **(B)** Darstellung eines repräsentativen Western Blots eines *Vegfr2^{Δeye}*- und eines Kontrollgeschwistertiers sowie die densitometrische Analyse der VEGFR2-Proteinsynthese in retinalem Gewebe von *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen und deren Kontrollgeschwistertieren. Die VEGFR2 -Proteinsynthese in der Retina von *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen (n=3; $0,29 \pm 0,12$; $*p=0,02$) war im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern (n=4; $1 \pm 0,16$) deutlich reduziert. Der Mittelwert der Kontrolltiere wurde auf 1 gesetzt. α -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM. **(C)** Repräsentative immunhistochemische Darstellung von Vegfr2 (rot, Pfeile) in einer *Vegfr2^{Δeye}*-Maus und eines Kontrollgeschwistertieres. Das Kontrolltier wies hierbei intensive Signale in der retinalen GCL und ein streifenförmiges Muster durch die Netzhaut auf. Diese

Ergebnisse

Signale waren bei der *Vegfr2*^{Δeye}-Maus deutlich reduziert. Die Gegenfärbung der DNA wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Die Negativkontrolle wurde ohne primären Antikörper durchgeführt und zeigte keinerlei unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers.

GCL = Ganglienzellschicht, INL = innere Körnerschicht, ONL = äußere Körnerschicht, RPE = retinales Pigmentepithel, AU = arbitrary unit / willkürliche Einheit, kDa = Kilodalton

2.3.4 Nachweis des konditionellen *Vegfr2*-Knockdowns im Bereich des vorderen Augenabschnitts

Anschließend wurde der Knockdown der *Vegfr2*-Expression auch im vorderen Augenabschnitt (Proben beinhalteten Iris, Ziliarkörper und Hornhaut) der *Vegfr2*^{Δeye}-Mäuse verifiziert und mittels mRNA- und Proteinanalysen an Gewebeproben des vorderen Augenabschnitts von *Vegfr2*^{Δeye}-Mäusen und deren Kontrollgeschwistertieren an P13 durchgeführt.

Mithilfe der RT-PCR wurde das signifikant reduzierte mRNA-Expressionslevel im vorderen Augenabschnitt der *Vegfr2*^{Δeye}-Mäuse (n=5; $0,35 \pm 0,16$; *p=0,05) im Vergleich zu den Kontrollgeschwistertieren (n=9; $1 \pm 0,21$) nachgewiesen (Abbildung 12 A). Ergänzend konnte der Knockdown von *Vegfr2* durch Western Blot Analysen von Gewebeproben des vorderen Augenabschnitts auf Proteinebene bestätigt werden (Abbildung 12 B). Hierbei zeigte sich das *Vegfr2*-Proteinlevel der *Vegfr2*^{Δeye}-Mäuse (n=3; $0,22 \pm 0,02$; *p=0,01) ebenfalls signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Kontrollgeschwistertieren (n=3; $1 \pm 0,19$).

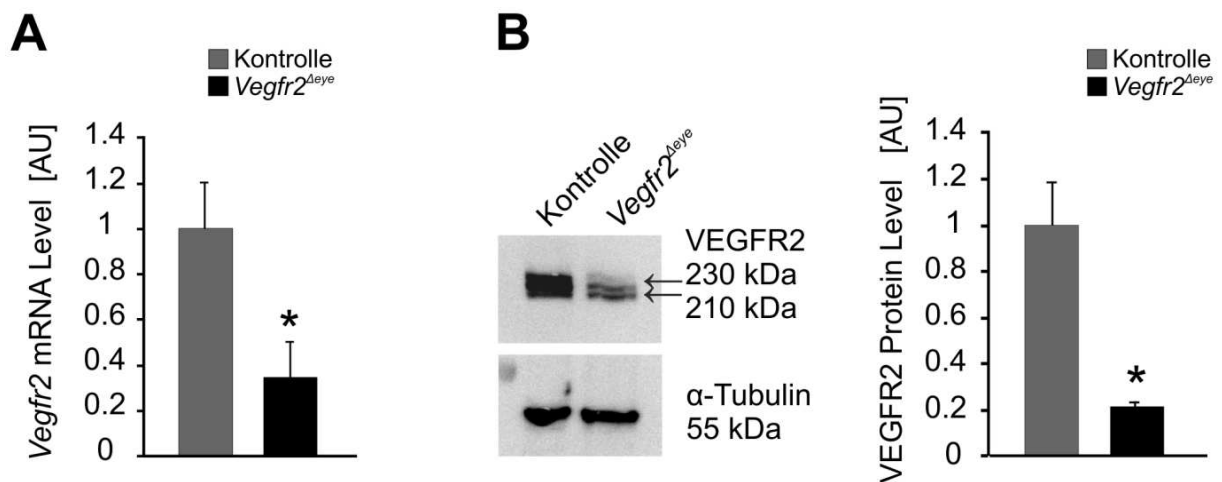


Abbildung 12: Analyse des konditionellen Knockdowns von *Vegfr2* bei *Vegfr2*^{Δeye}-Mäusen im Bereich des vorderen Augenabschnitts an P13

(A) mRNA-Level von *Vegfr2* im vorderen Augenabschnitt der *Vegfr2*^{Δeye}-Mäuse (n=5; $0,35 \pm 0,16$; *p=0,05) zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern signifikant erniedrigt (n=9; $1 \pm 0,21$). Der Mittelwert der Kontrolltiere wurde auf 1 gesetzt. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM. **(B)** Darstellung eines repräsentativen Western Blots

Ergebnisse

einer $Vegfr2^{\Delta eye}$ - und einer Kontrollgeschwistermaus sowie die densitometrische Analyse der VEGFR2-Proteinsynthese im vorderen Augenabschnitt von $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen und deren Kontrollgeschwistertieren. Die VEGFR2-Proteinsynthese in der Retina von $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen ($n=3$; $0,22 \pm 0,02$; $*p=0,01$) war im Vergleich zu Kontrollwurfgeschwistern ($n=3$; $1 \pm 0,19$) deutlich reduziert. Der Mittelwert der Kontrolltiere wurde auf 1 gesetzt. α -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

AU = arbitrary unit / willkürliche Einheit, kDa = Kilodalton

2.4 PHÄNOTYP-ANALYSE VON VEGFR2^{ΔEYE}-MÄUSEN:

VEGFR2^{ΔEYE}-MÄUSE ZEIGEN EINE GEWICHTSREDUKTION SOWIE DÜNNERE RETINALE ZELLSCHICHTEN

2.4.1 Makroskopisch-morphologische Unterschiede: Größen- und Gewichtsreduktion der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse

Zur Phänotyp-Analyse wurden $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse zunächst makroskopisch untersucht und mit ihren wildtypischen Geschwistertieren verglichen (Abbildung 13 A). Hierbei wurde ein erheblicher Größenunterschied an P13 zwischen der Experimental- und der Kontrollgruppe deutlich. Die Kontrolltiere zeigten sich größer als die $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse. Es erfolgte ferner eine Gewichtsbestimmung der beiden Gruppen am gleichen Tag (Abbildung 13 B). Hierbei zeigte sich in der nachfolgenden statistischen Auswertung eine hochsignifikante Reduktion des Körpergewichts der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse ($n=25$; $2,92 \pm 0,12$; $***p=0,000003$) im Vergleich zu ihren Kontrollgeschwistertieren ($n=44$; $4,51 \pm 0,22$).

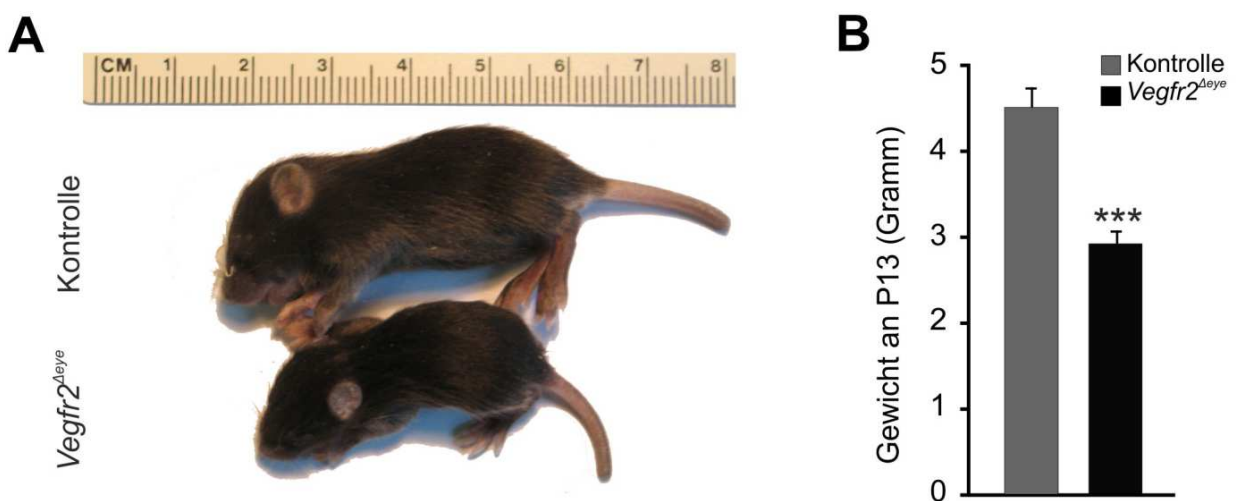


Abbildung 13: Makroskopische Aufnahme und Gewichtsbestimmung von $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen und den Kontrollgeschwistern an P13

Ergebnisse

(A) Repräsentative Bildaufnahme einer Vegfr2^{Δeye}-Maus und eines Kontrollgeschwistertiers. Hierbei zeigte sich ein Größenunterschied zwischen den Geschwistertieren an P13. (B) Gewichtsbestimmung an P13 der Vegfr2^{Δeye}-Mäuse (n=25; 2,92 ± 0,12; ***p=0,000003) im Vergleich zu den Kontrollwurfgeschwistern (n=44; 4,51 ± 0,22) zeigte eine hochsignifikante Reduktion des Körpergewichts. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM.

2.4.2 Mikroskopisch-morphologische Unterschiede: Dünnere retinale Zellschichten der Vegfr2^{Δeye}-Mäuse und erhöhte Apoptoserate in der Retina der Vegfr2^{Δeye}-Mäuse

2.4.2.1 Dünnere retinale Zellschichten der Vegfr2^{Δeye}-Mäuse

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde, der Zielsetzung der Doktorarbeit folgend, der Fokus auf die durch die Deletion des VEGFR2 bedingten Veränderungen im Bereich des Auges gelegt. Hierbei schlossen sich zunächst zur weitergehenden Phänotyp-Analyse der Vegfr2^{Δeye}-Mäuse Untersuchungen auf mikroskopischer Ebene an. Die retinale Morphologie wies in ihrer Gesamtheit keine großen offensichtlichen Veränderungen in den Vegfr2^{Δeye}-Mäusen, verglichen mit den Kontrollgeschwistertieren, auf. Jedoch zeigten sich verschiedene Schichtdicken der Netzhaut dünner bei den Vegfr2^{Δeye}-Mäusen (Abbildung 14 A). Aufgrund dieser wahrgenommenen Unterschiede wurden weitergehende morphometrische Analysen zur Vermessung der INL und der ONL durchgeführt und anschließend graphisch in Form von Spiderdiagrammen dargestellt (Abbildung 14 C). Die Dicke der INL und ONL wurde an Semidünnschnittpräparaten anhand von definierten Messpunkten von der OS bis zum ONH gemessen. Hierbei ergab die statistische Auswertung der INL der Vegfr2^{Δeye}-Mäuse (n=4; *p≤ 0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001) im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern (n=7) eine signifikante Reduktion an den meisten Positionen. Die statistische Auswertung der Schichtdicke der ONL hingegen ergab an nur wenigen Positionen signifikante Veränderungen von Vegfr2^{Δeye}-Mäusen (n=5; *p≤ 0,05) im Vergleich zu den Kontrollgeschwistertieren (n=7). Auch erfolgte eine Quantifizierung der Zellen in der Ganglienzellschicht anhand der Semidünnschnittpräparate von Vegfr2^{Δeye}-Mäusen (n=5; 0,83 ± 0,03; ***p=0,0008), die hierbei signifikant weniger Neurone als ihre Kontrollgeschwister (n=7; 1 ± 0,03) zeigten (Abbildung 14 B).

Ergebnisse

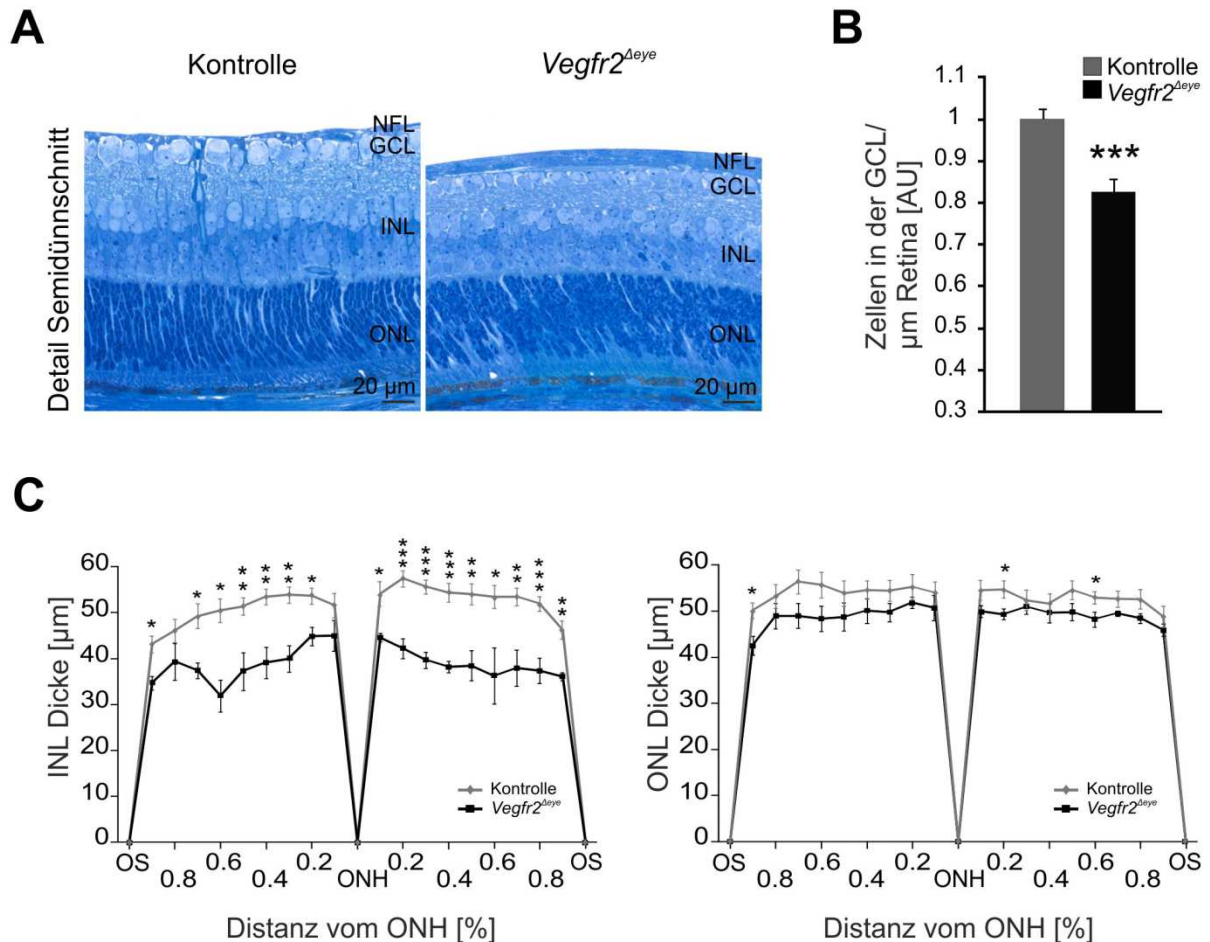


Abbildung 14: Morphologische Unterschiede in der Retina von *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen spezifiziert durch morphometrische Analysen der Dicke von INL und ONL sowie Quantifizierung der Neurone in der Ganglienzellschicht am Semidünnschnittpräparat an P13

(A) Repräsentative mikroskopische Aufnahme von Semidünnschnitten einer *Vegfr2^{Δeye}*-Maus und eines Kontrollgeschwistertiers, wobei sich die Netzhaut der *Vegfr2^{Δeye}*-Maus insgesamt dünner darstellt. **(B)** Quantifizierung der Zellen in der GCL anhand von Semidünnschnittpräparaten von *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen ($n=5$; $0,83 \pm 0,03$; $***p=0,0008$). Hierbei zeigten die *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse signifikant weniger Neurone in der GCL als die Kontrollgeschwistertiere ($n=7$; $1 \pm 0,03$). Der Mittelwert der Kontrolltiere wurde auf 1 gesetzt. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM. **(C)** Morphometrische Analysen der Dicke der INL und ONL, dargestellt in Form von Spiderdiagrammen. Die statistische Auswertung der INL von *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen ($n=4$; $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$) im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern ($n=7$) zeigte eine signifikant dünnere Schichtdicke. Die statistische Auswertung der Schichtdicke der ONL hingegen ergab an nur wenigen Positionen signifikante Veränderungen von *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen ($n=5$; $*p \leq 0,05$) im Vergleich zu den Kontrollgeschwistertieren ($n=7$). Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

NFL = Nervenfaserschicht, GCL = Ganglienzellschicht, INL = innere Körnerschicht, ONL = äußere Körnerschicht, OS = Ora serrata, ONH = Sehnervenkopf, AU = arbitrary unit / willkürliche Einheit

2.4.2.2 Erhöhte Apoptoserate in der Retina der *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse: TUNEL-Analysen

Um zu klären, ob die durch morphometrische Untersuchungen gewonnene Erkenntnis der Verringerung der INL mit einer Zunahme apoptotischer Zellen in den Netzhäuten der *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse einhergeht, wurden apoptotische Zellen mittels TUNEL-Analysen auf Paraffinschnitten markiert und anschließend quantifiziert (Abbildung 15 A/B). Die Gegenfärbung der DNA erfolgte mit DAPI, um letztlich im Fusionsbild eine bessere räumliche Orientierung in der Retina und damit eine Lokalisation der apoptotischen Zellen zu ermöglichen.

In der folgenden statistischen Auswertung zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in den Retinae der *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse ($n=6$; $2,02 \pm 0,13$; $**p=0,008$) im Vergleich zu den Kontrollen ($n=6$; $1 \pm 0,16$) (Abbildung 15 B). Diese befanden sich hauptsächlich in der INL und GCL, waren jedoch gleichmäßig von der zentralen bis zur peripheren Retina verteilt.

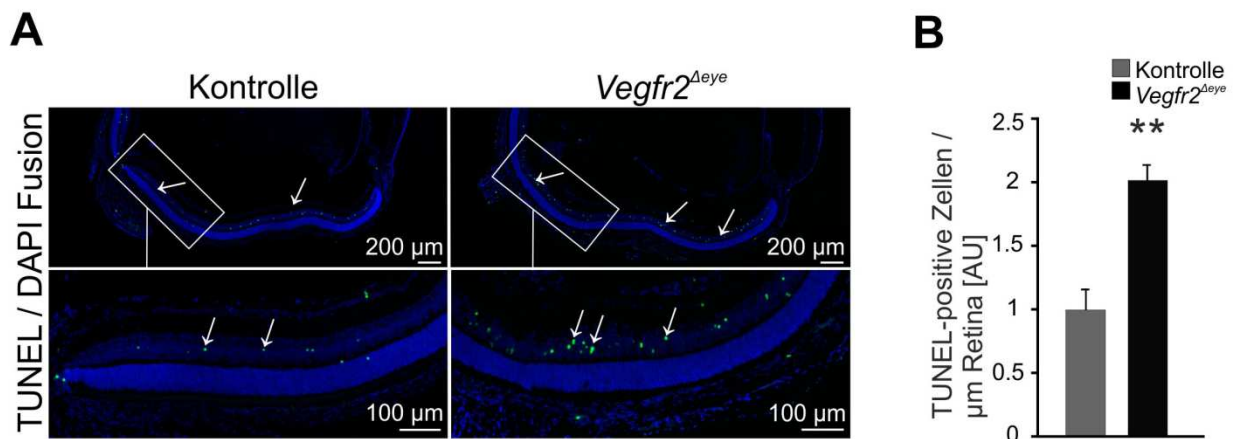


Abbildung 15: Darstellung apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Analysen in der Retina von *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen: Erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in der Retina von *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen an P13

(A) Repräsentative Markierung TUNEL-positiver Zellen (grün, Pfeile) von horizontalen Schnitten des Auges und Detailvergrößerung der Retina einer *Vegfr2^{Δeye}*-Maus und eines Kontrollgeschwistertieres. Die Gegenfärbung der Kern-DNA erfolgte mit DAPI (blau). **(B)** Quantifizierung aller apoptotischen Zellen der Retina und Berechnung als TUNEL-positive Zellen / μm Retina in *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen und deren Kontrollgeschwistertieren. Die anschließende statistische Auswertung zeigte eine signifikant höhere Apoptoserate bei *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen ($n=6$; $2,02 \pm 0,13$; $**p=0,008$) als bei den Kontrollen ($n=6$; $1 \pm 0,16$). Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

AU = arbitrary unit / willkürliche Einheit

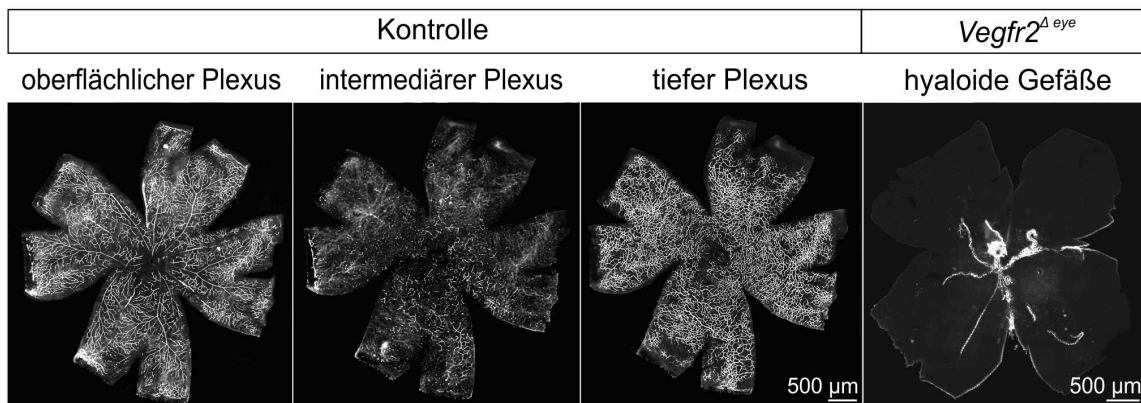
2.5 DETAILIERTE ANALYSE DER RETINA VON VEGFR2^{ΔEYE}-MÄUSEN

2.5.1 Gestörte retinale Angiogenese

2.5.1.1 Analyse von FITC-Dextran perfundierten Retinaflachpräparaten

Um mehr über die Rolle der Vegfr2-vermittelten Signalwirkung für die postnatale Netzhautentwicklung zu erfahren, wurden Mäuse an P13 mit hochmolekularem FITC-Dextran transkardial perfundiert, um so die Netzhautgefäße sichtbar zu machen. Netzhautflachpräparate von mit FITC-Dextran perfundierten Kontrollmäusen zeigten eine altersentsprechende Entwicklung der drei Gefäßplexus, wie hier an einer repräsentativen Kontrollmaus dargestellt (Abbildung 16 A). Im Gegensatz dazu entwickelten die Vegfr2^{Δeye}-Mäuse keinerlei postnatale retinale Vaskularisation, sondern zeigten eine Persistenz der embryonalen hyaloiden Gefäße (Abbildung 16 B). Das bedeutet, dass die Deletion von Vegfr2 zu einer morphologisch avaskulären Netzhaut führte.

A



B

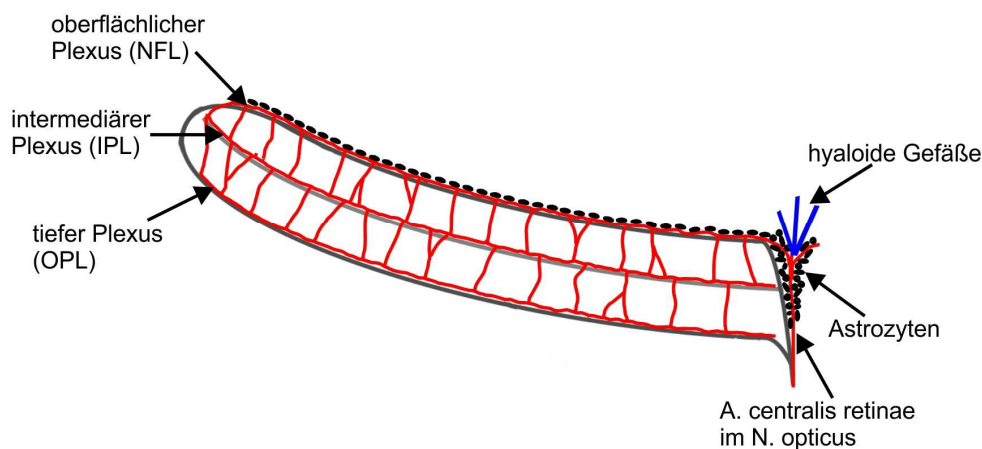


Abbildung 16: Vegfr2^{Δeye}-Mäuse zeigten eine reduzierte retinale Vaskularisation und eine Persistenz der hyaloiden Gefäße in FITC-Dextran perfundierten Retinaflachpräparaten an P13

Ergebnisse

(A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von FITC-Dextran perfundierten Netzhautflachpräparaten einer $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Maus und eines Kontrollgeschwistertieres an P13. Das Netzhautflachpräparat des Kontrolltieres zeigte eine altersgemäße Ausprägung der drei Gefäßplexus, wohingegen die $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Maus keinerlei postnatal entwickelte retinale Vaskularisation aufwies, sondern lediglich eine vollständige Persistenz der hyaloiden Gefäße zeigte. **(B)** Schematische Darstellung des retinalen Gefäßsystems. Hierbei ist zu erkennen, dass sich das Netzhautgefäßsystem in drei verschiedene Gefäßgeflechte gliedert: der tiefe, der intermediäre und der oberflächliche Plexus. Neugeborene Mäuse haben ein spezielles Gefäßsystem, welches als Hyaloidea bezeichnet wird und innerhalb der ersten Wochen degeneriert, während parallel die bleibende Gefäßarchitektur ausgebildet wird.

2.5.1.2 Nachweis der retinalen Gefäßveränderungen mittels FITC-Dextran perfundierten Gefrierschnitten

Zusätzlich wurden mikroskopische Aufnahmen von Gefrierschnitten von $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen und deren Kontrollgeschwistertieren angefertigt. Auch hierbei erfolgte am Präparationstag P13 eine transkardiale Perfusion mit hochmolekularem FITC-Dextran zur Visualisierung der retinalen Gefäßentwicklung an P13. Die Gefrierschnitte der Kontrolltiere zeigten FITC-Dextran Signale, welche altersentsprechend tief in die verschiedenen Schichten der Retina vordrangen und die drei verschiedenen Gefäßgeflechte, den tiefen, den intermediären und den oberflächlichen Plexus repräsentieren (Abbildung 17, Pfeile). Der intermediäre Plexus war zum Präparationszeitpunkt P13 physiologisch (Kapitel 1.3) noch nicht vollständig ausgebildet, sodass hier auch bei den Kontrolltieren noch kein vollständig ausgebildetes Gefäßgeflecht vorhanden war. Außerdem konnten auch bei den Kontrollen zu diesem Zeitpunkt noch Rudimente von hyaloiden Gefäßen nachgewiesen werden. Die $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse hingegen wiesen keinerlei postnatal entwickelte intraretinale Vaskularisation auf, sondern zeigten lediglich eine ausgeprägtere Persistenz der hyaloiden Gefäße (Abbildung 17, Pfeilköpfe).

Ergebnisse

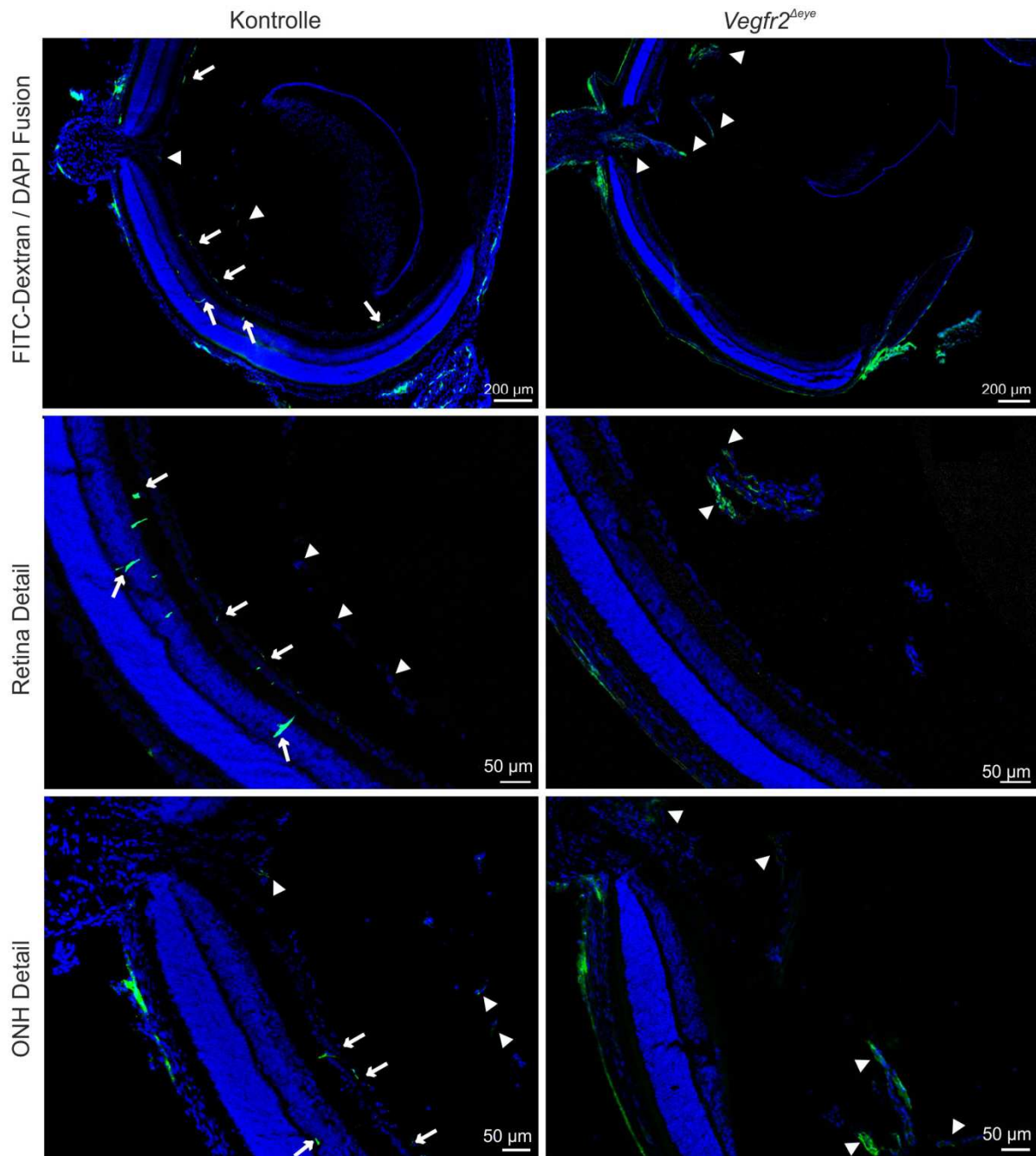


Abbildung 17: Vegfr2^{Δeye}-Mäuse zeigten eine reduzierte retinale Vaskularisation in FITC-Dextran perfundierten Gefrierschnitten an P13

Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von FITC-Dextran (grün) perfundierten Gefrierschnitten einer Vegfr2^{Δeye}-Maus und eines Kontrollgeschwistertieres an P13. Die Gefrierschnitte des Kontrolltieres zeigten FITC-Dextran Signale (Pfeile), welche in den verschiedenen Schichten der Retina nachweisbar sind. Außerdem zeigten sich noch Rudimente von hyaloiden Gefäßen (Pfeilköpfe). Die Vegfr2^{Δeye}-Maus hingegen wies keinerlei intraretinale Vaskularisation in Form der retinalen Gefäßplexus auf, sondern lediglich eine ausgeprägtere Persistenz der hyaloiden Gefäße (Pfeilköpfe). Die Gegenfärbung der DNA erfolgte mit DAPI (blau).

ONH = Sehnervenkopf

2.5.1.3 Molekulare Veränderungen in der Retina in Zusammenhang mit der gestörten Angiogenese

Um die morphologisch detektierte Avaskularität der Retina bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen näher zu untersuchen wurden weitergehende Analysen auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt. Hierbei zeigten sich einige molekulare Veränderungen bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen im Vergleich zu den Kontrollgeschwistertieren. So wurde einerseits die Hypoxia Inducible Factor 1, subunit alpha (HIF-1 α) Proteinexpression in retinalem Gewebe mittels Western Blot Analysen untersucht (Abbildung 18 A). Hierbei zeigte sich die HIF-1 α -Proteinexpression von $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen ($n=6$; $1,99 \pm 0,36$; $*p=0,02$) im Vergleich zu den Kontrollwurfgeschwistern ($n=10$; $1 \pm 0,18$) signifikant erhöht, was auf eine Stabilisierung des Faktors bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen hinweist. Ferner wurde das mRNA-Expressionslevel von *Angiopoetin-2* (*Ang-2*), ein Faktor welcher für die postnatale Sprossung und Neubildung von Gefäßen wesentlich ist (9) und als ein hypoxie-reguliertes Genprodukt gilt (35,37,41), in der Retina mittels RT-PCR untersucht. Dabei zeigte sich bei den Proben der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse ($n=6$; $1,64 \pm 0,10$; $*p=0,03$) ein signifikant höheres Level als bei den Kontrolltieren ($n=5$; $1 \pm 0,20$) (Abbildung 18 B).

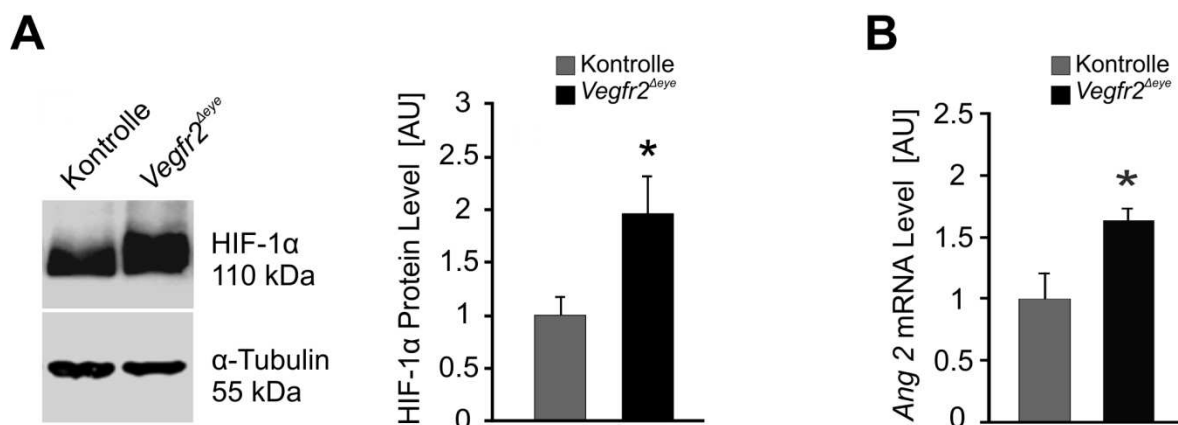


Abbildung 18: $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse zeigten eine erhöhte retinale Expression diverser Angiogenese-assoziiierter Faktoren: Western Blot Analysen von HIF-1 α und RT-PCR von Ang-2

(A) Darstellung eines repräsentativen Western Blots für eine $Vegfr2^{\Delta eye}$ - und eine Kontrollgeschwistermaus sowie die densitometrische Analyse der HIF-1 α -Proteinmenge in retinalem Gewebe von $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen und deren Kontrollgeschwistertieren. Das HIF-1 α -Proteinlevel in der Retina von $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen ($n=6$; $1,99 \pm 0,36$; $*p=0,02$) war im Vergleich zu den Kontrollwurfgeschwistern ($n=10$; $1 \pm 0,18$) durch einen verminderten Abbau aufgrund einer Stabilisierung des Faktors signifikant erhöht. Der Mittelwert der Kontrolltiere wurde auf 1 gesetzt. α -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM. (B) mRNA-Level von *Ang-2* in der Retina der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse ($n=6$; $1,64 \pm 0,10$; $*p=0,03$) zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern signifikant erhöht ($n=5$; $1 \pm 0,20$). Der Mittelwert der Kontrolltiere wurde auf 1 gesetzt. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

HIF-1 α = Hypoxia Inducible Factor 1, subunit alpha; Ang-2 = Angiopoetin-2; AU = arbitrary unit / willkürliche Einheit, kDa = Kilodalton

Ergebnisse

Des Weiteren wurden bei den Vegfr2-defizienten Tieren die Veränderungen des Liganden VEGFa auf molekularer Ebene differenzierter untersucht. Hierbei wurden Western Blot Analysen, RT-PCR-Untersuchungen und immunhistochemische Analysen durchgeführt. Das Proteinlevel von VEGFa in der Retina erwies sich bei den Vegfr2^{Δeye}-Mäusen (n=7; 4,45 ± 1,17; *p=0,01) im Western Blot im Vergleich zu den Kontrollwurfgeschwistern (n=7; 1 ± 0,31) als signifikant erhöht (Abbildung 19 A). Das mRNA-Expressionslevel von zwei VEGFa-Isoformen (*VEGFa120* und *VEGFa164*) wurde mittels RT-PCR analysiert (Abbildung 19 B). In dieser Analyse konnte eine signifikante Erhöhung des mRNA-Expressionslevels von *VEGFa164* der Vegfr2^{Δeye}-Mäuse (n=6; 2,05 ± 0,14; *p=0,02) im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern (n=5; 1 ± 0,17) detektiert werden, wohingegen sich das mRNA-Expressionslevel von *VEGFa120* der Vegfr2^{Δeye}-Mäuse (n=6; 1,01 ± 0,07; p=0,96) im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern (n=5; 1 ± 0,32) als nicht signifikant verändert darstellte. Im Rahmen von immunhistochemischen Färbungen der Netzhaut konnte ebenfalls VEGFa visualisiert werden (Abbildung 19 C). Hierbei zeigten die Kontrolltiere eine diskrete Markierung für VEGFa in der GCL, der INL und dem RPE. Diese immunhistochemische Markierung war in den Netzhäuten der Vegfr2^{Δeye}-Tiere, insbesondere in der GCL und der INL, deutlich verstärkt, was ebenfalls für eine Zunahme an dem Liganden in den Vegfr2-defizienten Tieren spricht und somit die Aussagen der anderen beiden durchgeführten Verfahren stützt.

Ergebnisse

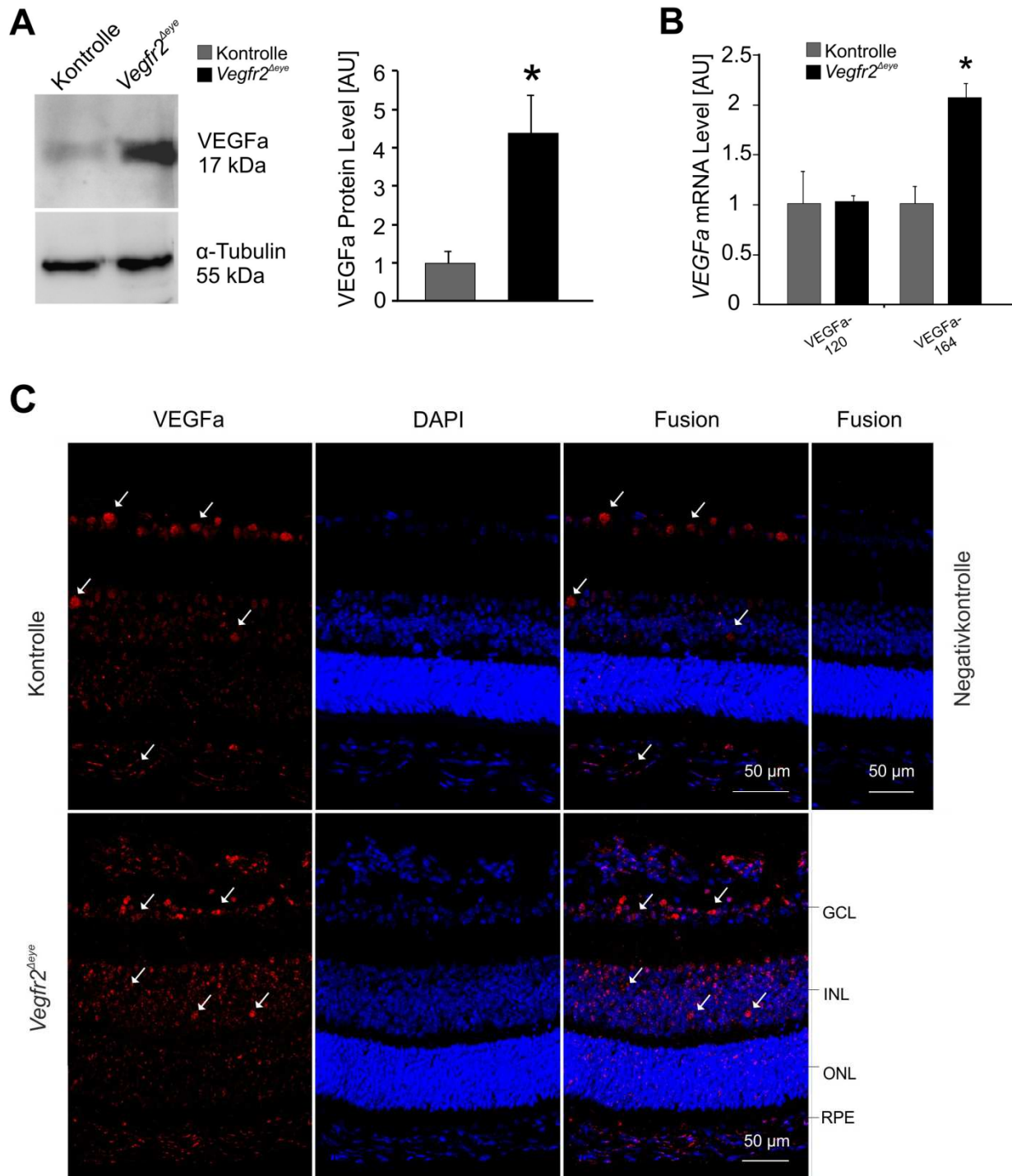


Abbildung 19: Vegfr2 Δ eye-Mäuse zeigten eine erhöhte retinale Expression diverser Angiogenese-assoziiierter Faktoren: RT-PCR, Western Blot Analysen und immunhistochemische Färbung von VEGFa

(A) Darstellung eines repräsentativen Western Blots für ein *Vegfr2 Δ eye*- und ein Kontrollgeschwistertier mit densitometrischer Analyse der VEGFa-Proteinsynthese in retinalem Gewebe von *Vegfr2 Δ eye*-Mäusen und deren Kontrollgeschwistertieren. Die VEGFa-Proteinsynthese in der Retina von *Vegfr2 Δ eye*-Mäusen ($n=7$; $4,45 \pm 1,17$; $*p=0,01$) zeigte sich im Vergleich zu Kontrollwurfgeschwistern ($n=7$; $1 \pm 0,31$) signifikant erhöht. Der Mittelwert der Kontrolltiere wurde auf 1 gesetzt. α -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM. (B) mRNA-Level von *VEGFa120* und *VEGFa164* in der Retina der *Vegfr2 Δ eye*-Mäuse und deren Kontrollgeschwistern. Das mRNA-Level von *VEGFa120* in der Retina der *Vegfr2 Δ eye*-Mäuse ($n=6$; $1,01 \pm 0,07$;

Ergebnisse

p=0,96) zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern nicht signifikant verändert (n=5; $1 \pm 0,32$). Das mRNA-Level von *VEGFA164* in der Retina der *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse (n=6; $2,05 \pm 0,14$; *p=0,02) zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern hingegen signifikant erhöht (n=5; $1 \pm 0,17$). Der Mittelwert der Kontrolltiere wurde auf 1 gesetzt. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM. **(C)** Repräsentative immunhistochemische Darstellung von VEGFa (rot, Pfeile) in der Retina einer *Vegfr2^{Δeye}*-Maus und eines Kontrollgeschwistertieres. Das Kontrolltier zeigte eine diskrete Markierung für VEGFa in der GCL, der INL und dem RPE, welche sich in der *Vegfr2^{Δeye}*-Netzhaut, insbesondere in der GCL und INL, verstärkt zeigte. Die Gegenfärbung der Kern-DNA wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Die durchgeführte Negativkontrolle zeigte keinerlei unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers.

GCL = Ganglienzellschicht, INL = innere Körnerschicht, ONL = äußere Körnerschicht, RPE = retinales Pigmentepithel, AU = arbitrary unit / willkürliche Einheit, kDa = Kilodalton

Aufgrund der veränderten Vorgänge in der Retina, einhergehend mit einer avaskulären Retina sowie einer Degeneration der retinalen Zellen in den *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen, wurden ebenfalls Färbungen des ionisierten Kalzium-bindenden Adapterprotein-1 (IBA-1) zur immunhistochemischen Darstellung der myeloiden Zellen (retinale Mikroglia bzw. Makrophagen) durchgeführt. Hierbei zeigten die Kontrolltiere eine diskrete Markierung für IBA-1 positive Mikrogliazellen in der IPL und OPL sowie ein Signal myeloider Zellen in der Choroidea, wohingegen sich in den Netzhäuten der *Vegfr2^{Δeye}*-Tiere zusätzlich eine Lokalisation von amöboiden Mikrogliazellen in der INL zeigte, was für eine Aktivierung der retinalen Mikroglia am Schädigungsort, also dem Bereich der größten Hypoxie, spricht (Abbildung 20). Außerdem konnten bei den *Vegfr2^{Δeye}*-Tieren mehr IBA-1 positive, myeloide Zellen im Bereich der NFL beobachtet werden.

Ergebnisse

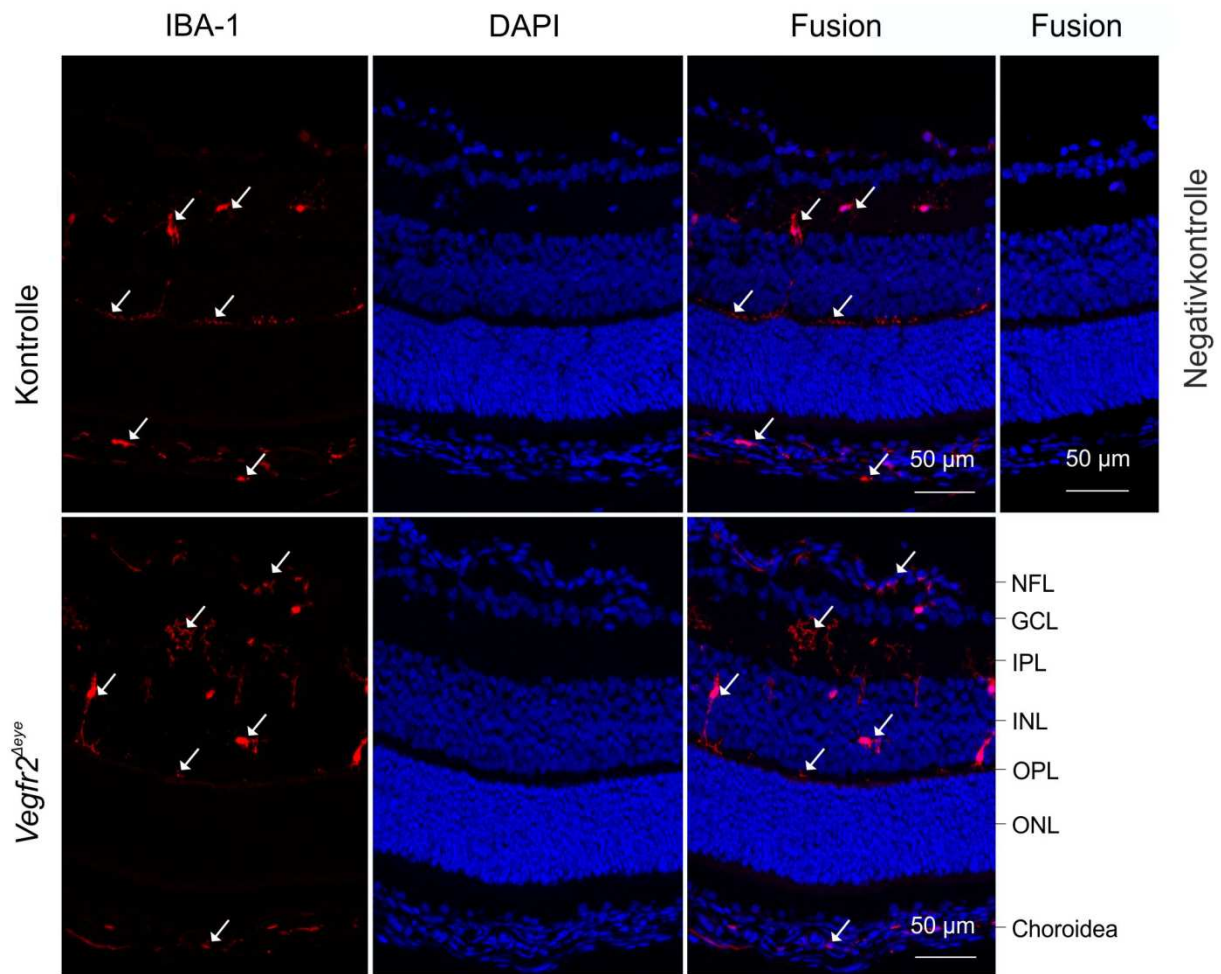


Abbildung 20: Vegfr2^{Δeye}-Mäuse zeigten eine Aktivierung der retinalen Mikroglia: immunhistochemische Färbung von IBA-1

Repräsentative immunhistochemische Darstellung von IBA-1 (rot, Pfeile) in einer Vegfr2^{Δeye}-Maus und einem Kontrollgeschwistertier. Das Kontrolltier zeigte eine diskrete Färbung für IBA-1 in der IPL und OPL sowie der Choroidea, wohingegen sich in der Vegfr2^{Δeye}-Netzhaut, insbesondere in der INL, eine Signalverstärkung zeigte. Außerdem konnten beim Vegfr2^{Δeye}-Tier mehr IBA-1 positive, myeloide Zellen im Bereich der NFL beobachtet werden. Die Gegenfärbung der DNA wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Die durchgeführte Negativkontrolle zeigte keinerlei unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers.

NFL = Nervenfaserschicht, GCL= Ganglienzellschicht, IPL= innere plexiforme Schicht, INL= innere Körnerschicht, OPL= äußere plexiforme Schicht, ONL= äußere Körnerschicht, IBA-1 = ionisiertes Kalzium-bindendes Adapterprotein-1

2.5.2 Akkumulation von Astrozyten in der Nervenfaserschicht (NFL) der Retina

2.5.2.1 Identifikation und Quantifizierung der Zellakkumulation in der Nervenfaserschicht von *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen

Wie sich bei der Phänotypanalyse der *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse mittels Semidünnschnittpräparaten herausstellte, zeigte sich die NFL der Netzhaut der *Vegfr2*-defizienten Tiere insbesondere in der zentralen Retina deutlich verdickt (Abbildung 21 A). Um die Entität dieser verdickten NFL in *Vegfr2^{Δeye}*-Netzhäuten weiter zu analysieren wurde eine Färbung des Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), einem Marker für retinale Astrozyten, welche wiederum physiologisch in der NFL lokalisiert sind (70,71), durchgeführt. Hierbei zeigte das Kontrolltier eine deutliche Markierung für GFAP in der NFL, wobei die GFAP-positiven Zellen ein physiologisches, einschichtiges Verteilungsmuster ohne jegliche Akkumulation aufwiesen. Die immunhistochemische GFAP-Färbung der *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse hingegen zeigte eine deutliche Anhäufung/Mehrschichtigkeit von GFAP-positiven Astrozyten in der NFL im Vergleich zu den Kontrollgeschwistertieren (Abbildung 21 C). Diese Anhäufung war in der zentralen Netzhaut stärker ausgeprägt als in der peripheren Netzhaut (Daten nicht gezeigt). Um diese beobachteten morphologischen Merkmale zu quantifizieren, wurde sowohl eine mRNA-Analyse mittels RT-PCR als auch eine morphometrische Untersuchung durchgeführt. In der RT-PCR stellte sich das mRNA-Expressionslevel von *GFAP* in der Retina der *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse ($n=5$; $2,16 \pm 0,20$; $*p=0,03$) im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern ($n=6$; $1 \pm 0,20$) als signifikant erhöht dar (Abbildung 21 B). Für morphometrische Analysen wurden Paraffinschnitte mit einem anti-GFAP-Antikörper angefärbt und anschließend quantifiziert. In der folgenden statistischen Auswertung zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl von GFAP-positiven Zellen / μm Retina in den Retinae der *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen ($n=5$; $2,48 \pm 0,09$; $**p=0,00005$) im Vergleich zu den Kontrollen ($n=6$; $1 \pm 0,06$) (Abbildung 21 D).

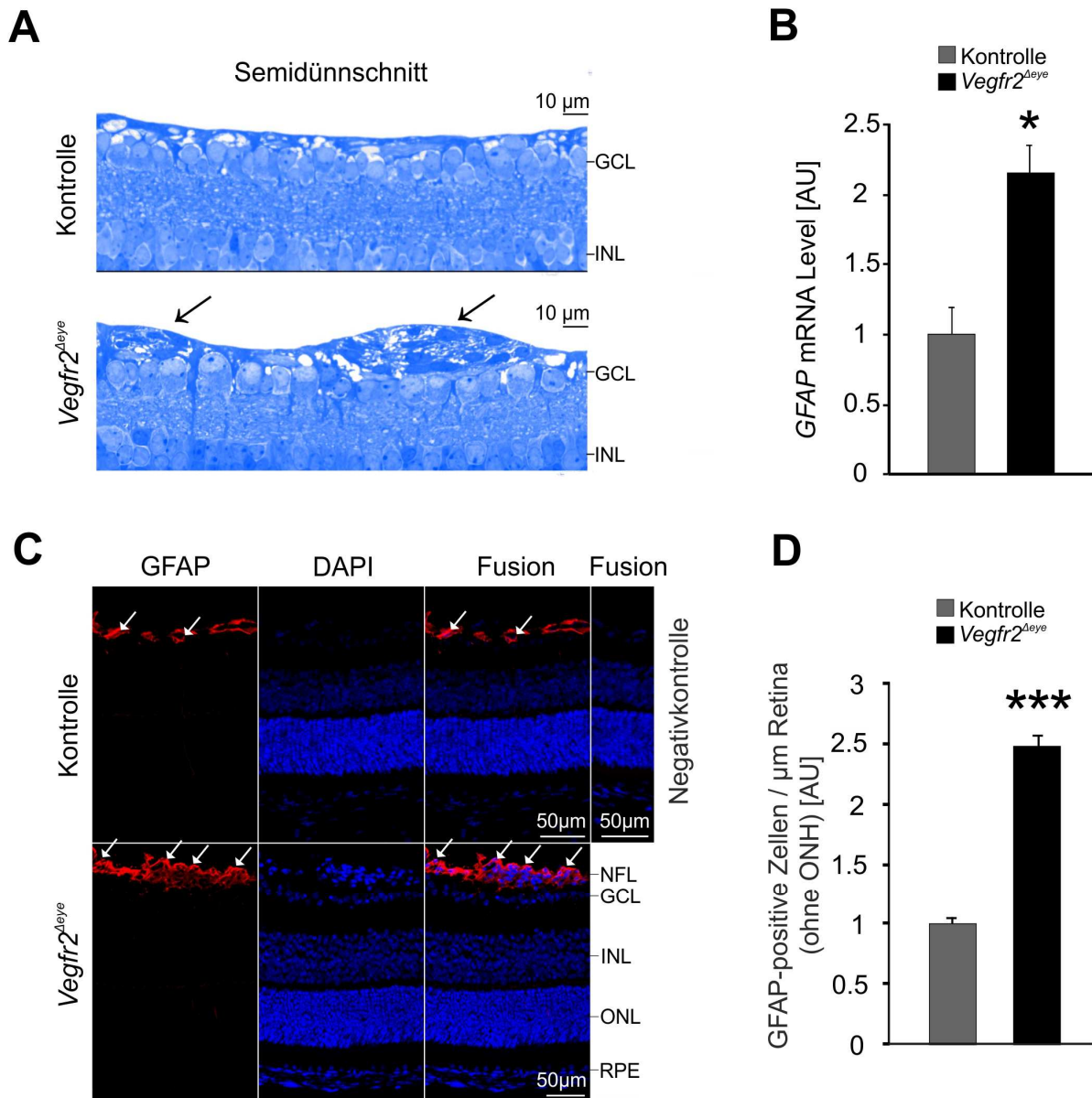


Abbildung 21: Vegfr2^{Δeye}-Mäuse zeigten eine Akkumulation von GFAP-positiven Zellen in der NFL an P13

(A) Repräsentative mikroskopische Aufnahme von Semidünnschnitten einer Vegfr2^{Δeye}-Maus und eines Kontrollgeschwistertiers. Hierbei lässt sich in den Detailaufnahmen eine Zellakkumulation (Pfeile) in der NFL oberhalb der GCL bei der Vegfr2^{Δeye}-Maus im Vergleich zu dem dargestellten Kontrollgeschwistertier erkennen. (B) Das mRNA-Level von GFAP in der Retina der Vegfr2^{Δeye}-Mäuse (n=5; 2,16 ± 0,20; *p=0,03) zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern signifikant erhöht (n=6; 1 ± 0,20). Der Mittelwert der Kontrolltiere wurde auf 1 gesetzt. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM. (C) Repräsentative immunhistochemische Darstellung von GFAP (rot, Pfeile) in einer Vegfr2^{Δeye}-Maus und einem Kontrollgeschwistertier. Das Kontrolltier zeigte eine gut erkennbare Markierung für GFAP in der NFL, welches in retinalen Astrozyten exprimiert wird. Die Netzhaut der Vegfr2^{Δeye}-Maus hingegen zeigte eine Signalintensivierung und mengenmäßige Zunahme von GFAP in der NFL. Die Gegenfärbung der DNA wurde mit DAPI (blau) vorgenommen. Die durchgeführte Negativkontrolle zeigte keinerlei unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers. (D) Quantifizierung der GFAP-positiven Zellen in der NFL und Berechnung dieser als GFAP-positive Zellen / μm Retina in Vegfr2^{Δeye}-Mäusen und deren Kontrollgeschwistertieren. Die anschließende statistische Auswertung zeigte eine signifikante Erhöhung von GFAP-positiven Zel-

Ergebnisse

len bei $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen ($n=5$; $2,48 \pm 0,09$; $**p=0,00005$) im Vergleich zu den Kontrollen ($n=6$; $1 \pm 0,06$). Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

NFL = Nervenfaserschicht, GCL = Ganglienzellschicht, INL = innere Körnerschicht, ONL = äußere Körnerschicht, RPE = retinales Pigmentepithel, AU = arbitrary unit / willkürliche Einheit, GFAP = Glial Fibrillary Acidic Protein

2.5.2.2 Veränderungen des retinalen astrozytären Netzwerks

Um die Akkumulation von GFAP-positiven Zellen in der NFL weiter zu untersuchen erfolgten transkardiale Perfusionen mit hochmolekularem FITC-Dextran zur Visualisierung der retinalen Gefäßstruktur und eine immunhistochemische Markierung der retinalen Astrozyten auf Netzhautflachpräparaten mit einem anti-GFAP-Antikörper. Bei den Kontrolltieren zeigte sich ein intensives Färbemuster für GFAP in der gesamten Netzhaut, welches die charakteristische sternförmige Morphologie der Astrozyten darstellt, die teilweise mit den FITC-Dextran perfundierten Netzhautgefäßen assoziiert waren (

Abbildung 22, Pfeile). Im Gegensatz hierzu wiesen die Netzhäute der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse nur einige FITC-perfundierte hyaloide Gefäße an der Oberfläche der Retina auf und das GFAP-Färbemuster zeigte eine dicke homogene Masse von klobigen GFAP-positiven Zellen im zentralen Teil der Retina, welche ihr Aussehen zur peripheren Retina hin veränderten und hierbei eine Honigwaabenstruktur (Abbildung 22, Pfeilköpfe) aufwiesen.

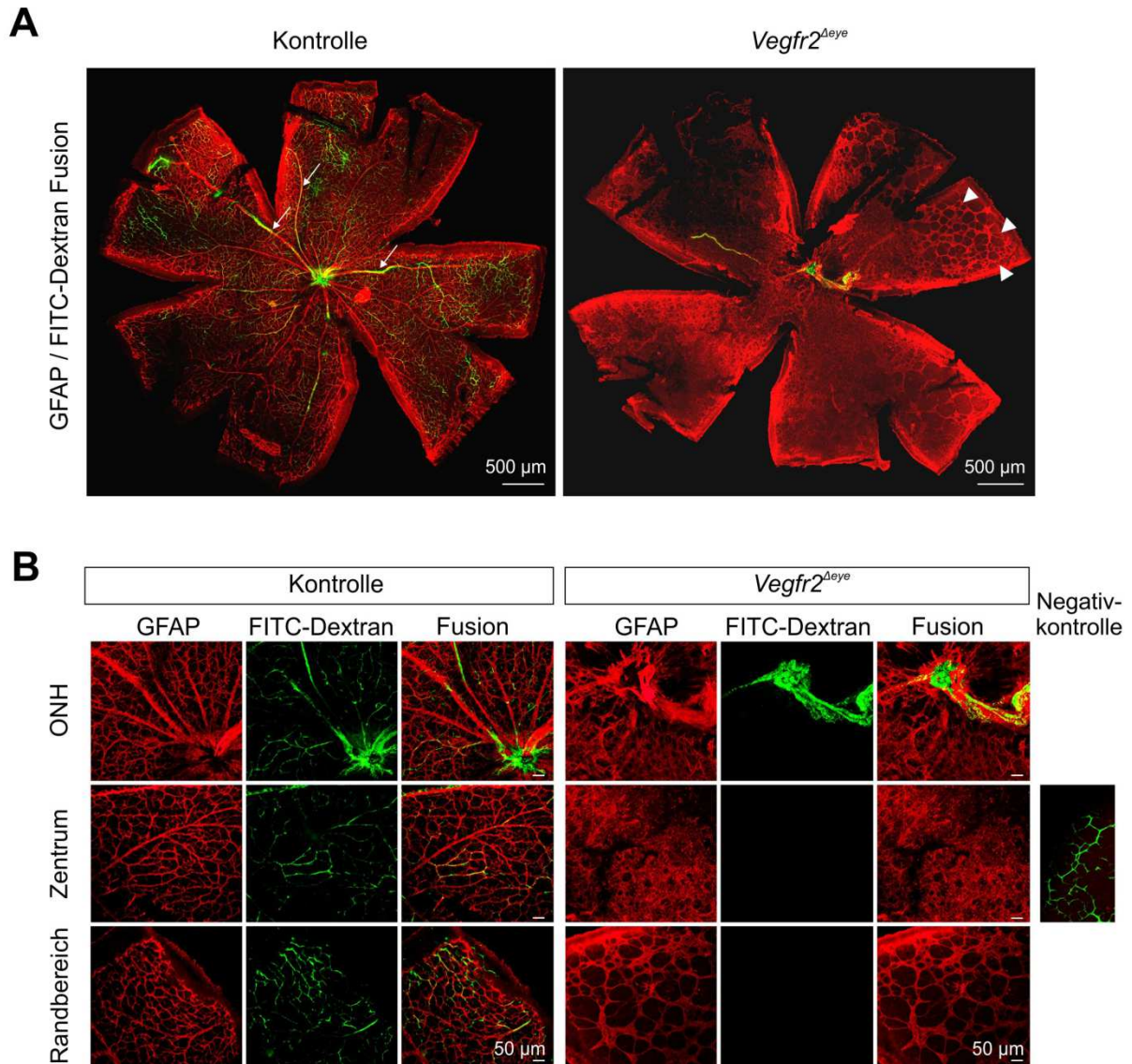


Abbildung 22: Retinales astrozytäres Netzwerk mit Gefäßstatus an P13 visualisiert anhand von FITC-Dextran perfundierten, anti-GFAP markierten Netzhautflächpräparaten

(A) Repräsentative mikroskopische Übersichtsaufnahmen von Netzhautflächpräparaten einer *Vegfr2^{Δeye}*-Maus und eines Kontrollgeschwistertieres. Es erfolgte eine transkardiale Perfusion mit hochmolekularem FITC-Dextran zur Visualisierung der retinalen Gefäßentwicklung an P13 sowie eine Markierung der retinalen Astrozyten mit einem anti-GFAP-Antikörper an Netzhautflächpräparaten. Beim Netzhautflächpräparat des Kontrolltiers zeigte sich das charakteristische, feine sternförmige Netzwerk aus GFAP-positiven Astrozyten in der gesamten Netzhaut, welche mit den FITC-perfundierten Netzhautgefäßen assoziiert waren (Pfeile). Im Gegensatz hierzu war die Gefäßstruktur der *Vegfr2^{Δeye}*-Maus auf die hyaloiden Gefäße begrenzt und das GFAP-Färbemuster zeigte sich im zentralen Teil der Retina dicht und homogen und im peripheren Teil der Netzhaut vergrößert im Sinne einer Honigwaabenstruktur (Pfeilköpfe). **(B)** Detailvergrößerung dreier relevanter Positionen des mit einem anti-GFAP-Antikörper gefärbten und FITC-Dextran perfundierten Netzhautflächpräparats einer *Vegfr2^{Δeye}*-Maus und eines Kontrollgeschwistertieres. Hierbei zeigte sich beim Kontrolltier durchgängig das feine Netzwerk der Astrozyten, die sowohl zentral, als auch peripher teilweise mit den FITC-Dextran perfundierten Netzhautgefäßen assoziiert waren, wohingegen die Netzhaut der *Vegfr2^{Δeye}*-Maus nur einige wenige FITC-perfundierte hyaloide Gefäße an der Oberfläche der Retina aufwies und das GFAP-Färbemuster sich im zentralen Teil der Retina als eine dicke

Ergebnisse

homogene Masse von klobigen GFAP-positiven Zellen darstellte, welche ihr Aussehen zur peripheren Retina hin veränderten und hierbei eine Honigwaabenstruktur aufwiesen. Die durchgeführte Negativkontrolle zeigte keinerlei unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers.

ONH = Sehnervenkopf, GFAP = Glial Fibrillary Acidic Protein

2.6 GEFÄßPROLIFERATION IM VORDEREN AUGENABSCHNITT DER VEGFR2^{ΔEYE}-MÄUSE

2.6.1 Morphologische Unterschiede der Iris im Semidünnschnitt

Zur weitergehenden Phänotyp-Analyse der *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse wurden die Semidünnschnittpräparate auch im vorderen Augenabschnitt analysiert. Hierbei wiesen die *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse eine dickere Iris auf als ihre Kontrollgeschwistertiere (Abbildung 23).

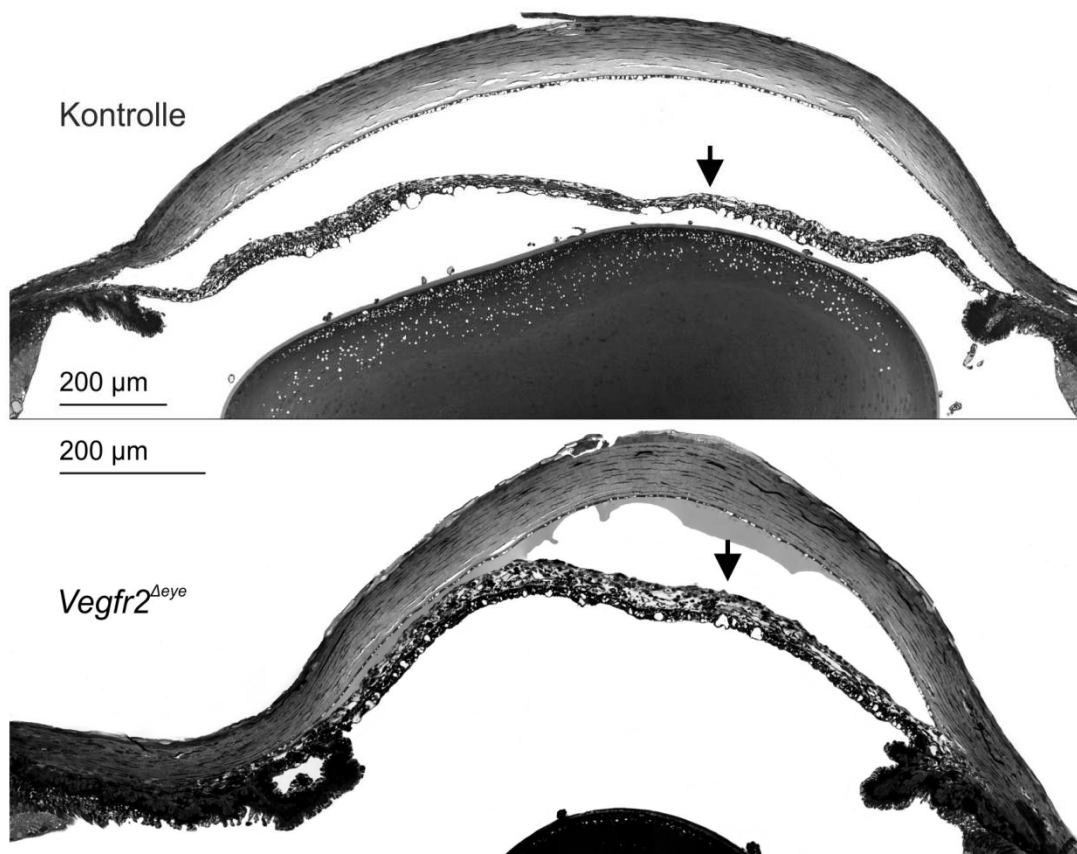


Abbildung 23: Verdickung der Iris der *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse an P13

Ergebnisse

Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von Semidünnschnitten einer $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Maus und eines Kontrollgeschwistertieres. Hierbei ließ sich bereits in der Übersichtsaufnahme ein Unterschied an der Dicke der Iris (Pfeile) erkennen, wobei die Iris der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Maus im Vergleich zu dem Kontrollgeschwistertier dicker imponierte.

2.6.2 Detektion und Differenzierung molekularer Veränderungen mittels Immunhistochemie

Um die beobachteten morphologischen Unterschiede der Iris differenzierter zu analysieren, wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen an Gefrierschnitten durchgeführt. Da eine mögliche Erklärung der Verdickung der Iris bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen eine Gefäßproliferation der Irisgefäße darstellte, wurden Färbungen mit dem Endothelzellmarker Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (CD31) (72) durchgeführt. Hierbei zeigten die Kontrolltiere eine gut erkennbare Markierung für CD31 in der Iris, im Ziliarkörper sowie im Schlemmkanal (Abbildung 24 A). Die $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse hingegen zeigten sowohl eine deutliche Signalintensivierung als auch eine mengenmäßige Zunahme des Markers in der gesamten Iris, was auf eine Vermehrung der Endothelzellen schließen lässt. Die Gegenfärbung der DNA wurde mit DAPI durchgeführt, sodass letztlich im Fusionsbild eine bessere räumliche Orientierung im vorderen Augenabschnitt ermöglicht wurde. Ferner wurden immunhistochemische Färbungen mit einem anti-Collagen-IV-Antikörper, welcher unter anderem die Basallamina von Gefäßen färbt (73), durchgeführt (Abbildung 24 B). Hierbei wurden Präparate von Tieren verwendet, welche mit hochmolekularem FITC-Dextran perfundiert wurden. Die Kontrolltiere zeigten hierbei eine gut erkennbare Markierung für Collagen IV in der Iris und der Cornea. Die Präparate der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse zeigten eine deutliche Zunahme der Anzahl sowie eine Intensivierung des Signals in der gesamten Iris, was auf eine Zunahme von Epithel- und/oder Endothelzellen schließen lässt. Durch das eingesetzte hochmolekulare FITC-Dextran, welches durch intakte Gefäßwände am Austritt aus dem Gefäßsystem gehindert wird, wurde eine Zuordnung zu physiologischen Irisgefäßen mit deren Endothelzellen ermöglicht. Hierbei zeigte sich trotz Zunahme der Collagen IV Markierung in der Iris bei $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen eine Verringerung von intravasalem FITC-Dextran. Außerdem wurden immunhistochemische Färbungen mit einem anti-IBA-1-Antikörper, welcher myeloide Zellen anfärbt, durchgeführt. Hierbei zeigten die Kontrolltiere eine sehr diskrete Markierung in der Iris und im Ziliarkörper (Abbildung 24 C). Die Präparate der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse hingegen wiesen eine deutliche mengenmäßige Zunahme des Signals in der gesamten Iris auf, was auf eine Zunahme der Anzahl der myeloiden Zellen in der Iris der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse schließen lässt.

Ergebnisse

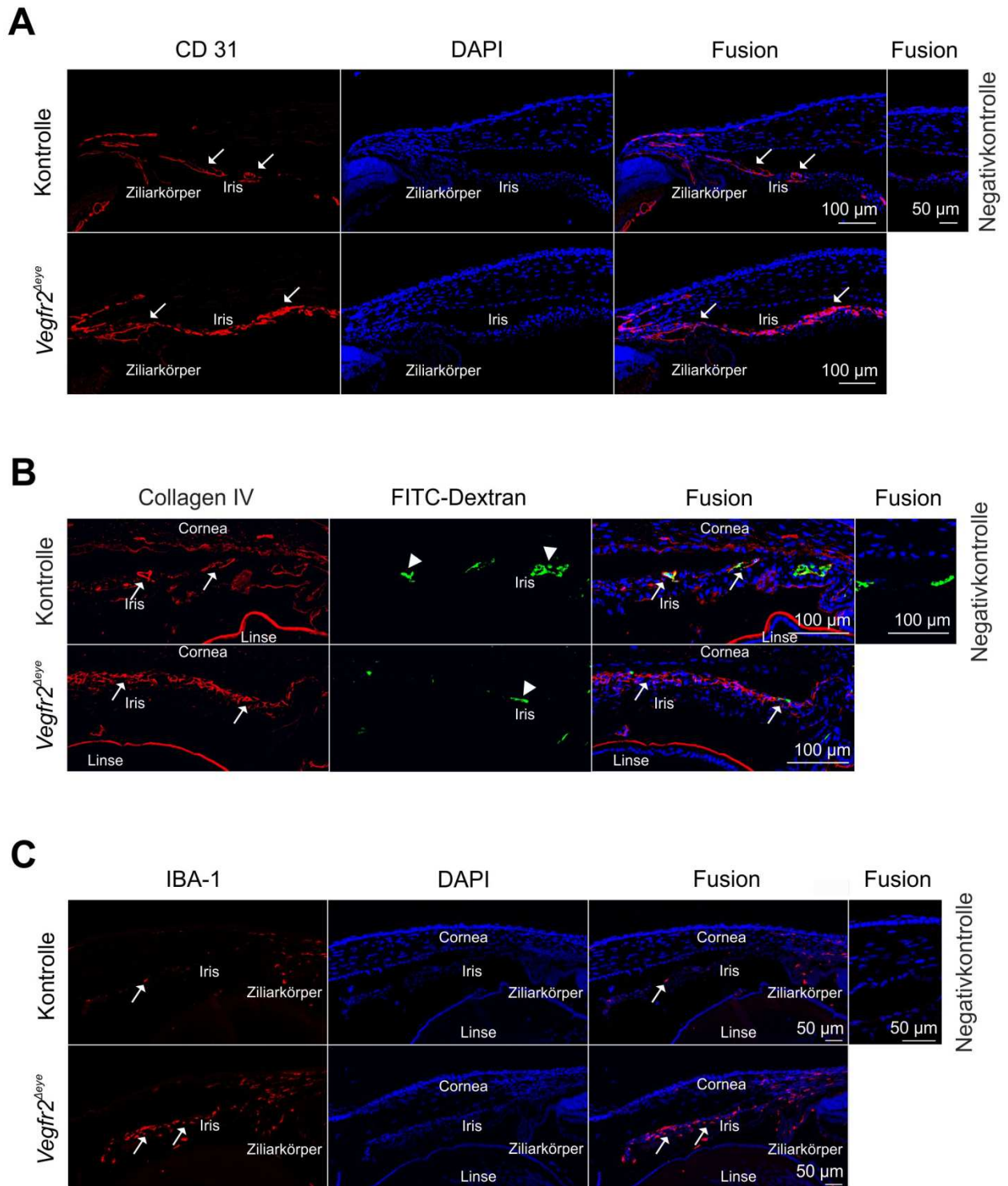


Abbildung 24: *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse zeigten eine stärkere Färbung der Iris mit Endothelzell-, Basallamina- und Mikrogliamarker an Gefrierschnitten an P13

(A) Immunhistochemische Darstellung von CD 31 (rot, Pfeile) in einer repräsentativen *Vegfr2^{Δeye}*-Maus und einem Kontrollgeschwistertier. Das Kontrolltier zeigte eine gut erkennbare Markierung für CD 31 in der Iris, im Ziliarkörper sowie im Schlemmkanal. Das Präparat der *Vegfr2^{Δeye}*-Maus zeigte eine Signalintensivierung und mengenmäßige Zunahme des Markers in der gesamten Iris. Die Gegenfärbung der DNA wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Die durchgeführte Negativkontrolle zeigte keinerlei unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers. **(B)**

Ergebnisse

Immunhistochemische Darstellung von Collagen IV (rot, Pfeile) in einer repräsentativen $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Maus und einem Kontrollgeschwistertier bei FITC-Dextran (grün) perfundierten Gefrierschnitten. Das Kontrolltier zeigte eine gut erkennbare Markierung für Collagen IV in der Iris, der Linse und der Cornea sowie einige gut abgrenzbare FITC-Dextran Fluoreszenzen. Das Präparat der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Maus zeigte eine deutliche Zunahme der Anzahl sowie eine Intensivierung der Collagen IV-Markierung in der gesamten Iris, trotz Verringerung von intravasalem FITC-Dextran (Pfeilköpfe) im Vergleich zu dem Kontrollgeschwistertier. Die Gegenfärbung der DNA wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Die durchgeführte Negativkontrolle zeigte keinerlei unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers. **(C)** Immunhistochemische Darstellung von IBA-1 (rot, Pfeile) in einer repräsentativen $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Maus und einem Kontrollgeschwistertier. Das Kontrolltier zeigte eine diskrete Markierung in der Iris und im Ziliarkörper. Das Präparat der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Maus hingegen zeigte eine deutliche mengenmäßige Zunahme des Signals in der gesamten Iris. Die Gegenfärbung der DNA wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Die durchgeführte Negativkontrolle zeigte keinerlei unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers.

CD31 = Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule 1, IBA-1 = ionisiertes Kalzium-bindendes Adapterprotein-1

2.6.3 Veränderte Vaskularisierung der Iris

Um die veränderte Vaskularisierung der Iris zu visualisieren wurden Irisflachpräparate von perfundierten $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen und Kontrolltieren angefertigt. Bei diesen Präparaten wurden im Anschluss ADPase-Reaktionen durchgeführt, um die ADPase-Aktivität auf den Endothelzellen nachzuweisen, anschließend durch eine enzymhistochemische Reaktion zu visualisieren und somit die Gefäßstrukturen der Iris darzustellen. Bei den anschließend lichtmikroskopisch beurteilten Aufnahmen zeigte sich bei den Kontrolltieren ein fein verzweigtes, geradliniges und symmetrisches vaskuläres Netzwerk, welches über die gesamte Iris verteilt war, welches hier an einer repräsentativen Maus dargestellt wird (Abbildung 25). Die ebenfalls repräsentativ dargestellte $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Maus hingegen wies ein dichteres vaskuläres Netzwerk mit plumperen und teils gekräuselten Gefäßen auf. Hinzu kam, dass die vor der Präparation durchgeführte Applikation von miotisch wirkenden Augentropfen bei den Kontrolltieren zu einer engen Pupille führte (Abbildung 25 oben), wohingegen die Miose bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen ausblieb (Abbildung 25 unten), was auf eine reduzierte Beweglichkeit der Iris hindeutet.

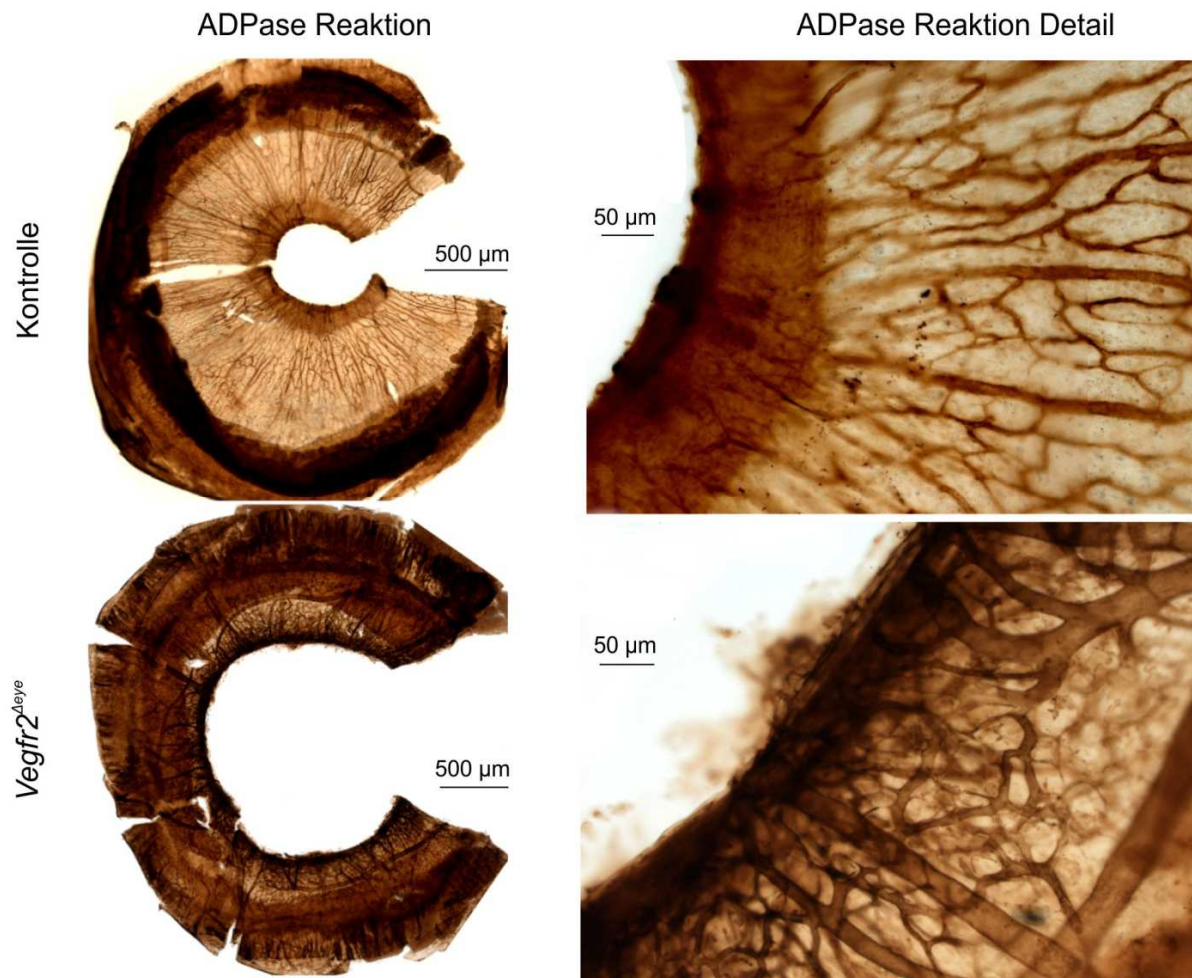


Abbildung 25: $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse zeigten ein verdichtetes vaskuläres Netzwerk in Irisflachpräparaten an P13

Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von Irisflachpräparaten einer $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Maus und eines Kontrollgeschwistertieres. Es wurde eine ADPase-Reaktion durchgeführt, durch welche die ADPase-Aktivität auf den Endothelzellen und somit die Gefäßstruktur der Iris visualisiert werden konnte. Hierbei zeigte sich ein dichteres vaskuläres Netzwerk mit plumperen Gefäßen beim Präparat der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Maus im Vergleich zu dem Kontrollgeschwistertier.

2.7 PATHOLOGISCHE VASKULARISATION DER IRIS DURCH FENESTRIERTES IRISENDOTHEL DER $VEGFR2^{\Delta EYE}$ -MÄUSE

2.7.1 Makroskopisch-morphologische Veränderungen der Vorderkammer

Im Zuge der Phänotyp-Analyse der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse wurden auch für den vorderen Augenabschnitt bereits makroskopisch erste Unterschiede erkennbar. So zeigten die Kontrolltiere am Präparationstag bei Entnahme der Augen einen physiologisch konfigurierten Bulbus mit

Ergebnisse

einer klaren vorderen Augenkammer und ungehindertem Blick auf die Linse, wohingegen sich bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen eine massive Blutung im Bereich der vorderen Augenkammer zeigte (Abbildung 26). Dieser Befund war noch deutlicher bei Mäusen im Albinohintergrund ersichtlich und behinderte hier auch vollständig den Blick auf die Linse.

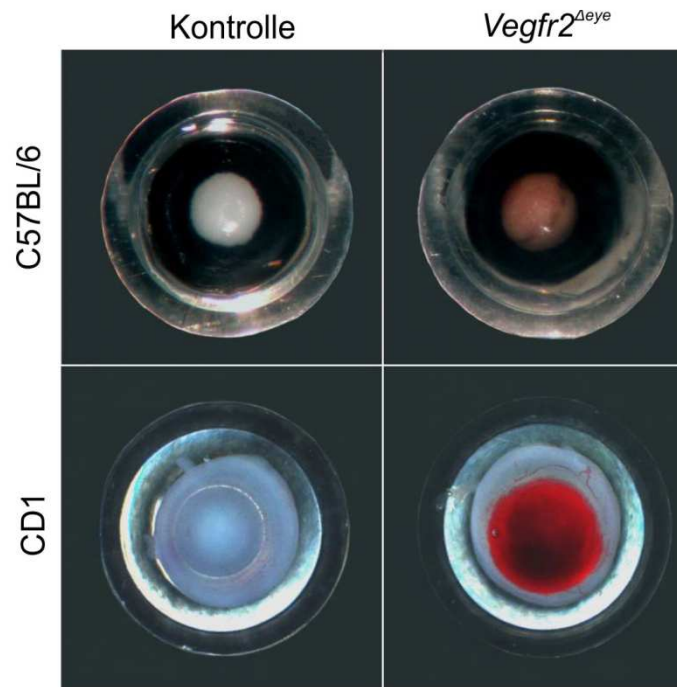


Abbildung 26: $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse zeigten Einblutungen in die vordere Augenkammer an P13 bei Mäusen in zwei verschiedenen Mausstämmen

Repräsentative Bildaufnahmen einer $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Maus und eines Kontrollgeschwistertieres in zwei verschiedenen genetischen Hintergründen (C57BL/6J und CD1). Hierbei zeigte sich eine massive Blutung in der vorderen Augenkammer der repräsentativen $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Maus. Dieser Befund war noch deutlicher bei Mäusen mit Albinohintergrund erkennbar, wie hier bei einer Maus im CD1-Hintergrund dargestellt.

2.7.2 Mikroskopisch-morphologische Veränderungen der Irisgefäße

Zur weitergehenden Phänotyp-Analyse der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse und insbesondere zur näheren Ursachenerforschung der detektierten Vorderkammerblutung wurden die Irisgefäße detaillierter untersucht. Hierbei wurden FITC-Dextran perfundierte Flachpräparate (grün) des vorderen Augenabschnitts von $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen und Kontrollgeschwistern analysiert (Abbildung 27 A). Hierbei wiesen die Kontrolltiere ein gleichmäßiges, feines vaskuläres Netzwerk, welches sich über die gesamte Iris hinweg erstreckte, auf. Die $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse hingegen zeigten ebenfalls ein intensives FITC-Dextransignal im Bereich der Iris, jedoch wirkte dieses an nur wenigen Stellen klar konfiguriert, wohingegen das überwiegende Signal sehr ver-

Ergebnisse

schwommen imponierte und keine klaren vaskulären Grenzen auszumachen waren. Im weiteren Verlauf wurden ebenfalls TEM-Untersuchungen der Irisgefäße an Ultradünnschnitten durchgeführt. Hierbei zeigte sich das Irisendothel der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse fenestriert (Fenster mit Diaphragmen) (Abbildung 27 B), während die Kontrollgeschwister Tiere ein physiologisch kontinuierliches Endothel aufwiesen.

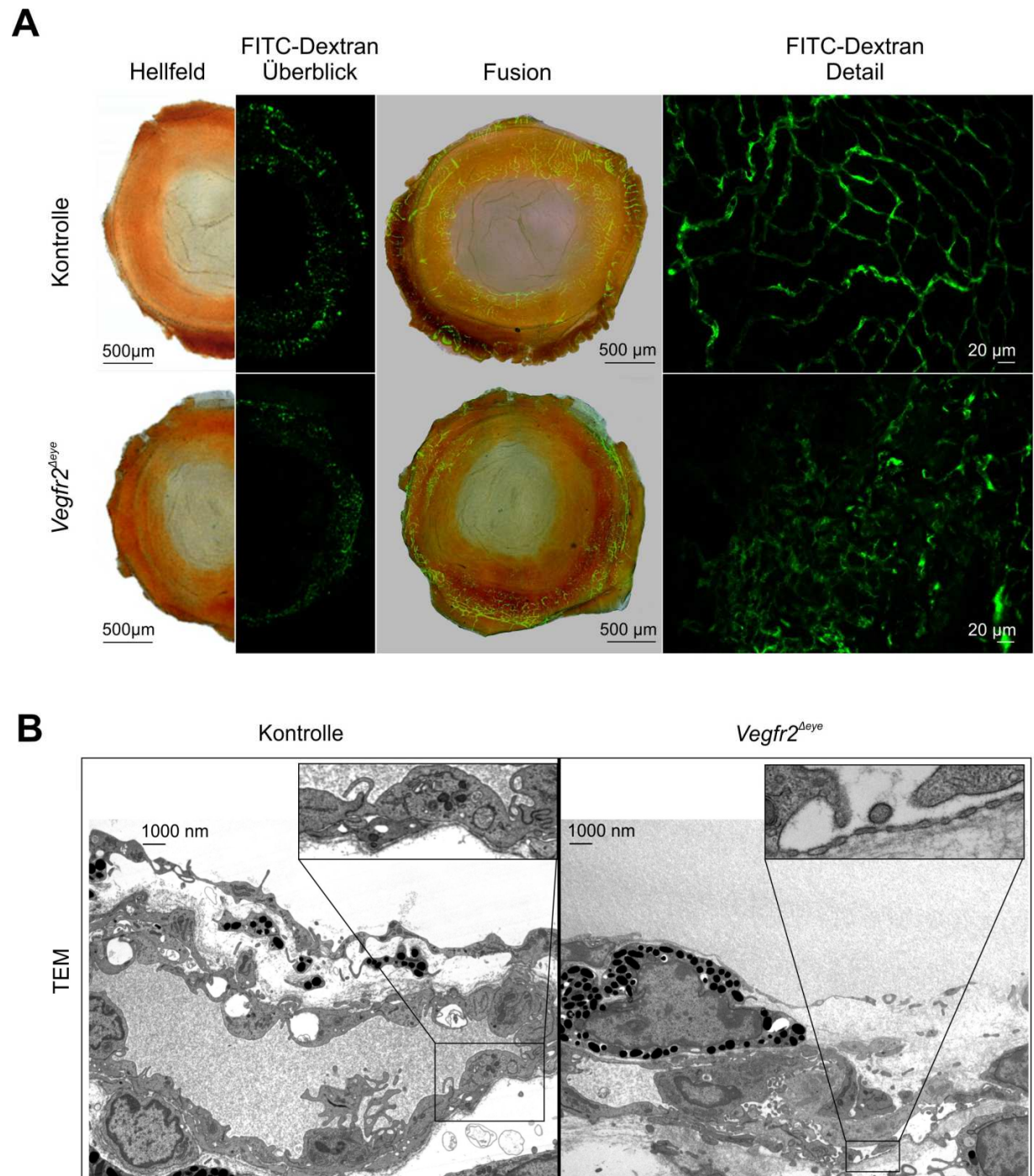


Abbildung 27: $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse zeigten ein dichteres vaskuläres Irisnetzwerk mit fenestrierten Irisgefäßen an P13

Ergebnisse

(A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von FITC-Dextran perfundierten Flachpräparaten (grün) des vorderen Augenabschnitts einer $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Maus und eines Kontrollgeschwistertiers. Hierbei zeigte sich beim Kontrolltier ein gleichmäßiges, feines vaskuläres Netzwerk, welches sich durch die gesamte Iris hindurch zog. Die $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Maus hingegen zeigte ebenfalls ein intensives FITC-Dextransignal im Bereich der Iris, wobei keine klaren vaskulären Grenzen auszumachen waren. (B) TEM-Aufnahme eines repräsentativen Ausschnitts eines Irisgefäßes. Hierbei zeigten sich Fenster mit Diaphragmen des Irisendothels der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Maus, während das Kontrollgeschwistertier ein physiologisch kontinuierliches Endothel aufwies.

TEM = Transmissionselektronenmikroskopie

2.7.3 Molekularer Nachweis der pathologischen Vaskularisation

Die durch TEM-Untersuchungen detektierten Fenster mit Diaphragmen der Irisgefäße der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse konnten auch durch den Einsatz anderer Methoden näher untersucht werden. So wurde mittels RT-PCR das mRNA-Expressionslevel von *Plasmalemma Vesicle Associated Protein (PLVAP)*, einem Marker für fenestrierte Endothelzellen (74), im vorderen Augenabschnitt untersucht (Abbildung 28 B). Hierbei zeigte sich eine signifikante Erhöhung dessen bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen ($n=7$; $2,36 \pm 0,22$; $**p=0,009$) im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern ($n=10$; $1 \pm 0,12$). Auch wurden immunhistochemische Färbungen mit einem anti-PLVAP-Antikörper durchgeführt (Abbildung 28 A). Die Kontrolltiere zeigten für diesen Marker eine gut erkennbare Markierung im Ziliarkörper, jedoch nicht im Bereich der Iris. Die $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse zeigten hingegen eine deutliche Markierung in der gesamten Iris und ebenfalls im Ziliarkörper, was für eine Veränderung des Irisendothels von einem physiologisch kontinuierlichen Endothel hin zu einem fenestrierten Endothel spricht.

Ergebnisse

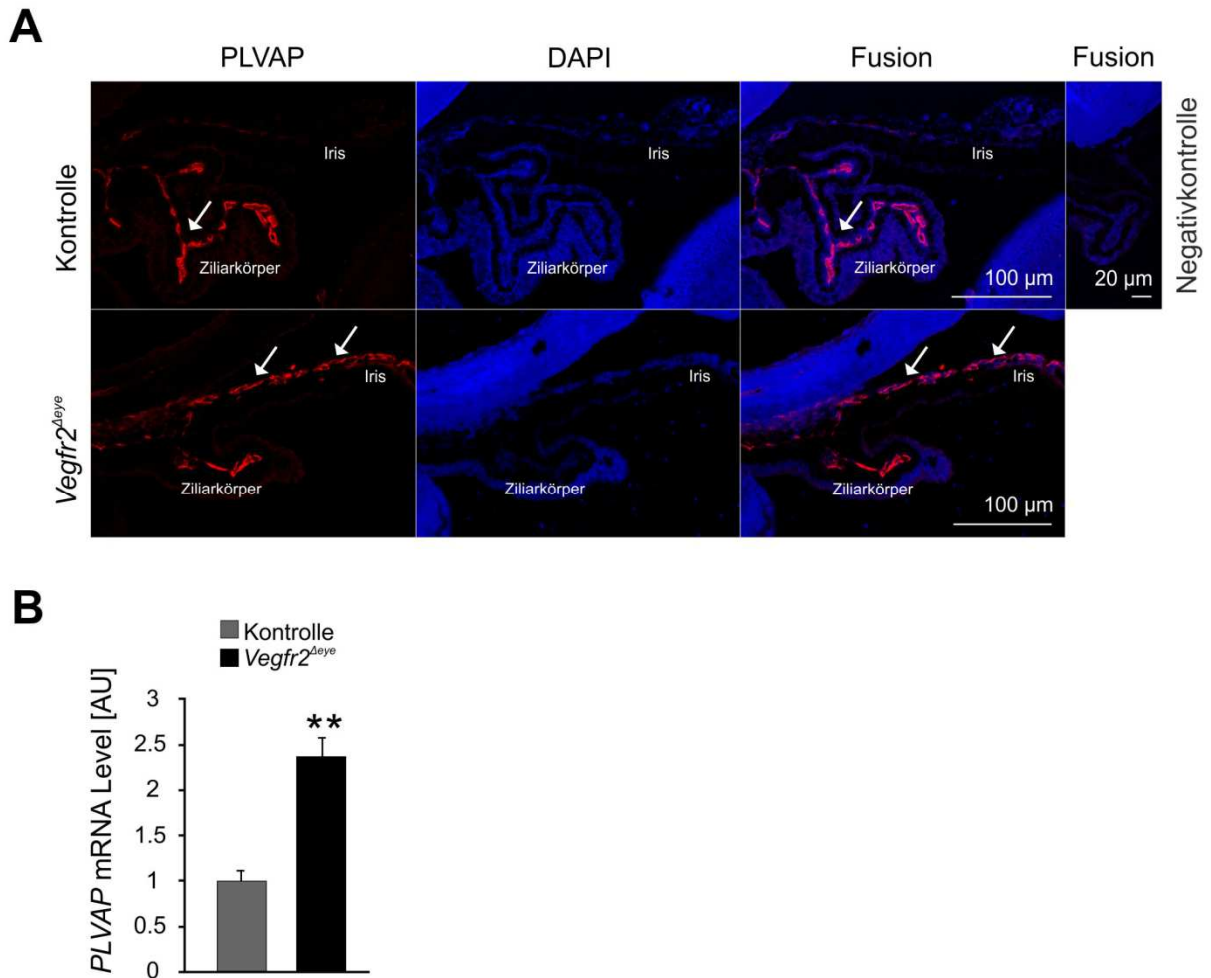


Abbildung 28: Expressionsverstärkung eines molekularen Markers für fenestrierte Endothelzellen in der Iris der *Vegfr2*^{Δeye}-Mäuse

(A) Immunhistochemische Darstellung von PLVAP (rot, Pfeile) in einer repräsentativen *Vegfr2*^{Δeye}-Maus und einem Kontrollgeschwistertier. Das Kontrolltier zeigte für den Marker für fenestriertes Endothel (anti-PLVAP-Antikörper) eine gut erkennbare Markierung im Ziliarkörper, jedoch nicht im Bereich der Iris. Das Präparat der *Vegfr2*^{Δeye}-Maus zeigte hingegen eine deutliche Markierung in der gesamten Iris und ebenfalls im Ziliarkörper. Die Gegenfärbung der DNA wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Die durchgeführte Negativkontrolle zeigte keinerlei unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers. **(B)** Das mRNA-Level von *PLVAP* im vorderen Augenabschnitt der *Vegfr2*^{Δeye}-Mäuse (n=7; 2,36 ± 0,22; **p=0,009) zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern signifikant erhöht (n=10; 1 ± 0,12). Der Mittelwert der Kontrolltiere wurde auf 1 gesetzt. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM.

PLVAP = Plasmalemma Vesicle Associated Protein, AU = arbitrary unit / willkürliche Einheit

2.7.4 Kompensatorische molekulare Veränderungen im Bereich des vorderen Augenabschnitts

Durch die vorliegende pathologische Vaskularisation der Iris der *Vegfr2*^{Δeye}-Mäuse wurden weitergehend molekulare Mechanismen analysiert, welche den Befund erklären könnten.

Ergebnisse

Hierbei wurde insbesondere der Ligand VEGFa untersucht, da beschrieben ist, dass eine erhöhte Expression von VEGFa, insbesondere über das nachgeschaltete Zielgen PLVAP, zu einer Fenestrierung der Gefäße führen kann (75,76). Mittels RT-PCR wurde das mRNA-Expressionslevel der VEGFa-Isoformen *VEGFa120* und *VEGFa164* im vorderen Augenabschnitt der *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse und deren Kontrollgeschwistertiere analysiert. Sowohl die mRNA-Expression von *VEGFa120*, als auch jene von *VEGFa164* im vorderen Augenabschnitt der *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse (n=7; $1,44 \pm 0,13$; *p=0,04 (*VEGFa120*)) bzw. (n=7; $2,48 \pm 0,21$; **p=0,005 (*VEGFa164*)) zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern signifikant erhöht (n=10; $1 \pm 0,11$ (*VEGFa120*)) bzw. (n=10; $1 \pm 0,14$ (*VEGFa164*)) (Abbildung 29 B). Ferner wurde die Proteinexpression von VEGFa mittels Western Blot Analysen mit Proben des vorderen Augenabschnitts von *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen und deren Kontrollgeschwistertieren untersucht (Abbildung 29 C). Hierbei erwies sich die VEGFa-Proteinsynthese im vorderen Augenabschnitt von *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen (n=7; $3,22 \pm 0,49$; *p=0,01) im Vergleich zu Kontrollwurfgeschwistern (n=5; $1 \pm 0,54$) signifikant erhöht. Außerdem wurden immunhistochemische Färbungen für VEGFa an Gefrierschnitten für *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse und deren Kontrollgeschwistertiere durchgeführt (Abbildung 29 A). Bei dieser Untersuchung zeigten die Kontrolltiere eine diskrete Markierung für den eingesetzten anti-VEGFa-Antikörper im Bereich des Ziliarkörpers und der Iris. Diese Fluoreszenzmarkierung war bei den *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen verstärkt auszumachen, sowohl im Ziliarkörper, jedoch insbesondere auch im Bereich der Iris.

Ergebnisse

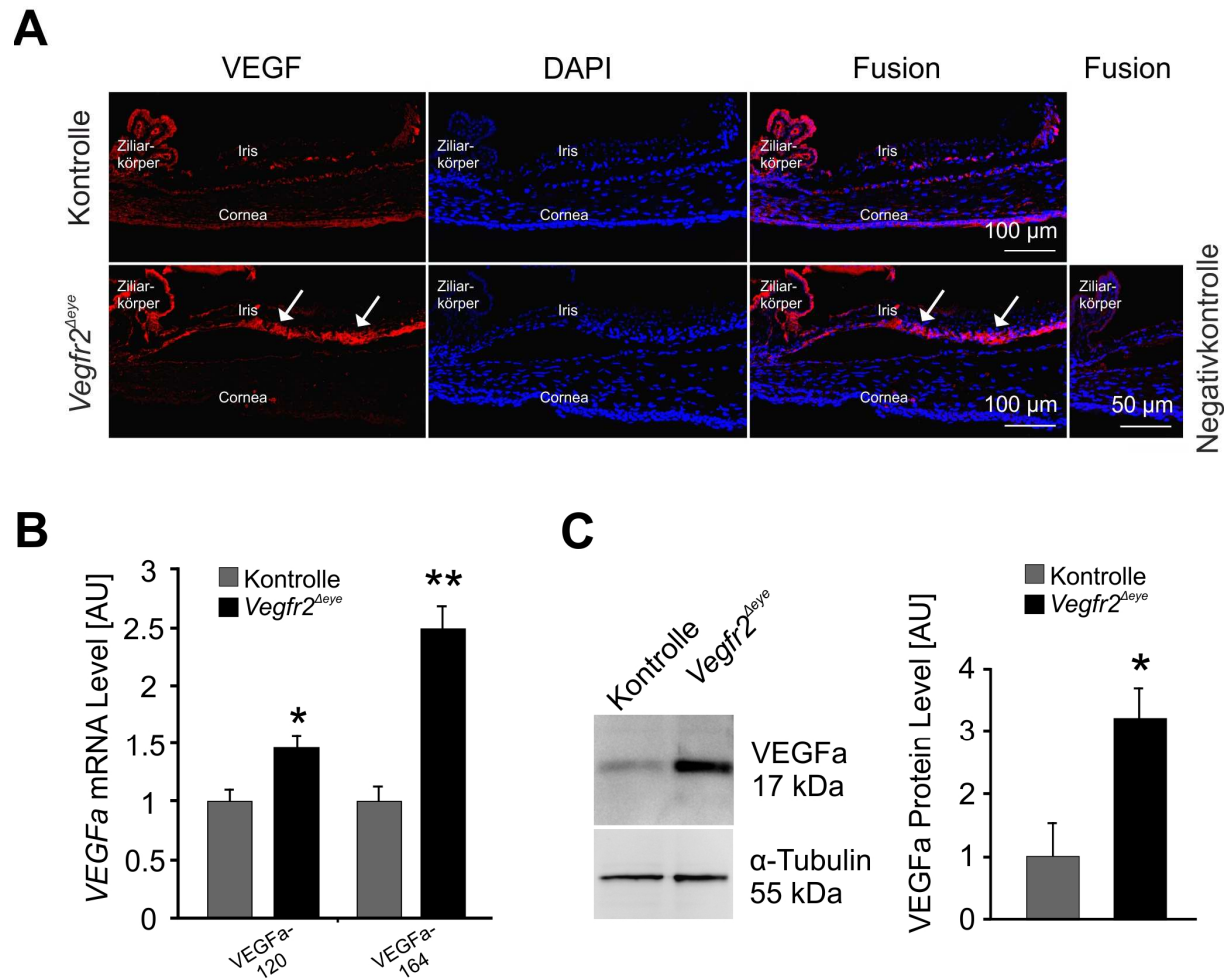


Abbildung 29: Vegfr2^{Δeye}-Mäuse zeigten eine erhöhte VEGFa-Expression auf mRNA- und Proteinebene im vorderen Augenabschnitt an P13

(A) Immunhistochemische Darstellung von VEGFa (rot, Pfeile) in einer repräsentativen Vegfr2^{Δeye}-Maus und einem Kontrollgeschwister. Das Kontrolltier zeigte eine diskrete Markierung für den anti-VEGFa-Antikörper im Bereich des Ziliarkörpers und der Iris, welche bei der Vegfr2^{Δeye}-Maus verstärkt, insbesondere in der Iris nachweisbar war. Die Gegenfärbung der DNA wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Die durchgeführte Negativkontrolle zeigte keinerlei unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers. **(B)** mRNA-Level von *VEGFa120* und *VEGFa164* im vorderen Augenabschnitt der Vegfr2^{Δeye}-Mäuse und deren Kontrollgeschwistern. Sowohl das mRNA-Level von *VEGFa120*, als auch das von *VEGFa164* im vorderen Augenabschnitt der Vegfr2^{Δeye}-Mäuse (n=7; 1,44 ± 0,13; *p=0,04 (*VEGFa120*)) bzw. (n=7; 2,48 ± 0,21; **p=0,005 (*VEGFa164*)) zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern signifikant erhöht (n=10; 1 ± 0,11 (*VEGFa120*)) bzw. (n=10; 1 ± 0,14 (*VEGFa164*)). Der Mittelwert der Kontrolltiere wurde auf 1 gesetzt. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM. **(C)** Densitometrische Analyse der VEGFa-Proteinsynthese in Gewebeproben des vorderen Augenabschnitts von Vegfr2^{Δeye}-Mäusen und deren Kontrollgeschwister. Die VEGFa-Proteinsynthese im vorderen Augenabschnitt von Vegfr2^{Δeye}-Mäusen (n=7; 3,22 ± 0,49; *p=0,01) war im Vergleich zu Kontrollwurfgeschwistern (n=5; 1 ± 0,54) signifikant erhöht. Ein repräsentativer Western Blot ist für eine Vegfr2^{Δeye}- und eine Kontrollgeschwistermaus dargestellt. Der Mittelwert der Kontrolltiere wurde auf 1 gesetzt. α-Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM.

AU = arbitrary unit / willkürliche Einheit, kDa = Kilodalton

3 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des VEGF-Signalwegs auf die postnatale Gefäßentwicklung und Homöostase im Auge der Maus zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurden Mäuse mit einer induzierbaren, Tamoxifen-abhängigen Deletion von VEGFR2 im Mausauge unter Verwendung des Cre/loxP-Systems gezüchtet ($Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse) und durch Tamoxifenapplikation ab P1 der VEGF-Signalweg während der retinalen Angiogenese inhibiert. Aus den Ergebnissen der durchgeführten Studie lässt sich schließen, dass die VEGFR2-vermittelte Signalübertragung für eine regelrechte Invasion von Astrozyten in die Retina, sowie für eine physiologische retinale Angiogenese wesentlich ist. Diese Schlussfolgerung basiert auf folgenden Erkenntnissen:

- eine fehlende intraretinale Vaskularisation, erkennbar durch eine avaskuläre Retina bei einer
- gleichzeitig vorhandenen Persistenz der hyaloiden Gefäße in den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen
- eine daraus resultierende retinale Hypoxie einhergehend mit einer Stabilisierung von HIF-1 α und einem erhöhten VEGFa-Level in der Netzhaut
- sowie einer signifikanten Akkumulation von GFAP-positiven Astrozyten in der NFL der Retina

Ferner führte die Deletion des VEGFR2 zu Gefäßveränderungen im Bereich des vorderen Augenabschnitts. Dieser Rückschluss ergibt sich aus folgenden Ergebnissen:

- eine vermehrte Anzahl von Irisgefäßen, welche durch eine erhöhte Anzahl von CD31- (Endothelzellen) und Collagen IV- (Basallamina u. a. der Gefäße) positiven Strukturen in der Iris detektiert werden konnte
- dem Vorhandensein von Fenestrierungen der Irisgefäße
- sowie einer Einblutung in die vordere Augenkammer

Außerdem scheint die Deletion des VEGFR2 auch systemische Auswirkungen auf andere Organe als das Auge zu haben. Dies konnte durch die signifikante Verringerung der Körpergröße und des -gewichts sowie die frühe Sterblichkeit um P13 bei den VEGFR2-defizienten Tieren gezeigt werden. Diese Befunde wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht differenzierter untersucht.

3.1 DER VEGF-SIGNALWEG WÄHREND DER RETINALEN ANGIOGENESE

Es wurde in den folgenden Analysen zunächst auf die retinale Gefäßentwicklung fokussiert. Hierbei ist aus der Literatur bereits bekannt, dass dem VEGFR2 eine ganz entscheidende Rolle zuteil wird. So belegen *in vitro* Daten eine fundamentale Rolle von VEGFR2 bei der Bildung von kapillarähnlichen, röhrenartigen Strukturen von menschlichen mikrovaskulären Endothelzellen (77) und *in vivo* Daten von VEGFR2 Knockout-Mäusen zeigen, dass diese Tiere *in utero* um den Embryonaltag 8,5 bis 9,5 aufgrund früher Defekte in der Entwicklung von hämatopoetischen und endothelialen Zellen sterben (78). In dieser Studie konnte ebenso nachgewiesen werden, dass in keinem Stadium des Embryos oder Dottersacks organisierte Blutgefäße vorliegen, was darauf hindeutet, dass der VEGFR2 für die Bildung von Dottersack-Blutinseln und die Gefäßbildung im Mäuseembryo von entscheidender Bedeutung ist (78). Die Gefäßentwicklung der Netzhaut bei der Maus beginnt im Gegensatz zum Menschen erst nach der Geburt (79). So haben neugeborene Mäuse zunächst keine Netzhautgefäße sondern persistierende hyaloide Gefäße, welche sich postnatal nach Ausbildung der retinalen Gefäßgeflechte parallel zurückbilden (10). So konnten andere Forschergruppen zeigen, dass sich bei Mäusen die Regression der hyaloiden Gefäße je nach Gefäßgruppe (Hyaloidarterie (HA), Vasa hyaloidea propria (VHP), Tunica vasculosa lentis (TVL) und Pupillarmembran (PM)) zeitlich unterscheidet (80). So scheint sich zunächst die VHP, dann die TVL und letztlich erst die HA zurück zu entwickeln (80), sodass eine überwiegende Rückbildung der hyaloiden Gefäße im Gesamten bis zu P16 vorliegt (81). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte konditionelle Deletion des VEGFR2, welcher hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert wird (23), bei neugeborenen Mäusen führte somit zu einer Unterbrechung des VEGF-Signalwegs zu einem sehr sensiblen Entwicklungszeitpunkt und resultierte in einer ausgeprägteren Persistenz der hyaloiden Gefäße an P13 bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren sowie einer verbleibend avaskulären Retina mit dem kompletten Ausbleiben der physiologisch postnatal stattfindenden Bildung der retinalen Gefäßplexus. So konnte durch transkardiale Perfusionen mit hochmolekularem FITC-Dextran gezeigt werden, dass durch die Deletion des VEGFR2 letztlich keine Migration der Endothelzellen mit Formierung eines Gefäßgeflechtes postnatal in der Mäuseretina stattfindet. Auch resultierte durch die fortbestehende Avaskularität eine retinale Hypoxie, wodurch auf molekularer Ebene eine Stabilisierung von HIF-1 α und eine erhöhte Expression von VEGFa bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren in der Retina nachgewiesen werden konnte. Auf mRNA-Ebene konnte festgestellt werden, dass sich die Isoform *VEGFa164* auf das Doppelte bei den Retinaprobe erhöht zeigte, wohingegen die Analyse der Isoform *VEGFa120* keine signifikanten Unterschiede erbrachte. Dies lässt sich

in Verbindung mit Daten einer anderen Forschergruppe bringen, welche feststellte, dass sich die relativen Mengen der mRNA der verschiedenen VEGFa-Isoformen von Organ zu Organ unterscheiden (82). Hierbei stellte sich die Isoform *VEGFa164* als die am häufigsten vorkommende mRNA-Isoform im Auge dar (82). Konkret konnte hier gezeigt werden, dass im gesamten Mausauge der Anteil von *VEGFa120* bei 26 %, der Anteil von *VEGFa164* bei 69 % und der Anteil von *VEGFa188* bei 5 % liegt (82). Im Mäusegehirn, sowohl während der Entwicklung als auch im Adulten, stellte sich die Verteilung noch drastischer zugunsten von *VEGFa164* dar (*VEGFa120*: 14 %, *VEGFa164*: 80 % und *VEGFa188*: 6 %) (82). Da die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Neuroretina als eine funktionale Einheit des zentralen Nervensystems zu verstehen ist, welche aus dem Zwischenhirn stammt und verschiedene Arten von Nervenzellen enthält (83), liegt zwar physiologisch, vergleichbar dem Gehirn, ein geringer Anteil an *VEGFa120* vor, jedoch zu einem weitaus größeren Anteil die Isoform *VEGFa164*, sodass auch in der vorliegenden Arbeit nach konditioneller Deletion von VEGFR2 in den *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen die prozentuale Erhöhung von *VEGFa164* in den Retinaprobe als maßgeblich zu detektieren war, wohingegen sich die Veränderung von *VEGFa120* als nicht signifikant herausstellte. Der dahinterliegende molekulare Regulationsmechanismus, durch welchen eine Ischämie die Stabilisierung von HIF-1 α und eine kompensatorische Hochregulation von hypoxie-regulierten Genprodukten, u. a. VEGFa und Ang-2, einleitet, ist bereits bestens untersucht (35,37,41). So ist die VEGFa-Erhöhung maßgeblich als Reaktion auf die Hypoxie zu verstehen, wodurch der sezernierte Ligand daraufhin Rezeptoren auf vaskulären Endothelzellen aktiviert (35,37,41). Die Transkription des VEGF-Gens seinerseits ist hierbei von HIFs gesteuert, die als intrazelluläre Sauerstoffsensoren fungieren und durch Kontrolle der VEGF-Produktion sicherstellen, dass ein Gefäßwachstum genau dort stattfindet, wo dies benötigt wird (35). Dies erklärt sowohl die im Rahmen der vorliegenden Arbeit als erhöht detektierte HIF-1 α -Proteinexpression in den Retinaprobe als auch die ebenfalls signifikant erhöhten mRNA-Expressionslevel von *Ang-2*.

3.2 DER EINFLUSS DES VEGF-SIGNALWEGS AUF DIE RETINALEN NEURONE

Als Ursache der neuronalen Schädigung bleibt zu diskutieren, inwieweit durch die Deletion von VEGFR2 im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein direkter neuronaler Schaden von Zellen in der INL entstanden sein könnte, oder aber die Neurone indirekt durch die vorliegende retinale Hypoxie geschädigt wurden und dies zur neuronalen Degeneration führte. Die morphometrische Analyse der retinalen Zellschichten und die Quantifizierung der Zellen der Ganglienzellschicht in Verbindung mit TUNEL-Analysen lieferten Hinweise auf eine erhöhte

Diskussion

Apoptoserate, insbesondere im Bereich der INL und der GCL. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen, welche sich gleichmäßig von der zentralen bis zur peripheren Retina verteilen. Dies kann einerseits indirekt, durch die vorliegende retinale Hypoxie erklärt werden, eventuell auch, indem diese, die zu diesem Zeitpunkt physiologischerweise auftretende zweite Phase des programmierten Zelltods während der Synaptogenese (84), verstärkt. Andererseits jedoch kann dieser Effekt auch direkt durch die Inhibition des VEGF-Signalwegs u. a. in retinalen Neuronen und einer direkt damit assoziierten retinalen Neurodegeneration bedingt sein.

So kann die in dieser Arbeit detektierte erhöhte Apoptoserate in der inneren Netzhaut, einhergehend mit einer signifikant geringeren Anzahl an Zellen in der GCL und einer dünneren INL bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen im Vergleich zu ihren Kontrollgeschwistertieren, ein Effekt der vorherrschenden Hypoxie sein, denn allen Zellen der inneren Netzhaut ist gemein, dass sie über die inneren retinalen Gefäßplexus mit Nährstoffen versorgt werden, wohingegen die Zellen der ONL über die Choriokapillaris versorgt werden (85), die bereits pränatal angelegt wurde (38,86) und in ihrer Entwicklung somit nicht von der Deletion des VEGF-Signalwegs betroffen war. Da jedoch bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen dieser Arbeit die Bildung der inneren retinalen Gefäße ausblieb, konnte keine suffiziente Nährstoffversorgung stattfinden, wodurch die erhöhte Apoptoserate der inneren Netzhaut erklärt werden könnte. Im Bezug auf die Schichtdicke der ONL zeigten die analysierten Daten nahezu keine signifikanten Unterschiede, was durchaus aufgrund der differierenden Gefäßversorgung erklärbar ist.

Für die Hypothese, einer verstärkten Wirkung der vorliegenden Hypoxie bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen, könnte sprechen, dass durch die durchgeführte Studie eine experimentelle Unterbrechung des VEGF-Signalwegs bei den neugeborenen Mäusen zu einem massiven Eingriff in einer höchst vulnerablen Phase während der Entwicklung führte. So könnte hierbei der zweite, physiologische Apoptosepeak, welcher in den ersten beiden postnatalen Wochen auftritt (84), bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen aufgrund der vorliegenden retinalen Hypoxie stärker ausfallen, als dies bei wildtypischen Mäusen mit physiologischer Formation der Gefäßplexus zu beobachten ist. Diese zweite Phase des programmierten Zelltods tritt während der Synaptogenese physiologischerweise im Mausauge auf (84). Hierbei zeigen sich jedoch je nach Zelltyp unterschiedliche Höhepunkte der Apoptose; so sterben RGC und amakrine Zellen in den ersten 11 Lebenstagen, wohingegen Bipolarzellen und Müller-Gliazellen zwischen P5 und P18 sterben (84,87). Da die $Vegfr2^{\Delta eye}$ - und Kontrolltiere der vorliegenden Arbeit an P13 präpariert wurden, könnte dies eine mögliche Erklärung darstellen, für die insbesondere

Diskussion

erhöhte Apoptoserate in der INL die mit dem physiologischen Apoptosezeitfenster der Zellen der INL, darunter Bipolarzellen und Müller-Gliazellen, zusammengefallen ist.

Jedoch kann nicht nur die Hypoxie eine Ursache für die in der vorliegenden Arbeit detektierte erhöhte Apoptoserate, insbesondere im Bereich der INL und der GCL, darstellen. So könnte für die obige, ebenfalls genannte, Hypothese, einer vorliegenden Neurodegeneration, sprechen, dass der als neuroprotektiv geltende Faktor VEGFa (39) und seine unzureichende Bindung an seinem defizienten Rezeptor 2 in den *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen eine neuronale Vulnerabilität bei diesen Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren bedingt. So konnten andere Gruppen zeigen, dass VEGFa direkt auf die RGC wirkt und deren Überleben fördert (39). Die RGC selbst exprimieren sowohl VEGFa als auch beide Rezeptoren (VEGFR2 und VEGFR1) (88), jedoch wird der Rezeptor 2 um das 17-fache höher exprimiert (39). Durch die Deletion des VEGFR2 in der vorliegenden Studie ergibt sich zwar eine erhöhte mRNA-Expression von *VEGFa164* in der Retina, jedoch kann die neuroprotektive Wirkung über den VEGFR2 und seiner Signalisierung über den Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalweg (39) nicht stattfinden, sodass dies eine mögliche Erklärung für die signifikant erhöhte Apoptoserate der Zellen in der GCL in den *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen bieten könnte.

Eine weitere mögliche Erklärung für die erhöhte Apoptoserate in der INL der vorliegenden Arbeit könnte sein, dass die in der INL lokalisierten Müller-Gliazellen, die bei der Unterstützung der neuronalen Funktion eine wesentliche Rolle spielen (71,89), ebenfalls von der Deletion des VEGFR2 betroffen sind. Sie reagieren auf nahezu jede pathologische Veränderung der Netzhaut (71,90) durch eine Gliosereaktion, welche anhand einer positiven GFAP-Färbung detektierbar ist (91–93) und einen zellulären Versuch darstellt, das Gewebe vor weiteren Schäden zu schützen und die Gewebefunktionen zu erhalten (94). So umfassen schützende Funktionen der Müller-Gliazellen den Schutz der Neurone nach einer Netzhautverletzung z. B. durch die Freisetzung von neuroprotektiven Faktoren, sodass Müller-Gliazellen insgesamt eine neuroprotektive Eigenschaft zugesprochen wird (95,96). Dennoch hat diese reaktive Gliose nicht nur schützende, sondern auch nachteilige Auswirkungen (97), da überschießende gliotische Veränderungen auch zur neuronalen Degeneration und Ödembildung in der erkrankten Netzhaut beitragen können (71,98). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen von VEGFR2 der Retina zeigten ein intensives Signal in der GCL sowie ein streifenförmiges Muster durch die Netzhaut, welches auf eine Expression von VEGFR2 sowohl in den RGC als auch in den Müller-Gliazellen der Netzhaut schließen lässt. Auch sezernieren Müller-Gliazellen, insbesondere

durch die hypoxiebedingte Stabilisierung von HIF-1 α , VEGFa (99), das parakrin, auf die benachbarten Neurone, aber auch möglicherweise autokrin wirken könnte und dies durch die konditionelle Deletion von VEGFR2 bei den Vegfr2 Δ^{eye} -Mäusen gestört wurde. Die Analyse der in dieser Arbeit durchgeführten GFAP-Färbungen zeigte jedoch keine radiäre Streifung durch die Netzhaut, was dem charakteristischen Färbemuster reaktiver Müllerzellen entsprechen würde (91), sodass eine Müllerzell-Gliosereaktion in der vorliegenden Arbeit mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann. Daten einer anderen Forschergruppe, welche die Auswirkungen eines konditionellen Knockouts von VEGFR2 in Müller-Gliazellen untersuchten, wiesen unter physiologischen Bedingungen keine signifikanten Änderungen der Müllerzelldichte, der mittels Elektroretinographie (ERG) analysierten Netzhautfunktion, der Netzhautmorphologie oder der Dichte der INL- und GCL-Neuronen durch die Unterbrechung von VEGFR2 in Müller-Gliazellen auf (89). Dies deutet darauf hin, dass die VEGFR2-Deletion in Müller-Gliazellen unter physiologischen Bedingungen diese nicht schädigt und auch zu keinen offensichtlichen Schädigungen der Netzhaut führt.

Die in dieser Arbeit detektierte, vergleichsweise dünnere INL bei den Vegfr2 Δ^{eye} -Mäusen zu ihren Kontrollgeschwistertieren, sowie die erhöhte Anzahl TUNEL-positiver Zellen, welche ebenfalls überwiegend in der INL lokalisiert waren, impliziert einen neuronalen Schaden in diesem Bereich. Dies ging einher mit einer Aktivierung von, sich in unmittelbarer Nähe befindlicher, Mikroglia, deren wesentliche Aufgabe unter anderem darin besteht, tote Zellen durch Phagozytose zu beseitigen (100). Diese Aktivierung der retinalen Mikroglia konnte durch immunhistochemische Färbungen von IBA-1 in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, wobei sich hierbei die normalerweise im Bereich der plexiformen Schichten ruhende, ramifizierte Mikroglia bei den Vegfr2 Δ^{eye} -Mäusen vor allem im Bereich der INL als deutliches IBA-1 Signal mit amöboider Zellmorphologie darstellen ließ.

3.3 DER VEGF-SIGNALWEG UND ASTROZYTEN

An weiteren Ergebnissen lieferte die vorliegende Arbeit eine Akkumulation von GFAP-positiven Astrozyten in der NFL bei den Vegfr2 Δ^{eye} -Mäusen. Die in der NFL vorkommenden Astrozyten dienen physiologischerweise, durch ihre zentrifugale Auswanderung vom ONH in die retinale Peripherie, als eine Vorlage für die Endothelzellen, indem sie als Reaktion auf die bis dato bestehende retinale Hypoxie VEGFa exprimieren (9,10,46). Dieser Wachstumsstimulus wiederum lockt Endothelzellen an, die sich entlang des durch die Astrozyten vorge-

bildeten Netzwerkgerüsts formieren und so den oberflächlichen Plexus der Retina bilden (9,10,46). So haben die retinalen Astrozyten normalerweise engen Kontakt zu den gebildeten Blutgefäßen und erfüllen ebenso eine wichtige Funktion bei der Bildung der inneren Blut-Retina-Schranke (101). Diese, seit langem bestehende, Theorie der sogenannten "Astrozytenschablone" konnte durch eine andere Forschergruppe präzisiert werden (102). So zeigen diese Daten, dass sich diese astrozytäre Schablone auf unreife Astrozyten und nicht auf ausgereifte Astrozyten bezieht (102). So konnten die Kollegen hier zeigen, dass aus dem Sehnerv stammende astrozytäre Vorläuferzellen große Bereiche der inneren Netzhautoberfläche in perinatalen Stadien besiedeln, sich zu unreifen Astrozyten differenzieren und proliferieren und fortlaufend weiter in Richtung der Netzhautperipherie wandern (102). Hierbei unterstützen die unreifen Astrozyten die Angiogenese hinter sich (102). Eine Differenzierung von unreifen Astrozyten zu reifen Astrozyten findet jedoch laut den Daten der Kollegen nur in vaskularisierten Bereichen statt, sodass sich zusammenfassend sagen lässt, dass die vaskulären und astrozytären Komponenten der Netzhaut die Entwicklung der jeweils anderen Komponente durch wechselseitige Regulationsmechanismen beeinflussen (102). In der vorliegenden Arbeit zeigten die Astrozyten der NFL der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse eine stark veränderte Netzwerkmorphologie im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistertieren, welche die charakteristische sternförmige Morphologie der Astrozyten (47) darstellte, die auch an mehreren Stellen mit den FITC-Dextran perfundierten Netzhautgefäßen assoziiert waren. Im Gegensatz hierzu wies die Netzhaut der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse nur einige FITC-perfundierte hyaloide Gefäße an der Oberfläche der Retina auf und das GFAP-Färbemuster zeigte eine dicke homogene Masse von klobigen GFAP-positiven Zellen im zentralen Teil der Retina, welche ihr Aussehen zur peripheren Retina hin veränderten und hierbei eine Honigwaabenstruktur aufwiesen. Diese beobachteten Veränderungen könnten durch die Abwesenheit der retinalen Gefäße bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen bedingt sein, sodass eine Differenzierung von unreifen Astrozyten zu reifen Astrozyten nicht stattfinden konnte, während dies bei den wildtypischen Geschwistertieren physiologisch ablaufen konnte. Hierbei zeigen Daten aus der Literatur, dass reife Astrozyten den peripheren Rand der Retina zwischen P8 und P10 erreichen (102) und sich somit bei den wildtypischen Geschwistertieren in der vorliegenden Arbeit am Präparationstag P13 ein reifes Astrozytennetzwerk zeigt, wohingegen dies bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen nicht der Fall ist, was wiederum eine Erklärung für die veränderte Netzwerkmorphologie bieten könnte.

Ferner könnte in dieser Studie die detektierte Veränderung des astrozytären Netzwerks auch durch die weiterhin bestehende retinale Hypoxie zu erklären sein, welche über aktuell noch nicht abschließend geklärte molekulare Signalwege zur beobachteten Astrozytenakkumulation führt. Ursächlich hierbei könnten die, durch die retinale Hypoxie be-

dingten, erhöhten VEGFa-Spiegel sein, die im Gesamten eine Proliferation oder verstärkte Migration der Astrozyten induzieren (9), was in der vorliegenden Arbeit durch eine erhöhte Anzahl an GFAP-positiven Zellen in der NFL, welche vor allem im zentralen Bereich der Retina auftrat, sowie eine erhöhte *GFAP* mRNA-Expression in Retinaprobe quantifiziert wurde. Erste Hinweise, dass dem so sein könnte, kommen von einer anderen Forschergruppe, welche zeigen konnte, dass VEGF über astrogliale VEGFR1 wirkt und hierbei das astrogliale Wachstum im zentralen Nervensystem steuert (103). Hierbei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die meisten Astrozyten den VEGFR1 exprimieren, jedoch nicht den VEGFR2 (103). Auf eine Verabreichung von exogenem VEGF konnten die Kollegen eine signifikante Astrozytenaktivierung, -proliferation und -reifung nachweisen, welche sie durch die Messung der GFAP-Expression quantifizierten, wobei die detektierten astrozytären Veränderungen wiederum offenbar ausschließlich über den VEGFR1 vermittelt werden (103). Da das in erhöhtem Ausmaße sezernierte VEGFa zwar insgesamt an den VEGFR1 bindet, welcher ebenfalls auf Endothelzellen vorhanden ist (104), dieser jedoch kaum eine mitogene Rolle auf die Endothelzellen zu spielen scheint (15), scheint dies für die retinale Angiogenese nur untergeordnet von Bedeutung zu sein. Dies stützt ebenfalls die Aussage einer anderen Forschergruppe, welche nachweisen konnte, dass VEGFR1-Gene-Null-Mutantenmäuse früh in der Embryogenese aufgrund eines Überwachstums von Endothelzellen versterben, da VEGFR1 als ein negativer Regulator für die Angiogenese in der Entwicklung gilt (104), wohingegen der VEGFR2 Endothelzellproliferation, -migration und -überleben fördert, sodass im Kontrast zur Deletion des Rezeptor 1 bei der Deletion des Rezeptor 2 das retinale Gefäßwachstum ausbleibt bzw. bei postnataler Deletion unterbunden wird (14).

3.4 DER VEGF-SIGNALWEG UND DIE VERÄNDERUNGEN IM VORDEREN AUGENABSCHNITT

Auch im Bereich des vorderen Augenabschnitts wurden in der vorliegenden Arbeit mikroskopische Untersuchungen der Gefäße durchgeführt, um die pathologischen Auswirkungen des VEGFR2-Knockdowns aufzuarbeiten. Hierbei gelang es, Unterschiede im Bereich der Irisgefäße zu detektieren. Im Gegensatz zu den intraretinalen Gefäßen, welche sich erst in den ersten Wochen postnatal entwickeln (10,46), weisen Daten anderer Forschergruppen darauf hin, dass die iridalen Gefäße bereits früher angelegt sind (105), sodass die Deletion des VEGFR2 in den *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen der vorliegenden Studie hier den Effekt auf ein bereits bestehendes Gefäßsystem zeigt. Die *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse zeigten in den durchgeführten Unter-

suchungen eine dickere Iris, die sich durch eine Gefäßproliferation der iridalen Gefäße erklären lässt. Diese Hypothese konnte durch immunhistochemische Färbungen von CD31 und Collagen IV untermauert werden, da Präparate der *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse jeweils eine deutliche Zunahme der Anzahl sowie eine Intensivierung des Signals in der gesamten Iris der beiden Marker im Vergleich zu ihren Kontrollgeschwistertieren aufwiesen. Ferner ergaben die immunhistochemischen Färbungen für Collagen IV in Kombination mit dem eingesetzten FITC-Dextran erste Hinweise auf eine Undichtigkeit der Irisgefäße, da bei den *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen trotz einer Zunahme der Collagen IV-Markierung in der Iris eine Verringerung von intravasalem FITC-Dextran zu detektieren war. Dies könnte auch eine Erklärung für die festgestellten makroskopisch-morphologischen Veränderungen im Sinne einer Vorderkammerblutung bei den *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen darstellen. Durch weitergehende Untersuchungen der Irisgefäße konnten einerseits durch TEM-Analysen Fenster mit Diaphragmen der Irisgefäße detektiert werden, und weiterhin durch die Herstellung von Irisflächpräparaten morphologische Veränderungen der Irisgefäßarchitektur nachgewiesen werden, da die *Vegfr2^{Δeye}*-Mäuse im Gegensatz zu ihren wildtypischen Geschwistern ein sehr viel dichteres vaskuläres Netzwerk mit plumperen und teils gekräuselten Irisgefäßen aufwiesen und sich die FITC-Dextransignale nur an wenigen Stellen klar konfiguriert darstellten, sondern überwiegend sehr verschwommen imponierten und keine klaren vaskulären Grenzen auszumachen waren. Diese nachgewiesenen Veränderungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit liefern Hinweise auf eine funktionelle Störung der physiologischerweise dichten Irisgefäße, welche gemeinsam mit dem Epithel des Ziliarkörpers die Blut-Kammerwasser-Schranke bilden (106). Die zugrundeliegende Ursache für die detektierten Veränderungen bei den *VEGFR2*-defizienten Mäusen können durch die, unter hypoxischen Bedingungen stattgefundenene, erhöhte Expression von *VEGFa* erklärt werden, die in der vorliegenden Arbeit sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene auch im vorderen Augenabschnitt nachgewiesen werden konnte. Die erhöhte Anwesenheit eines so potenten angiogenen Faktors könnte sowohl die beschriebenen iridalen Neovaskularisationen (107), als auch die Fenestrierung erklären (15). Hierbei stellte sich im Bereich des vorderen Augenabschnitts sowohl das Expressionslevel der mRNA-Isoform *VEGFa120* als auch der Isoform *VEGFa164* bei den *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren als signifikant erhöht dar. Im Detail zeigte sich eine Erhöhung von *VEGFa120* auf den 1,5-fachen Wert und eine Erhöhung von *VEGFa164* auf den 2,5-fachen Wert. Dies kann durch die bereits weiter oben beschriebene, organspezifische Verteilung der *VEGFa*-Isoformen erklärt werden, wonach die Daten aus der Literatur zeigen, dass im gesamten Mausauge der überwiegende *VEGFa*-Anteil (69 %) als *VEGFa164* und nur ein geringer Anteil (26 %) als *VEGFa120* vorliegt (82). Im Vergleich zur Retina lässt sich der vordere Augenabschnitt auch als eine typische Augenstruktur deklarieren, sodass diese Literaturdaten (82) einerseits die prozentuale Verteilung der mRNA-

Expressionslevelerhöhung in den Gewebeproben des vorderen Augenabschnitts der vorliegenden Arbeit erklären können, sowie auch den Unterschied zu den Retinaprobe, bei welchen sich *VEGFa120* nicht signifikant verändert zeigte. Die bestehende Hypothese der, durch hohe VEGFa-Level bedingten, iridalen Neovaskularisationen untermauern einige Daten aus der Literatur (107). So gilt VEGFa als einer der Hauptmediatoren von okulären Neovaskularisationen bei retinaler Ischämie (88,108,109) wie diese bei verschiedenen Augenerkrankungen, wie z. B. der proliferativen diabetischen Retinopathie (PDR), vorliegt. Neben Neovaskularisationen in der Retina und in den Glaskörper können diese auch im Bereich der Iris auftreten (Rubeosis iridis) und im weiteren Verlauf in ein Neovaskularisationsglaukom übergehen (110). In zwei Tiermodellen konnte eine kausale Rolle von VEGF bei der mit Ischämie verbundenen Neovaskularisierung der Netzhaut nachgewiesen werden. Hierbei verhinderten VEGF-neutralisierende Antikörper Neovaskularisationen der Iris in einem Primatenmodell vollständig (109) und lösliche VEGF-Rezeptoren unterdrückten die retinale Vaskularisation in einem Mausmodell (108). So konnten andere Forschergruppen auch zeigen, dass in ischämischen Netzhäuten von Affen die VEGF mRNA- und Proteinlevel proportional zum Ausmaß der sich daraufhin entwickelnden Irisneovaskularisation steigen (111), wobei die nicht vollständig an die Matrix gebundenen Isoformen hierbei am maßgeblichsten sind (112). Auch bei Menschen mit retinaler Ischämie korrelieren die VEGF-Spiegel in der Netzhaut, im Glaskörper und im Kammerwasser zeitlich mit der Neovaskularisation der Netzhaut und der Iris (88). So entsteht die Vermutung einer Aktivierung des VEGFR1 in den *Vegfr2^{Δeye}*-Mäusen dieser Arbeit, welcher im Irisgefäßsystem vorhanden ist (113), durch die vorliegenden hohen VEGFa-Level, was letztlich zu den detektierten Veränderungen der Irismorphologie führte. Generell betrachtet zeigt der VEGFR1 eine deutlich schwächere Kinaseaktivität als der VEGFR2 (114), was allerdings durch die nachgewiesenen hohen VEGFa-Level dennoch für die diagnostizierten Veränderungen ausreichend sein könnte. Andernfalls erscheint auch denkbar, dass durch das in der vorliegenden Arbeit verwendete induzierbare System nicht 100% der Zellen eine Deletion des VEGFR2 aufweisen, sodass die verbleibenden, nicht targetierten Zellen, durch die vorliegende VEGF-Exposition über ihren noch vorhandenen VEGFR2 angiogen wirken und so zu den beschriebenen Veränderungen führen. Des Weiteren zeigen Daten aus der Literatur, dass nach exogener VEGFa-Exposition bei Affen nicht nur der VEGFR1, welcher sowohl im bereits bestehenden Irisgefäßsystem als auch in den neu gebildeten Gefäßen vorhanden ist, sondern auch der VEGFR3 vom bereits existierenden Gefäßendothel der Iris und sehr stark in den sprießenden Gefäßen an der Irisoberfläche exprimiert wird, was auf eine Beteiligung des Rezeptor 3 an der Migration von Endothelzellen bei VEGFa-induzierter Angiogenese hinweisen könnte (113,115) und möglicherweise ebenfalls als eine Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit detektierte Irisproliferation dienen könnte. Auch konnte, wie bereits oben beschrieben, eine

Diskussion

Zunahme der Gefäßpermeabilität der Irisgefäße bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen dieser Arbeit detektiert werden. Generell wird angenommen, dass die Gefäßpermeabilität über zwei Mechanismen vermittelt wird: einerseits den transzellulären Weg und andererseits den parazellulären Weg (116). Der transzelluläre Weg stellt einen Caveolae-vermittelten vesikulären Transport dar (116), wobei hier die gebildeten Caveolae durch das Endothel hindurch wandern und so die zu transportierenden Stoffe befördern (117). Der parazelluläre Weg stellt einen Transportweg zwischen einzelnen Zellen dar (3) und umfasst den Transport durch interendotheliale Verbindungen (116), hier im Speziellen Adherens und Tight Junctions (117). VEGFa wurde als ein Faktor identifiziert, welcher die Gefäßpermeabilität erhöht (15). Außerdem sprechen Daten aus der Literatur dafür, dass die Gefäßpermeabilität nicht nur, wie bislang angenommen, in erster Linie durch VEGFa/VEGFR2 vermittelt wird, sondern auch über VEGFR1 (118). Auch liefern Literaturdaten nach exogener VEGFa-Behandlung bei Affen Hinweise auf eine erhöhte Permeabilität, Hypertrophie und Aktivierung des bereits vorhandenen Irisgefäßsystems, was u. a. durch eine Signalintensivierung von CD31 und den VEGFR1,-2, und -3 gezeigt werden konnte (113). So können die in der vorliegenden Arbeit detektierten Veränderungen hinsichtlich der Gefäßpermeabilität der Irisgefäße mit den ebenfalls detektierten Fenestrationsen durch die vorliegenden hohen VEGFa-Level im Bereich des vorderen Augenabschnitts erklärt werden, wodurch letztlich eine Störung der Blut-Kammerwasser-Schranke bei den VEGFR2-defizienten Tieren resultiert. Einhergehend mit den via TEM detektierten Fenestrationsen der Irisgefäße konnten auch auf mRNA-Ebene signifikant erhöhte Level von *PLVAP* auf über das 2-fache nachgewiesen werden. Ferner konnte durch immunhistochemische Färbungen von PLVAP gezeigt werden, dass, während die Kontrolltiere lediglich PLVAP im Ziliarkörper exprimieren, bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen zusätzlich in der Iris eine sehr deutliche Expression von PLVAP vorliegt, was die vorliegenden Fenster mit Diaphragmen des Irisendothels untermauert. Die im Ziliarkörper detektierte positive Markierung auf PLVAP ist hierbei als physiologisch zu werten, da im Stroma des Ziliarkörpers fenestrierte Kapillaren vorliegen (119), wohingegen das Irisendothel physiologischerweise ein kontinuierliches Endothel ohne Fenestrationsen aufweist (106). Diese molekulare Veränderung lässt sich ursächlich durch die erhöhten VEGFa-Level im Bereich des vorderen Augenabschnitts erklären. Auf diesen Zusammenhang deuten auch Daten aus der Literatur hin; so wird vermutet, dass PLVAP ein nachgeschaltetes Zielgen der VEGF-Signalisierung ist und somit eine Assoziation zwischen VEGFa und dem Auftreten bzw. der Aufrechterhaltung von Fenestrationsen untermauert (75,76). PLVAP selbst gilt als Protein, welches endotheliale Diaphragmen bildet (76) und so für die Entwicklung der endothelialen Fenestrationsen unerlässlich ist (120). So gibt es durchaus auch Bereiche im Auge, an welchen eine Fenestration des Endothels von entscheidender funktioneller Bedeutung ist, so z. B. im Bereich der Choriokapillaris, um die Versorgung der äußeren Schichten

der Retina mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten und somit zur Aufrechterhaltung der Sehfunktion wesentlich beizutragen (120). Auch in diesem Fall konnte gezeigt werden, dass VEGFa die PLVAP-Expression in der Choroidea reguliert und somit eine funktionelle Korrelation von VEGFa und PLVAP besteht (120). Letztlich konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch durch immunhistochemische Färbungen des vorderen Augenabschnitts von IBA-1 eine ausgeprägte mengenmäßige Zunahme des Signals in der gesamten Iris bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistertieren nachgewiesen werden, was auf eine Zunahme der Anzahl der myeloiden Zellen in der Iris der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse schließen lässt. Dies lässt sich durch eine gesteigerte Signaltransduktion über den VEGFR1 aufgrund der erhöhten VEGFa-Level, welche wiederum die Produktion von proinflammatorischen und proangiogenen Mediatoren durch Makrophagen und Mikroglia induzieren kann, erklären (118).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit im Bereich des vorderen Augenabschnitts auf pathologische Veränderungen der Irisgefäße hin, an welchen maßgeblich die erhöhten VEGFa-Level bei den VEGFR2-defizienten Tieren beteiligt sind. So kann die vorliegende nähere Aufarbeitung dieser pathologischen Auswirkungen des VEGFR2-Knockdowns im Tiermodell eine Basis darstellen, um ein besseres Verständnis für die Auswirkungen von pathologischen oder therapeutischen Eingriffen in den VEGF-Signalweg zu erlangen. Hierbei konnte insbesondere im Bereich des vorderen Augenabschnitts ein ursächlicher Zusammenhang zwischen auftretenden Neovaskularisationen im Bereich der Iris gezeigt werden, der bei weiterem Fortschreiten bzw. einer Ausweitung im Bereich des Kammerwinkels ein Krankheitsmodell für das Neovaskularisationsglaukom bieten könnte. In diesem Fall jedoch müsste das Studiendesign angepasst werden, um die detektierte Letalität der Tiere um P14 zu umgehen. Hierbei erscheint als wesentliches Element die Verhinderung der vermutlich vorliegenden systemischen Ausbreitung des, durch Applikation via Augentropfen, verabreichten Tamoxifens, dass bei ubiquitär im Körper vorhandener CAGGCre (121) wohl nicht ausschließlich einen lokal auf das Auge begrenzten Phänotyp durch die VEGFR2-Deletion nach sich zieht. Dies lässt sich aus den makroskopisch-morphologischen Daten mit detektierten Unterschieden im Bereich von Größe und Gewicht der Versuchstiere sowie dem frühen Todeseintritt der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse schließen.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Der VEGF-Signalweg spielt eine herausragende Rolle sowohl während der physiologischen Gefäßentwicklung als auch bei pathologischen Veränderungen des Gefäßsystems im Auge. So sind ophthalmologische Erkrankungen wie z. B. die feuchte altersbedingte Maculadegeneration oder die diabetische Retinopathie mit pathologischen Gefäßproliferationen im Auge assoziiert, verursacht unter anderem durch erhöhte VEGFa-Spiegel, einem Liganden der VEGF-Familie (14,40). Um ein besseres Verständnis für die Pathogenese dieser Erkrankungen und der Rolle des VEGF-Signalwegs zu erlangen, war es das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss des VEGF-Signalwegs auf die postnatale Gefäßentwicklung und Homöostase im Mausauge zu untersuchen. Hierbei wurden Mäuse mit einer induzierbaren, Tamoxifen-abhängigen Deletion des VEGFR2 unter Verwendung des Cre/loxP-Systems ($Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse), gezüchtet, da der VEGFR2, als einer der drei endothelialen Rezeptortyrosinkinasen der VEGF-Familie (14,15), als essentiell für den VEGF-Signalweg gilt. So gelang es letztlich, den VEGF-Signalweg während der retinalen Angiogenese im Mausauge zu inhibieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Mausauge sowohl der Erfolg des VEGFR2-Knockdowns, als auch dessen Auswirkungen auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene sowie die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen analysiert.

Zunächst wurde in dieser Studie die Aktivität der verwendeten Cre-Rekombinase anhand von Cre-Reportermäusen (R26R) im gesamten Auge nachgewiesen und somit gezeigt, dass die den folgenden Experimenten zugrunde liegende Methodik effektiv und wirksam ist. Anschließend wurde sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene der erfolgreiche Knockdown des VEGFR2 in Geweben des vorderen Augenabschnitts und der Retina bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen und eine Phänotyp-Analyse der Versuchstiere - sowohl auf makroskopischer als auch auf mikroskopischer Ebene - durchgeführt. Makroskopisch zeigten sich die $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse kleiner und mit einem geringeren Gewicht als die Kontrolltiere. Ferner zeigten sie Einblutungen in die vordere Augenkammer. Die detaillierte Analyse der Augen von VEGFR2-defizienten Tieren zeigte bei morphometrischen Analysen der verschiedenen retinalen Schichten signifikant dünnere retinale Zellschichten, wobei im Speziellen die innere Körnerschicht an den meisten Positionen eine signifikante Reduktion ergab, die äußere Körnerschicht hingegen nur an einigen wenigen Positionen. Des Weiteren ergaben sich eine geringere Anzahl an Zellen in der Ganglienzellschicht und TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)-Analysen bestätigten eine erhöhte retinale Apoptoserate bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen. Auch wurde die retinale Ge-

Zusammenfassung

fäßentwicklung mittels transkardialen Perfusionen von hochmolekularem FITC-Dextran untersucht und bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen eine inhibierte retinale Angiogenese und daraus resultierender retinaler Hypoxie, einhergehend mit einer HIF-1 α -Stabilisierung und erhöhten VEGFa-Spiegeln detektiert. Ferner wurden im Bereich der Retina differenziertere Untersuchungen der retinalen Astrozyten durchgeführt, welche im Rahmen der funktionellen, physiologischen Gefäßentwicklung eine entscheidende Rolle spielen (9,10). Hierbei zeigte sich eine Astrozytenakkumulation in der Nervenfaserschicht der Retina, sowie deutliche Veränderungen des retinalen astrozytären Netzwerks. Nicht nur die Retina, sondern auch der vordere Augenabschnitt wurde im Rahmen dieser Arbeit weitergehend untersucht, um die pathologischen Auswirkungen des VEGFR2-Knockdowns aufzuarbeiten. Besonders auffallend waren bei den $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäusen Veränderungen im Vaskularisierungsprofil der Iris mit plumperen und teils gekräuselten Gefäßen an Stelle des wildtypischen, fein verzweigten und symmetrisch-vaskulären Netzwerks der Irisgefäße. Ebenso konnten Veränderungen des Irisendothels, insbesondere durch den Einsatz von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Analysen, nachgewiesen werden, wobei die Analysen hierbei ein fenestriertes Irisendothel bei den VEGFR2-defizienten Tieren ergaben. Letztlich wurden die gewonnenen Daten durch molekularbiologische Methoden auch auf mRNA- und Proteinebene differenzierter analysiert und gestützt. So gelang es, die mikroskopisch detektierten Fenestrationsen der Irisendothelien anhand von PLVAP-Analysen auch molekularbiologisch zu untermauern. Außerdem konnten im vorderen Augenabschnitt eine kompensatorisch erhöhte VEGFa-Expression der $Vegfr2^{\Delta eye}$ -Mäuse sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Dissertation, dass der VEGF-Signalweg essentiell für eine regelrechte physiologische retinale Gefäßentwicklung und die Formation des Astrozytennetzwerks ist. Die durch die Deletion des Signalwegs resultierende avaskuläre Retina führte zu kompensatorisch erhöhten VEGFa-Spiegeln, die bei den bereits angelegten Irisgefäßen zur Proliferation führten. Letztlich wurde somit in dieser Dissertation auch ein Mausmodell des Neovaskularisationsglaukoms generiert, wie es bei Patienten mit diabetischer Retinopathie oder Okklusion der retinalen Gefäße vorkommt.

5 ANHANG

5.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung des Auges	1
Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung der VEGF-Familie	7
Abbildung 3: Struktur und extrazelluläre Lokalisation der drei hauptsächlichsten Isoformen von VEGFa	9
Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung der embryonalen intraokulären Gefäße	12
Abbildung 5: Vereinfachte schematische Darstellung der intraretinalen Gefäße	14
Abbildung 6: Entwicklung der Netzhautgefäße der Maus.....	15
Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung der molekularen Mechanismen retinaler Angiogenese	17
Abbildung 8: Morphometrische Analyse der Retina anhand von Semidünnschnittpräparaten	46
Abbildung 9: Genotypisierung von Vegfr2 ^{fl/fl} Mäusen inklusive Differenzierung des Vorhandenseins der Cre-Rekombinase (CAGGCre)	55
Abbildung 10: Rosa-LacZ Reporterermäuse (R26R): Mikroskopische Aufnahmen der β -Galaktosidaseaktivitätsfärbung an P8.....	57
Abbildung 11: Nachweis des konditionellen Knockdowns von Vegfr2 bei Vegfr2 ^{Δeye} -Mäusen in der Retina an P13.....	59
Abbildung 12: Analyse des konditionellen Knockdowns von Vegfr2 bei Vegfr2 ^{Δeye} -Mäusen im Bereich des vorderen Augenabschnitts an P13	60
Abbildung 13: Makroskopische Aufnahme und Gewichtsbestimmung von Vegfr2 ^{Δeye} -Mäusen und den Kontrollgeschwistern an P13	61
Abbildung 14: Morphologische Unterschiede in der Retina von Vegfr2 ^{Δeye} -Mäusen spezifiziert durch morphometrische Analysen der Dicke von INL und ONL sowie Quantifizierung der Neurone in der Ganglienzellschicht am Semidünnschnittpräparat an P13.....	63
Abbildung 15: Darstellung apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Analysen in der Retina von Vegfr2 ^{Δeye} -Mäusen: Erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in der Retina von Vegfr2 ^{Δeye} -Mäusen an P13	64
Abbildung 16: Vegfr2 ^{Δeye} -Mäuse zeigten eine reduzierte retinale Vaskularisation und eine Persistenz der hyaloiden Gefäße in FITC-Dextran perfundierten Retinaflachpräparaten an P13.....	65

Anhang

Abbildung 17: Vegfr2 ^{Δeye} -Mäuse zeigten eine reduzierte retinale Vaskularisation in FITC-Dextran perfundierten Gefrierschnitten an P13.....	67
Abbildung 18: Vegfr2 ^{Δeye} -Mäuse zeigten eine erhöhte retinale Expression diverser Angiogenese-assoziiierter Faktoren: Western Blot Analysen von HIF-1α und RT-PCR von Ang-2	68
Abbildung 19: Vegfr2 ^{Δeye} -Mäuse zeigten eine erhöhte retinale Expression diverser Angiogenese-assoziiierter Faktoren: RT-PCR, Western Blot Analysen und immunhistochemische Färbung von VEGFa.....	70
Abbildung 20: Vegfr2 ^{Δeye} -Mäuse zeigten eine Aktivierung der retinalen Mikroglia: immunhistochemische Färbung von IBA-1	72
Abbildung 21: Vegfr2 ^{Δeye} -Mäuse zeigten eine Akkumulation von GFAP-positiven Zellen in der NFL an P13.....	74
Abbildung 22: Retinales astrozytäres Netzwerk mit Gefäßstatus an P13 visualisiert anhand von FITC-Dextran perfundierten, anti-GFAP markierten Netzhautflachpräparaten	76
Abbildung 23: Verdickung der Iris der Vegfr2 ^{Δeye} -Mäuse an P13	77
Abbildung 24: Vegfr2 ^{Δeye} -Mäuse zeigten eine stärkere Färbung der Iris mit Endothelzell-, Basallamina- und Mikroglia marker an Gefrierschnitten an P13.....	79
Abbildung 25: Vegfr2 ^{Δeye} -Mäuse zeigten ein verdichtetes vaskuläres Netzwerk in Irisflachpräparaten an P13	81
Abbildung 26: Vegfr2 ^{Δeye} -Mäuse zeigten Einblutungen in die vordere Augenkammer an P13 bei Mäusen in zwei verschiedenen Mausstämmen.....	82
Abbildung 27: Vegfr2 ^{Δeye} -Mäuse zeigten ein dichteres vaskuläres Irisnetzwerk mit fenestrierten Irisgefäßen an P13	83
Abbildung 28: Expressionsverstärkung eines molekularen Markers für fenestrierte Endothelzellen in der Iris der Vegfr2 ^{Δeye} -Mäuse.....	85
Abbildung 29: Vegfr2 ^{Δeye} -Mäuse zeigten eine erhöhte VEGFa-Expression auf mRNA- und Proteinebene im vorderen Augenabschnitt an P13.....	87

5.2 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Reagenzien.....	20
Tabelle 2: Enzyme, Taq Polymerasen und handelsübliche Kits.....	21
Tabelle 3: Molekulargewichtsstandards.....	21
Tabelle 4: Oligonukleotidprimer zur Genotypisierung	21
Tabelle 5: Oligonukleotidprimer zum Einsatz bei quantitativer Echtzeit-PCR.....	22
Tabelle 6: Primäre Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie	22
Tabelle 7: Sekundäre Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie.....	23
Tabelle 8: Chemische Zusammensetzung von Puffern und Lösungen	25
Tabelle 9: Laborausstattung	26
Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 11: Verwendete Mauslinien.....	27
Tabelle 12: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes zur Amplifikation eines Cre-Rekombinasefragments aus genomischer DNA (CAGGCre).....	33
Tabelle 13: CAGGCre-PCR Cycler Programm	33
Tabelle 14: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes zur Genotypisierung von Vegfr2 ^{fl/fl} Mäusen	34
Tabelle 15: Vegfr2 ^{fl/fl} -PCR Cycler Programm	34
Tabelle 16: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes zur Genotypisierung von Vegfr2 ^{fl/fl} Mäusen sowie zur Differenzierung des Vorhandenseins der Cre-Rekombinase (CAGGCre)	34
Tabelle 17: Vegfr2 ^{fl/fl} - und CAGGCre -PCR Cycler Programm	34
Tabelle 18: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes zur Genotypisierung der LacZ-Expression in Cre-Reportermäusen (ROSA26-LacZ)	35
Tabelle 19: Lac-Z-PCR Cycler Programm	35
Tabelle 20: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese	37
Tabelle 21: Cycler-Programm für die cDNA-Synthese.....	37
Tabelle 22: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die RT-PCR.....	38
Tabelle 23: Cycler-Programm für die RT-PCR.....	38
Tabelle 24: Bestandteile des SDS-Gels für Western Blot-Analysen.....	40
Tabelle 25: Schematische Anordnung des Semidry-Blots	41
Tabelle 26: Verwendete Substanzen bei Western Blot-Analysen	42
Tabelle 27: Protokoll der Dehydration für Paraffineinbettung.....	44
Tabelle 28: Protokoll der Dehydration für Eponeinbettung.....	45

Anhang

Tabelle 29: Protokoll für Eponeinbettung.....	45
Tabelle 30: Immunhistochemische Färbeprotokolle für Gefrierschnitte.....	48
Tabelle 31: Protokoll zur Entparaffinierung.....	49
Tabelle 32: Immunhistochemische Färbeprotokolle für Paraffinschnitte	49
Tabelle 33: Immunhistochemisches Färbeprotokoll für Netzhautflachpräparate	50
Tabelle 34: Protokoll TUNEL-Analyse	51

5.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Alpha
β	Beta
∞	unendlich
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent
μ	Mikro
A	Ampere
A.	Arterie
ADP	Adenosindiphosphat
ADPase	Adenosindiphosphatase
AMD	altersbedingte Maculadegeneration
Ang-1/2	Angiopoetin-1 und -2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AU	arbitrary unit / willkürliche Einheit
BCA	Bicinchoninsäure
bidest.	bidestillata
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CD31	Differenzierungscluster 31
cDNA	komplementäre DNA
Cre	cyclization recombination
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DDSA	2-Dodecenyln-Bernsteinsäureanhydrid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
dest.	destillata
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpt	Dioptrien
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2'-Deoxyuridin, 5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EM	Elektronenmikroskop
ERG	Elektroretinographie
et al.	und andere
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran
fl	flox
fwd	vorwärts
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCL	Ganglienzellschicht
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
Gnb2l1	Guanin-Nukleotid-bindende Proteinuntereinheit beta-2-like1
H ₂ O	Wasser
HA	Hyaloidarterie
HCl	Salzsäure

Anhang

HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HIF-1 bzw. HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1(-alpha)
housekeeper	stabil exprimiertes Referenzgen
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IBA-1	ionisiertes Kalzium-bindendes Adapterprotein 1
IgG	Immunglobulin G
<i>in vitro</i>	außerhalb des lebenden Organismus
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
INL	innere Körnerschicht
IPL	innere plexiforme Schicht
k	Kilo
l	Liter
LIF	leukemia inhibitory factor (Leukämie-inhibitorischer Faktor)
loxP	locus of X-over P1
m	Milli Meter
M	Molar
M.	Musculus
min	Minute
mind.	mindestens
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mRNA	messengerRNA
n	Nano
N.	Nervus
NFL	Nervenfaserschicht
NV	Neovascularisationen
ONH	Sehnervenkopf
ONL	äußere Körnerschicht
OPL	äußere plexiforme Schicht
OS	Ora serrata
P	postnataler Tag
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PDGF	platelet-derived growth factor (Thrombozyten-Wachstumsfaktor)
PDGFR α	platelet-derived growth factor receptor α (Thrombozyten-Wachstumsfaktorrezeptor α)
PDR	proliferative diabetische Retinopathie
Php	Phosphatpuffer
PIGF	Placental Growth Factor (plazentarer Wachstumsfaktor)
PLVAP	Plasmalemma Vesicle Associated Protein (Plasmalemma Vesikel assoziiertes Protein)
PM	Pupillarmembran
PVDF	Polyvinylidenfluorid-Membran
R26R	Rosa-LacZ Reportermause
rev	rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
ROP	Frühgeborenenretinopathie
RGC	retinale Ganglienzellen

Anhang

RPE	retinales Pigmentepithel
RPL32	ribosomales Protein L32
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
rTdT	terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
SCC	Standard-Kochsalzlösung Citrat
SDS	sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Std.	Stunde(n)
Taq	Thermus aquaticus (thermostabile DNA Polymerase)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	transgen
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor- β
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITON	tert-Octylphenylpolyoxyethylen
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
TVL	Tunica vasculosa lentis
U	Unit
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR1	VEGF-Rezeptor 1
VEGFR2	VEGF-Rezeptor 2
VEGFR3	VEGF-Rezeptor 3
VHP	Vasa hyaloidea propria
w/v	Gewicht pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
ZB	Ziliarkörper

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Welsch U, Deller T. Lehrbuch Histologie: Mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch. 3rd ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2010. 596 p. ger.
2. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Kopf, Hals und Neuroanatomie: 115 Tabellen. 2nd ed. Stuttgart: Thieme; 2009. 541 p. (Prometheus). ger.
3. Physiologie: 93 Tabellen. Stuttgart: Thieme; 2010. 830 p. (Duale Reihe). ger.
4. O'Leary F, Campbell M. The blood-retina barrier in health and disease. *FEBS J.* 2021. doi:10.1111/febs.16330 Cited in: PubMed; PMID 34923749.
5. Romero-Aroca P, Baget-Bernaldiz M, Pareja-Rios A, Lopez-Galvez M, Navarro-Gil R, Verges R. Diabetic Macular Edema Pathophysiology: Vasogenic versus Inflammatory. *J Diabetes Res.* 2016;20162156273. doi:10.1155/2016/2156273 Cited in: PubMed; PMID 27761468.
6. Goldman D. Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(7):431–42. doi:10.1038/nrn3723 Cited in: PubMed; PMID 24894585.
7. Pérez De Sevilla Müller L, Shelley J, Weiler R. Displaced amacrine cells of the mouse retina. *J Comp Neurol.* 2007;505(2):177–89. doi:10.1002/cne.21487 Cited in: PubMed; PMID 17853452.
8. Moll K-J, Moll KJ, Möller M. Anatomie: Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog. 18th ed. München, Jena: Elsevier Urban & Fischer; 2006. 784 p. ger.
9. Saint-Geniez M, D'Amore PA. Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol.* 2004;48(8-9):1045–58. doi:10.1387/ijdb.041895ms Cited in: PubMed; PMID 15558494.
10. Fruttiger M. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis.* 2007;10(2):77–88. doi:10.1007/s10456-007-9065-1 Cited in: PubMed; PMID 17322966.
11. Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C. Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol.* 2011;21 Suppl 6S3-9. doi:10.5301/EJO.2010.6049 Cited in: PubMed; PMID 23264323.
12. Zayas-Santiago A, Cross SD, Stanton JB, Marmorstein AD, Marmorstein LY. Mutant Fibulin-3 Causes Proteoglycan Accumulation and Impaired Diffusion Across Bruch's Membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(7):3046–54. doi:10.1167/iovs.17-21720 Cited in: PubMed; PMID 28622396.
13. Heinke J, Patterson C, Moser M. Life is a pattern: vascular assembly within the embryo. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012;42269–88. doi:10.2741/541 Cited in: PubMed; PMID 22202036.

14. Karaman S, Leppänen V-M, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. *Development*. 2018;145(14). doi:10.1242/dev.151019 Cited in: PubMed; PMID 30030240.
15. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Mişu CM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):455–67. Cited in: PubMed; PMID 30173249.
16. Secker GA, Harvey NL. Regulation of VEGFR Signalling in Lymphatic Vascular Development and Disease: An Update. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14). doi:10.3390/ijms22147760 Cited in: PubMed; PMID 34299378.
17. Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J*. 1997;16(13):3898–911. doi:10.1093/emboj/16.13.3898 Cited in: PubMed; PMID 9233800.
18. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*. 1994;269(41):25646–54. Cited in: PubMed; PMID 7929268.
19. Tjwa M, Lutun A, Autiero M, Carmeliet P. VEGF and PlGF: two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis. *Cell Tissue Res*. 2003;314(1):5–14. doi:10.1007/s00441-003-0776-3 Cited in: PubMed; PMID 13680354.
20. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 1991;6(9):1677–83. Cited in: PubMed; PMID 1656371.
21. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 1999;13(1):9–22. Cited in: PubMed; PMID 9872925.
22. Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang MK, Anand-Apte B, Weatherbee JA, Wang Y, Fang F, Flanagan JG, Tsang ML. Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*. 1996;271(6):3154–62. doi:10.1074/jbc.271.6.3154 Cited in: PubMed; PMID 8621715.

23. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019;176(6):1248–64. doi:10.1016/j.cell.2019.01.021 Cited in: PubMed; PMID 30849371.
24. Adamis AP, Shima DT. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina*. 2005;25(2):111–8. doi:10.1097/00006982-200502000-00001 Cited in: PubMed; PMID 15689799.
25. Stalmans I. Role of the vascular endothelial growth factor isoforms in retinal angiogenesis and DiGeorge syndrome. *Verh K Acad Geneeskd Belg*. 2005;67(4):229–76. Cited in: PubMed; PMID 16334858.
26. Olsson A-K, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(5):359–71. doi:10.1038/nrm1911 Cited in: PubMed; PMID 16633338.
27. Li X, Lee C, Tang Z, Zhang F, Arjunan P, Li Y, Hou X, Kumar A, Dong L. VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? *Cell Adh Migr*. 2009;3(4):322–7. doi:10.4161/cam.3.4.9459 Cited in: PubMed; PMID 19684473.
28. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9349–54. doi:10.1073/pnas.95.16.9349 Cited in: PubMed; PMID 9689083.
29. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 2005;438(7070):946–53. doi:10.1038/nature04480 Cited in: PubMed; PMID 16355212.
30. Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, Alitalo K. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res*. 1992;52(20):5738–43. Cited in: PubMed; PMID 1327515.
31. Tammela T, Alitalo K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell*. 2010;140(4):460–76. doi:10.1016/j.cell.2010.01.045 Cited in: PubMed; PMID 20178740.
32. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Böhlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187(3):1579–86. doi:10.1016/0006-291x(92)90483-2 Cited in: PubMed; PMID 1417831.

33. Matsumoto K, Azami T, Otsu A, Takase H, Ishitobi H, Tanaka J, Miwa Y, Takahashi S, Ema M. Study of normal and pathological blood vessel morphogenesis in Flt1-tdsRed BAC Tg mice. *Genesis*. 2012;50(7):561–71. doi:10.1002/dvg.22031 Cited in: PubMed; PMID 22489010.
34. Fudalej E, Justyniarska M, Kasarek K, Dziedziak J, Szaflik JP, Cudnoch-Jędrzejewska A. Neuroprotective Factors of the Retina and Their Role in Promoting Survival of Retinal Ganglion Cells: A Review. *Ophthalmic Res*. 2021;64(3):345–55. doi:10.1159/000514441 Cited in: PubMed; PMID 33454713.
35. Rattner A, Williams J, Nathans J. Roles of HIFs and VEGF in angiogenesis in the retina and brain. *J Clin Invest*. 2019;129(9):3807–20. doi:10.1172/JCI126655 Cited in: PubMed; PMID 31403471.
36. Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, Keshet E. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci*. 1995;15(7 Pt 1):4738–47. Cited in: PubMed; PMID 7623107.
37. Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol*. 2014;947–71. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104720 Cited in: PubMed; PMID 23937437.
38. Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA. VEGF expression and receptor activation in the choroid during development and in the adult. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(7):3135–42. doi:10.1167/iovs.05-1229 Cited in: PubMed; PMID 16799060.
39. Foxton RH, Finkelstein A, Vijay S, Dahlmann-Noor A, Khaw PT, Morgan JE, Shima DT, Ng Y-S. VEGF-A is necessary and sufficient for retinal neuroprotection in models of experimental glaucoma. *Am J Pathol*. 2013;182(4):1379–90. doi:10.1016/j.ajpath.2012.12.032 Cited in: PubMed; PMID 23416159.
40. Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(6):385–403. doi:10.1038/nrd.2015.17 Cited in: PubMed; PMID 26775688.
41. Campochiaro PA. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2015;4967–81. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.06.002 Cited in: PubMed; PMID 26113211.
42. Pardanaud L, Yassine F, Dieterlen-Lievre F. Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development*. 1989;105(3):473–85. Cited in: PubMed; PMID 2612361.

43. Coffin JD, Poole TJ. Embryonic vascular development: immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordia in quail embryos. *Development*. 1988;102(4):735–48. Cited in: PubMed; PMID 3048971.
44. Pudliszewski M, Pardanaud L. Vasculogenesis and angiogenesis in the mouse embryo studied using quail/mouse chimeras. *Int J Dev Biol*. 2005;49(2-3):355–61. doi:10.1387/ijdb.041956mp Cited in: PubMed; PMID 15906251.
45. Chan-Ling T, Gock B, Stone J. The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that 'physiological hypoxia' is the stimulus for normal retinal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36(7):1201–14. Cited in: PubMed; PMID 7775098.
46. Dorrell MI, Aguilar E, Friedlander M. Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(11):3500–10. Cited in: PubMed; PMID 12407162.
47. Tao C, Zhang X. Development of astrocytes in the vertebrate eye. *Dev Dyn*. 2014;243(12):1501–10. doi:10.1002/dvdy.24190 Cited in: PubMed; PMID 25236977.
48. Fruttiger M, Calver AR, Krüger WH, Mudhar HS, Michalovich D, Takakura N, Nishikawa SI, Richardson WD. PDGF Mediates a Neuron–Astrocyte Interaction in the Developing Retina. *Neuron*. 1996;17(6):1117–31. doi:10.1016/s0896-6273(00)80244-5 Cited in: PubMed; PMID 8982160.
49. Witmer AN, Vrensen GFJM, van Noorden CJF, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res*. 2003;22(1):1–29. doi:10.1016/s1350-9462(02)00043-5 Cited in: PubMed; PMID 12597922.
50. Benjamin LE. Glucose, VEGF-A, and diabetic complications. *Am J Pathol*. 2001;158(4):1181–4. doi:10.1016/S0002-9440(10)64066-7 Cited in: PubMed; PMID 11290533.
51. Nowak JZ. AMD--the retinal disease with an unprecised etiopathogenesis: in search of effective therapeutics. *Acta Pol Pharm*. 2014;71(6):900–16. Cited in: PubMed; PMID 25745762.
52. Wu A-L, Wu W-C. Anti-VEGF for ROP and Pediatric Retinal Diseases. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2018;7(3):145–51. doi:10.22608/APO.201837 Cited in: PubMed; PMID 29633587.
53. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996;380(6573):435–9. doi:10.1038/380435a0 Cited in: PubMed; PMID 8602241.

54. Kühn R, Torres RM. Cre/loxP recombination system and gene targeting. *Methods Mol Biol.* 2002;180:175–204. doi:10.1385/1-59259-178-7:175 Cited in: PubMed; PMID 11873650.
55. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol.* 1981;150(4):467–86. doi:10.1016/0022-2836(81)90375-2 Cited in: PubMed; PMID 6276557.
56. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1263–73. doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032 Cited in: PubMed; PMID 3472723.
57. *Biochemie: 50 Tabellen.* 2nd ed. Stuttgart: Thieme; 2008. 836 p. (Duale Reihe). ger.
58. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350–4. doi:10.1073/pnas.76.9.4350 Cited in: PubMed; PMID 388439.
59. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(7):3116–20. doi:10.1073/pnas.76.7.3116 Cited in: PubMed; PMID 91164.
60. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual: Vol. 2.* 2nd ed. S.l.: Cold Spring Harbor; 1989. getr. Pag. eng.
61. RICHARDSON KC, JARETT L, FINKE EH. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.* 1960;35:13–23. doi:10.3109/10520296009114754 Cited in: PubMed; PMID 13741297.
62. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239–57. doi:10.1038/bjc.1972.33 Cited in: PubMed; PMID 4561027.
63. Corporation P. Using Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) Enzyme to Detect TUNEL-Positive, GFP-Expressing Apoptotic Cells [Internet] [cited 2022 Feb 11]. Available from: <https://www.promega.de/~media/files/resources/cell%20notes/cn003/using%20terminal%20deoxynucleotidyl%20transferase%20enzyme.pdf>
64. Byrne C, Tainsky M, Fuchs E. Programming gene expression in developing epidermis. *Development.* 1994;120(9):2369–83. Cited in: PubMed; PMID 7525178.

65. Baulmann DC, Ohlmann A, Flügel-Koch C, Goswami S, Cvekl A, Tamm ER. Pax6 heterozygous eyes show defects in chamber angle differentiation that are associated with a wide spectrum of other anterior eye segment abnormalities. *Mech Dev.* 2002;118(1-2):3–17. doi:10.1016/s0925-4773(02)00260-5 Cited in: PubMed; PMID 12351165.
66. 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;854495–500. doi:10.1007/978-3-319-17121-0_66 Cited in: PubMed; PMID 26427451.
67. Luty GA, McLeod DS. Phosphatase enzyme histochemistry for studying vascular hierarchy, pathology, and endothelial cell dysfunction in retina and choroid. *Vision Res.* 2005;45(28):3504–11. doi:10.1016/j.visres.2005.08.022 Cited in: PubMed; PMID 16213000.
68. Luty GA, McLeod DS. A new technique for visualization of the human retinal vasculature. *Arch Ophthalmol.* 1992;110(2):267–76. doi:10.1001/archophth.1992.01080140123039 Cited in: PubMed; PMID 1736877.
69. Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet.* 1999;21(1):70–1. doi:10.1038/5007 Cited in: PubMed; PMID 9916792.
70. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119(1):7–35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8 Cited in: PubMed; PMID 20012068.
71. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* 2006;25(4):397–424. doi:10.1016/j.preteyeres.2006.05.003 Cited in: PubMed; PMID 16839797.
72. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol.* 2016;23(3):253–9. doi:10.1097/MOH.0000000000000239 Cited in: PubMed; PMID 27055047.
73. Dong S, Landfair J, Balasubramani M, Bier ME, Cole G, Halfter W. Expression of basal lamina protein mRNAs in the early embryonic chick eye. *J Comp Neurol.* 2002;447(3):261–73. doi:10.1002/cne.10245 Cited in: PubMed; PMID 11984820.
74. 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;10527–33. doi:10.1016/j.exer.2012.09.011 Cited in: PubMed; PMID 23063469.

75. Strickland LA, Jubb AM, Hongo J-A, Zhong F, Burwick J, Fu L, Frantz GD, Koeppen H. Plasmalemmal vesicle-associated protein (PLVAP) is expressed by tumour endothelium and is upregulated by vascular endothelial growth factor-A (VEGF). *J Pathol.* 2005;206(4):466–75. doi:10.1002/path.1805 Cited in: PubMed; PMID 15971170.
76. Nakagami Y, Hatano E, Chayama Y, Inoue T. An anti-PLVAP antibody suppresses laser-induced choroidal neovascularization in monkeys. *Eur J Pharmacol.* 2019;854240–6. doi:10.1016/j.ejphar.2019.04.035 Cited in: PubMed; PMID 31026444.
77. Koolwijk P, Peters E, van der Vecht B, Hornig C, Weich HA, Alitalo K, Hicklin DJ, Wu Y, Witte L, van Hinsbergh VW. Involvement of VEGFR-2 (kdr/flk-1) but not VEGFR-1 (flt-1) in VEGF-A and VEGF-C-induced tube formation by human microvascular endothelial cells in fibrin matrices in vitro. *Angiogenesis.* 2001;4(1):53–60. doi:10.1023/a:1016637700638 Cited in: PubMed; PMID 11824379.
78. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 1995;376(6535):62–6. doi:10.1038/376062a0 Cited in: PubMed; PMID 7596435.
79. Stahl A, Connor KM, Sapielha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, Seaward MR, Willett KL, Aderman CM, Guerin KI, Hua J, Löfqvist C, Hellström A, Smith LEH. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(6):2813–26. doi:10.1167/iovs.10-5176 Cited in: PubMed; PMID 20484600.
80. Ito M, Yoshioka M. Regression of the hyaloid vessels and pupillary membrane of the mouse. *Anat Embryol (Berl).* 1999;200(4):403–11. doi:10.1007/s004290050289 Cited in: PubMed; PMID 10460477.
81. Kim T-H, Son T, Yao X. Functional OCT angiography reveals early physiological dysfunction of hyaloid vasculature in developing mouse eye. *Exp Biol Med (Maywood).* 2019;244(10):819–23. doi:10.1177/1535370219850787 Cited in: PubMed; PMID 31126209.
82. Ng YS, Rohan R, Sunday ME, Demello DE, D'Amore PA. Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Dev Dyn.* 2001;220(2):112–21. doi:10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<:AID-DVDY1093>3.0.CO;2-D Cited in: PubMed; PMID 11169844.
83. Behar-Cohen F, Gelizé E, Jonet L, Lassiass P. Anatomie de la rétine [Anatomy of the retina]. *Med Sci (Paris).* 2020;36(6-7):594–9. fre. doi:10.1051/medsci/2020094 Cited in: PubMed; PMID 32614310.

84. Braunger BM, Demmer C, Tamm ER. Programmed cell death during retinal development of the mouse eye. *Adv Exp Med Biol.* 2014;8019–13. doi:10.1007/978-1-4614-3209-8_2 Cited in: PubMed; PMID 24664675.
85. Reiner A, Fitzgerald MEC, Del Mar N, Li C. Neural control of choroidal blood flow. *Prog Retin Eye Res.* 2018;6496–130. doi:10.1016/j.preteyeres.2017.12.001 Cited in: PubMed; PMID 29229444.
86. Marneros AG, Fan J, Yokoyama Y, Gerber HP, Ferrara N, Crouch RK, Olsen BR. Vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium is essential for choriocapillaris development and visual function. *Am J Pathol.* 2005;167(5):1451–9. doi:10.1016/S0002-9440(10)61231-X Cited in: PubMed; PMID 16251428.
87. Young RW. Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J Comp Neurol.* 1984;229(3):362–73. doi:10.1002/cne.902290307 Cited in: PubMed; PMID 6501608.
88. Kim I, Ryan AM, Rohan R, Amano S, Aguilar S, Miller JW, Adamis AP. Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40(9):2115–21. Cited in: PubMed; PMID 10440268.
89. Fu S, Dong S, Zhu M, Sherry DM, Wang C, You Z, Haigh JJ, Le Y-Z. Müller Glia Are a Major Cellular Source of Survival Signals for Retinal Neurons in Diabetes. *Diabetes.* 2015;64(10):3554–63. doi:10.2337/db15-0180 Cited in: PubMed; PMID 26068541.
90. Bringmann A, Reichenbach A. Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci.* 2001;6E72-92. doi:10.2741/bringman Cited in: PubMed; PMID 11578954.
91. Kaur C, Sivakumar V, Yong Z, Lu J, Foulds WS, Ling EA. Blood-retinal barrier disruption and ultrastructural changes in the hypoxic retina in adult rats: the beneficial effect of melatonin administration. *J Pathol.* 2007;212(4):429–39. doi:10.1002/path.2195 Cited in: PubMed; PMID 17582234.
92. Kim IB, Kim KY, Joo CK, Lee MY, Oh SJ, Chung JW, Chun MH. Reaction of Müller cells after increased intraocular pressure in the rat retina. *Exp Brain Res.* 1998;121(4):419–24. doi:10.1007/s002210050476 Cited in: PubMed; PMID 9746148.
93. Lewis GP, Fisher SK. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol.* 2003;230:263–90. doi:10.1016/s0074-7696(03)30005-1 Cited in: PubMed; PMID 14692684.
94. Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem.* 2004;89(5):1092–100. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02420.x Cited in: PubMed; PMID 15147501.

95. Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Osborne NN, Reichenbach A. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res.* 2009;28(6):423–51. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.07.001 Cited in: PubMed; PMID 19660572.
96. García M, Vecino E. Role of Müller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. *Histol Histopathol.* 2003;18(4):1205–18. doi:10.14670/HH-18.1205 Cited in: PubMed; PMID 12973689.
97. Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist.* 2005;11(5):400–7. doi:10.1177/1073858405278321 Cited in: PubMed; PMID 16151042.
98. Bringmann A, Reichenbach A, Wiedemann P. Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res.* 2004;36(5):241–9. doi:10.1159/000081203 Cited in: PubMed; PMID 15583429.
99. Yang XM, Yafai Y, Wiedemann P, Kuhrt H, Wang Y-S, Reichenbach A, Eichler W. Hypoxia-induced upregulation of pigment epithelium-derived factor by retinal glial (Müller) cells. *J Neurosci Res.* 2012;90(1):257–66. doi:10.1002/jnr.22732 Cited in: PubMed; PMID 21922517.
100. Silverman SM, Wong WT. Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. *Annu Rev Vis Sci.* 2018;445–77. doi:10.1146/annurev-vision-091517-034425 Cited in: PubMed; PMID 29852094.
101. Yao H, Wang T, Deng J, Liu D, Li X, Deng J. The development of blood-retinal barrier during the interaction of astrocytes with vascular wall cells. *Neural Regen Res.* 2014;9(10):1047–54. doi:10.4103/1673-5374.133169 Cited in: PubMed; PMID 25206758.
102. Duan L-J, Pan SJ, Sato TN, Fong G-H. Retinal Angiogenesis Regulates Astrocytic Differentiation in Neonatal Mouse Retinas by Oxygen Dependent Mechanisms. *Sci Rep.* 2017;7(1):17608. doi:10.1038/s41598-017-17962-2 Cited in: PubMed; PMID 29242645.
103. Mani N, Khaibullina A, Krum JM, Rosenstein JM. Astrocyte growth effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) application to perinatal neocortical explants: receptor mediation and signal transduction pathways. *Exp Neurol.* 2005;192(2):394–406. doi:10.1016/j.expneurol.2004.12.022 Cited in: PubMed; PMID 15755557.
104. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2006;39(5):469–78. doi:10.5483/bmbrep.2006.39.5.469 Cited in: PubMed; PMID 17002866.

105. Ritter MR, Aguilar E, Banin E, Schepcke L, Uusitalo-Jarvinen H, Friedlander M. Three-dimensional in vivo imaging of the mouse intraocular vasculature during development and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(9):3021–6. doi:10.1167/iovs.05-0153 Cited in: PubMed; PMID 16123396.
106. Lee J, Pelis RM. Drug Transport by the Blood-Aqueous Humor Barrier of the Eye. *Drug Metab Dispos.* 2016;44(10):1675–81. doi:10.1124/dmd.116.069369 Cited in: PubMed; PMID 26895982.
107. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Chatzistefanou K, Ferrara N, Adamis AP. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol.* 1996;114(8):964–70. doi:10.1001/archopht.1996.01100140172010 Cited in: PubMed; PMID 8694732.
108. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, Smith LE. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(23):10457–61. doi:10.1073/pnas.92.23.10457 Cited in: PubMed; PMID 7479819.
109. Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, Gragoudas ES, Ferrara N, Folkman J, D'Amore PA, Miller JW. Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol.* 1996;114(1):66–71. doi:10.1001/archopht.1996.01100130062010 Cited in: PubMed; PMID 8540853.
110. Gartner S, Henkind P. Neovascularization of the iris (rubeosis iridis). *Surv Ophthalmol.* 1978;22(5):291–312. doi:10.1016/0039-6257(78)90175-3 Cited in: PubMed; PMID 349748.
111. Miller JW, Adamis AP, Shima DT, D'Amore PA, Moulton RS, O'Reilly MS, Folkman J, Dvorak HF, Brown LF, Berse B. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol.* 1994;145(3):574–84. Cited in: PubMed; PMID 7521577.
112. Shima DT, Gougos A, Miller JW, Tolentino M, Robinson G, Adamis AP, D'Amore PA. Cloning and mRNA expression of vascular endothelial growth factor in ischemic retinas of *Macaca fascicularis*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37(7):1334–40. Cited in: PubMed; PMID 8641836.
113. Witmer AN, van Blijswijk BC, van Noorden CJF, Vrensen GFJM, Schlingemann RO. In vivo angiogenic phenotype of endothelial cells and pericytes induced by vascular endo-

- thelial growth factor-A. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(1):39–52.
doi:10.1177/002215540405200105 Cited in: PubMed; PMID 14688216.
114. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem.* 2013;153(1):13–9. doi:10.1093/jb/mvs136 Cited in: PubMed; PMID 23172303.
115. Witmer AN, van Blijswijk BC, Dai J, Hofman P, Partanen TA, Vrensen GF, Schlingemann RO. VEGFR-3 in adult angiogenesis. *J Pathol.* 2001;195(4):490–7. doi:10.1002/path.969 Cited in: PubMed; PMID 11745682.
116. Komarova Y, Malik AB. Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:463–93. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135833 Cited in: PubMed; PMID 20148685.
117. Minshall RD, Malik AB. Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(176 Pt 1):107–44. doi:10.1007/3-540-32967-6_4 Cited in: PubMed; PMID 16999218.
118. Uemura A, Fruttiger M, D'Amore PA, Falco S de, Jousseaume AM, Sennlaub F, Brunck LR, Johnson KT, Lambrou GN, Rittenhouse KD, Langmann T. VEGFR1 signaling in retinal angiogenesis and microinflammation. *Prog Retin Eye Res.* 2021;84:100954. doi:10.1016/j.preteyeres.2021.100954 Cited in: PubMed; PMID 33640465.
119. Freddo TF. A contemporary concept of the blood-aqueous barrier. *Prog Retin Eye Res.* 2013;32:181–95. doi:10.1016/j.preteyeres.2012.10.004 Cited in: PubMed; PMID 23128417.
120. Kim SA, Kim SJ, Choi YA, Yoon H-J, Kim A, Lee J. Retinal VEGFA maintains the ultrastructure and function of choriocapillaris by preserving the endothelial PLVAP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;522(1):240–6. doi:10.1016/j.bbrc.2019.11.085 Cited in: PubMed; PMID 31759628.
121. 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. doi:10.1006/dbio.2002.0597 Cited in: PubMed; PMID 11944939.

7 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ernst Tamm bedanken, der mir die Durchführung dieses Projekts an seinem Lehrstuhl ermöglicht hat und mir mit wertvollen Ratschlägen und seiner ständigen Diskussionsbereitschaft stets unterstützend zur Seite stand.

Ferner bedanke ich mich von ganzem Herzen bei Frau Prof. Dr. Dr. Barbara Braunger für die Vergabe meines, mich sehr begeisternden, Promotionsthemas und die Übernahme des Erstgutachtens meiner Arbeit. Sie hat mich in ihre Arbeitsgruppe von Anfang an sehr herzlich aufgenommen und mir nicht nur den Zugang zur Wissenschaft ermöglicht, sondern auch meine Begeisterung für die Grundlagenforschung entfacht. Für die hervorragende Betreuung möchte ich mich ganz besonders bedanken! Barbara, Du standest mir während der gesamten Zeit immer hilfsbereit zur Seite, ich habe unglaublich viel von Dir gelernt und die Zusammenarbeit mit Dir hat mir sehr viel Spaß gemacht - vielen lieben Dank dafür!

Ebenso möchte ich Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner ganz herzlich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Humananatomie und Embryologie bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die lockere Arbeitsatmosphäre und die vielen gemeinsamen Stunden im Labor. So gilt mein Dank besonders Dr. Sabrina Schmitt, Dr. Anja Schlecht, Dr. Franziska Frömel und Christina Bielmeier für all die verbrachten schönen gemeinsamen Stunden. Ihr habt mich - trotz meines medizinischen Hintergrundes - in Euer biologisches Reich aufgenommen, meine Arbeit immerzu respektiert, seid mir eine große Hilfe und Unterstützung gewesen und habt den Laboralltag jeden Tag aufs Neue bereichert. Auch möchte ich mich bei Angelika Pach, Elke Stauber, Margit Schimmel und Silvia Babl für die ausgezeichnete Anleitung und tatkräftige technische Unterstützung bei anfallenden Arbeiten im Bereich der Molekularbiologie und Histologie bedanken.

Ganz besonders möchte ich Dr. Andrea Dillinger danken, die mir durch unsere gemeinsame Laborzeit zu einer guten Freundin wurde. Andrea, ich danke Dir für die unvergesslichen gemeinsamen Stunden im Labor aber auch außerhalb des Labors, für die lustige und bereichernde Zeit unserer gemeinsamen Experimente, Deine kreativen Ideen, Deine uneinge-

Danksagung

schränkte Kollegialität und natürlich ganz besonders für Deine Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Dissertation. Du hast mich die ganze Zeit über motiviert, standest mir mit konstruktiven Ratschlägen zur Seite und warst immer für eine fachliche Diskussion zu begeistern. Ich danke Dir von ganzem Herzen Andrea, dass Du mir auf persönlicher Ebene aber auch mit Deiner ausgezeichneten fachlichen Expertise beratend zur Seite standest. Ich hatte dadurch eine super schöne Zeit und habe sehr viel von Dir gelernt!

Ein besonderer Dank gilt meinen beiden ehemaligen Kommilitoninnen Nikola Weiß und Dr. Patricia Berber. Sie beide haben das gesamte Studium über bis zum heutigen Tag mit mir gute, aber auch anstrengende Zeiten verbracht und sind mir zu den treuesten Freundinnen geworden. Ihr seid in den letzten Jahren ein nicht mehr wegzudenkender Teil meines Lebens geworden und ich bin stolz, solch tolle Freundinnen zu haben. Nikola, ich danke Dir für die unzähligen gemeinsamen, lustigen Stunden im Labor, am Mikroskop und im Tierstall, für die beste Zusammenarbeit die man sich nur vorstellen kann, Deine stets gute Laune und Deine Gelassenheit, wenn etwas nicht nach Plan verlief. Patricia, ich kann Dir mit Worten gar nicht genug danken für Deine Unterstützung bei der schriftlichen Ausarbeitung meiner Dissertation, für Deine immerzu motivierenden Worte, Dein unfassbar hilfreiches fachliches Feedback und Deine unerschöpfliche Hilfsbereitschaft. Du warst mir die ganze Zeit über ein großes Vorbild und hast mich so bei der Fertigstellung dieser Arbeit immens angespornt. Diesen Freundschaftsdienst werde ich Dir niemals vergessen! Tausend Dank!

Auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern möchte ich großen Dank aussprechen, die mir mein Studium und auch meine Promotion ermöglichten. Meinem Mann Markus möchte ich an dieser Stelle einen ganz besonderen Dank widmen. Markus, Du hast mich bei meinem Vorhaben stets unterstützt, mich aufgeheitert, mir immerzu den Rücken frei gehalten und die vielen arbeitsintensiven Wochenenden im Labor respektiert. Auch hast du mir in den Endzügen der Fertigstellung meiner Dissertation durch die Betreuung unserer Tochter die nötigen zeitlichen Kapazitäten geschaffen und so maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss der Arbeit beigetragen. Vor allem aber hast Du die ganze Zeit über an mich geglaubt und warst mir dadurch die allergrößte Stütze.

Zuletzt möchte ich noch meinen Freunden danken, die sich bereit erklärten, einen Teil oder aber sogar die ganze Dissertation Korrektur zu lesen und mir somit geholfen haben, hoffentlich auch den letzten Tippfehler zu entfernen. Dankeschön an Euch alle!

8 ERTEILUNG VON BILDRECHTEN

Für die erteilte Genehmigung zur Verwendung von Bildmaterialien in meiner Dissertation möchte ich mich bedanken bei:

- **International Journal of Developmental Biology** - Saint-Geniez M, D'Amore PA. Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol.* 2004;48(8-9):1045–58. doi:10.1387/ijdb.041895ms Cited in: PubMed; PMID 15558494.

Permission to reproduce image for a thesis

International Journal of Developmental Biology [ijdb@ehu.eus]

Sie haben am 25.02.2022 10:28 geantwortet.

Gesendet: Do 24.02.2022 16:17

An: anita.grundl@web.de

Dear Anita Grundl,

Thank you very much for your mail asking for permission to reproduce Figure 2 from the article by M. Saint-Geniez and P. A. D'Amore in *The International Journal of Developmental Biology* 48: 1045-1058. <https://doi.org/10.1387/ijdb.10.1387/ijdb.041895ms>

We appreciate your attention and grant you our non-exclusive permission to reproduce the referred material in your doctoral thesis. We require that you give full credit of the sources and make the corresponding statement in the acknowledgements section.

We would suggest that you also ask the authors for permission at the address specified in the article and would be very obliged to receive, if possible, a copy of your publication for our files.

Please receive our kindest regards,

Juan Luis Vidaurrazaga

Editorial Office
The International Journal of Developmental Biology
www.intjdevbiol.com

Tel: +34-94-601-2874

Fax: +34-94-601-3266

e-mail: ijdb@ehu.eus

Library Building, 6th floor, 6A 7.1
University of the Basque Country
E-48940 Leioa (Vizcaya),
Spain

Erteilung von Bildrechten

Re: Request for permission to use one of your illustrations for my dissertation

D'Amore, Patricia [patricia_damore@meei.harvard.edu]

Sie haben am 28.02.2022 09:04 geantwortet.

Gesendet: Fr 25.02.2022 18:41

An: Anita Grundl

Hi Anita-

Thank you for asking. Of course you may use this figure.

All the best with finishing up your thesis.

Best

Pat

Patricia A. D'Amore, PhD, MBA

Charles L. Schepens Professor of Ophthalmology (Pathology)
Harvard Medical School

Associate Chief of Basic & Translational Science, Mass. Eye and Ear

Vice Chair of Basic and Translational Research, Department of Ophthalmology

Schepens Eye Research Institute - Mass. Eye and Ear
20 Staniford Street
Boston, MA 02114

617-912-2559

patricia_damore@meei.harvard.edu

<http://www.schepens.harvard.edu/damore>

- **Development at a glance, published by The Company of Biologists** - Karaman S, Leppänen V-M, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. *Development*. 2018;145(14). doi:10.1242/dev.151019 Cited in: PubMed; PMID 30030240.

RE: Paper: "Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease" Karaman et al., 2018

permissions [permissions@biologists.com]

Gesendet: Do 03.03.2022 17:56

An: Anita Grundl

Cc: permissions

Dear Anita,

Thank you for your request. Permission is granted without charge, for use in a medical dissertation only.

The acknowledgement is very important and should state "reproduced/adapted with permission" and give the source journal name - the acknowledgement should either provide full citation details or refer to the relevant citation in the article reference list - the full citation details should include authors, journal, year, volume, issue, and page citation.

Where appearing online or in other electronic media, a link should be provided to the original article (e.g. via DOI).

Development: <https://journals.biologists.com/dev>

We wish you the best of luck with your dissertation.

Kind regards,

Alice

Alice Baker

Sales & Customer Service Administrator

The Company of Biologists

Bidder Building, Station Road, Histon, Cambridge, CB24 9LF, UK

T: +44 (0) 1223 632 850 | subscriptions@biologists.com | www.biologists.com

Erteilung von Bildrechten

- **Investigative Ophthalmology & Visual Science, ARVO Journals** - Dorrell MI, Aguilar E, Friedlander M. Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(11):3500–10. Cited in: PubMed; PMID 12407162.

•

RE: Permission to reproduce image for a thesis

Debbie Chin [dchin@arvo.org]

Gesendet: Do 14.04.2022 20:22

An: Anita Grundl

Dear Anita Grundl,

Thank you for your email. Permission is hereby granted to reprint the following figure in your medical dissertation:

Figure 1 from Dorrell MI, Aguilar E, Friedlander M. Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:3500-3510.

A reprint of this material must include a full article citation and acknowledge ARVO as the copyright holder.

Best regards,

Debbie Chin
ARVO Journals
5515 Security Lane, Suite 500
Rockville, MD 20852-5007
+1.240.221.2926



- **Dr. med. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg**

Regensburg, 19.04.2022

Hiermit gewähre ich, Patricia Berber, Anita Grundl das Recht, meine Abbildung der schematischen Darstellung des Auges in ihrer medizinischen Dissertation zu verwenden und gegebenenfalls zu modifizieren.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'P. Berber', written over a horizontal line.

Dr. med. Patricia Berber

9 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, _____

Anita Maria Grundl