

**Auswirkungen einer 14-tägigen postnatalen Hyperoxie (85 % O<sub>2</sub>) auf  
die Retina und ihr Gefäßsystem in Wildtyp- und iNOS-KO-Mäusen im  
Vergleich zur Normoxie**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Schulze zur Wiesch, Cosima Philine  
aus Hamburg

Gießen, 2025

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
AG Experimentelle Ophthalmologie

Gutachter: Prof. Dr. Dr. K. Stieger

Gutachterin: PD Dr. B. Ahlemeyer

Tag der Disputation: 12.11.25

Für meinen Vater

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Aufbau des Wirbeltierauges .....	1
1.2	Aufbau der Retina .....	2
1.3	Gefäßversorgung der Retina.....	3
1.3.1	Pränatales Gefäßsystem des Auges und seine Regression.....	4
1.3.2	Aufgaben der Gliazellen während der Angiogenese .....	5
1.3.3	Sprießende Angiogenese innerhalb der Retina .....	9
1.3.4	Entwicklung der retinalen Gefäßplexus.....	10
1.4	Krankheiten ausgelöst durch Veränderungen der Sauerstoffkonzentration .....	12
1.4.1	Hyper- und Hypoxie im Auge – Die Frühgeborenen-Retinopathie.....	12
1.4.2	Hyperoxie in der Lunge – Die bronchopulmonale Dysplasie.....	13
1.5	iNOS und seine Auswirkungen auf pathologische Prozesse.....	14
1.5.1	Induzierbare NO-Synthase .....	14
1.5.2	Effekte durch Defizienz / Inhibition von iNOS .....	15
1.6	Hyperoxie – Tiermodelle .....	16
1.6.1	OIR – Modell.....	16
1.6.2	BPD – Modell .....	17
1.7	Zielsetzung der Arbeit .....	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1	Material .....	19
2.1.1	Verbrauchslösungen und Chemikalien.....	19
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	20
2.1.3	Puffer und Lösungen .....	21
2.1.4	Weitere eingesetzte Puffer .....	22
2.1.5	Kit-Systeme.....	22
2.1.6	Marker und Enzyme .....	22
2.1.7	Primer.....	22
2.1.8	Primärantikörper und Lektine .....	23
2.1.9	Sekundärantikörper.....	23
2.1.10	Geräteliste.....	24
2.1.11	Softwareapplikationen.....	25
2.2	Methoden .....	26

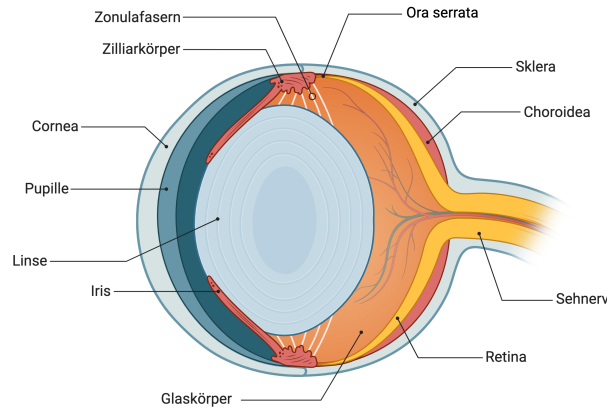
2.2.1	Externe Arbeit .....	26
2.2.2	Eigene Arbeit .....	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
3.1	Reverse Transkriptase-PCR zum Nachweis der Expression von iNOS in der Retina	45
3.2	Astrozyten in der Retina – GFAP-Expression in Wt- und iNOS-KO-Mäusen nach Haltung bei unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen .....	46
3.2.1	GFAP-Expression der Astrozyten in der Retina von Wt- und iNOS-KO-Mäusen nach Haltung in 21 % O <sub>2</sub> .....	47
3.2.2	GFAP-Expression der Astrozyten in der Retina von Wt- und iNOS-KO-Mäusen nach Haltung in 85 % O <sub>2</sub> .....	50
3.3	Retinale Angiogenese der Wildtyp- und iNOS-KO-Mäuse aus Normoxie (21 % O <sub>2</sub> ) und Hyperoxie (85 % O <sub>2</sub> ) .....	53
3.3.1	Gefäßentwicklung in der Retina nach Haltung in Normoxie .....	55
3.3.2	Gefäßentwicklung in der Retina nach Haltung in Hyperoxie .....	63
3.4	α-SMA-Expression in den retinalen Gefäßen bei Wt- und iNOS-KO-Mäusen aus Normoxie (21 % O <sub>2</sub> ) .....	67
3.5	Überreste des embryonalen Gefäßsystems – Hyaloidale Gefäße .....	71
3.6	Mikrogliazellen in der Retina von Wildtyp- und iNOS-KO-Mäusen aus Normoxie (21 % O <sub>2</sub> ) und Hyperoxie (85 % O <sub>2</sub> ) .....	78
3.6.1	Expression von Iba1 .....	78
3.6.2	Zählung der Mikrogliazellen .....	84
3.7	Messungen von Gesamtretina-, ONL- und INL-Dicke .....	85
3.7.1	Dickenmessung der gesamten Retina .....	85
3.7.2	Dickenmessung der ONL .....	87
3.7.3	Dickenmessung der INL .....	88
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>89</b>
4.1	Einfluss der Hyperoxie auf die retinale Angiogenese während P0-P14 bei Wt- und iNOS-KO-Mäusen .....	89
4.2	Astrozyten nach Normoxie und Hyperoxie bei Wt und iNOS-KO-Mäusen an P14 ..	90
4.3	Persistenz der hyaloidalen Gefäßstruktur bei Tieren aus hyperoxischen Haltungsbedingungen .....	94
4.4	Dickenunterschiede der Netzhautschichten .....	98

4.5	Ausblick auf die Regenerationsphase der Versuchstiere nach Haltung im BPD-Hyperoxie-Modell.....	102
5	Zusammenfassung.....	106
6	Summary .....	108
7	Abkürzungsverzeichnis .....	110
8	Abbildungsverzeichnis .....	113
9	Tabellenverzeichnis .....	116
10	Literaturverzeichnis .....	118
11	Publikationsverzeichnis .....	127
12	Ehrenwörtliche Erklärung.....	128
13	Danksagung.....	129

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau des Wirbeltierauges

Zum Schutz liegt der Augapfel zusammen mit dem optischen Nerv, den extraokularen Muskeln und der Tränendrüse in der knöchernen Orbitahöhle. Die drei äußeren Muskelpaare setzen außen am *Bulbus oculi* an und ermöglichen so dessen Bewegung (Schünke *et al.*, 2022). Der dreischichtige Wandaufbau des Auges gliedert sich in die äußere, mittlere und innere Augenhaut. Diese Unterteilung basiert auf der Embryonalentwicklung. Überwiegend mesenchymalen Ursprungs sind die äußere sowie die mittlere Augenhaut. Im Gegensatz dazu geht die innere Augenhaut aus dem Neuroektoderm hervor (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019). Die weiße, primär aus Bindegewebe bestehende Sklera bildet im hinteren Abschnitt die äußere Augenhaut und hat eine protektive Funktion. Anterior besteht die äußere Augenhaut aus der durchsichtigen Cornea. Die mittlere Augenhaut, auch als Uvea bezeichnet, umfasst im vorderen Anteil die pigmentierte Iris mit der Pupille als zentraler Öffnung sowie den Ziliarkörper. Dessen Ziliarepithel sezerniert das Kammerwasser, während der M. ciliaris für die Akkommodation des Auges verantwortlich ist. Seine Zonulafasern bilden zusätzlich noch die Aufhängung der Linse. Den hinteren Anteil der Uvea bildet die gefäßreiche Choroidea. Sie liegt zwischen der Sklera und Retina und versorgt die Photorezeptoren. Die Retina stellt die innerste Haut des Augapfels dar und zeichnet sich durch einen komplexen Aufbau aus. Ihre Funktion besteht in der visuellen Wahrnehmung der Außenwelt. Innerhalb des *Bulbus oculi* befinden sich die Linse und der Glaskörper. Bezogen auf das gesamte Auge ist die Linse der Maus deutlich größer als die des Menschen. Außerdem ist die Mäuselinse eher rund als bikonvex (Abb. 1). Der Glaskörper ist eine zähe Substanz, die zu 99 % aus Wasser, aber auch aus Kollagen und gelöstem Hyaluron besteht und sich zwischen der Netzhaut und der Linse befindet, um die Form des Augapfels zu stabilisieren. Während die das Licht brechenden Strukturen Cornea, Linse, Glaskörper, Kammerwasser vorne im Auge liegen, bildet die im hinteren Abschnitt des Auges gelegene Retina den lichtempfindlichen, sensorischen Teil (Zeiss *et al.*, 2018; Grehn, 2019; Lüllmann-Rauch und Asan, 2019; Schünke *et al.*, 2022).



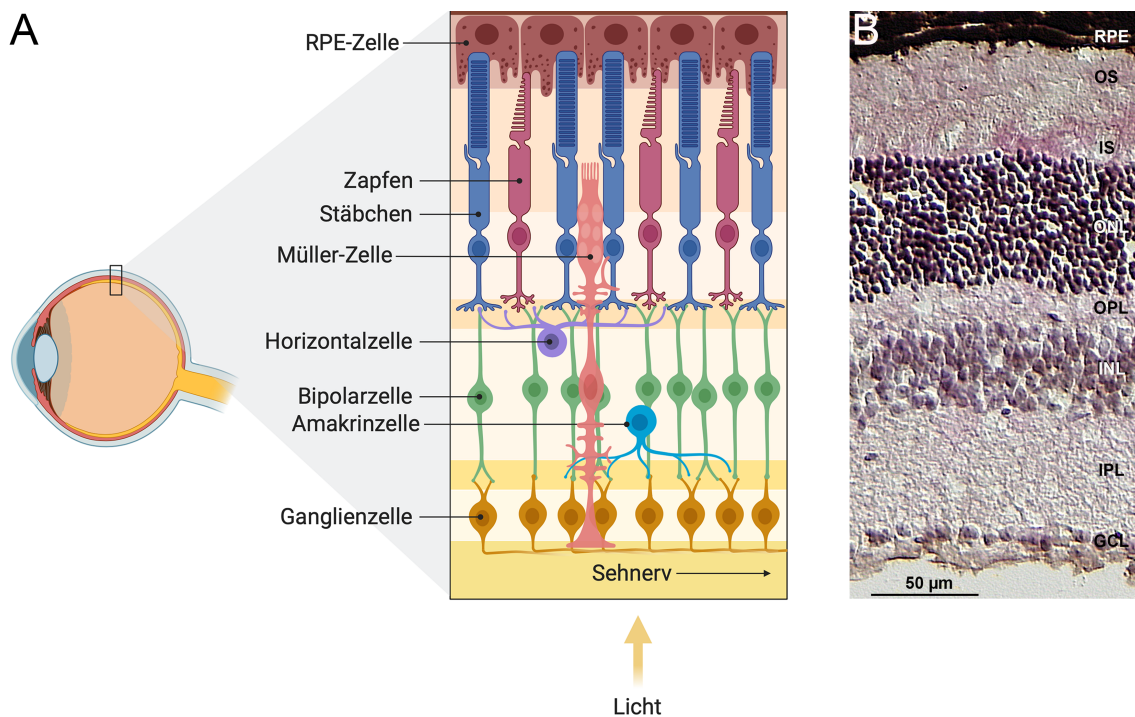
**Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Mäuseauges im Querschnitt**  
(Erstellt mit BioRender.com)

## 1.2 Aufbau der Retina

Die Netzhaut lässt sich in die *Pars optica* und in die *Pars caeca* unterteilen. Die *Pars caeca* besteht nur aus Pigmentepithel und ist unempfindlich auf Licht. Sie bedeckt die Rückfläche der Iris und des Ziliarkörpers und liegt somit im vorderen Augenabschnitt. Die *Ora serrata* bildet die Grenze zur *Pars optica*, die den posterioren Teil der Retina ausmacht und lichtempfindlich ist (Schünke *et al.*, 2022). Unter dem Begriff Retina versteht sich in dieser Arbeit die sensorische *Pars optica* der Netzhaut.

Die Aufgabe der Retina ist es, Lichtstimuli in elektrische Impulse umzuwandeln und diese dann über den Sehnerv zum Gehirn weiterzuleiten. Insgesamt lässt sich die Retina in zehn verschiedene Schichten einteilen (Abb. 2). Die äußerste, an die Choroidea angrenzende Schicht ist das *Stratum pigmentosum (retinal pigment epithelium, RPE)*, welches aus einschichtigem Pigmentepithel besteht. Es folgt das *Stratum neuroepitheliale*, wo nur die Fortsätze der Photorezeptoren liegen. Es gibt zwei Arten von Photorezeptoren, die Stäbchen und die Zapfen. Stäbchen sind am empfindlichsten für Licht und dienen dem Nachtsehen. Die Zapfen dagegen sind für das Sehen bei Tageslicht und das Farbsehen zuständig. In dieser Schicht befinden sich zunächst die Außensegmente (*outer segments, OS*) und weiter innen die Innensegmente (*inner segments, IS*) der Photorezeptoren. Es folgt die äußere Grenzschicht (*outer limiting membrane, OLM*), wo die glialen Müller-Zellen mit den Photorezeptoren in Kontakt stehen. In der nächsten Schicht, der äußeren Körnerschicht (*outer nuclear layer, ONL*) befinden sich dann die Perikaryen der Photorezeptoren, die das erste Neuron der Sehbahn bilden. An die ONL schließt sich die äußere plexiforme Schicht (*outer plexiform layer, OPL*) an. Hier befinden sich die Synapsen zwischen den Fortsätzen der ersten beiden Neurone sowie die Synapsen zu den Horizontalzellen. Das zweite Neuron, also die Perikaryen der Bipolarzellen, befinden sich neben den Somata von Amakrin-, Horizontal- und Müller-Zellen in der inneren Körnerschicht (*inner nuclear layer, INL*).

Synapsen zwischen den Dendriten des zweiten und dritten Neurons liegen in der inneren plexiformen Schicht (*inner plexiform layer*, IPL). Das dritte Neuron der Sehbahn, wird von den Perikaryen der Ganglienzellen gebildet, sie liegen in der Ganglienzellschicht (*ganglion cell layer*, GCL). Die Axone der Ganglienzellen, welche zusammen den N. opticus (Sehnerv) bilden, befinden sich in der Nervenfaserschicht (*nerve fiber layer*, NFL). Die letzte Schicht ist die innere Grenzschicht (*inner limiting membrane*, ILM), sie enthält die Endfüßchen der Müller-Zellen und bildet die abgrenzende Basallamina aus (Zeiss *et al.*, 2018; Lüllmann-Rauch und Asan, 2019; Schünke *et al.*, 2022; Mahabadi und Al Khalili, 2024).



**Abbildung 2: Aufbau der Retina**

**A:** Schematische Darstellung der Hauptzelltypen der Wirbeltierretina. (Erstellt mit BioRender.com)

**B:** Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Mause retina-Schnittes. Der Balken entspricht 50 µm. RPE = Retinales Pigmentepithel, OS = Außensegmente der Photorezeptoren, IS = Innensegmente der Photorezeptoren, ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglienzellschicht. (Mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt von Dr. Brigitte Müller)

### 1.3 Gefäßversorgung der Retina

Bei Wirbeltieren ist die Gefäßversorgung der Netzhaut zweigeteilt. Die äußeren retinalen Schichten werden über die *Lamina choriocapillaris* versorgt, sie ist die innerste Schicht der Choroidea. Die inneren Schichten der Netzhaut, einschließlich der INL, werden dagegen von der A. centralis retinae versorgt, welche über den Sehnerv eintritt. Das Blut entspringt in beiden Fällen der A. ophthalmica aus der A. carotis interna. Das sauerstoffarme Blut fließt parallel zu den Arterien über Netzhautvenolen ab und gelangt

über die V. ophthalmica superior und inferior zum Sinus cavernosus (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019; Schünke *et al.*, 2022).

Während der Mensch bereits mit einem ausgereiften retinalen Gefäßsystem geboren wird, findet bei der Maus der Übergang von der embryonalen Gefäßversorgung des Auges zu einem ausgereiften inneren retinalen Gefäßnetz erst ab der Geburt statt (Fruttiger, 2007; Stahl *et al.*, 2010).

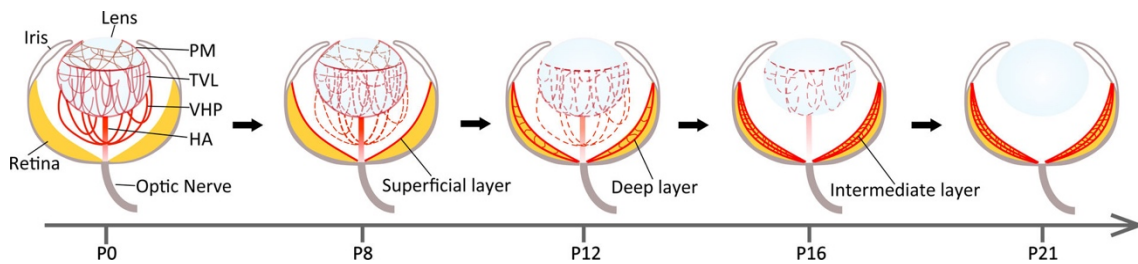
### 1.3.1 Pränatales Gefäßsystem des Auges und seine Regression

Neben der Choroidea und dem retinalen Gefäßsystem lässt sich auch das embryonale Gefäßnetz aus hyaloidalen Gefäßen und der Pupillarmembran (PM) als ein Gefäßsystem des Auges differenzieren. Es stellt die erste funktionierende Blutversorgung der Linse, des primären Glaskörpers und der Netzhaut während der Embryonalentwicklung dar (Lutty und McLeod, 2018; Wang *et al.*, 2019). Das Gefäßnetzwerk ist rein arteriell und liegt innerhalb des Glaskörpers (Fruttiger, 2007).

Die Vaskularisation beginnt mit dem Eintritt der A. hyaloidea (*hyaloid artery*, HA) in den Augenbecher, hier zweigen sich die Vasa hyaloidea propria (VHP) ab und ziehen durch den Glaskörper in Richtung Linse, wo die Tunica vasculosa lentis (TVL) ein dichtes Netz aus Kapillaren um die Linsenrückseite ausbildet. Es kommt zur Anastomose mit Gefäßen der Pupillarmembran, sodass auch anterior der Linse ein Gefäßnetz entsteht. Außerdem bilden sich hier Verbindungen zur Choroidea aus, dadurch können die Aderhautvenen für den venösen Abfluss des hyaloidalen Gefäßnetzwerkes genutzt werden (Saint-Geniez und D'Amore, 2004; Anand-Apte und Hollyfield, 2010; Wang *et al.*, 2019)

Im menschlichen Embryo ist dieses Gefäßsystem in der neunten Schwangerschaftswoche fertig ausgereift, die Rückbildung beginnt dann zeitgleich mit der Angiogenese der Retina. Zum Zeitpunkt der Geburt ist das hyaloidale Gefäßsystem dann verschwunden. Im Gegensatz dazu werden Mäuse mit einer noch avaskulären Retina geboren, die Entwicklung des retinalen Gefäßsystems und die Rückbildung des hyaloidalen Gefäßsystems erfolgt erst postnatal (Abb. 3.) (Wang *et al.*, 2019).

Die Regression der Gefäße beginnt am postnatalen Tag (P) 4, zwischen P10-12 ist die PM als erste Struktur bereits abgebaut. Bei der VHP und TVL kommt es bereits zwischen P4-P8 zu einer rapiden Abnahme ihrer Strukturen. Vollendet ist die Regression der VHP dann zwischen P12-16, einige wenige Gefäße der TVL sind zu diesem Zeitpunkt weiterhin im Glaskörper aufzufinden. Nach 21 Tagen ist der Abbau des gesamten Netzwerkes dann weitgehend abgeschlossen (Ito und Yoshioka, 1999). Diese Rückbildung des hyaloidalen Gefäßsystems und der Pupillarmembran ist vor allem auf eine veränderte Blutflussverteilung (Bischoff *et al.*, 1983) sowie auf einen Makrophagen-vermittelten Umbau zurückzuführen (Lang und Bishop, 1993).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der entwicklungsbedingten Rückbildung des embryonalen Gefäßsystems im Auge der Maus**

Die hyaloidalen Gefäße nehmen bei der Geburt den größten Teil des Raumes zwischen Linse und unreifer Retina ein. Die Rückbildung des embryonalen Gefäßsystems beginnt um P4 mit der PM. Ab P8 bilden sich PM, VHP und TVL parallel zur beginnenden retinalen Angiogenese kontinuierlich zurück. Um P12 ist die PM bereits abgebaut, um P16 auch die VHP, von der TVL sind nur noch wenige Gefäßreste vorhanden. Mit P21 ist die Rückbildung des hyaloidalen Gefäßsystems weitgehend abgeschlossen und das retinale Gefäßsystem vollständig ausgereift.

Die gestrichelten roten Linien stellen die sich zurückbildenden hyaloidalen Gefäße dar. PM = Pupillarmembran, TVL = Tunica vasculosa lentis, VHP = Vasa hyaloidea propria, HA = A. hyaloidea. (Wang *et al.*, 2019 © 2019 Originally published in Journal of Visualized Experiments, JoVE Reprint Permission)

### 1.3.2 Aufgaben der Gliazellen während der Angiogenese

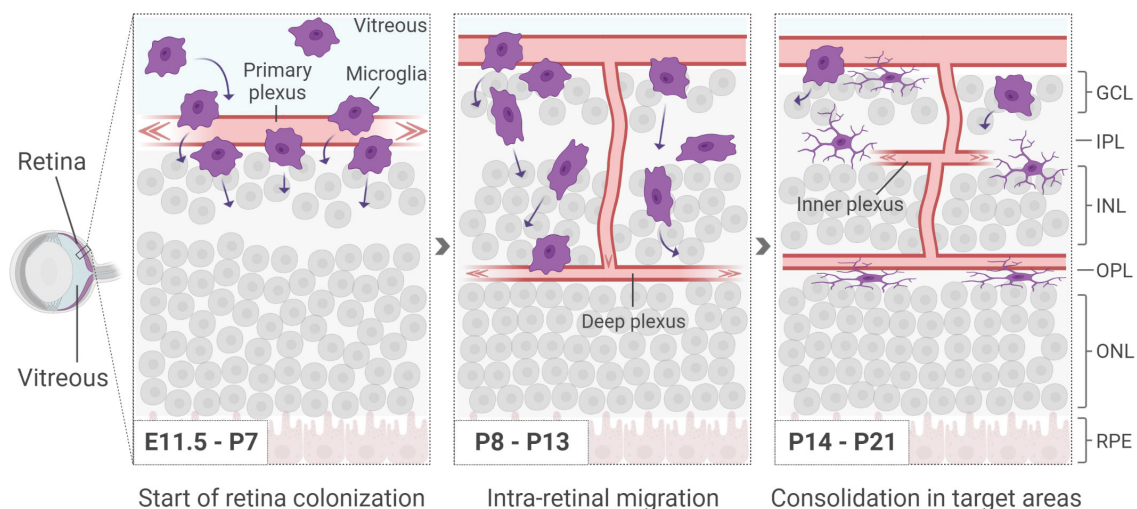
Die physiologische Entwicklung der retinalen Gefäße wird unter anderem durch die Beteiligung von Gliazellen gewährleistet (Hu *et al.*, 2024). In der Netzhaut werden drei verschiedene Typen von Gliazellen unterschieden, Mikroglia und zwei Arten von Makrogliazellen, die Astrozyten und die Müller-Zellen (Reichenbach und Bringmann, 2020).

#### 1.3.2.1 Einwanderung und Funktion der Mikroglia

Mikroglia gelten als die ortsansässigen Makrophagen des zentralen Nervensystems und dienen der aktiven Immunabwehr (Guo *et al.*, 2022). Auch die neuronale Retina wird von diesen Zellen, nach ihrer Differenzierung, in zwei Phasen besiedelt. Die erste Phase erfolgt während der Embryonalentwicklung noch vor der retinalen Angiogenese und die zweite zum Zeitpunkt der Geburt, parallel zur Gefäßentwicklung in der Mäusenetzhaut (F. Li *et al.*, 2019). Ungefähr ab dem embryonalen Tag (E) 11,5 sind Mikroglia also bereits in der Retina von Nagetieren zu identifizieren (Abb. 4), sie wandern über die Ziliarmarginalzone oder die vitreoretinale Grenzfläche ein. Die Migration erfolgt zunächst tangential an der Grenze zur GCL, parallel der Lokalisation des primären Gefäßplexus der Retina. Postnatal findet dann eine radiale Zellwanderung in äußere Retinaschichten statt, zuerst wird die IPL besiedelt und zuletzt die OPL. Unter physiologischen Umständen werden in der ONL nie Mikroglia aufgefunden. Die Besiedlung der Mikroglia, die räumlich und zeitlich mit der vaskulären Entwicklung koordiniert ist, scheint diese Prozesse auch zu beeinflussen (Silverman und Wong, 2018).

Während der Zellmigration haben die Mikroglia eine amöboide Struktur und nehmen erst nach Erreichen ihrer endgültigen Position innerhalb der Retinaschichten eine ramifizierte

Form an (Murenu *et al.*, 2022). Generell werden strukturelle Veränderung dieser Gliazellen postnatal im Zusammenhang mit ihrem Funktionszustand interpretiert. Als „ruhend“ werden die ramifizierten Mikroglia mit ihren runden Somata und feinen verzweigten Fortsätzen bezeichnet, mit denen sie ihre Umgebung überwachen, um jederzeit auf pathologische Veränderungen reagieren zu können. Als Reaktion auf erhebliche Störungen verschwinden die Fortsätze der Zellen und die Zellkörper vergrößern sich. Diese amöboiden Mikroglia werden dann als „aktiv“ bezeichnet und können durch ihre angepasste Morphologie schnell an ihren Einsatzort gelangen (F. Li *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2022). In der gesunden Netzhaut werden mehrere Faktoren exprimiert, die für die Mikroglia ein Signal darstellen, im ramifizierten Zustand zu verbleiben. Erst wenn die Hämostase der Retina durch Degeneration oder Schädigung beeinträchtigt wird, kommt es zu einer Expressionsänderung dieser spezifischen Faktoren. Dies führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung der Mikroglia, die mit einer amöboiden Form und Migration einhergeht (Murenu *et al.*, 2022). Eine Aktivierung führt zur Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen oder Wachstumsfaktoren mit möglichen pathogenen Folgen. Als Phagozyten der Retina sind die aktivierten Mikroglia nämlich für die Beseitigung von Krankheitserregern oder Zelltrümmern zuständig (Guo *et al.*, 2022). Während der Entwicklung exprimieren Mikroglia noch besondere Aktivierungsmarker, wie F4/80, Isolectin, CD68 und die induzierbare NO-Synthase (iNOS). In der adulten Netzhaut sind diese kaum noch aufzufinden (Silverman und Wong, 2018; F. Li *et al.*, 2019).



#### Abbildung 4: Retinale Einwanderung der Mikroglia in die Netzhaut der Maus

Bereits vor der Ausbildung des retinalen Gefäßsystems erscheinen Mikrogliazellen um E11,5 in der Mäuseretina im Bereich der GCL. Während der Ausbildung der Gefäßplexus durchwandern die Mikroglia die Netzhaut und besiedeln zunächst die IPL und anschließend die OPL. GCL = Ganglienzellschicht; IPL = innere plexiforme Schicht; INL = innere Körnerschicht; OPL = äußere plexiforme Schicht; ONL = äußere Körnerschicht; RPE = retinales Pigmentepithel. (Murenu *et al.*, 2022 © 2022 Murenu, Gerhardt, Biel and Michalakis *Originally published in Frontiers in Immunology*)

### 1.3.2.2 Einwanderung und Funktion der Makroglia

Durch Makroglia werden Metabolismus und Funktion von Photorezeptoren und Neuronen unterstützt. Außerdem dienen sie als anatomische und funktionelle Brücke zwischen Neuronen und Bereichen, mit denen ein Molekularaustausch stattfinden muss, wie dem Glaskörper, dem subretinalen Raum und den Blutgefäßen (Reichenbach und Bringmann, 2020).

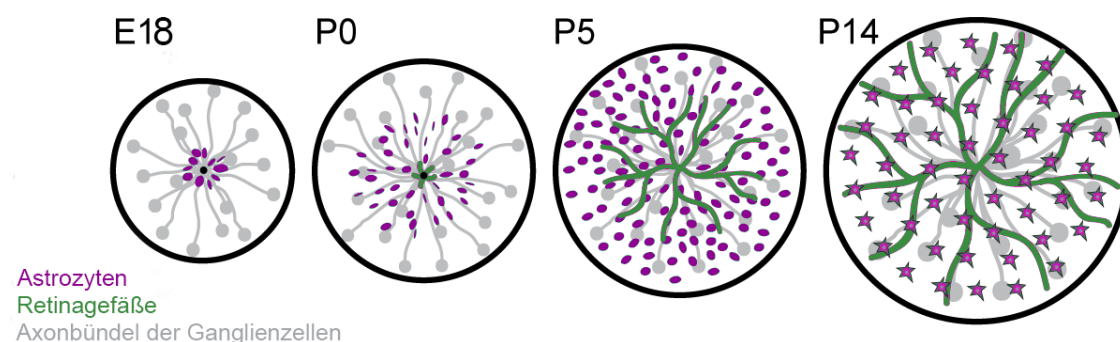
Müller-Zellen machen insgesamt den Großteil aller Gliazellen in der Retina aus. Sie durchqueren die gesamte Netzhaut radial von der inneren Grenzsicht bis zum äußersten Rand der ONL (Vecino *et al.*, 2016). Neben strukturerhaltenden und hämostatischen Funktionen in der Retina (Goldman, 2014) sind sie auch für die Weiterleitung des Lichts zu den Photorezeptoren zuständig (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019). Durch die Expression von pro- und antiangiogenen Faktoren können Müller-Zellen auch die Gefäßentwicklung beeinflussen (X. Li *et al.*, 2019). So entwickeln sich z.B. die retinalen Gefäßausprossungen in Richtung der äußeren Netzhautschichten entlang der Müller-Zellen (Caprara und Grimm, 2012).

Bei der primären Entstehung des retinalen Gefäßsystems haben unter den Gliazellen die Astrozyten die entscheidende Rolle (Reichenbach und Bringmann, 2020). Zwischen dem Vorkommen und der Verteilung von Astrozyten und Blutgefäßen in der Netzhaut besteht eine Korrelation. Die Astrozyten, deren Namen auf ihre sternförmige Gestalt zurückzuführen ist, entstammen dem Sehnerv (Vecino *et al.*, 2016). Aus einer Vorläuferzelllinie entstehen hier zwei Gruppen von Astrozyten, die Astrozyten des N. opticus und die retinalen Astrozyten (Fruttiger, 2007). Nach Austritt aus dem Sehnervenkopf breiten sich die retinalen Astrozyten um E18 (Abb. 5) zentrifugal als proliferierende Population an Zellen ausschließlich in der NFL der Netzhaut aus (Selvam *et al.*, 2018). Offenbar folgen sie dabei den bereits radial angeordneten Axonbündeln der Ganglienzellen in einem Prozess, der den von den retinalen Ganglienzellen synthetisierten *platelet-derived growth factor* (PDGF) erfordert (Fruttiger *et al.*, 1996; Gariano und Gardner, 2005). Die unreifen Zellen haben hierbei noch eine bipolare und langgestreckte Gestalt (Fruttiger, 2002). Auch nach Migration bis in die Netzhautperipherie proliferieren die Zellen weiter, sodass schließlich ein maschenartiges Netzwerk aus ring- bzw. wabenförmig angeordneten Astrozyten entsteht, das als Template für die nachfolgenden Gefäße dient (Paisley und Kay, 2021). Zu diesem Zeitpunkt exprimieren die Astrozyten primär Pax2, PDGFR und Vimentin und nur sehr geringe Mengen des Astrozyten-spezifischen Proteins GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (Fruttiger, 2007), aus dem die Intermediärfilamente bestehen, die für die

mechanische Stabilität der Zellausläufer verantwortlich sind (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019).

Das Fehlen einer intrinsischen Blutversorgung der Retina führt in diesem Entwicklungsstadium zu einer physiologischen Gewebshypoxie, die spezifisch von den Astrozyten detektiert wird (Paisley und Kay, 2021). Als Reaktion darauf wird der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF) aktiviert, was zu einer vermehrten Anreicherung von HIF-1- $\alpha$  führt. HIF-1- $\alpha$  induziert unter anderem die Transkription des Angiogenese-Faktors VEGF-A (*vascular endothelial growth factor-A*), die unter diesen Bedingungen stark hochreguliert wird (Pugh und Ratcliffe, 2003). Dadurch kommt es in den retinalen Astrozyten zu einer erhöhten Expression von VEGF-A, dem wichtigsten Stimulus für die Angiogenese (Melincovici *et al.*, 2018; Paisley und Kay, 2021).

Nach Ausbreitung des primären Gefäßgeflechts auf der Vorlage aus Astrozyten verändert sich das Erscheinungsbild der Zellen. Sie nehmen die klassisch sternförmige Morphologie an und das maschenartige Netzwerk löst sich auf. Anteilig bleiben die Astrozyten eng mit den großen Gefäßen assoziiert. Ansonsten verteilen sie sich gleichmäßig über die adulte Retina. Dies geschieht vorrangig durch die Bereitstellung von Sauerstoff über die neu gebildeten Gefäße und die dadurch beendeten hypoxischen Zustände. Auch das weitere Wachstum der Astrozyten wird so gestoppt. Die Expression von Vimentin und VEGF-A nimmt ab und diejenige von GFAP wird dagegen hochreguliert. Es entsteht ein negativer-Feedback-Mechanismus, wodurch die Summe der Astrozyten und die Gefäßdichte in der Retina stabilisiert wird (Fruttiger, 2007; Paisley und Kay, 2021).



#### Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zellentwicklung von Astrozyten in der Mäuseretina

Bei Mäusen beginnen die Astrozyten bereits pränatal (ab ca. E18) mit Hilfe der Axonbündel der Ganglienzellen in die NFL der Retina einzuwandern. Postnatal (ab P0) treten die Gefäße in die Netzhaut ein und besiedeln das Template aus Astrozyten, was zur Maturation der Astrozyten führt (Sterne = reife Astrozyten). (Modifiziert nach Puñal *et al.*, 2019 © 2019 Puñal *et al.* Originally published in PLOS Biology)

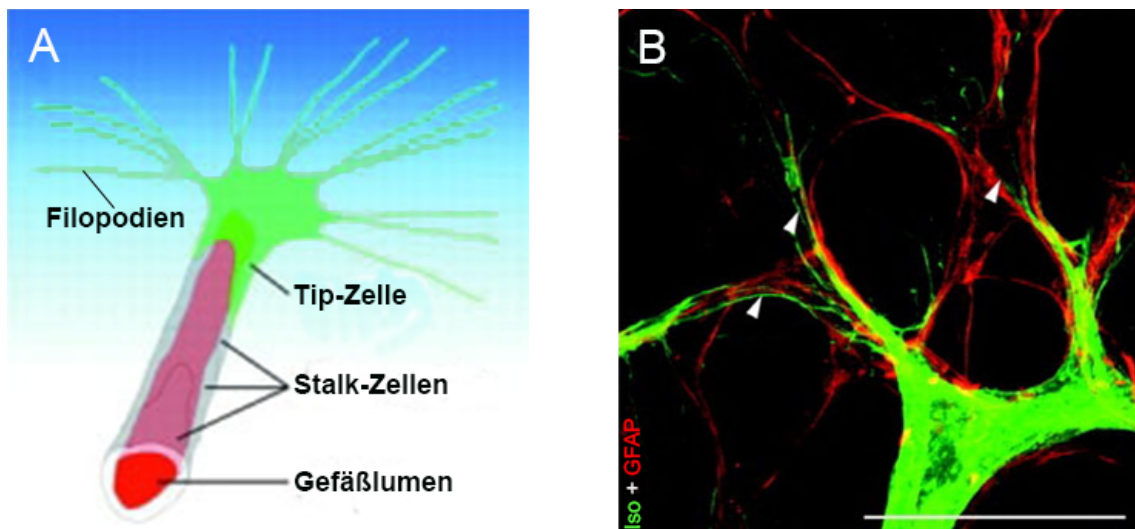
### 1.3.3 Sprießende Angiogenese innerhalb der Retina

Im Gegensatz zum Menschen beginnt die Entwicklung des retinalen Gefäßsystems zur Versorgung der inneren Retinaschichten der Maus erst postnatal, parallel zur Rückbildung des embryonalen Gefäßsystems (Stahl *et al.*, 2010). Die retinalen Gefäße entstehen durch Angiogenese, ein Vorgang, bei dem Endothelzellen aus bestehenden Gefäßen durch Proliferation neue Sprösslinge formen. Abzugrenzen ist dieser Prozess von der Vaskulogenese, wobei Gefäße *de-novo* durch den Zusammenschluss von endothelialen Vorläuferzellen, den Angioblasten, gebildet werden. Dadurch, dass in der Netzhaut keine Angioblasten identifiziert werden können, geht man davon aus, dass hier alle Gefäßplexus durch Angiogenese entstehen (Fruttiger, 2002). Ab P1 wachsen die ersten neuen Blutgefäße aus dem Sehnervenstiel aus, um mit der Vaskularisation der Netzhaut zu beginnen (Zarkada *et al.*, 2021).

Innerhalb der Retina wird dann von einer sprießenden Angiogenese gesprochen, Grund dafür ist die Identifikation einer besonderen Untergruppe von Endothelzellen, die als endotheliale Tip-Zellen bezeichnet werden. Sie befinden sich an der Außengrenze der entstehenden Gefäßsprossen (Fruttiger, 2007). Distal dieser Tip-Zellen gehen zarte, langgestreckte Ausläufer, die Filopodien, ab (Abb. 6A). Diese suchen in ihrem unmittelbaren Umfeld nach Orientierungshilfen für eine gerichtete Migration. Die durch die physiologische Hypoxie ausgelöste VEGF-A Sekretion der Astrozyten erzeugt einen VEGF-A Gradienten innerhalb der Netzhaut. Geringe Mengen befinden sich im vaskularisierten Zentrum, während viel VEGF in der avaskulären Peripherie exprimiert wird. Im Bereich der Filopodien findet sich vermehrt VEGFR-2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*), einer von zwei Rezeptoren im angiogenen Endothel, an die VEGF-A binden kann. Die Tip-Zellen bewegen sich mit ihren Filopodien entlang der VEGF-A exprimierenden Astrozyten und lagern sich ihnen direkt an, sodass die Gefäße des primären (superfiziellen) Plexus parallel zum Astrozytennetzwerk migrieren (Abb. 6B). In den Tip-Zellen findet keine Proliferation statt, was zeigt, dass die aktive Richtungsbestimmung tatsächlich nur von den Filopodien gesteuert wird. Anders verhält es sich bei den Stalk-Zellen, einer weiteren Untergruppe der Endothelzellen, die den Tip-Zellen hintenangestellt sind. Proliferation kann hier eindeutig nachgewiesen werden. Die Stimulation hierzu erfolgt ebenfalls über VEGF-A, da die Stalk-Zellen auch VEGFR-2 tragen. Während die gerichtete Migration der Tip-Zellen vom Verteilungsmuster von VEGF-A abhängt, ist für die Vermehrung der Stalk-Zellen die absolute Konzentration entscheidend. VEGF-A löst somit in den verschiedenen Untergruppen der Endothelzellen unabhängige Reaktionen aus (Gerhardt *et al.*, 2003).

Neben VEGF scheinen aber auch eine Reihe anderer Faktoren, wie beispielsweise Fibronectin, die Steuerung der Endothelzellen entlang der Astrozyten zu beeinflussen (Uemura, 2006; Caprara und Grimm, 2012; Selvam *et al.*, 2018).

Basierend auf diesen Grundlagen entwickelt sich zunächst der superfizielle Plexus innerhalb der ersten Woche nach der Geburt der Maus von der Papille ausgehend zentrifugal entlang des Astrozyten-Gerüsts (Stahl *et al.*, 2010). Seine Gefäße entwickeln sich dabei ausschließlich in der NFL und erreichen die Peripherie der Netzhaut an P8 (Abb. 7A) (Fruttiger, 2007).



**Abbildung 6: Endothelzellen während der sprießenden retinalen Angiogenese in der Mäuseretina**  
**A:** Schematische Darstellung der Tip-Zellen mit Filopodien und der Stalk-Zellen. **B:** Fluoreszenzfärbung einer Mäuseretina (postnatal) mit Isolectin (grün) zur Darstellung der Gefäße des primären Plexus, die sich mit den Filopodien der Tip-Zellen nach dem mit GFAP (rot) gefärbtem Template aus Astrozyten ausrichten (Pfeilköpfe). Der Balken entspricht 20 µm. (Modifiziert nach Gerhardt *et al.*, 2003 © 2003 Gerhardt *et al.* Originally published in The Rockefeller University Press)

### 1.3.4 Entwicklung der retinalen Gefäßplexus

Mensch und Maus besitzen ein retinales Gefäßnetzwerk, das aus insgesamt drei Kapillarbettungen besteht, die die inneren Schichten der Netzhaut mit sauerstoffreichem Blut versorgen. Neben dem superfiziellen Plexus differenzieren sich sekundär der tiefe und der intermediäre Plexus (Liu *et al.*, 2017). Anders als die primären Gefäße des superfiziellen Plexus, entwickeln sich die nachfolgenden Gefäßgeflechte unabhängig von Astrozyten. Ab P7, wenn der primäre Plexus die Peripherie beinahe erreicht hat, beginnt zunächst die Entwicklung des tiefen Plexus. Erst zentral und später weiter peripher, kommt es zu vertikalen Gefäßausprossungen aus dem primären Plexus (Abb. 7A), die senkrecht durch die Retina in Richtung der OLM ziehen (Fruttiger, 2007). Angetrieben wird dieser Prozess wieder durch physiologisch hypoxische Bedingungen im Gewebe, die eine VEGF-Ausschüttung in den Somata der Zellen der INL auslösen (Selvam *et al.*, 2018). Die Tip-Zellen der Gefäßausläufer wandern auf ihrem Weg entlang der Müller-Zellen, welche ebenfalls VEGF exprimieren (Caprara und Grimm, 2012).

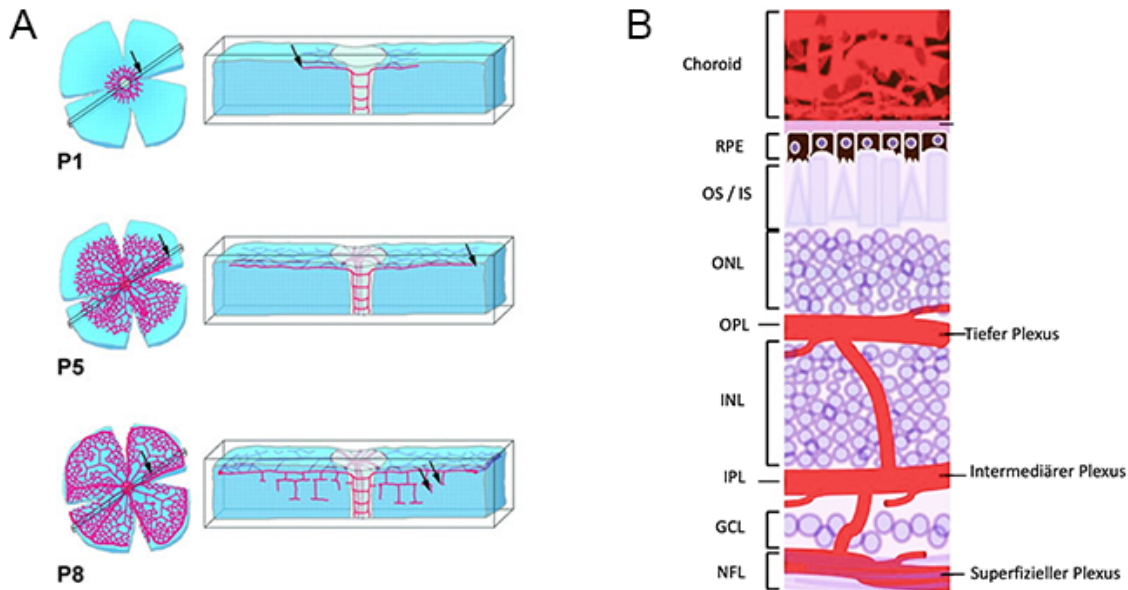
Nach Erreichen der Außengrenze der INL ändern sie ihre Wachstumsrichtung und bewegen sich innerhalb der OPL in Richtung Peripherie (Fruttiger, 2007). Der tiefe Plexus erreicht die Peripherie der Retina ungefähr an P12. In dieser Zeit kommt es auch auf der Innenseite der INL zu einer „Seitwärtsbewegung“ der senkrechten Gefäßstränge, sodass in der IPL die Entwicklung des intermediären Plexus beginnt. Nach drei Wochen sind dann alle Plexus vollständig entwickelt (Abb. 7B) und durch Verbindungsgefäße miteinander vernetzt (Fruttiger, 2007; Stahl *et al.*, 2010).

Als ein negativer Kontrollmechanismus während der retinalen Blutgefäßbildung fungiert u.a. VEGFR-1, der im Gegensatz zu VEGFR-2 eine modulierende bzw. negativ regulierende Funktion hinsichtlich der Angiogenese hat. Im RPE und in den Photorezeptoren wird VEGFR-1 exprimiert, um ein Gefäßwachstum über die OPL hinaus zu verhindern (Selvam *et al.*, 2018).

Während der sprießenden Angiogenese bilden sich zunächst dichte, gleichförmige, noch unreife Kapillargeflechte aus. Durch eine Umstrukturierung, die einerseits durch Gefäßregression und andererseits durch Gefäßstabilisierung bestimmt wird, reift im Laufe der Zeit ein hierarchisch strukturierter Gefäßbaum heran. Hier unterscheiden sich die Durchmesser der Gefäße und eine Differenzierung zwischen Arterien, Venen und Kapillaren wird möglich. Endothelzellmigration, mangelnde Perfusion und selektive Endothelzellapoptose, z. B. von Leukozyten induziert, wirken destabilisierend und führen so beispielsweise zu kapillarfreien Bereichen. Diese finden sich vorwiegend um die großen Arterien, wohl auch wegen der deutlich erhöhten Sauerstoffkonzentrationen und der niedrigen VEGF-Werte in deren Umgebung. Stabilisierend während der Gefäßumstrukturierung wirken Perfusion, Gefäßreifung und die Interaktionen zwischen Endothelzellen und Wandzellen (Fruttiger, 2007; Selvam *et al.*, 2018).

Die kontraktilen Wandzellen befinden sich abluminal der Endothelzellschicht und lassen sich in glatte Muskelzellen und Perizyten unterteilen (Siekmann, 2023). Die glatten Muskelzellen befinden sich in der *Tunica media*, der mittleren der drei Gefäßschichten, in den großen reifen Gefäßen. Dabei sind sie in Arterien stärker ausgeprägt als in Venen. Sie stabilisieren die Blutgefäße und haben durch ihre kontraktilen Eigenschaften einen regulierenden Einfluss auf den Gefäßdurchmesser und den Blutfluss (Siekmann, 2023). Über Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*, NO), das die lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylyl cyclase, SGC) in diesen Zellen aktiviert, wird die Vasodilatation induziert (Poulos, 2006).

Perizyten werden zu den neu entstehenden Kapillaren rekrutiert und umgeben diese. Sie bieten dort strukturelle Unterstützung, besitzen ebenfalls kontraktile Eigenschaften und sind für den Aufbau der Blut-Retina-Schranke erforderlich (Gergely und Gerinec, 2011).



**Abbildung 7: Retinales Gefäßsystem in der Mäusenetzhaut**

**A:** Schematische Darstellung der Gefäßentwicklung in der Retina der Maus. Die Draufsicht zeigt den superfi ziellen Plexus in der NFL. Die Sprossung erfolgt hier bis in die Peripherie (P1 und P5, Pfeile) und anschließend in die äußeren Retinaschichten (P8, Pfeile). (Modifiziert nach Gerhardt *et al.*, 2003 © 2003 Gerhardt *et al.* Originally published in The Rockefeller University Press) **B:** Schematische Darstellung eines retinalen Querschnitts zur Veranschaulichung der Lokalisation der drei miteinander verbundenen Gefäßplexus des retinalen Gefäßsystems. Der sich zuerst entwickelnde superfi zielle Plexus liegt in der NFL, der nachfolgende tiefe Plexus in der OPL und der sich zuletzt entwickelnde intermediäre Plexus in der IPL. RPE = Retinales Pigmentepithel, OS = Außensegmente der Photorezeptoren, IS = Innensegmente der Photorezeptoren, ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglienzellschicht. (Modifiziert nach Liu *et al.*, 2017 © 2017 Originally published in The FASEB Journal, Lizenznummer: 5910241382766)

## 1.4 Krankheiten ausgelöst durch Veränderungen der Sauerstoffkonzentration

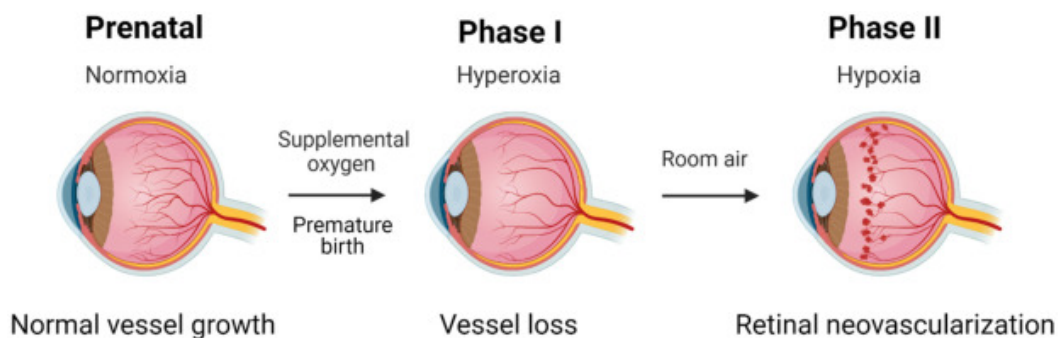
### 1.4.1 Hyper- und Hypoxie im Auge – Die Frühgeborenen-Retinopathie

Es gibt mehrere Erkrankungen der Netzhaut, die auf pathologische Veränderungen des retinalen Gefäßsystems zurückzuführen sind. Eine ist beispielsweise die Frühgeborenen-Retinopathie (*retinopathy of prematurity*, ROP), die als Hauptgrund für den Verlust der Sehkraft bei frühgeborenen Kindern gilt (Liu *et al.*, 2017). Als wichtigster Risikofaktor für dieses Krankheitsbild gilt die frühzeitige Geburt eines Kindes und die damit einhergehende Exposition gegenüber schwankenden Sauerstoffkonzentrationen (Dammann *et al.*, 2023). Es können zwei unterschiedliche Phasen im Krankheitsverlauf benannt werden, eine initiale Destruktion der bis zum Zeitpunkt der Geburt bereits entwickelten retinalen Gefä ße. Sowie eine anschließende Phase pathologischer Neovaskularisation innerhalb der Netzhaut (Abb. 8) (Liu *et al.*, 2017).

Zunächst führen hyperoxische Bedingungen durch die bei Frühgeborenen oft überlebensnotwendige Beatmung zum Verlust und zur Hemmung der Entwicklung der noch unreifen Netzhautgefä ße. Aber auch die normoxische Umgebungsluft kann unmittelbar nach der Geburt im Vergleich zum intrauterinen Sauerstoffgehalt zu hoch

sein und die Vaso-Obliteration auslösen (Dammann *et al.*, 2023). Nach Beendigung der Sauerstoffsupplementierung kann es dann zu einem Abfall des Sauerstoffgehaltes in der Netzhaut kommen. Dadurch steigen hypoxieabhängige Angiogenese-Faktoren wie VEGF an, was an der Grenze zwischen vaskulärer und avaskulärer Retina zu pathologischen Gefäßneubildungen führt, die in den Glaskörper einwachsen (Stahl *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2017).

Je nach Schweregrad wird die Frühgeborenen-Retinopathie in verschiedene Stadien eingeteilt. Von einer Demarkationslinie zwischen vaskulärer und avaskulärer Netzhaut über eine intravitreale fibrovaskuläre Proliferation kann es bis zur totalen Netzhautablösung kommen (Chiang *et al.*, 2021). Bei Therapieindikation wird mit Laserkoagulation oder VEGF-Inhibitoren behandelt, außerdem sollten prophylaktisch bei der Sauerstofftherapie von Neugeborenen die O<sub>2</sub>-Partialdrücke kontrolliert werden (Grehn, 2019).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Krankheitsverlaufs der Frühgeborenen-Retinopathie**  
 Vor der Frühgeburt entwickeln sich die retinalen Gefäße zunächst physiologisch. In Phase I werden die Frühgeborenen durch Sauerstoffbeatmung einer relativen Hyperoxie ausgesetzt, die die normale retinale Gefäßentwicklung hemmt und zur Vaso-Obliteration der noch unreifen Gefäße führt. In Phase II werden die Säuglinge wieder der Raumluft ausgesetzt, die als relative Hypoxie wirkt und eine pathologische Neovaskularisation induziert. (Ryu, 2022 © 2022 by Ryu *Originally published in* The International Journal of Molecular Sciences)

#### 1.4.2 Hyperoxie in der Lunge – Die bronchopulmonale Dysplasie

Durch die verbesserte medizinische Versorgung und die damit verbundenen erhöhten Überlebenschancen der immer jünger geborenen Frühchen steigt die Inzidenz von Erkrankungen, die durch eine Frühgeburt ausgelöst werden können (Stoll *et al.*, 2015). Neben den Augen werden auch andere Organe durch die mit der Frühgeburt einhergehenden Schwankungen der Sauerstoffkonzentration pathologisch beeinflusst (Weinberger *et al.*, 2002). Die häufigste Folge ist eine Erkrankung der Lunge, die bronchopulmonale Dysplasie (BPD). Neben der Unreife der Lunge sind die wichtigsten Risikofaktoren für diese Erkrankung die fetale Wachstumsrestriktion, die mechanische Beatmung, die durch erhöhtes Volumen und Druck zu einer Schädigung der Lunge führen kann, sowie die dabei verwendeten erhöhten Sauerstoffkonzentrationen, die zu

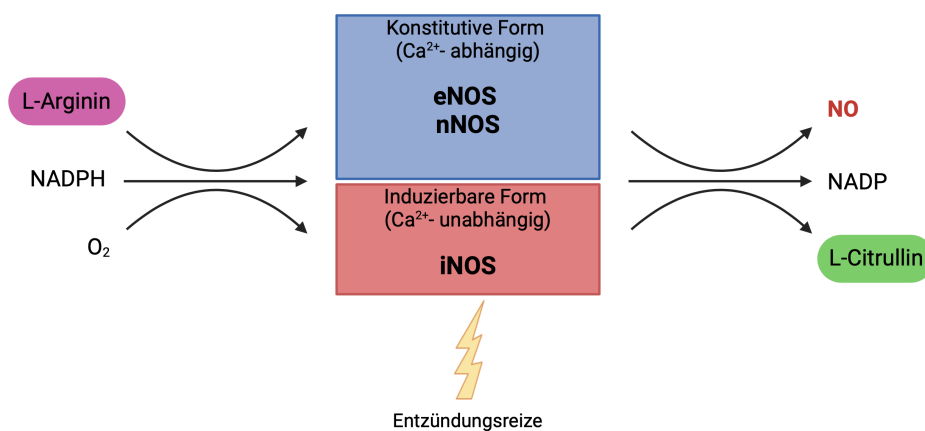
einer zytotoxischen Reaktion führen können. Prä- und postnatale Infektionen scheinen das Risiko für BPD ebenfalls wesentlich zu steigern (Schmidt und Ramamoorthy, 2022). Da heutzutage versucht wird, Frühgeborene mit niedrigerem Beatmungsdruck und mit geringerem Sauerstoffgehalt zu beatmen, hat sich das Krankheitsbild verändert (Jobe, 2011). Anstelle von Septenverdickung und Fibrose ist die „neue“ BPD eher durch alveoläre Vereinfachung und eine Dysangiogenese der Lungengefäße gekennzeichnet. In der Folge besteht ein deutlich erhöhtes Risiko eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung oder sogar eine pulmonale Hypertonie zu entwickeln (Schmidt und Ramamoorthy, 2022).

## **1.5 iNOS und seine Auswirkungen auf pathologische Prozesse**

### **1.5.1 Induzierbare NO-Synthase**

Stickstoffmonoxid ist ein flüchtiges Gas und funktioniert als Signalmolekül. Da es membrangängig ist, kann es intra- und extrazellulär wirken und ist so an verschiedenen Vorgängen wie Vasodilatation, Neurotransmission, Entzündung und Wirtszellabwehr beteiligt (Koolman *et al.*, 2019). Auch auf die Vaskularisation scheint NO Einfluss nehmen zu können, wobei es sowohl pro- (Parenti *et al.*, 1998; Cooke, 2003) als auch antiangiogen (Pipili-Synetos *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1998) wirken kann. NO wird in einer NADPH-abhängigen Reaktion aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff synthetisiert, als Nebenprodukt verbleibt L-Citrullin. Das Enzym NO-Synthase katalysiert diese Reaktion (Abb. 9). Es können hierbei drei verschiedene Isoformen unterschieden werden, die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und die neuronale NO-Synthase (nNOS). Zwei dieser Isoformen werden konstitutiv exprimiert, eNOS in den Endothelzellen und nNOS in Nerven- und Muskelzellen (Moncada und Erusalimsky, 2002; Koolman *et al.*, 2019). Sie sind dabei abhängig von Kalzium und produzieren als Reaktion auf physiologische Stimuli relativ geringe Mengen an NO. Im Gegensatz dazu ist iNOS aufgrund seiner hochaffinen Calmodulin-Bindungsdomäne kalziumunabhängig und, wie der Name schon sagt, induzierbar (Nathan, 1992; Abu El-Asrar *et al.*, 2004; Mattila und Thomas, 2014). Es sind Entzündungsreize nötig, um eine iNOS-Ausschüttung in verschiedenen Zelltypen wie beispielsweise Gliazellen, Neuronen, glatten Muskelzellen, Chondrozyten oder Monozyten zu provozieren. Die Expression wird dabei in erster Linie über transkriptionelle Regulation gesteuert. Proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin-1, Interferon- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , und Lipopolysaccharide führen zur Aktivierung spezieller Signalwege, wie beispielsweise den NF- $\kappa$ B- und JAK/STAT-Hauptsignalwegen. Über die Signalwege aktivierte Transkriptionsfaktoren binden

daraufhin im Zellkern an den Promotor des iNOS-Gens und ermöglichen so die iNOS-Transkription und -Expression (Kleinert *et al.*, 2003; Cinelli *et al.*, 2020). Im Vergleich zu den beiden anderen Synthesen produziert iNOS nach seiner Expression deutlich größere Mengen NO, über deutlich längere Zeiträume (Toda and Nakanishi-Toda, 2007). NO kann in diesen hohen Konzentrationen zur Erregerabwehr beitragen und ist daher im Rahmen des angeborenen Immunsystems von Bedeutung. Eine Überexpression von iNOS kann aber auch schädliche Auswirkungen haben. Die daraus resultierenden überhöhten NO-Mengen werden mit zahlreichen Krankheiten assoziiert, darunter Krebs-, Herz- und Lungenerkrankungen. Es ist also stark konzentrationsabhängig, ob iNOS-assoziiertes NO vorteilhafte oder schädliche Effekte hat (Cinelli *et al.*, 2020). Auch im Auge kann eine iNOS-induzierte NO-Überproduktion zu pathologischen Veränderungen beitragen. Beim Krankheitsbild des Glaukoms ist iNOS beispielsweise für die Ganglienzellschädigung mitverantwortlich (Toda und Nakanishi-Toda, 2007). Auch für die altersbedingte Makuladegeneration wird eine iNOS bedingte NO-Überproduktion im Bereich der *Lamina choroidecapillaris* als Ursache beschrieben (Chiou, 2001). Bei der ROP wurde der iNOS-Aktivierung eine pathologische Rolle hinsichtlich der Neovaskularisation zugewiesen (Zhang *et al.*, 2009).



#### Abbildung 9: NO-Synthese

Stickstoffmonoxid (NO) wird NADPH-abhängig aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) durch eine der drei NO-Synthasen katalysiert, wobei L-Citrullin als Nebenprodukt verbleibt. Die endotheliale- und die neuronale NO-Synthase (eNOS und nNOS) sind abhängig von Kalzium ( $Ca^{2+}$ ) und werden konstitutiv exprimiert, während die induzierbare NO-Synthase (iNOS) kalziumunabhängig ist und z.B. durch Entzündungsreize induziert werden kann. (Erstellt mit BioRender.com)

### 1.5.2 Effekte durch Defizienz / Inhibition von iNOS

Da Dysregulationen von iNOS und die daraus resultierenden erhöhten NO-Konzentrationen an der Pathophysiologie verschiedener Krankheiten beteiligt sind, gilt die selektive Hemmung des Enzyms als wichtiger Ansatzpunkt für potenzielle Behandlungsmöglichkeiten (Minhas *et al.*, 2020).

Um mögliche protektive Effekte bei speziellen Krankheitsbildern zu identifizieren, werden häufig zunächst Tiere mit iNOS-Defizienz in geeigneten Modellen untersucht. Ergänzend wird der Einsatz von spezifischen iNOS-Inhibitoren in den Modellen an Wildtyptieren getestet, um auch Hinweise auf aussichtsreiche Therapieansätze durch eine mögliche medikamentöse Hemmung der Synthese zu erhalten.

So konnten Seimetz *et al.* bei iNOS-KO-Mäusen, die Tabakrauch ausgesetzt waren, einen Schutz vor Emphysemen und dem Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie feststellen. Auch die nachträgliche Hemmung von iNOS in Wildtypmäusen mit dem iNOS-Inhibitor L-NIL schützte die Alveoli und Lungengefäße der Tiere vor krankhaften Veränderungen, bereits entstandene Schäden konnten sogar rückgängig gemacht werden (Seimetz *et al.*, 2011).

Auf das Auge bezogen konnte beispielsweise in einem Rattenmodell für das einseitige Glaukom ein protektiver Effekt durch die Gabe eines iNOS-Inhibitors festgestellt werden. Während in der unbehandelten Kontrollgruppe durch den erhöhten Augeninnendruck 36 % der retinalen Ganglienzellen verloren gingen, waren es in der Versuchsgruppe nach Gabe eines iNOS-Inhibitors weniger als 10 % (Neufeld *et al.*, 1999).

## **1.6 Hyperoxie – Tiermodelle**

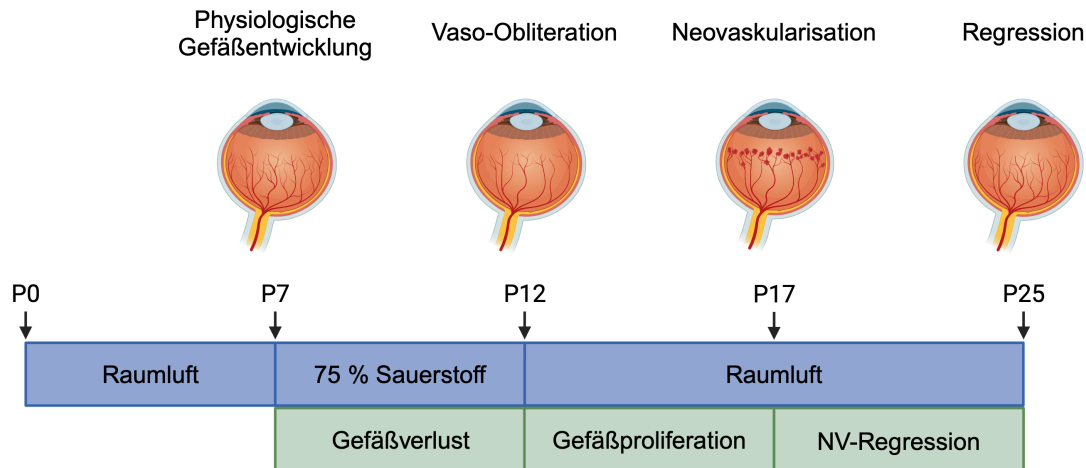
### **1.6.1 OIR – Modell**

Um den Krankheitsverlauf der Frühgeborenen-Retinopathie experimentell darzustellen, hat sich das Tiermodell mit Mäusen etabliert, welches erstmals 1994 von Smith *et al.* vorgestellt wurde (Smith *et al.*, 1994). Da sich die retinalen Gefäße bei der Maus im Gegensatz zum Menschen erst postnatal entwickeln, bietet die Untersuchung an der Maus den Vorteil, dass die ROP-Symptomatik leicht dargestellt und zugänglich untersucht werden kann, ohne die Schwierigkeiten, die mit einer Untersuchung während der Embryonalentwicklung verbunden wären.

Dadurch, dass die Symptome in dem Modell nicht durch eine frühzeitige Geburt, sondern nur durch Änderungen der Sauerstoffkonzentration erreicht werden, wird das Modell als *oxygen induced retinopathy* (OIR) – Modell bezeichnet (Abb. 10).

Eine Woche nach der Geburt werden Mäuse von P7 bis P12 einer Sauerstoffkonzentration von 75 % ausgesetzt. Dies spiegelt die erste Phase des Krankheitsbildes der ROP wider, wobei die hyperoxischen Bedingungen eine zentrale Vaso-Obliteration des ohnehin noch unreifen retinalen Gefäßsystems auslösen. Die zweite Phase wird erzeugt, indem die Mäuse ab P12 wieder in Normoxie gehalten werden. Diese relative Hypoxie aktiviert Angiogenese-Faktoren und führt zu einer Revaskularisierung und zusätzlich pathologischer Neovaskularisation. Bei Mäusen

kommt es nach P17, dem Höhepunkt der pathologischen Gefäßproliferation, zu einer Rückbildung der neuen Gefäße, sodass bis P25 eine Regression aller pathologischen Veränderungen der Netzhautgefäße stattgefunden hat (Stahl *et al.*, 2010).



**Abbildung 10: Schematischer Aufbau des klassischen OIR-Mausmodells für die Frühgeborenen-Retinopathie**

Mäusewelpen werden bis zum postnatalen Tag P7 in Raumlufte gehalten. Von P7 bis P12 werden die Mäuse 75 % Sauerstoff ausgesetzt, was die physiologische retinale Gefäßentwicklung hemmt und zu einer zentralen Zone der Vaso-Obliteration führt. Ab P12 werden die Mäuse wieder in Raumlufte gehalten, was wie eine relative Hypoxie wirkt und eine Revaskularisation der Retina und zusätzlich eine pathologische Neovaskularisation (NV) auslöst. Der maximale Schweregrad der NV wird bei P17 erreicht, danach setzt eine Regression ein, sodass an P25 keine pathologischen Gefäßveränderungen mehr feststellbar sind. (Erstellt mit BioRender.com)

### 1.6.2 BPD – Modell

Für die BPD hat sich bisher noch kein Standard-Tiermodell etablieren können. Eine Vielzahl von Modellen wurde beschrieben, in denen neugeborene Mäuse unterschiedlich hohen Sauerstoffkonzentrationen über unterschiedlich lange Zeiträume ausgesetzt wurden, um das Krankheitsbild möglichst genau zu rekonstruieren (Silva *et al.*, 2015).

Die wichtigsten zu erzielenden Strukturelemente des Tiermodells sollten dabei die verringerte Anzahl an Alveolen mit verdickten Septenwänden sein, die durch die gehemmte Lungenentwicklung aufgrund der Sauerstoffsupplementierung verursacht werden. Beide pathologischen Lungenmerkmale konnten in dem 2017 von Nardiello *et al.* als vorteilhaft beschriebenen BPD-Modell beobachtet werden. Die Mäusewelpen wurden hier direkt nach der Geburt von P0-P14 unter 85 % Sauerstoff gehalten, um das Krankheitsbild experimentell darzustellen (Nardiello *et al.*, 2017).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Diese Forschungsarbeit ist eine Kooperation mit dem *Cardio Pulmonary Institute* (CPI) in Gießen. Basierend auf den oben erwähnten Forschungsergebnissen zu protektiven Effekten einer iNOS-Defizienz bzw. -Inhibition bei bestimmten Lungenerkrankungen, wird im CPI jetzt untersucht, ob iNOS auch einen Einfluss auf die bronchopulmonale Dysplasie (BPD) hat. Dafür wurden Wildtyp- und iNOS-KO-Mäuse in einem BPD-Modell gehalten, um mögliche Unterschiede in Bezug auf die Krankheitsentwicklung festzustellen.

Da das Krankheitsbild der BPD mit dem Hauptrisikofaktor einer Frühgeburt häufig zusätzliche krankhafte Veränderungen der Netzhaut aufweist, wird in dieser Arbeit die Retina der Versuchstiere untersucht. Es sollte herausgefunden werden, ob ein BPD-Mausmodell neben der Lunge auch für die Darstellung pathologischer Entwicklungen des Auges bei einer Frühgeburt geeignet ist. Mittels Fluoreszenzfärbungen der retinalen Blutgefäße und der Makro- und Mikroglia sollte in einem ersten Teil der Arbeit einerseits untersucht werden, ob und welche Veränderungen in der Retina, insbesondere im Gefäßsystem, durch die Haltung in einem BPD-Modell mit 85 % Sauerstoffkonzentration zwischen P0 und P14 beobachtet werden können. Besonders im Vergleich zu den bekannten und oft beschriebenen Pathologien des klassischen OIR-Modells sollte nach Parallelen und Unterschieden geschaut werden.

Als zweiter wichtiger Schwerpunkt, bei dem auch RT-PCR-Untersuchungen geplant waren, sollte zusätzlich erforscht werden, ob und welche Auswirkungen eine iNOS-Defizienz dabei auf die Netzhaut hat. Es sollte gezeigt werden, ob das Fehlen dieser Synthese einen Einfluss auf die Retina während der frühen postnatalen Entwicklung unter normoxischen Bedingungen hat. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die Haltung der Tiere unter den hyperoxischen Bedingungen des BPD-Modells bei Wildtypmäusen womöglich zu pathologischen Effekten führt, die bei iNOS-KO-Mäusen fehlen und somit auf iNOS zurückzuführen wären.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchslösungen und Chemikalien

Produkt	Hersteller, Ort
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Life Technologies - Thermo Fisher, Dreieich
Agarose LE	Genaxxon bioscience, Ulm
Borsäure 0,82 M	Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix (10 mM)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe
DNA Stain Clear G	Serva Electrophoresis, Heidelberg
EDTA*H <sub>2</sub> *2Na 10mM	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut	Carl Roth, Karlsruhe
Fluorescence Mounting Medium	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Immersionsöl IMMOIL-F30CC	Olympus, Nagano, Japan
Magnesiumchlorid MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Thermo Fisher, Dreieich
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Thermo Fisher, Dreieich
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Normal Donkey Serum (NDS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Stickstoff (flüssig)	Linde, Pullach
Sucrose (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Tissue Tek Mounting Medium	Leica Biosystems, Nussloch
Tris 1 M	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Carl Roth, Karlsruhe

**Tabelle 1: Verwendete Verbrauchslösungen und Chemikalien unter Angabe der Hersteller in alphabetischer Reihenfolge**

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Ort
Alufolie	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Deckgläser 22x22 mm	Epredia Europe, Basel, Schweiz
Deckgläser 24x50 mm	Epredia Europe, Basel, Schweiz
Einweg-Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe
Einwegskalpell	Feather, Osaka, Japan
Färbekammer für Objektträger (StainTray)	Science Services GmbH, München
Färbeküvette 120 ml	VWR International GmbH, Darmstadt
Federschere 15000-08	Fine Science Tools, Vancouver, Canada
Filterpapier	Carl Roth, Karlsruhe
Hellendahl-Küvette 80 ml	VWR International GmbH, Darmstadt
Injektionsnadel kurz 30Gx1/2	Becton, Dickinson S.A, Huesca, Spanien
Kryoeinbettformen Tissue Tek Cryomold	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Microscope slides 631-1551	Avantor by VWR, Darmstadt
Mikrotom-Klinge R35	Feather, Osaka, Japan
Nagellack	dm Drogeriemarkt, Karlsruhe
Objektträger SuperFrost Plus 25x75 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Objektträgerkasten mit 50 und 100 Stellplätzen	Carl Roth, Karlsruhe
Parafilm M	Bemis, Neenah, Wisconsin, USA
Petrischalen (10cm)	Sarstedt, Nürnbrecht
Pipettenspitzen in verschiedenen Größen	Biozym, Hess. Oldendorf; Eppendorf, Hamburg; Brand, Wertheim
Präzisionspinzette 5, Inox 0.8	Dumont, Montignez, Schweiz
Präzisionspinzette FS5	Dumont, Montignez, Schweiz
Rasierklengen	dm Drogeriemarkt, Karlsruhe
Reaktionsgefäße in verschiedenen Größen	Sarstedt, Nürnbrecht; Carl Roth, Karlsruhe; Eppendorf, Hamburg; Biozym, Hess. Oldendorf; Simport, Bernard-Pilon Beloil, Kanada
Stahlkugeln $\varnothing$ 3 mm	Retsch, Haan
Wattestäbchen	dm Drogeriemarkt, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen Cellstar (10 ml und 15 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

**Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge unter Nennung der Hersteller**

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10x TBE-Puffer	242,02 g Tris 102,70 g Borsäure 7,44 g EDTA <i>ad</i> 2000 ml dH <sub>2</sub> O
1x TBE-Puffer	200 ml 10x TBE-Puffer <i>ad</i> 2000 ml dH <sub>2</sub> O
Antikörpermedium	3 % Normal Donkey Serum 1 % BSA 0,5 % Triton X-100 in 0,1 M PBS
DAPI-Lösung (1:1000)	0,1 % der DAPI Stammlösung in 0,1 M PBS
Natriumazidlösung (0,02 %)	0,02 % Natriumazid in 0,1 M PBS
Paraformaldehydlösung 4 %	4 % Paraformaldehyd in 0,1 M PBS
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) 0,1 M, pH 7,4	500 ml PBS 0,2 M 500 ml ddH <sub>2</sub> O pH-Wert auf 7,4 einstellen
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) 0,2 M, pH 7,4	4,14 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 11,68 g NaCl 45,57 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O <i>ad</i> 1000 ml ddH <sub>2</sub> O pH-Wert auf 7,4 einstellen
Sucrose-Lösung 10 %	0,1 g Sucrose <i>ad</i> 10 ml 0,1 M PBS
Sucrose-Lösung 20 %	0,2 g Sucrose <i>ad</i> 10 ml 0,1 M PBS
Sucrose-Lösung 30 %	0,3 g Sucrose <i>ad</i> 10 ml 0,1 M PBS

**Tabelle 3: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen aus eigener Herstellung in alphabetischer Reihenfolge**

### 2.1.4 Weitere eingesetzte Puffer

Puffer	Hersteller, Ort
5x Colorless GoTaq Flexi Buffer1	Promega, Walldorf
5x Phusion HF-Puffer	Thermo Fisher, Dreieich
Gel Loading Dye, Purple (6x)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Orange DNA-Ladefarbstoff (6x)	Thermo Fisher, Dreieich

Tabelle 4: Weitere verwendete Puffer unter Angabe der Hersteller in alphabetischer Reihenfolge

### 2.1.5 Kit-Systeme

Kit-System mit Bestellnummer	Hersteller, Ort
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, #740609.50	Macherey-Nagel, Düren
PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit, #6110A	Takara Bio, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
RNeasy Mini Kit (50), #74104	Qiagen, Hilden

Tabelle 5: Verwendete Kit-Systeme unter Angabe der Bestellnummer und Hersteller in alphabetischer Reihenfolge

### 2.1.6 Marker und Enzyme

Marker/Enzym	Hersteller, Ort
GeneRuler 100 bp Plus DNA-Ladder	Thermo Fisher, Dreieich
GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (5 U / µl)	Promega, Mannheim
Phusion DNA-Polymerase (2 U/ µl)	Thermo Fisher, Dreieich

Tabelle 6: Verwendete Enzyme und Marker unter Angabe der Hersteller in alphabetischer Reihenfolge

### 2.1.7 Primer

Interne Nummer	Name	Primersequenz	Produktlänge
#2189	GAPDH <i>forward</i>	GGTCGGTGTGAACGGATTTGG	199 bp
#2190	GAPDH <i>reverse</i>	CCCGTTGATGACAAGCTTCCC	

#6003	iNOS <i>forward</i>	ACATGCTACTGGAGGTGGGT	429 bp
#6002	iNOS <i>reverse</i>	TCCAGGGCTCGATCTGGTAGT	

**Tabelle 7: Verwendete Primer mit Angabe der internen Nummer, der Primersequenz und der erwarteten Produktlänge für jedes Primerpaar**

Alle verwendeten Primer wurden mit ddH<sub>2</sub>O zu einer Gebrauchskonzentration von 10 pmol/μl verdünnt.

### 2.1.8 Primärantikörper und Lektine

Antikörper mit Bestellnummer	Wirt	Verdünnung	Hersteller, Ort
GFAP (Anti-gliab fibrillary acidic protein) #AB5804	Kaninchen	1:1000	Millipore-Merck KGaA, Darmstadt
Iba1 (Anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1) #ab5076	Ziege	1:250	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Isolectin GS-IB4, Alexa Fluor 488 Conjugate #I21411	isoliert aus Griffonia simplicifolia	1:100	Invitrogen - Thermo Fisher, Dreieich
α-SMA (Anti-α-smooth-muscle-actin) #A5228	Maus	1:1000	Sigma-Aldrich, Darmstadt

**Tabelle 8: Verwendete Primärantikörper und Lektine unter Nennung der Bestellnummer, Wirtsspezies, Verdünnungsstufe und Hersteller**

### 2.1.9 Sekundärantikörper

Antikörper mit Bestellnummer	Wirt	Reaktivität	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor 488 #A11055	Esel	Ziege	1:500	Life Technologies-Thermo Fisher, Dreieich
Alexa Fluor 594 #A21203	Esel	Maus	1:500	Life Technologies-Thermo Fisher, Dreieich

Alexa Fluor 594 #A21207	Esel	Kaninchen	1:500	Life Technologies- Thermo Fisher, Dreieich
Alexa Fluor 594 #A21468	Huhn	Ziege	1:500	Life Technologies- Thermo Fisher, Dreieich
Alexa Fluor 647 #A31571	Esel	Maus	1:500	Life Technologies- Thermo Fisher, Dreieich
Alexa Fluor 647 #A31573	Esel	Kaninchen	1:500	Life Technologies- Thermo Fisher, Dreieich
Alexa Fluor 647 #A21447	Esel	Ziege	1:500	Life Technologies- Thermo Fisher, Dreieich

**Tabelle 9: Verwendete Sekundärantikörper unter Nennung der Bestellnummer, Wirtsspezies, Reaktivität, Verdünnungsstufe und Hersteller**

### 2.1.10 Geräteliste

Gerät	Hersteller, Ort
-20 °C Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen
-80 °C Gefrierschrank	Thermo Fisher, Dreieich
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Tuttnauer Europe, Breda, Niederlande
Elektrophorese Netzteil Biometra PS 300TP	Analytikjena, Jena
Fluoreszenzmikroskop Biozero	Keyence, Neu-Isenburg
GelDoc Go Imaging System	BioRad, Kalifornien, USA
Gelkammer und Geltablett, Biometra Compact S und M	Analytikjena, Jena
GeneExplorer Thermal Cycler GE48DG	Bioer Technology, Frankfurt am Main
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop Fluoview FV10i	Olympus, Hamburg
Kryostat MEV	SLEE medical, Mainz
Kühlschrank (4 °C)	Bosch, Gerlingen
Lichtmikroskop	KERN Optics, Balingen

Magnetrührer	IKA, Staufen
Mikrowelle	Siemens, München
Minizentrifuge	VWR International, Darmstadt
MSC-Advantage biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II	Thermo Fisher, Dreieich
pH Messgerät	Mettler Toledo, Gießen
Präzisionswaage Scouz SKX621	OHAUS, Nänikon, Schweiz
Schwingmühle MM 400	Retsch, Haan
Spektralphotometer NanoDrop 2000	Thermo Fisher, Dreieich
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex Mischer	VWR International, Darmstadt
Zentrifuge Mikro 200 R	Hettich, Tuttlingen
Zoom-Stereomikroskop Bino Motic SMZ 168	MoticEurope, Barcelona, Spanien

Tabelle 10: Verwendete Geräte unter Angabe der Hersteller in alphabetischer Reihenfolge

### 2.1.11 Softwareapplikationen

Softwareapplikation	Hersteller, Ort
Adobe Photoshop CS 3 Extended	Adobe Inc., California, USA
BioRender	Science Suite Inc., Toronto, Kanada
Biozero II Analyzer Software	Keyence, Neu-Isenburg
Biozero II Viewer Software	Keyence, Neu-Isenburg
DeepL	DeepL GmbH, Köln
Fluoview FV10-ASW Version 4.1	Olympus, Hamburg
IBM SPSS Statistics Version 29.0.2.0	IBM Corporation, Armonk, USA
ImageJ2 Version 2.14.0/1.54f	Open Source unter GNU General Public Licence (Schindelin <i>et al.</i> , 2012)
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Washington, USA
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation, Washington, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Washington, USA
OriginPro Version 2023b (10.05)	OriginLab Corporation, Massachusetts, USA
SnapGene Version 7.2.0	GSL Biotech LLC, Chicago, USA
Zotero Version 7.0.6	Roy Rosenzweig Center, Fairfax, USA

Tabelle 11: Verwendete Softwareapplikationen unter Angabe der Hersteller in alphabetischer Reihenfolge

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Externe Arbeit

#### 2.2.1.1 Versuchstiere

Die für die Versuche verwendeten iNOS-KO- und Wildtypmäuse stammten jeweils vom Jackson Laboratory. In den iNOS-KO-Mäusen der Linie B6.129P2-Nos2tm1Lau/J wurden die Exons 12 und 13, die für die Calmodulin-Bindungsdomäne kodieren, durch eine Neomycin-Kassette ersetzt. Zur Kontrolle des Knockouts wurde von Mitarbeitern des CPI eine Genotypisierung mittels PCR (*polymerase chain reaction*, PCR) durchgeführt (nicht gezeigt). Die Wt-Mäuse der Linie C57BL/6J wurden als Kontrolltiere verwendet.

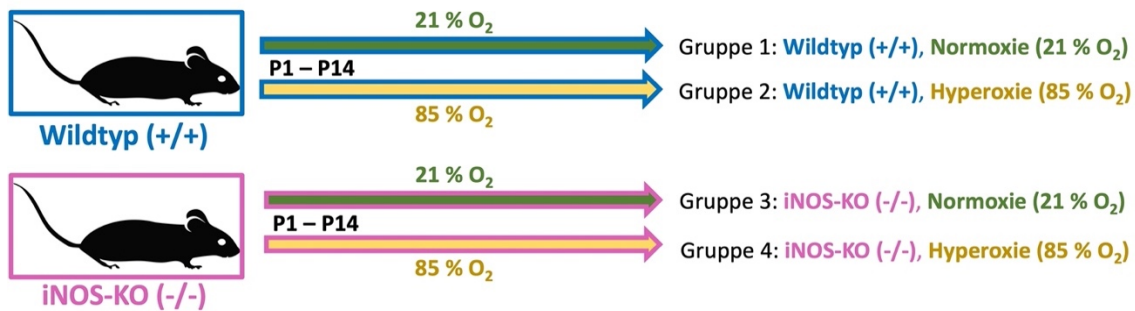
Während der Versuchszeit wurden die Tiere im Tierhaus des CPI der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten. Es wurde ein 12 Stunden Tag-Nacht-Lichtzyklus eingehalten und uneingeschränkt Wasser und Futter zur Verfügung gestellt. Das Regierungspräsidium Gießen genehmigte die Tierversuche unter dem Aktenzeichen AZ.: V 54–19 c 20 15 h 01 GI 20/10 Nr. G 89/2022.

#### 2.2.1.2 Tiermodell

Da das Projekt eine Kooperation mit dem CPI ist, wurde das verwendete Tiermodell von der Lungenabteilung definiert. Es handelt sich um ein Mausmodell zur Darstellung der bronchopulmonalen Dysplasie, in dem iNOS-KO- und Wt-Mäuse gehalten wurden. Unmittelbar nach der Geburt wurden die Muttertiere mit ihrem Wurf entweder Normoxie (21 % O<sub>2</sub>) oder Hyperoxie (85 % O<sub>2</sub>) ausgesetzt. Vom postnatalen Tag 1 bis zum postnatalen Tag 14 wurden die Mäusewelpen unter diesen Sauerstoffbedingungen gehalten.

Es entstanden vier verschiedene Versuchsgruppen, die miteinander verglichen wurden. Eine Gruppe bestand aus den Wildtypmäusen, die 14 Tage in Raumluft (21 % O<sub>2</sub>) gehalten wurden. Aufgrund dieser physiologischen Bedingungen stellten diese Tiere die Kontrollgruppe dar. Eine weitere Gruppe stellten die iNOS-KO-Mäuse dar, die ebenfalls bei Normoxie gehalten wurden. Die weiteren zwei Versuchsgruppen bestanden aus den Wt- bzw. iNOS-KO-Mäusen, die jeweils in Hyperoxie (85 % O<sub>2</sub>) gehalten wurden (Abb. 11). Für die hier vorliegende Arbeit standen jeweils zehn Wildtypmäuse aus normoxischen und hyperoxischen Bedingungen, zehn iNOS-KO-Mäuse aus 21 % O<sub>2</sub> und neun iNOS-KO-Tiere aus Hyperoxie zur Verfügung.

Nach Ende der ersten zwei Lebenswochen erfolgte die planmäßige Euthanasie der Tiere. Bevor die Eukleation stattfinden konnte, wurden von den Mitarbeitern des CPI noch Untersuchungen an den Tieren durchgeführt.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung des im Forschungsprojekt verwendeten Mausmodells**  
 Wildtyp- (blau) und iNOS-KO- (pink) Mäuse wurden postnatal von P1 bis P14 entweder in Normoxie (21 % O<sub>2</sub>, grün) oder Hyperoxie (85 % O<sub>2</sub>, gelb) gehalten, sodass vier verschiedene Versuchsgruppen entstanden, die miteinander verglichen werden konnten. (Erstellt mit Microsoft PowerPoint)

## 2.2.2 Eigene Arbeit

### 2.2.2.1 Augenentnahme und anschließende Konservierung

Nach Abschluss der Untersuchungen für das CPI wurden die Mäuse schnellstmöglich an qualifizierte Mitarbeiterinnen der experimentellen Ophthalmologie zur Augenentnahme übergeben. Zwischen Euthanasie und Enukleation entstand so eine maximale Zeitspanne von 30 Minuten.

Aufgrund des jungen Alters waren die Augenlider der Tiere meist noch verschlossen und mussten zuerst vorsichtig mit einer Pinzette eröffnet werden. Anschließend wurde mit Daumen und Zeigefinger beidseitig um das Auge herum Druck ausgeübt, um den Augapfel vorsichtig aus der Augenhöhle zu heben. Das Auge konnte jetzt kurz hinter dem Austritt des Sehnervs mit einer gebogenen Pinzette gehalten werden. Während es so fixiert war, wurde der Nerv unterhalb der Pinzette mit einer gebogenen Schere durchtrennt, wodurch das Auge aus der Augenhöhle gelöst wurde.

In diesem Zustand wurden die enukleierten Augen für die nachfolgende Immunhistochemie (siehe Abschnitt 2.2.2.3) fixiert, um das Gewebe stabil zu halten. Die Fixation der Augen erfolgte für eine oder zwei Stunden in beschrifteten 2 ml Eppendorfgefäßen mit 4 % PFA. Anschließend wurde das PFA dreimal für mindestens 15 Minuten mit 0,1 M PBS ausgewaschen. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Augen in 0,1 M PBS mit 0,02 % Natriumazid bei 4 °C aufbewahrt.

Für die molekularbiologischen Methoden (siehe Abschnitt 2.2.2.2) mussten die Netzhäute der Tiere direkt und möglichst schnell nach der Enukleation, ohne vorherige Fixation freipräpariert werden. Die Technik basierte hier grob auf der in Abschnitt 2.2.2.3.1.1 ausführlich beschriebenen flatmount-Präparation, wobei nicht so sorgfältig vorgegangen werden musste, da die Retina für diese Zwecke nicht unversehrt zu sein hatte. Es war lediglich wichtig, das gesamte Netzhautgewebe zu lösen, eine besondere

Form des Präparates war nicht erforderlich. Im Anschluss an die Präparation wurden beide Netzhäute eines Tieres in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### **2.2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

Die RNA (*ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure) ist ein einzelsträngiges Molekül mit einem Ribose-Phosphat-Gerüst und vier verschiedenen stickstoffhaltigen Basen (Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil). Es gibt drei Arten RNAs, die ribosomale RNA (rRNA), die Transfer-RNA (tRNA) und die Messenger-RNA (mRNA). Der genetische Informationsfluss läuft generell von der DNA (*deoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure), dem Speicher der genetischen Information, über die Zwischenstufe der mRNA hin zum Protein. Der Prozess, in dem die doppelsträngige DNA in die einzelsträngige mRNA-Sequenz umgeschrieben wird, heißt Transkription. Die Information der mRNA wird dann im zweiten Schritt, der Translation, in eine Proteinsequenz übersetzt. Das Enzym Reverse Transkriptase kann den normalen Transkriptionsprozess umkehren und die RNA in die stabilere cDNA (*complementary DNA*, komplementäre DNA) umschreiben (Reinard, 2021).

#### **2.2.2.2.1 RNA-Extraktion**

Um die RNA aus den Netzhäuten der Tiere zu extrahieren, wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben genutzt.

Zu Beginn wurde den Präparaten ein RLT-Puffer mit beta-Mercaptoethanol beigefügt. Der Zellaufschluss des Netzhautgewebes erfolgte dann durch mechanische Homogenisierung mit je einer Stahlkugel ( $\varnothing$  3 mm) pro 1,5 ml Eppendorfgefäß (enthielt je zwei Netzhäute eines Versuchstieres) in der Schwingmühle (20 s, 30 Hz). Die RNA lag nun frei und nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Durch Zugabe von 70 % Ethanol wurde die RNA ausgefällt und anschließend auf die RNeasy Mini Spin Columns gegeben. Die RNA konnte während einer kurzen Zentrifugation an die Membran der Säule binden, der Durchlauf wurde entfernt. Es folgte eine Waschung mit RW1 und anschließend eine Inkubation für 15 min mit einer Mischung aus RDD-Buffer und DNase-Stock-Lösung, um DNA-Reste zu entfernen. Danach folgten Waschschrte mit RW1- und RPE-Puffer, nach deren Zentrifugation der Durchfluss immer entfernt wurde. Um die Membran zu trocknen, fand zum Schluss noch eine zusätzliche zweiminütige Zentrifugation statt. Durch Zugabe von RNase freiem H<sub>2</sub>O auf die Säule und anschließender Zentrifugation wurde die RNA eluiert. Der Durchfluss wurde dann erneut auf die Säule gegeben und wieder

zentrifugiert. Der RNA-Gehalt und die Reinheit konnten anschließend photometrisch mit dem NanoDrop 2000 bestimmt werden. Gelagert wurde die RNA bei -80 °C.

#### 2.2.2.2.2 cDNA-Synthese

Zur reversen Transkription (*reverse transcription*, RT), also der Umschreibung der RNA in cDNA, wurde das PrimeScript cDNA Synthesis Kit von Takara nach Herstellerangaben verwendet. Zu Beginn wurde der jeweilige RNA-Template-Mix wie folgt angesetzt:

Komponenten	Menge
Random 6mers (50 µM)	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Template – RNA	x µl (abhängig von Konzentration der RNA, 1 µg wurde eingesetzt)
RNase freies dH <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Tabelle 12: Ansatz für den RNA-Template-Mix (10 µl) bei der cDNA-Synthese

Nachdem der Ansatz jeweils kurz durchmischt wurde, fand eine fünf Minuten lange Inkubation bei 65°C auf der Wärmeplatte statt. Die Proben wurden anschließend direkt auf Eis gestellt. Nun konnte die Reaktionsmischung nach folgendem Protokoll angesetzt werden:

Komponenten	Menge
RNA-Template-Mix	10 µl
5x Prime Script Buffer	4 µl
RNase Inhibitor (40U/µl)	0,5 µl (20 Units)
RNase freies dH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Tabelle 13: Ansatz für die Reaktionsmischung (20 µl) bei der cDNA-Synthese

Die Reaktionsmischung wurde kurz durchmischt und anschließend fand die Inkubation im Cycler bei folgenden Einstellungen statt:

Temperatur	Zeit
30 °C	10 min
42 °C	30 min
70 °C	15 min

Tabelle 14: Thermocycler-Protokoll der cDNA-Synthese

Die cDNA wurde bei einer Temperatur von -20 °C gelagert.

### 2.2.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht eine Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts *in vitro* und kann so zur Identifizierung oder zum Nachweis von Genen genutzt werden. Es werden die zu amplifizierende Ausgangs-DNA, dazu sequenzspezifische Primer, Desoxyribonukleotide und eine thermostabile DNA-Polymerase benötigt. In 20 bis 40 Zyklen findet eine Abfolge bestimmter Schritte statt. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Erhöhung der Temperatur auf ca. 95 °C getrennt (Denaturierung), anschließend wird die Temperatur so weit abgesenkt, dass die Primer an ihre komplementäre DNA-Sequenz binden können (Annealing). Schließlich werden durch Erhöhung der Temperatur auf ca. 70 °C die richtigen Bedingungen für die DNA-Polymerase geschaffen, die die Primer komplementär zur entsprechenden Sequenz verlängert, sodass wieder eine doppelsträngige DNA entsteht (Elongation). Die Durchführung mehrerer Zyklen führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA-Sequenz (Reinard, 2021).

Für den Nachweis von iNOS mittels PCR wurde ein Primerpaar mit dem Programm SnapGene entworfen. Der *reverse*-Primer #6002 bindet im iNOS-Gen in der Region von Exon 12 und 13, d.h. in der Region, die bei den iNOS-KO-Mäusen ausgetauscht wurde. Der *forward*-Primer #6003 bindet außerhalb dieser Region in Exon 10. Es wurden DNA-Fragmente von 429 Basenpaaren (*base pair*, bp) erwartet.

Als Referenz und zur Kontrolle des genetischen Ausgangsmaterials wurde zusätzlich eine PCR mit einem Primerpaar durchgeführt, das spezifisch für das in der Mäuseretina konstant und stabil exprimierte *housekeeping*-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) ist. Hier wurden DNA-Fragmente von 199 bp erwartet.

Die optimale Annealingtemperatur für die Primerpaare wurde jeweils mittels Gradienten-PCR bestimmt.

Der Reaktionsansatz für die PCR zum Nachweis von iNOS setzte sich folgendermaßen zusammen:

Komponenten	Menge
ddH <sub>2</sub> O	6,6 µl
5X Phusion HF Buffer	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
Primer #6002 (10 pmol/µl)	0,2 µl
Primer #6003 (10 pmol/µl)	0,2 µl
Phusion DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,1 µl
cDNA	0,5 µl

Tabelle 15: PCR-Reaktionsansatz (iNOS) zu je 10 µl

Die PCR wurde anschließend im Thermocycler nach folgendem Protokoll durchgeführt:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
Denaturierung	98 °C	10 s
Annealing	63 °C	10 s
Elongation	72 °C	1:30 min
Finale Elongation	72 °C	5 min
Lagerung	10 °C	∞

} 36 x

Tabelle 16: Thermocycler-Protokoll für die PCR (iNOS)

Der Reaktionsansatz für die Positivkontrolle zum Nachweis des *housekeeping*-Gens GAPDH setzte sich folgendermaßen zusammen:

Komponenten	Menge
ddH <sub>2</sub> O	11,375 µl
5X Colorless GoTaq Flexi Buffer1	5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
Primer #2189 (10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer #2190 (10 pmol/µl)	2,5 µl
GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (5u/µl)	0,125 µl
cDNA	1 µl

Tabelle 17: PCR-Reaktionsansatz (GAPDH) zu je 25 µl

Die PCR für die Positivkontrolle wurde anschließend in einem Thermocycler nach folgendem Protokoll durchgeführt:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	15 s
Annealing	60 °C	15 s
Elongation	72 °C	10 s
Finale Elongation	72 °C	2 min
Lagerung	10 °C	∞

} 36 x

Tabelle 18: Thermocycler-Protokoll für die PCR (GAPDH)

#### **2.2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese**

Nach der PCR wurde die Größenbestimmung der DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Das Grundprinzip dabei ist, dass die proportional zu ihrer Größe negativ geladene DNA durch das Gel zur Anode wandert und dabei je nach Größe durch Reibungskräfte gebremst wird (Reinard, 2021).

Zur Herstellung eines einprozentigen Gels wurde eine Gellösung aus 70 ml 1x TBE-Puffer und 0,7 g Agarose angesetzt, aufgeköcht, nach dem Abkühlen mit 2,8 µl DNA-Stain Clear G versetzt, in den Gelträger gegossen und der Kamm eingesetzt. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde es in die mit 1x TBE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer gegeben. Vor dem Auftragen der Proben in die Geltaschen wurden je nach Ausgangsvolumen 2 bzw. 5 µl Ladepuffer hinzugefügt. Als Größenstandard wurde in die äußerste Geltasche 8 µl GeneRuler 100 bp DNA Ladder pipettiert.

Die Elektrophorese wurde bei 120 Volt für 45-60 Minuten durchgeführt und die Bandentrennung im Gel anschließend mit dem UV-Transilluminator visualisiert.

#### **2.2.2.2.5 Gel-Extraktion und PCR-Aufreinigung**

Zur weiteren Untersuchung der PCR-Ergebnisse mussten die DNA-Fragmente zunächst aus dem Agarosegel extrahiert und aufgereinigt werden. Es wurde das PCR Clean-up Gel extraction Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Zuerst wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgestanzt und gewogen. Pro 100 mg wurden 200 µl NTI Buffer hinzugegeben und die Gelstücke so 5-10 min bei 50 °C auf dem bewegten Heizblock gelöst. Die DNA wurde nun durch Zentrifugation (30 s, 11.000 x g) an eine Säule gebunden und danach sorgfältig durch zweifache Verwendung von je 700 µl des NT3 Buffers gewaschen. Anschließend wurde die Säule durch Zentrifugieren (1 min, 11.000 x g) getrocknet und die DNA dann durch die Zugabe von 27 µl ddH<sub>2</sub>O in einem letzten Zentrifugationsschritt (1 min, 11.000 x g) aus der Säule eluiert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mit dem NanoDrop 2000.

#### **2.2.2.2.6 Sequenzierung nach Sanger**

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenzen der eluierten DNA wurde eine DNA-Sequenzierung nach Sanger von der Firma Microsynth Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Dazu wurden jeweils ca. 6,5 ng/µl der aufgereinigten DNA mit 3 µl des iNOS-*forward*-Primers #6003 (10 pmol/µl) zusammengegeben und mit ddH<sub>2</sub>O auf das gewünschte Endvolumen von 15 µl aufgefüllt und eingeschickt.

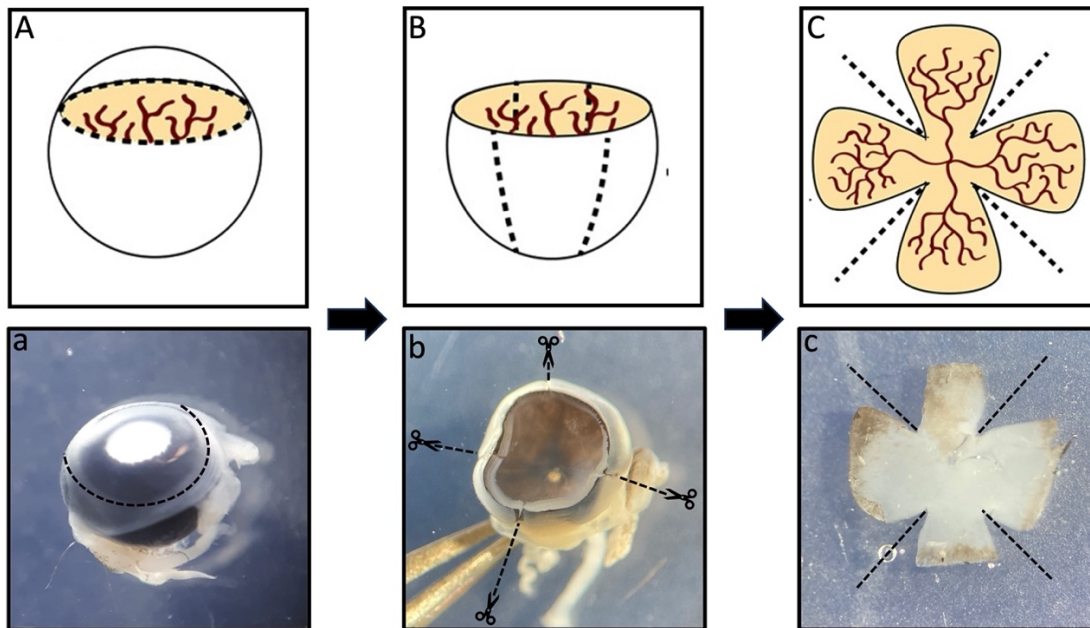
### 2.2.2.3 Immunhistochemische Methoden

#### 2.2.2.3.1 Präparation der Augen

##### 2.2.2.3.1.1 *Flatmount*-Präparation

Um die Retina in ihrer Gesamtheit zu färben, einzudecken und zu analysieren wurden sogenannte *flatmounts* präpariert. Hierbei war auf besondere Sorgfalt zu achten, um die Netzhaut nicht zu beschädigen. Für die Präparation wurde ein Binokular verwendet. Das Auge wurde zusammen mit einigen Tropfen 0,1 M PBS in eine flache Petrischale gegeben, um eine Austrocknung zu verhindern. Während das Auge posterior an Bindegeweberesten mit einer feinen Pinzette fixiert wurde, konnte oberhalb der *Ora serrata* mit einer Injektionsnadel punktiert werden. Die entstandene Einstichstelle diente für die feine Federschere als Zugang. Ein kreisförmiger Schnitt wurde entlang des Bulbusumfangs oberhalb der *Ora serrata* im Bereich des Ziliarkörpers angelegt (Abb. 12A, a). Mithilfe von Pinzetten konnte nun der anteriore Anteil des Auges, also die Cornea, die Iris und Teile des Ziliarkörpers abgelöst werden. Die Linse verblieb nach diesem Schritt häufig im Fundus des Auges. Wenn es die weitere Behandlung der Netzhaut nicht störte, wurde sie auch dort belassen, mit dem Ziel, das eröffnete Auge, eine Halbkugel, zu stabilisieren und vor Verunreinigungen zu schützen. Zur Präparation eines *flatmounts* folgte nun ein senkrechter Schnitt mit der Schere durch die Sklera und Retina in Richtung des optischen Nervs (Abb. 12B, b). Dieser Einschnitt wurde benötigt, um mit zwei Pinzetten Halt an der nun minimal freigelegten Sklera zu bekommen. Durch entgegengesetztes Ziehen an der freigelegten Sklera, konnte diese nun vorsichtig von der Retina abgelöst werden. Zusätzlich wurden durch stumpfes Vorpräparieren mit der geschlossenen Pinzette Sklera-Reste von der Netzhaut geschoben. Das Pigmentepithel verblieb in den meisten Fällen an der Sklera und die Retina war größtenteils pigmentfrei. Die beschriebene Präparationstechnik ermöglichte eine sehr sorgfältige Separation der Netzhäute. Um das Endergebnis eines kleeblatt- bzw. blumenförmigen *flatmounts* zu erzielen und die weiterhin globulären Netzhäute später flach ausbreiten zu können, waren noch weitere Inzisionen notwendig. Diese letzten Präparationsschritte wurden, wenn möglich, erst nach der Immunfärbung und kurz vor dem Eindecken durchgeführt, um das Gewebe während der Immunfärbung und den damit verbundenen Waschschritten zu schonen. In einigen Fällen wurden jedoch bereits jetzt weitere, gleichmäßig verteilte Einschnitte mit der Federschere vorgenommen (Abb. 12B, b und C, c). So konnte in Situationen, in denen die Sklera schwer zu fassen oder abzulösen war, an mehreren Stellen der Netzhaut angesetzt werden. Die Chance, die Sklera mit der Pinzette zu fassen, war nun größer, und beim Ablösen konnte von entgegengesetzten Richtungen aufeinander zugearbeitet werden. Unabhängig davon,

wie viele Schnitte zu diesem Zeitpunkt bereits durchgeführt worden waren, wurden die immer noch kugelförmigen Netzhäute nun vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pasteurpipette in das Eppendorfgefäß mit der 0,02 % Natriumazid-Lösung überführt. In diesem wurden die präparierten Netzhäute bis zum Beginn der Immunfärbung bei 4 °C gelagert.



**Abbildung 12: Schematische (A-C) und exemplarische (a-c) Darstellung einer flatmount-Präparation**

**A, a:** Ganzes Auge mit gestrichelter Linie, die den noch zu entfernenden anterioren Anteil des Auges markiert. **B, b:** Der anteriore Augenanteil (Cornea, Iris und Teile des Ziliarkörpers) wurde entfernt. Die gestrichelte Linie markiert die senkrechten Einschnitte in Richtung Papille, die für die spätere Flachlegung der Netzhaut notwendig sind (in diesem Beispiel bereits vier Inzisionen). Die Sklera ist bei b noch nicht abgelöst und die Linse befindet sich nicht mehr im Augenbecher. **C, c:** Die senkrechten Inzisionen in Richtung der Papille (gestrichelte Linien) ermöglichen die Abflachung der Netzhaut. Die Sklera und große Teile des Pigmentepithels sind in c abgetragen.

(A-C modifiziert nach Singh *et al.*, 2017 © 2017 Originally published in Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Lizenznummer: 1546508-1)

### 2.2.2.3.1.2 Präparation zur Vorbereitung der Augen für Gefrierschnitte

Zur Analyse der verschiedenen Schichten der Retina, war eine Darstellung des Auges im Querschnitt notwendig. Hierfür konnten mithilfe eines Gefriermikrotoms Gefrierschnitte angefertigt werden. Zuvor wurde eine Vorbehandlung inklusive Präparation der Augen durchgeführt. Dafür wurden sie in einer abgeflachten Petrischale mit PBS 0,1 M unter dem Binokular positioniert. Entsprechend der Präparation eines flatmounts (siehe Abschnitt 2.2.2.3.1.1) wurde zuerst oberhalb der *Ora serrata* mit einer Injektionsnadel punktiert. Diese Punktionsstelle wurde wieder als Zugang genutzt, um mit der Federschere entlang des Ziliarkörpers zu schneiden und anschließend den anterioren Anteil des Auges mit feinen Pinzetten zu entfernen. Die Präparation zur Herstellung von Gefrierschnitten war abgeschlossen, sobald Cornea, Iris, Linse und

Teile des Ziliarkörpers vom restlichen Auge gelöst waren. Bei diesen Augen verblieb die Retina im Augenbecher. Die präparierten Augen waren nun zur weiteren Behandlung für die Herstellung von Gefrierschnitten bereit.

#### **2.2.2.3.2 Gefrierschutz**

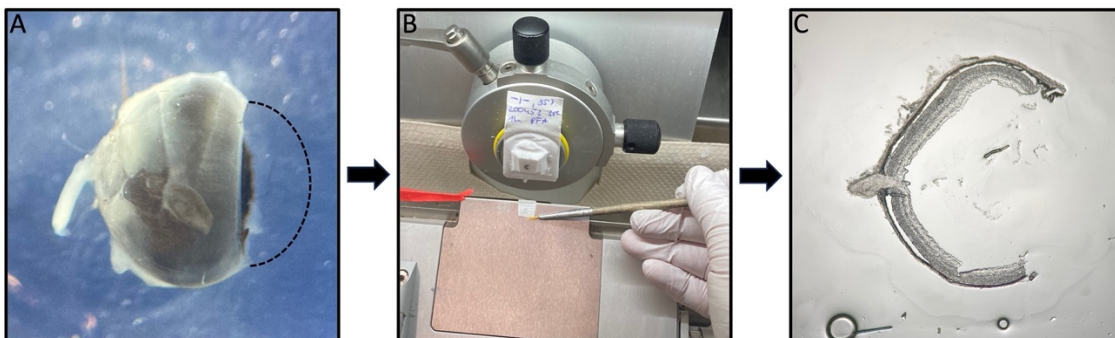
Vor der Immunfärbung erfolgte eine Inkubation der präparierten Augen bzw. Netzhäute in aufsteigender Sucrose-Reihe. Die Nutzung von Zucker verhindert die Entstehung von Wasserkristallen während des späteren Einfrierens. Bei Raumtemperatur wurden die Gewebe zunächst mindestens eine Stunde lang in zehnprozentiger Sucrose in einem Eppendorfgefäß auf dem Taumelschüttler gelagert, sodass sie auf den Boden absanken. Es folgte eine weitere Stunde in zwanzigprozentiger Sucroselösung unter den gleichen Bedingungen. In der höchsten Stufe der Sucrose-Reihe (30 %) verblieben die Augen nun über Nacht bei 4 °C. Die separierten Netzhäute für die *flatmounts* wurden am nächsten Tag in den Eppendorfgefäßen mit der dreißigprozentigen Sucrose bei -20 °C eingefroren. Die Präparate sollten für mindestens zwei Stunden einmal komplett durchfrieren, bevor sie anschließend bei Raumtemperatur wieder langsam aufgetaut werden konnten. Nach sorgfältigem Auswaschen der Sucrose mit Hilfe von 0,1 M PBS, konnte mit dem Färbeprotokoll für die *flatmounts* begonnen werden.

Die Augen, die für die Anfertigung von Gefrierschnitten präpariert worden waren, wurden auf einem anderen Weg vereist und verblieben dann auch in diesem tiefgefrorenen Zustand (siehe Abschnitt 2.2.2.3.3).

#### **2.2.2.3.3 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Nachdem die für die Gefrierschnitte vorbereiteten Augen die aufsteigende Sucrose-Reihe (10 %, 20 %, 30 %) durchlaufen hatten, wurde eine Mixtur im 1:1-Mischverhältnis aus der dreißigprozentigen Sucroselösung und Tissue-Tek Compound angefertigt. Aufgrund der Viskosität des Tissue-Tek Compounds wurde zum Pipettieren die Spitze abgeschnitten. Zum Mischen der beiden Komponenten wurde mehrmals auf und ab pipettiert und zusätzlich der Vortex verwendet. Pro Auge wurden nun ca. 500 µl der Flüssigkeit in das jeweilige Eppendorfgefäß gegeben und für mindestens eine Stunde auf dem Taumelschüttler bei Raumtemperatur gelagert. Für jedes Auge wurde jeweils eine der kleinsten Einbettformen passend beschriftet und dann von einer Ecke ausgehend mit Tissue-Tek befüllt. Die Augen wurden dann aus den Eppendorfgefäßen entnommen und vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette in der Einbettform platziert. Unter dem Binokular konnte das Auge jetzt durch leichtes Schieben mit der geschlossenen Pinzette richtig positioniert werden. Ziel war, dass der offen präparierte Teil des Auges nach rechts zeigt und der optische Nerv nach links, das Auge sollte dabei möglichst senkrecht

liegen und in keine Richtung wegkippen (Abb. 13A). In dieser Ausrichtung wurden die Augen mit Hilfe eines Metallblocks, der in flüssigem Stickstoff in einer Styroporbox stand, eingefroren. Nach Entfernung aus der Einbettform, wurden die gefrorenen Gewebelöckchen mit Hilfe von destilliertem Wasser und etwas Gefriereinbettmedium über ein passend beschriftetes Filterpapier auf einen Objekteller gesockelt. So konnte das Gewebelöckchen in dem Gefriermikrotom positioniert werden. Die Kammertemperatur betrug zwischen  $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$  und die Schnittdicke wurde auf  $14\text{ }\mu\text{m}$  eingestellt (Abb. 13B). Beim Anschneiden wurden die ersten Schnitte zur Kontrolle, ob das Gewebe bereits erreicht wurde, zunächst auf einfache Glasobjektträger aufgezogen und anschließend unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Sobald das Auge wie gewünscht im Querschnitt getroffen war und die Form des Buchstabens „C“ hatte, wurden immer drei Schnitte hintereinander auf mit Bleistift beschriftete SuperFrost Plus-Objektträger gezogen (Abb. 13C). Die Qualität der einzelnen Schnitte wurde unter dem Mikroskop beurteilt, und einwandfreie Schnitte wurden anschließend mit einem kleinen Punkt auf dem Glas markiert, um die Auswahl günstiger Objektträger für die spätere Färbung zu erleichtern. Die Aufbewahrung fand bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Objektträgerkästen statt. Falls die Präparate nicht direkt nach dem Einfrieren oder nicht vollständig in einer Sitzung geschnitten werden konnten, wurden die Blöckchen in Parafilm und Alufolie bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.



**Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der Herstellung von Gefrierschnitten**

**A:** Für Gefrierschnitte präpariertes Auge mit entferntem anterioren Anteil. Die gestrichelte Linie stellt den entfernten Teil des Auges dar. In dieser Ausrichtung (eröffneter Augenbecher zeigt nach rechts und der Sehnerv nach links) wurde das Auge eingebettet. **B:** Das Gewebelöckchen wurde über ein beschriftetes Filterpapier auf einem Objekteller gesockelt und im Gefriermikrotom positioniert. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von  $14\text{ }\mu\text{m}$  angefertigt. **C:** Beispiel eines Schnittes, der das Auge genau im Querschnitt trifft.

#### 2.2.2.3.4 Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Visualisierung unterschiedlicher Strukturen der Retina wurde hauptsächlich das Prinzip der indirekten Fluoreszenzfärbung angewandt. Hier bindet zuerst ein Primärantikörper spezifisch an das Zielantigen. Nach dreimaligem Waschschrift wird ein Fluorochrom-markierter Sekundärantikörper dazugegeben, um an den primären Antikörper zu binden. Im Gegensatz zur direkten Fluoreszenzfärbung, bei der ein an

Fluorochrom gekoppelter Primärantikörper direkt bindet, hat diese Methode den Vorteil einer hohen Empfindlichkeit und einer möglichen Signalverstärkung (Im *et al.*, 2019).

Der Ablauf für die in dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen orientiert sich an im Labor für experimentelle Ophthalmologie in Gießen etablierten Protokollen (Müller *et al.*, 2007, 2017).

#### **2.2.2.3.4.1 Färbeprotokoll für die Gefrierschnitte**

Es wurden Objektträger mit möglichst guten Schnitten ausgewählt und 30 Minuten bei Raumtemperatur zum Antrocknen rausgelegt. Danach wurden die getrockneten Objektträger dreimal für mindestens 15 Minuten in einer Glasküvette mit PBS (0,1 M) gewaschen. Dieser Vorgang fand auf dem Taumelschüttler statt. Nach dem Waschen der Objektträger fand die Permeabilisierung statt. In die Glasküvette mit den Präparaten wurde die Permeabilisierungslösung aus 0,5 % Triton x 100 in PBS (0,1 M) gegeben und für 45-60 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Hierdurch konnten Zellmembranlipide gelöst werden, um später den Antikörpern das Eindringen zu erleichtern. Nach der Permeabilisierung wurden die Objektträger noch einmal kurz in 0,1 M PBS gegeben, bevor die Primärantikörperinkubation stattfand. Die Objektträger wurden aus der Küvette genommen und durch Abtupfen mit einem Papiertuch vorsichtig abgetrocknet, dabei sollte immer ein Sicherheitsabstand zu den Schnitten gewahrt werden, um eine Beschädigung zu vermeiden. Jetzt wurden die Objektträger mit Abstand zueinander in einer feuchten Kammer positioniert. Gemäß der Tabelle 8 wurden die zu verwendenden Primärantikörper im Antikörpermedium verdünnt und zentrifugiert. Anschließend wurden dann ca. 60 µl dieser Primärantikörperlösung gleichmäßig auf die drei Gefrierschnitte gegeben. Direkt im Anschluss wurde ein passend zugeschnittenes Rechteck aus Parafilm mit einer Pinzette möglichst blasenfrei auf die Präparate gelegt. Dadurch konnte ein Verdunsten der Antikörperlösung verhindert werden. Die Inkubation der Schnitte fand über Nacht bei 4 °C bei Dunkelheit statt. Am nächsten Tag wurden die Parafilmstreifen vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Um die Entfernung zu erleichtern, wurde vorher etwas PBS mit einer Pipette auf die Objektträger gegeben, um den Parafilm zum Schwimmen zu bringen. Die Präparate wurden anschließend erneut in einer Küvette mit PBS (0,1 M) dreimal für mindestens 15 Minuten gewaschen. Im Fall von Isolectin B4 (Iso), welches schon ein konjugiertes Chromophor enthält musste dieser Schritt bereits in Dunkelheit stattfinden. In der Zwischenzeit wurden die Zweitantikörper und DAPI mit dem Antikörpermedium verdünnt (siehe Tabelle 9). Die entstandene Sekundärantikörperlösung musste dann für fünf Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert werden. Nach dem Waschen wurden die Objektträger wieder vorsichtig mit

Papiertüchern rund um die Schnitte abgetupft und in der feuchten Kammer platziert. Von der Sekundärantikörperlösung wurden ca. 100 µl pro Objektträger verwendet. Anschließend wurden die Schnitte wieder mit Parafilm abgedeckt. Die feuchte Kammer sollte im Anschluss direkt verdunkelt werden, um eine Lichtexposition der Schnitte zu vermeiden. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper fand für ca. zwei Stunden bei Raumtemperatur statt. Nach drei letzten Waschgängen in PBS, konnte mit dem Eindecken der Objektträger begonnen werden. Mit Papiertüchern wurde wieder vorsichtig um die Präparate abgetrocknet. Entlang der drei Schnitte wurde nun ein Streifen Fluorocent Mounting Medium aufgetragen und mit einem rechteckigen Deckgläschen von einer Seite ausgehend mithilfe einer Pinzette möglichst blasenfrei abgedeckt. Gelagert wurden die gefärbten Kryoschnitte dann bei 4 °C in Dunkelheit. Jeweils ein Objektträger wurde als Negativkontrolle nur mit dem Sekundärantikörper und DAPI gefärbt.

#### **2.2.2.3.5 Färbeprotokoll für die *flatmounts***

Nach dreimaligem Auswaschen der aufgetauten dreißigprozentigen Sucrose mit PBS, fand die Permeabilisierung der Netzhäute in den Eppendorfgefäßen statt. Dafür wurde eine Lösung mit 1 % Triton x 100 in 0,1 M PBS angesetzt. Pro Netzhaut wurden ca. 200 µl der Lösung in das entsprechende Eppendorfgefäß pipettiert. Die Inkubation fand für eine Stunde auf dem Taumelschüttler statt. Währenddessen wurden die zu verwendenden Erstantikörper entsprechend der Tabelle 8 im Antikörpermedium verdünnt und danach zentrifugiert. Nach Abpipettieren der Permeabilisierungslösung wurden nun ca. 150 µl der Primärantikörperlösung pro Retina aufgetragen. Zuerst sollten die Präparate für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler verweilen und erst anschließend im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden. Hier erfolgte die weitere Inkubationszeit von drei Tagen. Wenn z.B. Isolectin mit einem gekoppelten Fluorochrom in der ersten Antikörperlösung enthalten war, musste der gesamte Schritt bereits im Dunkeln durchgeführt werden, um ein vorzeitiges Ausbleichen zu vermeiden. Um die Primärantikörperlösung nach vollendeter Inkubationszeit auszuwaschen, wurde wieder dreimal für mind. 30 Minuten mit 0,1 M PBS gewaschen. Zuvor sollten die Präparate noch ca. eine Stunde auf dem Taumelschüttler bei Raumtemperatur aufwärmen. Die Sekundärantikörperlösung wurde in einem abgedunkelten Eppendorfgefäß angesetzt, in dem die entsprechenden Sekundärantikörper und DAPI in dem Antikörpermedium verdünnt wurden (siehe Tabelle 9). Die Lösung wurde im Anschluss bei 13.000 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Ca. 150 µl der Antikörperlösung wurden pro Netzhaut in das Eppendorfgefäß pipettiert. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper fand über Nacht bei 4 °C in einer abgedunkelten Box statt. Am

nächsten Tag wurde die Sekundärantikörperlösung dreimal für mind. 15 Minuten mit 0,1 M PBS ausgewaschen. Die *flatmounts* wurden bis zum Eindecken in 0,1 M PBS bei 4 °C in Dunkelheit gelagert.

Auch bei den *flatmounts* wurden ausgewählte Präparate jeweils nur mit dem entsprechenden Sekundärantikörper und DAPI gefärbt, um als Negativkontrolle zu dienen.

#### **2.2.2.4 Eindecken der *flatmounts***

Nach der Fluoreszenzfärbung waren die Netzhäute bereit zum Eindecken. Zuvor wurden sie mithilfe einer beschnittenen Einmalpipette in eine flache Petrischale unter dem Binokular platziert. Mit gegensätzlichen Bewegungen von zwei Pinzetten und der zusätzlichen Nutzung einer kleinen Federschere wurden die *flatmounts* vorsichtig von Resten des Pigments und des Ziliarkörpers, Fusseln oder Verunreinigungen gesäubert. Teilweise wurde erst in diesem Schritt die Linse entfernt, wenn diese sich nicht schon bei der Präparation gelöst hatte. Wenn die Netzhaut sauber vorlag, wurde das Flüssigkeitslevel mit einer Pipette verringert. Jetzt war es leichter mit einem Skalpell oder auch der Schere, äquivalent zum ersten Einschnitt aus der vorherigen Präparation, drei- bis fünf weitere senkrechte Schnitte in Richtung des optischen Nervs zu setzen. Die Schnitte sollten dabei in einem möglichst gleichmäßigen Abstand zueinander liegen und nicht zu tief Richtung Papille reichen (siehe auch Abb. 12B, b und C, c). Die Anzahl der Einschnitte wurde danach bestimmt, inwiefern sich die jeweilige Netzhaut flach ausbreiten ließ. Wenn eine Retina sehr starr in ihrer kugeligen Form verblieb, waren mehr Einschnitte erforderlich, um die gesamte Netzhaut ohne einrollende Ränder flach darzustellen. In anderen Fällen reichten bereits vier Einschnitte insgesamt. Als Endergebnis sollte später, je nach Anzahl der Schnitte, eine kleeblatt- oder blumenförmige, vollständige Netzhaut vorliegen.

Für jeden *flatmount* wurde jeweils ein Objektträger vorbereitet und passend mit Bleistift beschriftet. Vor dem Aufbringen des *flatmounts* auf den Objektträger wurden rechts und links von der Mitte im Abstand von ca. 1 cm zwei kleine Fragmente eines zerkleinerten Deckgläschens mit je einem Tropfen Dako Mounting Medium platziert. Diese Glassplitter sollten so klein wie möglich sein, und dienten als Abstandshalter für die Retina, um ein Plattdrücken und Quetschen der Netzhaut unter dem eigentlichen Deckglas zu verhindern. Nach Positionierung dieser Abstandshalter konnte der *flatmount* mit Hilfe der beschnittenen Pipette und möglichst wenig PBS auf den Objektträger übertragen werden. Um die Retina jetzt präzise und flach hinzulegen, wurde der Wasserstand mit Pipetten und Stücken von Handtüchern minimiert. Wenn dies nicht ausreichte, um die Netzhaut flach auf dem Objektträger zu halten, wurden dünne Filterpapierstreifen

verwendet, um die entsprechenden Segmente des *flatmounts* einzeln aufzuklappen und auf dem Glas zu halten. Die Ausrichtung der Netzhaut durfte nicht zu viel Zeit in Anspruch nehmen, um ein Austrocknen zu verhindern. Wenn die Retina zufriedenstellend positioniert war, wurde auf ein quadratisches Deckglas (22 mm x 22 mm) ein Streifen Dako Mounting Medium appliziert und dann mit Hilfe einer Pinzette von einer Seite ausgehend vorsichtig auf der Retina abgelegt. Hierbei musste zügig und gleichzeitig sehr vorsichtig vorgegangen werden, um ein Einfalten der Segmente sowie die Entstehung von Blasen auf dem Präparat zu verhindern. In diesem Zustand trocknete das Medium auf dem Objektträger in Dunkelheit an. Anschließend wurden die Außenkanten des Deckgläschens mit einem Nagellack mehrfach versiegelt, um Lufteinschlüsse und ein Austrocknen während der Lagerung zu verhindern. Die *flatmounts* wurden bei 4 °C in Dunkelheit aufbewahrt.

#### **2.2.2.5 Mikroskopie der Gewebe**

Zur Darstellung und Betrachtung der verschiedenen Immunfluoreszenzfärbungen an den Gefrierschnitten und den *flatmounts* wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop Olympus Fluoview FV10i genutzt. Von allen Präparaten wurden Übersichtsaufnahmen mit dem 10x Objektiv aufgenommen. Von den Gefrierschnitten wurden zentral und peripher der Retina Aufnahmen mit dem 10x Objektiv und zusätzlicher 2,3-fachen Vergrößerung gemacht, um alle Schichten darzustellen. Für Detailaufnahmen einzelner Schichten und Strukturen, wurde das 60x Objektiv verwendet. Der Abstand zwischen den einzelnen optischen-Ebenen (Z-Ebenen) verblieb immer auf 1 µm und die Anzahl dieser Ebenen pro *stack* lag bei ca. 10-20.

Für die *flatmounts* wurde sowohl das 10x als auch das 60x Objektiv verwendet. Für die Aufnahmen mit dem 10x Objektiv wurde der Abstand der einzelnen Z-Ebenen auf 1,5 µm erhöht, die *stacks* bestanden hierbei aus ca. 40 Ebenen. Details wurden auch in den *flatmounts* mit dem 60x Objektiv aufgenommen und der Abstand wurde hierfür wieder auf 1 µm reduziert. Wegen der Dicke der Präparate, bestanden die Aufnahmen jetzt aus ca. 70-100 Ebenen. Durch die manuelle Einstellung der Laserintensität wurde immer versucht, Überbelichtungen zu vermeiden. Die genauen Einstellungen der jeweiligen Laser wurden dokumentiert und für die entsprechenden Negativkontrollen übernommen.

Um die *flatmounts* zusätzlich detailgetreu in ihrer Gesamtheit zu zeigen, wurde hier ergänzend das Fluoreszenz-Mikroskop Biozero von Keyence verwendet. Pro *flatmount* wurden hiermit insgesamt zwölf angrenzende Aufnahmen angefertigt, um die ganze Netzhaut lückenlos darzustellen. Es wurde mit dem 4x Objektiv gearbeitet und die optischen Ebenen hatten einen Abstand von ca. 2 µm. Die *stacks* enthielten so ca. 25-

45 optische Ebenen. Aus jeder der zwölf Aufnahmen wurde ein „*full-focus*“, erstellt, also eine Projektion aus ausschließlich scharf fokussierten Bereichen aller Ebenen. Anschließend wurden diese zwölf Bilder zusammengefügt, sodass ein scharfes und detailgetreues Gesamtbild der Retina entstand.

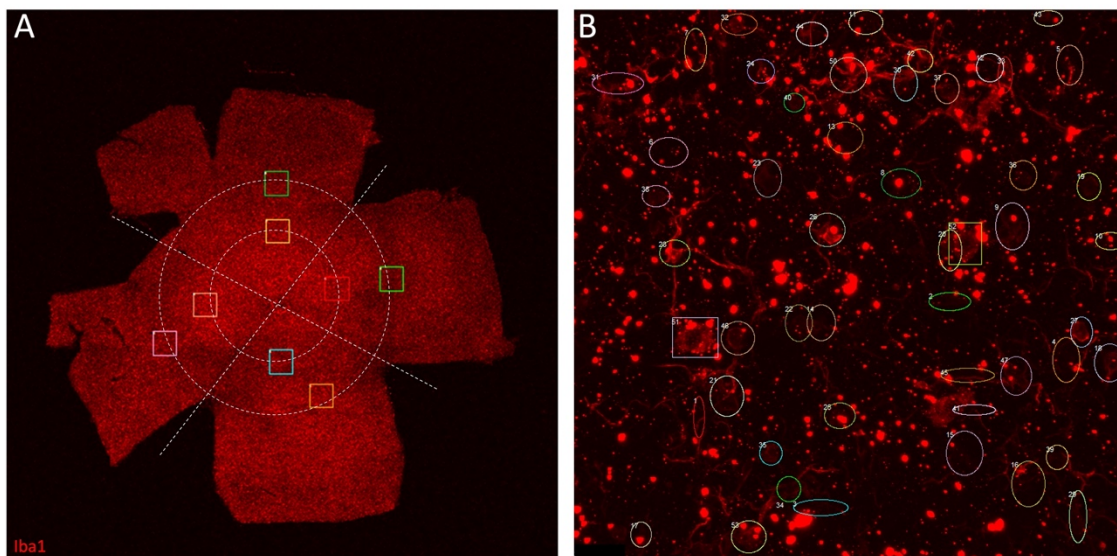
#### **2.2.2.6 Bildbearbeitung der Aufnahmen**

Mit dem Programm FV 10 - ASW 4.2 Viewer des Olympus Mikroskops wurden, nach erster Auswertung der unbearbeiteten Aufnahmen, Projektionen hergestellt. Hierbei wurde die Anzahl der Z-Ebenen auf ein Minimum verringert, um unscharfe Bereiche zu verringern und bestimmte Details möglichst fokussiert darstellen zu können. Zusätzlich wurde in die Aufnahmen ein Maßstab eingefügt, um Größenverhältnisse unabhängig von der Vergrößerung der Aufnahmen einschätzen zu können. Die Bilder konnten anschließend mit Adobe Photoshop bearbeitet werden. Es wurde immer eine Tonwertkorrektur durchgeführt. Abhängig davon, welche Färbungen im Fokus standen und gezeigt werden sollten, wurden teilweise Kanäle ausgeblendet oder nur anteilig im Bild integriert. Zusätzlich wurden die Bilder beschriftet, um eine eindeutige Zuordnung zu den Versuchsgruppen zu gewährleisten, und auch der Maßstab wurde optisch hervorgehoben und beschriftet.

#### **2.2.2.7 Zählung der Mikrogliazellen**

Um eine erste Tendenz über Unterschiede in der Anzahl der Mikroglia in den Netzhäuten zu erhalten, wurden die Mikroglia in den vier Versuchsgruppen gezählt. Die Zählung fand dabei an *flatmounts* statt, in denen die Mikroglia durch Färbung mit Iba1 dargestellt wurden. Da das 10x Objektiv für eine detaillierte Darstellung der Gliazellen nicht ausreichte, wurden Aufnahmen in höherer Vergrößerung mit dem 60x Objektiv für die Zählung verwendet (*area*: ca. 45.000  $\mu\text{m}^2$ ). Von jedem Präparat wurden jeweils acht unterschiedlich positionierte Aufnahmen der Retina angefertigt. Dazu wurde der *flatmount* für diese Aufnahmen in vier Quadranten unterteilt, indem er zweimal durch die Mitte der Papille geteilt wurde. Vier der Aufnahmen wurden dann in relativer Nähe zur Papille, in jeweils einem der vier Quadranten angefertigt. Die Papille sollte in den Aufnahmen jedoch nicht angeschnitten sein. Eine weitere Aufnahme pro Quadranten wurde dann im Abstand zur ersten Aufnahme weiter in Richtung Peripherie gemacht. Durch Verbinden dieser Positionen ergaben sich zwei unterschiedlich große Kreise um die Papille (Abb. 14A). Die Aufnahmen wurden dann bei einer Vergrößerung von 83 % einzeln mit dem Programm Olympus Fluoview Version 4.1a geöffnet. Damit war es möglich, sich schrittweise durch die verschiedenen Ebenen der Aufnahmen zu klicken. Außerdem konnten jederzeit Projektionen ausgewählter, aufeinanderfolgender optischer

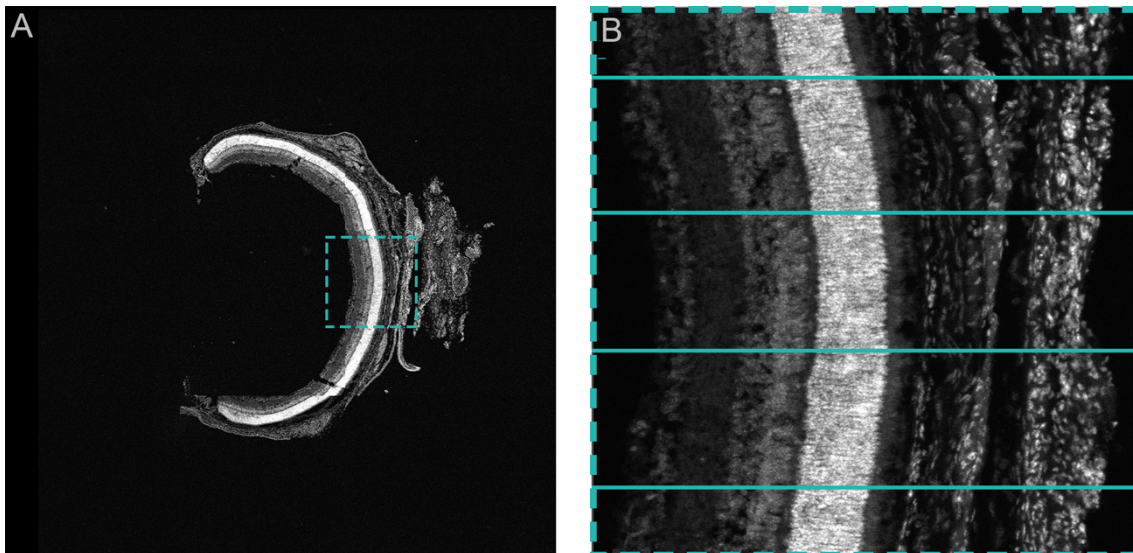
Ebenen erstellt werden. Zur besseren Darstellung der Mikroglia wurde nur der Kanal ausgewählt, der die Iba1 Färbung darstellte, die anderen Kanäle wurden zunächst ausgeschaltet. Um die einzelnen Mikroglia mit ihren feinen Fortsätzen besser abgrenzen zu können, wurde die Aufnahme ohne Farbe in schwarz und weiß betrachtet. Über die ROI-Toolbar am linken Rand des Programms, konnte die Ellipsen-Markier-Funktion ausgewählt werden. Jetzt wurden die einzelnen Ebenen der Aufnahme langsam von Anfang bis Ende durchgesehen und jede auftretende Mikrogliazelle einzeln markiert (Abb. 14B). Die Markierungen wurden von dem Programm automatisch durchgezählt und zusätzlich wurde für jede Zelle dokumentiert, in welcher optischen Ebene sie das erste Mal zu sehen war und in welcher Ebene zuletzt, um die Zählung nachvollziehbar zu gestalten. Durch dieses schrittweise Vorgehen sollte eine Doppelzählung der Mikrogliazellen vermieden werden. Dies wäre bei Zählungen an großen Projektionen der Fall gewesen, da die Mikroglia unterschiedlich über die Schichten der Netzhaut hinweg verteilt waren und eine genaue Abgrenzung ihrer komplexen Struktur so sehr schwierig gewesen wäre. Als Mikrogliazellen wurden mit Iba1 gefärbte Strukturen gezählt, die ein Soma aufzeigten, von welchem Fortsätze ausgingen. Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, wurde vor der Auszählung festgelegt, dass Zellen, die nur teilweise an den Rändern in die Aufnahme hineinragten, nur an zwei der vier Seiten mitgezählt werden würden. Durch diese Technik sollte vermieden werden, dass zu viele oder zu wenige Mikroglia gezählt werden würden.



**Abbildung 14: Positionierung der verschiedenen Aufnahmen für die Mikroglia-Zählung in flatmounts**  
**A:** Die mit Iba1 (rot) gefärbten Netzhäute wurden durch die Papille in vier Abschnitte aufgeteilt (gestrichelte gekreuzte Linien), und in jedem Quadranten wurden zwei Aufnahmen bei maximaler Vergrößerung (x60 Objektiv) angefertigt (farbige Quadrate), die, wenn sie miteinander verbunden wurden, zwei Kreise ergaben, einen inneren Kreis nahe der Papille und einen etwas weiter peripher gelegenen Kreis (gestrichelte Kreise). **B:** Beispielhafte Aufnahme in höchster Vergrößerung, in der die Mikrogliazellen durch alle Schichten hinweg gezählt und jeweils farblich markiert wurden.

### 2.2.2.8 Dickenmessung der Retina, ONL und INL

Um mögliche Dickenunterschiede der gesamten Netzhaut sowie der ONL und INL unter den vier Versuchsgruppen zu ermitteln, wurde die ImageJ2 Software eingesetzt. Es wurden jeweils mit DAPI gefärbte Gefrierschnitte aller Versuchsgruppen ausgewählt, bei denen die Retina der Tiere möglichst mittig getroffen und gut erhalten war. Gemessen wurde an den mit dem Olympus Fluoview FV10i angefertigten Aufnahmen in 23-facher Vergrößerung auf Objektivebene ( $area: ca. 306.000 \mu m^2$ ). In diesen wurde die Netzhaut mit allen Schichten detailliert dargestellt. Für die Messungen wurden nur zentrale Aufnahmen ausgewählt, die maximal zwei Aufnahme- bzw. Messfelder vom Mittelpunkt des annähernd halbkreisförmig dargestellten Auges entfernt waren (Abb. 15A). Bevor die Messung an den Aufnahmen begonnen werden konnte, wurden die Dateinamen der verschiedenen Aufnahmen von einer außenstehenden, unabhängigen Person randomisiert. Dadurch war eine unbefangene Messung möglich. Die randomisierten Aufnahmen wurden anschließend nacheinander in ImageJ2 geöffnet und eine 70 % Vergrößerung ausgewählt, um die Details eindeutig zu erkennen. Dann wurde die schärfste Einzelaufnahme der verschiedenen Ebenen ausgewählt. Um sicherzustellen, dass die Vermessungen in allen Aufnahmen in ungefähr den gleichen Bereichen stattfanden, wurde über die Tools-Funktion von ImageJ2 ein Raster mit einer *area per point* von 19140,0308 in Form von horizontalen Linien über die Aufnahme gelegt. Es entstand eine gleichmäßige Aufteilung des Bildes (Abb. 15B). Für jede Struktur (gesamte Retina, ONL, INL) wurden pro Aufnahme drei Messungen durchgeführt. Die Messungen erfolgten in je einem der drei mittleren, gleichgroßen Rechtecke des eingefügten Gitters. Zur Messung der gesamten Retinadicke wurde das Präparat abwechselnd im Durchlicht und auch in der DAPI-Färbung betrachtet. Alle anderen Farbkanäle wurden nicht beachtet und ausgeblendet. Um die einzelnen Schichten besser gegeneinander abgrenzen zu können, konnte der Kontrast in den zwei verwendeten Kanälen angepasst werden. Für die Dickenmessung der ONL und INL wurde die gleiche Taktik der Drittelung angewandt, nur dass hier ausschließlich die DAPI-Färbung zur Vermessung herangezogen wurde. Durch die hohe Dichte an Perikaryen mit Zellkernen, die durch DAPI visualisiert werden, konnte die Ausdehnung der ONL und INL hier gut bestimmt werden. Am Ende wurden die Messergebnisse der randomisierten Aufnahmen wieder den jeweiligen Versuchsgruppen zugeordnet und die Werte zwischen den Gruppen verglichen.



**Abbildung 15: Exemplarisch mit DAPI gefärbter Gefrierschnitt eines Mäuseauges zur Vermessung der verschiedenen Retinaschichten**

**A:** Mit DAPI-Kernfärbung gefärbter Querschnitt eines Präparates mit zentralem Auswahlbereich (gestricheltes Quadrat) im Präparat für die Vergrößerung zur Dickenmessung. **B:** Vergrößerung des mit DAPI angefärbten Auswahlbereichs aus **A** mit eingefügtem Raster (blaue Horizontallinien) zur Festlegung der Messbereiche. In jedem ausgewählten Gefrierschnitt wurde die Gesamtretnadicke, die ONL-Dicke und die INL-Dicke jeweils in den drei durch das Raster definierten mittigen Rechtecken gemessen.

### 2.2.2.9 Statistische Auswertung

Excel, OriginLab und SPSS wurden verwendet, um die Ergebnisse der Retinadickenmessungen (Gesamtdicke, ONL-Dicke, INL-Dicke) statistisch auszuwerten und in geeigneten Diagrammen darzustellen.

Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde überprüft, ob jeweils eine Normalverteilung der Messwerte angenommen werden konnte.

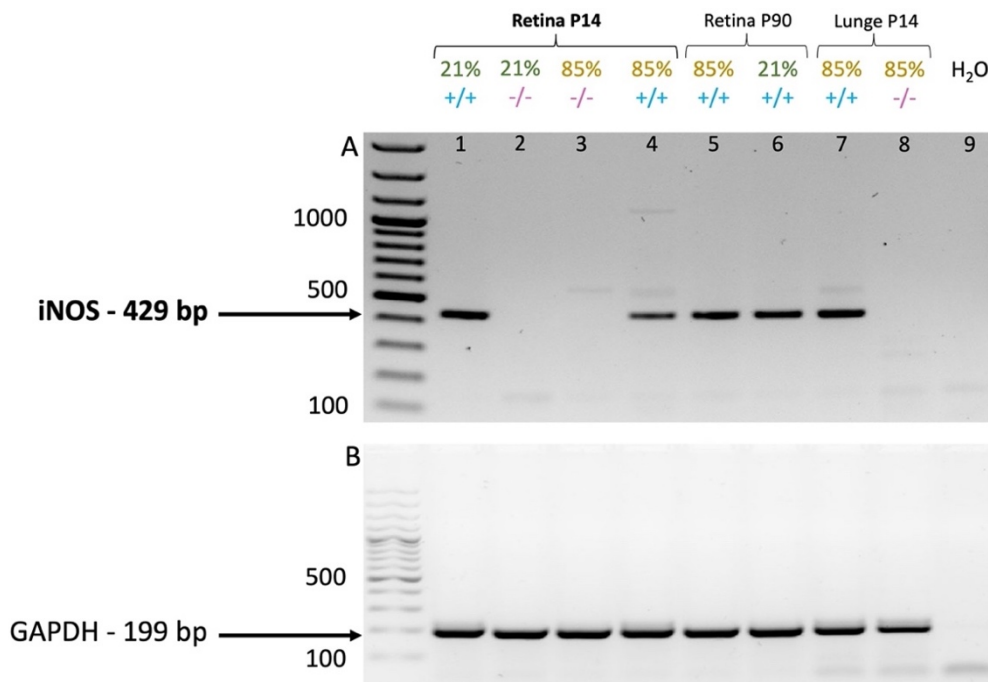
Bei Annahme einer Normalverteilung folgte die Anwendung parametrischer Tests. Zunächst wurde mit dem Levene-Test auf Varianzhomogenität getestet. Bei nachgewiesener Varianzhomogenität wurde die klassische einfaktorische ANOVA verwendet, bei Varianzungleichheit hingegen der robustere Welch-ANOVA-Test, um Signifikanzunterschiede zwischen den Mittelwerten der Messwerte zu detektieren. Um festzustellen, zwischen welchen Gruppen die Unterschiede bestanden, wurde bei gleichen Varianzen der Tukey-HSD-Test als Post-hoc-Test und bei ungleichen Varianzen der Games-Howell-Test eingesetzt.

Wenn für die Werte einer Messung keine Normalverteilung angenommen werden konnte, wurden nichtparametrische Tests angewendet. Als Alternative zur ANOVA kam der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz. Als Post-hoc-Test wurde anschließend der Mann-Whitney-Test verwendet, um die Gruppen paarweise miteinander zu vergleichen. Abschließend wurde eine Holm-Bonferroni-Korrektur der p-Werte durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Reverse Transkriptase-PCR zum Nachweis der Expression von iNOS in der Retina

Um eine Aussage über das Vorhandensein von iNOS in der Retina der Versuchstiere auf Transkriptionsniveau treffen zu können, wurde eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mithilfe einer Gel-Elektrophorese in 1 % Agarosegel optisch dargestellt. Das erwartete PCR-Produkt für iNOS lag bei 429 bp. Zur qualitativen und quantitativen Kontrolle der extrahierten RNA wurde mit dem Material der Versuchstiere zusätzlich eine PCR mit dem Referenzgen GAPDH durchgeführt, wobei dabei ein PCR-Produkt auf Höhe von 199 bp zu erwarten war. Die Negativkontrolle (Abb. 16, *lane 9*), bei der die cDNA durch H<sub>2</sub>O ersetzt wurde, zeigte für beide durchgeführten PCRs im Gel keine Bande. Alle weiteren untersuchten Proben zeigten für das Referenzgen GAPDH eine eindeutige Bande bei ca. 199 bp (Abb. 16B). Die cDNA aus dem Lungengewebe der P14 Versuchstiere aus Hyperoxie wurde zusätzlich als Vergleichsmaterial in der PCR verwendet. Die Probe des Lungengewebes der Wildtypmaus zeigte im Bereich der 429 bp eine eindeutige Bande für iNOS und diente damit als Positivkontrolle (Abb. 16A, *lane 7*). Das Lungengewebe der iNOS-KO-Maus aus der Hyperoxie zeigte kein PCR-Produkt und funktionierte dementsprechend als zusätzliche Negativ-Kontrolle für das zu untersuchende Material aus der Retina (Abb. 16A, *lane 8*).



**Abbildung 16: RT-PCR zum Nachweis von iNOS (A) und GAPDH (B)**

RT-PCR zum Nachweis von iNOS (A) mit einem erwarteten PCR-Produkt von 429 bp und RT-PCR zum Nachweis des *housekeeping*-Gens GAPDH (B) mit einem erwarteten PCR-Produkt von 199 bp. 1: Retina, P14, Wt / 21 %; 2: Retina, P14, iNOS-KO / 21 %; 3: Retina, P14, iNOS-KO / 85 %; 4: Retina, P14, Wt / 85 %; 5: Retina, P90, Wt / 85 %; 6: Retina, P90, Wt / 21%; 7: Lungengewebe, P14, Wt / 85 %; 8: Lungengewebe, P14, iNOS-KO / 85 %; 9: Wasserkontrolle

Für die Proben des Retinagewebes der P14 Wildtypmäuse aus 21 % O<sub>2</sub> (Abb. 16A, *lane* 1) und 85 % O<sub>2</sub> (Abb. 16A, *lane* 4) war jeweils eine klare Bande auf Höhe der erwarteten 429 bp erkennbar. Im Vergleich dazu entstand kein PCR-Produkt bei den P14 iNOS-KO-Mäusen aus Raumluft und aus hyperoxischen Haltungsbedingungen (Abb. 16A, *lane* 2 und 3).

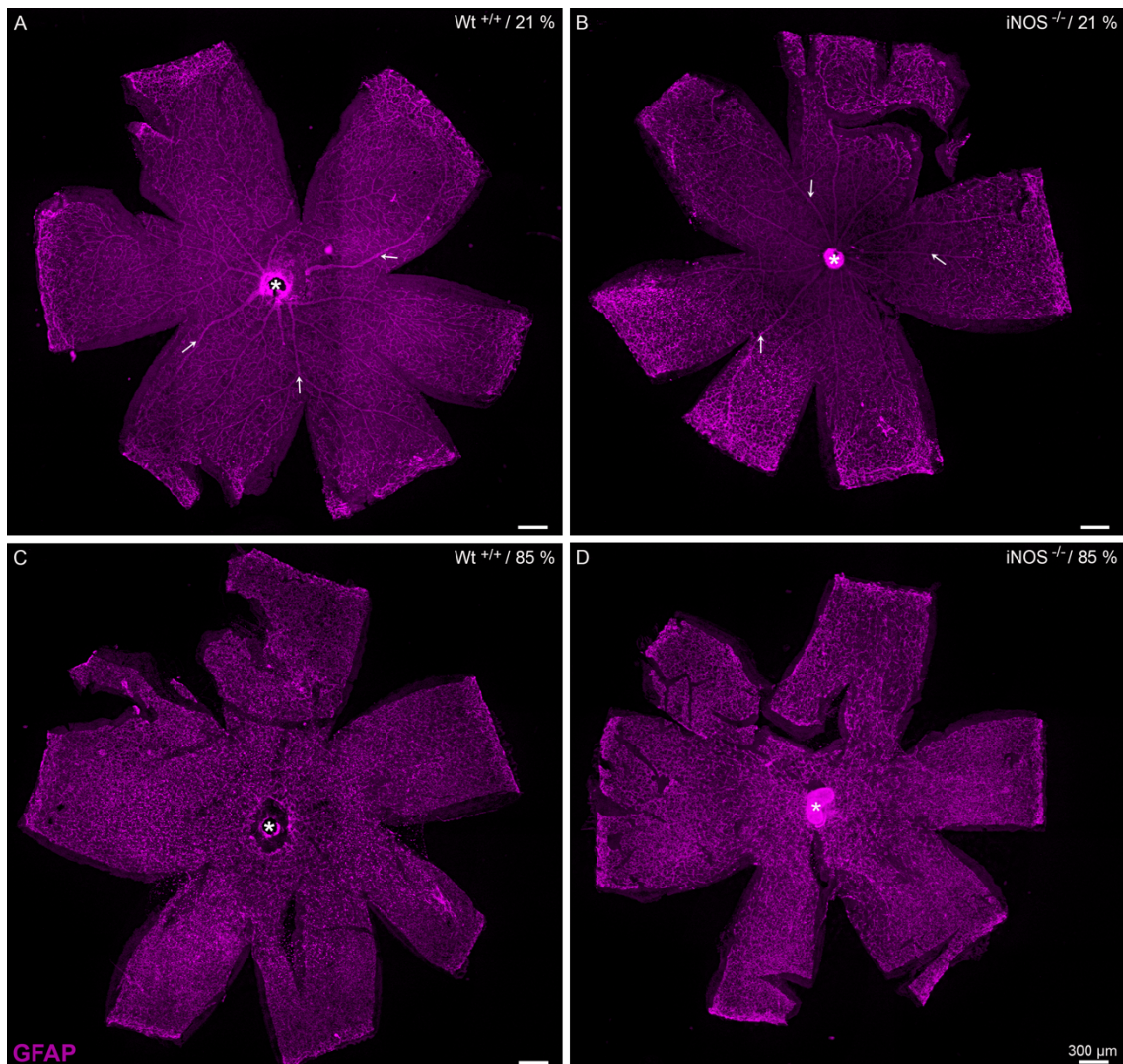
Darüber hinaus wurde zusätzlich aus der Retina stammende cDNA von P90 Wildtypmäusen aus dem BPD-Modell nach Regeneration in Normoxie untersucht. Die Maus wurde also die ersten zwei postnatalen Wochen in Hyperoxie (85 % O<sub>2</sub>) gehalten und anschließend bis P90 in Normoxie (21 % O<sub>2</sub>). Parallel dazu wurde die PCR auch mit der cDNA einer Wildtypmaus, die zu keinem Zeitpunkt Hyperoxie ausgesetzt war und 90 Tage in Normoxie gehalten wurde, durchgeführt. Für beiden Proben konnte eine klare Bande auf Höhe der 429 bp detektiert werden (Abb. 16A, *lane* 5 und 6).

In allen untersuchten Proben von Wildtypmäusen konnte der Nachweis von iNOS auf mRNA-Ebene mithilfe der RT-PCR durch das jeweils deutliche PCR-Produkt bei den erwarteten 429 bp detektiert werden. Bestätigt wurde dieser Befund durch eine Sanger-Sequenzierung nach der Gel-Extraktion der jeweiligen Banden. In allen Sequenzierungsergebnissen wurden Basenpaare im Bereich von Exon 12 und teilweise auch Exon 13 der iNOS-cDNA detektiert, also die Exons, die bei den iNOS-KO-Tieren aufgrund des Knockouts nicht vorhanden sind (nicht gezeigt).

In der cDNA der iNOS-KO-Mäuse konnte nur für das Referenzgen GAPDH auf Höhe von 199 bp ein PCR-Produkt nachgewiesen werden, nicht jedoch für iNOS. Das Fehlen einer Bande in der PCR zum Nachweis von iNOS bestätigt den Knockout.

### **3.2 Astrozyten in der Retina – GFAP-Expression in Wt- und iNOS-KO-Mäusen nach Haltung bei unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen**

Wie in der Einleitung beschrieben wandern die Astrozyten unter physiologischen Bedingungen vor den Gefäßen in die Retina ein und bilden dort ein Template für die nachfolgenden Gefäße (siehe auch 1.3.2.2.). Zur Beurteilung der Ausbreitung und Morphologie dieser Strukturen an P14, wurden an den Präparaten Immunfluoreszenzfärbungen mit GFAP durchgeführt. In allen vier Versuchsgruppen konnten dabei Astrozyten im Bereich der NFL nachgewiesen werden. In den *flatmounts* zeigten sich die Astrozyten in allen Gruppen bis in die äußere Netzhautperipherie (Abb. 17), wobei hier bereits bei geringer Vergrößerung Unterschiede in Form und Anordnung der Zellen in Abhängigkeit von der Sauerstoffsituation (21 % O<sub>2</sub> vs. 85 % O<sub>2</sub>) erkennbar waren.



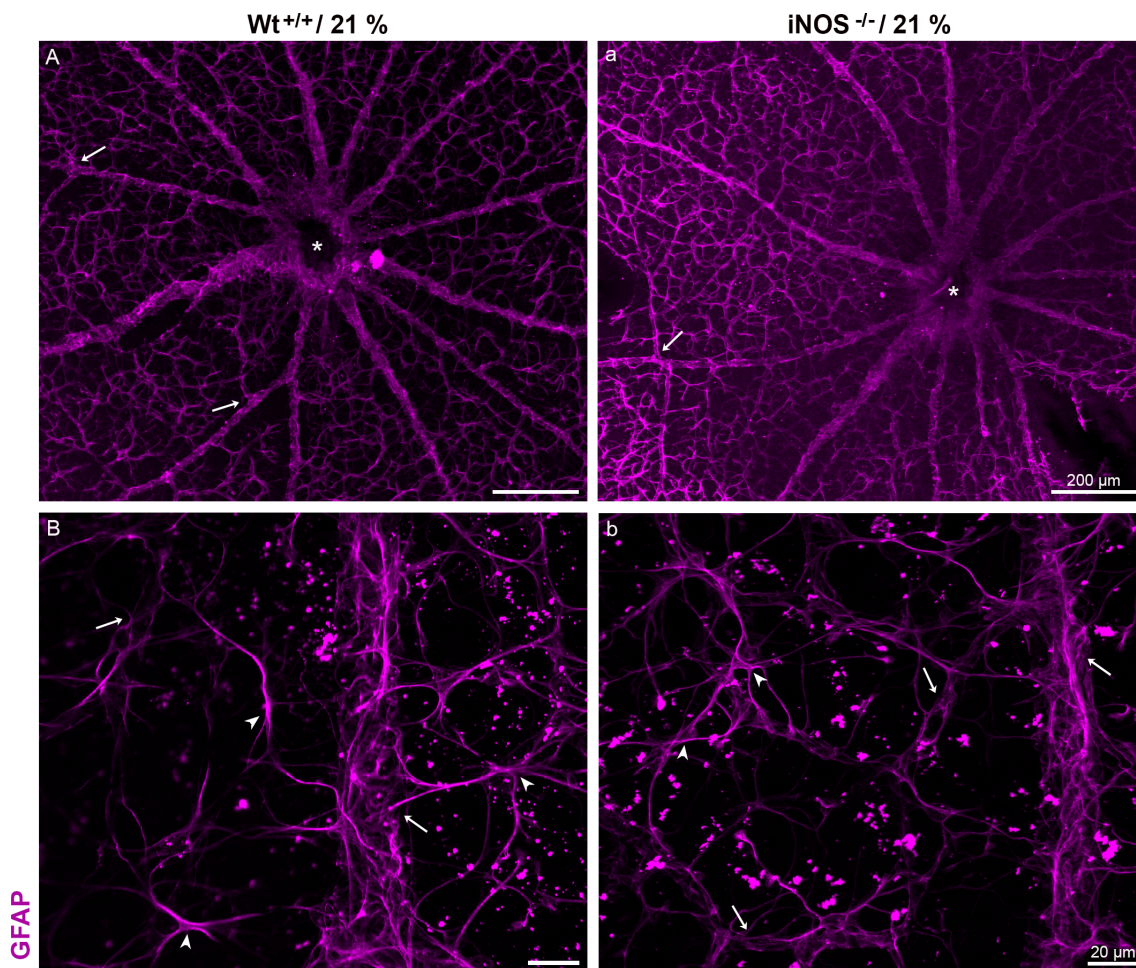
**Abbildung 17: Vergleich der GFAP-Expression in flatmounts von Wt- und iNOS-KO-Mäusen aus verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21 % und 85 % O<sub>2</sub>)**

**A, B:** GFAP-exprimierendes Astrozytennetzwerk (lila), das sich von der Papille (Stern) bis in die Peripherie erstreckt, mit gefäßähnlicher Morphologie (Pfeile) in Wt- (A) und iNOS-KO- (B) Mäusen bei 21 % O<sub>2</sub>. **C, D:** Ungeordnetes, die gesamte Netzhaut bedeckendes GFAP-exprimierendes Geflecht von Astrozyten (lila) in Wt- (C) und iNOS-KO- (D) Mäusen bei 85 % O<sub>2</sub>. Der Balken entspricht 300 µm.

### 3.2.1 GFAP-Expression der Astrozyten in der Retina von Wt- und iNOS-KO-Mäusen nach Haltung in 21 % O<sub>2</sub>

In der Retina der in Normoxie gehaltenen Wildtyp- und iNOS-KO-Mäuse zeigte sich an P14 ein einheitliches zelluläres Netzwerk aus Astrozyten. Dieses war ausschließlich im Bereich der NFL lokalisiert.

Bei der Betrachtung der *flatmounts* beider Mauslinien wurde das bereits weit entwickelte Gefäßtemplate aus Astrozyten, die sich mit ihren langen, spindelförmigen Fortsätzen untereinander vereinigten, über die ganze Netzhaut hinweg deutlich (siehe Abb. 17A, B).



**Abbildung 18: GFAP-Expression des zentralen retinalen Astrozytennetzwerkes in Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus 21 % O<sub>2</sub>**

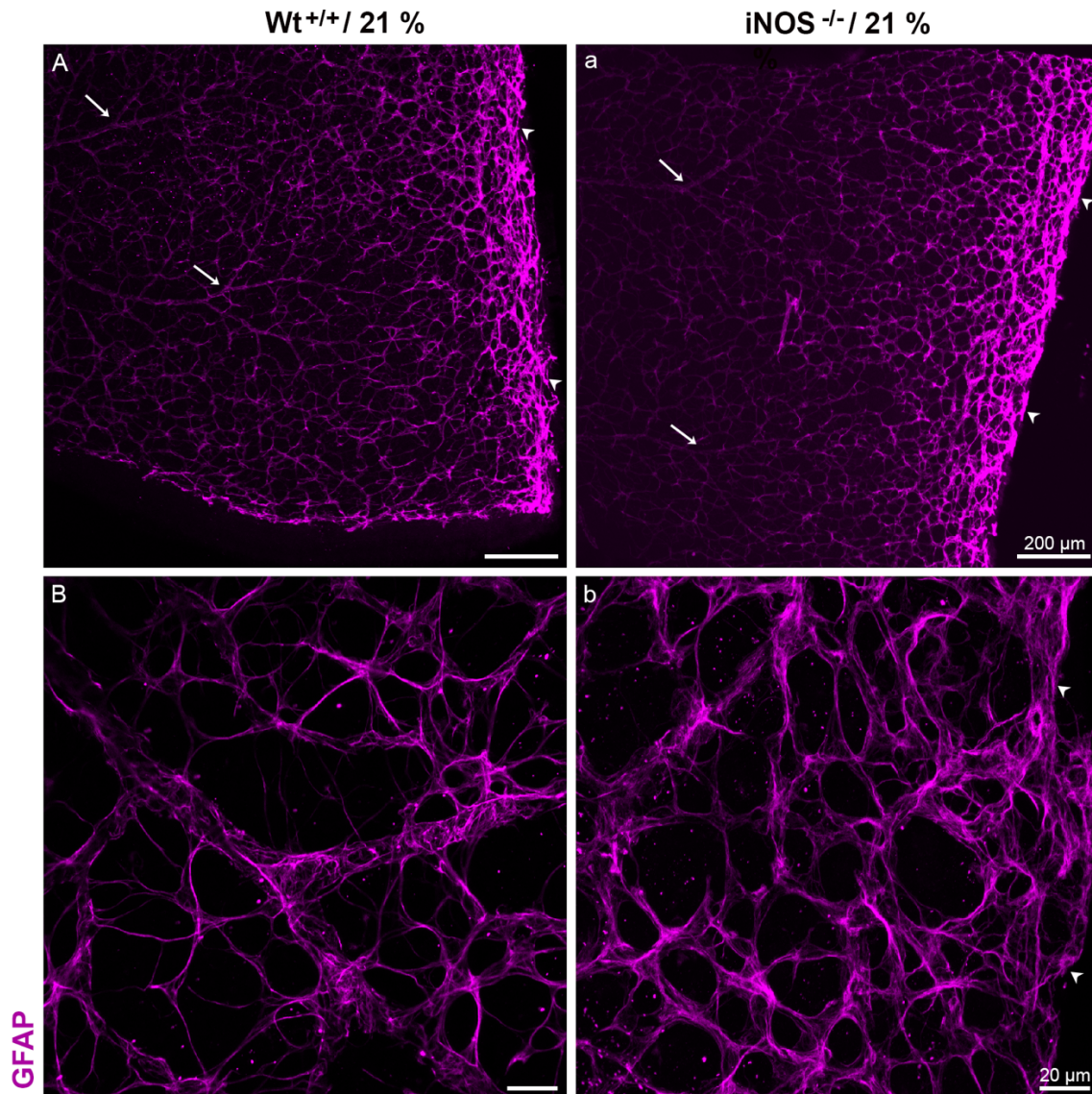
**A, a:** Gefäßähnliche Anordnung der Astrozyten (lila) nahe der Papille (Stern) mit Aufzweigungen im weiteren Verlauf (Pfeile). **B, b:** Stark vergrößertes zentrales Astrozytennetzwerk mit zum Teil dichter Vereinigung der Zellen zu deutlich gefäßähnlichen Strukturen (Pfeile), aber auch einzelne Astrozyten unabhängig von den Gefäßvorläuferstrukturen erkennbar (Pfeilköpfe). In B und b zeigen sich zusätzlich punktförmige unspezifische Färbungen (lila). Der Balken entspricht bei A, a 200 µm und bei B, b 20 µm.

Ausgehend von der Papille (Abb. 18A, a, Stern) formten viele Astrozyten gemeinsam durch enge Verdichtung eindeutig gefäßförmige Strukturen (Abb. 18A, a).

Dabei unterschieden sich die zentralen Zellansammlungen in ihren Durchmessern untereinander. Bei Verfolgung ihres Verlaufs zeigten sich Aufzweigungen und immer mehr kleine Abgänge (Abb. 18A, a, Pfeile). Zwischen den prägnanten Strukturen war ein etwas lockereres Geflecht aus Astrozyten sichtbar. Das zentrale Astrozytennetzwerk glich optisch stark dem retinalen Gefäßsystem. Die einzelnen Astrozyten mit ihren zarten Somata waren in den engmaschigen gefäßförmigen Gebilden (Abb. 18B, b, Pfeile) auch bei hoher Vergrößerung nicht mehr auszumachen. Zwischen diesen markanten, durch die zahlreichen Zellfortsätze faserig erscheinenden Strukturen fanden sich auch einzelne unabhängige, weniger dicht angeordnete Astrozyten. Hier konnten dann zum Teil die Zellkörper von den Fortsätzen der einzelnen Makrogliazellen differenziert werden (Abb. 18B, b, Pfeilköpfe).

Weiter peripher der Netzhaut veränderte sich das Erscheinungsbild des Astrozytennetzwerkes, wobei sich weiterhin keine Unterschiede zwischen Wt- und iNOS-KO-Mäusen zeigten. Die Durchmesser der von zentral kommenden, prägnanten Gefäßvorläuferstrukturen (Abb. 19A, a, B) nahmen immer weiter ab und integrierten sich schließlich in ein wabenartiges Muster aus vielen Vernetzungen der einzelnen Astrozyten (Abb. 19A, a Pfeile). Das Netzwerk reichte bis an den alleräußersten Rand der Retina (Abb. 19A, a, b, Pfeilköpfe), während es dabei immer engmaschiger wurde und sich weiter verdichtete. Dieser Bereich war in den *flatmounts* besonders stark fluoreszierend und bei hoher Vergrößerung ließ sich die Vereinigung vieler Astrozyten zu den gefäßähnlichen Wabenstrukturen erkennen. (Abb. 19B, b). Auch hier war eine Differenzierung einzelner Zellen nicht klar möglich und zwischen dem engen, mosaikartigen Zellnetz der Peripherie fanden sich jetzt nahezu keine unabhängigen, einzeln abgrenzbaren Astrozyten mehr.

Der Vergleich der beiden Mauslinien aus Normoxie ergab keine Hinweise auf übersteigertes oder vermindertes Wachstum oder Abweichungen in der Zellmorphologie der Astrozyten bei den iNOS-KO-Tieren.



**Abbildung 19: GFAP-Expression des peripheren retinalen Astrozytennetzwerkes in Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus 21 % O<sub>2</sub>**

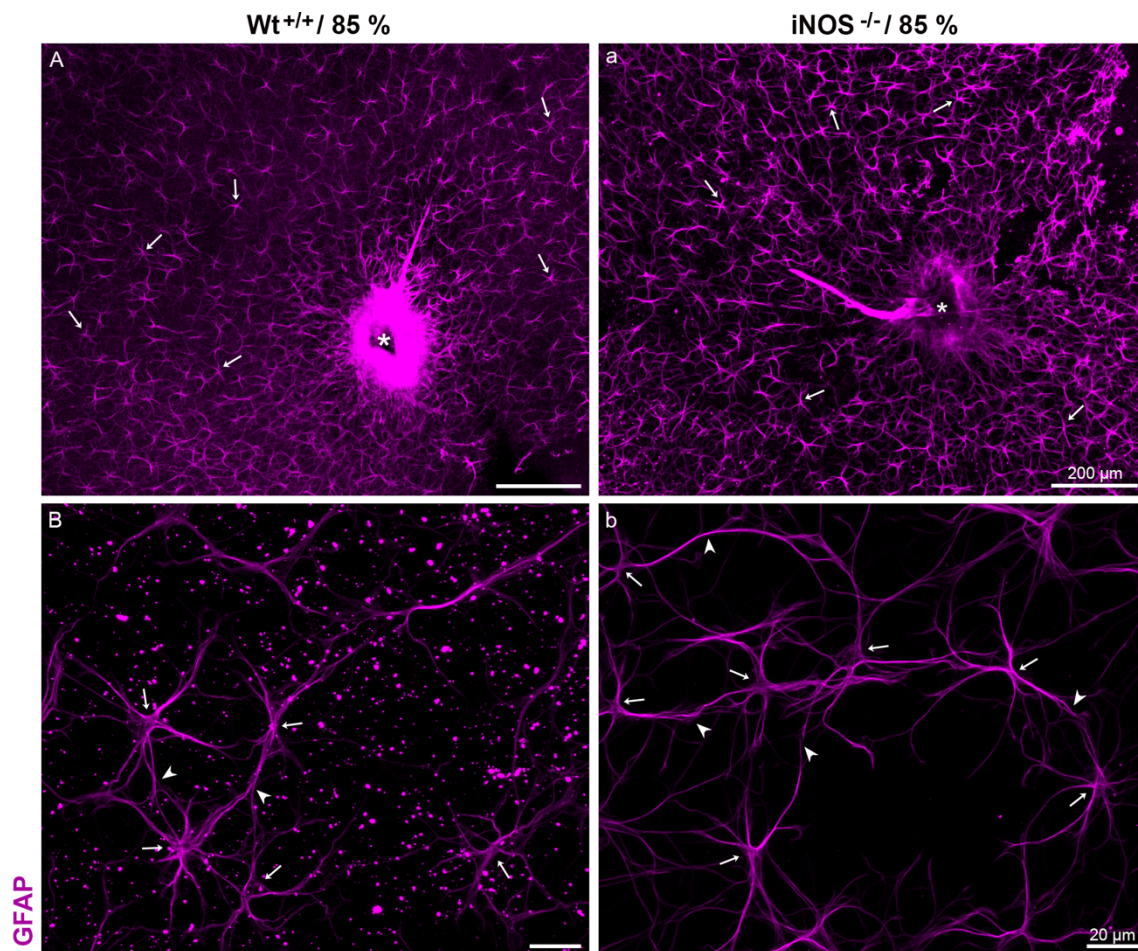
**A, a:** Durchmesserabnahme der von zentral ausgehenden GFAP-exprimierenden (lila) Gefäßvorläuferstrukturen mit Gabelungen (Pfeile) und Integration in das bis zum äußeren Retinarand reichende wabenartige Astrozytengeflecht (Pfeilköpfe). **B, b:** Peripheres Astrozytennetzwerk bei hoher Vergrößerung mit deutlich gefäßähnlichen Strukturen, die sich weiter verzweigen und ein wabenartiges Netzwerk bilden, das sich bis zum äußeren Rand der Netzhaut erstreckt (b, Pfeilkopf). Der Balken bei A, a entspricht 200 µm und in B, b 20 µm.

### 3.2.2 GFAP-Expression der Astrozyten in der Retina von Wt- und iNOS-KO-Mäusen nach Haltung in 85 % O<sub>2</sub>

Die Netzhäute der Wt- und iNOS-KO-Mäuse aus Hyperoxie zeigten ein deutlich verändertes Bild des Gefäßtemplates aus Astrozyten. Es konnten zwar ebenfalls über die ganze Retina hinweg Astrozyten vorgefunden werden (siehe auch Abb. 17C, D), doch ihre Morphologie und Anordnung unterschied sich deutlich von den Tieren aus physiologischen Sauerstoffbedingungen (21 % O<sub>2</sub>).

Auch bei Haltung in 85 % O<sub>2</sub> ließen sich die Astrozyten in beiden Mauslinien wieder ausschließlich in der NFL der Retina lokalisieren.

Die strukturellen Unterschiede des Astrozytennetzwerkes im Vergleich zu den Normoxie-Tieren wurden bei näherer Betrachtung der *flatmounts* deutlich. In keiner der beiden hyperoxisch gehaltenen Mauslinien waren nahe der Papille (Abb. 20A, a, Stern) Vereinigungen der Astrozyten zu gefäßähnlichen Strukturen zu finden. Stattdessen lagen die Astrozyten zentral isoliert vor und waren sehr viel lockerer und unstrukturierter angeordnet (Abb. 20A, a).



**Abbildung 20: GFAP-Expression der Astrozyten zentral der Retina in Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus 85 % O<sub>2</sub>**

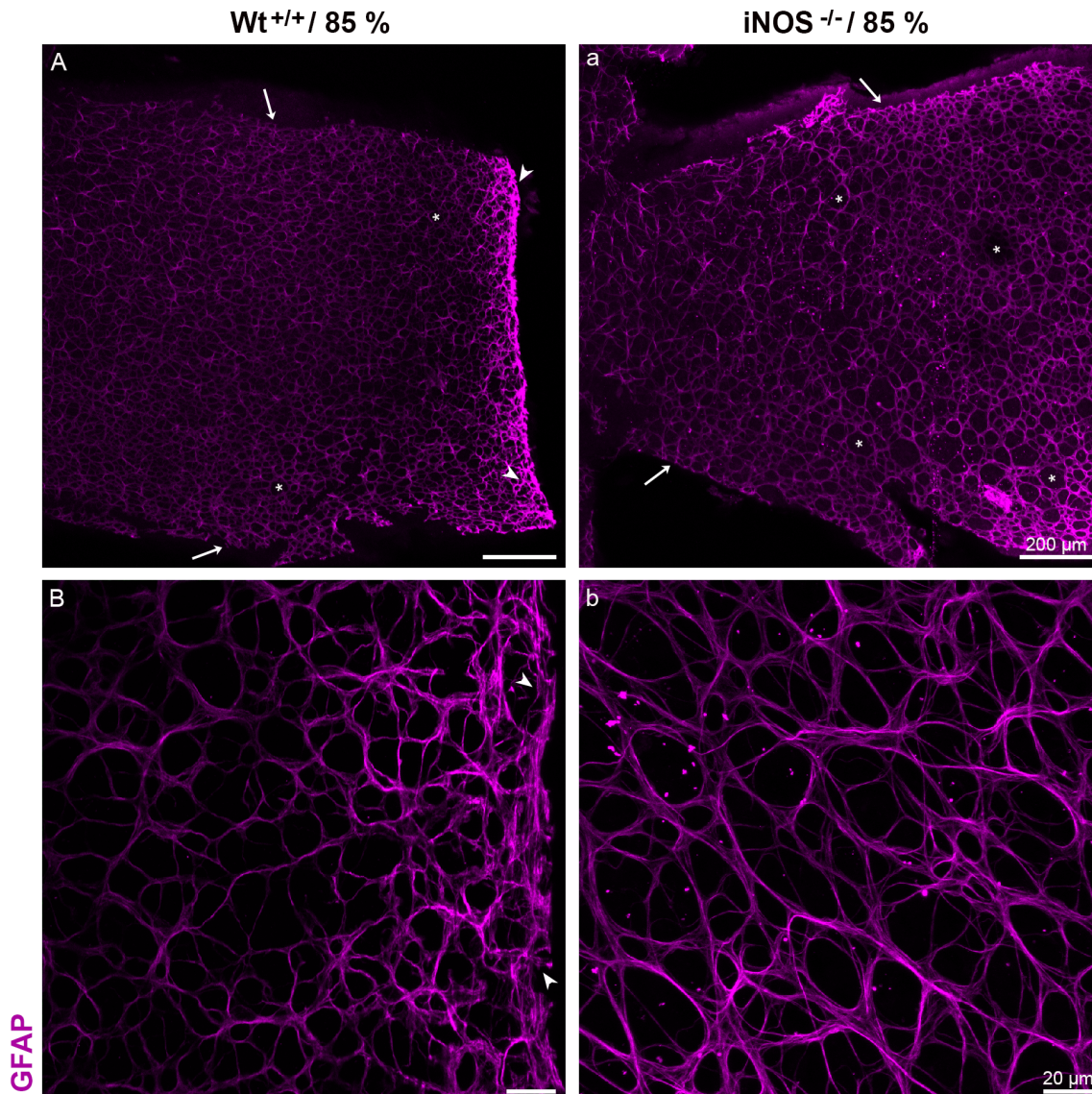
**A, a:** Lockere Verteilung von GFAP-exprimierenden (lila) sternförmigen Astrozyten (Pfeile) in der Nähe der Papille (Stern).  
**B, b:** Deutlich voneinander abgrenzbare einzelne sternförmige Astrozyten (Pfeile) mit Verbindung einzelner Zellfortsätze untereinander (Pfeilköpfe). In B zeigen sich zusätzlich punktförmige unspezifische Färbungen (lila). Der Balken entspricht 200 µm bei A, a und 20 µm bei B, b.

Viele Bereiche zwischen den einzelnen Astrozyten blieben unbesiedelt. Bereits bei geringer Vergrößerung war hier eine sternförmige Morphologie der einzelnen Astrozyten zu erkennen (Abb. 20A, a, Pfeile). Detailaufnahmen verdeutlichten dies und zeigten die einzelnen kleinen, zentral gelegenen Somata (Abb. 20B, b, Pfeile), von denen lange, meist gerade Zellfortsätze in verschiedene Richtungen abgingen. Zwischen den weiterhin klar voneinander abgrenzbaren Astrozyten waren jetzt teilweise

Verbindungsstellen sichtbar, an denen sich einzelne Fortsätze mehrerer Astrozyten scheinbar übergangslos vereinigten (Abb. 20B, b, Pfeilköpfe).

Etwas weiter in Richtung der Netzhautperipherie zeigte sich in beiden Mauslinien eine deutlich veränderte Anordnung der Astrozyten. Die Somata ließen sich hier nicht mehr so einfach abgrenzen und die Zellfortsätze wirkten besonders lang. Zwischen den Fortsätzen bildeten sich immer mehr Verbindungen aus und schließlich entstand aus den miteinander vereinigten Astrozyten ein engmaschiges Zellgeflecht, wobei zahlreiche kleine, rundlich ovale Freiräume entstanden, die in ihrer Form an Bienenwaben erinnerten (Abb. 21A, a, Pfeile). Eine ähnliche Anordnung der Astrozyten fand sich auch in den Vergleichsgruppen aus 21 % O<sub>2</sub>, allerdings nur am äußersten Rand der Retina (siehe auch Abb. 19). Bei den Tieren aus den Hyperoxie-Gruppen war ein deutlich größerer Anteil der Netzhaut von diesen Astrozytenwaben bedeckt. Die Sternform war nicht mehr klar zu erkennen und die einzelnen Zellen kaum noch voneinander abzugrenzen (Abb. 21B, b). Teilweise waren die Zwischenräume der Waben auch deutlich vergrößert oder kreisrund (Abb. 21A, a, Sterne). Das Geflecht der Astrozyten reichte auch bei den Tieren aus erhöhten Sauerstoffbedingungen (85 % O<sub>2</sub>) bis zum äußersten Rand der Netzhäute (Abb. 21A, a, B). Ganz außen fluoreszierte das Netzwerk stark und war deutlich engmaschiger (Abb. 21A, B, Pfeilköpfe).

Nach 14-tägiger Haltung unter erhöhten Sauerstoffbedingungen von 85 % O<sub>2</sub> war das Template aus Astrozyten insbesondere zentral der Retina wesentlich verändert. Zwischen den Wt- und iNOS-KO-Tieren konnten dabei keine Unterschiede differenziert werden.



**Abbildung 21: GFAP-Expression der Astrozyten in der peripheren Retina von Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus 85 % O<sub>2</sub>**

**A, a:** Großflächiges Wabenmuster (Pfeile) der GFAP-expressierenden Astrozyten (lila) mit teilweise kreisrunden Zwischenräumen (Stern). Das Astrozytengeflecht reicht bis an den äußersten Rand des Netzhautrandes und fluoresziert dort stark (A, Pfeilköpfe). **B, b:** Stark vergrößertes, engmaschiges peripheres Astrozytengeflecht, das bis an den äußersten Rand der Netzhaut reicht und dort noch stärker verdichtet ist (B, Pfeilköpfe). Der Balken entspricht in A, a 200 µm und in B, b 20 µm.

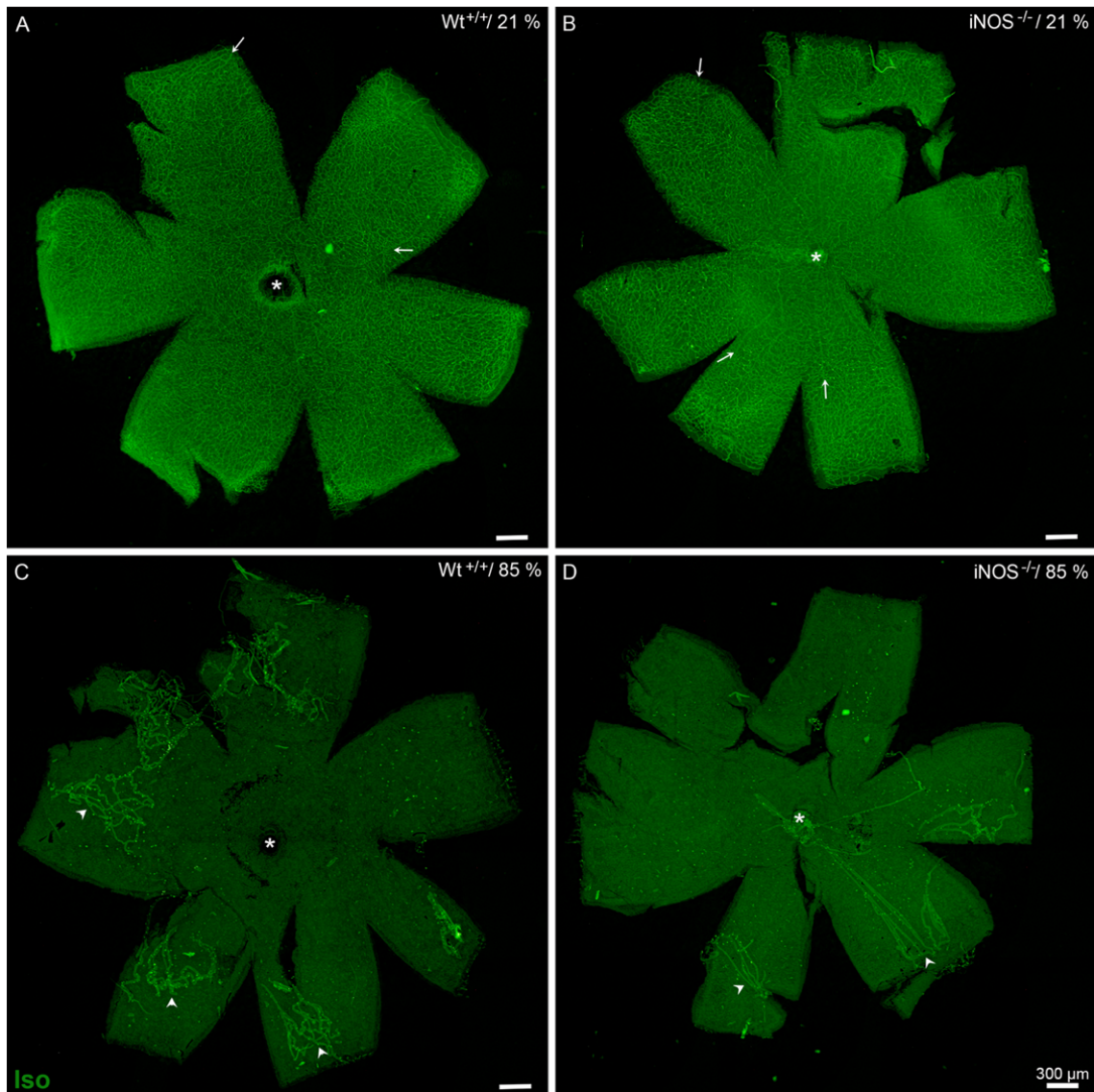
### 3.3 Retinale Angiogenese der Wildtyp- und iNOS-KO-Mäuse aus Normoxie (21 % O<sub>2</sub>) und Hyperoxie (85 % O<sub>2</sub>)

Zur Darstellung und Beurteilung der retinalen Gefäße an P14 wurden die *flatmounts* und Vertikalschnitte der Augen der vier verschiedenen Versuchsgruppen mit Isolectin B4 angefärbt. So konnten die Endothelzellen markiert werden, die in allen Gefäßen vorkommen und einer ihrer wichtigsten zellulären Bestandteile sind.

Auf den ersten Blick zeigte sich für beide Mauslinien aus normoxischen Haltungsbedingungen eine von der Papille (Abb. 22A, B, Stern) ausgehende

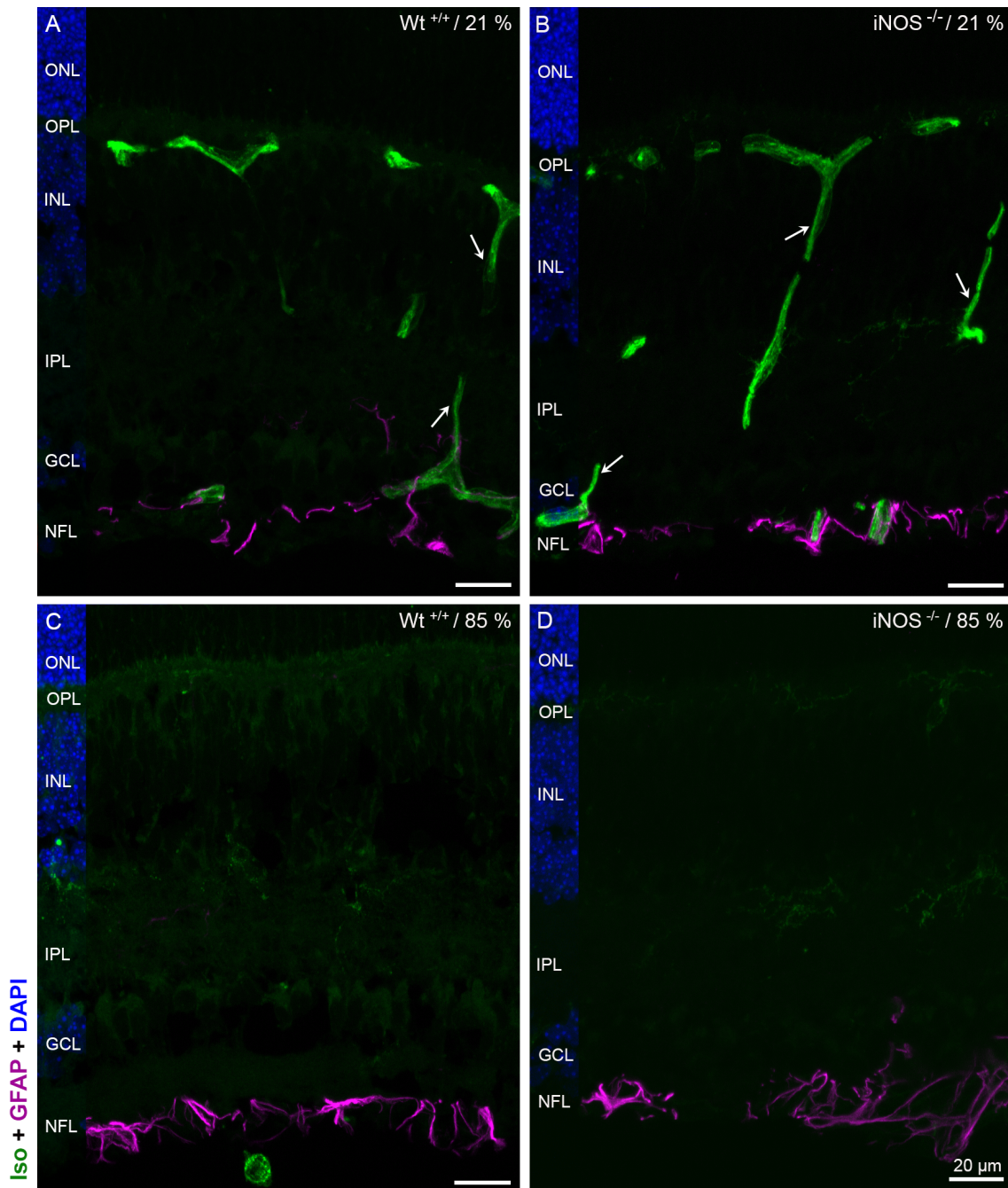
physiologische retinale Gefäßentwicklung bis in die Peripherie (Abb. 22A, B, Pfeile). Im Vertikalschnitt konnten hier eindeutig Gefäße im Bereich drei verschiedener Netzhautschichten lokalisiert werden (Abb. 23A, B).

Im Gegensatz dazu konnten in den Netzhäuten der Wildtyp- und iNOS-KO-Tiere aus Hyperoxie keine Gefäße des retinalen Gefäßsystems innerhalb der Netzhaut detektiert werden (22C, D und 23C, D).



**Abbildung 22: Vergleich der retinalen Gefäßentwicklung in flatmounts von Wt- und iNOS KO-Mäusen aus verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21 % / 85 % O<sub>2</sub>)**

Von der Papille (Stern) ausgehendes physiologisches, mit Isolectin (grün) markiertes retinales Gefäßsystem (Pfeile) einer Wt-Maus (A) und einer iNOS-KO-Maus (B) aus 21 % O<sub>2</sub>. Fehlendes retinales Gefäßsystem einer Wt-Maus (C) und einer iNOS-KO-Maus (D) aus 85 % O<sub>2</sub> mit Überresten hyaloidaler Gefäße (Pfeilköpfe), die der Retina aufliegen. Der Balken entspricht 300 μm.



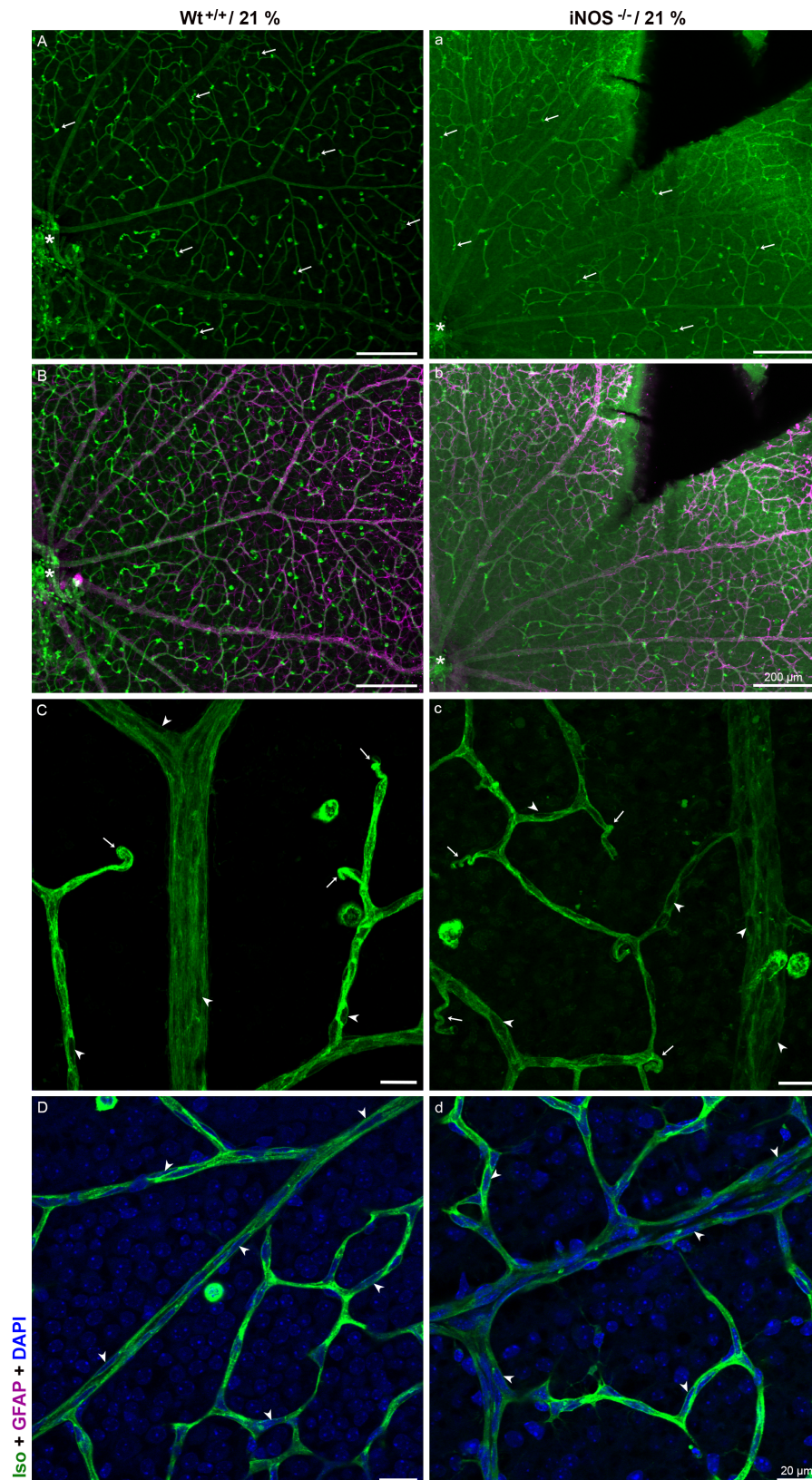
**Abbildung 23: Vergleich der retinalen Gefäßentwicklung in Vertikalschnitten von Wt- und iNOS KO-Mäusen aus verschiedenen Sauerstoffverhältnissen (21 % / 85 % O<sub>2</sub>)**

In der Retina der Wt-Maus (A) und der iNOS-KO-Maus (B) aus 21 % O<sub>2</sub> sind mit Isolectin gefärbte (grün) Netzhautgefäße im Bereich der NFL, IPL und OPL sowie Verbindungsgefäße (Pfeile) zwischen den Plexus erkennbar. Gefäße des superfiziellen Plexus in der NFL sind kolokalisiert mit dem Astrozytennetzwerk (mit GFAP-Antikörper immungefärbt, lila). Die Retina der Wt-Maus (C) und der iNOS-KO-Maus (D) aus 85 % O<sub>2</sub> ist ohne erkennbare Netzhautgefäße. Astrozyten (GFAP, lila) liegen weiter in der NFL. Der Balken entspricht 20 µm. ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglienzellschicht, NFL = Nervenfaserschicht.

### 3.3.1 Gefäßentwicklung in der Retina nach Haltung in Normoxie

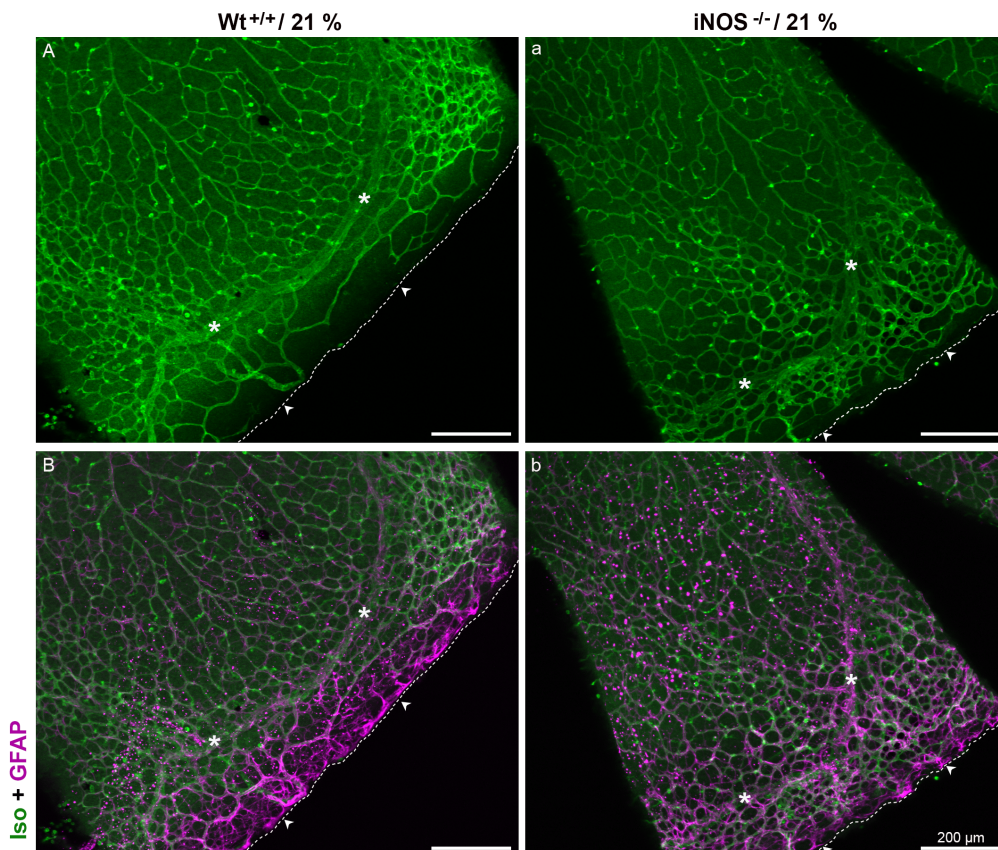
Die Retina von Wildtyp- und iNOS-KO-Mäusen, die 14 Tage bei Raumluft (21 % O<sub>2</sub>) gehalten wurden, zeigte eine alterstypische vaskuläre Entwicklung. In den Vertikalschnitten der Netzhäute konnten die drei nacheinander entwickelten

Gefäßplexus im Bereich der NFL, IPL und OPL lokalisiert werden (siehe Abb. 23A, B). Ausschließlich in der NFL, wo der superfizielle Plexus (primäre Plexus) liegt, zeigte sich eine enge Lagebeziehung und teilweise auch deutliche Kolokalisation der Gefäße mit dem in dieser Retinaschicht aus Astrozyten gebildetem Gefäßstemplate (siehe Abb. 23A, B). Immer wieder wurden in den Gefrierschnitten auch senkrecht zwischen den Gefäßplexus verlaufende Verbindungsgefäße angeschnitten (siehe Abb. 23A, B, Pfeile). Der **primäre Plexus** war in beiden Mauslinien am weitesten ausgereift. Die Gefäße waren hier bereits stark ausgeprägt und eindeutig zu differenzieren. In den *flatmounts* konnten sternförmig von der Papille (Abb. 24A, a, Stern) ausgehend mehrere Gefäße mit großem Durchmesser und deutlichem Lumen beobachtet werden. Es zeigten sich klare strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Astrozytennetzwerk in der Retina (siehe auch Abb. 18), wobei die Doppelfärbung mit GFAP die Kolokalisation der Gebilde aus zusammengelagerten Astrozyten und den einzelnen Gefäßen des superfiziellen Plexus bestätigte (Abb. 24B, b). Dazwischen konnten aber auch vereinzelt GFAP-markierte Zellen ohne benachbartes Gefäß gefunden werden (Abb. 23A, a; 24B, b). Parallel zu den prägnanten Astrozytenstrukturen gabelten sich die großen Gefäße auf ihrem Weg in Richtung Peripherie weiter auf und gaben dabei seitlich immer wieder kleinere Gefäßäste ab, sodass um sie herum ein lockeres Gefäßgeflecht entstand (Abb. 24A, a). An den Enden dieser neuen, aussprossenden Gefäße konnten geschwungene Verdichtungen beobachtet werden, die stärker fluoreszierten (Abb. 24A, a, Pfeile). Bei höherer Vergrößerung stellten sie sich als kleine Gefäßabbiegungen bzw. -windungen dar (Abb. 24C, c, Pfeile), die vom primären Plexus ausgingen und dann senkrecht durch die retinalen Schichten verliefen, wobei man durchgängig ihren Gefäßquerschnitt beobachten konnte. Als Verbindungsgefäße mündeten sie dann in die sich entwickelnden Gefäßplexus der äußeren Retinaschichten. Ausschließlich in den innersten Netzhautschichten fanden sich zwischen dem superfiziellen Plexus immer wieder kleine, kreisrunde, randständig fluoreszierende Profile. Sie zeigten keine Verbindung zu den beschriebenen retinalen Gefäßen und es kann bislang nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um eine unspezifische Färbung handelt. Bei hoher Vergrößerung des superfiziellen Plexus war insbesondere in den weitlumigen Gefäßen eine klare Gefäßstruktur zu erkennen, in der die einzelnen Endothelzellen deutlich differenziert werden konnten. Im Gefäßverlauf waren sie längs orientiert und lagen in der Gefäßwand dicht nebeneinander (Abb. 24C, c, Pfeilköpfe). Durch den blau fluoreszierenden DNA-Farbstoff DAPI konnten zusätzlich auch ihre Zellkerne dargestellt werden, die längs angeschnitten waren (Abb. 24D, d, Pfeilköpfe). In der Peripherie des superfiziellen Plexus zeigte sich in den *flatmounts* beider Mauslinien im Vergleich zum Zentrum eine veränderte Struktur.



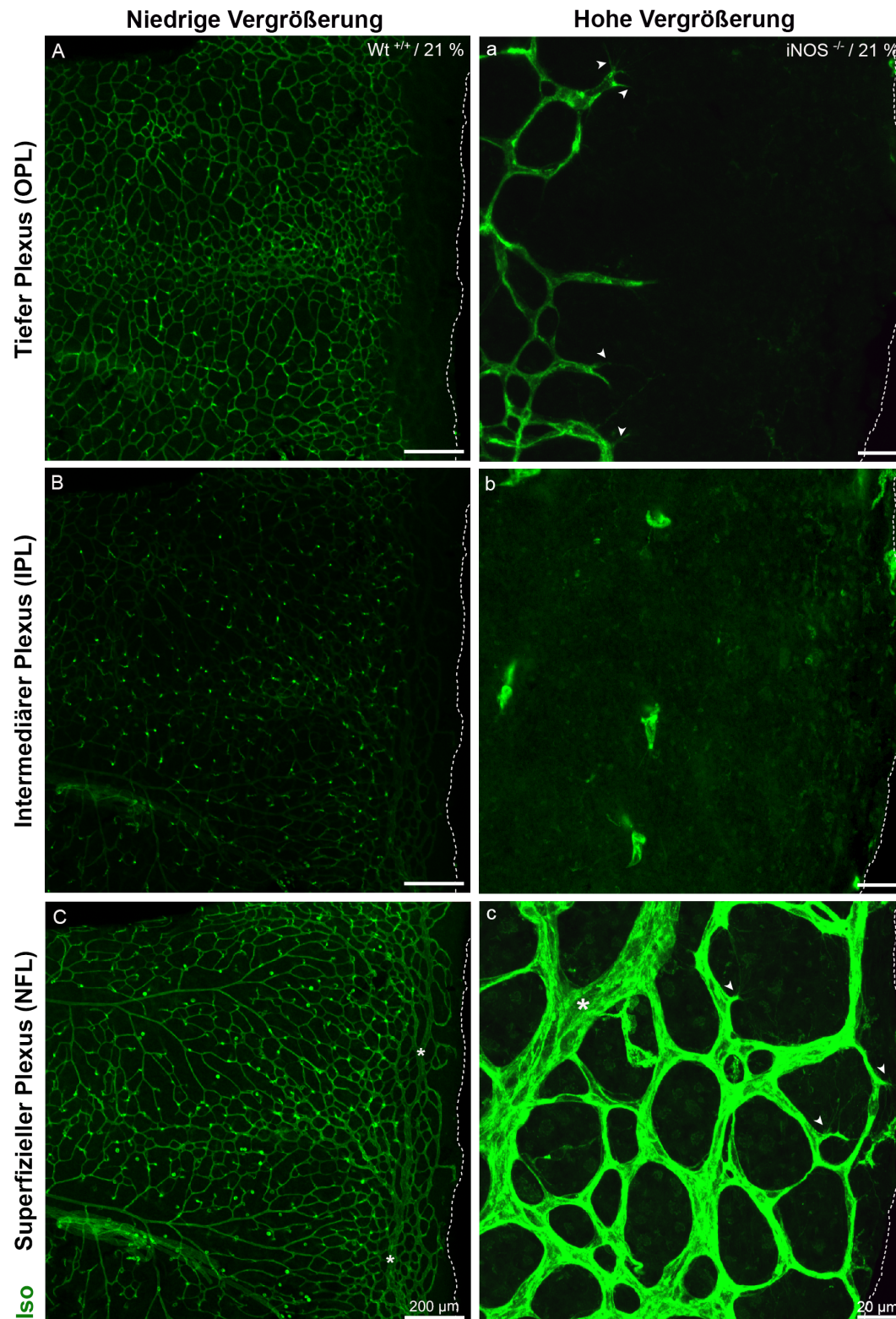
**Abbildung 24: Zentrale Gefäße des superfiziellen Plexus (Iso, grün) in *flatmounts* von Wt- (A-D) und iNOS-KO- (a-d) Mäusen aus Normoxie mit zusätzlicher Doppelfärbung mit GFAP (lila) und DAPI (blau)**  
**A, a:** Von der Papille (Stern) ausgehende große Gefäße (Isolectin, grün), die sich auf ihrem Weg in Richtung Peripherie weiter aufgabeln. An den Enden neuer, kleiner Gefäßäste zeigen sich geschwungene Verdichtungen (Pfeile). **B, b:** Eindeutige Kolokalisation des Astrozytennetzwerkes (GFAP, lila) mit dem Gefäßnetz des superfiziellen Plexus. **C, c:** Höchste Vergrößerung der zentralen Gefäße mit jeweils mittig liegenden länglichen Endothelzellen (Pfeilköpfe). Die unter A, a beschriebenen Verdichtungen stellen sich als Gefäßabbiegungen dar, die von hier in die äußeren Netzhautschichten ziehen (Pfeile). **D, d:** Innerhalb der Gefäßwände sind mit DAPI (blau) angefärbte, längs angeschnittene Zellkerne der Endothelzellen zu sehen (Pfeilköpfe). Der Balken entspricht 200 μm bei A, a und B, b und 20 μm bei C, c und D, d.

Parallel zum Astrozytennetzwerk nahm hier der Durchmesser der großen, von der Papille ausgehenden Gefäße immer weiter ab und schließlich mündeten die Gefäße peripher in ein engmaschiges, mosaik- bzw. wabenartiges Gefäßgeflecht (Abb. 25A, a). Dieses schien eher parallel entlang des Retinarandes zu verlaufen. Die vielen schmalen und miteinander verwobenen Gefäße wurden auch in der Peripherie immer von einem Gefäß mit größerem Durchmesser begleitet (Abb. 25A, a, Sterne). Teilweise konnte gut erkannt werden, wie diese großen Gefäße zuvor von zentral nach peripher zogen, sich dann aufgabelten und so ihre Verlaufsrichtung änderten. Ab hier verliefen sie parallel zum Retinarand zwischen dem wabenartigen Gefäßnetz. Die Doppelfärbung mit GFAP zeigte, dass das Template der Astrozyten im Vergleich deutlich weiter an den äußersten Rand der Netzhaut gelangte als die Gefäße (Abb. 25B, b). Von den drei Gefäßplexus der Netzhaut reichte der superfizielle mit Abstand am weitesten in die Peripherie und wirkte dabei in sich abgeschlossen (Abb. 26C, c). In den letzten Reihen der Gefäßwaben konnten hier bei höchster Vergrößerung hervortretende Tip-Zellen mit langen, faserartigen Filopodien beobachtet werden, die noch weiter in Richtung des Retinarandes ragten (Abb. 26c, Pfeilköpfe).



**Abbildung 25: Kolokalisation des peripheren Gefäßnetzwerkes vom superfiziellen Plexus (Iso) und des Astrozytennetzwerkes (GFAP) in Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus Normoxie**

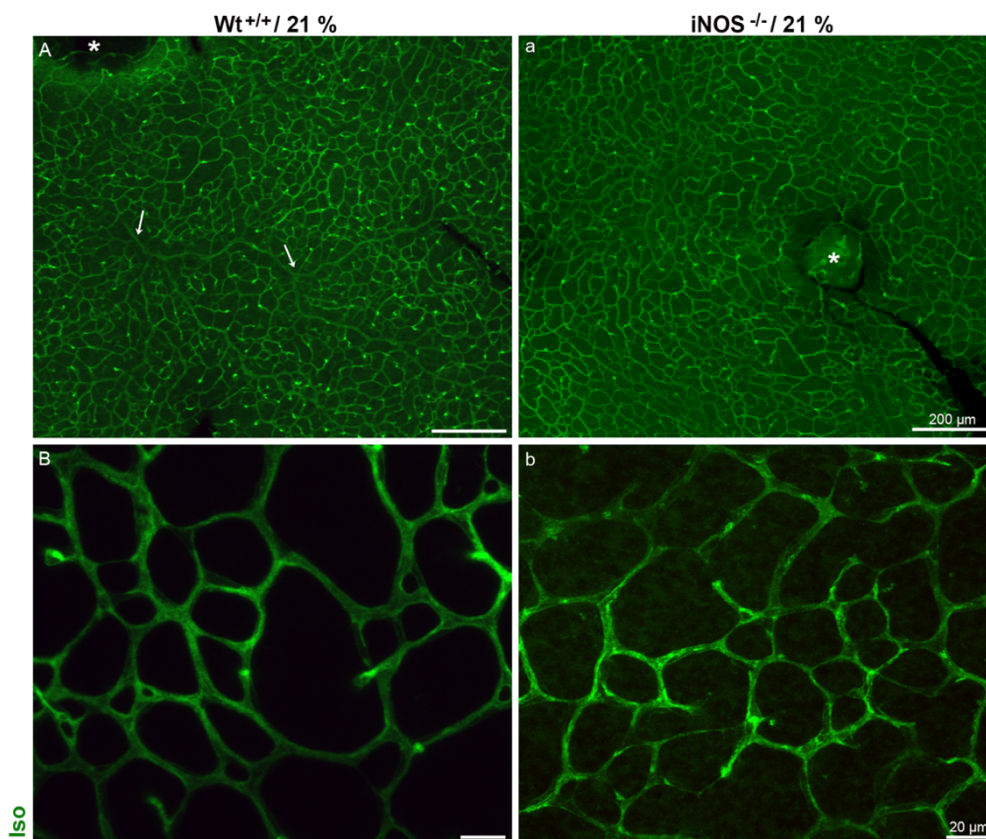
**A, a:** Mosaikartiges Gefäßgeflecht (Isolectin, grün) in der Netzhautperipherie mit einem zentral kommenden, parallel zum Retinarand verlaufendem großen Gefäß (Sterne). **B, b:** Deutliche Kolokalisation des peripheren superfiziellen Plexus mit dem Astrozytennetzwerk (GFAP, lila). Die periphere Astrozytengrenze ist durch eine gestrichelte Linie und Pfeilköpfe sichtbar gemacht (B, b). Die Linie dieser Astrozytengrenze ist auch bei der reinen Gefäßdarstellung (A, a) eingezeichnet. Der Balken entspricht bei A, a, und B, b 200 µm.



**Abbildung 26: Periphere Ausdehnung der drei retinalen Gefäßplexus (Isolectin, grün) im flatmount einer Wt-Maus (A-C) bei niedriger Vergrößerung und einer iNOS-KO-Maus (a-c) bei hoher Vergrößerung aus Normoxie**

**A:** Deutlich vor dem Netzhautrand abrupt endendes, wabenförmiges Gefäßgeflecht des tiefen Plexus in Höhe der OPL. **a:** Tiefer Plexus, der in Höhe der OPL deutlich vor dem Netzhautrand abrupt und offen endet, mit erkennbaren Tip-Zellen mit Filopodien (Pfeilköpfe). **B, b:** Nicht bis zum äußeren Netzhautrand reichende punkt- und strichförmige Gefäßansätze des intermediären Plexus im Bereich der IPL. **C:** Peripheres Wabenmuster des superfiziellen Plexus, der sich in der NFL mit einem parallel zum Retinarand verlaufenden großen Gefäß (Sterne) bis in die Peripherie erstreckt. **c:** Bis in die Peripherie der Retina reichendes Wabenmuster des superfiziellen Plexus mit parallel verlaufendem großem Gefäß und ganz außen auffindbaren Tip-Zellen mit Filopodien (Pfeilkopf). Der periphere Netzhautrand wird jeweils durch die gestrichelte Linie dargestellt. Der Balken entspricht in A-C: 200 µm und in a-c: 20 µm. Die verschiedenen Vergrößerungen sind jeweils repräsentativ für beide Mauslinien.

Auch der **tiefe Plexus** konnte in den Wt- und iNOS-KO-Tieren aus Normoxie eindeutig nachgewiesen werden, und zwar im Bereich der OPL (siehe auch Abb. 23A, B). Da der tiefe Plexus von Gefäßen des superfiziellen Plexus ausgeht, fand sich kein Template aus Astrozyten. Die Gefäße waren hier im Vergleich noch deutlich feiner und hatten einen geringeren Durchmesser. Von der Papille ausgehend (Abb. 27A, a, Stern) konnte über die gesamte Fläche des *flatmounts* hinweg ein gleichmäßig ausgebildetes, mosaikartiges Gefäßnetzwerk beobachtet werden, welches etwas an die peripherste Gefäßstruktur des superfiziellen Plexus erinnerte. Teilweise ließen sich vereinzelt auch breitere, längere Gefäßstränge mit Gabelungen ausmachen, die nach peripher zogen (Abb. 27A, Pfeile). Bei höchster Vergrößerung wurden die regelmäßig angeordneten, teilweise unterschiedlich großen Gefäßwaben im Detail erkennbar (Abb. 27B, b). Der tiefe Plexus endete in den untersuchten Präparaten beider Mauslinien weniger weit peripher als der superfizielle (Abb. 26A, a). Es konnte hier kein parallel verlaufendes, größeres begleitendes Gefäß aufgefunden werden. Die Wabenstruktur des Gefäßnetzes endete offen und abrupt und wirkte dadurch eher unvollendet ausgereift. Teilweise konnten bei höchster Vergrößerung Tip-Zellen mit langen, feinen Filopodien an den äußersten Enden des Gefäßnetzes detektiert werden (Abb. 26a, Pfeilköpfe).



**Abbildung 27: Tiefer Plexus (Iso, grün) in *flatmounts* von Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus Normoxie**

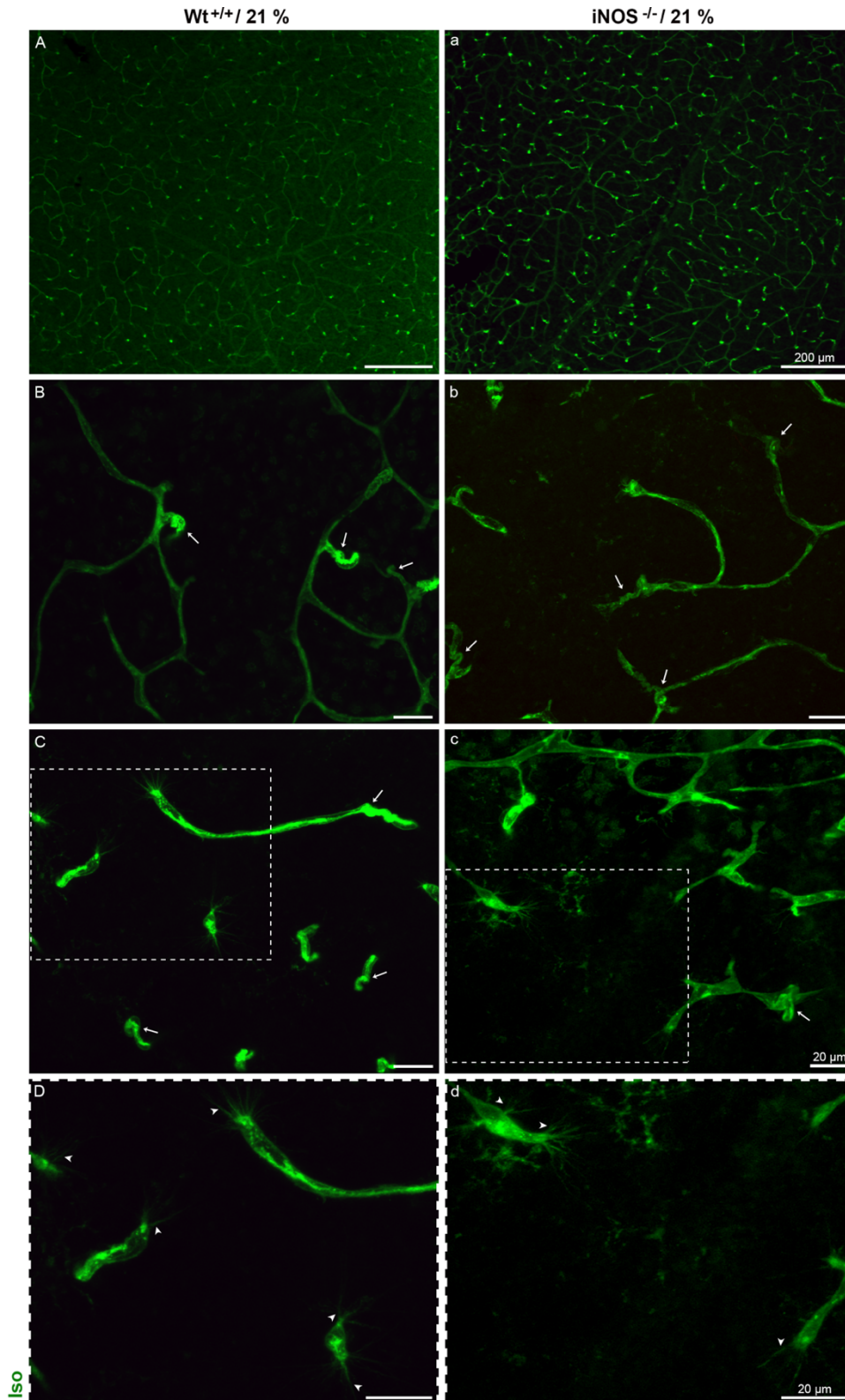
**A, a:** Waben- bzw. -mosaikartiges Gefäßnetzwerk des tiefen Plexus im Bereich der Papille (Stern) mit vereinzelt großen, in die Peripherie ziehenden Gefäßästen (A, Pfeile). **B, b:** Gleichmäßiges Wabenmuster kleiner Gefäße des tiefen Plexus bei hoher Vergrößerung. Die Balken entsprechen bei A, a 200 µm und bei B, b 20 µm.

Der **intermediäre Plexus** war in den Wt- und iNOS-KO-Mäusen am wenigsten weit entwickelt. Er konnte im Bereich der IPL lokalisiert werden (siehe auch Abb. 23A, B). In den Vertikalschnitten fiel auf, dass hier im Vergleich immer deutlich weniger einzelne Gefäße angeschnitten waren als auf Höhe der anderen beiden Gefäßnetzwerke. Da der intermediäre Plexus von Gefäßen der bereits vorhandenen Plexus abstammt, konnte auch hier kein paralleles Astrozytennetzwerk nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der *flatmounts* wirkte der intermediäre Plexus im Vergleich zu den anderen Gefäßgeflechten noch kaum differenziert und am unreifsten. Generell erschien hier der Eindruck von vielen punkt- und strichförmigen Gefäßstrukturen mit teilweise ersten Verzweigungen untereinander (Abb. 28A, a). Bei dem Versuch, den intermediären Plexus isoliert darzustellen, schimmerten insbesondere bei geringer Vergrößerung immer auch Anteile der beiden anderen differenzierteren Gefäßgeflechte durch. Eine eindeutige, definierte Abgrenzung war nur schwer möglich. Dies lag auch an den zahlreichen Verbindungsgefäßen zwischen den einzelnen Plexus, die bei genauerer Betrachtung in der IPL vermehrt zu beobachten waren und sich hier als geschwungene Gefäßwindungen darstellten (Abb. 28B, b, C, c, Pfeile). Ihr Gefäßverlauf konnte durch die Schichten hinweg bis in den tiefen oder superfiziellen Plexus verfolgt werden. Von diesen Verbindungsgefäßen ausgehend, wuchsen erste Gefäße seitwärts in die IPL ein und bildeten so die sichtbaren Anfänge des späteren intermediären Gefäßnetzwerkes. In einigen Bereichen war die Entwicklung schon so weit, dass sich bereits erste Verzweigungen und netzwerkartige Gefäßstrukturen ausbildeten. Dadurch entstand zum Teil der Eindruck von quadratischen Umrissen feiner Gefäße, die nur bei höherer Vergrößerung zu erkennen waren (Abb. 28B, b, c). Häufig konnten an den Anfangsgefäßen dieses Plexus Tip-Zellen aufgefunden werden, die als kleine Ausstülpungen mit ihren feinen, langen faserartigen Filopodien in die Umgebung ragten (Abb. 28C, c, D, d, Pfeilköpfe).

Ein ausgebildetes Netzwerk oder weitlumige Gefäße mit Abgängen, wie in den anderen Schichten der Retina konnten in der IPL nirgendwo detektiert werden. Soweit es möglich war, die Anfänge des intermediären Plexus einzeln abzugrenzen und zu differenzieren und nicht nur die Querschnitte der Verbindungsgefäße anzuschneiden, zeigte sich in den *flatmounts*, dass die Gefäße bis knapp in den Bereich der Peripherie reichten, wo auch der tiefe Plexus endete (Abb. 26B, b).

Nach postnataler Haltung in Normoxie zeigten sich keine offensichtlichen immunhistologischen Unterschiede zwischen Wildtyp- und iNOS-KO-Mäusen. Die Gefäßentwicklung des superfiziellen, tiefen und intermediären Plexus schien bis P14 in beiden Mauslinien identisch und altersentsprechend verlaufen zu sein. Bei den Tieren

mit iNOS-Defizienz konnten keine Unterschiede in der Ausbreitung oder Morphologie der Gefäße festgestellt werden.



**Abbildung 28: Intermediärer Plexus (Isolectin, grün) in flatmounts von Wt- (A-D) und iNOS-KO- (a-d) Mäusen aus Normoxie (21 % O<sub>2</sub>)**

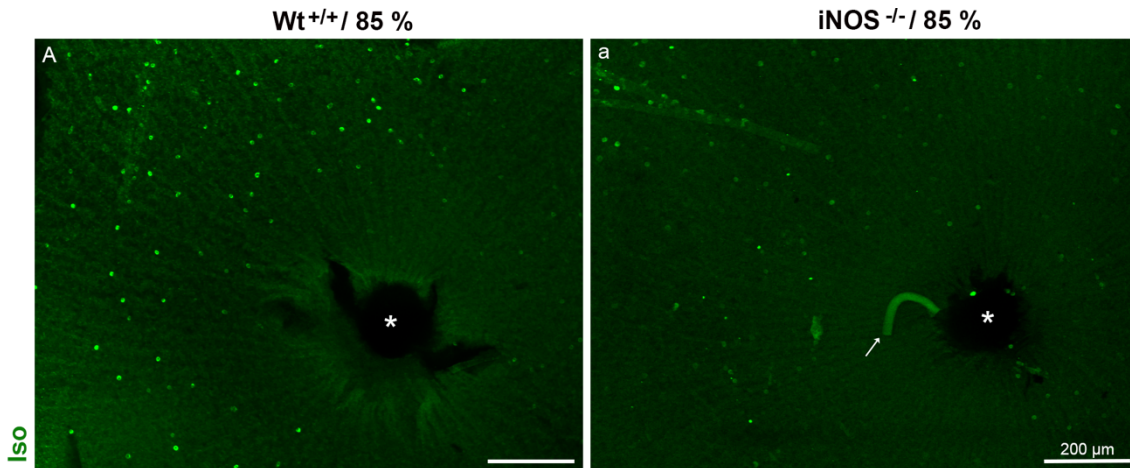
**A, a:** Punkt- und strichförmige Gefäßnetzwerkanfänge des intermediären Plexus bei geringer Vergrößerung. **B, b und C, c:** Starke Vergrößerung des sich neu entwickelnden Gefäßnetzes mit Verbindungsgefäßen aus anderen Schichten der Netzhaut, die sich als gewundene Gefäßbiegungen darstellen (Pfeile). Tip-Zellen sind außen an den Gefäßanfängen zu erkennen (Rechteck in C, c). **D, d:** Zoom der Gefäße mit Tip-Zellen und faserartigen, langen Filopodien (Pfeilköpfe) aus C und c. Der Balken entspricht bei A, a 200 μm und bei B, b, C, c und D, d 20 μm.

### 3.3.2 Gefäßentwicklung in der Retina nach Haltung in Hyperoxie

Die Untersuchung der retinalen Gefäßentwicklung bei Wildtyp- und iNOS-KO-Mäusen, die direkt nach der Geburt für 14 Tage bei einer erhöhten Sauerstoffkonzentration von 85 % O<sub>2</sub> gehalten wurden, zeigte ein deutlich verändertes Bild im Vergleich zu den in Normoxie gehaltenen Tieren. Zwischen den verschiedenen Mauslinien (Wt vs. iNOS-KO) konnten nach der hyperoxischen Haltung jedoch weiterhin keine immunhistologischen Unterschiede ausgemacht werden. In beiden Versuchsgruppen zeigten sich gleichartige Befunde.

Obwohl Astrozyten unter Hyperoxie nachweisbar waren (siehe auch Abschnitt 3.2.2), wenn auch in einer gegenüber der Normoxie deutlich veränderten Anordnung, konnten bei 85 % O<sub>2</sub> weder in den Vertikalschnitten (siehe Abb. 23C, D) noch in den *flatmounts* (siehe Abb. 22C, D) beider Mauslinien Ansätze eines physiologischen Gefäßnetzwerkes lokalisiert werden.

Die Färbung mit Isolectin zeigte eindeutig, dass keiner der drei Gefäßplexus begonnen hatte, sich zu entwickeln. Weder in der NFL, wo eindeutig Astrozyten vorhanden sind und sich unter physiologischen Bedingungen der primäre Plexus ausbildet, noch in den plexiformen Schichten (OPL und IPL), in die der tiefe und der intermediäre Plexus hätten einwachsen sollen, wurden Gefäßstrukturen gefunden (siehe Abb. 23C, D). In der gesamten Retina war durch die Färbung nur ein Hintergrundrauschen zu erkennen. Das Fehlen eines physiologischen retinalen Gefäßsystems war sowohl zentral (Abb. 29) als auch peripher in der Netzhaut festzustellen. In den Präparaten beider Gruppen aus Hyperoxie wurden vermehrt hyaloidale Gefäßreste beobachtet, die der Retina auf der zum Glaskörper gewandten Seite auflagen (siehe Abb. 22C, D; Abb. 29a, Pfeilköpfe und siehe auch Abschnitt 3.5). Die kreisrunden, stark fluoreszierenden punktförmigen noch nicht identifizierbaren Profile im Bereich der NFL und GCL konnten ebenfalls in beiden Gruppen deutlich erkannt werden. Dadurch, dass in den Netzhäuten dieser beiden Versuchsgruppen kein ausgeprägtes Gefäßsystem durch Isolectin angefärbt wurde, fielen diese hier stärker und auch schon in geringer Vergrößerung als leuchtende Punkte auf. In einigen Präparaten erschienen sie nicht ausschließlich rund, sondern teilweise auch länglich gestreckt und faserartig.



**Abbildung 29: Zentrale mit Isolectin (grün) gefärbte *flatmount*-Aufnahmen von Wt- und iNOS-KO-Mäusen aus 85 % O<sub>2</sub>**

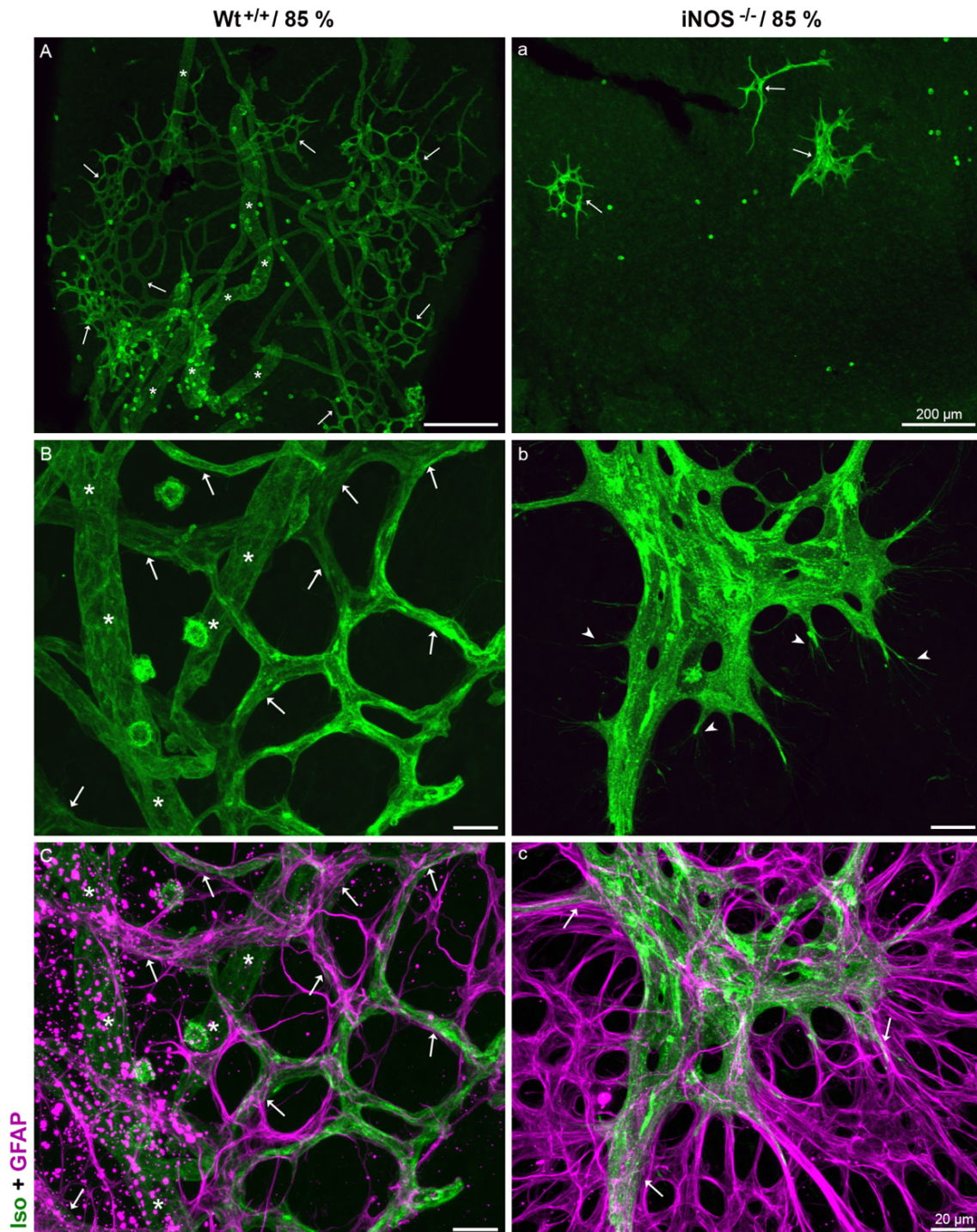
Gefäßfreie Retina einer Wt- (A) und iNOS-KO-Maus (a) bei 85 % O<sub>2</sub> nahe der Papille (Stern). Der Retina aufliegend findet sich der Rest eines hyaloidalen Gefäßes (Pfeil). Der Balken entspricht 200 µm.

Bei Hyperoxie konnten innerhalb der Retina bei zwei der untersuchten Augen der Wildtypmäuse und bei einem der untersuchten iNOS-KO-Mäuse, die als *flatmount* präpariert wurden, einzelne spezielle „Gefäßgitter“ bzw. „Gefäßknäuel“ in eher peripheren Anteilen nachgewiesen werden (Abb. 30A, a). Sie lagen jeweils ungefähr im Bereich der NFL und GCL und wirkten ohne Verbindung zum sonstigen Hintergrund. Ihre Morphologie erinnerte teilweise an die wabenartige engmaschige Musterung des tiefen Plexus (siehe auch Abb. 27).

Bei einem dieser speziellen Befunde in der Retina eines Wildtyptieres war dieses Gefäßgitter im Vergleich sehr großflächig und nahm fast ein ganzes Segment des *flatmounts* ein (Abb. 30A, Pfeile). Neben den kleinen, ineinander verschlungenen Gefäßen waren hier auch einige weitlumige Gefäße mit geradem Verlauf erkennbar. Es wirkte fast so wie ein unabhängiges Gefäßnetz, d.h. als würde dieses Gefäßsystem blind enden und anfangen. Auffällig war, dass in beiden Präparaten der Wildtypmäuse, wo diese Gefäßgitter bzw. -knäuel aufgefunden wurden, eine enge Lagebeziehung zu hyaloidalen Gefäßresten festgestellt wurde (Abb. 30A, B, Sterne). Eine Abgrenzung zu diesen Gefäßen war meist möglich, da die hyaloidalen Gefäße keine Wabenstruktur aufwiesen und außerhalb der retinalen Schichten lagen. In einigen Bereichen schienen die embryonalen Gefäßreste (Abb. 30A, Sterne) jedoch sehr eng mit den besonderen Gefäßknäueln verwoben zu sein, was die Differenzierung erschwerte. Als zusätzliches Unterscheidungsmerkmal wurde nach einer Kolo-kalisation der speziellen Gefäßstrukturen mit Astrozyten geschaut. Während die Gefäßgitter, die innerhalb der Retina lagen, eine deutliche Kolo-kalisation mit Astrozyten aufwiesen (Abb. 30D, Pfeile), als ob diese auch den speziellen Gefäßen zur Vorlage dienten, konnte dieses Phänomen bei den hyaloidalen Gefäßen (Abb. 30C, Stern) nie beobachtet werden.

Bei dem vergleichbaren Befund in der Retina einer iNOS-KO-Maus (Abb. 30a) fanden sich keine Reste hyaloidaler Gefäße in unmittelbarer Nähe dieser speziellen Gefäßstrukturen. Sie waren hier kleiner und unauffälliger. Es entstand eher der Eindruck von kleinen Knäueln als der eines Gitternetzes oder entwickelter Gefäße mit Lumen (Abb. 30a, Pfeile). Bei Betrachtung dieser Strukturen in starker Vergrößerung zeigten sich in den äußeren Bereichen der Gefäßknäuel viele feine, faserig erscheinende Fortsätze wie sie von den Filopodien der Tip-Zellen bekannt sind (Abb. 30b, Pfeilköpfe). Durch die Färbung mit GFAP konnte auch hier eine eindeutige Kolo-kalisation dieser Strukturen mit den Astrozytenwaben festgestellt werden (Abb. 30c). Insbesondere in Kombination mit den Astrozyten entstand dabei ein stark dreidimensionaler Eindruck der strukturellen Befunde.

In den vertikalen Gefrierschnitten der Augen dieser beiden Versuchsgruppen konnten keine äquivalenten Strukturen gefunden werden, die an diese Gewebebesonderheiten in den *flatmounts* erinnern könnten. Auch in den *flatmounts* waren diese Befunde Einzelfälle.



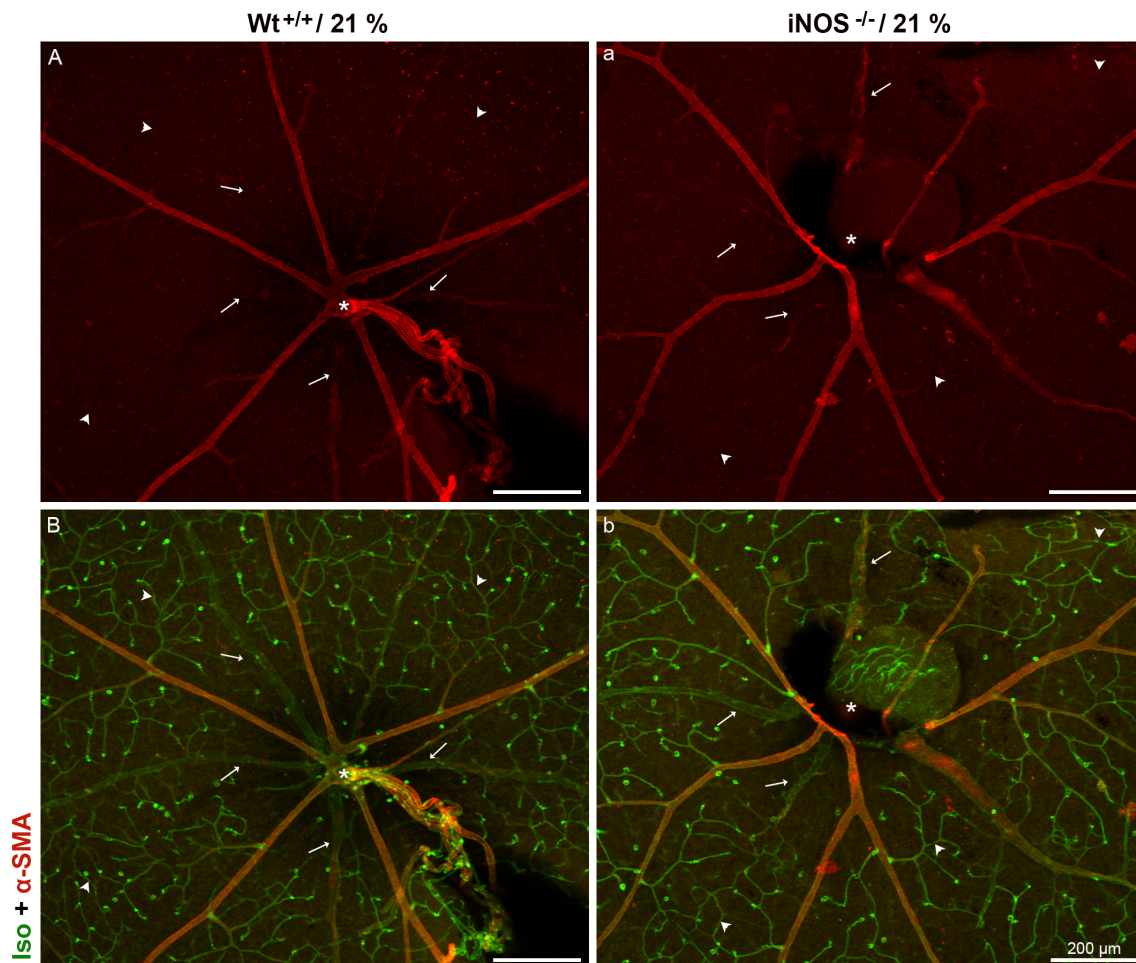
**Abbildung 30: Einzelfälle von "Gefäßgittern" und "Gefäßknäueln", dargestellt mit Isolectin (grün), in der sonst avaskulären Retina von Wt- (A-C) und iNOS-KO- (a-c) Mäusen aus 85 % O<sub>2</sub>**

**A:** Großflächiges Gefäßgitter (Pfeile) innerhalb der ansonsten gefäßfreien Retina einer Wt-Maus aus 85 % O<sub>2</sub> in enger Lagebeziehung zu angelagerten hyaloidalen Gefäßen (Sterne). **B:** Die enge Lagebeziehung zu angelagerten hyaloidalen Gefäßen (Sterne) des Gefäßgitters von A bei stärkerer Vergrößerung (Pfeile). **C:** Das Astrozytennetzwerk (GFAP, lila) weist bei Doppelfärbung mit Isolectin eine vergleichbare Gitterstruktur wie das Gefäßgitter (Pfeile) auf. Astrozyten verlaufen nicht parallel mit hyaloidalen Gefäßen (Sterne). Im linken Drittel sind unspezifische punktförmige Färbungen (lila) zu sehen. **a:** Drei einzelne kleine Gefäßknäuel (Pfeile) innerhalb der ansonsten gefäßfreien Retina einer iNOS-KO-Maus aus 85 % O<sub>2</sub>. **b:** Vergrößerung eines Gefäßknäuels mit Tip-Zell-artigen Ausläufern (Pfeilköpfe). **c:** Kolokalisation des Gefäßknäuels mit Astrozyten. Der Balken entspricht bei A und a 200 µm und bei B, b, C und c 20 µm.

### 3.4 $\alpha$ -SMA-Expression in den retinalen Gefäßen bei Wt- und iNOS-KO-Mäusen aus Normoxie (21 % O<sub>2</sub>)

Da NO auch die glatten Muskelzellen und Perizyten der Gefäßwände erreicht und dort relaxierend wirken kann, sollte überprüft werden, ob bei iNOS-KO-Mäusen strukturelle Unterschiede in der kontraktilen Zellschicht der Retinagefäße bestehen.

Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit *alpha-smooth-muscle-actin* ( $\alpha$ -SMA) durchgeführt.

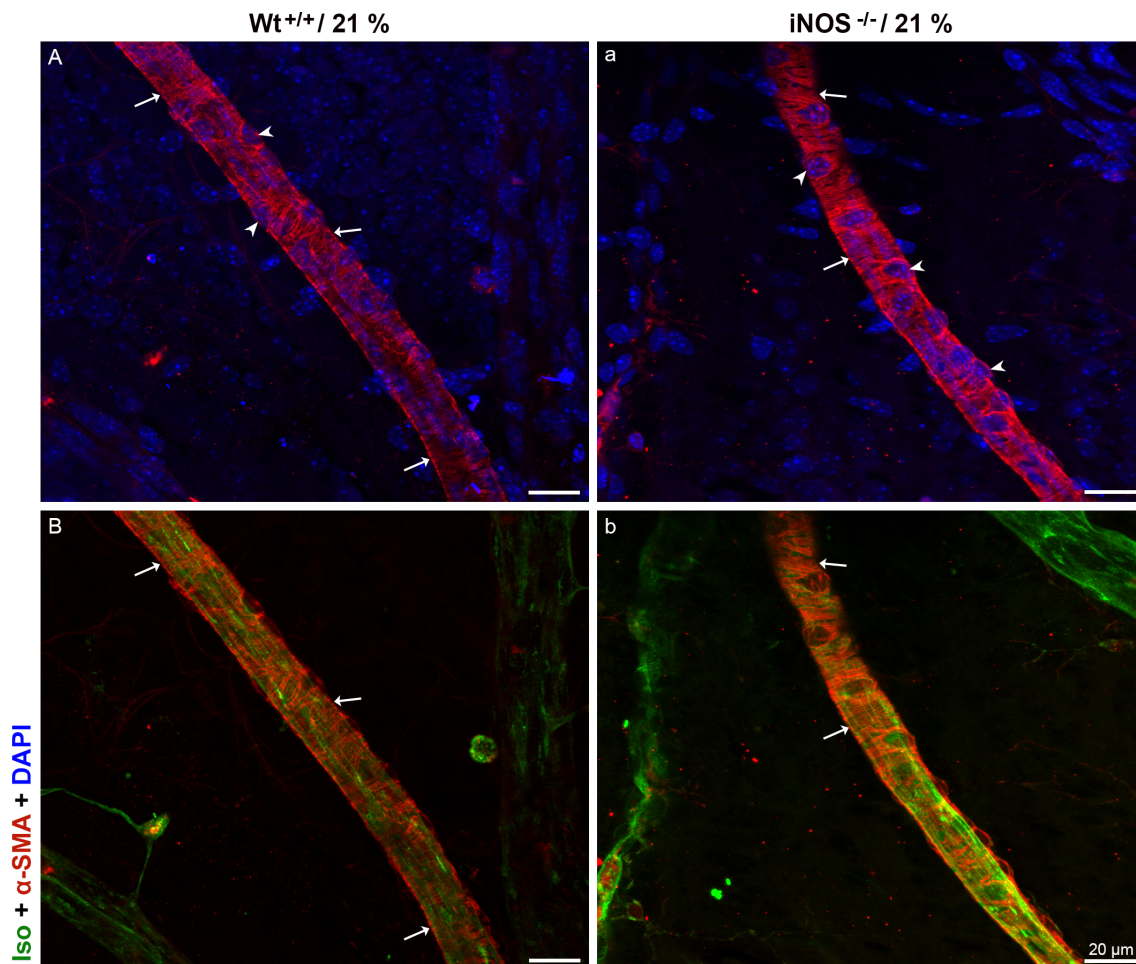


**Abbildung 31:  $\alpha$ -SMA-Expression der zentralen Gefäße des superfiziellen Plexus bei Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus 21 % O<sub>2</sub>**

**A, a:** Expression des Muskelzellmarkers  $\alpha$ -SMA (rot) in Gefäßen des superfiziellen Plexus nahe der Papille (Stern) bei Wt- (A) und iNOS-KO-Mäusen (a) in Normoxie. **B, b:** Doppelfärbung der Gefäße mit dem Endothelzellmarker Isolectin, grün) und  $\alpha$ -SMA (rot). Alle kleineren Gefäße (Pfeilköpfe) und einige größere Gefäße (Pfeile) zeigen nur eine sehr geringe Expression von  $\alpha$ -SMA. Der Balken entspricht 200  $\mu$ m.

Schon bei schwacher Vergrößerung wurde beim Mikroskopieren der *flatmounts* beider Mauslinien deutlich, dass es Gefäße gibt, die eine durch  $\alpha$ -SMA dargestellte muskuläre Schicht besitzen (Abb. 31A, a). Dies waren primär die von zentral kommenden, größeren Gefäßen des weit entwickelten superfiziellen Plexus, also vornehmlich Arterien und Venen. Die Darstellung der Doppelfärbung von Isolectin B4, das die in allen Gefäßen vorkommende Endothelzellschicht nachweist, und  $\alpha$ -SMA (Abb. 31B, b) zeigte, dass in

dem von diesen Hauptgefäßen abzweigenden Netzwerk kleinerer Gefäße (Abb. 31B, b, Pfeilköpfe) bei geringer Vergrößerung kaum  $\alpha$ -SMA sichtbar war, was für Kapillaren spricht. Doch auch in großen Gefäßen des superfiziellen Plexus war die  $\alpha$ -SMA-Expression nicht überall gleichermaßen ausgeprägt. In einigen Gefäßen mit größerem Lumendurchmesser war die  $\alpha$ -SMA-Färbung nur schwach oder fast gar nicht erkennbar (Abb. 31B, b, Pfeile).



**Abbildung 32:  $\alpha$ -SMA-Expression eines zentralen Gefäßes des superfiziellen Plexus einer Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Maus aus Normoxie bei höchster Vergrößerung**

**A, a:** Äußere Gefäßwand eines zentralen Gefäßes mit querverlaufenden (Pfeile)  $\alpha$ -SMA-markierten Zellen (rot) und zusätzlich mit DAPI (blau) markierten querangeschnittenen, runden Zellkerne dieser Muskelzellen (Pfeilköpfe). **B, b:** Quer verlaufende Ummantelung der Endothelzellen (Isolectin, grün) durch  $\alpha$ -SMA-markierte (rot) glatte Muskelzellen (Pfeil). Der Balken entspricht 20  $\mu$ m.

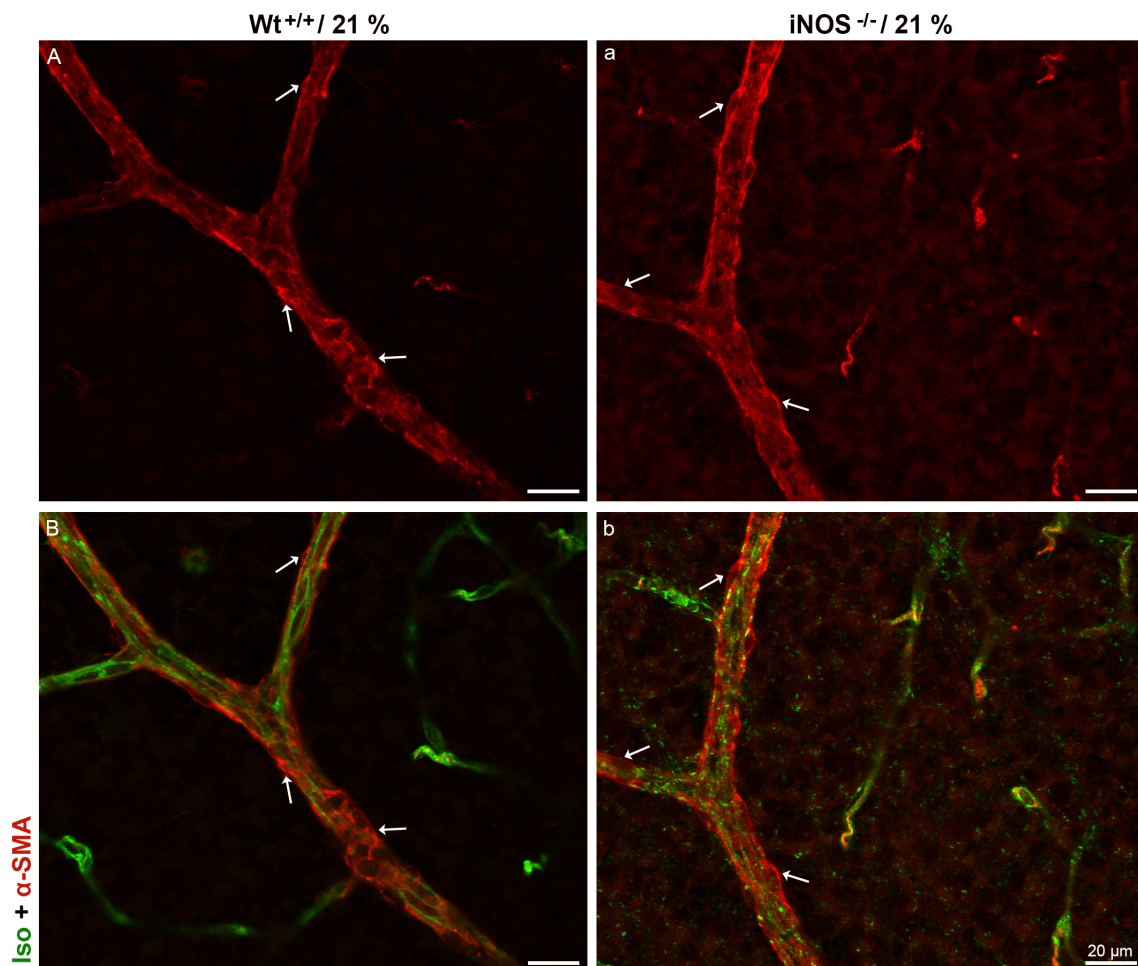
Details der Gefäßwandstruktur konnten in beiden Mauslinien gleichermaßen in den bereits stark ausgereiften,  $\alpha$ -SMA-positiven Gefäßen des primären Plexus erkannt werden. Vor allem zentral zeigte sich, dass die  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen in einer dünnen Schicht quer um die Endothelzellen herum verlaufen (Abb. 32, Pfeile), was für glatte Muskelzellen von Gefäßen (beginnend mit Arteriolen) typisch ist.

Dadurch stellte sich bei der Doppelfärbung von Endothel (längs verlaufende Zellen) und Muskulatur (quer verlaufende Zellen) eine Art Streifung dar (Abb. 32B, b, Pfeile), die für

eine baumrindenartige Optik sorgte. Eine zusätzliche Färbung mit DAPI ließ die Zellkerne der Muskelzellen und damit die Muskelzellen als Ganzes besser erkennen (Abb. 32A, a, Pfeilköpfe). Sie waren im Gegensatz zu den Zellkernen der Endothelzellen quer und nicht längs angeschnitten.

Auch in höchster Vergrößerung zeigten die feinen Abzweigungen der Hauptgefäße des superfiziellen Plexus, die untereinander ein lockeres Gefäßgeflecht bilden, nur eine sehr schwache  $\alpha$ -SMA-Expression.

Das Erscheinungsbild der  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen veränderte sich im Bereich der kleineren, peripheren Gefäße. Statt einer querverlaufenden Muskelschicht zeigten sich eher längs verlaufende Zellen (Abb. 33A, a, Pfeile), die ein unregelmäßig deckendes Muster entlang der Endothelzellschicht der Gefäße erzeugten (Abb. 33B, b, Pfeile).

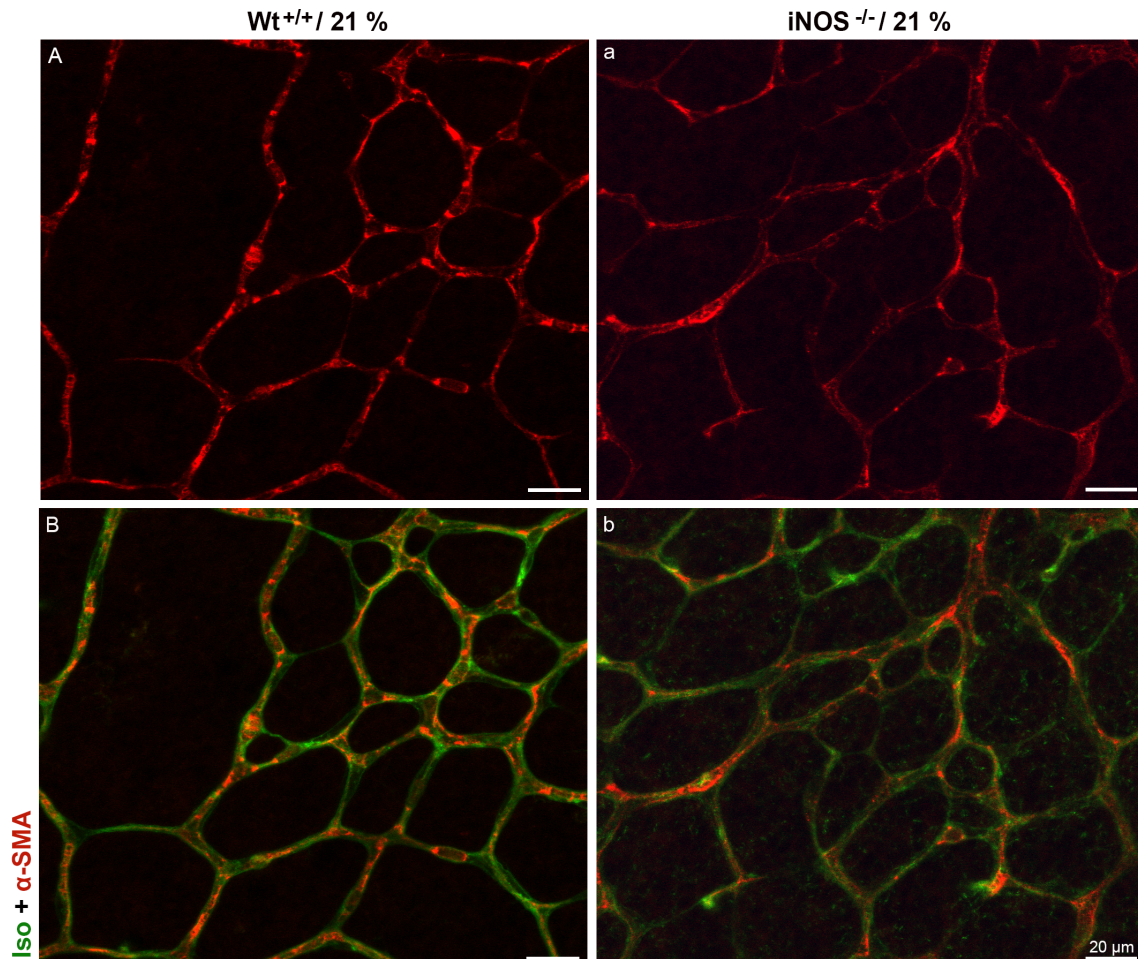


**Abbildung 33:  $\alpha$ -SMA -Expression kleiner, peripherer Gefäße des superfiziellen Plexus von Wt- (A, B) und iNOS- KO- (a, b) Mäusen aus 21 %  $O_2$**

**A, a:**  $\alpha$ -SMA-Expression (rot) längs verlaufender Zellen in kleinen peripheren Gefäßen. **B, b:** Äußere Ummantelung (Pfeile) der Endothelzellen (Isolectin, grün) durch die  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen. Der Balken entspricht 20  $\mu$ m.

Nur mit stärkster Vergrößerung konnten  $\alpha$ -SMA-positive Zellen entlang des mosaikartigen Gefäßnetzwerkes des tiefen Plexus in den *flatmounts* der Wt- und iNOS-KO-Tiere aus 21 %  $O_2$  erkannt werden. Auch hier konnten keine Unterschiede in der  $\alpha$ -

SMA-Expression zwischen den beiden Mauslinien festgestellt werden. Die Morphologie ähnelte den kleineren, peripheren Gefäßen des superfiziellen Plexus, es waren eher längs verlaufende, inhomogen deckende Zellen zu erkennen (Abb. 34A, a), die die Endothelzellschicht der Gefäße von außen umgaben (Abb. 34B, b).



**Abbildung 34:**  $\alpha$ -SMA-Expression in Gefäßen des tiefen Plexus von Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus 21 %  $O_2$

A, a:  $\alpha$ -SMA-Expression (rot) längsverlaufender Zellen in Gefäßen des tiefen Plexus. B, b: Umhüllung der Endothelzellschicht (Isolectin, grün) durch  $\alpha$ -SMA exprimierende Zellen. Der Balken entspricht 20  $\mu$ m.

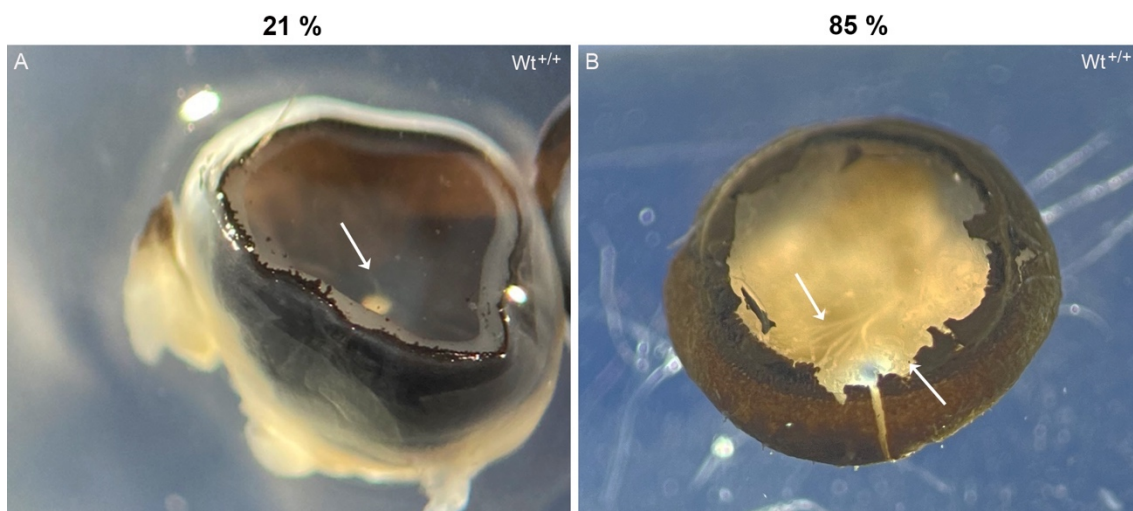
Im sich gerade erst entwickelnden intermediären Plexus konnten bei hoher Vergrößerung in beiden Mauslinien nur vereinzelt schon glatte Muskelzellen nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Insgesamt konnten nach Betrachtung der  $\alpha$ -SMA-Immunfluoreszenzfärbungen des retinalen Gefäßsystems der Wt- und iNOS-KO-Mäuse aus normoxischen Bedingungen keine Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien festgestellt werden, d.h. es konnten keine Unterschiede in der Entwicklung der glatten Muskelzellen und der Perizyten bzw. dem Reifegrad der retinalen Gefäße in beiden Gruppen festgestellt werden, was vor dem Hintergrund, dass glatte Muskelzellen und Perizyten den NO-Rezeptor SGC besitzen, denkbar gewesen wäre.

### 3.5 Überreste des embryonalen Gefäßsystems – Hyaloidale Gefäße

Nach einem Zufallsfund wurde in den Netzhäuten der Versuchstiere aktiv nach Überresten embryonaler Gefäßstrukturen gesucht. Es lässt sich sagen, dass es eine deutliche Häufung von hyaloidalen Gefäßresten in beiden Mauslinien aus hyperoxischen Haltungsbedingungen gab.

Erste Indizien für eine Persistenz des embryonalen Gefäßsystems zeigten sich hier bereits während der Präparation der Augen. Nach Entfernung der Linse waren unabhängig von der Mauslinie teilweise bereits unter dem Binokular gefäßähnliche Strukturen im Fundus erkennbar. Es zeigten sich milchig weiße, miteinander vernetzte Fasern, die von der Papille ausgehend in den Glaskörper hineinragten. Bei Tieren aus Hyperoxie wurden diese faserartigen Strukturen oft als besonders büschelig, stark verwoben und sehr raumeinnehmend im Glaskörper und auch um die Linse herum wahrgenommen (Abb. 35B, Pfeile). Die Präparation der Augen von diesen Versuchstieren war aufgrund dieser miteinander verschlungenen Gefäßbündel anspruchsvoller.



**Abbildung 35: Während der Präparation aufgefundene hyaloidale Gefäße im Glaskörper von Wt-Mäusen bei 21 % und 85 % O<sub>2</sub>; repräsentativ für beide Mauslinien**

**A:** Von der Papille in den Glaskörper eintretendes, gerades hyaloidales Gefäß einer Wt-Maus aus 21 % O<sub>2</sub>.

**B:** Ausgeprägte, stark verwundene hyaloidale Gefäßbüschel im Glaskörper einer Wt-Maus aus Hyperoxie 85 % O<sub>2</sub>.

In den Augen beider Mauslinien aus Raumluft (21 % O<sub>2</sub>) konnten während der Präparation partiell auch potenzielle Gefäßreste erkannt werden. Diese Befunde traten hier jedoch deutlich seltener auf. Die Strukturen waren geringer in ihrer Anzahl, filigraner und weniger auffällig. Öfters war in den Tieren aus normoxischen Haltungsbedingungen nur ein einziges kräftigeres Gefäß erkennbar, welches aus der Papille entsprang und gradlinig in den Vitreous verlief (Abb. 35A, Pfeil).

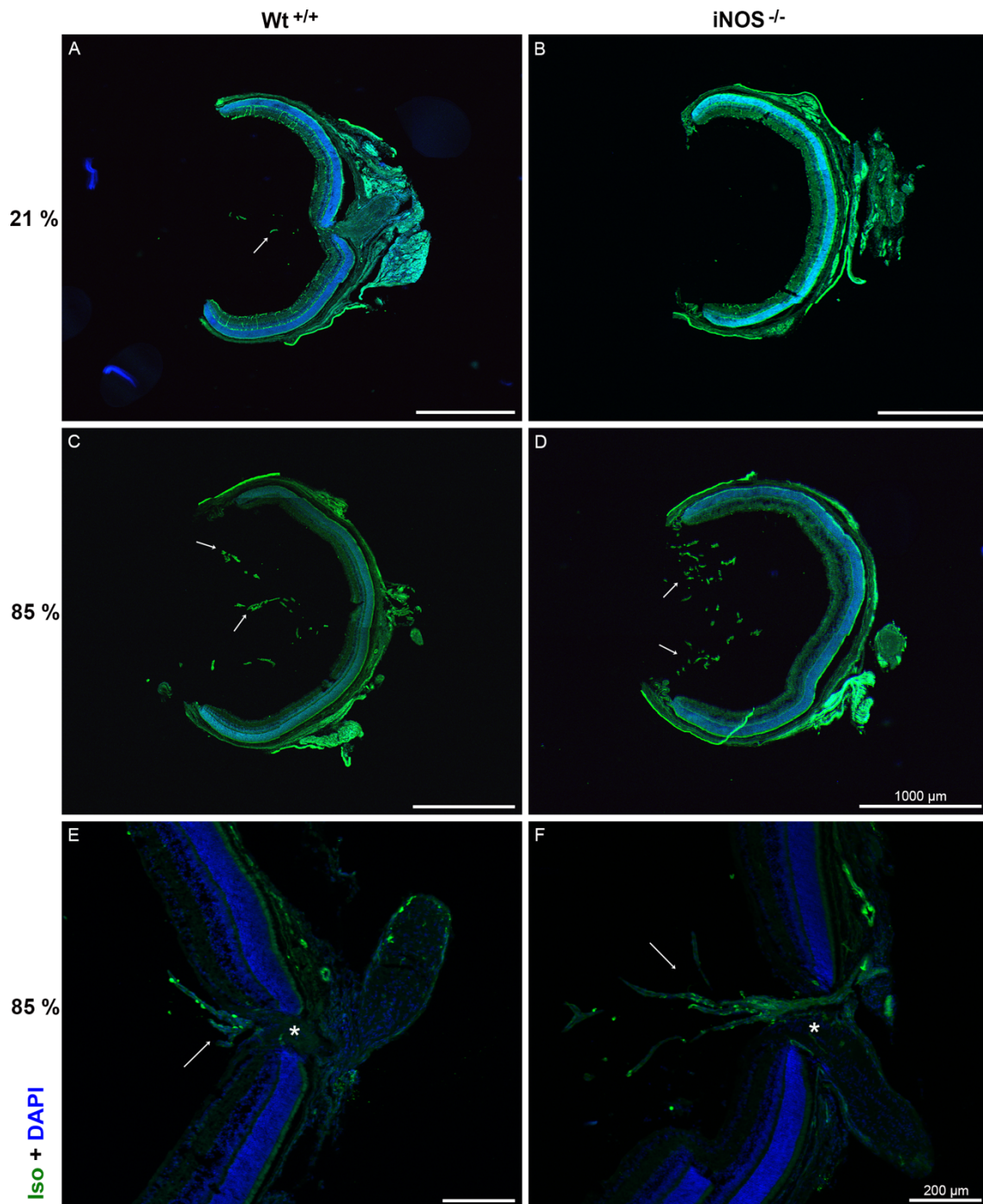
Diese ersten Beobachtungen bestätigten sich auch im Prozess der Fluoreszenzfärbungen. Zusätzliche hyaloidale Gefäße außerhalb der Retina wurden dabei durch Anfärbung mit Isolectin und DAPI als solche identifiziert.

In den für die Gefrierschnitte aufgearbeiteten Augen der Wt- und iNOS-KO-Tiere aus Normoxie konnten auch bei der Mikroskopie nur sehr vereinzelt oder sogar gar keine embryonalen Gefäßreste aufgefunden werden (Abb. 36A, B). Lediglich in einigen wenigen Schnitten konnten punktuell runde oder längliche gefäßähnliche Strukturen im Bereich des Glaskörpers nachgewiesen werden (Abb. 36A, Pfeile). Die Befunde waren hier nie so auffällig und zahlreich wie in den vergleichbaren Präparaten der Tiere aus hohen Sauerstoffbedingungen (85 % O<sub>2</sub>).

In allen untersuchten Augen der bei Hyperoxie gehaltenen Tiere konnten in Gefrierschnitten vaskuläre Strukturen innerhalb des Glaskörpers entdeckt werden. In Schnitten, die das Auge weiter außen trafen, wurden die Gefäßreste zum Teil sehr mittig im Glaskörper oder sogar nahe der Linse angeschnitten (Abb. 36C, D). Häufig zeigte sich der peripher verzweigte, embryonale Gefäßbaum hier als Anhäufung zahlreicher ovaler und rundlicher Strukturen (Abb. 36C, D, Pfeile). Die einzelnen hyaloidalen Gefäße schienen hier jeweils im Querschnitt getroffen worden zu sein.

In Augen von Wt- oder iNOS-KO-Mäusen aus 85 % O<sub>2</sub>, die sehr zentral genau im Bereich des Sehnervs angeschnitten wurden, konnte der Ursprung des embryonalen Gefäßstranges teilweise deutlich erkannt werden. Aus der Papille (Abb. 36E, F, Stern) trat mittig ein Gefäß in den Glaskörper ein, welches sich dann schnell aufgabelte (Abb. 36E, F, Pfeile). Ein solches Bild konnte in keinem der gefärbten Schnitte eines Tieres aus normalen Sauerstoffbedingungen (21 % O<sub>2</sub>) entdeckt werden.

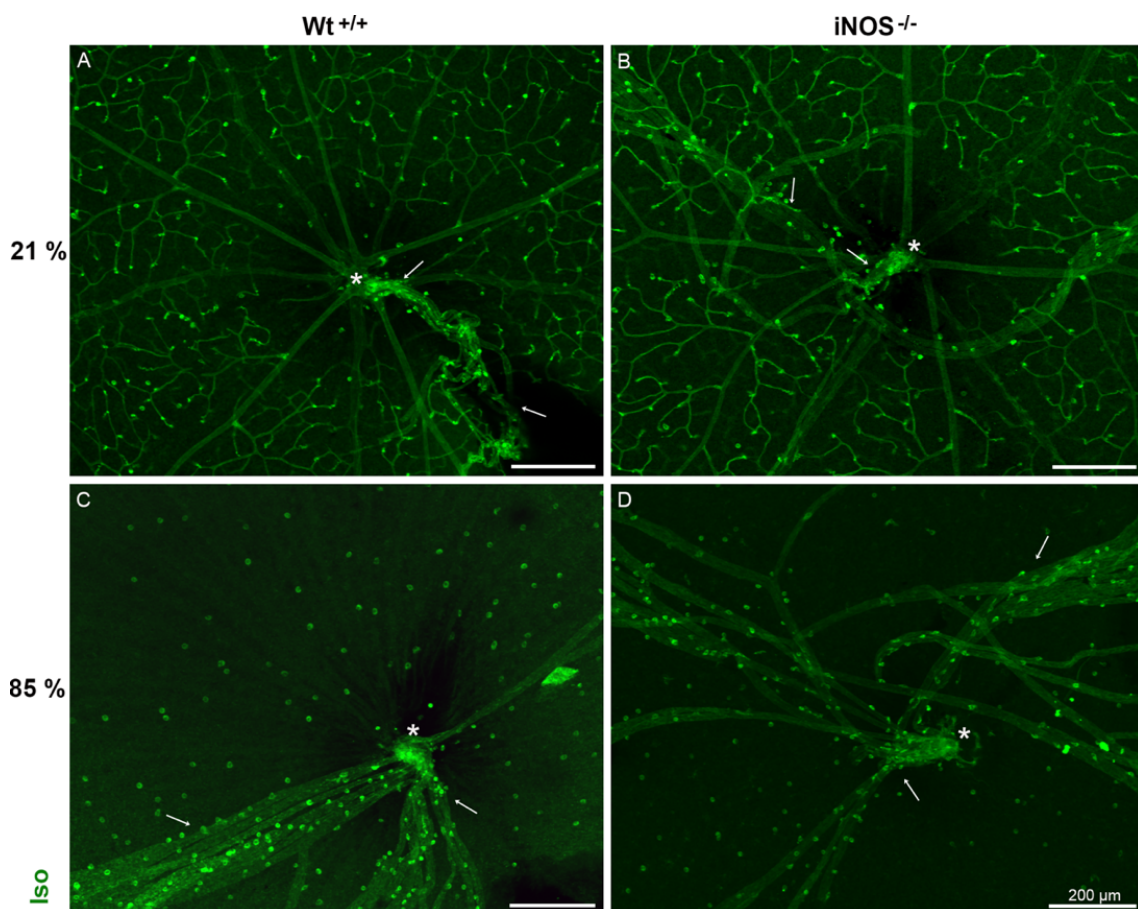
Auch bei mikroskopischer Untersuchung der *flatmounts* konnten Gefäßreste der pränatalen Gefäßstruktur identifiziert werden. Auf den Übersichtsaufnahmen waren teilweise Gefäßstränge und -bündel erkennbar, die der zum Glaskörper gerichteten Seite der Retina auflagen. In einigen Fällen wirkte es auch so, als ob Anteile dieser Gefäßreste während der Präparation oder des Eindeckens über die Netzhaut bewegt worden wären. Zwischen den Tieren aus verschiedenen Sauerstoffbedingungen zeigten sich wieder deutliche Unterschiede.



**Abbildung 36: Gefrierschnitte von Wt- und iNOS-KO-Mäusen unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen (21 % / 85 % O<sub>2</sub>) mit Überresten hyaloidaler Gefäße im Glaskörper**

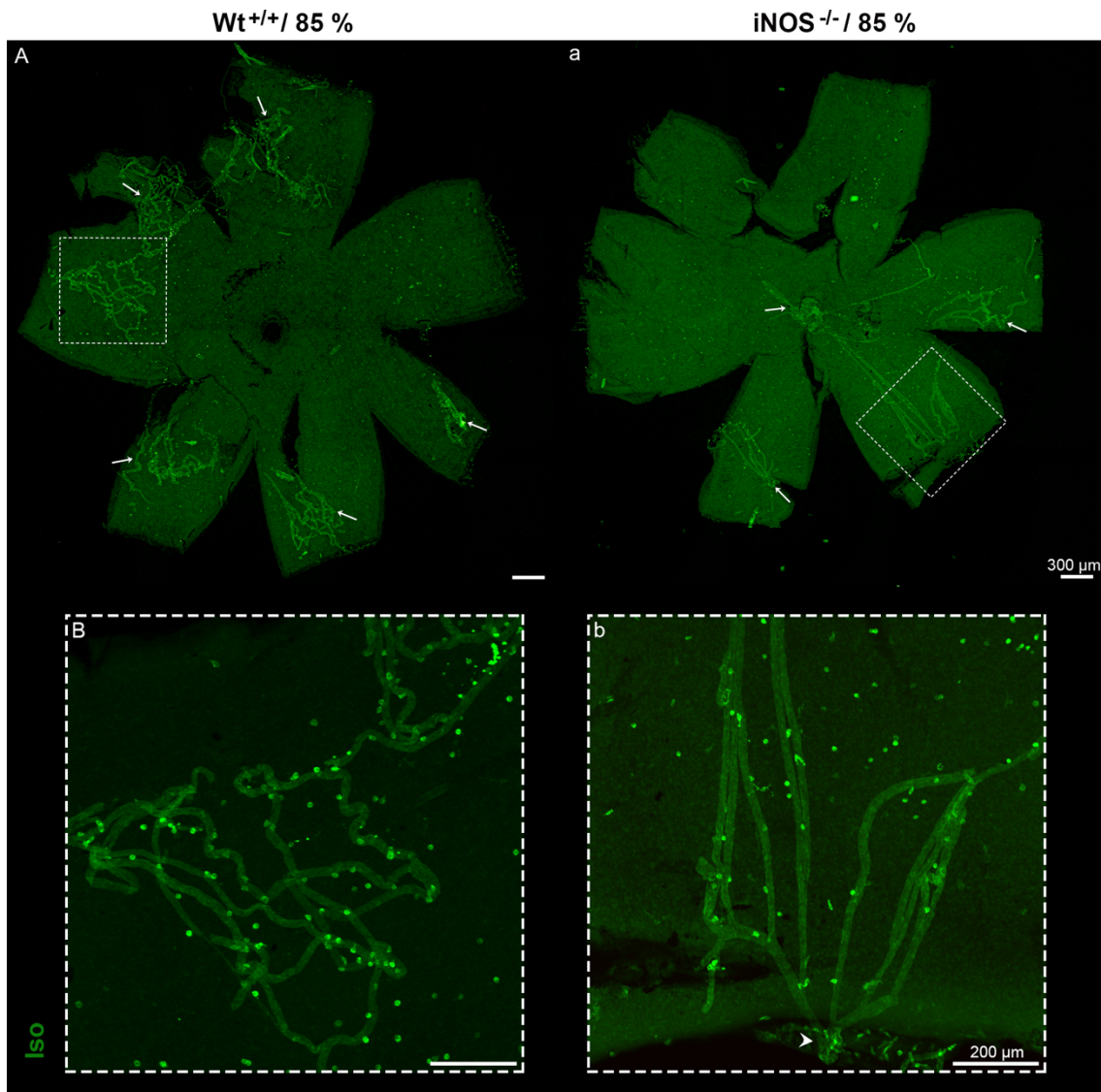
Vertikalschnitt eines Auges einer Wt-Maus (A) und einer iNOS-KO-Maus (B) aus 21 % O<sub>2</sub> mit wenigen bzw. keinen Überresten hyaloidaler Gefäße (Pfeil). Weiter außen getroffener Vertikalschnitt eines Auges einer Wt-Maus (C) und einer iNOS-KO-Maus (D) aus 85 % O<sub>2</sub> mit zahlreichen Überresten hyaloidaler Gefäße mittig im Glaskörper (Pfeile). Vergrößerung eines zentralen Vertikalschnitts des Auges einer Wt- (E) und einer iNOS-KO-Maus (F) bei 85 % O<sub>2</sub> mit Austritt der hyaloidalen Gefäße (Pfeile) direkt aus der Papille (Stern) in den Glaskörper. Der Balken entspricht 1000 µm bei A-D und 200 µm bei E und F. Isolectin = Endothelzellfärbung, grün und DAPI = Zellkernfärbung, blau.

Auch in den *flatmounts* waren die Reste des embryonalen Gefäßsystems am häufigsten und in größtem Ausmaß in den Präparaten beider Mauslinien aus 85 % O<sub>2</sub> zu finden. Von der Papille ausgehend fanden sich häufig voluminöse Ansammlungen vieler einzelner Gefäße (Abb. 37C, D, Pfeile), die sich von hier ausgehend auf die Innenseite der Netzhaut legten. In der Regel konnten die Reste des persistierenden embryonalen Gefäßbaumes dann in Form von mehreren größeren Gefäßbündeln über das gesamte Präparat verteilt beobachtet werden (Abb. 38A, a, Pfeile). Insbesondere peripher der Retina dieser Versuchsgruppen wurden oft viele noch ineinander verschlungene, stark gewundene Anhäufungen weitlumiger Gefäße detektiert (Abb. 38B). Teilweise zeigten sich sogar Verbindungen der verwobenen hyaloidalen Gefäßstränge mit dem periphersten Rand der Retina (Abb. 38b, Pfeilkopf). Die Befunde waren in den Netzhäuten beider Mauslinien aus Hyperoxie mikroskopisch besonders auffällig, da hier kein physiologisches Gefäßnetzwerk in der Retina ausgebildet und angefärbt war. Es wurde eindeutig sichtbar, dass die Gefäße nicht innerhalb der Netzhaut lagen, sondern sich auf der zum Glaskörper gerichteten Innenseite der flach ausgebreiteten Retina befanden.



**Abbildung 37: Zentrale Befunde hyaloidaler Gefäße in *flatmounts* von Wt- und iNOS-KO-Mäusen aus verschiedenen Sauerstoffbedingungen (21 % O<sub>2</sub> / 85 % O<sub>2</sub>)**

**A, B:** Von der Papille (Stern) ausgehender hyaloidaler Gefäßstrang (Pfeile) auf der vaskulären Netzhaut einer Wt- (A) und iNOS-KO-Maus (B) aus 21 % O<sub>2</sub>. **C, D:** Voluminöser, von der Papille (Stern) ausgehender hyaloidaler Gefäßstrang (Pfeile) auf der avaskulären Netzhaut einer Wt- (C) und iNOS-KO-Maus (D) bei 85 % O<sub>2</sub>. Der Balken entspricht 200 µm; Isolectin = Endothelzellfärbung, grün.



**Abbildung 38: Flatmounts von Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus Hyperoxie (85 % O<sub>2</sub>) mit hyaloidalen Gefäßbündeln**

**A, a:** Über die ganze Netzhaut verteilte Bündel hyaloidaler Gefäße (Pfeile). **B:** Verwobenes, peripheres Bündel hyaloidaler Gefäße aus A. **b:** Von zentral kommender, an den Retinarand angrenzender hyaloidaler Gefäßstrang (Pfeilkopf) aus a. Der Balken entspricht 300 µm bei A, a und 200 µm bei B, b; Isolectin = Endothelzellfärbung, grün.

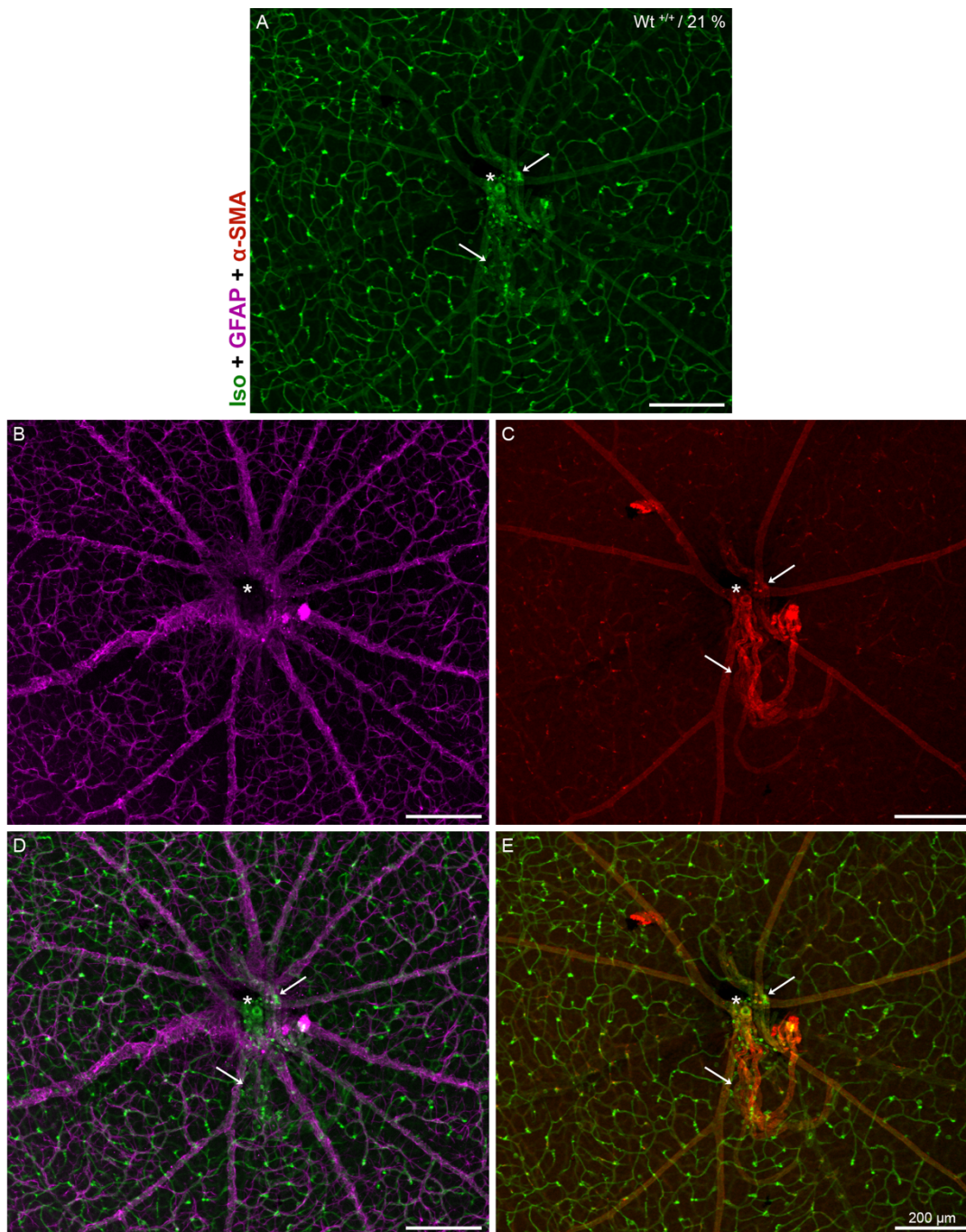
Bei den Wt- und iNOS-KO-Tieren aus physiologischen Sauerstoffbedingungen (21 % O<sub>2</sub>) waren in den *flatmounts* partiell auch Überreste der hyaloidalen Gefäße zu finden, aber deutlich seltener. Sie fanden sich ausschließlich zentral, nahe der Papille (Abb. 37A, B, Stern). Meistens zeigten sich nur kleine Gefäßbündel oder einzelne Gefäßstränge, die noch deutlich mit der Papille verbunden waren und zu einer Seite herausragten (Abb. 37A, B, Pfeile). Zur Differenzierung der hyaloidalen Gefäße war hier eine zusätzliche GFAP-Färbung hilfreich, da diese Gefäße während der Entwicklung keinem retinalen Astrozytennetzwerk folgen und dementsprechend auch keine Kolokalisation aufweisen (Abb. 39A, B, D, Pfeil). So konnte eine klare Abgrenzung zum superfiziellen Plexus des retinalen Gefäßsystems ermöglicht werden, der mit seiner Lage in der NFL räumlich am nächsten zu den auf der Glaskörperseite der Retina

anliegenden hyaloidalen Gefäßen war und immer eindeutig mit dem GFAP-exprimierenden Gefäßstern aus Astrozyten kolokalisiert war.

Eine Immunfluoreszenzfärbung der hyaloidalen Gefäßstrukturen mit  $\alpha$ -SMA zur Identifizierung der kontraktilen Zellschicht der Gefäße zeigte dagegen in allen vier Versuchsgruppen gleichermaßen differenzierte  $\alpha$ -SMA-exprimierende Zellen (Abb. 39A, C, E, Pfeil), die das Endothel ummantelten, was auf bereits entwickelte und ausgereifte Gefäße des embryonalen Gefäßsystems hinweist.

Bei Betrachtung der embryonalen Gefäßstrukturen im Bereich des Glaskörpers und der Retina konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien festgestellt werden. Unterschiede ließen sich ausschließlich zwischen Tieren aus verschiedenen Sauerstoffbedingungen (21 % O<sub>2</sub> vs. 85 % O<sub>2</sub>) feststellen. In den Augen von Wt- und iNOS-KO-Mäusen aus Hyperoxie konnte gleichermaßen eine Häufung von hyaloidalen Gefäßresten beobachtet werden.

Unabhängig von der Mauslinie oder den Sauerstoffbedingungen während der Haltung fiel bei der Untersuchung der Reste pränataler Gefäßstrukturen auf, dass in den Bereichen, in denen diese Gefäße gefunden wurden, oft eine Häufung von Artefakten in den Immunfluoreszenzfärbungen auftrat. Es wirkte fast so, als hätten sich Anteile der Sekundärantikörper in diesen Strukturen verfangen.



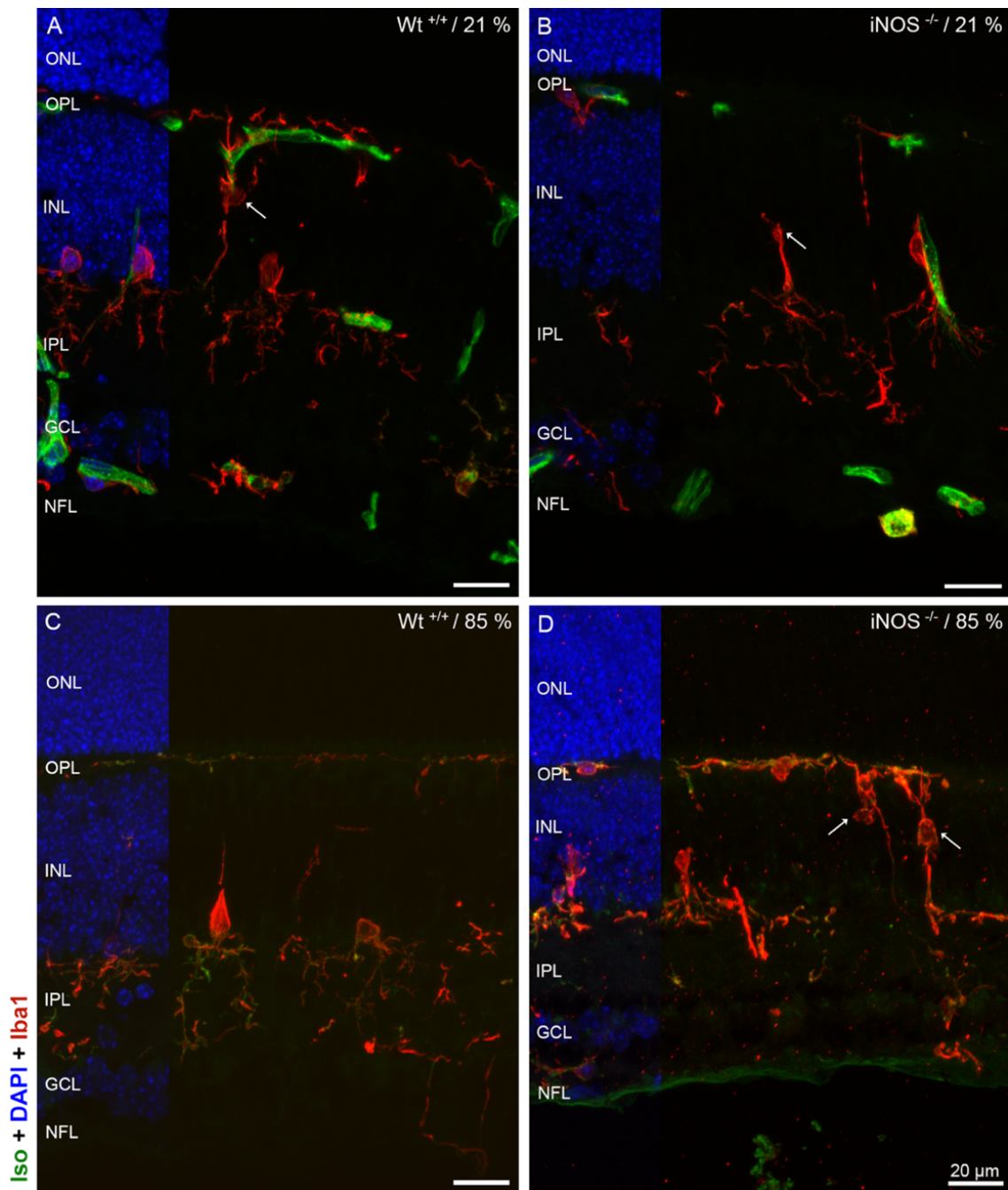
**Abbildung 39: Doppelmarkierungen der mit Isolectin (grün) markierten hyaloidalen Gefäße und GFAP (links, lila) und  $\alpha$ -SMA (rechts, rot) in einer vaskulären Retina einer Wt-Maus aus 21 % O<sub>2</sub>**

**A:** Mit Isolectin (grün) dargestelltes hyaloidales Gefäßbündel (Pfeile) nahe der Papille (Stern) auf der zum Glaskörper gerichteten Innenseite einer flachen, vaskulären Retina. **B:** GFAP-Färbung (lila) des Präparates aus A zur Darstellung des Astrozytennetzwerkes, das nur parallel zum superfiziellen Plexus und nicht im Bereich der hyaloidalen Gefäße nachzuweisen ist. **C:**  $\alpha$ -SMA-Färbung (rot) des Präparates aus A. Einige große Gefäße des superfiziellen Plexus und das Gefäßbündel hyaloidaler Gefäße (Pfeile) sind markiert. **D:** Doppelfärbung von Isolectin und GFAP. Im Bereich der hyaloidalen Gefäße (Pfeile) liegen keine Astrozyten. **E:** Doppelfärbung von Isolectin und  $\alpha$ -SMA. Im Bereich der hyaloidalen Gefäße (Pfeil) wird  $\alpha$ -SMA exprimiert. Der Maßstab entspricht 200  $\mu$ m. Die Abbildungen sind repräsentativ für beide Mauslinien.

### **3.6 Mikrogliazellen in der Retina von Wildtyp- und iNOS-KO-Mäusen aus Normoxie (21 % O<sub>2</sub>) und Hyperoxie (85 % O<sub>2</sub>)**

#### **3.6.1 Expression von Iba1**

Um mögliche Unterschiede in der Verteilung und Morphologie der Mikroglia, die iNOS exprimieren können, darzustellen, wurden Gefrierschnitte und *flatmounts* von allen vier Versuchsgruppen mit Iba1 angefärbt. In den Vertikalschnitten konnten die Mikrogliazellen in allen Gruppen primär in drei verschiedenen Ebenen der Netzhaut lokalisiert werden, im Bereich der NFL, der IPL und der OPL (Abb. 40). In den beiden Versuchsgruppen, in denen die Tiere in Raumluft gehalten wurden und sich ein physiologisches retinales Gefäßnetzwerk entwickelt hatte, zeigte sich eine direkte Lagebeziehung der drei mit Isolectin B4 dargestellten Gefäßplexus zu den Mikrogliazellen (Abb. 40A, B). Im Bereich der NFL zeigten sich keine eindeutigen Zellkörperquerschnitte. Stattdessen waren vereinzelt eher unscheinbare, fadenförmige Zellfortsatzstrukturen zu erkennen, die teilweise auch in die GCL hineinragten. Im Vergleich dazu fanden sich in der IPL auffällige Ansammlungen stark verzweigter und langer Mikrogliazellfortsätze. Die dazugehörigen Somata lagen im Anfangsbereich der INL. Sie waren groß, oval-rund und sehr prägnant. In keiner anderen Schicht waren die Zellkörper im Vertikalschnitt so eindeutig und flächig zu sehen. Teilweise konnten weiter außen in der INL auch noch Mikroglia mit einem Anhang von Zellfortsätzen entdeckt werden (Abb. 40A, B, D, Pfeile), die möglicherweise auf dem Weg in Richtung OPL waren und ihre Endposition noch nicht erreicht hatten. In der schmalen OPL wirkten die Mikrogliazellen komprimierter. Zum Teil zeigten sich hier zwischen den verdichteten Fortsätzen kleine runde Somata. In der angrenzenden ONL konnten nie Anteile von Mikrogliazellen detektiert werden.



**Abbildung 40: Verteilung der Mikrogliazellen in Vertikalschnitten der Retina von Wt- und iNOS-KO-Mäusen aus verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21 % / 85 % O<sub>2</sub>)**

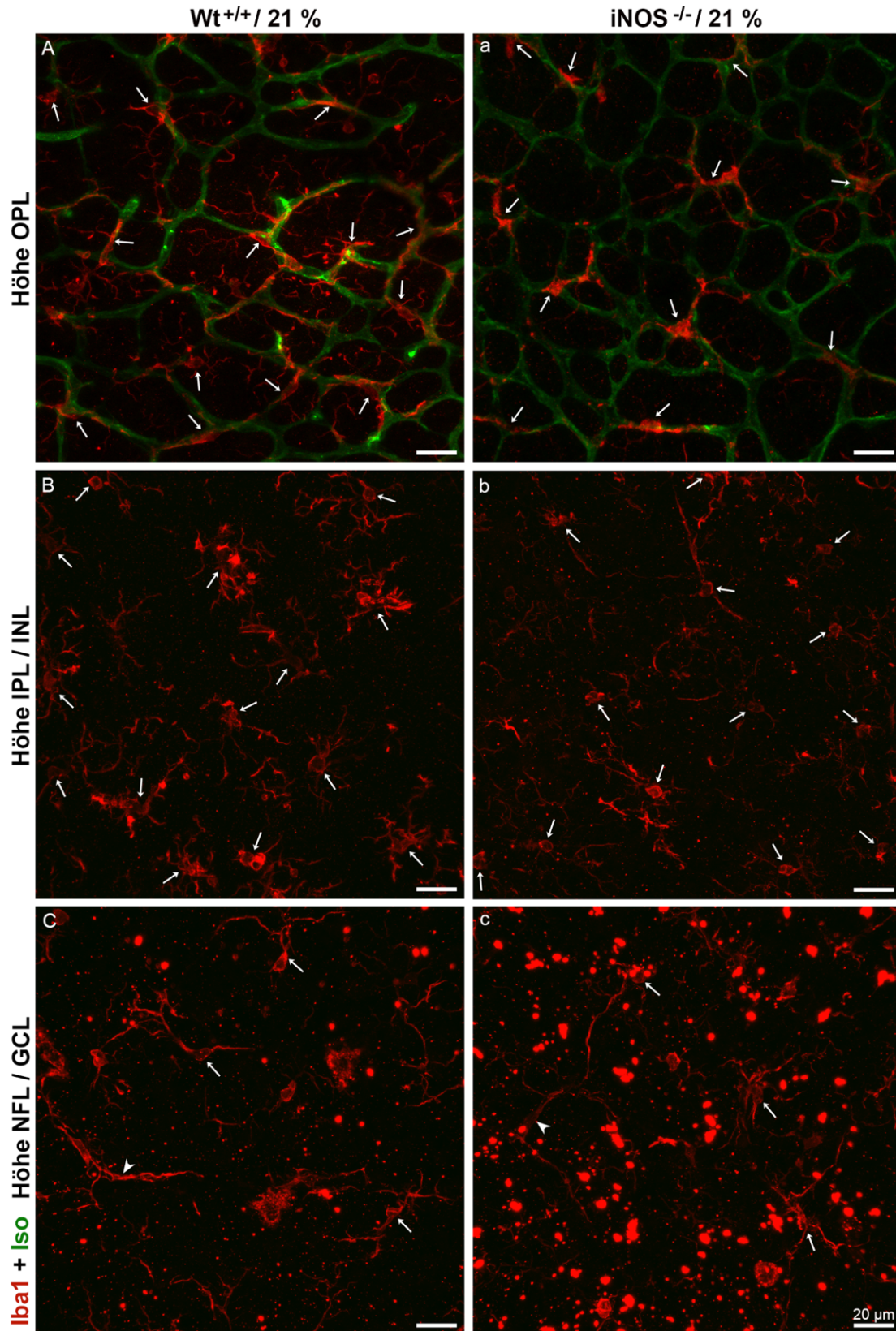
Iba1-markierte Mikrogliazellen (rot), die vornehmlich in der NFL/GCL, IPL/INL und OPL der Netzhaut lokalisiert sind. In den Präparaten aus Normoxie (A, B) zeigt sich eine enge Lagebeziehung zu den retinalen Gefäßen der drei Gefäßplexus. Im Bereich der INL scheinen einige Zellen noch in Richtung OPL zu wandern (Pfeile). ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglienzellschicht, NFL = Nervenfaserschicht; Der Balken entspricht 20 µm.

Besser ließ sich die Gestalt der Mikrogliazellen in den *flatmounts* ausmachen. Auch dort wurde die klare Verteilung in drei Ebenen der Retina deutlich. Die ersten Ansammlungen von Mikrogliazellen fanden sich in allen Gruppen ganz innen, ungefähr im Bereich der NFL und GCL (Abb. 41C, c und 42C, c). Dies konnte teilweise anhand einer zusätzlichen DAPI-Färbung identifiziert werden. In den Präparaten aller *flatmounts* zeigten sich insbesondere in diesem Bereich viele, stark fluoreszierende Artefakte, sodass eine Abgrenzung der einzelnen Zellen nicht immer eindeutig möglich war. Die bereits beschriebenen kreisrunden, fluoreszierenden, unspezifischen Profile in der Färbung mit Isolectin B4, zeigten sich auch mit der Iba1-Färbung. In diesen inneren Retinaschichten waren die Somata der Mikroglia häufig klein und hatten eine runde bis ovale Gestalt. Von einem Zellkörper gingen jeweils nur wenige Fortsätze ab, dafür waren diese oft lang und zweigten sich auf ihrem Weg weiter auf (Abb. 41C, c, Pfeile und Abb. 42C, c, Pfeile). Immer wieder fielen auch prägnante, eher längliche Strukturen auf, bei welchen eine Abgrenzung zwischen Soma und Zellfortsatz nicht eindeutig möglich war (Abb. 41C, c und 42C, c Pfeilköpfe). Generell war die Mikrogliazellzahl auf der Glaskörperseite im Vergleich zu anderen retinalen Schichten geringer und die Zellen lagen weniger dicht beieinander. Auch in den *flatmounts* der Wt- und iNOS-KO Mäuse aus Normoxie konnte die parallele Lagebeziehung der Mikrogliazellen mit den Gefäßen des superfiziellen Plexus in der NFL erkannt werden. Die Mikroglia lagen dabei unter den Gefäßsträngen und ihre Gestalt überschneidet sich teilweise klar mit dem Verlauf des Gefäßnetzes (nicht gezeigt).

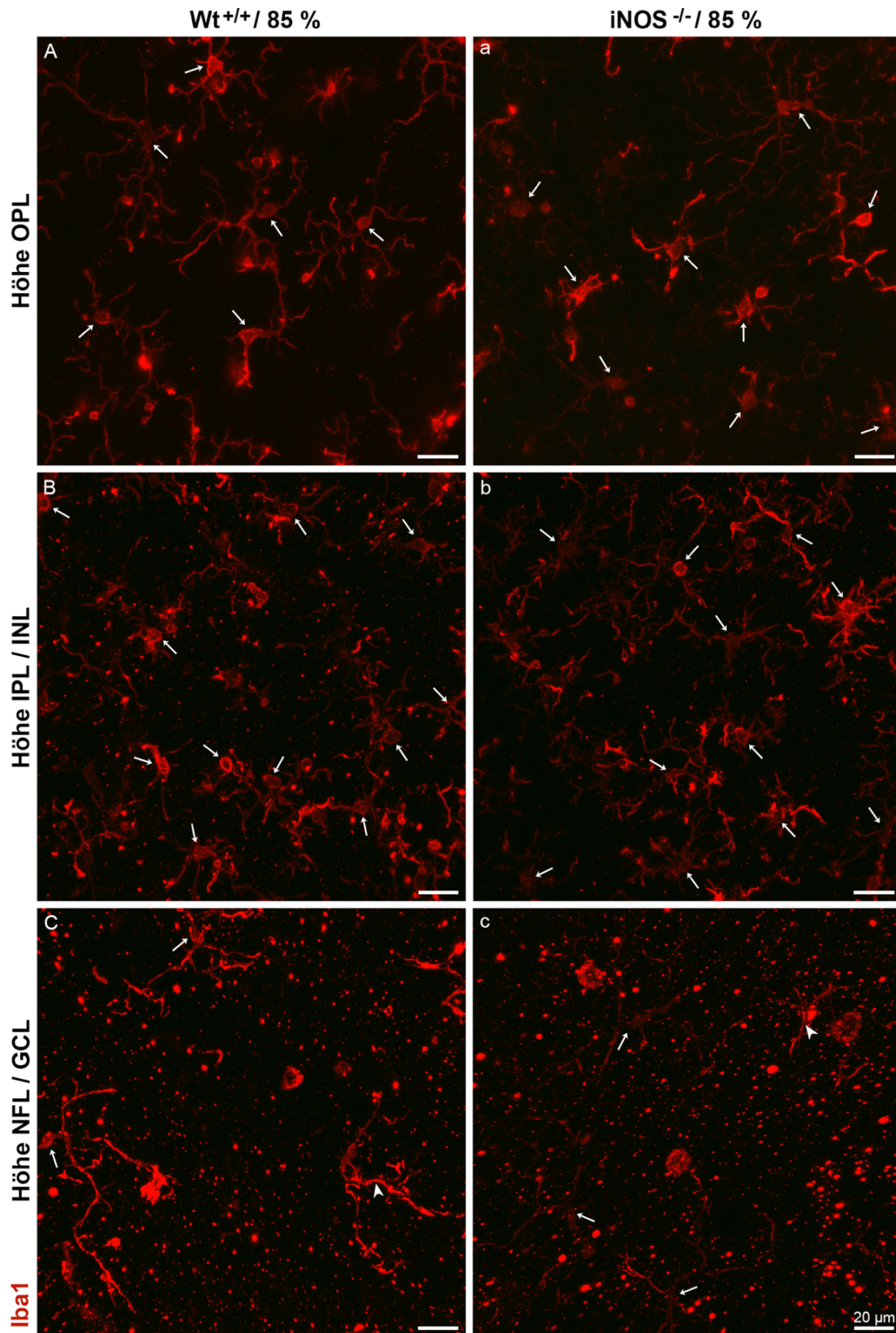
Richtung Choroidea fanden sich nach einigen mikrogliafreien Bereichen zunächst einzeln angeschnittene Iba1-positive Zellfortsätze. Noch weiter außen im Bereich der IPL waren dann zahlreiche stark verzweigte Ansammlungen von Zellausläufern gleichmäßig verteilt (Abb. 41B, b und 42B, b). Die dazugehörigen Zellkörper lagen meist schon weiter außen im Bereich der INL, wie eine Zellkern-Färbung teilweise bestätigen konnte. Die Somata waren hier sehr klein und auffallend rund. Bei Betrachtung dieser aufeinanderfolgenden Ebenen als Projektion, zeigt sich ein dichtes Bild stark verzweigter, voluminöser Zellfortsatzbündel mit eher unauffälligen Somata (Abb. 41B, b, Pfeile und Abb. 42B, b, Pfeile). Bei den Mäusen, die ein physiologisches Gefäßnetz entwickelt hatten (Wt 21 % O<sub>2</sub> und iNOS-KO 21 % O<sub>2</sub>), lagen in diesem Abschnitt der Retina auch die Anfänge des intermediären Plexus. Da dieser noch nicht weit entwickelt war, konnte eine örtliche Übereinstimmung von Gliazellen und Gefäßen hier nicht beobachtet werden (nicht gezeigt).

Weiter außen, auf Höhe der OPL, zeigte sich die dritte Häufung der Mikrogliazellen mit etwas abweichender Zellmorphologie (Abb. 41A, a und 42A, a). Sie wirkten hier großflächig verbreitert und langgestreckt (Abb. 41A, a, Pfeile und 42A, a, Pfeile). Es war

teilweise schwer zu differenzieren, ob es sich um mehrere einzelne Zellen oder nur einen groben, weitläufigen Zellkörper mit seinen Fortsätzen handelte. Viele stark verzweigte Ausläufer gingen von den Somata ab. Die Zellen waren hier in Ihrer Anzahl nicht unbedingt erhöht aber durch ihr massives Erscheinungsbild entstand ein dicht gepackter Eindruck. Bei den Mäusen aus Raumluft stimmte die Lage der flächigen, teils sogar gebogenen Zellkörper in der OPL mit dem Verlauf des tiefen Gefäßplexus deutlich überein (Abb. 41A, a). In der Tiefe der *flatmounts* war die Färbung oft nur noch schwach zu erkennen, sodass hier eine Kontrastverbesserung im Nachhinein essenziell war, um die Zellen überhaupt in ihrer Gesamtheit erkennen zu können.



**Abbildung 41: Mikrogliazellen in flatmounts von Wt- (A-C) und iNOS-KO- (a-c) Mäusen aus Normoxie**  
 A, a: Iba1-markierte (rot), großflächige, gebogene Zellkörper der Mikrogliazellen (Pfeile) mit vielen Fortsätzen auf Höhe der OPL mit exemplarisch dargestellter deutlicher Koloalokalisation zum tiefen Gefäßplexus (Isolectin, grün). B, b: Dichte Ansammlung vieler Mikrogliazellen mit kleinen runden Somata (Pfeile) und zahlreichen verzweigten Zellausläufern im Bereich der IPL und INL. C, c: Vereinzelte Mikrogliazellen mit kleinen Somata (Pfeile) und wenigen langen Zellfortsätzen im Bereich der NFL/GCL. Teilweise ist keine klare Abgrenzung zwischen Soma und Zellfortsätzen möglich (Pfeilköpfe). Hier sind viele unspezifische punktförmige Färbungen (rot). Der Balken entspricht in allen Abbildungen 20 µm.

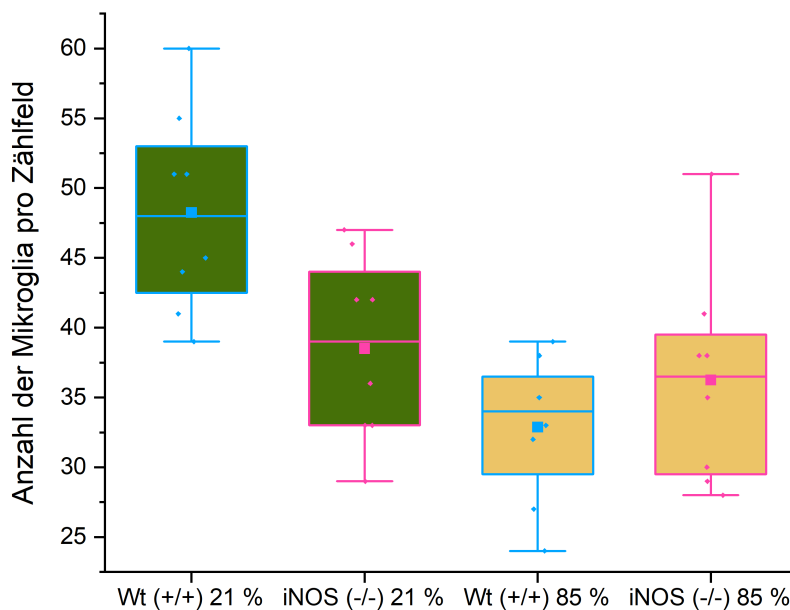


**Abbildung 42: Mikrogliazellen in *flatmounts* von Wt- (A-C) und iNOS-KO- (a-c) Mäusen aus Hyperoxie**  
**A, a:** Iba1-markierte (rot), großflächige, gebogene Zellkörper der Mikrogliazellen (Pfeile) mit vielen Fortsätzen auf Höhe der OPL. **B, b:** Dichte Ansammlung vieler Mikrogliazellen mit kleinen runden Somata (Pfeile) und zahlreichen verzweigten Zellausläufern im Bereich der IPL und INL. **C, c:** Vereinzelte Mikrogliazellen mit kleinen Somata (Pfeile) und wenigen langen Zellfortsätzen im Bereich der NFL/GCL. Teilweise keine klare Abgrenzung zwischen Soma und Zellfortsätzen möglich (Pfeilköpfe). Hier sind viele unspezifische punktförmige Färbungen (rot). Der Balken entspricht in allen Abbildungen 20 µm.

### 3.6.2 Zählung der Mikrogliazellen

Um erste Hinweise auf quantitative Unterschiede der Mikroglia zu erhalten, wurden sie in acht gleichmäßig verteilten Messfeldern in einer Retina pro Versuchsgruppe gezählt (siehe auch Abb. 14, Abschnitt 2.2.2.7.).

In der Versuchsgruppe der Wt-Tiere aus Normoxie betrug der Mittelwert (MW) der unterschiedlichen Zählergebnisse 48,25. Die einzelnen Werte lagen in einem Bereich zwischen 39 und 60 und mit 15 % konnte eine mittlere relative Standardabweichung (RSD %) berechnet werden. Bei den iNOS-KO-Mäusen aus Normoxie war der Mittelwert mit 38,5 etwas geringer. Die relative Standardabweichung lag bei 17 % und es wurden Werte zwischen 29 und 47 dokumentiert. In den Gruppen aus hyperoxischen Bedingungen war die Gesamtzahl der Mikrogliazellen geringer. Bei den Wildtypmäusen aus Hyperoxie lag der Mittelwert der Zählungen bei 32,88 und war damit am niedrigsten. Die gezählten Werte lagen zwischen 24 und 39. Die relative Standardabweichung war bei 16 %. Der Mittelwert der iNOS-KO-Tiere aus Hyperoxie lag bei 36,25 und die einzelnen Zählergebnisse zwischen 28 und 51, mit einer hohen relativen Standardabweichung von 21 % wiesen sie die größte Streuung auf.



**Tabelle 19: Ergebnisse Mikrogliazählung**

Versuchsgruppe	Mittelwert	RSD %
Wt / 21 % O <sub>2</sub>	48,25	15 %
iNOS-KO / 21 % O <sub>2</sub>	38,50	17 %
Wt / 85 % O <sub>2</sub>	32,88	16 %
iNOS-KO / 85 % O <sub>2</sub>	36,25	21 %

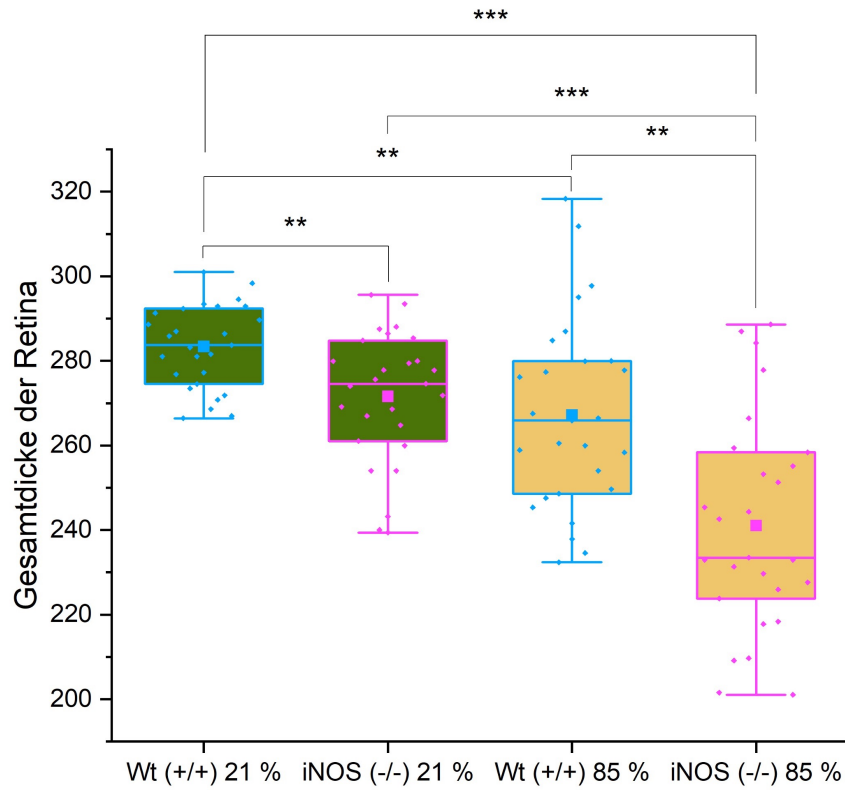
**Abbildung 43: Boxplot-Diagramm zu Ergebnissen der Mikrogliazählung**

Pro Versuchsgruppe wurden die Mikrogliazellen in jeweils acht Aufnahmen je eines *flatmounts* gezählt (biologisches Replikat = 1, technische Replikate = 8).

### **3.7 Messungen von Gesamtretina-, ONL- und INL-Dicke**

#### **3.7.1 Dickenmessung der gesamten Retina**

Um Unterschiede in der Gesamtdicke der Netzhaut zwischen den vier Versuchsgruppen zu ermitteln, wurden zentrale Messungen aller Schichten durchgeführt. Die Messwerte lagen zwischen 201,072  $\mu\text{m}$  (iNOS-KO, 85 %) und 318,331  $\mu\text{m}$  (Wt, 85 %). Bei den Wildtypmäusen aus Normoxie wurde der höchste Mittelwert von 283,394  $\mu\text{m}$  berechnet. Der niedrigste Mittelwert wurde in den iNOS-KO-Tieren aus 85 %  $\text{O}_2$  ermittelt. Die relative Standardabweichung der Messwerte lag in beiden Versuchsgruppen aus Normoxie und den Wildtyptieren aus Hyperoxie zwischen 3-8 % und war damit niedrig. Bei den iNOS-KO-Mäusen aus Hyperoxie war die relative Standardabweichung mit 11 % im Vergleich minimal höher. Ausreißer konnten in keiner Gruppe identifiziert werden. Beim Vergleich der Messergebnisse zwischen den Versuchsgruppen konnten hochsignifikante ( $p\text{-Wert} < 0,01$ ) Unterschiede zwischen den Wildtypmäusen und iNOS-KO-Mäusen aus normoxischen Bedingungen festgestellt werden. Hochsignifikante Unterschiede ( $p\text{-Wert} < 0,01$ ) zeigte auch der Vergleich der verschiedenen Mauslinien bei 85 %  $\text{O}_2$ . Innerhalb einer Mauslinie zeigten sich deutlich signifikante Unterschiede in Bezug auf die unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen während der Haltung. Die Gesamtdicke der Retina war nach Haltung in Hyperoxie bei Wildtyptieren hochsignifikant ( $p\text{-Wert} < 0,01$ ) und bei iNOS-KO-Tieren höchstsignifikant ( $p\text{-Wert} < 0,001$ ) geringer als nach Haltung in Normoxie. Zusätzlich zeigte sich ein höchstsignifikanter ( $p\text{-Wert} < 0,001$ ) Unterschied der retinalen Gesamtdicke bei den iNOS-KO-Tieren aus Hyperoxie im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Wt, 21 %  $\text{O}_2$ ).



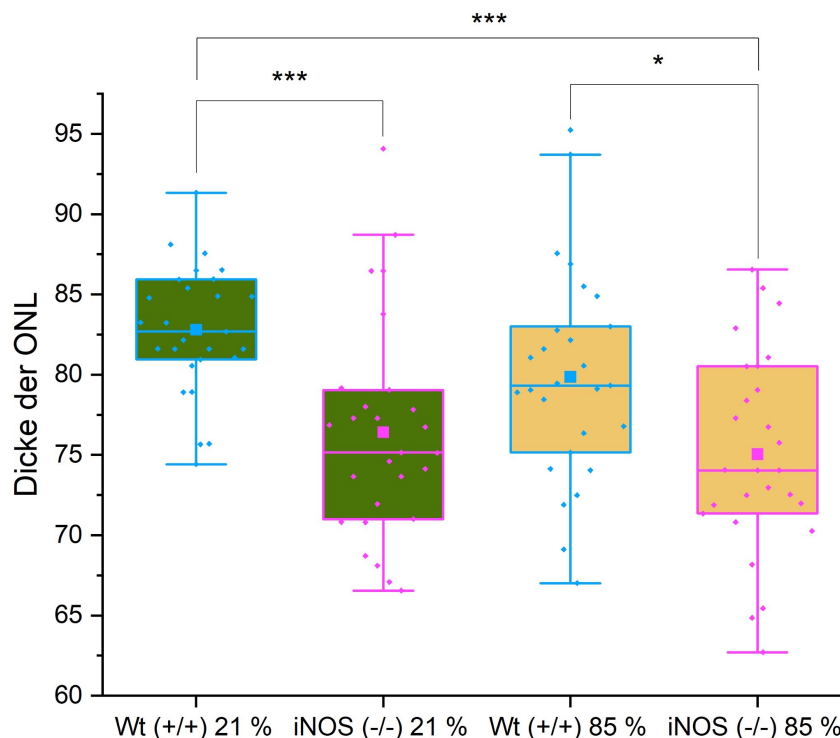
**Abbildung 44: Ergebnisse der Gesamtdickenmessung dargestellt in einem Boxplot-Diagramm**

Für jede Versuchsgruppe wurden drei biologische Replikate verwendet. Für jedes biologische Präparat wurde die Gesamtreinadicke an drei unterschiedlichen Schnitten auf verschiedenen Objektträgern in jeweils drei unterschiedlichen Regionen der Aufnahme gemessen (biologische Replikate = 3, technische Replikate = 27). Werte in µm. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ; Horizontalinie = Median; kleines Quadrat = Mittelwert

### 3.7.2 Dickenmessung der ONL

Die äußere Körnerschicht (ONL) wurde in allen vier Gruppen separat vermessen, um auch schichtspezifische Veränderungen feststellen zu können.

Der geringste Wert der ONL-Dicke konnte mit 62,710  $\mu\text{m}$  bei den iNOS-KO-Tieren aus Hyperoxie gemessen werden. Der höchste Messwert betrug 95,238  $\mu\text{m}$  und wurde in der Gruppe der Wildtypmäuse aus 85 %  $\text{O}_2$  gemessen. Die berechneten Mittelwerte der jeweiligen Gruppen lagen zwischen 75,046  $\mu\text{m}$  (iNOS-KO, 85 %) und 82,806  $\mu\text{m}$  (Wt, 21 %). Bei den iNOS-KO-Mäusen aus 21 %  $\text{O}_2$  und den Wt-Mäusen aus Hyperoxie wurden Ausreißer im Boxplot-Diagramm festgestellt. Die relative Standardabweichung war in allen Gruppen mit unter 10 % niedrig. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Dicke der ONL konnten nur zwischen den verschiedenen Mauslinien (iNOS-KO vs. Wt), und nicht zwischen den verschiedenen Sauerstoffbedingungen (21 %  $\text{O}_2$  vs. 85 %  $\text{O}_2$ ) festgestellt werden. Die Messwerte der iNOS-KO- und der Wildtypmäuse, die in Normoxie gehalten wurden, unterschieden sich höchstsignifikant ( $p$ -Wert < 0,001). Bei Haltung in 85 % Sauerstoff konnten signifikante Unterschiede ( $p$ -Wert < 0,05) zwischen den beiden Mauslinien festgestellt werden. Die ONL-Dicke der iNOS-KO-Tiere aus Hyperoxie zeigte zusätzlich eine höchstsignifikante ( $p$ -Wert < 0,001) Abnahme im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Wt, 21 %  $\text{O}_2$ ).



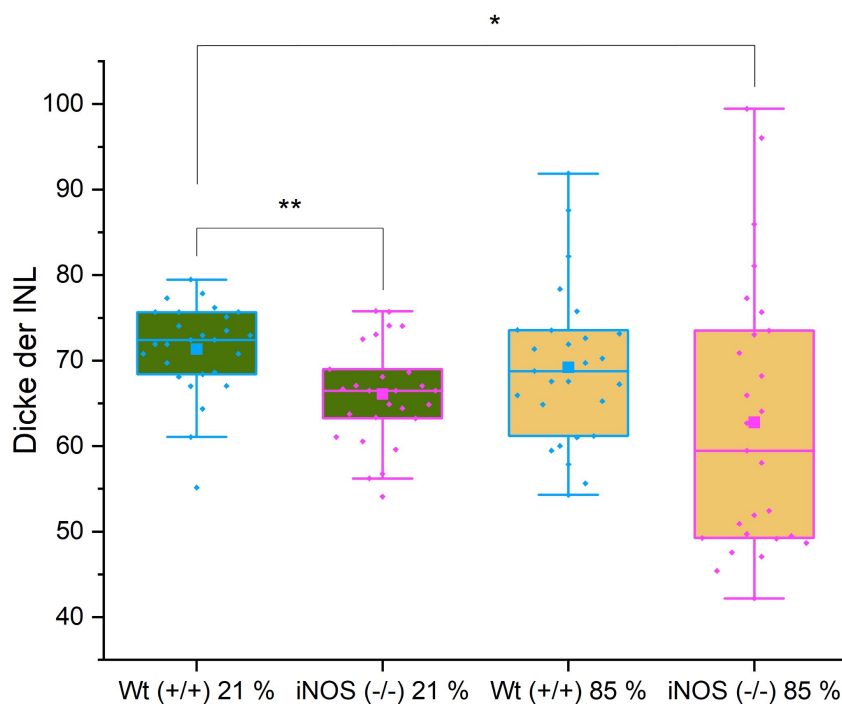
**Abbildung 45: Boxplot-Diagramm zu Ergebnissen der ONL-Dickenmessungen**

Für jede Versuchsgruppe wurden drei biologische Replikate verwendet. Für jedes biologische Präparat wurde die Dicke der äußeren Körnerschicht (ONL) an drei unterschiedlichen Schnitten auf verschiedenen Objektträgern in jeweils drei unterschiedlichen Regionen der Aufnahme gemessen (biologische Replikate = 3, technische Replikate = 27). Werte in  $\mu\text{m}$ . \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ; Horizontallinie = Median; kleines Quadrat = Mittelwert

### 3.7.3 Dickenmessung der INL

Die INL, wo die Somata der Müller-, Amakrin-, Bipolar- und Horizontalzellen liegen, wurden zum genauen Vergleich ebenfalls nochmal separat vermessen.

Der niedrigste gemessene Wert aller Gruppen lag bei 42,184  $\mu\text{m}$  und der höchste bei 99,461  $\mu\text{m}$ . Beide Werte stammten diesmal aus der Versuchsgruppe der iNOS-KO-Tiere aus Hyperoxie. Die berechneten Mittelwerte der vier Versuchsgruppen lagen zwischen 62,779  $\mu\text{m}$  (iNOS-KO, 85 %) und 71,337  $\mu\text{m}$  (Wt, 21 %). Während die relative Standardabweichung der Messwerte aus Versuchsgruppen aus Raumluft (Wt, 21 % und iNOS-KO, 21 %) mit  $< 10\%$  wieder niedrig war, zeigte sich bei den Wt-Tieren aus Hyperoxie mit 13 % nur eine mittlere relative Standardabweichung. Mit einem Ergebnis von 25 % wurde bei den iNOS-KO-Tieren aus 85 %  $\text{O}_2$  sogar eine hohe relative Standardabweichung festgestellt, was auf eine hohe Streuung der Messwerte im Verhältnis zum Mittelwert hinweist. Im Boxplot-Diagramm zeigten sich bei beiden Mauslinien aus Normoxie Ausreißer. Die Signifikanztests zeigten zwischen den in Normoxie gehaltenen Mauslinien einen signifikanten Unterschied. Dieser war hoch (p-Wert  $< 0,01$ ). Die INL-Dicke der iNOS-KO-Tiere aus Hyperoxie zeigte außerdem signifikant (p-Wert  $< 0,05$ ) geringere Werte im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Wt, 21 %  $\text{O}_2$ ).



**Abbildung 46: Boxplot-Diagramm zu Ergebnissen der INL-Dickenmessungen**

Für jede Versuchsgruppe wurden drei biologische Replikate verwendet. Für jedes biologische Präparat wurde die Dicke der inneren Körnerschicht (INL) an drei unterschiedlichen Schnitten auf verschiedenen Objektträgern in jeweils drei unterschiedlichen Regionen der Aufnahme gemessen (biologische Replikate = 3, technische Replikate = 27). Werte in  $\mu\text{m}$ . \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ; Horizontallinie = Median; kleines Quadrat = Mittelwert

## 4 Diskussion

### 4.1 Einfluss der Hyperoxie auf die retinale Angiogenese während P0-P14 bei Wt- und iNOS-KO-Mäusen

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, dass durch Haltung in dem BPD-Modell (P0-P14 bei 85 % O<sub>2</sub>) in den beiden untersuchten Mauslinien (Wildtyp und iNOS-KO) keine physiologische retinale Gefäßentwicklung sichtbar war und die Retina somit an P14 jeweils avaskulär war (siehe auch Abb. 22, 23 C und D und Abb. 29). Nur in wenigen Einzelfällen konnten kleine Gefäßstrukturen in der Netzhautperipherie nachgewiesen werden (siehe auch Abb. 30).

Es ist bekannt, dass Hypoxie einer der wichtigsten Stimuli für die Angiogenese ist (Carmeliet, 2003). Durch Hypoxie-induzierbare-Transkriptionsfaktoren (HIF) wird unter anderem die Ausschüttung von VEGF aus Makrogliazellen induziert, was der Startschuss für die retinale Gefäßentwicklung ist (Stone *et al.*, 1995). Die Mobilisierung dieser HIFs könnte durch hyperoxische Sauerstoffbedingungen verhindert werden (Caprara und Grimm, 2012). Eine Herunterregulierung des proangiogenen Faktors VEGF, ausgelöst durch Hyperoxie, konnte in der ersten Phase eines ROP-Modells bereits detektiert werden (Pierce *et al.*, 1996). Es ist daher nicht überraschend, dass eine stark erhöhte Sauerstoffkonzentration von 85 % zu einer verhinderten Gefäßausbildung führt. Vergleichbare Ergebnisse konnten Lajko *et al.* 2016 feststellen, nachdem sie Mäuse für 14 Tage in einem BPD-Modell mit 75 % Sauerstoff hielten. Auch hier konnten weder zentral noch peripher in der Retina Anzeichen für eine normale Gefäßausbildung festgestellt werden (Lajko *et al.*, 2016).

Die Netzhautgefäße der Maus zeigen nur in den ersten beiden postnatalen Wochen eine Anfälligkeit gegenüber erhöhter Sauerstoffkonzentrationen (Gu *et al.*, 2002). Da sich die retinalen Gefäße in der Maus aber erst postnatal ab P0 in der Netzhaut zu entwickeln beginnen (Dorrell *et al.*, 2002), kann davon ausgegangen werden, dass das Fehlen der retinalen Gefäße bei den Tieren des BPD-Modells nicht auf eine sekundäre Vaso-Obliteration, ausgelöst durch Hyperoxie, zurückzuführen ist. Dies unterscheidet die Situation wesentlich von den Tieren des OIR-Modells, bei denen sich der primäre Plexus bereits in der Retina ausgebildet hat, wenn es an P7 zu dem plötzlichen Sauerstoffanstieg kommt, der die erste Phase der ROP darstellt. Erst so entsteht dann durch Verengung der Blutgefäße und Regression der Kapillaren die typische gefäßfreie Zone (Stahl *et al.*, 2010), die im Vergleich zu den in dieser Arbeit beschriebenen vollständig avaskulären Netzhäuten ausschließlich zentral liegt.

Vor dem Hintergrund, dass die Netzhaut der Mäuse aus dem hier vorgestellten BPD-Modell also vermutlich zu keinem Zeitpunkt des Versuchs physiologisch durchblutet war,

kann davon ausgegangen werden, dass das oxygenierte Blut überhaupt nicht die gesamte Netzhaut erreichen konnte, da die Sauerstoffzufuhr zu Geweben unmittelbar vom Vorhandensein von Blutgefäßen abhängt (Morita *et al.*, 2017). Dieser Gedanke wurde bereits 2005 von der Arbeitsgruppe um West weiterverfolgt. Sie konnten durch Nutzung des EF5-Sauerstoffsensors bei Mäusen, die in der ersten postnatalen Woche bei 80 % O<sub>2</sub> gehalten wurden, paradoxerweise sogar eine hypoxische Retina feststellen und in der peripheren Retina eine erhöhte VEGF-Konzentration detektieren. Weshalb sich trotz dieser scheinbar optimalen Angiogenese-Bedingungen keine Netzhautgefäße entwickelten, wird mit dem bestehenden Vorhandensein des embryonalen Gefäßsystems erklärt. Dieses würde das sauerstoffangereicherte Blut weitertransportieren, sodass im Bereich der Papille, wo die A. hyaloidea in den Glaskörper eintritt, eine hyperoxische Barriere entstünde, die die physiologische radiale Gefäßausprossung aus dem Sehnerv verhindert (West *et al.*, 2005). Dieser Erklärungsansatz könnte eine plausible Begründung für das Fehlen der Netzhautgefäße auch in diesem Hyperoxie-BPD-Modell darstellen. Untersuchungen nach expliziten Hinweisen von Hypoxie in der Retina der Versuchstiere würden weiteren Aufschluss diesbezüglich geben.

#### **4.2 Astrozyten nach Normoxie und Hyperoxie bei Wt und iNOS-KO-Mäusen an P14**

Zur Darstellung der retinalen Astrozyten wurden Immunfluoreszenzfärbungen der Präparate mit GFAP angefertigt. Bei der Auswertung dieser Färbungen konnten keine Unterschiede in Bezug auf die Morphologie oder das Verteilungsmuster der Astrozyten zwischen den Wildtyp- und iNOS-KO-Mäusen festgestellt werden.

Die Haltung unter hyperoxischen Bedingungen im BPD-Hyperoxie-Modell zeigte in beiden Mauslinien deutlich sichtbare Effekte im Vergleich zur Normoxie. In den Netzhäuten der Wt- und iNOS-KO-Mäuse wirkten die Astrozyten hier insbesondere zentral isolierter, aufgelockerter und weniger dicht verteilt (siehe auch Abb. 20). Anders als bei den Tieren aus Normoxie bildeten die Astrozyten keine gemeinsamen sich verzweigenden Verbindungen, die als entwickeltes Gefäßtemplate gedeutet werden könnten. In Richtung Peripherie ergab sich dann schnell eine wabenartige Struktur (siehe auch Abb. 21), die bei den Vergleichstieren aus Normoxie nur am äußersten Rand zu finden war (siehe auch Abb. 19).

Über die Relevanz von Astrozyten in pathologischen Angiogeneseprozessen, wie beispielsweise der ROP, wurde aufgrund ihrer relevanten Steuerungsfunktion während der physiologischen retinalen Gefäßentwicklung schon öfters geforscht (Paisley und

Kay, 2021). Es gibt bereits Berichte, die einen Zusammenhang zwischen pathologischen Veränderungen der Astrozyten und einer gestörten nachfolgenden retinalen Gefäßentwicklung beschreiben (Fruttiger *et al.*, 1996).

Im klassischen OIR-Modell zeigten Untersuchungen, dass die Astrozytendichte in der durchgängig vaskularisierten Peripherie der Retina zunimmt, während es in der hyperoxischen Phase des Modells zu einer deutlichen Abnahme der Astrozytendichte in der zentralen Zone der Vaso-Obliteration kommt. Eine Normalisierung trat hier erst nach Revaskularisierung ein (Bucher *et al.*, 2013). Eine verringerte Astrozytendichte, provoziert durch pathologisch hohe Sauerstoffkonzentrationen, zeigt Parallelen zu den in dieser Arbeit beschriebenen zentralen Befunden, in denen die Astrozyten im Vergleich zu den normoxischen Bedingungen weniger dicht beieinanderliegen und gemeinsam keine gefäßähnlichen Strukturen ausbildeten. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Aussagen von Bucher *et al.* primär nach Betrachtung der Astrozytenkerne getroffen wurde und nicht nach Färbung mit GFAP, die ihre gesamte Gestalt aufzeigt.

Die Verringerung der Astrozytendichte wurde im klassischen OIR-Modell auf apoptotische Prozesse zurückgeführt. Dabei wurden vermehrt aktivierte Mikrogliazellen mit apoptotischen Astrozyten assoziiert aufgefunden (Bucher *et al.*, 2013). Im Laufe der hyperoxischen Phase zeigte sich dabei eine stetige Zunahme der Mikroglia-dichte, die damit genau dem Endothelzellsterben und der Abnahme der Astrozytendichte während der Hyperoxie reziprok folgte. Mikrogliazellen scheinen also keine entscheidende Rolle bei der Gefäßregression zu spielen, sondern vielmehr bei der Beseitigung von Zellresten, die durch den Gefäßzerfall entstanden sind (Fischer *et al.*, 2011; Bucher *et al.*, 2013). Im Unterschied zu diesen Befunden konnte in der vorliegenden Arbeit keine spezifische Kolokalisation zwischen Mikrogliazellen und Astrozyten in den hyperoxischen Tieren festgestellt werden. Auch eine Dichtezunahme der Mikrogliazellen unter Hyperoxie konnte nicht beobachtet werden, was auch durch die Stichprobenzählung bestätigt wird, die sogar eine Abnahme der Mikrogliazellzahl unter Hyperoxie im Vergleich zur Normoxie zeigte (siehe auch Abb. 43). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass im BPD-Modell keine Apoptose in der Astrozyten-Region stattfindet und hier keine apoptotischen Zellen von Mikrogliazellen erkannt und abgebaut werden müssen. Eine Färbung mit Apoptose-Markern wäre eine interessante Ergänzung zu den bisherigen Ergebnissen, um diese Hypothese weiter zu prüfen.

Unter physiologischen Bedingungen wird die Struktur der Astrozyten stark durch die Gefäßeinwanderung und die damit einhergehende Sauerstoffversorgung beeinflusst. Sie führt zu einer Zelldifferenzierung, morphologischen Umstrukturierung und Hemmung der Proliferation (Fruttiger, 2007; Paisley und Kay, 2021). Auch die Astrozytenzahl ist vom retinalen Gefäßsystem und seiner Dichte abhängig (Chan-Ling *et al.*, 2009).

Angesichts dieser Zusammenhänge ist es plausibel, dass ein pathologischer Abbau von Gefäßen einen direkten transformativen oder destabilisierenden Einfluss auf die Astrozyten in der Retina haben könnte (Bucher *et al.*, 2013).

Im Gegensatz zum OIR-Modell kann die Abnahme der Astrozytendichte in dem hier beschriebenen BPD-Modell jedoch nicht als Reaktion auf den sekundären Gefäßabbau erklärt werden, da in dieser Arbeit ein Tiermodell untersucht wurde, in dem die Mäuse bereits direkt nach der Geburt einer Hyperoxie ausgesetzt waren. Vermutlich kam es bei den betroffenen Tieren also nie zu einer physiologischen retinalen Gefäßentwicklung und folglich auch zu keinem Gefäßabbau, der Auswirkungen auf die Astrozyten hätte haben können.

Trotzdem ist basierend darauf abzuwägen, inwiefern die initiale gefäßbedingte Reorganisation der Astrozyten ohne Einwirkung der Gefäßentwicklung überhaupt stattfindet, da die Astrozytenmigration bereits pränatal in der Retina beginnt und zum Zeitpunkt der Geburt bereits ein nahezu abgeschlossenes Zellnetzwerk vorliegt (Dorrell *et al.*, 2002). Eine Hypothese für das veränderte Erscheinungsbild des Astrozytennetzwerkes könnte also das vollständige Ausbleiben der physiologischen Zelldifferenzierung und eine Stagnation des pränatalen Entwicklungszustandes der Zellen sein. Ein Vergleich des Astrozytennetzwerkes der publizierten Bilder von Dorell *et al.* von GFAP-gefärbten *flatmounts* von E19, E20 und P0 mit den Befunden der vorliegenden Arbeit im BPD-Modell zeigt jedoch deutliche morphologische Differenzen. Während die Astrozyten an E20 und P0 auch zentral untereinander eindeutige Verbindungen ausbilden und als wabenförmige Gefäßvorläuferstrukturen in die Peripherie ziehen (Dorrell *et al.*, 2002), sind die Astrozyten der hier beschriebenen P14-Tiere aus Hyperoxie nahe der Papille deutlich sternförmiger, größer, separierter und ohne eindeutige gemeinsame Strukturen (siehe auch Abb. 20). Dies weist auf einen transformativen Einfluss der erhöhten Sauerstoffexposition, unabhängig von der Gefäßausbildung hin.

Auswirkungen des Sauerstoffgehaltes im Gewebe auf den Phänotyp von Astrozyten konnten bereits nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 1999). Zur Untersuchung solcher Effekte erhöhter Sauerstoffkonzentrationen auf die Entwicklung der Astrozyten und potenziell damit verbundenen Folgen auf die Vaskularisierung hat das in dieser Arbeit vorgestellte BPD-Modell deutliche Vorteile im Vergleich zum klassischen OIR-Modell. Dies liegt daran, dass die Entwicklung der Astrozyten an P7 bereits weitgehend abgeschlossen ist und die Veränderungen der Sauerstoffkonzentrationen im OIR-Modell daher zeitlich zu spät stattfinden, um Einfluss auf die Zellreifung zu nehmen (Paisley und Kay, 2021). Das BPD-Modell könnte daher von Nutzen sein, um zusätzliche Erkenntnisse über die Auswirkungen von direkt postnatal stark erhöhten

Sauerstoffbedingungen auf retinale Astrozyten während ihrer Entwicklung zu gewinnen. In einem ähnlichen Mausmodell, in dem die Tiere zwischen P0 und P4 bei 75 % O<sub>2</sub> gehalten und anschließend in Raumluft (21 % O<sub>2</sub>) umgesetzt wurden, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Hauptrisikofaktor der ROP, also die neonatale Sauerstoffüberexposition, auch die Bildung des angiogenen Astrozytenmusters stört. Während die Migration der Astrozyten bis in die Peripherie nicht durch die hohe Sauerstoffkonzentration beeinflusst wurde, konnte eine relative Hemmung der Astrozytenproliferation beobachtet werden. Die deutlichsten Effekte zeigten sich aber sekundär, ausgelöst durch die Regeneration in Normoxie. Hierbei kam es zu einer Aktivierung der Zellproliferation, die zu einem extremen Anstieg der Astrozytenzahl führte und so die Struktur der Gefäßvorlage und sekundär auch der Gefäße stark beeinflusste. Im Verlauf der weiteren Entwicklung konnten ROP-assoziierte Defekte festgestellt werden (Perelli *et al.*, 2021). Einige dieser Ergebnisse passen mit den Befunden aus dem in dieser Arbeit untersuchten BPD-Modell deutlich überein. Auch hier schien die Migration nicht durch die Hyperoxie gestoppt worden zu sein, denn trotz der zweiwöchigen stark erhöhten Sauerstoffbedingungen wurden Astrozyten über die gesamte Retina verteilt bis in die Peripherie nachgewiesen.

Auch West *et al.* untersuchten die direkt postnatalen Auswirkungen (P0-P7) erhöhter Sauerstoffkonzentrationen (80 % O<sub>2</sub>) in der Mäuseretina. Sie stellten im Rahmen dieser Arbeit, wie bereits erwähnt, fest, dass die fehlende Gefäßbesiedlung der Netzhaut aufgrund der fehlenden Blutversorgung zu hypoxischen Verhältnissen führt und nur zentral das durch die A. hyaloidea strömende hyperoxische Blut Auswirkungen zeigt. In der peripheren hypoxischen Zone war die VEGF-Expression in den Astrozyten stark hochreguliert und eine verstärkte Proliferation wurde detektiert. In der Umgebung des Sehnervs bzw. der HA verhielten sich die Astrozyten wie unter normoxischen Bedingungen, vermutlich aufgrund der Nähe zum stark sauerstoffangereicherten Blut im embryonalen Gefäßsystem. VEGF war herunterreguliert und Proliferation konnte nicht mehr nachgewiesen werden (West *et al.*, 2005). Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit wären zusätzliche Nachforschungen zur VEGF-Expression und Proliferation spannend, um zu wissen, welche Effekte die vergleichsweise lange postnatale sehr hohe Sauerstoffexposition des BPD-Modells exakt auf die Astrozyten der Retina hat und welche Veränderungen durch die Regeneration in Normoxie entstehen. Möglicherweise lassen sich die in diesem untersuchten BPD-Modell beobachteten strukturellen Unterschiede des Astrozytennetzwerkes zwischen zentraler und peripherer Netzhaut aber bereits mit den Ergebnissen von West *et al.* zu unterschiedlich sauerstoffversorgten Arealen innerhalb der Netzhaut erklären. Das periphere Wabennetzwerk, das teilweise bereits an das physiologische äußerste

Astrozytenmuster der normoxischen Tiere erinnert, könnte die klassische ring- bzw. wabenförmige Anordnung von Fortsätzen und Somata darstellen, in der die Astrozyten unter physiologischen Bedingungen auf die Einwanderung der Gefäße „warten“ (Paisley und Kay, 2021). Im Vergleich dazu könnte die zentral stark veränderte Form der Astrozyten auf die möglicherweise nur hier vorherrschende Hyperoxie zurückgeführt werden. Das so gestörte Gefäßtemplate aus Astrozyten nahe der Papille spielt daher wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung der normalerweise hier beginnenden, von Astrozyten gesteuerten sprießenden Angiogenese der Netzhaut.

Im Rahmen des weiteren Forschungsvorhabens wäre es zusätzlich wichtig, Immunfluoreszenzfärbungen der Netzhaut auch mit anderen Astrozytenmarkern wie PAX2 oder PDGFRa durchzuführen, da GFAP primär als Marker für reife Astrozyten gilt und die GFAP-Expression erst mit der Einwanderung von Gefäßen stark hochreguliert wird (Paisley und Kay, 2021).

### **4.3 Persistenz der hyaloidalen Gefäßstruktur bei Tieren aus hyperoxischen Haltungsbedingungen**

In allen untersuchten Versuchsgruppen konnten Anteile embryonaler Gefäßstrukturen auf der Glaskörper-Seite der Netzhäute aufgefunden werden. Während keine Unterschiede zwischen den Wildtypmäusen und den iNOS-KO-Mäusen in Bezug auf die hyaloidalen Gefäße innerhalb einer Sauerstoffkonzentration ausgemacht werden konnten, zeigten sich deutliche Differenzen zwischen den zwei unterschiedlichen angewendeten Sauerstoffbedingungen nach der zweiwöchigen Haltung.

Bei den Tieren, welche unter Raumluft gehalten wurden, traf man weniger häufig und wenn, dann primär zentral, also im Bereich der Papille, auf Überreste dieser Gefäße (siehe auch Abb. 37A, B). Aufgrund dieser Lage und weil die Gefäße oft einzeln vorlagen und weniger gewunden waren, handelt es sich hier vermutlich um Überreste der A. hyaloidea (*hyaloid artery*, HA). Zeitlich gesehen würde dies auch dem Kenntnisstand der Embryologie entsprechen, da man weiß, dass Anteile der HA auch nach P16 noch aufzufinden sind und generell als letzte Struktur abgebaut werden. Auch eine geringe Anzahl von TVL-Zellen bleibt unter physiologischen Bedingungen über die ersten zwei postnatalen Wochen hinaus im Glaskörper nachweisbar (Wang *et al.*, 2019) und könnte daher auch in den Mäusen unter Normoxie beobachtet worden sein. Dies würde insbesondere die teilweise leicht gewundenen Gefäßstrukturen erklären.

In allen untersuchten Augen, die von Tieren aus hyperoxischer Haltung stammten, wurden Reste hyaloidaler Gefäße festgestellt. Bereits während der Präparation fiel hier eine Häufung raumeinnehmender, büscheliger, intravitrealer Strukturen auf (siehe auch

Abb. 35B). Auch nach der Immunfluoreszenzfärbung waren die Befunde hier grundsätzlich zahlreicher und deutlich großflächiger über die Präparate verteilt. Außerdem waren die Gefäßüberreste oft auch deutlich weiter peripher lokalisiert als bei den Tieren aus normoxischen Bedingungen und erschienen viel stärker verzweigt und verwunden (siehe auch Abb. 36C, D und 38). Lokalisation und Morphologie dieser Gefäßstrukturen sprechen dafür, dass es sich hier zusätzlich zu Anteilen der HA und TVL, die auch unter Normalbedingungen noch aufzufinden wären, voraussichtlich noch um andere Anteile des hyaloidalen Gefäßbaums handelt. Vermutlich sind die beobachteten Strukturen Überreste der VHP, welche im Glaskörper weiter in Richtung Linse liegen, deutlich verwunden sind und deren Regression normalerweise bis P16 vollständig abgeschlossen wäre (Wang *et al.*, 2019).

Bei Deutung dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass zur Herstellung der *flatmounts* und auch der Gefrierschnitte jeweils im Bereich des Glaskörpers, also dem Lageort des embryonalen Gefäßbaums, präpariert wurde. Dies kann zu unabsichtlichen Ablösungen und Bewegungen der hyaloidalen Gefäßreste geführt haben. Da alle Netzhäute mit der gleichen Technik von den gleichen Präparatorinnen präpariert wurden und die Augen der verschiedenen Gruppen immer abwechselnd bearbeitet wurden, ist davon auszugehen, dass ein möglicher invasiver Effekt auf die Gefäßstrukturen der verschiedenen Gruppen konstant war.

Prinzipiell kann die Häufung von hyaloidalen Gefäßresten in beiden Mauslinien aus Hyperoxie so interpretiert werden, dass die fehlende retinale Angiogenese, ausgelöst durch die Sauerstoffübersversorgung, zu einer Persistenz des embryonalen Gefäßsystems geführt hat, um dieses Versorgungsdefizit zu kompensieren. Auch ein generell gestörter Abbau auf Grund der hyperoxischen Bedingungen ist möglich.

Die Beobachtung einer verminderten Regression des embryonalen Gefäßbaums nach erhöhter postnataler Sauerstoffexposition, stimmt auch mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen überein. Auch nach einer viertägigen postnatalen Exposition mit 75 % O<sub>2</sub> zeigte sich im Glaskörper von Mäusewelpen ein dichtes Netz persistierender hyaloidaler Gefäße. Teilweise wurde sogar eine Besiedlung der Netzhäute durch diese Gefäße beobachtet (Perelli *et al.*, 2021). Auch in einem weiteren Maus-Modell von Lajko *et al.*, wo neonatale Mäuse für zwei Wochen bei 75 % O<sub>2</sub> gehalten wurden, und anschließend bis P28 ihre Regeneration in Normoxie studiert wurde, konnten zu jedem Untersuchungszeitpunkt beständige hyaloidale Gefäße gezeigt werden. Interessanterweise konnten durch Immunfluoreszenzfärbungen für VEGF und VEGFR-2 jeweils Expressionen im Bereich dieser Gefäße nachgewiesen werden, die während der Regeneration in Normoxie noch intensiver wurden. Dies wurde so interpretiert, dass die Endothelzellen hier aktiv proliferieren und die gemeinsame Expression von VEGFR-

2 mit den Müller-Zellen möglicherweise eine Reaktion auf den generell verzeichneten Anstieg von VEGF in der Retina ab P15 ist, um eine physiologische Plexusentwicklung in der Retina zu initiieren (Lajko *et al.*, 2016). Anders als im klassischen OIR-Modell, wo die Neovaskularisation am Übergang zwischen vaskulärer und avaskulärer Netzhaut intravitreal in den Glaskörper hineinragt (Stahl *et al.*, 2010), wurden in dem von Lajko *et al.* beschriebenen Modell nach Beendigung der Sauerstoffübersorgung neue Blutgefäße zentral der Retina in der IPL, aber eben auch peripher an den Berührungspunkten zwischen Netzhaut und hyaloidalen Gefäßen aufgefunden (Lajko *et al.*, 2016).

Diese Beschreibungen bei Perelli *et al.* und Lajko *et al.* über Verbindungen der hyaloidalen Gefäße mit der Netzhaut, aus der teilweise sogar neue retinale Gefäße entsprangen, erinnern an die in dieser Arbeit als Ausnahmefälle beschriebenen Gefäßgitter oder Gefäßknäuel (siehe auch Abb. 30), die in zwei von den drei Fällen kolokalisiert mit hyaloidalen Gefäßen in der ansonsten avaskulären Netzhaut von Tieren aus Hyperoxie entdeckt wurden. Das könnte bedeuten, dass es auch in diesem BPD-Modell zu einer Anlagerung persistierender embryonaler Gefäße, an die ansonsten avaskuläre Netzhaut kam und so zu vereinzeltten Bereichen der Vaskularisation in der Retina führte. Ein möglicher Erklärungsansatz dieser Befunde könnte im Zusammenhang mit den Astrozyten stehen, die bei Betrachtung der Immunfluoreszenzbilder eindeutig mit den neuartigen Gefäßstrukturen kolokalisiert sind und offensichtlich sogar als Vorlage dienen (Abb. 30C, c). Auf Grundlage der wissenschaftlichen Arbeit von West *et al.* ist zu vermuten, dass die Netzhäute der Mäuse aus dem hyperoxischen BPD-Modell, aufgrund fehlender Versorgung mit sauerstoffreichem Blut womöglich großteilig hypoxisch sind und dadurch in den Astrozyten eine verstärkte VEGF-Ausschüttung stattfindet (West *et al.*, 2005). Sollte in den bestehenden hyaloidalen Gefäßen, wie in dem Modell von Lajko *et al.* beschrieben, auch eine Expression von VEGFR-2 vorliegen (Lajko *et al.*, 2016), könnte dies die Anlagerung dieser Gefäße an die Astrozyten in der innersten Schicht der avaskulären Retina und die dadurch initiierte Neovaskularisation erklären.

Um diese Vermutung in diesem Tiermodell weiter zu sichern, wäre es sinnvoll, im weiteren Verlauf des Forschungsprojektes zu versuchen VEGF und VEGFR-2 in den Netzhäuten der Tiere nachzuweisen. Zusätzlich sollten weitere biologische Replikate untersucht werden, um zu sehen, ob diese Anlagerung von embryonalen Gefäßen tatsächlich nur eine Ausnahmeerscheinung ist, und wenn ja, warum. Des Weiteren wird es interessant sein, zu sehen, wie Tiere aus dem beschriebenen BPD-Modell ab P15 auf Raumluft reagieren werden. Vermutlich würde auch hier eine Neovaskularisation der Retina durch die Kontaktpunkte mit hyaloidalen Gefäßen gesteuert werden, wie es

bereits in anderen ähnlichen Forschungsprojekten gezeigt wurde (Lajko *et al.*, 2016; Tedeschi *et al.*, 2022). Ob die Gefäßneubildungen intraretinal oder wie im klassischen OIR-Modell primär intravitreal entsteht, könnte so ebenfalls gezeigt werden.

Eine Persistenz des embryonalen Gefäßbaumes im Glaskörper konnte bereits festgestellt werden, nachdem Mäuse nur eine Woche bei 65 % Sauerstoff gehalten wurden. Dabei wurden die Gefäße als stark gewunden und erweitert beschrieben und konnten auch noch im Alter von 40 Wochen aufgefunden werden (McMenamin *et al.*, 2016). Basierend auf solchen Resultaten ist damit zu rechnen, dass auch bei den Tieren des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen BPD-Hyperoxie-Modells bis ins ausgewachsene Alter Anteile der hyaloidalen Gefäßstrukturen fortbestehen könnten. Beim Menschen wurde in wenigen, aber dafür schweren Fällen der ROP, ein solches Fortbestehen von hyaloidalen Gefäßen im Auge bereits beobachtet (Eller *et al.*, 1987). Die in dieser Arbeit beschriebenen Befunde bei den untersuchten Mäusen an P14 vor einer sekundären Exposition mit Raumluft, könnten also ein Indiz für eine schwere ROP-analoge Erkrankung sein. Bei einem Patienten dieser von Eller *et al.* beschriebenen ROP-Fälle beim Menschen, die assoziiert mit hyaloidalen Gefäßen waren, wurde sogar eine Anastomose der persistierenden A. hyaloidea mit peripheren neovaskulären Gefäßen in der Retina beschrieben (Eller *et al.*, 1987). Diese Gefäßverbindung erinnert wieder an die bereits zuvor beschriebenen Gefäßknäuel, die hier vereinzelt nach Hyperoxie aufgefunden wurden. Sie könnten also vielleicht auch als Indiz für eine sich entwickelnde ROP gedeutet werden.

Im Vergleich zur ROP sind andere Erkrankungen im Auge deutlich eher mit einer gestörten Regression des embryonalen Gefäßsystems assoziiert. Das Krankheitsbild des persistierenden hyperplastischen primären Vitreous (PHPV) oder auch PFV (*persistent fetal vasculature*) genannt, ist hier als wichtiges Beispiel zu nennen (Chen *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). Durch eine fehlerhafte Regression des primären Glaskörpers, inklusive des hyaloidalen Gefäßsystems, kommt es zu dieser seltenen angeborenen Entwicklungsstörung des Auges, die primär unilateral auftritt. Es kann Beeinträchtigungen der Sehfunktion und auch eine Leukokorie zur Folge haben, die durch eine weißliche, bindegewebige Masse hinter der Linse ausgelöst wird (Shastry, 2009; Anand-Apte und Hollyfield, 2010). Die genaue Ursache für das Fortbestehen der embryonalen Gefäße ist hierbei aber weiterhin ungeklärt (Chen *et al.*, 2019). Bei ersten stichprobenartigen Augenpräparationen von P90-Versuchstieren, die nach den zwei postnatalen Wochen bei 85 % O<sub>2</sub> zur Regeneration in Normoxie gehalten wurden, konnten solche weißlichen, dichten Ansammlungen nach Linsenentnahme bereits festgestellt werden (unpublizierte Daten unserer Arbeitsgruppe). Dies verstärkt den Verdacht, dass die Persistenz der hyaloidalen Gefäße bis ins Erwachsenenalter der

Tiere bestehen bleibt. Außerdem könnte es tatsächlich ein diagnostischer Hinweis für das Krankheitsbild der PHPV sein, das vielleicht nach Haltung im BPD-Modell auftritt. PHPV kann auch assoziiert mit anderen Erkrankungen im Auge auftreten, wie zum Beispiel der ROP (Chen *et al.*, 2019). Um PHPV hier als die primäre Störung auszuschließen, wäre auf ein bilaterales Auftreten zu achten. Symptome der PHPV würden also auch in unserem BPD-Modell eine Frühgeborenen-Retinopathie nicht direkt ausschließen.

#### 4.4 Dickenunterschiede der Netzhautschichten

Bei der Vermessung der Retina konnten signifikante Unterschiede in Bezug auf die unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen aber auch zwischen den Mauslinien festgestellt werden. Die erhöhten Sauerstoffkonzentrationen sorgten in beiden Mauslinien für eine signifikante Abnahme der Gesamtdicke der Retina. Die ONL und INL zeigten hier keine prägnanten Veränderungen auf. Des Weiteren konnten unabhängig von Normoxie und Hyperoxie signifikante Unterschiede zwischen den gemessenen Werten der gesamten Retina, der ONL und teils auch der INL von Wt-Mäusen und iNOS-KO-Mäusen festgestellt werden. Die gemessenen Strukturen waren bei Tieren mit einer Defizienz von iNOS immer dünner als bei den Wildtyptieren.

Die Messungen wurden randomisiert und an neun verschiedenen Stellen pro Retina eines Tieres durchgeführt, um möglichst aussagekräftige und unvoreingenommene Messwerte zu generieren. Trotzdem muss bei der Interpretation beachtet werden, dass es sich ausschließlich um zentrale Messungen handelt, die von nur einer Person durchgeführt wurden. Außerdem lagen pro Versuchsgruppe lediglich drei biologische Replikate vor. Im Rahmen weiterführender Untersuchungen zu den vorliegenden Forschungsergebnissen wären mehr biologische Replikate sowie zusätzliche, unabhängige Probanden zur Durchführung der Messungen wünschenswert, um noch aussagekräftigere Resultate zu erhalten.

Eine Reduktion der Retinadicke in den Tieren, die in 85 % O<sub>2</sub> gehalten wurden, könnte durch das Fehlen der retinalen Gefäße in den Netzhäuten dieser Tiere erklärt werden. Wie bereits beschrieben, hat bei diesen Tieren, mutmaßlich aufgrund der Sauerstoffübersorgung, keine physiologische Angiogenese in der Retina stattgefunden. Die ausbleibende Entwicklung raumeinnehmender Gefäßnetzwerke in den verschiedenen retinalen Schichten könnte die verminderte Gesamtdicke begründen. Zusätzlich könnte basierend auf dieser Theorie erklärt werden, warum die 85 % O<sub>2</sub> keine signifikanten Unterschiede in der ONL und INL provozierte, obwohl es zu einer starken Gesamtreduktion der Netzhaut kam. Womöglich sind gerade nicht die Kernschichten betroffen, sondern jene Schichten, in denen sich normalerweise die Gefäße entwickelt

hätten. Separate Messungen der NFL, IPL und OPL wären eine spannende Ergänzung, um diese Hypothese zu bestätigen.

Die hier vorgestellten Untersuchungsergebnisse werden durch Erkenntnisse anderer Forschungsgruppen bekräftigt, die mit ähnlichen Tiermodellen gearbeitet haben und sehr ähnliche Befunde zeigten. In einem vergleichbaren BPD-Modell wurden neben der Lunge auch mögliche Effekte auf das Gehirn und die Netzhaut von Ratten untersucht. Die Nagetiere wurden zwischen P4 und P14 bei 95 % O<sub>2</sub> und anschließend bis P28 in Raumluft gehalten. In den folgenden Untersuchungen konnte eine signifikante Abnahme der retinalen Gesamtdicke im Vergleich zu den Kontrolltieren verzeichnet werden. Interessanterweise zeigten Messungen der ONL hier ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Dafür konnten im Gegensatz zu unseren Ergebnissen deutlich verminderte Messwerte in der INL ausgemacht werden. Auch die OPL und IPL zeigten signifikant reduzierte Messwerte gegenüber der Kontrollgruppe (Poon *et al.*, 2016). Es ist interessant zu sehen, dass auch in jener Studie allein die kontinuierliche Haltung in Hyperoxie zu erheblichen zytostrukturellen Schäden in der Retina führte. Auch wenn im Unterschied zur vorliegenden Arbeit keine Mäuse, sondern Ratten untersucht wurden, die keinen intermediären Plexus in der IPL ausbilden (Henking und De Oliveira, 1967). Auch Dembinska *et al.* konnten den deutlichen Verlust der OPL und der Horizontalzellen nach Exposition gegenüber erhöhten Sauerstoffbedingungen feststellen. Des Weiteren zeigten sie, dass es deutliche Abweichungen der retinalen Sauerstoffanfälligkeit, abhängig von den gewählten Zeitfenstern, für die Sauerstoffübersversorgung gibt. Die Rattennetzhaut reagierte in der zweiten postnatalen Lebenswoche am sensibelsten auf erhöhte Sauerstoffkonzentrationen von 80 % im Vergleich zur ersten und dritten Lebenswoche (Dembinska *et al.*, 2001). Dieses identifizierte Zeitfenster der höchsten Sauerstoffempfindlichkeit passt dabei zu früheren Studien, die zeigten, dass die Rattennetzhaut in der zweiten Lebenswoche signifikante Reifungsprozesse durchläuft und ihren Sauerstoffbedarf verdoppelt (Graymore, 1959, 1960). Da die retinale Entwicklung beider Nagetiere sehr ähnlich verläuft, kann davon ausgegangen werden, dass auch in diesem BPD-Modell das postnatale Zeitfenster der Sauerstoffübersversorgung mit dem der höchsten retinalen Sauerstoffsensitivität übereinstimmt und dementsprechend negative Auswirkungen hat, wie sie neben dem Wegbleiben retinaler Gefäße auch durch die signifikante Reduzierung der Gesamtdicke deutlich werden. Eine zusätzliche Messung der OPL würde die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der anderen Arbeitsgruppen noch verbessern.

In dem Mäusemodell von Lajko *et al.*, wo die Tiere von P0-P14 75 % Sauerstoff ausgesetzt waren, wurden zentral und peripher Vermessungen der Netzhäute in ihrer Gesamtheit an P14, P15, P21 und P28 durchgeführt. Parallel zu den in dieser Arbeit

beschriebenen Ergebnissen konnten an P14, aber auch zu allen späteren Untersuchungszeitpunkten nahe dem optischen Nerv (zentral) signifikante Unterschiede der Retinadicke festgestellt werden. Peripher konnten hier nur zu späteren Zeitpunkten während der Regeneration in Raumlufte signifikante Reduktionen der Retinadicke im Vergleich zu den Kontrolltieren ausgemacht werden. Zwischen P21 und P28 kam es in den Präparaten aus Hyperoxie zu Netzhautablösungen, die mit einer starken Ausdünnung der OPL und Verschmelzung der Körnerschichten einherging, wohl ausgelöst durch die Trennung von der versorgenden Choroidea (Lajko *et al.*, 2016). Basierend auf diesen Befunden sollte bei der Untersuchung von Tieren aus diesem BPD-Modell nach der Regeneration in Raumlufte explizit auf die OPL und mögliche Ablösungsprozesse geachtet werden, insbesondere, da die Netzhautablösung auch ein Symptom für schwere Fälle der ROP ist (Chiang *et al.*, 2021).

Neben den Differenzen der retinalen Gesamtdicke, die im Zusammenhang mit den erhöhten Sauerstoffkonzentrationen stehen, konnten im Rahmen der statistischen Auswertung der Messergebnisse noch weitere relevante Differenzen ermittelt werden. Es wurde eine signifikante Abnahme der Gesamtretinadicke, der ONL-Dicke und INL-Dicke in Normoxie bei den iNOS-KO-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen detektiert. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Mauslinien konnte zusätzlich in Hyperoxie ermittelt werden, jedoch nur bei der Gesamtretinadicke und der ONL. Diese Ergebnisse wirken auf den ersten Blick konträr dazu, dass NO-Überexpressionen durch iNOS bereits mit unterschiedlichen Pathologien, wie Gewebeschädigungen und Zellapoptose, infolge von Ischämie und Entzündung in Verbindung gebracht wurden (Toda und Nakanishi-Toda, 2007). Eine Defizienz von iNOS würde nach Kenntnis solcher Ergebnisse eher eine Schutzwirkung für das retinale Gewebe vermuten lassen. Im Rahmen einer Hypoxie-Studie an porcinen Netzhautexplantaten konnte so ein protektiver Effekt durch den Einsatz eines iNOS-Inhibitors bereits beschrieben werden. Es zeigte sich eine schützende Wirkung gegenüber dem Abbau von retinalen Ganglienzellen und Bipolarzellen (Hurst *et al.*, 2020). Auch in dem klassischen OIR-Modell, welches teilweise Parallelen zu unserem hier betrachteten BPD-Modell hat, wurden bereits protektive Effekte durch die Defizienz von iNOS in Mäusen bezüglich einer INL-Ausdünnung festgestellt. Fünf Tage nach Regeneration in Normoxie wurden die iNOS-KO- und Wt-Mäuse aus dem OIR-Modell untersucht. Es konnte zwar in der gesamten Retina beider Mauslinien eine generelle Reduktion der INL und IPL detektiert werden, aber insbesondere zentral, wo im OIR-Modell die Vaso-Obliteration stattfindet, war diese Reduktion in den Wildtypmäusen deutlich verstärkt. Dieser schützende Effekt auf die INL konnte im OIR-Modell auch durch die Gabe eines iNOS-Inhibitors direkt nach Hyperoxie-Exposition in Wildtypmäusen reproduziert werden (Sennlaub *et al.*, 2002).

Durch den Zeitpunkt der Inhibitorgabe direkt im Anschluss an die erhöhte Sauerstoffexposition scheint es, als würde primär die Reduktion der Sauerstoffkonzentration Auslöser für die iNOS-abhängigen, destruktiven Prozesse in der INL sein. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist nur bedingt möglich, da die Versuchstiere im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit keinen Sauerstoffschwankungen ausgesetzt waren. Sennlaub *et al.* haben jedoch zusätzlich auch die Dicke der Netzhautschichten der Wt- und iNOS-KO-Mäuse nach Haltung in Raumluft an P17 untersucht. Gegensätzlich zu den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen, konnten dabei keine Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien aufgezeigt werden (Sennlaub *et al.*, 2002).

Bei der Betrachtung von iNOS-vermitteltem NO ist es wichtig, seine konzentrationsabhängige duale Wirkung zu berücksichtigen. Neben schädigenden sind auch schützende Effekte nachgewiesen (Cinelli *et al.*, 2020). Hinsichtlich pathologischer Gewebsveränderungen der Netzhaut, die mit iNOS in Verbindung gebracht werden, gibt es auch Berichte über protektive Effekte des Enzyms. Diese könnten eine Grundlage zur Erklärung der in dieser Arbeit beobachteten reduzierten Messwerte der Retina von iNOS-KO-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren darstellen.

Eine Beteiligung von NO wurde beispielsweise bei dem Phänomen der späten ischämischen Prækonditionierung vermutet, die einen protektiven Effekt auf retinale Zellen gegenüber nachfolgender Ischämie zeigt, was sich durch eine verhinderte Abnahme der GCL-Zelldichte und einen Schutz vor IPL- und INL-Reduktion zeigt. An Ratten wurden unterschiedliche NOS-Inhibitoren getestet, um die Beteiligung von NO in diesem Prozess zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass nur der iNOS-spezifische Inhibitor L-NIL die schützende Wirkung der Prækonditionierung auf die retinalen Schichten beinahe vollständig verhindern konnte. Durch das Fehlen von iNOS kam es in der Netzhaut zu einem extremen Abfall der GCL-, IPL- und INL- Dicke. Die Studie lieferte damit einen wichtigen Hinweis auf die Möglichkeit einer protektiven Wirkung von iNOS-induziertem NO in der ischämischen Netzhaut (Sakamoto *et al.*, 2006).

Auch Hangai *et al.* konnten 1999 bereits solche schützenden Auswirkungen von NO auf die postischämische Retina ausmachen. Nach 60-minütiger Ischämie wurde Ratten der NOS-Inhibitor L-NNA verabreicht. In der Studie wird davon ausgegangen, dass L-NNA eine deutliche Präferenz zur Hemmung von nNOS und eNOS hat, sodass die Ergebnisse primär als Effekt einer Hemmung dieser beiden NO-Synthasen gedeutet werden (Hangai *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass L-NNA keine signifikante Selektivität zwischen den verschiedenen NO-Synthasen zeigt und eine vergleichbare Hemmung von eNOS, nNOS und auch iNOS bewirkt (Alderton *et al.*, 2001). Auf Grundlage dessen, kann davon ausgegangen werden, dass die

beschriebenen Ergebnisse von Hangai *et al.* auch im Zusammenhang mit einer Hemmung von iNOS stehen. Bei Ischämie führte L-NNA zu einer signifikanten Abnahme der gemessenen Netzhautabschnitte zwischen OLM und ILM sowie ILM und OPL. Die Vergleichsgruppe, der die Kontrollsubstanz D-NNA verabreicht wurde, zeigte ebenfalls eine Abnahme, jedoch nicht in dem gleichen Ausmaß. Die NOS-Hemmung führte also zu einer Verschlimmerung der Ischämie-Reperfusionsschäden, was auf eine protektive Wirkung von NO bei retinaler Ischämie hindeutet. Auf die unbehandelte Retina zeigte das Medikament jedoch keinen Effekt (Hangai *et al.*, 1999).

In Bezug auf strukturverändernde Prozesse innerhalb der retinalen Schichten hat iNOS also auch eine uneindeutige Rolle. Obwohl die 85 % O<sub>2</sub>-Tiere in der vorliegenden Arbeit eine avaskuläre und keine ischämische Retina aufwiesen, führte die Defizienz von iNOS auch hier zu einer Abnahme der Retinadicke, was eine Parallele zu den zuvor genannten Studienergebnissen darstellt. Anstatt der dort beschriebenen starken Reduktion im Bereich der INL, fiel jedoch neben der reduzierten Gesamtdicke primär die signifikante Abnahme der ONL im Vergleich zu den Wt-Mäusen auf.

Sennlaub *et al.* und Hangai *et al.* konnten bei den Versuchstieren durch eine iNOS-Inhibition unter physiologischen Bedingungen keine Effekte auf die unterschiedlichen Schichten der Retina feststellen. Die in dieser Arbeit festgestellte Dickenabnahme der Netzhaut bei iNOS-KO-Tieren im Vergleich zu Wildtypieren unter normoxischen Bedingungen ist aber weiterhin relevant, da in der Netzhaut von normoxischen Wt-Mäusen iNOS auf Transkriptionsniveau mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte. Eine Erhöhung der biologischen Replikate wird notwendig sein, um diesen ersten Hinweis auf eine postnatale NO-abhängige Veränderung der Retina unter physiologischen Bedingungen weiter zu untersuchen und zu interpretieren.

#### **4.5 Ausblick auf die Regenerationsphase der Versuchstiere nach Haltung im BPD-Hyperoxie-Modell**

In der vorliegenden Forschungsarbeit wurden die Netzhäute von Wt- und iNOS-KO-Mäusen unmittelbar nach einer zweiwöchigen postnatalen Haltung bei 85 % O<sub>2</sub> gemäß dem vorgestellten BPD-Modell im Vergleich zu Kontrolltieren unter normoxischen Haltungsbedingungen studiert. Im Verlauf des aktuellen wissenschaftlichen Projekts ist zusätzlich eine weitere Untersuchung der Tiere nach einer Regenerationsphase im Anschluss an die hyperoxische Haltung geplant. Dazu werden weitere Versuchstiere beider Mauslinien nach der 14-tägigen Hyperoxieexposition bis P90 in Raumluft gehalten. Mögliche Auswirkungen auf die Lunge und das Auge werden dann vom CPI und der Arbeitsgruppe für experimentelle Ophthalmologie geprüft.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse über Effekte einer zweiwöchigen Haltung im BPD-Modell auf die Netzhaut der Mäuse geben bereits Hinweise, die einige Hypothesen über die Entwicklung der Retina während der Regenerationsphase in Normoxie zulassen.

Die erhöhte Sauerstoffkonzentration führte bereits zu signifikanten Abnahmen der retinalen Gesamtdicke. Die Regeneration bei Raumluft könnte diese Effekte verstärken und sogar zu einer Ablösung der Netzhaut führen, wie sie bereits in ähnlichen Modellen beobachtet wurde (Lajko *et al.*, 2016). Dies könnte Symptom einer schweren ROP sein (Chiang *et al.*, 2021).

Auch die Persistenz der hyaloidalen Gefäße scheint über die Regenerationsphase bis P90 anzuhalten, hier sind die erwähnten Krankheitsbilder der ROP und PHPV dann differentialdiagnostisch gegeneinander abzuwägen.

Dadurch, dass in dem verwendeten Tiermodell wie in dem klassischen OIR-Modell auf eine Phase der erhöhten Sauerstoffexposition eine Regeneration in Normoxie folgt, sind generell Parallelen zum Krankheitsverlauf der ROP zu erwarten. Zum OIR-Modell unterscheidet sich das BPD-Modell lediglich durch höhere Sauerstoffkonzentrationen, längere Intervalle und das Fehlen der postnatalen Zeit bei Raumluft. Es ist auch hier zu erwarten, dass der plötzliche Wechsel zu normoxischen Bedingungen wie eine relative Hypoxie auf die Retina wirken wird. Dadurch ausgelöst wird es vermutlich wie im OIR-Modell (Stahl *et al.*, 2010) zu einer Neovaskularisation kommen. Interessant wird es sein, die Lokalisation dieser Gefäßentwicklung zu beobachten, und zu sehen, ob, wie bereits vermutet, die Anlagerung hyaloidaler Gefäße an die Retina hier einen steuernden Effekt haben könnte. Es muss im Hinterkopf behalten werden, dass im klassischen OIR-Modell der Maus in der dritten Woche eine vollständige Regression der neovaskulären Pathologien und eine Revaskularisation beobachtet wird (Stahl *et al.*, 2010). Darauf basierend wird es interessant sein zu sehen, ob an P90 überhaupt noch zu differenzieren sein wird, wo erste Vaskularisierungsprozesse stattgefunden haben, und wie sie sich weiter im Bereich der Netzhaut und des Glaskörpers entwickelten.

Möglicherweise kommt es im untersuchten Modell auch selbst nach der langen Regenerationsphase in Normoxie zu keiner Rückbildung der vermuteten schweren Pathologien. Dafür sprechen Befunde eines vergleichbaren BPD-Modells, wo nach zwar nur zweiwöchiger Regeneration in Raumluft keine Anzeichen für umkehrende oder sogar revaskularisierende Vorgänge in den Netzhäuten festgestellt werden konnten. Stattdessen zeigte sich in der Netzhaut eine auffällig desorganisierte Angiogenese mit Flächen aus verworrenen Endothelzellen, ohne Hinweise für eine Netzwerkausbildung (Lajko *et al.*, 2016).

Falls die frühe postnatale Sauerstoffübersversorgung der Tiere tatsächlich zur Provokation bestimmter Merkmale, wie beispielsweise einer Netzhautablösung oder der Persistenz hyaloidaler Gefäße führt, die teilweise auch bei schweren Verläufen der ROP auftreten, könnte das beschriebene Modell vielleicht zur Darstellung und Untersuchung dieser ROP-Symptome genutzt werden. Unabhängig davon, ist davon auszugehen, dass die differenzierten Effekte des Modells auf die Retina der Maus beim Menschen klinisch so bisher nicht auszumachen waren und sein werden. Das liegt daran, dass die retinale Angiogenese im Menschen bereits ab der 15. Schwangerschaftswoche beginnt (Selvam *et al.*, 2018). Bisher gibt es noch kein dokumentiertes Überleben von Frühchen, die vor der 21. Schwangerschaftswoche zur Welt kamen (Ahmad *et al.*, 2017). So hat sogar bei den jüngsten Frühgeborenen die retinale Angiogenese bereits begonnen, bevor sie mit der Geburt erhöhten Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt werden. Dies unterscheidet die Situation entsprechend von den Mäusewelpen in dieser Versuchsreihe, die ab P0 mit einer noch vollständig avaskulären Retina in Hyperoxie gehalten werden. In Anbetracht des sich stetig weiterentwickelnden medizinischen Fortschritts könnte das in dieser Arbeit beschriebene Tiermodell jedoch in Zukunft von großer Relevanz sein, um die Medizin auf erwartbare pathologische Auswirkungen einer extremen Frühgeburt auf die Retina vorzubereiten.

Unter der Annahme, dass die Veränderung der Sauerstoffkonzentrationen von 85 % O<sub>2</sub> auf 21 % O<sub>2</sub> auf die Tiere tatsächlich, wie eine relative Hypoxie wirkt, ist erwartbar, dass die Defizienz von iNOS in der zweiten Phase des Modells eine deutlich bedeutendere Rolle spielen könnte. Als Reaktion auf eine relative Hypoxie ist in der Retina mit einem Anstieg des Transkriptionsfaktors HIF-1- $\alpha$  zu rechnen. Im klassischen OIR-Modell konnte dies während der Regeneration in Normoxie bereits wiederholt belegt werden (Caprara und Grimm, 2012). Da bereits Nachweise darüber vorliegen, dass HIF-1- $\alpha$  die Expression von iNOS induzieren kann (Palmer *et al.*, 1998; He *et al.*, 2007), könnte es folglich in der zweiten Phase des Modells zu einer verstärkten NO-Ausschüttung durch eine Zunahme von iNOS in der Retina kommen. Solche Vorgänge konnten im OIR-Modell bereits beobachtet werden (Sennlaub *et al.*, 2001). Das Enzym iNOS schien dabei sogar direkte Auswirkungen auf die Neovaskularisation der Netzhaut zu haben. In iNOS-KO-Mäusen, die neben den Kontrolltieren in dem OIR-Modell gehalten wurden, konnte beispielsweise eine signifikant geringere intravitreale Gefäßneubildung dokumentiert werden. Neue Gefäße entwickelten sich unter den normoxischen Bedingungen der zweiten Phase des OIR-Modells dagegen deutlich physiologischer und intraretinal. Dies wurde zumindest teilweise damit erklärt, dass in Wt-Tieren durch die vermehrte Expression von iNOS eine erhöhte NO-Konzentration in der Retina vorläge, die VEGFR-2 herunterregulieren und somit zu einer verminderten Angiogenese führen

würde (Sennlaub *et al.*, 2001). Basierend darauf, könnte in dem aktuellen Forschungsprojekt bei den iNOS-KO-Tieren eine günstigere und physiologischere Angiogenese als in den Wt-Tieren erwartet werden. Die histologische Darstellung der Gefäße, insbesondere in Form von *flatmounts* wird dabei spannend zu betrachten und sicher aufschlussreich sein. Eine interessante Ergänzung könnte ein quantitativer Nachweis auf Proteinebene von iNOS in der Wildtypretina sein, um einen möglichen Anstieg, ausgelöst durch die Regeneration in Normoxie, im Vergleich zu P90 Wildtypkontrolltieren detektieren zu können.

## 5 Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der bronchopulmonalen Dysplasie (BPD), welches primär auf eine erhöhte Sauerstoffkonzentration bei Beatmung nach einer Frühgeburt zurückgeführt wird, ist auch mit pathologischen Veränderungen der Retina assoziiert. Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit sollten die Effekte einer unmittelbar postnatalen 14-tägigen Hyperoxie (85 % O<sub>2</sub>) in einem BPD-Mausmodell im Vergleich zur Haltung in Normoxie (21 % O<sub>2</sub>) auf die Retina und insbesondere ihr Gefäßsystem untersucht werden.

Neben Wildtyptieren (Wt) wurden auch iNOS-KO-Tiere in diesem Mausmodell untersucht. Bei anderen Erkrankungen in Lunge und Auge sind bei Inhibition bzw. Knockout von iNOS bereits Ergebnisse zu protektiven Auswirkungen bekannt.

Mittels RT-PCR wurde das Vorhandensein bzw. Fehlen der iNOS-Expression in den Netzhäuten der verschiedenen Versuchsgruppen am postnatalen Tag 14 (P14) geprüft. Im Anschluss wurden Immunfluoreszenzfärbungen der Retinagesäße sowie der Makro- und Mikroglia an *flatmounts* und Vertikalschnitten aller vier Versuchsgruppen durchgeführt. Zusätzlich wurde die Dicke der gesamten Retina sowie der äußeren (ONL) und inneren Körnerschicht (INL) gemessen.

Die Ergebnisse zeigten eine Expression von iNOS auf mRNA-Ebene an P14 nur in der Retina von Wt-Mäusen in Normoxie und Hyperoxie. In den Netzhäuten von Wt- und iNOS-KO-Tieren konnte bei Normoxie ein vergleichbar ausgebildetes, gefäßähnliches Netzwerk aus Astrozyten bis in die Peripherie nachgewiesen werden. Parallel dazu wurde jeweils ein für P14 altersentsprechend intaktes retinales Gefäßsystem aufgefunden. Durch die iNOS-Defizienz konnten bei normoxischer Haltung keine Veränderungen des Gefäßphänotyps oder des Entwicklungsgrades vom superfiziellen, tiefen oder intermediären Gefäßplexus beobachtet werden.

Nach hyperoxischer Haltung zeigte sich in den beiden Mauslinien im Vergleich dazu ein pathologisch verändertes Bild. Auch hier waren Astrozyten bis in die Peripherie nachweisbar, jedoch war die Vereinigung der Zellen zu einem Gefäßstemplate gestört, die Astrozyten lagen zentral isoliert vor und bildeten keine gemeinsamen gefäßähnlichen Strukturen aus. Die zweiwöchige Haltung in Hyperoxie führte zu einem vollständigen Ausbleiben der retinalen Angiogenese, sodass die Netzhäute der Wt- und iNOS-KO-Mäuse avaskulär waren. In Einzelfällen fanden sich jedoch kleine, isolierte Gefäßknäuel. Eine Zunahme persistierender hyaloidaler Gefäße des embryonalen Gefäßsystems zeigte sich unter Hyperoxie in beiden Mauslinien. Zusätzlich konnte eine signifikante Abnahme der retinalen Gesamtdicke im Vergleich zu den Normoxie-Tieren ermittelt werden.

Als Unterschied zwischen den Wt- und iNOS-KO-Mäusen konnte an P14 unter Hyperoxie bei den iNOS-KO-Tieren eine signifikante Abnahme der Gesamtretina- und ONL-Dicke und unter Normoxie eine signifikante Abnahme der Gesamtretina-, ONL- und auch INL-Dicke im Vergleich zu den Wt-Kontrolltieren festgestellt werden.

Die Untersuchung der angefärbten Mikroglia ergab keine eindeutigen Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen.

Zusammenfassend führte bei Wt- und iNOS-KO-Mäusen eine unmittelbar postnatal erhöhte Sauerstoffkonzentration von 85 % O<sub>2</sub> also gleichermaßen zu einer Störung des Gefäßtemplates aus Astrozyten verbunden mit einer Verhinderung der physiologischen retinalen Angiogenese, was die Persistenz des embryonalen Gefäßsystems in diesen Präparaten begründen könnte. In Wildtyptieren scheint iNOS ein positiver Faktor für die Aufrechterhaltung der regulären Dicke der Retinaschichten zu sein.

## 6 Summary

Bronchopulmonary dysplasia (BPD), which is primarily caused by increased oxygen concentration during ventilation after premature birth, is often associated with pathological changes in the retina. The aim of this study was to investigate the impact of postnatal exposure to hyperoxia (85 % O<sub>2</sub>) for 14 days in a BPD mouse model compared to exposure to normoxia (21 % O<sub>2</sub>) on the retina and in particular on its vascular system. In addition to wild-type (Wt) animals, also iNOS-KO animals were studied in the BPD model. Inhibition or knockout of iNOS was already shown to have protective effects regarding other lung and eye diseases.

RT-PCR was used to check for the presence or absence of iNOS expression in retinas of the four research groups at postnatal day 14 (P14). Immunofluorescence staining of retinal blood vessels, microglia and macroglia was done on flatmounts and cryosections. Also the thickness of the total retina, the outer nuclear layer (ONL) and the inner nuclear layer (INL) was measured.

In normoxia, retinas of both Wt and iNOS-KO mice showed an equally developed vessel-like network of astrocytes to the periphery. Also at P14 an age-appropriate and intact retinal vascular system was found in both mouse lines. Under normoxic conditions, iNOS deficiency did not lead to changes in the vascular phenotype or the stage of development of the superficial, deep or intermediate vascular plexus.

In contrast, under hyperoxic conditions, both mouse lines showed an abnormal pathological picture. Again, astrocytes were detected up to the periphery, but the special organization of the cells, i.e. forming a vascular template, was disturbed. Especially in the center, astrocytes were isolated and did not form a template for the vessels. The two-week exposure to hyperoxia led to a complete absence of retinal angiogenesis, resulting in avascular retinas in both Wt and iNOS-KO mice. Only in very few cases, isolated small vascular structures were observed in these groups. In addition hyperoxic conditions increased the number of persistent hyaloid vessels of the embryonic vascular system. Moreover there was a significant decrease in total retinal thickness compared to normoxic animals.

In the iNOS-KO mice compared to the Wt control mice at P14 a significant decrease in total retinal as well as ONL thickness was found under hyperoxia and under normoxia a significant decrease in total retinal, ONL and also INL thickness was observed.

Staining of microglia did not show any clear differences between the four experimental groups.

In conclusion high postnatal oxygen levels of 85 % O<sub>2</sub> right after birth lead in Wt and iNOS-KO mice to a disruption of the vascular template formed by astrocytes together with an inhibition of the physiological retinal angiogenesis, presumably reflected by the persistence of embryonic vasculature in these samples. In wild-type animals, iNOS appears to be a positive factor for the maintenance of the regular thickness of the retinal layers.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
bp	<i>base pair</i> / Basenpaare
BPD	<i>bronchopulmonary dysplasia</i> / bronchopulmonale Dysplasie
BSA	Bovines Serum Albumin
Bzw.	Beziehungsweise
Ca.	Circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
cDNA	<i>complementary DNA</i> / komplementäre DNA
CPI	<i>Excellence Cluster Cardio Pulmonary Institute</i>
D.h.	Das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt-destilliertes Wasser
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynucleotide
E	Embryonaler Tag
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i> / endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCL	<i>ganglion cell layer</i> / Ganglienzellschicht
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> / saures Gliafilament-Protein
Ggf.	Gegebenenfalls
H <sub>2</sub> O	Wasser
HA	<i>hyaloid artery</i> / Arteria hyaloidea
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i> / Hypoxie-induzierter Faktor
Hz	Hertz

Iba1	<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
ILM	<i>inner limiting membrane</i> / Innere limitierende Membran
INL	<i>inner nuclear layer</i> / Innere Körnerschicht
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i> / induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IPL	<i>inner plexiform layer</i> / Innere plexiforme Schicht
IS	<i>inner segments</i> / Innensegmente der Photorezeptoren
Iso	Isolectin B4
KO	<i>knockout</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mRNA	Messenger-RNA
MW	Mittelwert
NAPDH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NFL	<i>nerve fiber layer</i> / Nervenfaserschicht
nNOS	<i>neuronal nitric oxide synthase</i> / neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	<i>nitric oxide</i> / Stickstoffmonoxid
NV	Neovaskularisation
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OIR	<i>oxygen-induced retinopathy</i> / Frühgeborenen-Retinopathie
ONL	<i>outer nuclear layer</i> / Äußere Körnerschicht
OS	<i>outer segments</i> / Außensegmente der Photorezeptoren
P	Postnataler Tag
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> / phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> / Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> / Thrombozytenwachstumsfaktor

PFA	Paraformaldehyd
PFV	<i>persistent fetal vasculature</i>
PHPV	<i>persistent hyperplastic primary vitreous</i> / persistierender hyperplastischer primärer Vitreous
PM	<i>pupillary membrane</i> / Pupillarmembran
pmol	Pikomol
RNA	<i>ribonucleic acid</i> / Ribonukleinsäure
ROP	<i>retinopathy of prematurity</i> / Frühgeborenen-Retinopathie
RPE	Retinales Pigmentepithel
rRNA	Ribosomale RNA
RSD	Relative Standardabweichung
RT	<i>reverse transcription</i> / Reverse Transkription
s	Sekunde
SGC	<i>soluble guanylyl cyclase</i> / lösliche Guanylatzyklase
tRNA	Transfer-RNA
TVL	Tunica vasculosa lentis
U	<i>enzyme unit</i> / Enzym-Einheit
U.a.	Unter anderem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> / vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i> / vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor
VHP	Vasa hyaloidea propria
vs.	Versus
z.B.	Zum Beispiel
$\alpha$ -SMA	<i><math>\alpha</math>-smooth-muscle-actin</i>
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Mäuseauges im Querschnitt .....	2
Abbildung 2: Aufbau der Retina .....	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung der entwicklungsbedingten Rückbildung des embryonalen Gefäßsystems im Auge der Maus .....	5
Abbildung 4: Retinale Einwanderung der Mikroglia in die Netzhaut der Maus .....	6
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zellentwicklung von Astrozyten in der Mäuseretina.....	8
Abbildung 6: Endothelzellen während der sprießenden retinalen Angiogenese in der Mäuseretina.....	10
Abbildung 7: Retinales Gefäßsystem in der Mäusenetzhaut .....	12
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Krankheitsverlaufs der Frühgeborenen-Retinopathie .....	13
Abbildung 9: NO-Synthese.....	15
Abbildung 10: Schematischer Aufbau des klassischen OIR-Mausmodells für die Frühgeborenen-Retinopathie .....	17
Abbildung 11: Schematische Darstellung des im Forschungsprojekt verwendeten Mausmodells.....	27
Abbildung 12: Schematische (A-C) und exemplarische (a-c) Darstellung einer <i>flatmount</i> -Präparation.....	34
Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der Herstellung von Gefrierschnitten.....	36
Abbildung 14: Positionierung der verschiedenen Aufnahmen für die Mikroglia-Zählung in <i>flatmounts</i> .....	42
Abbildung 15: Exemplarisch mit DAPI gefärbter Gefrierschnitt eines Mäuseauges zur Vermessung der verschiedenen Retinaschichten.....	44
Abbildung 16: RT-PCR zum Nachweis von iNOS (A) und GAPDH (B).....	45
Abbildung 17: Vergleich der GFAP-Expression in <i>flatmounts</i> von Wt- und iNOS-KO-Mäusen aus verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21 % und 85 % O <sub>2</sub> ) .....	47
Abbildung 18: GFAP-Expression des zentralen retinalen Astrozytennetzwerkes in Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus 21 % O <sub>2</sub> .....	48

Abbildung 19: GFAP-Expression des peripheren retinalen Astrozytennetzwerkes in Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus 21 % O <sub>2</sub> .....	50
Abbildung 20: GFAP-Expression der Astrozyten zentral der Retina in Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus 85 % O <sub>2</sub> .....	51
Abbildung 21: GFAP-Expression der Astrozyten in der peripheren Retina von Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus 85 % O <sub>2</sub> .....	53
Abbildung 22: Vergleich der retinalen Gefäßentwicklung in <i>flatmounts</i> von Wt- und iNOS KO-Mäusen aus verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21 % / 85 % O <sub>2</sub> ) .....	54
Abbildung 23: Vergleich der retinalen Gefäßentwicklung in Vertikalschnitten von Wt- und iNOS KO-Mäusen aus verschiedenen Sauerstoffverhältnissen (21 % / 85 % O <sub>2</sub> ).....	55
Abbildung 24: Zentrale Gefäße des superfiziellen Plexus (Iso, grün) in <i>flatmounts</i> von Wt- (A-D) und iNOS-KO- (a-d) Mäusen aus Normoxie mit zusätzlicher Doppelfärbung mit GFAP (lila) und DAPI (blau) .....	57
Abbildung 25: Kolokalisation des peripheren Gefäßnetzwerkes vom superfiziellen Plexus (Iso) und des Astrozytennetzwerkes (GFAP) in Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus Normoxie .....	58
Abbildung 26: Periphere Ausdehnung der drei retinalen Gefäßplexus (Isolectin, grün) im <i>flatmount</i> einer Wt-Maus (A-C) bei niedriger Vergrößerung und einer iNOS-KO-Maus (a-c) bei hoher Vergrößerung aus Normoxie .....	59
Abbildung 27: Tiefer Plexus (Iso, grün) in <i>flatmounts</i> von Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus Normoxie .....	60
Abbildung 28: Intermediärer Plexus (Isolectin, grün) in <i>flatmounts</i> von Wt- (A-D) und iNOS-KO- (a-d) Mäusen aus Normoxie (21 % O <sub>2</sub> ).....	62
Abbildung 29: Zentrale mit Isolectin (grün) gefärbte <i>flatmount</i> -Aufnahmen von Wt- und iNOS-KO-Mäusen aus 85 % O <sub>2</sub> .....	64
Abbildung 30: Einzelfälle von "Gefäßgittern" und "Gefäßknäueln", dargestellt mit Isolectin (grün), in der sonst avaskulären Retina von Wt- (A-C) und iNOS-KO- (a-c) Mäusen aus 85 % O <sub>2</sub> .....	66
Abbildung 31: α-SMA-Expression der zentralen Gefäße des superfiziellen Plexus bei Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus 21 % O <sub>2</sub> .....	67
Abbildung 32: α-SMA-Expression eines zentralen Gefäßes des superfiziellen Plexus einer Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Maus aus Normoxie bei höchster Vergrößerung .....	68

Abbildung 33: $\alpha$ -SMA -Expression kleiner, peripherer Gefäße des superfiziellen Plexus von Wt- (A, B) und iNOS- KO- (a, b) Mäusen aus 21 % O <sub>2</sub> .....	69
Abbildung 34: $\alpha$ -SMA-Expression in Gefäßen des tiefen Plexus von Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus 21 % O <sub>2</sub> .....	70
Abbildung 35: Während der Präparation aufgefundene hyaloidale Gefäße im Glaskörper von Wt-Mäusen bei 21 % und 85 % O <sub>2</sub> ; repräsentativ für beide Mauslinien .....	71
Abbildung 36: Gefrierschnitte von Wt- und iNOS-KO-Mäusen unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen (21 % / 85 % O <sub>2</sub> ) mit Überresten hyaloidaler Gefäße im Glaskörper.....	73
Abbildung 37: Zentrale Befunde hyaloidaler Gefäße in <i>flatmounts</i> von Wt- und iNOS-KO-Mäusen aus verschiedenen Sauerstoffbedingungen (21 % O <sub>2</sub> / 85 % O <sub>2</sub> ) .....	74
Abbildung 38: <i>Flatmounts</i> von Wt- (A, B) und iNOS-KO- (a, b) Mäusen aus Hyperoxie (85 % O <sub>2</sub> ) mit hyaloidalen Gefäßbündeln.....	75
Abbildung 39: Doppelmarkierungen der mit Isolectin (grün) markierten hyaloidalen Gefäße und GFAP (links, lila) und $\alpha$ -SMA (rechts, rot) in einer vaskulären Retina einer Wt-Maus aus 21 % O <sub>2</sub> .....	77
Abbildung 40: Verteilung der Mikrogliazellen in Vertikalschnitten der Retina von Wt- und iNOS-KO-Mäusen aus verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21 % / 85 % O <sub>2</sub> ) ...	79
Abbildung 41: Mikrogliazellen in <i>flatmounts</i> von Wt- (A-C) und iNOS-KO- (a-c) Mäusen aus Normoxie .....	82
Abbildung 42: Mikrogliazellen in <i>flatmounts</i> von Wt- (A-C) und iNOS-KO- (a-c) Mäusen aus Hyperoxie .....	83
Abbildung 43: Boxplot-Diagramm zu Ergebnissen der Mikrogliazählung .....	84
Abbildung 44: Ergebnisse der Gesamtdickenmessung dargestellt in einem Boxplot-Diagramm.....	86
Abbildung 45: Boxplot-Diagramm zu Ergebnissen der ONL-Dickenmessungen .....	87
Abbildung 46: Boxplot-Diagramm zu Ergebnissen der INL-Dickenmessungen .....	88

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchslösungen und Chemikalien unter Angabe der Hersteller in alphabetischer Reihenfolge.....	19
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge unter Nennung der Hersteller .....	20
Tabelle 3: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen aus eigener Herstellung in alphabetischer Reihenfolge.....	21
Tabelle 4: Weitere verwendete Puffer unter Angabe der Hersteller in alphabetischer Reihenfolge .....	22
Tabelle 5: Verwendete Kit-Systeme unter Angabe der Bestellnummer und Hersteller in alphabetischer Reihenfolge.....	22
Tabelle 6: Verwendete Enzyme und Marker unter Angabe der Hersteller in alphabetischer Reihenfolg.....	22
Tabelle 7: Verwendete Primer mit Angabe der internen Nummer, der Primersequenz und der erwarteten Produktlänge für jedes Primerpaar .....	23
Tabelle 8: Verwendete Primärantikörper und Lektine unter Nennung der Bestellnummer, Wirtsspezies, Verdünnungsstufe und Hersteller .....	23
Tabelle 9: Verwendete Sekundärantikörper unter Nennung der Bestellnummer, Wirtsspezies, Reaktivität, Verdünnungsstufe und Hersteller.....	24
Tabelle 10: Verwendete Geräte unter Angabe der Hersteller in alphabetischer Reihenfolge .....	25
Tabelle 11: Verwendete Softwareapplikationen unter Angabe der Hersteller in alphabetischer Reihenfolge.....	25
Tabelle 12: Ansatz für den RNA-Template-Mix (10 µl) bei der cDNA-Synthese .....	29
Tabelle 13: Ansatz für die Reaktionsmischung (20 µl) bei der cDNA-Synthese .....	29
Tabelle 14: Thermocycler-Protokoll der cDNA-Synthese.....	29
Tabelle 15: PCR-Reaktionsansatz (iNOS) zu je 10 µl.....	30
Tabelle 16: Thermocycler-Protokoll für die PCR (iNOS).....	31
Tabelle 17: PCR-Reaktionsansatz (GAPDH) zu je 25 µl .....	31
Tabelle 18: Thermocycler-Protokoll für die PCR (GAPDH).....	31

Tabelle 19: Ergebnisse Mikrogliazählung.....84

## 10 Literaturverzeichnis

- Abu El-Asrar, A.M., Meersschaert, A., Dralands, L., Missotten, L. und Geboes, K. (2004) 'Inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor are colocalized in the retinas of human subjects with diabetes', *Eye*, 18, S. 306–313. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6700642>.
- Ahmad, K.A., Frey, C.S., Fierro, M.A., Kenton, A.B. und Placencia, F.X. (2017) 'Two-Year Neurodevelopmental Outcome of an Infant Born at 21 Weeks' 4 Days' Gestation', *Pediatrics*, 140(6), S. e20170103. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1542/peds.2017-0103>.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E. und Knowles, R.G. (2001) 'Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition', *The Biochemical Journal*, 357(Pt 3), S. 593–615. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570593>.
- Anand-Apte, B. und Hollyfield, J.G. (2010) 'Developmental Anatomy of the Retinal and Choroidal Vasculature', in *Encyclopedia of the Eye*. Academic Press, S. 9–15. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374203-2.00169-X>.
- Bischoff, P.M., Wajer, S.D. und Flower, R.W. (1983) 'Scanning electron microscopic studies of the hyaloid vascular system in newborn mice exposed to O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>', *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 220(6), S. 257–263. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/BF00231352>.
- Bucher, F., Stahl, A., Agostini, H.T. und Martin, G. (2013) 'Hyperoxia causes reduced density of retinal astrocytes in the central avascular zone in the mouse model of oxygen-induced retinopathy', *Molecular and Cellular Neurosciences*, 56, S. 225–233. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.06.001>.
- Caprara, C. und Grimm, C. (2012) 'From oxygen to erythropoietin: Relevance of hypoxia for retinal development, health and disease', *Progress in Retinal and Eye Research*, 31(1), S. 89–119. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.11.003>.
- Carmeliet, P. (2003) 'Angiogenesis in health and disease', *Nature Medicine*, 9(6), S. 653–660. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nm0603-653>.
- Chan-Ling, T., Chu, Y., Baxter, L., Weible li, M. und Hughes, S. (2009) 'In vivo characterization of astrocyte precursor cells (APCs) and astrocytes in developing rat retinae: differentiation, proliferation, and apoptosis', *Glia*, 57(1), S. 39–53. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/glia.20733>.
- Chen, C., Xiao, H. und Ding, X. (2019) 'Persistent Fetal Vasculature', *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*, 8(1), S. 86–95. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.22608/APO.201854>.
- Chiang, M.F. et al. (2021) 'International Classification of Retinopathy of Prematurity, Third Edition', *Ophthalmology*, 128(10), S. e51–e68. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.optha.2021.05.031>.
- Chiou, G.C.Y. (2001) 'Review: Effects of Nitric Oxide on Eye Diseases and Their Treatment', *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 17(2), S. 189–198. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1089/10807680151125555>.

- Cinelli, M.A., Do, H.T., Miley, G.P. und Silverman, R.B. (2020) 'Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition', *Medicinal Research Reviews*, 40(1), S. 158–189. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/med.21599>.
- Cooke, J.P. (2003) 'NO and angiogenesis', *Atherosclerosis Supplements*, 4(4), S. 53–60. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S1567-5688\(03\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S1567-5688(03)00034-5).
- Dammann, O., Hartnett, M.E. und Stahl, A. (2023) 'Retinopathy of prematurity', *Developmental Medicine & Child Neurology*, 65(5), S. 625–631. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/dmcn.15468>.
- Dembinska, O., Rojas, L.M., Varma, D.R., Chemtob, S. und Lachapelle, P. (2001) 'Graded contribution of retinal maturation to the development of oxygen-induced retinopathy in rats', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42(5), S. 1111–1118. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11274093/>.
- Dorrell, M.I., Aguilar, E. und Friedlander, M. (2002) 'Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43(11), S. 3500–3510. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12407162/>.
- Eller, A.W., Jabbour, N.M., Hirose, T. und Schepens, C.L. (1987) 'Retinopathy of Prematurity', *Ophthalmology*, 94(4), S. 444–448. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(87\)33457-8](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(87)33457-8).
- Fischer, F., Martin, G. und Agostini, H.T. (2011) 'Activation of retinal microglia rather than microglial cell density correlates with retinal neovascularization in the mouse model of oxygen-induced retinopathy', *Journal of Neuroinflammation*, 8, S. 120. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-120>.
- Fruttiger, M. (2002) 'Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43(2), S. 522–527. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11818400/>.
- Fruttiger, M. (2007) 'Development of the retinal vasculature', *Angiogenesis*, 10(2), S. 77–88. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s10456-007-9065-1>.
- Fruttiger, M., Calver, A.R., Krüger, W.H., Mudhar, H.S., Michalovich, D., Takakura, N., Nishikawa, S. und Richardson, W.D. (1996) 'PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina', *Neuron*, 17(6), S. 1117–1131. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80244-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80244-5).
- Gariano, R.F. und Gardner, T.W. (2005) 'Retinal angiogenesis in development and disease', *Nature*, 438(7070), S. 960–966. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nature04482>.
- Gergely, K. und Gerinec, A. (2011) 'A consonant construction of the hyaloid and retinal vascular systems by the angiogenic process', *Bratislavské Lekárske Listy*, 112(3), S. 143–151. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21452767/>.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C. und Alitalo, K. (2003) 'VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia', *The Journal of Cell Biology*, 161(6), S. 1163–1177. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1083/jcb.200302047>.

- Graymore, C. (1959) 'Metabolism of the developing retina. I. Aerobic and anaerobic glycolysis in the developing rat retina', *The British Journal of Ophthalmology*, 43(1), S. 34–39. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1136/bjo.43.1.34>.
- Graymore, C. (1960) 'Metabolism of the developing retina. III. Respiration in the developing normal rat retina and the effect of an inherited degeneration of the retinal neuroepithelium', *The British Journal of Ophthalmology*, 44(6), S. 363–369. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1136/bjo.44.6.363>.
- Grehn, F. (2019) *Augenheilkunde*. 32. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-59154-3>.
- Gu, X., Samuel, S., El-Shabrawey, M., Caldwell, R.B., Bartoli, M., Marcus, D.M. und Brooks, S.E. (2002) 'Effects of sustained hyperoxia on revascularization in experimental retinopathy of prematurity', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43(2), S. 496–502. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11818396/>.
- Guo, L., Choi, S., Bikkannavar, P. und Cordeiro, M.F. (2022) 'Microglia: Key Players in Retinal Ageing and Neurodegeneration', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16, S. 804782. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.804782>.
- Hangai, M., Miyamoto, K., Hiroi, K., Tujikawa, A., Ogura, Y., Honda, Y. und Yoshimura, N. (1999) 'Roles of Constitutive Nitric Oxide Synthase in Postischemic Rat Retina', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40(2), S. 450–458. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9950605/>.
- He, T., Ai, M., Zhao, X.-H. und Xing, Y.-Q. (2007) 'Inducible nitric oxide synthase mediates hypoxia-induced hypoxia-inducible factor-1 alpha activation and vascular endothelial growth factor expression in oxygen-induced retinopathy', *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 74(6), S. 336–343. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1159/000110027>.
- Henking, P. und De Oliveira, L.F. (1967) 'Development of retinal vessels in the rat', *Investigative Ophthalmology*, 6(5), S. 520–530. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4168727/>.
- Hu, A., Schmidt, M.H.H. und Heinig, N. (2024) 'Microglia in retinal angiogenesis and diabetic retinopathy', *Angiogenesis*, 27(3), S. 311–331. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s10456-024-09911-1>.
- Hurst, J., Mueller-Buehl, A.M., Hofmann, L., Kuehn, S., Herms, F., Schnichels, S. und Joachim, S.C. (2020) 'iNOS-inhibitor driven neuroprotection in a porcine retina organ culture model', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(7), S. 4312–4323. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/jcmm.15091>.
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M.F.P. und Yong, W.H. (2019) 'An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining', *Methods in Molecular Biology*, 1897, S. 299–311. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26).
- Ito, M. und Yoshioka, M. (1999) 'Regression of the hyaloid vessels and pupillary membrane of the mouse', *Anatomy and Embryology*, 200(4), S. 403–411. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s004290050289>.
- Jobe, A.H. (2011) 'The new bronchopulmonary dysplasia', *Current Opinion in Pediatrics*, 23(2), S. 167–172. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e3283423e6b>.

- Kleinert, H., Schwarz, P.M. und Förstermann, U. (2003) 'Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase', *Biological Chemistry*, 384(10–11), S. 1343–1364. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1515/BC.2003.152>.
- Koolman, J., Röhm, K.-H., Wirth, J. und Wirth, N. (2019) *Taschenatlas Biochemie des Menschen*. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1055/b-006-161663>.
- Lajko, M., Cardona, H.J., Taylor, J.M., Shah, R.S., Farrow, K.N. und Fawzi, A.A. (2016) 'Hyperoxia-Induced Proliferative Retinopathy: Early Interruption of Retinal Vascular Development with Severe and Irreversible Neurovascular Disruption', *PloS One*, 11(11), S. e0166886. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166886>.
- Lang, R.A. und Bishop, J.M. (1993) 'Macrophages are required for cell death and tissue remodeling in the developing mouse eye', *Cell*, 74(3), S. 453–462. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80047-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80047-i).
- Li, F., Jiang, D. und Samuel, M.A. (2019) 'Microglia in the developing retina', *Neural Development*, 14(1), S. 12. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/s13064-019-0137-x>.
- Li, X., Liu, Jing, Hoh, J. und Liu, Ju (2019) 'Müller cells in pathological retinal angiogenesis', *Translational Research*, 207, S. 96–106. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.12.006>.
- Liu, C.-H., Wang, Z., Sun, Y. und Chen, J. (2017) 'Animal models of ocular angiogenesis: from development to pathologies', *The FASEB Journal*, 31(11), S. 4665–4681. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1096/fj.201700336R>.
- Liu, Y., Christou, H., Morita, T., Laughner, E., Semenza, G.L. und Kourembanas, S. (1998) 'Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5' enhancer', *The Journal of Biological Chemistry*, 273(24), S. 15257–15262. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.24.15257>.
- Lüllmann-Rauch, R. und Asan, E. (2019) *Taschenlehrbuch Histologie*. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: George Thieme Verlag. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1055/b-006-163361>.
- Lutty, G.A. und McLeod, D.S. (2018) 'Development of the hyaloid, choroidal and retinal vasculatures in the fetal human eye', *Progress in Retinal and Eye Research*, 62, S. 58–76. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.10.001>.
- Mahabadi, N. und Al Khalili, Y. (2024) 'Neuroanatomy, Retina', in *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545310/>.
- Mattila, J.T. und Thomas, A.C. (2014) 'Nitric Oxide Synthase: Non-Canonical Expression Patterns', *Frontiers in Immunology*, 5. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00478>.
- McMenamin, P.G., Kenny, R., Tahija, S., Lim, J., Naranjo Golborne, C., Chen, X., Bouch, S., Sozo, F. und Bui, B. (2016) 'Early Postnatal Hyperoxia in Mice Leads to Severe Persistent Vitreoretinopathy', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(15), S. 6513–6526. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19928>.
- Melincovici, C.S., Boşca, A.B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I.M., Roman, A.L. und Mişu, C.M. (2018) 'Vascular endothelial growth factor

(VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis', *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 59(2), S. 455–467. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30173249/>.

Minhas, R., Bansal, Y. und Bansal, G. (2020) 'Inducible nitric oxide synthase inhibitors: A comprehensive update', *Medicinal Research Reviews*, 40(3), S. 823–855. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/med.21636>.

Moncada, S. und Erusalimsky, J.D. (2002) 'Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis?', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(3), S. 214–220. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nrm762>.

Morita, A., Ushikubo, H., Mori, A., Arima, S., Sakamoto, K., Nagamitsu, T., Ishii, K. und Nakahara, T. (2017) 'A delay in vascularization induces abnormal astrocyte proliferation and migration in the mouse retina', *Developmental Dynamics*, 246(3), S. 186–200. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/dvdy.24484>.

Müller, B., Goodman, S.M. und Peichl, L. (2007) 'Cone Photoreceptor Diversity in the Retinas of Fruit Bats (Megachiroptera)', *Brain, Behavior and Evolution*, 70(2), S. 90–104. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1159/000102971>.

Müller, B., Wagner, F., Lorenz, B. und Stieger, K. (2017) 'Organotypic Cultures of Adult Mouse Retina: Morphologic Changes and Gene Expression', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(4), S. 1930. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20718>.

Murenu, E., Gerhardt, M.-J., Biel, M. und Michalakis, S. (2022) 'More than meets the eye: The role of microglia in healthy and diseased retina', *Frontiers in Immunology*, 13, S. 1006897. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1006897>.

Nardiello, C., Mižíková, I., Silva, D.M., Ruiz-Camp, J., Mayer, K., Vadász, I., Herold, S., Seeger, W. und Morty, R.E. (2017) 'Standardisation of oxygen exposure in the development of mouse models for bronchopulmonary dysplasia', *Disease Models & Mechanisms*, 10(2), S. 185–196. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1242/dmm.027086>.

Nathan, C. (1992) 'Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells', *The FASEB Journal*, 6(12), S. 3051–3064. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.12.1381691>.

Neufeld, A.H., Sawada, A. und Becker, B. (1999) 'Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma', *PNAS*, 96(17), S. 9944–9948. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9944>.

Paisley, C.E. und Kay, J.N. (2021) 'Seeing stars: Development and function of retinal astrocytes', *Developmental Biology*, 478, S. 144–154. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.07.007>.

Palmer, L.A., Semenza, G.L., Stoler, M.H. und Johns, R.A. (1998) 'Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1', *The American Journal of Physiology*, 274(2), S. L212–219. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.274.2.L212>.

Parenti, A., Morbidelli, L., Cui, X.-L., Douglas, J.G., Hood, J.D., Granger, H.J., Ledda, F. und Ziche, M. (1998) 'Nitric Oxide Is an Upstream Signal of Vascular Endothelial Growth

Factor-induced Extracellular Signal-regulated Kinase $\frac{1}{2}$  Activation in Postcapillary Endothelium', *Journal of Biological Chemistry*, 273(7), S. 4220–4226. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.7.4220>.

Perelli, R.M., O'Sullivan, M.L., Zarnick, S. und Kay, J.N. (2021) 'Environmental oxygen regulates astrocyte proliferation to guide angiogenesis during retinal development', *Development*, 148(9), S. dev199418. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1242/dev.199418>.

Pierce, E.A., Foley, E.D. und Smith, L.E. (1996) 'Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity', *Archives of Ophthalmology*, 114(10), S. 1219–1228. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1001/archophth.1996.01100140419009>.

Pipili-Synetos, E., Sakkoula, E., Haralabopoulos, G., Andriopoulou, P., Peristeris, P. und Maragoudakis, M.E. (1994) 'Evidence that nitric oxide is an endogenous antiangiogenic mediator', *British Journal of Pharmacology*, 111(3), S. 894–902. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1994.tb14822.x>.

Poon, A.W.H., Ma, E.X.H., Vadivel, A., Jung, S., Khoja, Z., Stephens, L., Thébaud, B. und Wintermark, P. (2016) 'Impact of bronchopulmonary dysplasia on brain and retina', *Biology Open*, 5(4), S. 475–483. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1242/bio.017665>.

Poulos, T.L. (2006) 'Soluble guanylate cyclase', *Current Opinion in Structural Biology*, 16(6), S. 736–743. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.09.006>.

Pugh, C.W. und Ratcliffe, P.J. (2003) 'Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system', *Nature Medicine*, 9(6), S. 677–684. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nm0603-677>.

Puñal, V.M. *et al.* (2019) 'Large-scale death of retinal astrocytes during normal development is non-apoptotic and implemented by microglia', *PLOS Biology*, 17(10), S. e3000492. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000492>.

Reichenbach, A. und Bringmann, A. (2020) 'Glia of the human retina', *Glia*, 68(4), S. 768–796. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/glia.23727>.

Reinard, T. (2021) *Molekularbiologische Methoden 2.0*. 3., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer (8449). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.36198/9783838587950>.

Ryu, J. (2022) 'New Aspects on the Treatment of Retinopathy of Prematurity: Currently Available Therapies and Emerging Novel Therapeutics', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), S. 8529. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/ijms23158529>.

Saint-Geniez, M. und D'Amore, P.A. (2004) 'Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature', *The International Journal of Developmental Biology*, 48(8–9), S. 1045–1058. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1387/ijdb.041895ms>.

Sakamoto, K., Yonoki, Y., Kubota, Y., Kuwagata, M., Saito, M., Nakahara, T. und Ishii, K. (2006) 'Inducible nitric oxide synthase inhibitors abolished histological protection by late ischemic preconditioning in rat retina', *Experimental Eye Research*, 82(3), S. 512–518. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.08.011>.

- Schindelin, J. *et al.* (2012) 'Fiji: an open-source platform for biological-image analysis', *Nature Methods*, 9(7), S. 676–682. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- Schmidt, A.R. und Ramamoorthy, C. (2022) 'Bronchopulmonary dysplasia', *Pediatric Anesthesia*, 32(2), S. 174–180. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/pan.14365>.
- Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., Wesker, K. und Schünke, M. (2022) *Kopf, Hals und Neuroanatomie*. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag (Prometheus LernAtlas der Anatomie). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1055/b000000615>.
- Seimetz, M. *et al.* (2011) 'Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice', *Cell*, 147(2), S. 293–305. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.035>.
- Selvam, S., Kumar, T. und Fruttiger, M. (2018) 'Retinal vasculature development in health and disease', *Progress in Retinal and Eye Research*, 63, S. 1–19. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.11.001>.
- Sennlaub, F., Courtois, Y. und Goureau, O. (2001) 'Inducible nitric oxide synthase mediates the change from retinal to vitreal neovascularization in ischemic retinopathy', *The Journal of Clinical Investigation*, 107(6), S. 717–725. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1172/JCI10874>.
- Sennlaub, F., Courtois, Y. und Goureau, O. (2002) 'Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy', *The Journal of Neuroscience*, 22(10), S. 3987–3993. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-10-03987.2002>.
- Shastri, B.S. (2009) 'Persistent hyperplastic primary vitreous: congenital malformation of the eye', *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 37(9), S. 884–890. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2009.02150.x>.
- Siekmann, A.F. (2023) 'Biology of vascular mural cells', *Development*, 150(16), S. dev200271. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1242/dev.200271>.
- Silva, D.M.G., Nardiello, C., Pozarska, A. und Morty, R.E. (2015) 'Recent advances in the mechanisms of lung alveolarization and the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia', *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 309(11), S. L1239–L1272. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00268.2015>.
- Silverman, S.M. und Wong, W.T. (2018) 'Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease', *Annual Review of Vision Science*, 4, S. 45–77. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-091517-034425>.
- Singh, J.N., Nowlin, T.M., Seedorf, G.J., Abman, S.H. und Shepherd, D.P. (2017) 'Quantifying three-dimensional rodent retina vascular development using optical tissue clearing and light-sheet microscopy', *Journal of Biomedical Optics*, 22(7), S. 076011. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.7.076011>.
- Smith, L.E., Wesolowski, E., McLellan, A., Kostyk, S.K., D'Amato, R., Sullivan, R. und D'Amore, P.A. (1994) 'Oxygen-induced retinopathy in the mouse', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 35(1), S. 101–111. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7507904/>.

- Stahl, A., Connor, K.M., Sapieha, P., Chen, J., Dennison, R.J., Krah, N.M., Seaward, M.R., Willett, K.L. und Aderman, C.M. (2010) 'The mouse retina as an angiogenesis model', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(6), S. 2813–2826. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5176>.
- Stoll, B.J. *et al.* (2015) 'Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012', *JAMA*, 314(10), S. 1039–1051. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1001/jama.2015.10244>.
- Stone, J., Itin, A., Alon, T., Pe'er, J., Gnessin, H., Chan-Ling, T. und Keshet, E. (1995) 'Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia', *The Journal of Neuroscience*, 15(7 Pt 1), S. 4738–4747. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-07-04738.1995>.
- Tedeschi, T., Lee, K., Zhu, W. und Fawzi, A.A. (2022) 'Limited hyperoxia-induced proliferative retinopathy: A model of persistent retinal vascular dysfunction, preretinal fibrosis and hyaloidal vascular reprogramming for retinal rescue', *PLOS ONE*, 17(4), S. e0267576. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267576>.
- Toda, N. und Nakanishi-Toda, M. (2007) 'Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy', *Progress in Retinal and Eye Research*, 26(3), S. 205–238. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2007.01.004>.
- Uemura, A. (2006) 'Tlx acts as a proangiogenic switch by regulating extracellular assembly of fibronectin matrices in retinal astrocytes', *Journal of Clinical Investigation*, 116(2), S. 369–377. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1172/JCI25964>.
- Vecino, E., Rodriguez, F.D., Ruzafa, N., Pereiro, X. und Sharma, S.C. (2016) 'Glia-neuron interactions in the mammalian retina', *Progress in Retinal and Eye Research*, 51, S. 1–40. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.003>.
- Wang, Z., Liu, C.-H., Huang, S. und Chen, J. (2019) 'Assessment and Characterization of Hyaloid Vessels in Mice', *Journal of Visualized Experiments*, (147), S. 59222. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3791/59222>.
- Weinberger, B., Laskin, D.L., Heck, D.E. und Laskin, J.D. (2002) 'Oxygen Toxicity in Premature Infants', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 181(1), S. 60–67. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1006/taap.2002.9387>.
- West, H., Richardson, W.D. und Fruttiger, M. (2005) 'Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes', *Development*, 132(8), S. 1855–1862. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1242/dev.01732>.
- Zarkada, G., Howard, J.P., Xiao, X., Park, H., Bizou, M., Leclerc, S., Künzel, S.E., Boisseau, B. und Li, J. (2021) 'Specialized endothelial tip cells guide neuroretina vascularization and blood-retina-barrier formation', *Developmental Cell*, 56(15), S. 2237–2251.e6. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.06.021>.
- Zeiss, C.J., Tu, D.C., Phan, I., Wong, R. und Treuting, P.M. (2018) 'Special Senses', in *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)*. Academic Press (A Mouse, Rat, and Human Atlas), S. 445–470. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00021-X>.

Zhang, Q., Zhang, J., Guan, Y., Zhang, S., Zhu, C., Xu, G.-T. und Wang, L. (2009) 'Suppression of retinal neovascularization by the iNOS inhibitor aminoguanidine in mice of oxygen-induced retinopathy', *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 247(7), S. 919–927. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00417-009-1066-x>.

Zhang, Y., Porat, R.M., Alon, T., Keshet, E. und Stone, J. (1999) 'Tissue oxygen levels control astrocyte movement and differentiation in developing retina', *Developmental Brain Research*, 118(1–2), S. 135–145. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(99\)00140-6](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(99)00140-6).

## 11 Publikationsverzeichnis

### Posterpräsentation:

Schulze zur Wiesch, C., Müller, B., Lytvynchuk, L., Stieger, K., 2024. *Effects of 85 % hyperoxia after 14 days postnatally on retinal angiogenesis in iNOS-KO and wild-type mice*. 18. Pro Retina Research-Colloquium in Potsdam, Mai 2024

### Vorträge:

Schulze zur Wiesch, C., *Analysis of the effects of 85 % hyperoxia during p1-p14 on retinal angiogenesis in iNOS-KO and wild-type mice*. Ophthalmology Retreat in Rauschholzhausen, Februar 2024

Schulze zur Wiesch, C., *Analyse der Auswirkungen von 85 prozentiger Hyperoxie während P1-P14 auf die retinale Angiogenese in iNOS-KO- und Wildtypmäusen*. Ophthalmology Retreat in Marburg, September 2024

## 12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort/Datum

---

Unterschrift

## 13 Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle bei Prof. Dr. Dr. Knut Stieger für das Überlassen des Themas dieser Arbeit, den spannenden wissenschaftlichen Austausch und die ausgezeichnete Betreuung während meiner Forschungszeit bedanken.

Meiner Betreuerin, Dr. Brigitte Müller, danke ich für die hervorragende und sehr geduldige 1:1-Betreuung bei der Einarbeitung in die Methoden der Netzhautpräparation und Immunhistochemie, die mir einen exzellenten Einstieg in das praktische wissenschaftliche Arbeiten ermöglichte. Die Zusammenarbeit hat mir viel Freude bereitet und ich bin dankbar, dass ich während des gesamten Schaffensprozesses so warmherzig unterstützt wurde und zu allen Uhrzeiten eine Ansprechmöglichkeit bezüglich des Projektes hatte.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Maria Weller, Dr. Tobias Wimmer, Annabella Janise-Libawski, Bärbel Fühler, Bettina Gill, Kerstin Walther, Fatimah Alabudeeb, Lasse Stöhr, und Luca Jährling aus der AG Experimentelle Ophthalmologie, die mich so herzlich aufgenommen haben, jederzeit hilfsbereit waren, mir auch in schwierigen Zeiten großartig beistanden, immer ein offenes Ohr für mich hatten und die Zeit im Labor für mich so sehr bereicherten. Ich habe mich bei Euch unglaublich wohl gefühlt, denke immer wieder gerne an die gemeinsame Zeit voller lustiger Momente zurück und bin glücklich über die hier entstandenen Freundschaften.

Außerdem möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Freund Anton und meiner Familie für die unendliche Unterstützung und Nachsicht bedanken, die sie mir während dieser Zeit entgegengebracht haben. Meinem Vater danke ich darüber hinaus dafür, dass er mich für die Wissenschaft inspiriert und begeistert hat, und ich seine Tätigkeit nun umso mehr zu schätzen weiß.